รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

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

อ.ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์
อ.ดร. นันทิกา คงเจริญพร
นายศุภกิจ ศรีสวัสดิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802369
สัญญาเลขที่ 79/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch)

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

อ.ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์
อ.ดร. นันทิกา คงเจริญพร
นายศุภกิจ ศรีสวัสดิ์
คณะวิทยาศาสตร์

มีนาคม พ.ศ.2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558 มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการต่อเนื่อง 2 ปี (พ.ศ.2558 – 2559) ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 78/2558

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 2558A10802369/ สัญญาเลขที่ 79/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 850,000 บาท (แปดแสนห้าหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี 5 เดือน (ระหว่างวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ.2557 - 23 มีนาคม พ.ศ.2559

บทคัดย่อ

พอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวถูกผลิตขึ้นโดยนำไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) มาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c 3 ตัว จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดกระตุ้นจำนวน 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน เก็บแอนติซีรัมจากหนูเมาส์ (PAb-seabass VTG) มาตรวจสอบความจำเพาะกับไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะพงขาว โดยเทคนิค western blot เทคนิค dot blot และเทคนิค Immunohistochemistry และตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในเลือดปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 โดยเทคนิค western blot พบว่า PAb-sea bass VTG ที่ได้จากหนูทั้ง 3 ตัว สามารถจับกับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากปลากะพงขาว ขนาด 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตันได้ และ สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาลอ่อน กับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และลำไส้ของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 และในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามพบเพียงพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 ที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในเลือดปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 ขนาด 210 และ 140 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PAb-sea bass VTG จากหนูตัวที่สอง สามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้ทั้งในปลากะพงขาวและปลานิลได้ นำม้ามจากหนูทั้ง 3 ตัวไปหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำนวน 3 ครั้ง ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 11 โคลน เพื่อทำการตรวจสอบลักษณะสมบัติ ความจำเพาะและความไวในการประยุกต์ใช้ในเทคนิคทางแอนติบอดีต่อไป

ผลผลิต

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้

นวลปรางค์ เกิดมณี อวัสดา ไหมทอง ศุภกิจ ศรีสวัสดิ์ และ พอจิต นันทนาวัฒน์. 2558. การชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน (*Lates calcarifer*) ด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7*, (BI-P002 หน้า 1-7). พิษณุโลก; มหาวิทยาลัยนเรศวร

สุทธิกา ฤทธิ์โพธิ์ อัญชนา พิมพ์โปร่ง วิชชุดา ประสาทแก้ว และ พอจิต นันทนาวัฒน์. 2558. การแยกไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7*, (BI-P 072 หน้า 1-6). พิษณุโลก; มหาวิทยาลัยนเรศวร

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยและการประยุกต์ผลการวิจัย

ได้ผลผลิตกึ่งกลางของโครงการต่อเนื่อง 2 ปีในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ ได้พอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน (PAb seabass-VTG) ที่ผลิตได้มีสมบัติเพียงพอที่จะนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาวที่ได้รับฮอร์โมนได้ในระดับหนึ่ง พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว และยังเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับไวเทลโลเจนินในปลานิล (*Oreochromis niloticus)* และปลาเก๋าปะการัง (*Epinephelus corallicola*) จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนิน ในปลา 2 ชนิดนี้ได้ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีต่าง ๆ เช่น Dot blot, Western blot หรือ อิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี เป็นต้น

บทคัดย่อ

พอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวถูกผลิตขึ้นโดยนำไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) มาใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c 3 ตัว จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดกระตุ้นจำนวน 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน เก็บแอนติซีรัมจากหนูเมาส์ (PAb-seabass VTG) มาตรวจสอบความจำเพาะกับไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์จากพลาสมาของปลากะพงขาว โดยเทคนิค western blot เทคนิค dot blot และเทคนิค Immunohistochemistry และตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในเลือดปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 โดยเทคนิค western blot พบว่า PAb-sea bass VTG ที่ได้จากหนูทั้ง 3 ตัว สามารถจับกับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากปลากะพงขาว ขนาด 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัน ได้ และ สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาลอ่อน กับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่อตับ ม้าม และลำไส้ ของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 และในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามพบเพียงพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 ที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในพลาสมาปลานิลและปลาเก๋าปะการังที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 ขนาด 210 และ 140 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PAb-sea bass VTG จากหนูตัวที่ 2 สามารถนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินและประยุกต์ใช้ตรวจสอบในปลานิลและปลาเก๋าปะการังได้ เมื่อนำม้ามจากหนูทั้ง 3 ตัวไปหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จำนวน 3 ครั้ง ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีรวมทั้งสิ้น 11 โคลน เพื่อทำการตรวจสอบลักษณะสมบัติของแอนติบอดีต่อไป

Abstract

Polyclonal antibody specific to vitellogenin was produced using Vitellogenin (VTG) purified from plasma of E_2 treated Asian sea bass as antigen. Three ICR mice were immunized for 3 times at 2 weeks interval. Seven days after last immunization, mice antiserum were collected and tested specificity with purified VTG by western blot, dot blot and immunohistochemistry and tested cross reactivity with plasma of E_2 treatment Tilapia and coral grouper by western blot. All 3 mice antiserum showed the specificity with purified Asian sea bass plasma VTG at 169, 132,112 and 86 kDa and with plasma VTG in tissues of internal organs by showing pale brown in liver, spleen and intestine tissues of E_2 treatment juvenile sea bass. In cross-reactivity testing with E_2 treatment tilapia plasma, only PAb-sea bass VTG from mouse no.2 showed the cross-reactivity with Tilapia and coral grouper plasma protein. This conclude that the PAb-sea bass VTG from mouse no.2 was applicable for use in VTG detection not only in Asian sea bass but also in tilapia and coral grouper as well. All three mice were further use for fusion in monoclonal antibody production protocol. Results from 3 fusions, there are 11 clones of monoclonal antibody specific to Asian seabass vitellogenin for further characterization.

สารบัญ

หน้า

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

บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง..... 7
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 15
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 32

เอกสารอ้างอิง..... 34
ประวัตินักวิจัย..... 37

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3-1 ส่วนผสมในการเตรียม 7.5% Separating Gel และ 4% Stacking Gel 8
4-1 ผลการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน..... 31

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4-1	โครมาโทแกรมของการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว	16
4-2	โครมาโทแกรมของการทำโปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จากการแยกพลาสมาปลากะพงขาว หลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300	17
4-3	รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาปลากะพงขาวและไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 โดยเทคนิค SDS-PAGE	18
4-4	การตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนินด้วย 7.5% native-PAGE โดยใช้สีย้อม 4 ชนิด.	19
4-5	การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูขาวกับไวเทลโลเจนิน จากพลาสมาปลากะพงขาว ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อช่อง โดยเทคนิค Western blot	20
4-6	รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาปลาและไวเทลโลเจนินที่เตรียมได้จากปลากะพงขาว...	21
4-7	ผลการทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินและ พลาสมาปลากะพงขาว ด้วยเทคนิค Western blot	22
4-8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นไวเทลโลเจนิน โดยเทคนิค ELISA	23
4-9	กราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนินโดยเทคนิค ELISA	24
4-10	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลากะพงขาววัยอ่อน ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี ในเยื่อปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นสารใด	25
4-11	การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลา กะพงขาวจากหนูตัวที่ 3 ที่ฉีดกระตุ้นด้วย17β-estradiol โดยเทคนิค Western blot.	26
4-12	ผลการทดสอบพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว โดยเทคนิค Dot blot	27
4-13	ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจาก พลาสมาปลากะพงขาวกับพลาสมาปลานิลที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน โดยเทคนิค Western blot	28
4-14	การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลานิลวัยอ่อนด้วยเทคนิค อิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี ในเยื่อปลานิลที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นสารใด.....	29
4-15	ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจาก พลาสมาปลากะพงขาวจากหนูตัวที่ 2 กับพลาสมาปลาเก๋าปะการัง โดยเทคนิค Western blot	30

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 การสร้างฮอร์โมนไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้แล้ว ยังอาจส่งผลกระทบให้ลูกปลามีอัตรารอดน้อยลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรและสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศนั้นได้ (Scholz และ Mayer, 2008)

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์ด้วยการวางไข่ สร้างขึ้นโดยการควบคุมของฮอร์โมน 17β-estradiol มีการสังเคราะห์ขึ้นบริเวณตับของปลาเพศเมียที่โตเต็มวัย และหลั่งสู่กระแสเลือดเพื่อพัฒนาโอโอไซต์ (Oocyte) (Hock และคณะ, 2001) การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินถูกควบคุมโดยระบบฮอร์โมน ซึ่งในสภาวะปกติปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อน จะไม่มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน อย่างไรก็ดีปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อนสามารถสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน 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 โดยไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลสูง เหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน มีความแม่นยำสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์ และค่าใช้จ่ายน้อย ซึ่งการใช้พอลิโคนอลแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับสัตว์น้ำหลายชนิดได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนิน แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดียังมีข้อจำกัดในด้านของปริมาณการผลิต

ซึ่งจากการทำวิจัยร่วมกับนักวิจัยจากกรมประมงก่อนหน้านี้ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะรังจุดฟ้า (ชุติมา ถนอมสิทธิ์ และคณะ, 2552) พบว่ามีข้อจำกัดเรื่องปริมาณพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยเนื่องจากหากสัตว์ทดลอง (หนูขาว) ที่ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีตายไป จำเป็นต้องเริ่มหาแอนติเจนและฉีดกระตุ้นหนูขาวตัวใหม่เพื่อผลิตแอนติบอดีอีกครั้ง สร้างความสูญเสียสัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่อง แต่หากนำหนูขาวที่ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินได้นั้น 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 ปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีได้แก่ Western blot, Dot blot, ELISA และ Immunohistochemistry

การแบ่งหัวข้อในการทดลอง

1. การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว
2. การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดี
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว
4. การตรวจสอบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.4 การใช้สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์

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

สัตว์น้ำ

สัตว์ทะเลและสัตว์น้ำจืด (เช่น ปลากะพงขาว ปลากะรัง ปลานิล เป็นต้น) ที่นำมาใช้ได้มาจากแหล่งเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคตะวันออก นำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 5 ตัน ที่ความเค็มเช่นเดียวกับความเค็มในแหล่งเลี้ยง มีระบบกรองน้ำหมุนเวียน ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำมาฉีดฮอร์โมน 17β-estradiol 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว จำนวน 3-4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำปลามาสลบและเก็บเลือดปลา และจัดการกับส่วนที่เหลือของปลาโดยการใส่ถุงพลาสติกและส่งไปกำจัดพร้อมขยะติดเชื้อ

1.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟาร์มทะเลทอง ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตราด อ.เมือง จ.ตราด

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวเทลโลเจนินได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการรับสัมผัสสารxenoestrogen 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) สามารถพบไวเทลโลเจนินในตับและพลาสมาได้ตั้งแต่วันแรก และสูงสุดในวันที่ 3- 5 โดยมีแนวโน้มของปริมาณเช่นเดียวกัน แต่ในพลาสมาจะพบปริมาณมากกว่าในตับ

Van den Belt และคณะ (2003) ทดสอบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลา zebrafish และปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ได้รับสารกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนินผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยง คือสาร 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 พบมีการสร้างไวเทลโลเจนินใน

ปลาที่ได้รับสารทุกชนิดที่ทุกความเข้มข้น 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 แถบโปรตีนคือ 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 ซึ่งแสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไวและความจำเพาะสูง การทดสอบด้วยเทคนิค Sandwich ELISA พบว่ามีค่า 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 ซึ่งการทดลองชี้ให้เห็นว่าการสร้างไวเทลโล-เจนินในปลาเพศผู้ทั้งสองชนิดสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการรับสัมผัสสารประกอบเอสโตรเจนได้

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 2187.51±228.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง 1 เดือนก่อนการวางไข่ในเดือนพฤษภาคม

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว

3.1.1 การเตรียมแอนติเจนไวเทลโลเจนิน

นำปลากะพงขาวขนาด 4-5 กิโลกรัม มาฉีดกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนินด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว จำนวน 3-4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 3 วัน เก็บเลือดปลาก่อนทำการฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 1 และ หลังฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 3 และ 4 นำเลือดปลาที่ได้ มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 xg เก็บพลาสมาส่วนใส นำมาทำให้บริสุทธิ์และใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบพอลิโคลนอลแอนติบอดี และเก็บอวัยวะภายใน เช่น เหงือก ตับ และลำไส้ แช่ใน 10% formaldehyde

3.1.2 การทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์

การทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์จะใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟี โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทด์ และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300

ก. คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทด์

นำไฮดรอกซิลอะพาไทด์ (BioGel-HPT, BIORAD) บรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกขนาด 1.6x10 เซนติเมตร ให้ได้ความสูง 6 เซนติเมตร นำพลาสมาจากปลากะพงขาวที่ได้จากข้อ 3.1.1 มาผ่านคอลัมน์ แล้วชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, 0.4 โมลาร์ และ 1.2 โมลาร์ pH 6.8 ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 60 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านจากคอลัมน์แฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 120 แฟรกชั่น นำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับ BSA มาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำโปรตีนยอดพีคที่ผ่านการชะด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300

ข. คอลัมน์เซฟาคริลเอส-300

บรรจุเซฟาคริลเอส-300 ในคอลัมน์ขนาด 1.5x30 เซนติเมตร ให้มีความสูง 30 เซนติเมตร ปล่อยให้เม็ดเจลเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำสารละลายที่ผ่านการชะด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.2 โมลาร์ ในคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทด์ มาผ่านสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 8.0 เก็บแฟรกชันละ 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 120 แฟรกชัน นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และนำไปคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบ BSA

3.1.3 การตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนิน

ก. การแยกส่วนประกอบของโปรตีนโดย 7.5 % SDS-PAGE

เตรียมเจล 7.5% Separating Gel และ 4% Stacking Gel ทำโดยการผสมสารละลายตามตารางที่ 3-1 ให้เข้ากัน แล้วเติมส่วนผสมลงในช่องว่าง 0.75 มิลลิเมตรระหว่างแผ่น

กระจกในชุด BioRad mini protein III ที่เตรียมไว้ ให้ได้ความสูงของเจลประมาณ 5 เซนติเมตร ปิดหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนเจลแข็งตัว โดยจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างน้ำกลั่นกับเจลชัดเจน จึงเทน้ำออกจากหน้าเจล เติมสารละลาย 4% Stacking Gel ลงบนหน้าเจลที่แข็งตัวจนเต็มแผ่นกระจก เสียบ comb ลงในช่องเจลตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว แล้วจึงดึง comb ออก

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

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

นำไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.1.2 ข. มาใส่ลงในช่องเจล ต่อชุดอุปกรณ์จ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ ให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่จนกระทั่งสังเกตเห็นสีตามรอย (tracking dye) เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

ข. การแยกส่วนประกอบของโปรตีนโดย 7.5 % Native-PAGE

นำไวเทลโลเจนินที่ได้จากข้อ 3.1.2 ข. มาตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นฟอสโฟไลโปไกลโคโปรตีน โดยการนำมาแยกด้วย 7.5% Native-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม 3 ชนิด คือ sudan black B สำหรับย้อมลิปิด methyl green สำหรับย้อมฟอสฟอรัส และ alcian blue สำหรับย้อมคาร์โบไฮเดรต

3.1.4 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี

เตรียมโปรตีนไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.1.2 ข. เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวจำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครกรัม (100 ไมโครกรัมต่อตัว) ห่างกันครั้งละ 14 วัน โดยครั้งแรกผสมแอนติเจนกับ Complete Freund's Adjuvant จากนั้นครั้งที่ 2-4 ผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน เก็บเลือดหนู ปั่นแยกเลือดที่แข็งตัว เก็บส่วนใสซึ่งเป็นซีรัมที่มี พอลิโคลนอลแอนติบอดีอยู่ นำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบสมบัติของแอนติบอดีต่อ ไวเทลโลเจนิน

3.2 การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดี

3.2.1 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

นำซีรัมของหนูเมาส์ทั้ง 3 ตัว มาตรวจสอบความจำเพาะต่อโปรตีนไวเทลโลเจนิน ด้วยเทคนิค Western blot โดยแยกไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค 7.5% SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนในเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดี

ก. การแยกส่วนประกอบของโปรตีนโดย 7.5 %SDS-PAGE

นำไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาใส่ลงในช่องเจลที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 ก. ต่อชุดอุปกรณ์จ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ ให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่จนกระทั่ง สังเกตเห็นสีตามรอย (tracking dye) เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

ข. การย้ายโปรตีนในเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

เตรียมกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ขนาดเท่ากับแผ่นเจล และแช่ไว้ใน Towbin's transfer buffer ที่แช่เย็นจัด นำแผ่นเจลที่แยกเสร็จแล้วจากข้อ 3.2.1 ก. มาประกบกับกระดาษไนโตรเซลลูโลส ให้สนิทโดยไม่ให้มีฟองอากาศระหว่างกระดาษกับเจล วางทับด้วยกระดาษกรองรีดน้ำออกให้ประกบกันอย่างเรียบสนิททั้งสองด้าน วางบนเครื่อง BioRad Trans-Blots SD Semi-Dry โดยให้ด้านที่มีกระดาษไนโตรเซลลูโลสอยู่ด้านล่าง ปิดฝาเครื่องต่ออุปกรณ์จ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสออกมาแช่ใน 5% blotto ใน 0.15M PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto ในสารละลาย 0.1% tween-20 ใน 0.15M PBS (PBST) ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง ตัดแยกกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นชิ้นละ 1 ช่องเจล แช่ลงในซีรัมหนูแต่ละตัว (1:10,000) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 0.5% blotto ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลส ใน secondary antibody (Goat anti-mouse conjugated horseradish peroxidase, GAM-HRP) (1: 3,000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 0.5% blotto ใน PBS นาน 5 นาที 3 ครั้ง แล้วนำกระดาษไนโตรเซลลูโลส แช่ในสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% ใน 0.15 M PBS) ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี ภายในเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน pre-stained น้ำหนักโมเลกุล 21-200 กิโลดาลตัล (Bio-Rad) ตรวจดูแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี เปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินระหว่าง พอลิโคลนอลแอนติบอดีจากซีรัมหนูทั้ง 3 ตัว

ค. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีกับโปรตีนอื่นในพลาสมา

การแยกส่วนประกอบของพลาสมาปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน โปรตีนจากพลาสมาปลาหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol และไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตามข้อ 3.1.2 ข. ด้วย 7.5 % SDS-PAGE และย้ายโปรตีนในเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. และ ข. โดยตัดแยกกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นชิ้นละ 1 ช่องเจล แช่ลงในพอลิโคลนอลแอนติบอดีปกติและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับโปรตีนทั่วไปที่พบในเลือด ซึ่งเตรียมได้จากการนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีผสมกับพลาสมา

ของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนในอัตราส่วน 1:5 แล้วเจือจางด้วย 5% Blotto ให้ ได้ระดับการเจือจางสุดท้ายเท่ากับ 1: 10,000 นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสลงแช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก แช่ใน GAM-HRP 1:3,000 และสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 ข. ตรวจดูแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของไวเทลโลเจนินและโปรตีนอื่นในพลาสมากับพอลิโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองแบบ

3.2.2 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

เคลือบเพลทด้วยไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 4,000 นาโนกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (10 dilution) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม ในทุกหลุมที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วย PBST 200 ไมโครลิตรต่อหลุมจำนวน 3 ครั้ง เติม 5% blotto 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ความเจือจาง 1:5,000 1:7,500 และ 1:10,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ในทุกหลุมที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม GAM-HRP ที่ความเจือจาง 1:10,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ในทุกหลุมที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรท TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บในที่มืด 15 นาที เติมกรดซัลฟิวริกเพื่อหยุดปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของแอนติเจนเคลือบเพลทและแอนติบอดีที่ความเจือจางต่างๆ เพื่อหาช่วงที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นไปตามหลัก Indirect ELISA

3.2.3 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีบนเนื้อเยื่อโดยวิธี Immunohistochemistry

ก. การเข้าพาราพลาสต์ (paraffination)

นำตับ เหงือก และลำไส้ของปลากะพงขาวที่ได้จากข้อ 3.1.1 มาล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดฟอร์มาลินออก จากนั้นนำมาดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยการแช่แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ 70% เอทานอล (3 ชั่วโมง) 90% เอทานอล (3 ชั่วโมง) 95% เอทานอล (6 ชั่วโมง) 2 ครั้ง บิวทานอล (1 ชั่วโมง) ไซลีน : บิวทานอล (1 ชั่วโมง) ไซลีน (1 ชั่วโมง) พาราพลาสต์ (50 องศาเซลเซียส) ครั้งละ 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง ฝังตัวอย่างตับ เหงือก และลำไส้ลงในพารา พลาสต์ ในแม่พิมพ์ (mould) แล้วจึงครอบด้วยกรอบพลาสติก (embedding ring) รอให้เย็น นำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้มีความหนา 8 ไมครอน แล้วติดลงบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินไว้แล้ว

ข. การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดี

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาละลายพาราฟินออก (deparaffination) และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยนำสไลด์เนื้อเยื่อมาแช่ใน ไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ไซลีน: บิวทานอล (1: 1) (5 นาที) 95% เอทานอล (5 นาที) 80% เอทานอล (5 นาที) 70% เอทานอล (5 นาที)

น้ำกลั่น (5 นาที) 10% ฟอร์มาลิน (10 นาที) น้ำกลั่น (5 นาที) 2 ครั้ง กำจัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อเยื่อด้วยการแช่ในสับสเตรท 1% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นแช่ใน PBS (5 นาที) 3 ครั้ง นำสไลด์เนื้อเยื่อมาหยดด้วย $P1^{+}$(10% calf serum ใน PBS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ต้องการตรวจสอบความจำเพาะลงบนเนื้อเยื่อแต่ละชิ้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที หยด GAM-HRP ลงบนเนื้อเยื่อทุกชิ้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แช่สไลด์ลงในสารละลายสับสเตรท (0.03% ไดอะมิโนเบนซิดีน (DAB), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS) ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที จุ่มสไลด์ล้างด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 1 นาที 2 ครั้ง และ แช่ในน้ำกรองเพื่อล้างส่วนเกินของปฏิกิริยา สังเกตผลบวกสีน้ำตาลของปฏิกิริยา จากนั้นนำสไลด์มาย้อมสีฮีมาทอกไซลิน (hematoxylin) และเตรียมทำสไลด์ถาวรต่อไป

ค. การทำสไลด์ถาวร

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่จากข้อ 3.2.3 ข มาทำเป็นสไลด์ถาวร โดยนำไปผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ใน 70% เอทานอล (5 นาที) 80% เอทานอล (5 นาที) 90% เอทานอล (5 นาที) 95% เอทานอล (5 นาที) 1% อีโอซิน (2 นาที) บิวทานอล (5 นาที) ไซลีน : บิวทานอล (1: 1) (5 นาที) ไซลีน (5 นาที) 3 ครั้ง และหยดเปอร์เมาท์ และปิดแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) รอให้แห้ง นำไปศึกษาผลของปฏิกิริยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพต่อไป

3.2.4 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว

ก) การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

นำไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ตามข้อ 3.1.2 ข. มาเจือจางแบบ serial dilution จากนั้นแยกโปรตีนด้วย 7.5 % SDS-PAGE และย้ายโปรตีนในเจลลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 ก. และ ข. แช่ลงในพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่อัตราการเจือจางต่าง ๆ แล้วแช่ต่อใน GAM-HRP และนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.1 ข. ตรวจดูแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของไวเทลโลเจนินกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่พอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจจับได้

ข) การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Dot blot

นำไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ตามข้อ 3.1.2 ข. มาเจือจางแบบ serial dilution แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย10% formaldehyde ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบ่มในพอลิโคลนอลแอนติบอดีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP เป็นเวลา

2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จากนั้นนำมาใส่ในสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน 0.15M PBS) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ตรวจผลบวกที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีตรวจจับได้

3.2.5. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลานิล

ก. การชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลานิล

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 สำหรับนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

ข. การชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลาเก๋า

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 หรือตัวทำละลายฮอร์โมนทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน เก็บเลือดปลา ปั่นแยกพลาสมา และเก็บตับ เหงือก และลำไส้ของปลามาแช่ใน 10% formaldehyde ใน PBS เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อนำไปเตรียมเนื้อเยื่อให้มีความหนา 8 ไมครอนสำหรับนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว

3.3.1 การหลอมเซลล์

นำเซลล์จากม้ามจากหนูขาวที่ฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลเจนินตามข้อ 3.1.4 มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมาที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริม 20% Fetal calf ซึ่งเจริญอยู่ในระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log Phase) ตามหลักการของ Köhler และ Milstein (1976) และดัดแปลงจากวิธีการของไพศาล สิทธิกรกุล (2548) โดยทำการสลบหนู จากนั้นผ่าตัดนำม้าม เลาะตัดเนื้อเยื่อไขมัน

และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก ล้างใน PBS ก่อนย้ายลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มี RPMI 10 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ นำเซลล์จากม้ามใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร และเซลล์ไมอิโลมา P3X ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ทั้งสองหลอดไปปั่นแยกเซลล์ที่ 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากการปั่นแยกเซลล์ เก็บเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอด โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดเดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ใหม่อีกครั้งในแต่ละหลอด ผสมให้เซลล์กระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างทั่วถึง นำเซลล์จากทั้งสองหลอดมารวมกัน ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์ที่ 1500 g นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก

จากนั้นค่อยๆ เติม PEG ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทีละน้อย เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์ผสมกันใน PEG ภายในเวลา 1 นาที แล้วเติม RPMI ลงข้างหลอดช้า ๆ ให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ผสมที่ 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ในอาหารคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine: HAT medium) เสริมด้วย 20% Fetal calf ดูดเซลล์ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 10 เพลท บ่มใน CO_2 incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-14 วัน ตรวจดูการเจริญของเซลล์ในหลุมต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ถ้าโคโลนีของเซลล์ลูกผสมมีขนาดประมาณ 100 เซลล์ขึ้นไป นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมนั้นมาทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินต่อไป

3.3.2 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน โดยเทคนิค Dot blot

นำไวเทลโลเจนิน ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร หยดลงแต่ละช่องของกระดาษไนโตรเซลลูโลส ขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย formaldehyde 10% เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แช่ใน 5% dry milk in PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสตามช่อง ใส่ในแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม หลุมละ 1 แผ่น เติม culture media ของแต่ละ hybridomas หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน 0.15M PBS (PBST) ครั้ง บ่มต่อใน goat anti-mouse 1:3,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วย PBST แล้วจึงเติมสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% ใน PBS) หลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อให้เกิดสี ภายใน 5 นาที นำออกล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ตรวจดู hybridomas ที่ให้ผลบวกกับไวเทลโลเจนิน

3.3.3 การรีโคลน (re-clone)

<u>ก. การขยายเพิ่มจำนวนเซลล์</u>

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ลูกผสมที่ให้ผลบวกกับไวเทลเจนินในข้อ 3.3.2 ความหนาแน่นเซลล์ 100 เซลล์/10 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ลูกผสมที่ปราศจากAminopterin (Hypoxanthine, Thymidine: HT medium) มาใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อให้แต่ละหลุมมีเซลล์ต้นกำเนิด 1 เซลล์ต่อหลุม ทำให้แน่ใจว่าแอนติบอดีที่ต้องการ

มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวกัน จากนั้นนำไปบ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10-14 วัน ตรวจการเจริญของเซลล์ในหลุมต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กลับด้าน ถ้าโคโลนีของเซลล์ มีขนาด 100 เซลล์ขึ้นไป ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีอีกครั้ง ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 จากนั้นนำเซลล์ลูกผสมที่ให้ผลบวกมาเพิ่มจำนวนต่อ โดยขยายเพิ่มจำนวนเซลล์จากถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เป็น 24 หลุม และ 6 หลุมตามลำดับ โดยใช้ฟีทอลคาล์ฟซีรัม 20% เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อได้จำนวนเซลล์มากพอ รวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน เพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยเทคนิคทางแอนติบอดีต่อไป

ข. การเก็บรักษาเซลล์

นำเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน ที่แยกจากข้อ 3.3.3 ก. มาเก็บรักษา โดยนำเซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณ $3\text{-}5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรมาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI และนำเซลล์มาเติมสารละลาย 12% DMSO-RPMI (แช่เย็นจัด) ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำใส่หลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ทันที เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้เมื่อต้องการ ทำการตรวจสอบการเจริญของเซลล์อย่างสม่ำเสมอ โดยการละลายเซลล์ออกมาเลี้ยงและตรวจสอบความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

3.4 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.1 ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน

ก. การตรวจไอโซไทป์ (Isotype) ของแอนติบอดี

การตรวจไอโซไทป์ (Isotype) ของแอนติบอดีเพื่อให้ทราบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ ด้วยใช้เทคนิค Sandwich ELISA โดยใช้ Mouse monoclonal Ab isotyping reagents kit โดยเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG, IgA และ IgM มาเจือจาง 1:1,000 ใน PBS เติมลงในหลุมในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม หลุม ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง เติม 5% blotto และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการตรวจ (เจือจาง 1:20) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBST ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง เติม Antimouse IgG (Fab specific)-peroxidase) (1:2,000 ใน PBS) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-Tween ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรท ที่ประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M phosphate citrate buffer pH 5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว

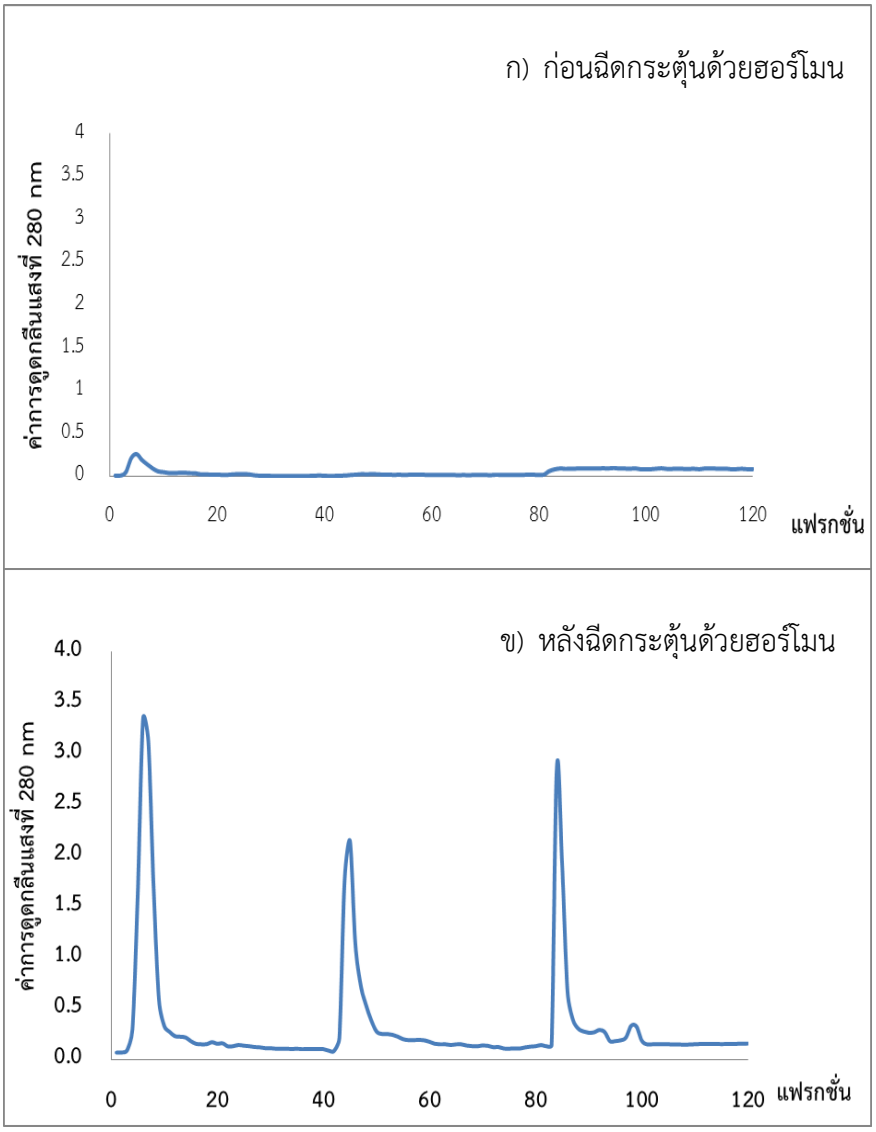
4.1.1 การเตรียมแอนติเจนไวเทลโลเจนิน

จากการนำปลากะพงขาวน้ำหนักเฉลี่ย 5 กิโลกรัม มาฉีดกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนินด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยเก็บเลือดปลาก่อนการฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 1 และหลังจากฉีดฮอร์โมน ครั้งที่ 4 มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 xg แล้วนำส่วนของพลาสมาที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนเทียบกับ BSA พบว่าปลาที่ได้รับฮอร์โมนมีระดับโปรตีนรวมในพลาสมาเพิ่มขึ้น โดยปริมาณโปรตีนในพลาสมาปลาก่อนฉีดเท่ากับ 19.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังฉีดเท่ากับ 48.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำพลาสมาที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดีต่อไป

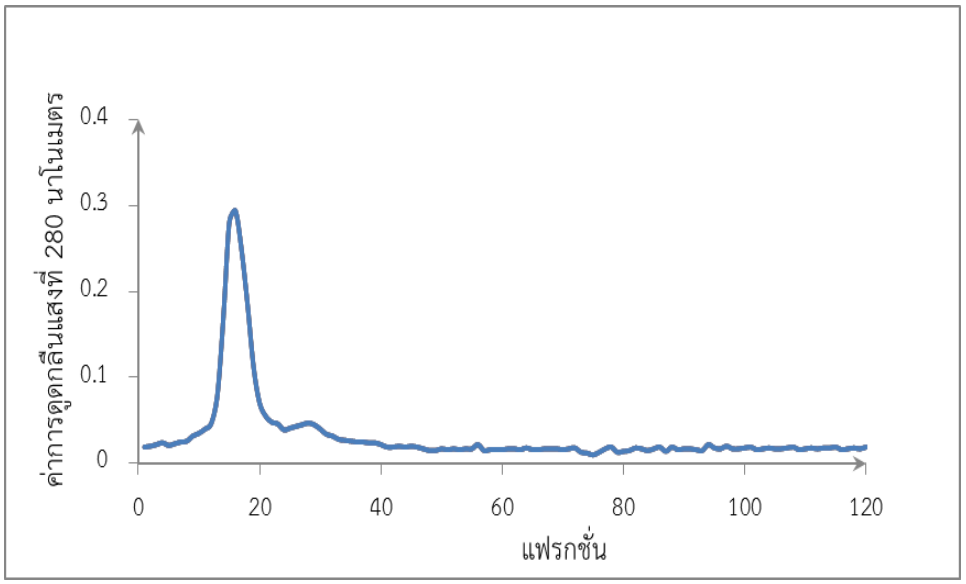
4.1.2 การทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์

นำพลาสมาของปลากะพงขาวก่อนฉีดและหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ โดยชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.2 โมลาร์ ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 40 แฟรกชั่น แฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร รวม 120 แฟรกชั่น นำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 นาโนเมตร พบว่าพลาสมาปลากะพงขาวก่อนฉีด มีโปรตีนแยกได้ 1 พีค ส่วนพลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดมีโปรตีนแยกได้ 3 พีค ได้จากการชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.2 โมลาร์ ตามลำดับ โดยปริมาณโปรตีนยอดพีค ที่ได้เท่ากับ 11.14, 6.19 และ 6.63 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 24.39 มิลลิกรัมต่อ 500 ไมโครลิตร) คิดเป็นร้อยละผลผลิต (%yield) ของโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์เท่ากับ 98.24 (ภาพที่ 4-1)

จากนั้นจึงนำโปรตีนจากยอดแฟรกชั่นที่ได้จากการชะด้วยสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 6.8 (พีคที่ 3) ของการแยกพลาสมาของปลากะพงขาวหลังฉีดฮอร์โมนมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยแยกด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ซึ่งใช้สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.8 เป็นตัวชะโปรตีน พบว่ามีโปรตีนแยกออกมา 1 พีค (ภาพที่ 4-2) จากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และนำไปคำนวณปริมาณโปรตีน พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ได้จากส่วนของแฟรกชั่นพีคเท่ากับ 2.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากโปรตีนเริ่มต้น 3.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (% yield = 86.17%)



ภาพที่ 4-1 โครมาโทแกรมของการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว ก) ก่อน และ ข) หลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol

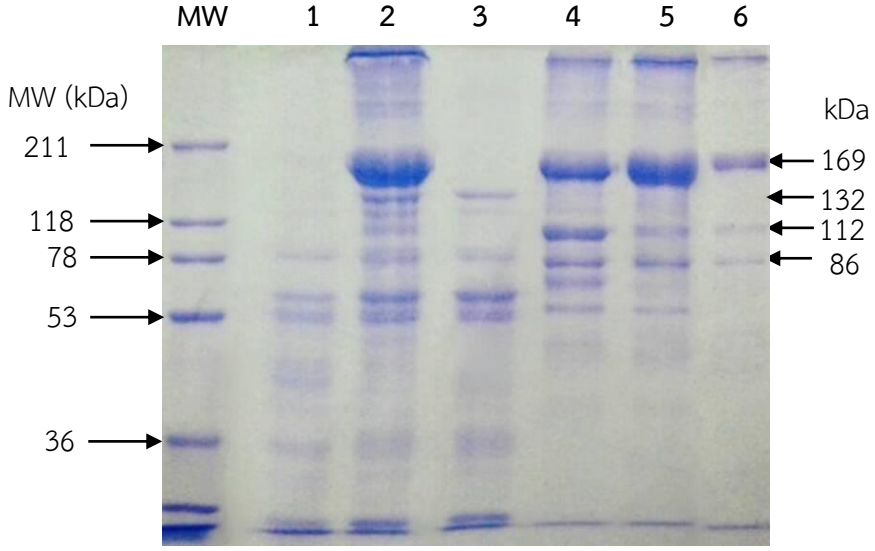


ภาพที่ 4-2 โครมาโทแกรมของการทำโปรตีนพีคที่ 3 ที่ได้จากการแยกพลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ชะด้วย สารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.8

4.1.3 การตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนิน

นำโปรตีนที่ผ่านการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ที่ได้แต่ละแฟรกชั่น มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนในพลาสมาปลากะพงขาวเพื่อตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนินโดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าพลาสมาหลังผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 มีความบริสุทธิ์มากขึ้นตามลำดับ เมื่อเทียบกับพลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (ภาพที่ 4-3) โดยขนาดของโปรตีนที่ในพลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol มีขนาด 86-169 กิโลดาลตัล

จากนั้นนำไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และเซฟาคริสเอส 300 มาตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนินซึ่งเป็นฟอสโฟไลโปไกลโคโปรตีน โดยการนำไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์มาแยกด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ native 7.5% (native-PAGE) แล้วย้อมด้วยสีย้อม 3 ชนิด คือ sudan black B สำหรับย้อมลิปิด methyl green สำหรับย้อมฟอสฟอรัส และ alcian blue สำหรับย้อมคาร์โบไฮเดรต ผลการตรวจสอบสมบัติพบโปรตีน 2 ขนาดใน native-PAGE โดยโปรตีนที่ได้นี้มีฟอสฟอรัส ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากย้อมติดสีทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 4-4) ซึ่งแสดงถึงสมบัติของไวเทลโลเจนินที่เป็นฟอสโฟไลโปไกลโคโปรตีน



ภาพที่ 4-3 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาปลากะพงขาวและไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 โดยเทคนิค SDS-PAGE (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อช่อง)

MW คือ SDS-PAGE Standards Broad Range: (BioRad)

ช่องที่ 1 พลาสมาปลากะพงขาวก่อนฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol

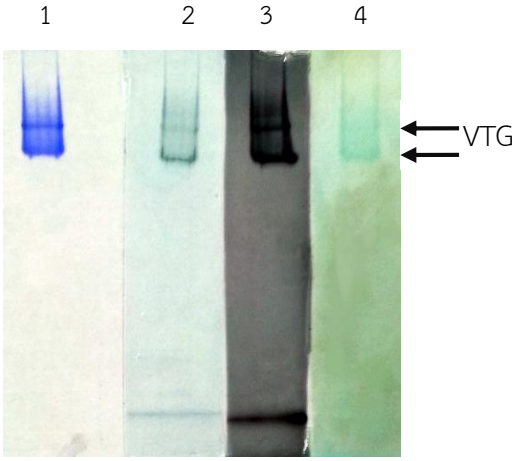
ช่องที่ 2 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol

ช่องที่ 3 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ (พีคที่ 1)

ช่องที่ 4 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.4 โมลาร์ (พีคที่ 2)

ช่องที่ 5 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.2 โมลาร์ (พีคที่ 3)

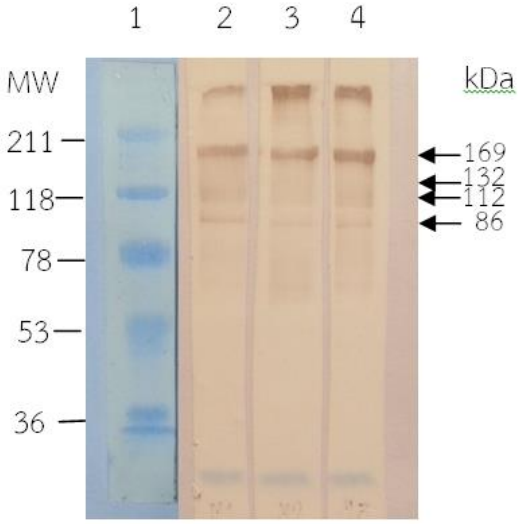
ช่องที่ 6 ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากคอลัมน์เซฟาคริสเอส-300 ชะด้วย ทริสบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์



ภาพที่ 4-4 การตรวจสอบสมบัติของไวเทลโลเจนินด้วย 7.5% native-PAGE โดยใช้สีย้อม 4 ชนิด
ช่องที่ 1 ย้อมโปรตีนด้วยสี coomassie blue (ปริมาณโปรตีน 36.8 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 2 ย้อมโปรตีนด้วยสี methyl green (ปริมาณโปรตีน 36.8 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 3 ย้อมโปรตีนด้วยสี sudan black B (ปริมาณโปรตีน 36.8 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 4 ย้อมโปรตีนด้วยสี alcian blue (ปริมาณโปรตีน 36.8 ไมโครกรัม)

4.1.4 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี

นำไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาณโปรตีน 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร (40 ไมโครกรัมต่อตัว) แต่ละครั้งห่างกัน 14 วัน โดยครั้งแรกผสมแอนติเจนกับ Complete Freund's Adjuvant จากนั้นครั้งที่ 2-4 ผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วัน เก็บเลือดหนู นำมาปั่นแยกเลือดที่แข็งตัว เก็บส่วนใสซึ่งเป็นซีรัมที่มีพอลิโคลนอลแอนติบอดีอยู่ เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติการสร้างแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินต่อไป โดยนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17β-estradiol ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (พีคที่ 3) และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากหนูทั้ง 3 ตัว สามารถจับกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลากะพงขาวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้ โดยพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 3 มีแถบโปรตีนขนาด 169 กิโลดาลตัลเข้มที่สุด และมีปริมาณซีรัมที่เก็บได้มากที่สุด จึงเลือกใช้เป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีอื่น ๆ ต่อไป (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูขาวกับไวเทลโลเจนิน จากพลาสมาปลากะพงขาว ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อช่อง โดยเทคนิค Western blot
ช่องที่ 1 Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range: Myosin (211 kDa), β-galactosidase (118 kDa), BSA (78 kDa), Ovalbumin (53 kDa), Carbonic anhydrase (36 kDa)
ช่องที่ 2 ทดสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 1 (การเจือจาง 1:10,000)
ช่องที่ 3 ทดสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 (การเจือจาง 1:10,000)
ช่องที่ 4 ทดสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 3 (การเจือจาง 1:10,000)

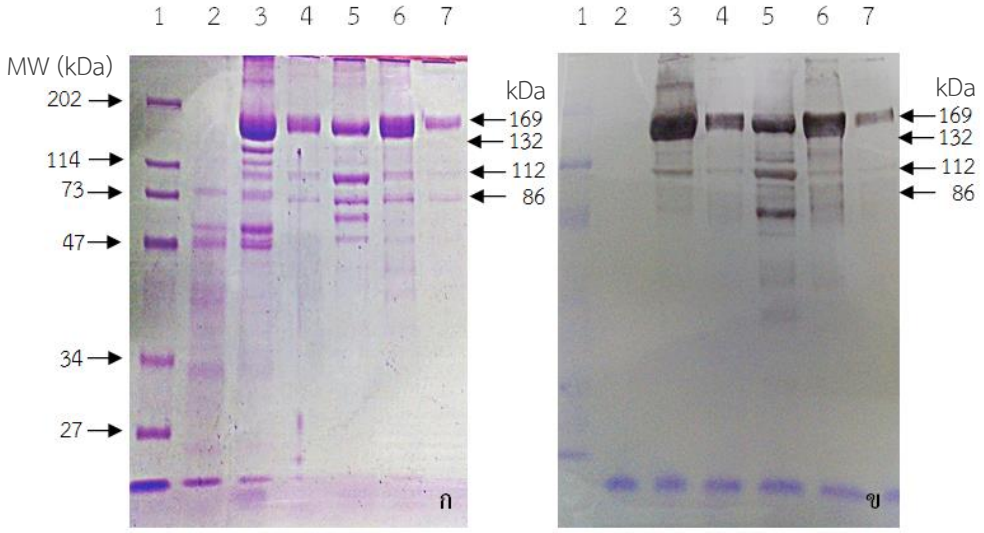
4.2 การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดี

4.2.1 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Western blot พบว่าพลาสมาของปลากะพงขาวที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ผ่านการแยกโปรตีนไวเทลโลเจนินด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และการทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาคริล-เอส 300 จะมีแถบโปรตีนที่ปรากฏน้อยกว่าพลาสมาหลังฉีดกระตุ้นที่ผ่านการแยกโปรตีนไวเทลโลเจนินด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์พีคที่ 1, 2 และ 3 (เลนที่ 4, 5, 6) เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าโปรตีนไวเทลโลเจนินที่ผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์เพียงคอลัมน์เดียว พบแถบโปรตีนหลักทั้งหมด 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัล ตามลำดับ ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4-6

การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดี เพื่อยืนยันว่าแอนติบอดีจับกับไวเทลโลเจนิน โดยไม่จับกับโปรตีนที่พบทั่วไปในพลาสมาของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีไปทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เพื่อดูดซับโปรตีนที่พบได้ทั่วไปในพลาสมาก่อน จากนั้นจึงใช้แอนติบอดีนั้นมาทำ

ปฏิกิริยากับพลาสมาปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน โปรตีนจากพลาสมาปลาหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol และไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Western blot พบว่าทั้งพอลิโคลนอลแอนติบอดีปกติและพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกดูดซับโปรตีนทั่วไปที่พบในเลือด ไม่ปรากฏแถบโปรตีนสีน้ำตาลดำเมื่อทดสอบกับพลาสมาปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ส่วนในพลาสมาปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol และไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ปรากฏแถบโปรตีนหลักสีน้ำตาล 4 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 169, 132, 112 และ 86 กิโลดาลตัล โดยแถบโปรตีนขนาด 169 กิโลดาลตัล เกิดสีน้ำตาลเข้มชัดเจนมากที่สุด จึงอาจกล่าวได้ว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 169 กิโลดาลตัล มากที่สุดและเป็นไปได้ที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 169 กิโลดาลตัล นี้ คือโปรตีนไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะพงขาวที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol (ภาพที่ 4-7)



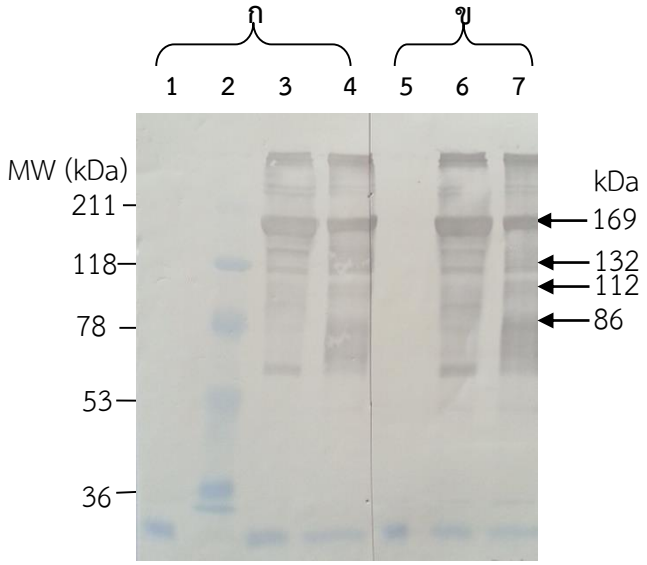
ภาพที่ 4-6 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาปลาและไวเทลโลเจนินที่เตรียมได้จากปลากะพงขาว
(ก) 7.5%SDS-PAGE ของโปรตีนไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลากะพงขาวและ
(ข) Western blot ของไวเทลโลเจนินที่จำเพาะต่อพอลิโคลนอลแอนติบอดี โดย
ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Myosin (202 kDa), β-galactosidase (114 kDa), BAS (73 kDa), Ovalbumin (47 kDa), Carbonic anhydrase (34 kDa), Soybean trypsin inhibitor (27 kDa)
ช่องที่ 2 พลาสมาปลากะพงขาวก่อนฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 3 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 4 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (พีคที่ 1) ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.35 นาโนเมตร (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 5 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (พีคที่ 2) ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.15 นาโนเมตร (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 6 พลาสมาปลากะพงขาวหลังฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ (พีคที่ 3) ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.88 นาโนเมตร (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 7 โปรตีนยอดพีคที่ 3 จากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์มาทำบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.29 นาโนเมตร (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)



ภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินและพลาสมาปลากะพงขาว ด้วยเทคนิค Western blot ก) ทดสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ดูดซับอิพิโทปในพลาสมาปลากะพงขาววัยอ่อนที่ไม่ได้รับฮอร์โมน และ ข) ทดสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี โดยที่

ช่องที่ 1 และ 5 พลาสมาปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

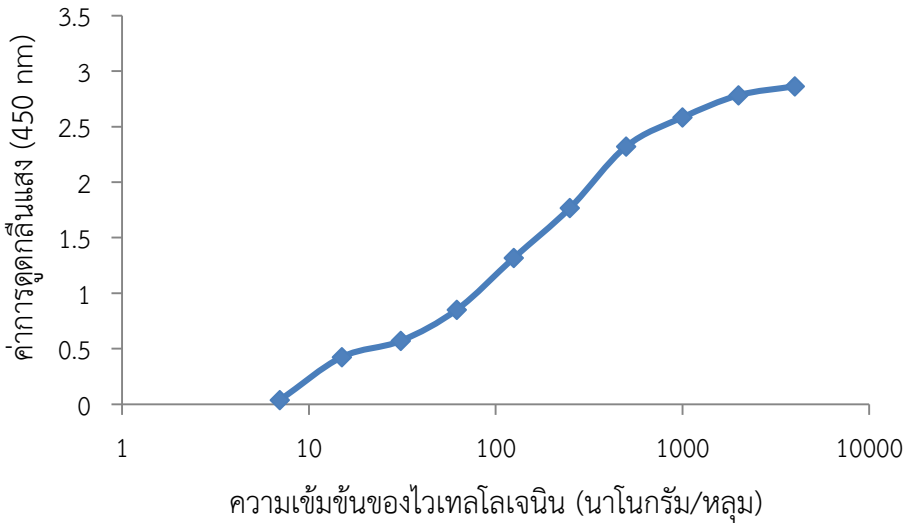
ช่องที่ 2 Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range

ช่องที่ 3 และ 6 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

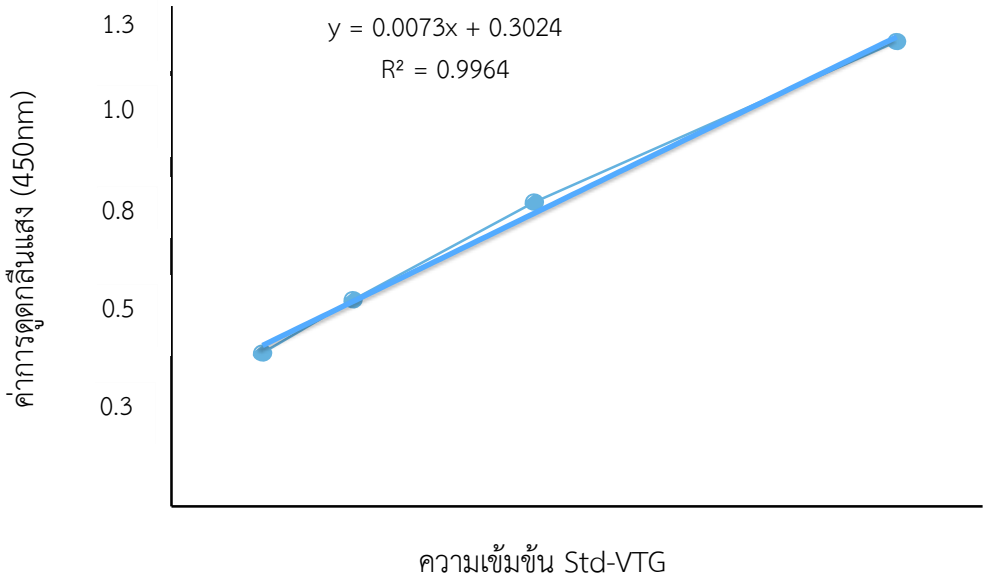
ช่องที่ 4 และ 7 พลาสมาปลากะพงขาวหลังได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)

4.2.2 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้ไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์เคลือบเพลท พบว่าความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินที่เหมาะสมสำหรับเคลือบเพลทเท่ากับ 4,000 นาโนกรัมต่อหลุม โดยความเข้มข้นของพอลิโคลนอลแอนติบอดีและ GAM-HRP ที่เหมาะสม คือ 1:7,500 และ 1:10,000 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-8) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้เป็นไปตามหลักการของ Indirect ELISA ที่เคลือบเพลทด้วยแอนติเจน เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้อยู่ระหว่าง 15-125 นาโนกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4-9) ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นกราฟมาตรฐานของการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินต่อไป อย่างไรก็ตามระดับของไวเทลโลเจนินที่สามารถตรวจวัดได้ ยังสูงกว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบในปลาเพศผู้จากธรรมชาติ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาเทคนิค ELISA ด้วยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อให้มีความไวมากขึ้นสำหรับใช้ในการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติต่อไป



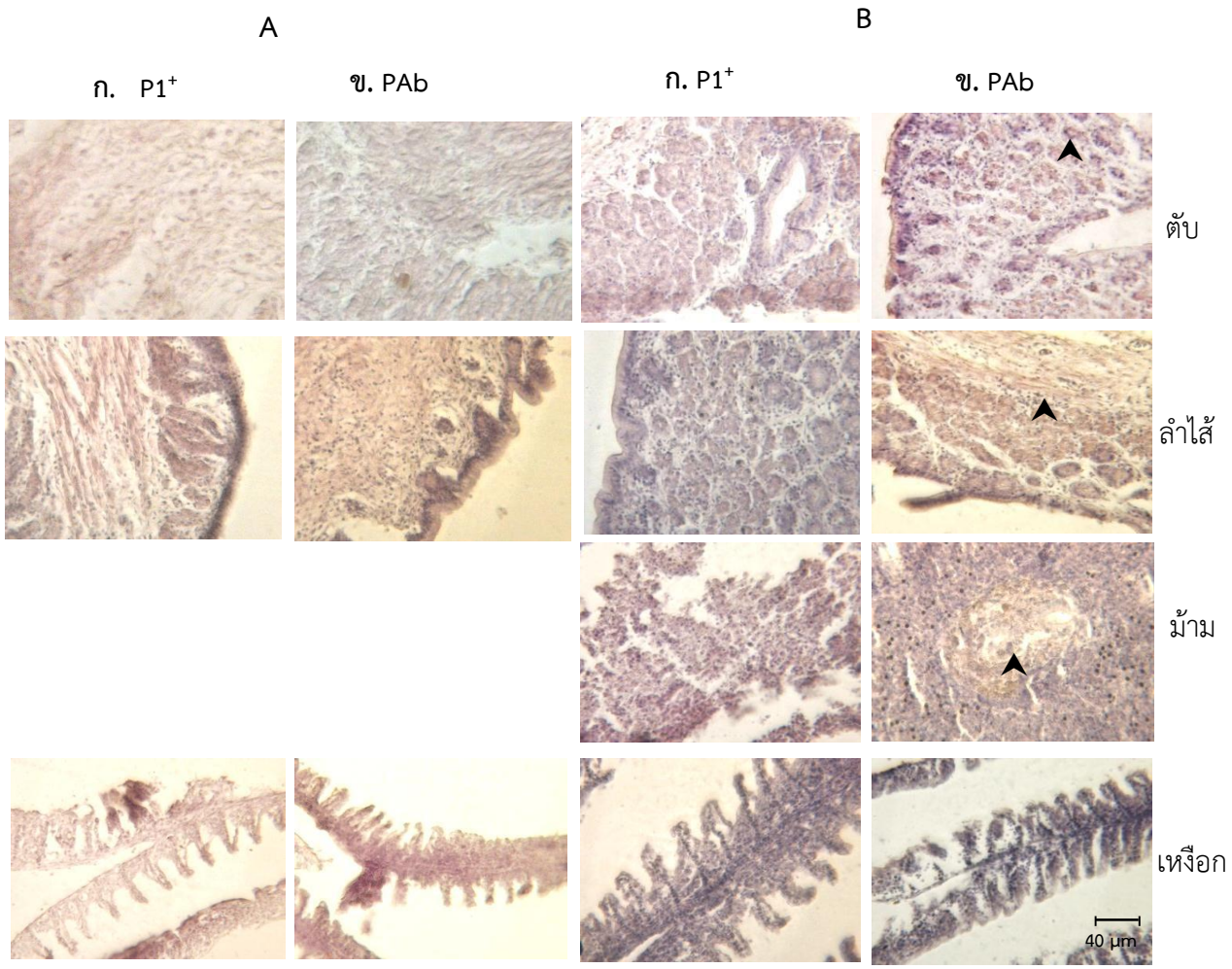
ภาพที่ 4-8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นไวเทลโลเจนิน โดยเทคนิค ELISA (เคลือบเพลทด้วยไวเทลโลเจนิน 4,000 นาโนกรัมต่อหลุม พอลิโคลนอลแอนติบอดีเจือจาง 1:7,500 และ GAM-HRP เจือจาง 1:10,000)



ภาพที่ 4-9 กราฟมาตรฐานไวเทลโลเจนินโดยเทคนิค ELISA (เคลือบเพลทด้วยไวเทลโลเจนิน 4,000 นาโนกรัมต่อหลุม พอลิโคลนอลแอนติบอดีเจือจาง 1:7,500 และ GAM-HRP เจือจาง 1:10,000)

4.2.3 การทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีบนเนื้อเยื่อโดยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี

การทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรีในปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับ17β-estradiol เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบไวเทลโลเจนินโดยการย้อมด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (PAb-seabass VTG) พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของปลากะพงขาววัยอ่อนได้ โดยแสดงผลของปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาลอ่อน บริเวณเนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่มีไวเทลโลเจนินและอวัยวะภายในที่มีเลือดไหลเวียนผ่าน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ย้อมแอนติบอดี ($P1^{+}$) พบว่าเนื้อเยื่อของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสารใด ๆ เกิดปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลอ่อน (+) ในเนื้อเยื่อ ตับ และลำไส้ ดังภาพที่ 4-10 (A) ส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของปลากะพงขาววัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย17β-estradiol ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว พบว่าเกิดปฏิกิริยาเกิดสีน้าตาลเข้ม (++) ในเนื้อเยื่อตับม้ามและลำไส้ดังภาพ 4-10 (B)

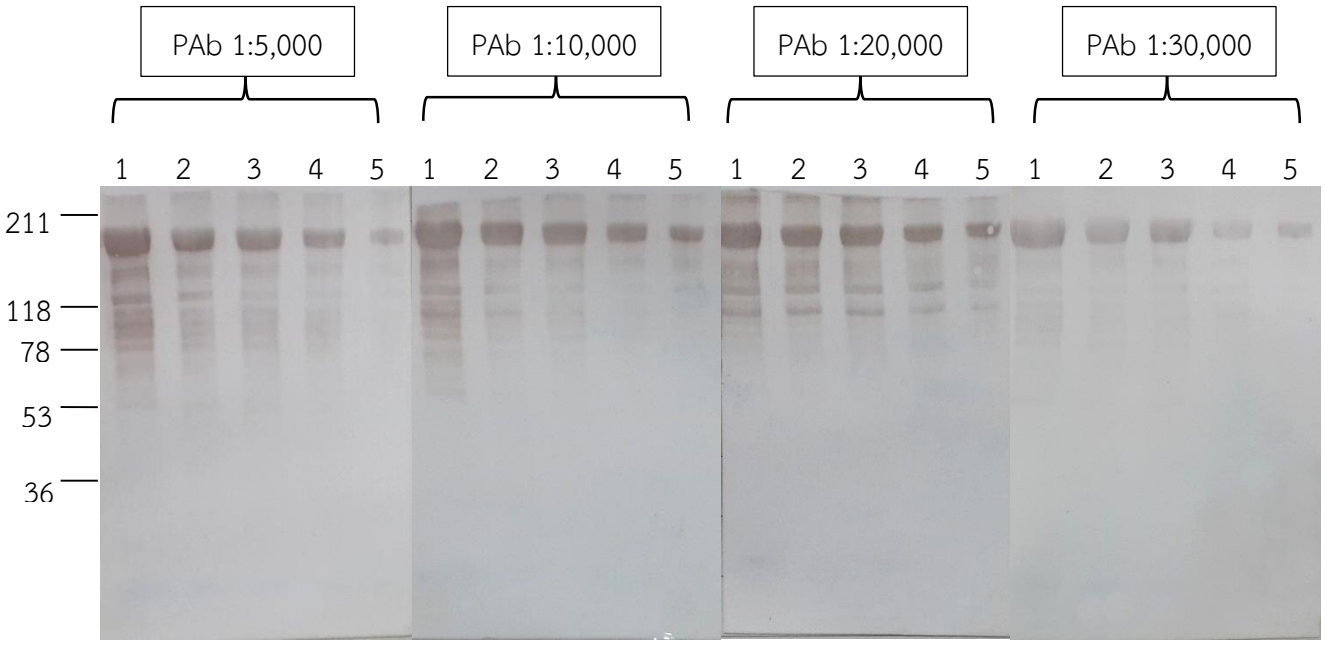


ภาพที่ 4-10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลากะพงขาววัยอ่อนด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี ในเยื่อปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นสารใด (A) และเนื่อเยื่อปลาที่ได้รับ 17β-estradiol ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว (B) โดยที่ ก. ไม่ย้อมแอนติบอดี (P1+) ข. ย้อมด้วย PAb

4.2.4 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว

ก) การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blot

การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:5,000 ถึง 1:30,000 ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ไมโครกรัม ถึง 0.25 ไมโครกรัม พบว่าระดับการเจือจางแอนติบอดีที่ 1:10,000 ให้ผลการตรวจสอบดีที่สุดเนื่องจากเป็นระดับการเจือจางมากที่สุด ที่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนหลัก ที่มีขนาดโปรตีน 169 กิโลดาลตัล ของไวเทลโลเจนินได้ชัดเจน โดยพอลิโคลนอลแอนติบอดีทุกระดับการเจือจางสามารถจับกับแถบโปรตีนหลักของไวเทลโลเจนินที่มีขนาด 169 กิโลดาลตัล ได้ในทุกความเข้มข้นของไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ไมโครกรัม ถึง 0.25 ไมโครกรัม (ภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-11 การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวจากหนูตัวที่ 3 ที่ฉีดกระตุ้นด้วย17β-estradiol โดยเทคนิค Western blot
ช่องที่ 1 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 2 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 2 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 3 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 4 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 0.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 5 ไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ปริมาณโปรตีน 0.25 ไมโครกรัม)

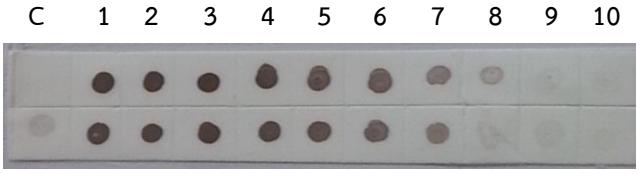
ข) การทดสอบความไวของพอลิโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Dot blot

การทดสอบระดับการเจือจางไวเทลโลเจนินที่เหมาะสมโดยเทคนิค Dot blot สำหรับการตรวจสอบด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ระดับการเจือจาง 1:10,000 กับไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เข้มข้นตั้งแต่ 2 ไมโครกรัม ถึง 0.0039 ไมโครกรัม พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับไวเทลโลเจนินได้ที่ระดับการเจือจางไวเทลโลเจนินตั้งแต่ 2-0.0312 ไมโครกรัม (ภาพที่ 4-12) จึงสามารถเลือกใช้ระดับการเจือจางแอนติเจนในช่วงดังกล่าวสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีเด้วยเทคนิค Dot blot ต่อไป

ก.

Control	ไวเทลโลเจนินความเข้มข้นต่างๆ (1 ไมโครลิตร/ช่อง)									
-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
+	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039

ข.

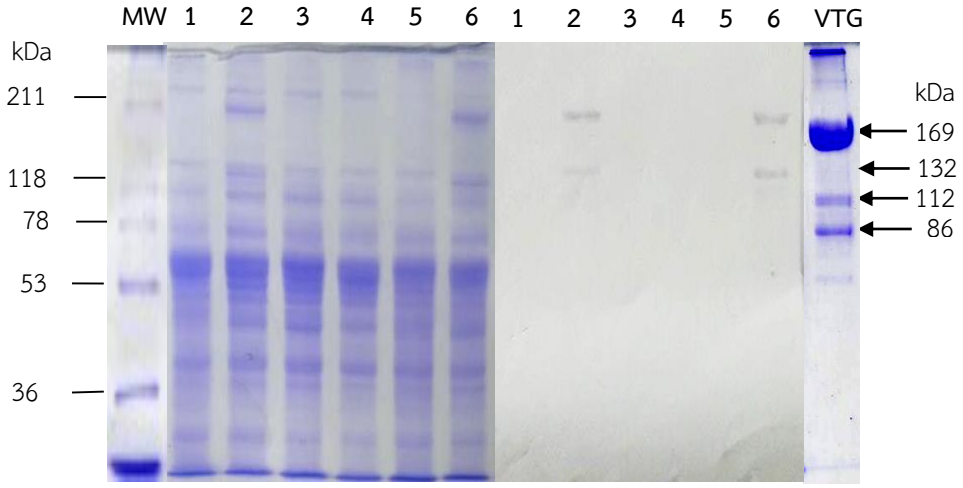


ภาพที่ 4-12 ผลการทดสอบพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาว โดยเทคนิค Dot blot ที่ระดับการเจือจางของพอลิโคนอลแอนติบอดีเท่ากับ 1:10,000 และปริมาณโปรตีนของไวเทลโลเจนินตั้งแต่ 2 ถึง 0.0039 ไมโครกรัม โดย ก) ผังการหยดแอนติเจน ข) ผลการย้อมด้วยแอนติบอดี

4.2.5. การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน

ก. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามในปลานิล

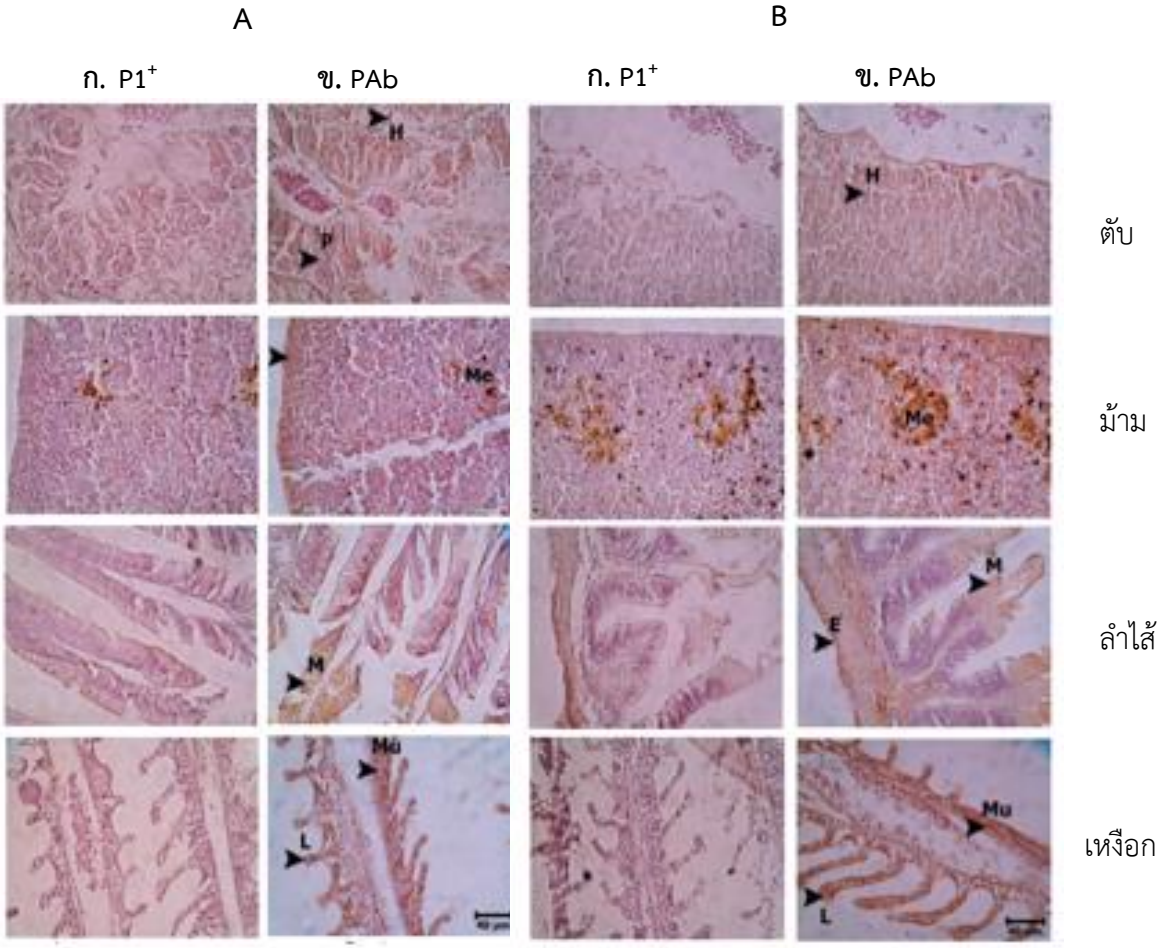
การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลานิลวัยอ่อน โดยการฉีดกระตุ้นปลานิลด้วยฮอร์โมน 17β-estradiol ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักปลา ทุก 6 วัน และเก็บเลือดปลา จำนวน 3 ตัว มาทำการทดสอบการสร้างไวเทลโลเจนินทุก 3 วัน พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 3 และ 1 ไม่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนจากพลาสมาปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนได้ จึงทดสอบกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 สามารถพบแถบโปรตีนขนาด 210 และ 140 กิโลดาลตัล ที่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 ได้ หลังจากการฉีดกระตุ้นในวันที่ 6 และ 18 (ภาพที่ 4-13) โดยพอลิโคลนอลแอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนในพลาสมาปลานิลวัยอ่อนที่ไม่ได้รับฮอร์โมนทั้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร และกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน



ภาพที่ 4-13 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวกับพลาสมาปลานิลที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน โดยเทคนิค Western blot
ช่องที่ 1 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1 (วันที่ 3; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 2 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 1 (วันที่ 6; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 3 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 (วันที่ 9; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 4 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 (วันที่ 12; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 5 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 3 (วันที่ 15; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)
ช่องที่ 6 พลาสมาปลานิลหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 3 (วันที่ 18; ปริมาณโปรตีน 22.5 ไมโครกรัม)

<u>- การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลานิลด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี</u>

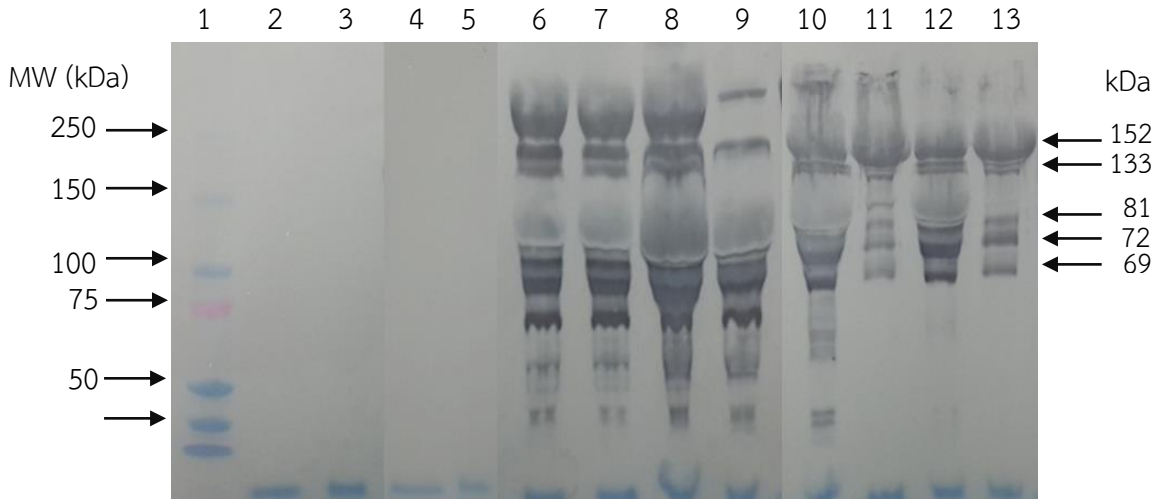
การทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรีในปลานิลวัยอ่อนที่ได้รับ17β-estradiol เป็นเวลา 18 วัน ตรวจสอบไวเทลโลเจนินโดยการย้อมด้วย PAb-seabass VTG พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของปลานิลวัยอ่อนได้ โดยแสดงผลของปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาลอ่อน–น้ำตาลเข้ม บริเวณเนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่มีไวเทลโลเจนินและอวัยวะภายในที่มีเลือดไหลเวียนผ่าน พอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของปลานิลวัยอ่อนมาย้อมด้วย PAb-seabass VTG เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ย้อมแอนติบอดี (P1+) พบว่าเนื้อเยื่อของปลานิลวัยอ่อนที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยสารใด ๆ เกิดปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลอ่อน (+) ในเนื้อเยื่อ ตับ ม้าม ลำไส้ และเหงือก ดังภาพที่ 4-14 (A) ส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะภายในของปลานิลวัยอ่อนที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย17β-estradiol ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักปลา พบว่าเกิดปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาลเข้ม (+++) ในทุกกลุ่มตัวอย่างและทุกเนื้อเยื่อที่ย้อม ยกเว้นเนื้อเยื่อตับเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลอ่อนดังภาพ B



ภาพที่ 4-14 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลานิลวัยอ่อนด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี ในเยื่อปลานิลที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นสารใด (A) และเนื่อเยื่อปลานิลที่ได้รับ 17β-estradiol ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักปลา (B) โดยที่ ก. ไม่ย้อมแอนติบอดี (P1+) ข. ย้อมด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดี (PAb)

ข. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามในปลาเก๋า

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีในปลาเก๋าปะการังที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol โดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนในพลาสมาปลาเก๋าปะการังก่อนฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและพลาสมาปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยตัวทำละลายฮอร์โมน โดยในปลาที่ได้รับฮอร์โมนทั้ง 8 ตัว พบแถบโปรตีนหลัก 5 แถบ ที่ขนาด 152, 133, 81, 72 และ 69 กิโลดาลตัล



ภาพที่ 4-15 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินจากพลาสมาปลากะพงขาวจากหนูตัวที่ 2 กับพลาสมาปลาเก๋าปะการัง โดยเทคนิค Western blot

ช่องที่ 1 Pre-stained plus molecular weight standard (Bio-Rad)
ช่องที่ 2 พลาสมาปลาเก๋าปะการังก่อนฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 1
ช่องที่ 3 พลาสมาปลาเก๋าปะการังก่อนฉีดฮอร์โมน ตัวที่ 2
ช่องที่ 4 พลาสมาปลาเก๋าปะการังหลังฉีดตัวทำละลายฮอร์โมนฮอร์โมน ตัวที่ 1
ช่องที่ 5 พลาสมาปลาเก๋าปะการังหลังฉีดตัวทำละลายฮอร์โมนฮอร์โมน ตัวที่ 2
ช่องที่ 6-13 พลาสมาปลาเก๋าปะการังหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 3 ตัวที่ 1-8

4.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว

ผลการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมเซลล์ จำนวน 3 ครั้ง โดยทำการคัดเลือก hybridomas ที่ผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน ด้วยเทคนิค Dot blot และดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ของ hybridomas ที่ให้ผลบวกกับไวเทลเจนินความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 100 เซลล์/10 มิลลิลิตร แล้วกระจายเซลล์ไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้แต่ละหลุมมีเซลล์ต้นกำเนิด 1 เซลล์ เพื่อทำให้แน่ใจว่าแอนติบอดีที่ต้องการมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวกัน จากนั้นประมาณ 10-14 วัน ตรวจการเจริญของเซลล์ แล้วดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีอีกครั้ง จึงนำเซลล์ลูกผสมที่ให้ผลบวกมา reclone โดยขยายเพิ่มจำนวนเซลล์จากถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ จากขนาด 96 หลุม เป็น 24 หลุม และ 6 หลุมตามลำดับ เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์มากพอ ทำการรวบรวมน้ำเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป โดยหลังจาก reclone พบว่าโคลนที่ยังให้ผลบวกกับไวเทลโลเจนิน จากการหลอมเซลล์ครั้งที่ 1 มี 3 โคลน ครั้งที่ 2 มี 3 โคลน และครั้งที่ 3 มี 5 โคลน (ตารางที่ 4-1) จึงนำไปตรวจลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน เพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยเทคนิคทางแอนติบอดีต่อไป

4.4 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน

ก. การตรวจหา class และ subclass

การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยใช้เทคนิค Sandwich ELISA ตามวิธีการที่ระบุในชุดตรวจสำเร็จรูป Mouse Monoclonal Ab Isotyping Reagents kit (Sigma) โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนิน

ที่	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	การหลอมเซลล์ครั้งที่	Isotyping
1	18-7G, 18-6G	1	IgG1
2	37-1F	1	IgG1
3	41-7G, 41-10G	1	IgG2b
4	1-7C	2	IgM
5	42-7D, 42-12C	2	IgG2b
6	46-11G	2	IgG2b
7	F3 18-2D, F3 18-2F, F318-2G	3	IgG1
8	F3-19-5B, F3-19-5D, F3-19-4C	3	IgG2a
9	F3-20-7C, F3-20-8C, F3-20-9C	3	IgG1
10	F3-23-3C, F3-23-2D, F3-23-1A	3	IgG1
11	F3-35-7B, F3-35-7C	3	IgG1

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ตามข้อเสนอโครงการต่อเนื่อง 2 ปี ซึ่งในปีที่ 1 นี้เป็นการผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินเป็นหลัก ซึ่งมีสัมฤทธิผล 2 ประการ คือ ได้พอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูเมาส์มาใช้สำหรับตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว และได้มีการนำหนูเมาส์เหล่านั้นมาหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อความยั่งยืนในด้านปริมาณการผลิตแอนติบอดีต่อไป ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสิ้น 11 โคลน ซึ่งในสิ้นปีที่ 1 ของโครงการตามแผนของการดำเนินโครงการ มีข้อสรุป ดังนี้

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 ตัวนี้ มาใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้ดีในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 กับไวเทลโลเจนินในปลานิลและปลาเก๋าปะการังพบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลานิลและปลาเก๋าปะการัง และเนื้อเยื่อของปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเดียวกันได้ ทำให้มูลค่าของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สูงขึ้น เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินที่เกิดขึ้นในปลานิลและปลาเก๋าได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีข้อจำกัดในด้านของปริมาณที่สามารถผลิตได้ไม่มากนัก และเนื่องจากมีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่

หลากหลาย จึงได้มีการพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อความยั่งยืนในการมีแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจสอบต่าง ๆ ได้ต่อไป

3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำโดยนำเซลล์ม้ามจากหนูเมาส์ 3 ตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยไวเทลโลเจนินมาทำการหลอมเซลล์กับเซลล์ไมอิโลมา เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมที่สามารถเพาะเลี้ยงและถ่ายทอดลักษณะการสร้างแอนติบอดีได้ การทำหลายครั้ง เป็นการเพิ่มโอกาสในการทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปบนแอนติเจนที่หลากหลายมากขึ้น ในเบื้องต้นคัดเลือกไว้จำนวน 11 โคลน จากการหลอมเซลล์ 3 รอบ ซึ่งแต่ละโคลนมีลักษณะการตอบสนองต่อแอนติเจนแตกต่างกัน ซึ่งในสิ้นปีที่ 1 นี้ได้มีการตรวจสอบลักษณะสมบัติไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว และอยู่ระหว่างดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะและความไวของแอนติบอดีด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีแบบต่าง ๆ รวมทั้งความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีกับปลาชนิดอื่น ตามแผนการดำเนินงานในปีที่ 2 ซึ่งหากผลการตรวจสอบเสร็จสิ้นสามารถคัดเลือกโคลนที่มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินในสภาพธรรมชาติ และ/หรือแบบเสียสภาพ (denature) และมีความไวในการทดสอบด้วยเทคนิคแอนติบอดีต่าง ๆ ได้ดี จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาวและอาจใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นได้ต่อไปด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยและการประยุกต์ผลการวิจัย

ควรพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อความยั่งยืนในการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีแบบต่าง ๆ แทนพอลิโคลนอลที่สามารถผลิตได้ในปริมาณจำกัด รวมทั้งพัฒนาการวิคราะห์ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีแบบต่าง ๆ ให้มีความไวและความแม่นยำในการตรวจสอบ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินทั้งในด้านของการตรวจสอบเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (EDCs) และการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาแม่พันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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.