ผลของโนนิลฟีนอลต่อการชักนำไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน

Effect of Nonylphenol to Vitellogenin Induction in Juvenile Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*)

สุรัสวดี แพทย์รังษี [1], วิชชุดา ประสาทแก้ว[2], และ พอจิต นันทนาวัฒน์ [1]*

Surassawadee Paetrangsi[1], Witchuda Prasatkeaw[2] and Phochit Nanthanawat [1]*

[1] *ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2] *สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1] *Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University*

[2] *Environmental Science Programme, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 11 June 2017

Accepted : 6 July 2017

Published online : 20 July 2017

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโนนิลฟีนอลซึ่งเป็นสารคล้ายเอสโตรเจนที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและสารซักฟอกชนิดต่าง ๆ ในการชักนำให้ปลากะพงขาววัยอ่อนสร้างไวเทลโลเจนิน ทำโดยการฉีดโนนิลฟีนอล ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ในปลากะพงขาววัยอ่อนที่มีกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17 เบต้า-เอสตราไดออล 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก หลังการฉีดสารเก็บพลาสมาปลาเพื่อตรวจสอบไวเทลโลเจนินทุก 3 วัน โดยเทคนิคดอทบลอท (dot blot) และเวสเทิร์นบลอท (western blot) พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิคดอทบลอท พบไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลากลุ่มทดลองที่ได้รับโนนิลฟีนอล และกลุ่มควบคุมที่ได้รับ17 เบต้า-เอสตร้าไดออลตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง แต่ไม่พบผลบวกของไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาที่ได้รับโนนิลฟีนอลเมื่อตรวจโดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท มีเพียงผลบวกของการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับ 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล เท่านั้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโนนิลฟีนอลสามารถชักนำการสร้างไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนได้ เช่นเดียวกับเมื่อปลาได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคดอทบลอท จากผลการวิจัยดังกล่าว จึงมีแนวโน้มที่จะนำเทคนิคการตรวจสอบไวเทลโลเจนินนี้ ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบผลกระทบการปนเปื้อนสารคล้ายเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำต่อไปได้

คำสำคัญ : ไวเทลโลเจนิน ปลากะพงขาว ตัวชี้วัดทางชีวภาพ 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล โนนิลฟีนอล

***Corresponding author. E-mail :** phochit@buu.ac.th

Abstract

The study on effect of xenoestrogen as nonylphenol, which is a nonionic surfactant used in textiles industrial and detergent product were done. Vitellogenin was induced in juvenile Asian sea bass (*Lates calcarifer*) by injection with 4-Nonylphenol (25 milligram/ kilogram body weight) and 17β- estradiol (2 milligram/ kilogram body weight) as a positive control. Three days after injection, plasma were collected to detection of VTG every 3 days using Dot blot and Western blot. Result from dot blot showed the induction of vitellogenin in plasma of the nonylphenol treatment group and 17β - estradiol control group since 3 days after exposure. In addition, Western blot can detect vitellogenin induction only in 17β- estradiol injection groups. These results showed that vitellogenin can be induced with nonylphenol likewise 17β- estradiol (2 milligram/ kilogram body weight) and, detected by dot blot. For these results, this vitellogenin detection could be applied for detection of estrogenic effect in aquatic environment as well.

Keywords : vitellogenin, asian sea bass, biomarker, 17β- estradiol, nonylphenol

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร และการผลิตในภาคอุตสาหกรรมที่ขยายตัวอย่างต่อเนื่องเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดมลพิษลงสู่สิ่งแวดล้อมมากขึ้น โดยของเสียจากบริเวณต่าง ๆ อาจมีการปนเปื้อนจากสารเคมีของโรงงานอุตสาหกรรม ปุ๋ยเคมีและสารปราบศัตรูพืชจากการเกษตร รวมทั้งน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนและอุตสาหกรรมก็อาจจะทำให้มีการปนเปื้อนของสารหลากหลายชนิด รวมถึงสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในแหล่งน้ำด้วย โดยสารคล้ายเอสโตรเจน เป็นได้ทั้งสารเคมีที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา เพื่อใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ เกษตรกรรม และอื่นๆ เช่น ฮอร์โมน ฮอร์โมนสังเคราะห์ โลหะหนัก โนนิลฟีนอล (Nonylphenol) บิสฟีนอลเอ (Bisphenol A) สารปราบศัตรูพืช และสารกลุ่มโพลีคลอรีเนเตทไบฟีนิล (Polychlorinated biphenyls: PCBs) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน สามารถดูดซับเข้าสู่ร่างกาย และเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ จึงรบกวนการทำงานของฮอร์โมนซึ่งผลิตโดยต่อมไร้ท่อ (Endocrine gland) ทำให้ระบบหรืออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายที่ทำงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเกิดความผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การทำงานของระบบสืบพันธุ์ โดยสัตว์น้ำซึ่งอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารคล้ายเอสโตรเจนเหล่านี้จะได้รับผลกระทบโดยตรง กล่าวคืออาจมีผลกระทบต่อวงจรการสืบพันธุ์ของสัตว์ โดยอาจยับยั้งการตกไข่และการวางไข่ในเพศเมีย หากได้รับสารคล้ายเอสโตเจนในช่วงปลายของวงจรสืบพันธุ์หรือก่อนการวางไข่ และอาจเกิดความผิดปกติของการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศผู้ ทำให้มีผลเสียต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ หรืออาจเกิดชักนำให้เปลี่ยนเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมีย เป็นต้น (Nanthanawat, 2015) โดยสารคล้ายเอสโตรเจนสามารถชักนำให้เกิดการสร้างไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) ที่บ่งชี้การปนเปื้อนของสารสารคล้ายเอสโตรเจนโดยใช้สิ่งมีชีวิต เนื่องจากการสร้างไวเทลโลเจนินตามปกตินั้นสามารถพบได้ในปลาเพศเมียที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ และจะไม่พบในปลาเพศผู้หรือเพศเมียที่ยังโตไม่เต็มวัย แต่สามารถเกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้เมื่อมีการกระตุ้นจากสารในกลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือสารคล้ายเอสโตรเจนที่พบในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ และเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารประเภทนี้เข้าสู่ร่างกาย กลไกการทำงาน

ของร่างกายยังไม่สามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ ทำให้อาจมีการสะสมของสารคล้ายเอสโตรเจนในร่างกายได้ (Lü *et al*., 2012)

ในครั้งนี้ได้ทำศึกษาผลของโนนิลฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่ใช้ประกอบในสารซักฟอก น้ำยาล้างทำความสะอาด และยาฆ่าแมลง เป็นต้น ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลาย และจัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งอาจมีผลต่อการชักนำให้ปลากะพงขาววัยอ่อนเกิดการตอบสนองในการสร้างโปรตีนไวเทลโลเจนิน โดยเปรียบเทียบกับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (17 เบต้า-เอสตร้าไดออล) และทำการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลากะพงขาวด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีได้แก่ ดอทบลอท และเวสเทิร์นบลอท เพื่อสำรวจความเป็นไปได้ในการใช้ผลการตอบสนองต่อโนนิลฟีนอลไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบผลกระทบการปนเปื้อนสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การฉีดกระตุ้นให้ปลากะพงขาวสร้างไวเทลโลเจนิน

นำปลากะพงขาววัยอ่อนขนาดประมาณ 10 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 11.5 กรัม นำมาเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ในตู้กระจกที่มีขนาดความจุ 100 ลิตร ปรับสภาพในห้องทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งปลาเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (1) กลุ่มควบคุมผลลบที่ไม่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นใดๆ (2) กลุ่มควบคุมผลลบที่ฉีดตัวทำละลายฮอร์โมน (3) กลุ่มควบคุมผลบวกที่ฉีด 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และ (4) กลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยโนนิลฟีนอล 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทำการเก็บตัวอย่างเลือด ก่อนเริ่มทำการทดลองและหลังจากได้รับการฉีดกระตุ้นในวันที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 ของการทดลองเพื่อนำมาตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคแอนติบอดี คือดอทบลอทและเวสเทิร์นบลอท ตามลำดับ

2. การทดสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคดอทบลอท

นำพลาสมาของปลากะพงขาว (10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) หยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จากนั้นนำแช่ในสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนด้วยสารละลายทวีน-20 ความเข้มข้น 0.1% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนออกไปแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว (MAb-Sea bass VTG 41 เจือจาง 1:10,000) เป็นเวลาข้ามคืน แล้วล้างตัวกระทำส่วนเกินออก ด้วยสารละลายทวีน-20 ความเข้มข้น 0.1% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปแช่ในแอนติบอดีตัวที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM IgG-HRP) ที่ระดับความเจือจาง 1:3,000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวกระทำส่วนเกินออกด้วยสารละลายทวีน 20 ความเข้มข้น 0.1% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จึงนำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนมาทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (ไดอะมิโนเบนซิดีน 0.03%, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.03% และ โคบอลต์คลอไรด์ 0.05% ใน PBS) และบันทึกผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่เกิดจุดสีน้ำตาลเทา

3. การทดสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ เวสเทิร์นบลอท

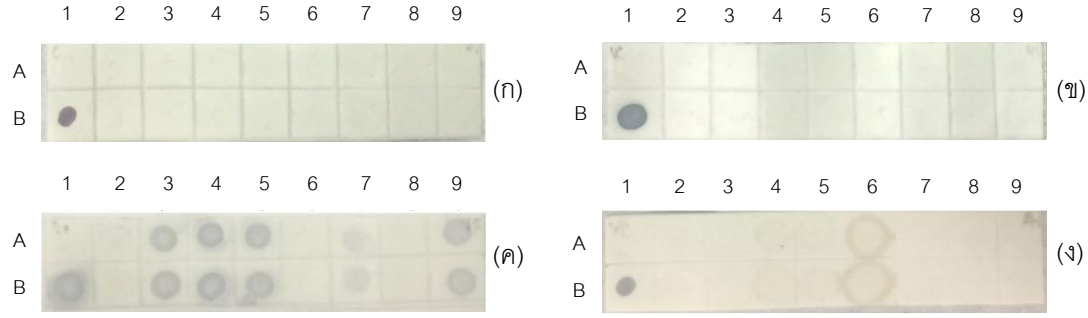
นำพลาสมาของปลากะพงขาว และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ได้จากการทดลองของ Ritphoe *et al*. (2015) มาเจือจางด้วย PBS และผสมกับสารละลายตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาแยกโปรตีนใน 7.5% SDS-PAGE จากนั้นนำไปย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 ส่วนเทคนิคเวสเทิร์นบลอท ทำได้โดยการย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และนำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายทวีน 20 0.1% ใน PBS นำมาแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะกับ

ไวเทลโลเจนิน (MAb-Sea bass VTG 41) ที่อัตราการเจือจาง 1:10,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวกระทำส่วนเกินออก จากนั้นแช่ในแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM-HRP เจือจาง 1:3,000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินแล้วนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรท บันทึกผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่เกิดแถบสีน้ำตาลเทา

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การทดสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคดอทบลอท

การตรวจสอบผลการชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนด้วยเทคนิคดอทบลอทในกลุ่มควบคุมผลลบที่ไม่ได้รับสารและกลุ่มควบคุมผลลบที่ได้รับสารตัวทำละลายไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนิน ส่วนกลุ่มควบคุมผลบวกได้รับการฉีดฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตร้าไดออล (2.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) พบการสร้างไวเทลโลเจนินในวันที่ 3, 6, 9 , 15 และ 21 ของการทดลอง โดยในวันที่ 12 และ 18 ไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนิน ส่วนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยโนนิลฟีนอล ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบการสร้างไวเทลโลเจนินในวันที่ 3, 6, 9, 12, 18 และ 21 ของการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Vaccaro *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาในปลากะพงเพศผู้ (*Dicentrarchus labrax*) ที่ได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และสารโนนิลฟีนอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3, 7, 14 และ 28 วัน พบว่าปลาทั้งสองกลุ่มสามารถตรวจพบการสร้างไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค ELISA ได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง โดยมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง และพบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ในวันที่ 28 ของการทดลองซึ่งจากการศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคดอทบลอท โดยใช้ MAb-Sea bass VTG 41 ของ Prasatkaew *et al.* (2016) พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากปลากะพงขาวได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0156 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 1 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคดอทบลอทในปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับสาร (ก) ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (ข) ได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล (ค) และสารโนนิลฟีนอล (ง) ปริมาณโปรตีน 8 ไมโครกรัมต่อช่อง โดยที่

1A คือ Negative control, 1B คือ Positive control,
2A และ 2B คือ พลาสมาปลาก่อนเริ่มทดลอง (วันที่ 0) 3A และ 3B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 3
4A และ 4B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 6 5A และ 5B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 9
6A และ 6B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 12 7A และ 7B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 15
8A และ 8B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 18 9A และ 9B คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 21

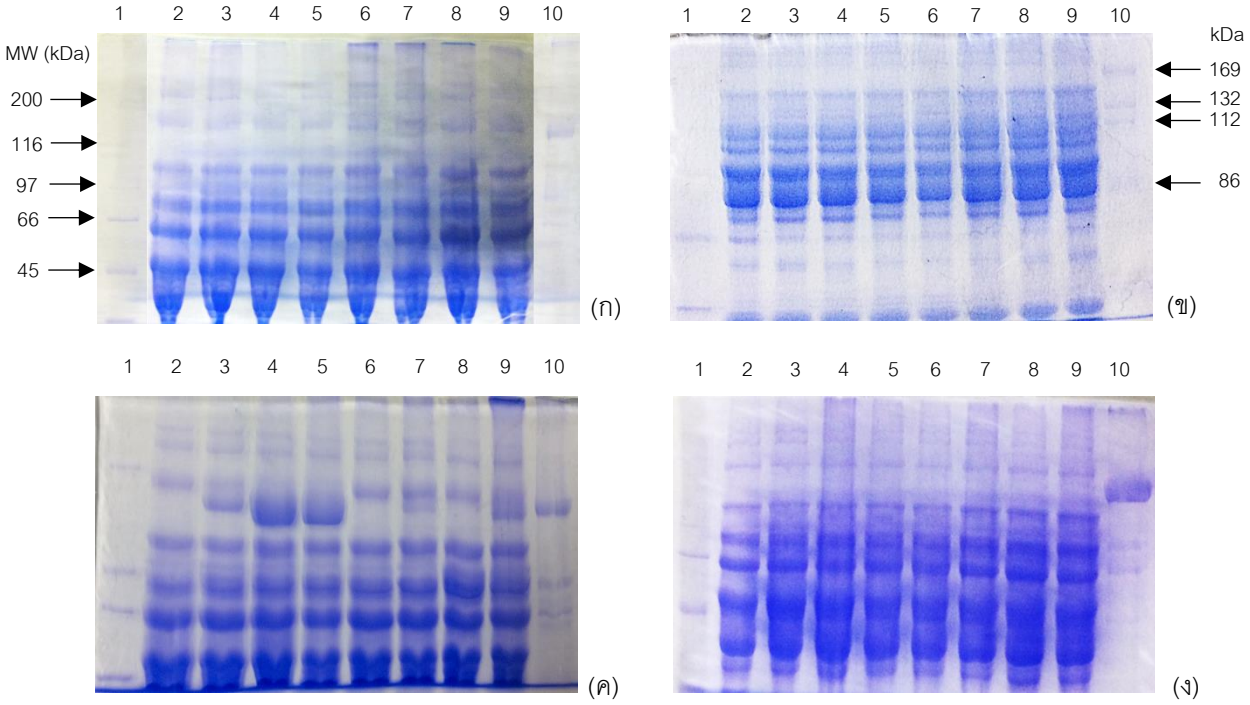
การทดสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเวสเทิร์นบลอท

เมื่อนำพลาสมาปลากะพงขาววัยอ่อนมาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ความเข้มข้น 7.5% พบว่ากลุ่มควบคุมผลลบที่ไม่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นใด ๆ และกลุ่มควบคุมผลลบที่ได้รับตัวทำละลาย ไม่มีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนในพลาสมา ส่วนในกลุ่มควบคุมผลบวกที่ฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล และกลุ่มทดลองที่ฉีดสารโนนิลฟีนอล พบแถบโปรตีนขนาด 150-200 kDa เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนการทดลอง (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับการศึกษาในปลา California halibut และ ปลา Stone flounder ที่พบว่าไวเทลโลเจนินในปลาชนิดดังกล่าวมีขนาดอยู่ระหว่าง 100-200 kDa (Maltais & Roy, 2009; Pan *et al*., 2012).

เมื่อตรวจสอบผลการชักนำในเกิดไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท โดยใช้ MAb-Sea bass VTG 41 พบว่ากลุ่มทดลองที่ฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล เท่านั้นที่สามารถตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนิน ในวันที่ 3, 6, 9, 15 และ 21 ส่วนในกลุ่มอื่น ๆ ตรวจไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนิน แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่งผลกระทบต่อการสร้างไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อน ซึ่งโดยทั่วไปไวเทลโลเจนินสามารถพบเฉพาะในปลาเพศเมียช่วงวัยเจริญพันธุ์ และไม่พบหรือพบต่ำมากในปลาเพศผู้หรือปลาวัยอ่อน แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยโนนิลฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายเอสโตรเจน ทำให้สามารถชักนำการสร้างไวเทลโลเจนินได้ ซึ่งทั้งในเทคนิคดอทบลอทและเวสเทิร์นบลอท สามารถตรวจพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับไวเทลโลเจนินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ของ Ritphoe *et al.* (2015) ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร พบแถบโปรตีนหลักที่ขนาดประมาณ 169 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 3) ซึ่งจากศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท โดยใช้ MAb-Sea bass VTG พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากปลากะพงขาวได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร โดยปริมาณไวเทลโลเจนินที่เหมาะสมอยู่ที่ 2-4 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร (Prasatkaew *et al*., 2016) ซึ่งแสดงว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่เกิดขึ้นน่าจะมีระดับต่ำกว่า 0.0125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จึงทำให้การตรวจสอบโดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอทไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลากลุ่มที่ได้รับสารโนนิลฟีนอล และอาจเนื่องมาจากความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับไวเทลโลเจนินในรูปแบบที่คงสภาพหรือเสียสภาพได้ต่างกัน รวมทั้งความสามารถในการจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนของสารคล้ายเอสโตรเจนที่ต่ำกว่าของโนนิลฟีนอลเมื่อเทียบกับ 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ทำให้เกิดการชักนำไวเทลโลเจนินได้น้อยกว่าการได้รับ 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโนนิลฟีนอล 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาววัยอ่อนได้ เช่นเดียวกับเมื่อปลาได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีตั้งแต่วันที่ 3 หลังได้รับสาร โดยเทคนิคเวสเทิร์นบลอทสามารถตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาที่ได้รับฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ส่วนเทคนิคดอทบลอทสามารถตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนินได้ทั้งในปลากะพงขาววัยอ่อนทั้งที่ได้รับสารโนนิลฟีนอล และฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตร้าไดออล ดังนั้นจากงานวิจัยดังกล่าว จึงมีแนวโน้มที่จะนำเทคนิคการตรวจสอบไวเทลโลเจนินนี้ ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบผลกระทบการปนเปื้อนสารคล้ายเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำต่อไปได้



ภาพที่ 2 การตรวจสอบโปรตีนในพลาสมาปลากะพงขาวด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับสาร (ก) ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (ข) ได้รับฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตร้าไดออล (ค) และสารโนนิลฟีนอล (ง) ปริมาณโปรตีน 8 ไมโครกรัมต่อช่อง โดยที่

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad))

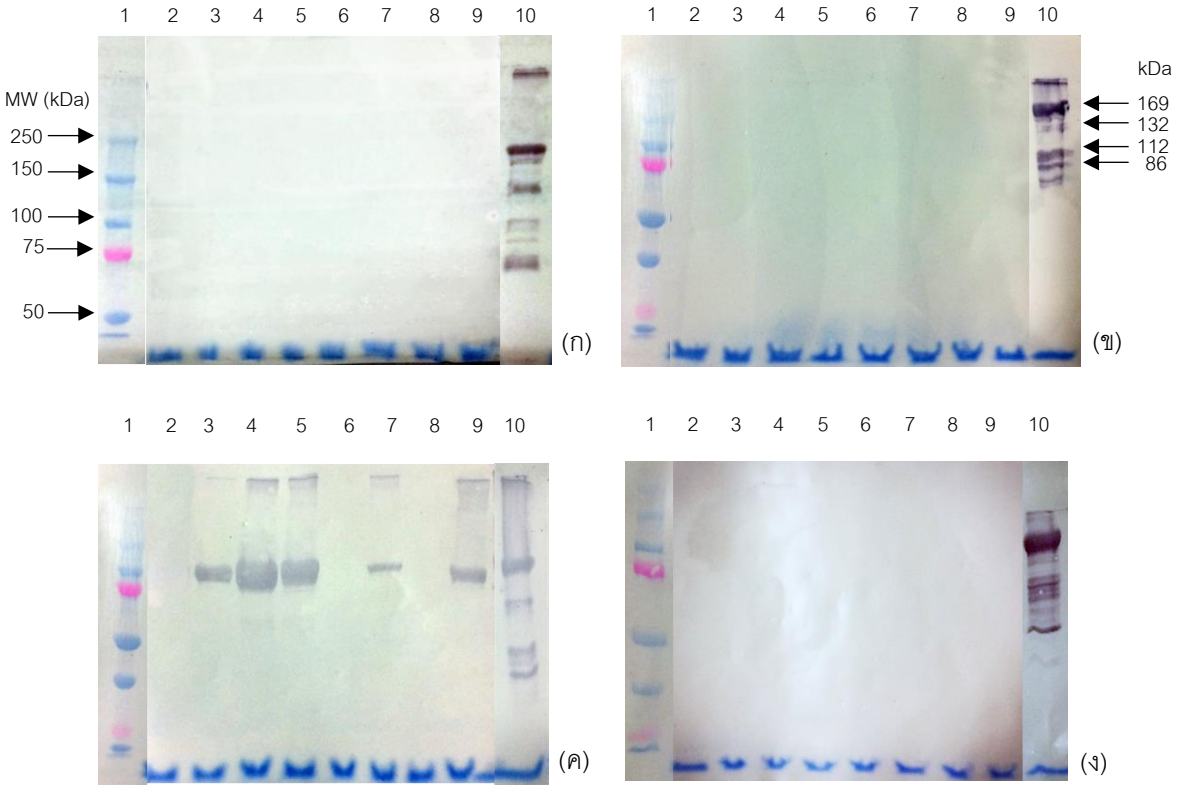
ช่องที่ 2 คือ พลาสมาปลาก่อนการทดลอง (วันที่ 0) ช่องที่ 3 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 3

ช่องที่ 4 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 6 ช่องที่ 5 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 9

ช่องที่ 6 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 12 ช่องที่ 7 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 15

ช่องที่ 8 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 18 ช่องที่ 9 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 21

ช่องที่ 10 คือ ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร



ภาพที่ 3 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอท ในปลากะพงขาวที่ไม่ได้รับสาร (ก) ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (ข) ได้รับฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตร้าไดออล (ค) และสารโนนิลฟีนอล (ง) ปริมาณโปรตีน 8 ไมโครกรัมต่อช่อง โดยที่

ช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Pre-stained plus SDS-PAGE standard, Broad Range (BioRad))

ช่องที่ 2 คือ พลาสมาปลาก่อนการทดลอง (วันที่ 0) ช่องที่ 3 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 3

ช่องที่ 4 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 6 ช่องที่ 5 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 9

ช่องที่ 6 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 12 ช่องที่ 7 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 15

ช่องที่ 8 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 18 ช่องที่ 9 คือ พลาสมาปลาหลังการทดลองวันที่ 21

ช่องที่ 10 คือ ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 71/2559

เอกสารอ้างอิง

Lü, X.F., Liu, F.Y., Zhou, X.P., Zhou, Q.F. and Deng, Y.L. (2012). Effects of cadmium, 17ß-estradiol and their interaction in the male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Chinese Science Bulletin*, *57*, 858-863

Maltais, D. and 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.

Nanthanawat, P. (2015). Vitellogenin : Biomarker for EDCs Exposure in Aquatic Environment *Burapha Science Journal*, *20*(2), 201-208. (In Thai)

Pan, Z., Tain, H., Wang, W., Wang, J. and 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.

Prasatkaew, W., Thanomsit, C. and Nanthanawat, P. (2016). Cross-Reactivity of Monoclonal Antibody against Vitellogenin from Asian Sea bass. In *Proceedings the 8th Science Research Conference* (pp. 491-496) Payao : University of Payao. (In Thai)

Ritphoe, S., Pimprong, A., Prasatkaew, W. and Nanthanawat P. (2015). Purification and Characterization of Plasma Vitellogenin from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*) In *Proceedings the 7th National Science Research Conference* (BI-P002 p1-7) Pitsanulok : Naresuan University. (In Thai)

Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Bello, D.D., Longoa, V., Gervasi, P.G. and Pretti, C. (2005). Effects of 17-estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology, 75*, 293-305.

.