การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน ในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus maculatus*)

Production of Polyclonal Antibody Specific to Plasma Vitellogenin of Blue-spotted grouper, *Plectropomus maculatus*.

ชุติมา ถนอมสิทธิ์[1], พอจิต นันทนาวัฒน์[2]*, เรณู ยาชิโร[3], ศิวาพร ลงยันต์[4], สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[5]และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]

[1]หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง

[4]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร

[5]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chutima thanomsit[1], Phochit Nanthanawat[2]*, Renu Yashiro[3], Siwaporn Longyant[4], Subuntith Nimrat[5] and Verapong Vuthiphandchai[1]

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

[2]Department of biotechnology, Faculty of Science, Burapha University

[3]Rayong Coastal Research and Development Center

[4]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[5]Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

บทคัดย่อ

ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินโดยการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวด้วย ไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus maculatus* เพศเมียที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 และเมื่อตรวจสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 102 และ 94 kDa ตามลำดับ จากการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค Double immunodiffusion พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ได้รับการฉีดด้วยฮอร์โมนและไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมนและพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้ และเมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค Western blot พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนที่แยกได้จากไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 94, 75, 70, 68 และ 50 kDa ตามลำดับ

คำสำคัญ : โพลีโคลนอลแอนติบอดี ไวเทลโลเจนิน ปลากะรังจุดฟ้า

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

Abstract

Polyclonal antibody (PAb) specific to vitellogenin (VTG) was obtained from mice immunized with VTG isolated from plasma of blue-spotted grouper, *Plectropomus maculatus,* which was induced by injection of 17 β-estradiol before purification with hydroxylapatite and sephacryl S-300 column. After performing with SDS-PAGE, VTG was identified at the molecular weight of 102 and 94 kDa respectively. The specificity of PAb to VTG determined by double immunodiffusion showed that PAb reacted with the plasma of 17 β-estradiol-injected female and purified VTG. However, the cross-reaction of PAb to the plasma of intact females and the plasma from males was not observed. When using western blot techniques, the PAb was identified the purify VTG at molecular weight of 94, 75, 70, 68 and 50 kDa, respectively. This PAb could be useful in immunological techniques for determination of vitellogenin content of blue-spotted grouper.

Keyword : blue-spotted grouper, *Plectropomus maculatus,* Polyclonal antibody, vitellogenin

บทนำ

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) เป็นโปรตีนหลักในไข่แดง (Yolk) และเป็นแหล่งอาหารสะสมและพลังงานเพื่อใช้ระหว่างพัฒนาการของตัวอ่อน (Embryo) ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในสัตว์เพศเมียและพบในเซลล์ไข่ที่มีการสะสมไข่แดง กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออลหรือสารที่มีลักษณะคล้ายกับฮอร์โมนดังกล่าว (Hennies *et al.,* 2003) โดยทั่วไปลักษณะภายนอกของปลาทะเลเพศผู้และเพศเมียในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่จะไม่แตกต่างกันทำให้แยกเพศปลาทะเลได้ยาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยบุคลากรที่มีประสบการณ์อย่างมากในการที่จะแยกเพศของปลา รวมทั้งการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของปลาแม่พันธุ์ก่อนที่จะนำมาฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้ปลาวางไข่ ได้มีรายงานการใช้ไวเทลโลเจนินในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ความสมบูรณ์เพศและพัฒนาการของเซลล์ไข่ (Werawatgoompa *et al.,* 1997) และใช้เป็นตัวชี้วัดชีวภาพการปนเปื้อนหรือการได้รับผลกระทบจากสารมลพิษต่างๆ เช่น โลหะหนัก สารออกาโนคลอรีน สารโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (PAHs) ร่วมกับตัวชี้วัดอื่นๆ ด้วย (Fernandes *et al.,* 2008) สำหรับการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ เทคนิค Radioimmunoassay (RIA) Rocket immunoelectrophoresis และเทคนิค Enzyme immunoassay (EIA) เช่น ELISA เป็นต้น ทั้งนี้พื้นฐานของการตรวจสอบด้วยเทคนิคเหล่านี้ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานเบื้องต้นถึงความสำเร็จในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus maculatus*ซึ่งเป็นปลาทะเลเศรษฐกิจที่นิยมบริโภค เพื่อประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่ได้นี้ในการตรวจความสมบูรณ์เพศของแม่พันธุ์ปลากะรังจุดฟ้าเพื่อความสะดวกในการจัดการระหว่างการเพาะขยายพันธุ์ หรือใช้เป็นตัวชี้วัดผลกระทบด้านอื่นๆ โดยใช้เทคนิคที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ปลากะรังจุดฟ้า *P. maculatus* เพศเมีย จำนวน 5 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.5-2.5 กิโลกรัม รวบรวมจากกระชังบริเวณเกาะเสม็ด ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง จังหวัดระยอง นำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด15 ตัน (5 x 3 x 1 เมตร) เป็น เวลา 15 วัน เปลี่ยนน้ำทะเลทุกวัน ให้เนื้อปลาข้างเหลืองสดเป็นอาหารวันละ 1.5% ของน้ำหนักตัว ฉีดกระตุ้นให้ปลาสร้างไวเทลโลเจนินด้วยฮอร์โมน 17-เบต้า เอสตราไดออล ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จำนวน 4 ครั้งทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นเก็บเลือดปลาบริเวณซี่เหงือก โดยใช้เข็มรูปผีเสื้อและใส่ในหลอดที่เคลือบเฮพารินและ 0.01% Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma) ปั่นแยกพลาสมาปลาที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกพลาสมาของปลาแต่ละตัวเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

หนูขาว (Swiss mice) อายุ 6 สัปดาห์ ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม

การทำไวเทลโลเจนินให้บริสุทธิ์

การแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาโดยใช้คอลัมน์ชนิดต่างๆ

นำพลาสมาปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17-เบต้า เอสตราไดออล มาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ แล้วชะด้วย โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 1.2 โมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้โปรตีนที่ผ่านการชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ (พีคที่ 3) มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส -300 และชะด้วยทริส บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ วัดปริมาณโปรตีนโดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับ BSA มาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวโลเจนินด้วย SDS-PAGE

นำแอนติเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ โปรตีนจากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อนและหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน และโปรตีนจากพีคต่างๆ ที่ผ่านคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิดมาแยกใน 7.5% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นำเจลที่ได้ไปย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

นำโปรตีนพีคที่ 3 ที่แยกได้จากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดสารผสมเข้าบริเวณช่องท้องของหนูขาว 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยการฉีดในครั้งที่ 2-4 จะผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant หลังจากฉีดครั้งที่ 4 แล้ว 1 สัปดาห์ จะเก็บเลือดหนูโดยการเจาะเลือดทางเบ้าตา นำเลือดที่ได้มาทิ้งให้แข็งตัว แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แบ่งซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚C จนกว่าจะนำมาใช้

การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค Double immunodiffusion

เทวุ้น (อะกาโรส) 1.2% ที่ละลายในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.2 ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งให้เย็นเจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลมๆ จากนั้นหยดแอนติเจน ได้แก่ พลาสมาจากปลาเพศเมียที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พลาสมาจากปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมเซฟาคริลเอส-300 และพลาสมาจากปลาเพศผู้ ลงในหลุมรอบๆ แต่ละหลุม ส่วนหลุมตรงกลางหยดแอนติซีรัมจากหนูแต่ละตัวที่ต้องการทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปย้อมสี coomassie brilliant blue R-250 เลือกแอนติซีรัมจากหนูตัวที่ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพลาสมาจากปลาเพศผู้และพลาสมาจากปลาเพศเมียที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมาใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค Dot blot

นำแอนติเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ พลาสมาของปลาเพศผู้ ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ พลาสมาของปลาก่อนหรือหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน หยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนช่องละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้ง จากนั้น block ด้วย 5% Blotto (5% Skim milk ใน 0.15 M PBS, 0.1% Triton X-100, 1% Thimerosol) เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 6 ระดับคือ 1 : 200, 1 : 500, 1 : 1,000, 1 : 5,000, 1 : 10,000 และ 1 : 20,000 บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มใน Goat anti mouse IgG-HRP (GAM-HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) ความเข้มข้น 1 : 1,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ทำให้เกิดสีในสารละลายสับสเตรทประกอบด้วย 0.03% Diaminobenzidine (DAB), 0.006% Hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% Cobalt chloride ($CoCl_2$)ใน PBS ตรวจดูผล

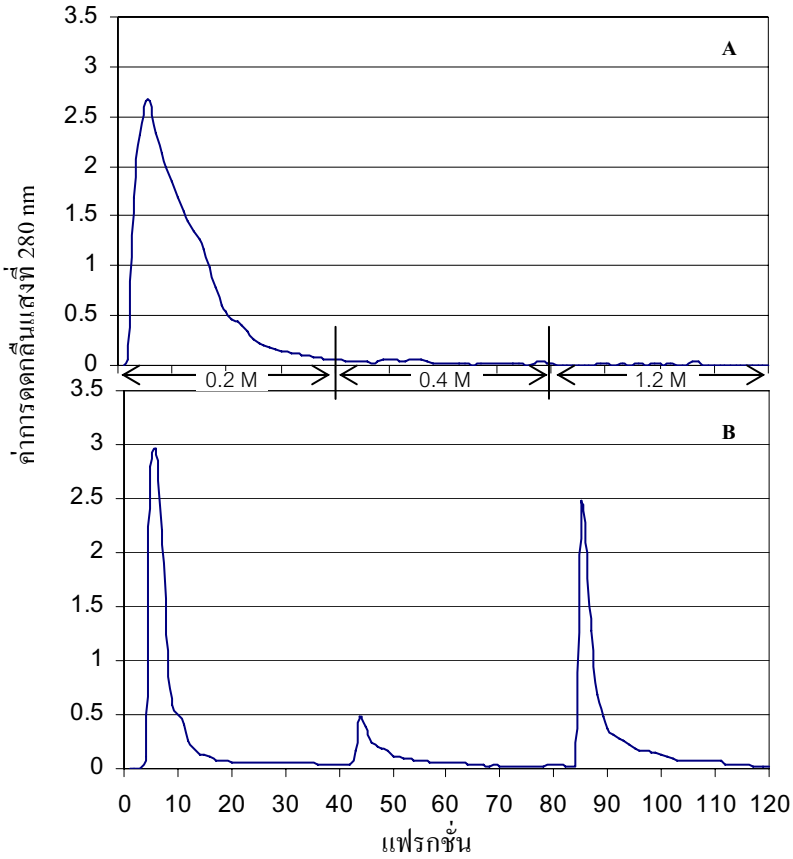
การตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแยกโปรตีนในพลาสมาปลากะรังจุดฟ้าด้วย 7.5% SDS-PAGE เช่นเดียวกับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวเทลโลเจนิน จากนั้นนำเจลที่ได้มาถ่ายโปรตีนลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยใช้ Transblot apparatus นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจุ่มใน 5% Blotto เป็นเวลา 30 นาที แล้วบ่มในโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เจือจาง 1 : 1,000 ใน 5% Blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับกรณีของ Dot blot เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี โดยเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับ Prestained standard molecular weight markers (BioRad)

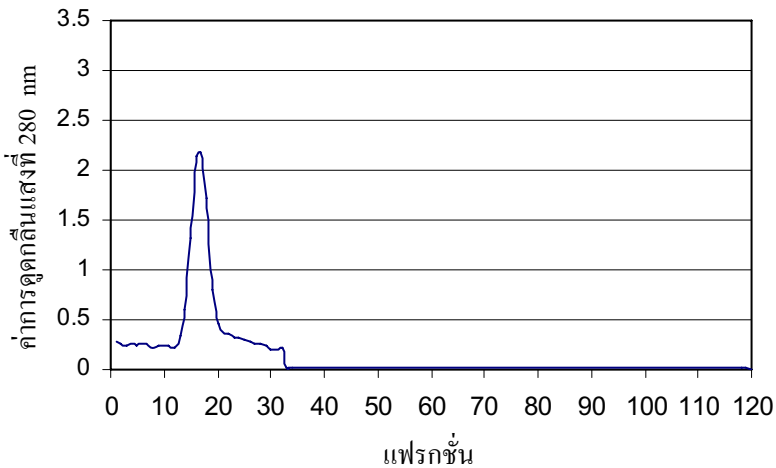
ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการฉีดกระตุ้นปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล มีผลทำให้การสร้างโปรตีนในพลาสมาเพิ่มมากขึ้นจาก 50.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 266.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำพลาสมาจากปลาก่อนและหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ พบความแตกต่างของโปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาทั้งสองชนิด คือโปรตีนที่แยกจากพลาสมาจากปลาหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจะพบพีคของโปรตีนเพิ่มขึ้นอีก 2 พีค คือพีคที่ 2 และพีคที่ 3 (ภาพที่ 1) จากนั้นนำโปรตีนพีคที่ 3 ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์มาทำให้เข้มข้นและผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 จะแยกโปรตีนได้ 1 พีค (ภาพที่ 2)

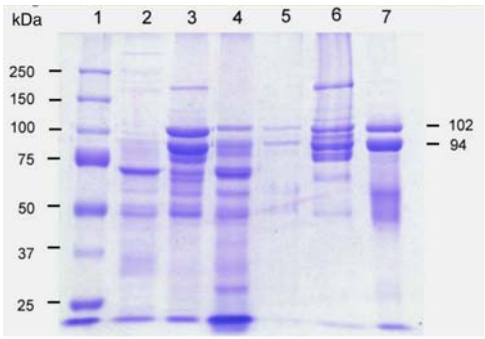
เมื่อนำโปรตีนในพลาสมาปลากะรังจุดฟ้าที่มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีทั้งสองชนิดมาแยกโดยใช้ SDS-PAGE พบความแตกต่างของแถบโปรตีนในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า- เอสตราไดออล (ภาพที่ 3 แถวที่ 3) โดยจะมีแถบโปรตีนเพิ่มมากขึ้นกว่าปลาที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (ภาพที่ 3 แถวที่ 2) แต่โปรตีนจากทั้ง 3 พีคที่เก็บจากการแยกโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์จะพบแถบโปรตีนลดลง (รูปที่ 3 แถวที่ 4-6) และโปรตีนพีคที่ 3 ที่นำมาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 พบแถบโปรตีนหลักเพียง 2 แถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 102 และ 94 kDa ตามลำดับ (ภาพที่ 3 แถวที่ 7) โดยแถบโปรตีนที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับไวเทลโลเจนินที่พบในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ เช่น ปลา *Zoarces viviparous* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของไวเทลโลเจนินเป็น 137, 98, 75 และ 71 kDa (Korsagaard & Pedersen, 1998) และในปลา Rare minnow ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 170 และ 147 kDa ตามลำดับ (Liao *et al.,* 2006) ดังนั้นโปรตีนที่แยกได้หลังจากผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 น่าจะเป็นไวเทลโลเจนินเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมการแยกไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อน (A) และหลังจาก (B) ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลโดยนำมาผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ ชะด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 0.4 โมลาร์ และ1.2 โมลาร์ ตามลำดับ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

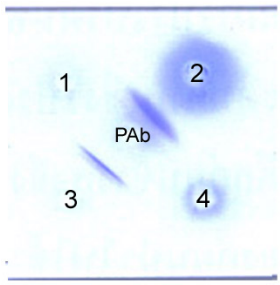


ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมการแยกไวเทลโลเจนินจากพลามาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล โดยนำโปรตีนจากพีคที่ 3 หลังจากการแยกด้วยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ มาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 และชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแฟรกชั่นละ 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร



ภาพที่ 3 SDS-PAGE ของโปรตีนในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อน (2) หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (3) โปรตีนที่แยกได้จากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าหลังฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์โดยโปรตีนจะถูกชะออกมาด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.2 โมลาร์ เป็นโปรตีนพีค ที่ 1 (4), 0.4 โมลาร์ เป็นโปรตีนพีคที่ 2 (5) และ 1.2 โมลาร์ เป็นโปรตีนพีคที่ 3 (6) ตามลำดับ และโปรตีนที่แยกได้หลังจากนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 ชะด้วยทริส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 8.0 (7) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (1)

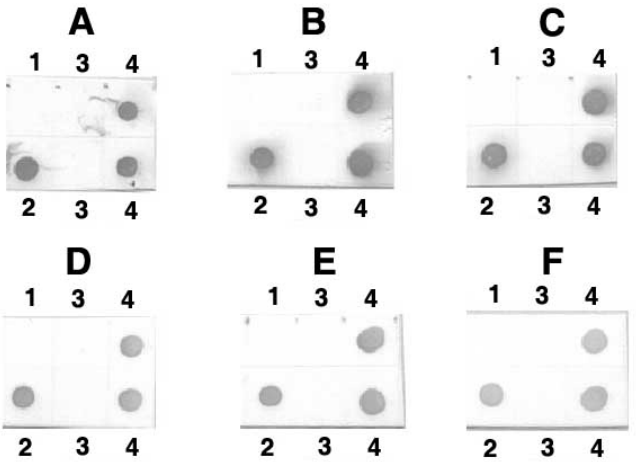
จากการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Double immunodiffusion พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูขาว สามารถทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนได้ (ภาพที่ 4 หลุมที่ 2) และโปรตีน (ไวเทลโลเจนิน) ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ได้ (ภาพที่ 4 หลุมที่ 3) โดยเกิดเป็นแนวตะกอนขึ้น แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (ภาพที่ 4 หลุมที่ 1) และพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้ (ภาพที่ 4 หลุมที่ 4) ตามลำดับ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในปลา Sea bass (*Dicen- trarchus labrax* L.) (Mañanós *et al.,* 1994) และปลา Sturgeon, Bester (*Huso huso* x *Acipencer ruthenus*) (Hiramatsu *et al.,* 2002) ส่วนการที่ไม่เกิดแนวตะกอนกับพลาสมาของปลากะรังเพศเมียที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลนั้น เนื่องมาจากปลาที่นำมาใช้ในการศึกษายังไม่สมบูรณ์เพศจึงยังไม่พบการสร้างไวเทลโลเจนินในเลือดทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้



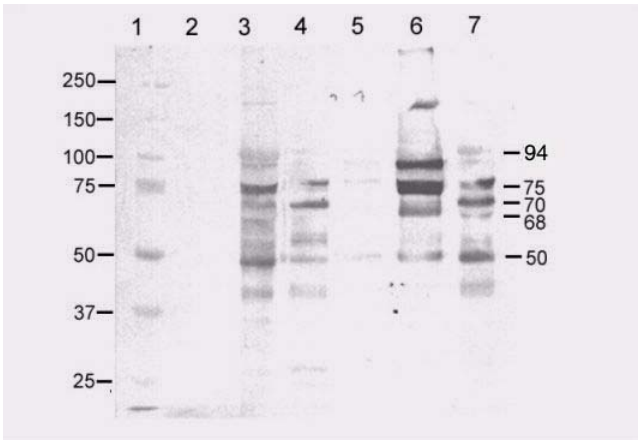
ภาพที่ 4 Double immunodiffusion ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb)จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะรังจุดฟ้า (หลุมตรงกลาง) กับแอนติเจนชนิดต่างๆ (หลุมรอบๆ) ได้แก่ หลุมที่ 1 พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ไม่ได้รับฮอร์โมน หลุมที่ 2 พลาสมาของปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน หลุมที่ 3 ไวเทลโลเจนินที่แยกได้โดยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 และ หลุมที่ 4 พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้

สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค Dot blot พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินสูงโดยสามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลดำกับแอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา คือ โปรตีนในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน และโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนในพลาสมาของปลาเพศผู้และโปรตีนจากพลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากัน นอกจากนี้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีค่าไตเตอร์ค่อนข้างสูง โดยสามารถเจือจางที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 1 : 20,000 ก็ยังสามารถใช้ตรวจไวเทลโลเจนินจากแอนติเจนที่ใช้ศึกษาได้ (ภาพที่ 5)

ส่วนการตรวจความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิค Western blot พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนจากพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการกระตุ้นโดยการฉีดฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล โปรตีนพีคที่ 3 ที่แยกได้โดยคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์เกิดเป็นแถบสีดำ (ภาพที่ 6) โดยแถบโปรตีนที่แยกได้จากโปรตีนพีคที่ 3 และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 6 แถวที่ 6 และ 7) แต่ในกรณีของไวเทลโลเจนิน บริสุทธิ์จะพบแถบโปรตีนทั้งหมด 5 แถบ คือ



ภาพที่ 5 Dot blot ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน โดยใช้แอนติเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) พลาสมาของปลาเพศผู้ (2) ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ (3) พลาสมาของปลาที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล และ (4) พลาสมาของปลาที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยหยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจุดละ 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 6 ระดับคือ (A) 1 : 200, (B) 1 : 500, (C) 1 : 1,000, (D) 1 : 5,000, (E) 1 : 10,000 และ (F) 1 : 20,000



ภาพที่ 6 Western blot ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนิน นำ (2) พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าก่อนการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและ (3) พลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าหลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (4) โปรตีนพีคที่ 1 (5) โปรตีนพีคที่ 2 (6) โปรตีนพีคที่ 3 ที่แยกได้จากคอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์ และ (7) โปรตีนที่แยกได้จากการผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS - PAGE) แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (1)

แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 94, 75, 70, 68 และ 50 kDa ตามลำดับ (ภาพที่ 6 แถวที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่แยกได้ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 3 แถวที่ 7) พบว่าแถบโปรตีนที่พบจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากไวเทลโลเจนินเกิดการสลายตัวได้ง่ายจึงทำให้มีการเปลี่ยนรูปไป เพราะฉะนั้นแถบโปรตีนเล็กๆ ที่พบเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค Western blot จึงน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ของไวเทลโลเจนินที่เกิดการสลายจนได้แถบโปรตีนขนาดเล็กลง ซึ่งในรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าไวเทลโลเจนินสามารถสลายตัวได้ง่ายเช่นกัน (Silversand & Specker, 1993; Korsgaard & Pedersen, 1998; Hennies *et al.,* 2003) ดังนั้นในการทำให้ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จึงต้องเพิ่มความระมัดระวัง ทั้งนี้อาจจะต้องเติมสาร เช่น EDTA ลงไปในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิดในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเพื่อเป็นการลดการสลายตัวของไวเทลโลเจนินต่อไป

โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการทดลองนี้มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินโดยสามารถนำมาใช้ในเทคนิคทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Immunodiffusion และ Dot blot สำหรับตรวจหาไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าที่ได้รับการฉีดกระตุ้นโดยการฉีดฮอร์โมน17 เบต้า-เอสตราไดออลได้ ซึ่งให้ผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกัน และแอนติบอดีที่ได้ยังไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับกับพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและพลาสมาปลากะรังจุดฟ้าเพศผู้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในปลา Rare minnow (*Gobicypris rarus*) และปลา Zebra fish (*Danio rerio*) ที่พบว่าไวเทลโลเจนินที่แยกได้จากพลาสมาของปลาเพศเมียสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีที่ผลิตได้ในขณะที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพลาสมาของปลาเพศผู้ (Liao *et al.,* 2006) และเมื่อนำมาแอนติบอดีมาทดสอบกับโปรตีนพีคที่ 3 ที่แยกได้โดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซิลอะพาไทต์และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาคริลเอส-300 พบว่าสามารถจับกับแถบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกัน

นอกจากนี้จากการศึกษาด้วยเทคนิค Dot blot สามารถใช้แอนติบอดีที่เจือจางถึง 1 : 20,000 เท่า ในการไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาได้ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้นำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไวเทลโลเจนิน ตรวจหาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนิน และศึกษาพัฒนาการของรังไข่หรือตรวจดูความสมบูรณ์เพศของปลาโดยประเมินจากระดับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลากะรังจุดฟ้าเพศเมียได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง ต.ตะพง จ.ระยอง ที่ให้การสนับสนุนปลากะรังจุดฟ้า และ ภาควิชาวาริชศาสตร์ และ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี รวมทั้งห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพมหานคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Fernandes, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J. & Porte, C. (2008). Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environmental Pollution*, *152,* 138-146.

Henneis, M., Wiesmann, M., Allner, B. & Sauerwein, H. (2003). Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): Purification, characterization and development of an ELISA for detection of estrogenic effects. *The Science of the Total Environment*, *309*, 93-103.

Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Hirano, K. & Hara, A. (2002). Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso x Acipencer ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *131*, 429-441.

Korsgaard, B. & Pedersen, K.L. (1998). Vitellogenin in *Zoarces viviparous*: Purification quantification by ELISA and induction by estradiol-17B and 4-nonylphenol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *120*, 159-166.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of the structure proteins during the assembly the head of T4. *Nature*, *227,* 680-685.

Liao, T., Jin, S., Yang, F. X., Hui, Y. & Xu, Y. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vitellogenin and comparison of vitellogenin response in rare minnow and zebra fish (*Danio rerio*). *Science of theTotal Environment, 364,* 284-294.

Mañanós, E., Zanúy, S., Le, M. F., Carrillo, M. & Núñez, J. (1994). Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin: Induction, purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology, 107*, 205-216.

Siversand, M. & Specker, T. L. (1993). Vitellogenin in tilapia (*Oreochronis massambicus*):Induction of two form by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish Physiology and Biochemistry*, *12*, 171-182.

Werawatgoompa, S., Piyatiratitivorakul, S., Nitithamyong, C., Aranyakanonda, P., Moree, N., Vajanamarhutue, C., Ruangvejivorachai, & Menasveta, P. (1997). Plasma vitellogenin and growing oocytes of grouper (*Cephalopholia pachycentron*). *Journal of Marine Biotechnology, 5,* 137-141.