การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไซโตโครม P4501A (CYP1A)ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) ที่ได้รับสารเบนโซ [เอ] ไพรีน

Production and Characterization of Monoclonal Antibody Specific to Cytochrome P4501A (CYP1A) in Asian Sea Bass (*Lates calcarifer* Bloch) Exposed to Benzo[a]Pyrene

พอจิต นันทนาวัฒน์[1]* นันทิกา คงเจริญพร[2] วิชชุดา ประสาทแก้ว[3] และปภาศิริ กาญจโนภาศ-บาร์เนท[4]

Phochit Nanthanawat[1]*, Nanthika Khongchareonporn[2], Witchuda Prasatkaew[3] and Praparsiri Kanchanopas- Barnette[4]

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[3] หลักสูตรวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[4] ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

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

[2] Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University

[3] Environmental Science Programme, Faculty of Science, Burapha University.

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

บทคัดย่อ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไซโตโครม P4501A (CYP1A) ของปลากะพงขาว *(Lates calcarifer* Bloch) ที่ได้รับสารเบนโซ [เอ] ไพรีน โดยการฉีดกระตุ้นหนูขาวด้วย CYP1A จากตับปลากะพงขาวสกัด จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำม้ามหนูที่ตอบสนองต่อแอนติเจนมาหลอมกับ myeloma เพื่อผลิตเซลล์ลูกผสม คัดเลือกโคลนที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อ CYP1A จากตับปลากะพงขาวสกัด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 56 และ 74 กิโลดาลตัน โดยเทคนิค dot blot และ western blot พบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ CYP1A จำนวน 3 โคลน ได้แก่ MAb- sea bass CYP1A 1.4-3D, 2.3-4G-6E และ 155-4D ที่มีไอโซไทป์ เป็น IgG1, IgG1 และ IgM ตามลำดับ โมโนโคลนอลที่ผลิตได้นี้จัดได้เป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะของ CYP1A ในรูปแบบเสียสภาพ (denatured) และรูปแบบไม่เสียสภาพ (native form) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 จำเพาะต่อ CYP1A ในรูปแบบเสียสภาพเท่านั้น มี 2 โคลน ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D และ 2.3-4G-6E และกลุ่มที่ 2 จำเพาะต่อ CYP1A ทั้งในรูปแบบเสียสภาพ และรูปแบบไม่เสียสภาพ มี 1 โคลน ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 155-4D ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปใช้ตรวจสอบ CYP1A ได้ด้วยเทคนิค dot blot, western blot และ immunohistochemistry หรือพัฒนาเทคนิค ELISA ได้ต่อไป นอกจากนี้พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 โคลน มีสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้กับปลาทะเลชนิดต่าง ๆ ปลาน้ำกร่อย และปลาน้ำจืดบางชนิดได้

คำสำคัญ : ไซโตโครม P4501A โมโนโคลนอลแอนติบอดี ปลากะพงขาว พีเอเอช เบนโซ [เอ] ไพรีน

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

Abstract

Monoclonal antibodies specific to cytochrome P4501A of Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch) exposed to benzo[a]pyrene were generated from a mouse immunized with fish liver cytochrome P4501A extracts. The spleen was fused with myelomas to provide hybridomas. Hybridomas were screened by dot blot and western blot against Asian sea bass CYP1A extracts. Three clones of monoclonal antibodies (MAb-sea bass CYP1A1.4-3D, 2.3-4G-6E and 155-4D) specific to Asian sea bass CYP1A (54 and 76 kDa) were obtained and the isotyping were IgG1, IgG1 and IgM, respectively. They were divided into 2 groups according to their specific binding to denatured and native form of CYP1A. The first group of antibodies (1.4-3D, 2.3-4G-6E) recognized only denatured form and the second group (155-4D) recognized both denatured and native form of CYP1A. The monoclonal antibodies can use for CYP1A detection by antibody techniques such as dot blot, western blot and immunohistochemistry or develops for ELISA. In addition, all clones of monoclonal antibodies were cross-reacted with liver cytochrome P4501A from some marine, brackish or freshwater fishes.

Key words : *Cytochrome P4501A, Monoclonal Antibody, Asian sea bass, PAHs, Benzo[a]pyrene*

บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร xenobiotics ในแหล่งน้ำ ซึ่งสารเหล่านี้มีผลในการชักนำให้เกิดไซโตโครม P4501A (CYP1A) ซึ่งเป็นโมโนออกซิเจเนส ที่สร้างขึ้นในตับ และทำหน้าที่เปลี่ยนโครงสร้างและกำจัดสารปนเปื้อนออกจากร่างกาย มีการใช้ไซโตโครม P4501A เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพหลังได้รับผลกระทบจากสารในกลุ่มของ Polychlorinated biphenyl (PCB), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) (Eggens และคณะ, 1995) ใช้เป็นตัวชี้วัดติดตามผลกระทบต่อปลาในแหล่งน้ำได้ ไซโตโครม P4501A ในปลากระดูกแข็งมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 40-60 กิโลดาลตัน สามารถตรวจหา CYP1A ได้โดยการวัดกิจกรรมของ 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) หรือโดยเทคนิคทางแอนติบอดี (antibody techniques) เช่น western blot, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), immunohistochemistry (Al-Arabi และ Goksøyr, 2002; Tom และคณะ, 2002; Desantis และคณะ, 2005) การผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A จากปลากะพงขาวที่ได้รับสารเบนโซ [เอ] ไพรีน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเทคนิคทางแอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะสูงมาช่วยในการตรวจสอบปริมาณของ CYP1A ซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม PAH ในแหล่งน้ำ นอกเหนือจากการใช้เทคนิคทางเอนไซม์ โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบแอนติเจนโดยเทคนิคทางแอนติบอดีได้หลายรูปแบบ (Förlin และ Celander, 1993; Rice และคณะ, 1998) ในการใช้เทคนิคแอนติบอดีตรวจหา CYP1A ในปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก หรือปลาชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยในเขตที่มีแหล่งอุตสาหกรรม ซึ่งจะได้รับผลโดยตรงจากการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำและอาจส่งผลกระทบต่อสรีระวิทยา การเจริญพันธุ์ และสะสมสารพิษเป็นอันตรายในการบริโภคของ

มนุษย์ เพื่อติดตามประเมินคุณภาพของน้ำ ประเมินสุขภาพของสัตว์น้ำที่เลี้ยงในแหล่งที่มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนซึ่งอาจส่งผลทำให้สัตว์น้ำมีภูมิต้านทานจากเชื้อโรคน้อยลงอีกทั้งยังเป็นการเฝ้าระวังผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1 การชักนำให้เกิด CYP1A ในสัตว์ทดลอง

ปลากะพงขาว (Asian sea bass; *Lates calcarifer* Bloch) ขนาด 400-500 g มาเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 7 วัน ที่ระดับความเค็ม 15 ppt จากนั้นฉีดเบนโซ [เอ] ไพรีน (B[a]P) ในน้ำมันข้าวโพด (corn oil) ปริมาณ 10 mg/kg BW เพื่อกระตุ้นให้ปลาสร้างไซโตโครม P4501A เมื่อครบ 7 วันหลังจากฉีดกระตุ้น เก็บตับปลากะพงขาว 20 g สำหรับนำมาสกัดไซโตโครม P4501A เพื่อใช้เป็นแอนติเจน และส่วนที่เหลือนำไปแช่ใน 10% PBS formalin เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบโดยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี

1.2 การสกัด CYP1A เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

สกัดโปรตีนตามวิธีของ Rice และคณะ (1995) โดยนำตับปลากะพงขาว 1 กรัม มาล้างด้วย 1.15% KCl เก็บไว้ในหลอด cryotube แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 วัน ก่อนย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C จากนั้นนำตับปลามาสกัดด้วยสารละลายทริสอะซิเตทบัฟเฟอร์ (0.01 M Tris-acetate containing 0.1 M KCL, 1mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) ปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาปั่นเหวี่ยงที่ 100,000 xg เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บตะกอนมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M K_3P0_4, 20% glycerol และ 1 mM EDTA) นำไปวัดปริมาณโปรตีน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ นำโปรตีนสกัดมาแยกใน 12% SDS-PAGE จากนั้นตัดเจลช่วงแถบโปรตีนขนาด 50-80 kDa มาสกัดโปรตีนออกจากเจล โดยใช้ Miniprotein Eluter (BioRad) นำเจลมาตรวจสอบ CYP1A โดยเทคนิค western blot ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลาเรนโบว์เทร้าท์ (PAb rabbit anti-Rainbow trout CYP1A) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Malin C. Celander, Department of Zoophysiology, Göteborg University, Göteborg, Sweden) (Förlin และ Celander, 1993) เพื่อยืนยันสมบัติของ CYP1A และนำโปรตีนที่ได้มาใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นหนูขาวให้สร้างแอนติบอดี โดยวิธีการที่ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยบูรพา

2. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A จากปลากะพงขาว

2.1 การฉีดกระตุ้นหนูขาวให้สร้างแอนติบอดี

นำหนูขาว (Swiss mice) อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล มาฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน CYP1A จากปลากะพงขาวที่สกัดออกจากเจล โดยนำ CYP1A สกัด ความเข้มข้น 1 mg/ml ผสมกับ Freund's Complete Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนูขาวจำนวน 4 ตัว ตัวละ 150 µl หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีก 3 ครั้ง ด้วย CYP1A สกัด ผสมกับ Freund's Incomplete Adjuvant ในอัตราส่วนเดียวกับการฉีดครั้งแรก ทำการฉีดทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เจาะเลือดหนู เก็บซีรัมแต่ละตัว มาใช้เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อทดสอบความจำเพาะต่อ CYP1A

นำซีรัมของหนูขาวทั้ง 4 ตัว มาตรวจสอบความจำเพาะต่อโปรตีน CYP1A ด้วยเทคนิค Western blot โดยแยกสารสกัด CYP1A ด้วยเทคนิค 12% SDS-PAGE โดยใช้ BioRad mini protein III ที่กระแสไฟฟ้า 110 v จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจล ลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส (BioRad) โดยเครื่อง BioRad Trans-Blots Semi-Dry โดยใช้กระแสไฟฟ้า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

15 v เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสออกมาแช่ใน 5% blotto (5% นมพร่องมันเนยในสารละลาย PBS ที่มี 1% Triton-X100) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ตัดแยกกระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นชิ้นละ 1 ช่องเจล แช่ลงในซีรัมหนูแต่ละตัว (1:100) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 0.5% blotto ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แช่กระดาษไนโตรเซลลูโลส ใน secondary antibody (Goat anti-mouse IgG conjugated horseradish peroxidase; GAM-HRP) (1:1,000) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 0.5% blotto ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำกระดาษไนโตรเซลลูโลส แช่ในสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS) ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี ภายในเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน pre-stained น้ำหนักโมเลกุล 31.4-126 kDa (Sigma) ตรวจดูแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี เปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยากับ CYP1A สกัด ระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากซีรัมหนูทั้ง 4 ตัว กับโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลาเรนโบว์เทร้าท์

3. การผลิตและตรวจสอบลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A จากปลากะพงขาว

3.1 การหลอมเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ลูกผสมที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำหนูขาวตัวที่ฉีดกระตุ้นให้สร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A ที่มีไตเตอร์ของแอนติบอดีมาฉีดกระตุ้นด้วย CYP1A สกัด ผสมกับ Freund's Incomplete Adjuvant อีก 1 ครั้ง 3 วัน ก่อนทำการหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี นำเซลล์ม้ามจากหนูขาวที่ฉีดกระตุ้น มาหลอมรวมกับ myeloma cell ตามวิธีของ Köhler และ Milstein (1976) และดัดแปลงจาก Mosmann และคณะ (1979) โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

นำเซลล์ม้ามมาใส่รวมกับเซลล์ myeloma NS-I ในอัตราส่วน 1:10 แล้วปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท RPMI ออกทิ้ง ค่อยๆ เติมสารละลาย 50% polyethylene glycol (PEG) ใน RPMI medium ปริมาตร 1 ml เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์ผสมกันเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม RPMI medium ปริมาตร 30 ml ตั้งบ่มไว้ในใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ผลิตเซลล์ลูกผสม (hybridomas) โดยปั่นแยกเซลล์ที่บ่มไว้ที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วกระจายเซลล์อย่างสม่ำเสมอในอาหารคัดเลือกเซลล์ลูกผสม 20% Fetal calf serum (FCS), RPMI-HAT medium ปริมาตร 250 ml ดูดเซลล์ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ (96 well plate) หลุมละ 200 µl จำนวน 12 ถาด บ่มใน CO_2 incubator ที่ 37 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูการปนเปื้อน และสังเกตการเจริญของเซลล์ลูกผสม ถ้าโคโลนีของเซลล์ลูกผสม มีขนาดใหญ่ประมาณ 100 เซลล์ขึ้นไป นำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 µl มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP1A ด้วยเทคนิค western blot เพื่อคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A นำเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีให้ผลบวกมาทำการรีโคลน (re-clone) และเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และปริมาณแอนติบอดีตามที่ต้องการจากนั้นให้แยกเซลล์มาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาใช้เป็นแอนติบอดีต่อไป

3.2 การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ CYP1A โดยเทคนิค Dot-blot

นำ CYP1A สกัด ที่ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 µl/ml มาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ขนาดช่องละ 0.5 x 0.5 cm ที่ความเข้มข้นละ 1 µl ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 0.25% glutaraldehyde เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาบ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A ที่คัดเลือกได้แต่ละโคลน ที่ระดับการเจือจาง 1: 10, 1:50, 1: 100, 1:200 และ 1: 400 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที บ่มต่อใน GAM-HRP (1: 1000) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ล้างด้วย PBS จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรท สังเกตผลบวกสีเทาดำที่ระดับการเจือจางสูงที่สุด เป็นปริมาณของ CYP1A ที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนตรวจสอบได้

3.3 การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ CYP1A โดยเทคนิค western blot

นำ CYP1A สกัด มาแยกด้วยเทคนิค 12% SDS-PAGE โดยให้มีปริมาณโปรตีนในแต่ละเลน 40 µg แล้วย้ายโปรตีนลงในกระดาษไนโตรเซลลูโลส และนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแต่ละช่องเจลมาทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน โดยแช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ได้แก่ 1: 2, 1: 5, 1: 10, 1:50, 1:100 , 1:200 และไม่เจือจาง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกจากนั้นทำขั้นตอนเช่นเดียวกับเทคนิค dot blot ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาสีเทาดำที่แถบโปรตีนขนาด 50-80 kDa เป็นผลบวก สังเกตผลบวกสีเทาดำที่ระดับการเจือจางสูงที่สุด เป็นระดับการเจือจางที่มากที่สุดที่สามารถใช้ตรวจสอบสารสกัด CYP1A ปริมาณ 40 µg/ช่องเจลได้

3.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A

การตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยใช้เทคนิค Sandwich ELISA ตามวิธีการที่ระบุในชุดตรวจสำเร็จรูป Mouse Monoclonal Ab Isotyping Reagents kit (Sigma)

4. การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A โดยเทคนิค immunohistochemistry

นำปลากะพงขาว ปลานวลจันทร์ทะเล ปลาเก๋าจุดน้ำตาล และปลานิล ขนาด 400-500 g มาฉีดกระตุ้นด้วยสารเบนโซ [เอ] ไพรีนในน้ำมันข้าวโพด 10 mg/kg BW โดยกลุ่มควบคุมฉีดน้ำมันข้าวโพด เมื่อครบเวลา 7 วัน เก็บเนื้อเยื่อตับ เหงือก และลำไส้ ที่ตรึงด้วย 10% PBS formalin มาผ่านกระบวนการเข้าพาราฟลาสต์ (paraffination) โดยใช้การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70%, 90% และ 95% ตามลำดับ บิวทานอล ไซลีน จากนั้นแทรกซึมพาราฟลาสต์ ฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตับ เหงือก และลำไส้ลงในแม่พิมพ์ นำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้มีความหนา 8 µm แล้วติดลงบนกระจกสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน (1% gelatin, 0.05% Chrome Alum)

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยละลายพาราฟินออก (deparaffination) และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydrate) กำจัดเปอร์ออกซิเดสในเนื้อเยื่อด้วยการแช่ใน 1% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่ใน PBS 5 นาที 3 ครั้ง นำสไลด์เนื้อเยื่อมาหยดด้วย $P1^{+}$(10% calf serum ใน PBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ต้องการตรวจสอบความจำเพาะ ลงบนเนื้อเยื่อแต่ละชิ้น บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที หยด GAM-HRP (1:1000) ลงบนเนื้อเยื่อทุกชิ้น บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBS 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แช่สไลด์ลงในสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ใน PBS) ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นเพื่อล้างส่วนเกินของปฏิกิริยา สังเกตผลบวกสีน้ำตาลของปฏิกิริยา จากนั้นนำสไลด์มาย้อมสีฮีมาทอกไซลิน (hematoxylin) และเตรียมทำสไลด์ถาวรต่อไป

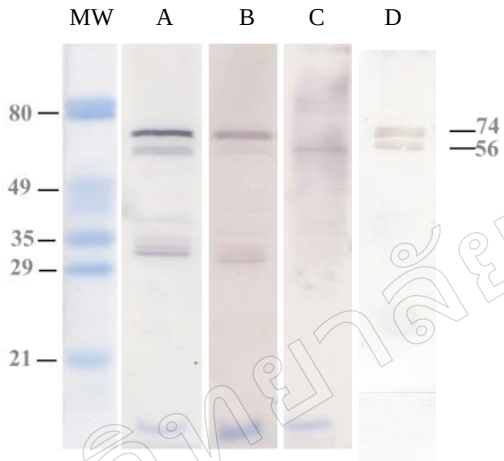
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A จากปลากะพงขาว

เมื่อนำโปรตีน CYP1A สกัดจากแถบโปรตีนใน 12% SDS-PAGE ได้โปรตีนขนาดประมาณ 56 kDa เป็นแอนติเจนไปฉีดกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP1A เป็นโพลิโคลนอลแอนติบอดี และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A ที่สกัดจากตับปลากะพงขาว ที่ได้รับสารเบนโซ[เอ]ไพรีน ในเบื้องต้น

ได้แสดงให้เห็นความจำเพาะที่ โปรตีนขนาด 56 kDa และเมื่อเปรียบเทียบผลการได้วิเคราะห์ยีน โปรตีน CYP1A มี sequence identity ความคล้ายคลึงกับ ปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 88% และ ปลา Rainbow trout 79% (K-Barnette และคณะ, 2010)

จากนั้นจึงนำม้ามของหนูขาวตัวที่ให้แอนติซีรัมผลบวกนั้น ไปหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งในขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CYP1A ของปลากะพงขาว ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนโปรตีนที่ขนาด 56 และ 74 kDa จำนวน 3 โคลน จากการหลอมเซลล์จำนวน 4 ครั้ง ได้แก่ MAb-Sea bass CYP1A 1.4-3D, 2.3-4G-6E และ 155-4D ซึ่งคัดเลือกได้โดยเทคนิค western blot โดยตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีกับโปรตีน CYP1A สกัดจากตับของปลากะพงขาวที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเบนโซ [เอ] ไพรีน (ดังภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การทดสอบความจำเพาะของ MAb-sea bass CYP1A กับตัวอย่างโปรตีน CYP1A สกัดจากตับปลากะพงขาวที่ได้รับสารเบนโซ [เอ] ไพรีน ปริมาณโปรตีน 40 ไมโครกรัม/ช่องเจล ด้วยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (MW) (A) ย้อมด้วย MAb-sea bass CYP1A (1.4-3D) 1:200 (B) ย้อมด้วย MAb-sea bass CYP1A (2.3-4G-6E) 1:100 (C) ย้อมด้วย MAb-Sea bass CYP1A (155-4D) 1:100 (D) ย้อมด้วย PAb rabbit anti-Rainbow trout CYP1A 1:100

พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่ขนาด 56 และยังจำเพาะต่อโปรตีนที่ขนาด 74 kDa ด้วย ซึ่งเป็นช่วงขนาดของโปรตีน CYP1A ที่ทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลาเรนโบว์เทร้าท์ (ภาพที่ 1D) ซึ่งตามที่ได้มีผู้วิจัยรายงานขนาดของ CYP1A ในสัตว์ทดลองแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกันไป ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 46-60 kDa อาทิ การศึกษาของ Wolkers และคณะ (1998) โดยการใช้ MAb anti Rat CYP1A พบ CYP1A ใน Ringed Seals และ Harp Seals มีขนาด 56 kDa ส่วน Al-Arabi และ Goksøyr (2002) ศึกษาการตอบสนองของ CYP1A ในปลาเขตร้อน 2 ชนิด ได้แก่ ปลาดุกแม่น้ำ (*Rita rita*) และปลาทะเล Mudfish (*Apocryptes bato*) โดยการให้ปลาทั้งสองชนิดได้รับสาร ß-Naphthoflavone (BNF) ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าสามารถชักนำการสร้าง CYP1A ได้โดย CYP1A ในปลาทั้งสองมีขนาดโปรตีนต่างกันคือ 58 kDa ใน Mudfish และ 49.5 kDa ใน Catfish เมื่อใช้แอนติบอดี MAb anti Fish CYP1A FA-1 อย่างไรก็ตามการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ แถบโปรตีน CYP1A 2 แถบที่ขนาด 56 และ 74 kDa ในปลากะพงขาว นั้นชี้ให้เห็นว่า โปรตีน CYP1A น่าจะมีสองรูปแบบ (Isoform) ซึ่งสามารถจับกับโพลิโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลาเรนโบว์เทร้าท์ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Goksøyr และคณะ (1992) ที่ใช้ MAb anti- Cod CYP1A1 ทดสอบในแมวน้ำ (Harp Seals และ Hooded Seals) พบว่ามีแถบโปรตีน 2 Isoform เกิดขึ้นสองแถบที่ 54 และ 52 kDa

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน CYP1A จากปลากะพงขาว

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ จำนวน 3 โคลน ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D, 2.3-4G-6E และ 155-4D มีความจำเพาะต่อโปรตีน CYP1A ต่อปลาทะเล ปลาน้ำกร่อย และปลาน้ำจืด และมีลักษณะสมบัติอื่น ๆ ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลากะพงขาวที่ได้รับสารเบนโซ[เอ]ไพรีน

ที่	MAb-sea bass CYP1A	ไอโซไทป์	ความจำเพาะโดย western blot (kDa)	Dot blot sensitivity (µg /µl) 1:100	ความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อปลาโดยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมิสทรี			
					กะพงขาว	นวลจันทร์ทะเล	เก๋าจุดน้ำตาล	นิล
1	1.4-3D	IgG1	56,74	+ (20 µg)	-	-	-	-
2	2.3-4G-6E	IgG1	56,74	+ (20 µg)	-	-	-	-
3	155-4D	IgM	56,74	+ (20 µg)	+	+	+	+

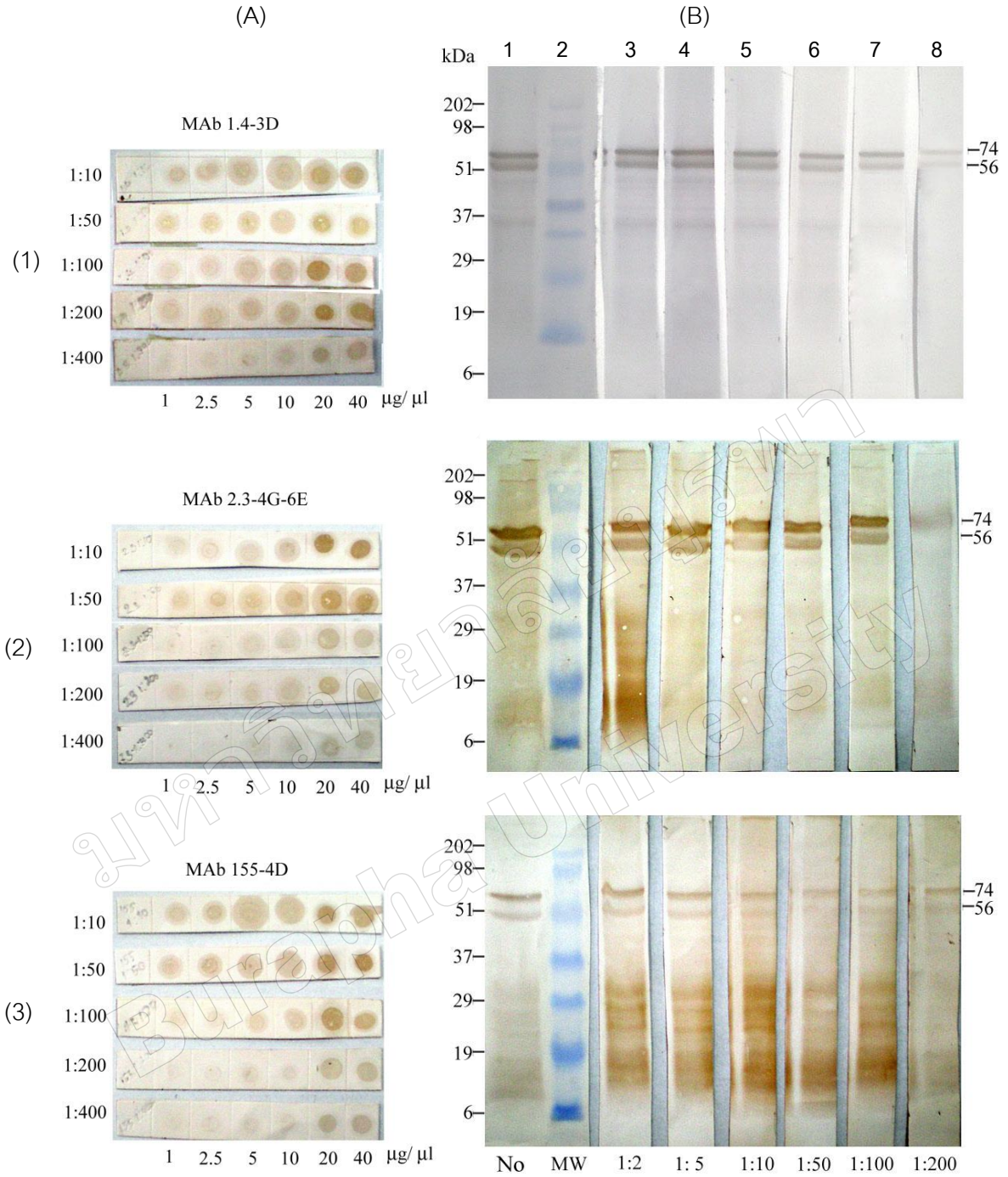
หมายเหตุ เครื่องหมาย (+) คือ เกิดปฏิกิริยาผลบวกในเนื้อเยื่อ

เครื่องหมาย (-) คือ ไม่เกิดปฏิกิริยาผลบวกในเนื้อเยื่อ

จากตารางจะเห็นว่าลักษณะสมบัติของแอนติบอดีทั้ง 3 โคลนที่เหมือนกันคือ การที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีน CYP1A จากปลากะพงขาวขนาด 56 และ 74 kDa ด้วยเทคนิค western blot และมีความไวต่อการจับโปรตีน CYP1A ด้วยเทคนิค dot blot ได้ระดับ 20 µg/µl โดยใช้แอนติบอดีเจือจาง 1: 100 ดังภาพที่ 2

เมื่อนำเนื้อเยื่อปลากะพงขาว ปลานวลจันทร์ทะเล ปลาเก๋าจุดน้ำตาล และปลานิล ที่ฉีดกระตุ้นด้วยสารเบนโซ[เอ] ไพรีน มาย้อมด้วย MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D และ 2.3-4G-6E ไม่แสดงผลของปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อโปรตีน CYP1A พบเพียงโคลน 155–4D ที่แสดงผลของปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ CYP1A เกิดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อที่ย้อมทุกตัวอย่างการทดลอง ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากโคลน 155-4D มีความจำเพาะกับโปรตีน CYP1A สามารถจับกับโปรตีนทั้งในรูปแบบเสียสภาพโดยเทคนิค western blot และ dot blot และแบบสภาพธรรมชาติ โดยเทคนิค immunohistochemistry (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3)

ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาว เกิดสีน้ำตาลปานกลางที่ในบริเวณเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกส่วนของลาเมลลาในภาพที่ 3-1A ส่วนในเนื้อเยื่อตับ ในภาพที่ 3-1B เกิดสีน้ำตาลเข้มที่เยื่อบุอวัยวะในระบบไหลเวียนเลือดส่วนของไซนูซอยด์ และลำไส้เกิดสีน้ำตาลเข้มที่เยื่อบุอวัยวะในระบบไหลเวียนเลือดส่วนของไมโครวิลไลในภาพที่ 3-1C



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความไวของ (1) MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D (2) MAb-sea bass CYP1A 2.3-4G-6E (3) MAb-sea bass CYP1A 155-4D ด้วยเทคนิค (A) dot blot การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่เหมาะสมต่อ MAb-sea bass CYP1A ที่ระดับการเจือจาง 1:10-1:400 โดยใช้ CYP1A สกัดปริมาณโปรตีนจุดละ 1-40 µg/µl และ (B) western blot แถวที่ 1 CYP1A สกัด ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง 40 µg ต่อช่องเจล โดยไม่เจือจางแอนติบอดี แถวที่ 2 pre-stained standard protein แถวที่ 3 -8 CYP1A สกัด มีปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง 40 µg ต่อช่องเจล ที่ระดับการเจือจางของแอนติบอดี 1: 2, 1: 5, 1: 10, 1: 50, 1: 100 และ 1: 200 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A โดยเทคนิค immunohistochemistry

ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีต่อ CYP1A ของปลากะพงขาวกับ CYP1A ในเนื้อเยื่อของปลานวลจันทร์ทะเล ปลาเก๋าจุดน้ำตาล และปลานิล ที่ได้รับสารเบนโซ [เอ] ไพรีน โดย MAb-sea bass CYP1A 155-4D พบการเกิดปฏิกิริยาในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ลำไส้ และ ไต ในปลาทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sarasquete และ Segner (2000) ซึ่งสำรวจเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ CYP1A ดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3

ตารางที่ 2 ความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ CYP1A ของปลากะพงขาวและการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับปลาเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ โดย MAb-sea bass CYP1A 155-4D ด้วยเทคนิค immunohistochemistry

สารที่เผชิญ	เนื้อเยื่อ	MAb-sea bass CYP1A 155-4D			
		กะพงขาว	นวลจันทร์ทะเล	เก๋าจุดน้ำตาล	นิล
กลุ่มควบคุม (น้ำมันข้าวโพด)	เหงือก (n)	++ (2) , - (1)	+(0) , - (2)	+++(5)	++ (3)
	ตับ (n)	++ (3) , - (0)	+(0) , - (2)	+++(5)	+++ (3)
	ลำไส้ (n)	+++ (3) , - (0)	++(2) , - (0)	+++(5)	+++ (3)
เบนโซ [เอ] ไพรีน	เหงือก (n)	++ (4) , - (3)	NA	+++(5)	NA
	ตับ (n)	+++ (7) , - (0)	+(0) , - (2)	+++(5)	- (3)
	ลำไส้ (n)	+++ (6) , - (1)	+++(2) , - (0)	+++(5)	+++ (3)
	ไต (n)	NA	NA	NA	+++ (3)

หมายเหตุ : สัญลักษณ์แทนการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้
n คือ จำนวนปลา (ตัว), NA คือ ไม่มีการตรวจสอบ, - คือ ไม่ติดสีน้ำตาล, + คือ ติดสีน้ำตาลระดับ 1, ++ คือ ติดสีน้ำตาลระดับ 2, +++ คือ ติดสีน้ำตาลระดับ 3

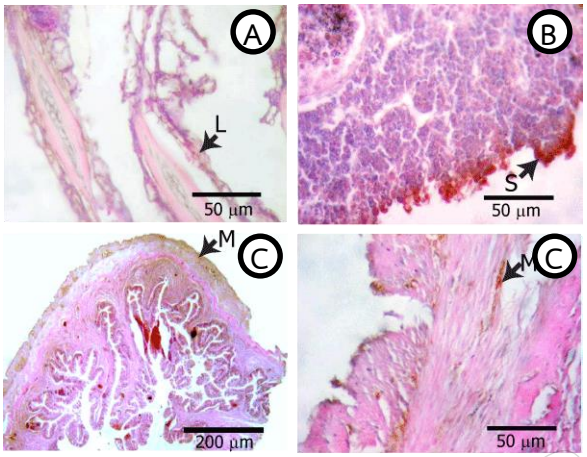
ในปลานวลจันทร์ทะเลพบปฏิกิริยาผลบวกในลำไส้บริเวณเซลล์เยื่อบุผิวของ ไมโครวิลไล โดยสามารถสังเกตเห็นสีน้ำตาลบริเวณเนื้อเยื่อได้ชัดเจน ภาพที่ 3-2C ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อตับไม่พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาผลบวก ดังภาพที่ 3-2B

ในเนื้อเยื่อปลาเก๋าจุดน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาผลบวกของแอนติบอดีต่อ CYP1A ติดสีน้ำตาลเข้มในทุกอวัยวะในบริเวณเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกในส่วนของลาเมลลา ภาพที่ 3-3A เนื้อเยื่อตับเกิดที่เยื่อบุอวัยวะในระบบไหลเวียนเลือดในส่วนของไซนูซอยด์ ภาพที่ 3-3B ที่ลำไส้เกิดที่เยื่อบุอวัยวะในระบบไหลเวียนเลือดส่วนของอีพิทีเลียม ในภาพที่ 3-3C

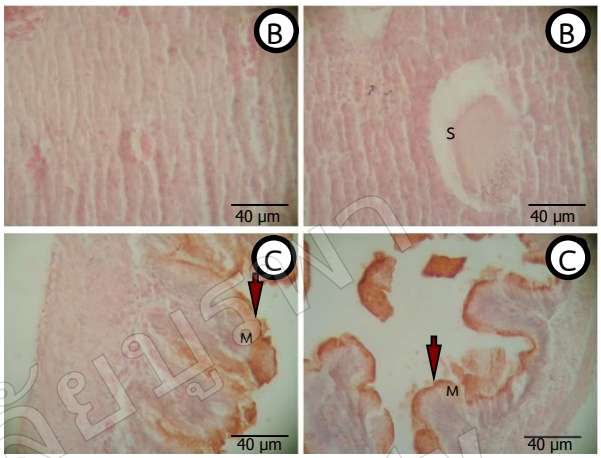
ในเนื้อเยื่อปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเบนโซ [เอ] ไพรีน ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี MAb-sea bass CYP1A 155-4D ในเนื้อเยื่อตับ ดังภาพที่ 3-4B ส่วนเนื้อเยื่อลำไส้พบการเกิดปฏิกิริยาผลบวก ติดสีน้ำตาลเข้มบริเวณเซลล์เยื่อบุผิวไมโครวิลไล ดังภาพที่ 3-4C และ เนื้อเยื่อไตติดสีน้ำตาลเข้ม บริเวณเยื่อบุภายนอกและระบบหมุนเวียนเลือด ดังภาพที่ 3-4D

การศึกษาโดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb-sea bass CYP1A 155-4D กับ CYP1A ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลาชนิดอื่น ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเบนโซ [เอ] ไพรีน ซึ่งหากแอนติบอดีไม่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปลากะพงขาวและปลาเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ นี้ ก็จะไม่ปรากฏสีน้ำตาลเข้มบนเนื้อเยื่อในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับ CYP1A แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้สายตาในการประเมินความเข้มของสี ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ประกอบกับปลาที่นำมาทดลองแต่ละ

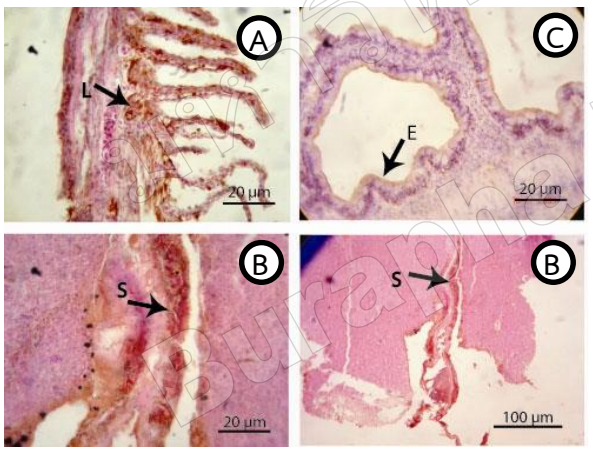
ตัวมีความสามารถในการตอบสนองต่อสาร xenobiotics แตกต่างกัน ทำให้ผลการทดลองเกิดการคลาดเคลื่อนโดยใช้เทคนิคนี้ได้ อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่า MAb-sea bass CYP1A 155-4D สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ CYP1A ในเซลล์ต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อปลาได้ โดยไม่จับกับโปรตีนอื่น ๆ



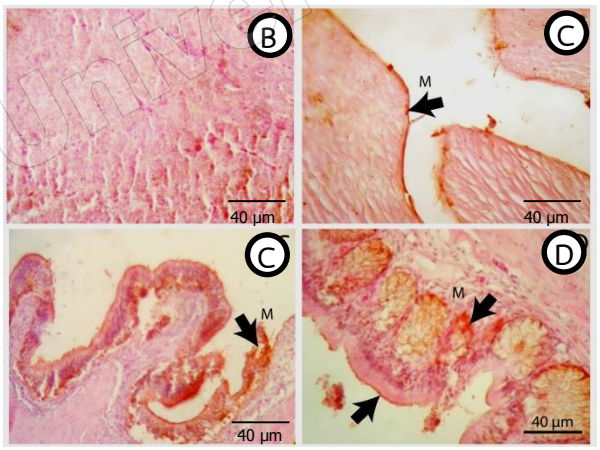
1.



2.



3.



4.

ภาพที่ 3 ผลการทำปฏิกิริยาของ MAb sea bass CYP1A 155-4D ในเนื้อเยื่อ (1) ปลากะพงขาว (2) ปลานวลจันทร์ทะเล (3) ปลาเก๋าจุดน้ำตาล (4) ปลานิล ที่ได้รับเบนโซ [เอ] ไพรีน ย้อมด้วยสี H&E A) เหงือก B) ตับ C) ลำไส้ D) ไต L = ลาเมลลา S = ไซนูซอยด์ M = ไมโครวิลไล E = อิพิทีเลียม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากลักษณะสมบัติที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไอโซไทป์ของแอนติบอดี และความสามารถในการจับกับ CYP1A ในเนื้อเยื่อปลาที่ตรวจสอบโดยเทคนิค immunohistochemistry ทำให้สามารถจัดกลุ่มของแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับ CYP1A ในรูปของโปรตีนที่เสียสภาพ (denatured protein) ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลนที่มีลักษณะสมบัติเหมือนกัน ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D และ 2.3-4G-6E ซึ่ง สรุปได้จากการที่สามารถทดสอบได้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค western blot และ เทคนิค dot blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการเตรียมตัวอย่างแอนติเจนโดยทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยสารเคมี และความร้อน ก่อนทดสอบ

กลุ่มที่ 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับ CYP1A ในรูปของโปรตีนที่เสียสภาพและโปรตีนสภาพธรรมชาติ (native protein) จำนวน 1 โคลน ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 155-4D โดยแอนติบอดีโคลนนี้สามารถให้ผลบวกได้กับเทคนิค western blot และ dot blot ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการทำให้โปรตีนตัวอย่างเสียสภาพ และเทคนิค immuno-histochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทดสอบกับโปรตีนที่รักษาสภาพธรรมชาติด้วยฟอร์มาลิน (ภาพที่ 3)

จากผลการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทำให้เราทราบลักษณะสมบัติที่แตกต่างของแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ และสามารถคัดเลือกแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ไปใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างโดยเทคนิคทางแอนติบอดีได้

ทั้งนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดี กลุ่มที่ 2 คือ MAb-sea bass CYP1A 155-4D มีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเทคนิคทางแอนติบอดีเพื่อติดตามการปนเปื้อนสาร xenobiotics เนื่องจากสามารถจับกับ CYP1A ได้ทั้งในรูปแบบโปรตีนเสียสภาพและรูปแบบธรรมชาติ ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางกว่า MAb กลุ่มที่ 1 แม้ว่าจากผลการวิจัยมีการติดสีของชุดควบคุม ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ โดยปกติแล้วในร่างกายสิ่งมีชีวิตอาจมีปริมาณ CYP1A อยู่ระดับหนึ่ง ความแปรปรวนในสิ่งมีชีวิตหรือความต้านทานต่อสารเคมีภายนอกที่ได้รับของสัตว์แต่ละตัวแตกต่างกัน และจำนวนตัวอย่างชุดควบคุมไม่เหมาะสม ส่งผลให้พบการติดสีของชุดควบคุมได้ ทำให้การแปลผลเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดทดลองไม่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในลักษณะของการประเมินความเสี่ยงของสารพิษในสัตว์น้ำเบื้องต้นได้ เพื่อเป็นข้อมูล สำหรับประกอบการประเมินมลพิษในสิ่งแวดล้อมทางทะเลโดยใช้ CYP1A ซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพตัวหนึ่งร่วมกับเทคนิคทางแอนติบอดี และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เคยรับสัมผัสสาร xenobiotics จากสิ่งแวดล้อมมาก่อน

การที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ CYP1A ในปลาชนิดอื่น ๆ นั้นมีข้อดีคือทำให้สามารถนำแอนติบอดีโคลนนั้น ๆ ไปตรวจสอบ CYP1A ที่เกิดขึ้นจากการชักนำโดยสาร xenobiotic ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้โดยเทคนิคที่เหมาะสม ตามวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบได้

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดไซโตโครม P4501A หรือ CYP1A จากปลากะพงขาวที่ฉีดกระตุ้นด้วยสารเบนโซ [เอ] ไพรีน และนำโปรตีนขนาด 50-80 kDa มาฉีดกระตุ้นให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีได้ และนำหนูขาวนั้นมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไซโตโครม P4501A จากปลากะพงขาว ได้จำนวน 3 โคลน โดยแบ่งตามลักษณะสมบัติของแอนติบอดีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 จำเพาะกับ CYP1A ในรูปแบบโปรตีนเสียสภาพ ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 1.4-3D และ 2.3-4G-6E

กลุ่มที่ 2 จำเพาะกับ CYP1A ทั้งในรูปแบบโปรตีนเสียสภาพ และรูปแบบธรรมชาติ ได้แก่ MAb-sea bass CYP1A 155-4D

นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ยังมีสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้กับปลาทะเล ปลาน้ำกร่อย และปลาน้ำจืดบางชนิดได้ ซึ่งทำให้สามารถนำไปใช้ตรวจหา CYP1A ได้ในปลาชนิดอื่นด้วย นอกเหนือจากการตรวจสอบในปลากะพงขาว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการต่อเนื่อง 3 ปี (พ.ศ.2550 – 2552) และได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่ และการใช้เครื่องมือและบุคลากรช่วยวิจัยจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Al-Arabi, S.A.M., & Goksøyr, A. (2002). Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 131*, 61-71.

Desantis,S., Corriero, A., Cirillo, F., Deflorio, M., Brill, R., Griffiths, M., Lopata, A.L., de la Serna, J.M., Bridges, C.R., Kime, D.E., & De Metrio, G. (2005). Immunohistochemical localization of CYP1A, vitellogenin and Zona radiata proteins in the liver of swordfish (*Xiphias gladius* L.) taken from the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquatic Toxicology*, *71*, 1-12.

Eggens, M. Bergman, A., Vethaak, D., van der Weiden, M., Celander, M., & Boon, J.P. (1995). Cytochrome P4501A indices as biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. *Aquatic Toxicology, 32*, 211-225.

Förlin, L., & Celander, M. (1993). Induction of cytochrome P450 1A in teleost : environmental monitoring in Swedish fresh, brackish and marine waters. *Aquatic Toxicology, 26*, 41-56.

Goksøyr, A., Beyer, J., & Lersen, H.E. (1992). Cytochrome P450 in seals: monooxygenase activities, immunochemical cross-reactions and response to phenobarbital treatment. *Marine Environmental Research, 34*, 113-116.

Kanchanopas-Barnette, P., Mokkongpai, P., Celander, M., & Sawangwong, P. (2010). Molecular Characterization of Cytochrome P450 1A : CYP1A) in Asian Sea bass (*Lates calcarifer* Bloch) and its application as a biomarker in the gulf of Thailand. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution, 7*(2), 43-51.

Köhler, G., & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology, 6*, 511-519.

Mosmann, T.R., Bauman, R., & Williamson, A.R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. *European Journal of Immunology, 9*, 511-516.

Rice, C.D., Banes, M.M., & Ardelt, T. (1995). Immunotoxicity in Channel catfish, *Ictalurus punctatus,* following acute exposure to tributyltin. *Archives of Environmental contamination and toxicology*, *28*, 464-470.

Rice, C.D., Schlenk, D., Ainsworth, J., & Goksøyr, A. (1998). Cross-reactivity of monoclonal antibodies against peptide 277-294 of rainbow trout CYP1A with hepatic CYP1A among fish. *Marine Environmental Research*, *46*(135). 87-91.

Sarasquete, C., & Segner, H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies . *The Science of the Total Environment, 247*, 313-332.

Tom, M., Myers, C.R., & Waterman, M.R. (2002). Evaluating molar CYP1A level in fish hepatic microsomes by competitive ELISA using recombinant membrane-free CYP1A standard protein. *Aquatic Toxicology, 59*, 101-114.

Wolker, J., Witkamp, R.F., Nojimeijer, S.M., Burkow, I.C., Groene, E.M., Lydersen, C., Dahle, S., & Monshouwer, M. (1998). Phase I and phase II enzyme activities in ringed seals (*Phoca hispida*): characterization of hepatic cytochrome P450 by activity patterns, inhibitions studies, mRNA analyses, and western blotting. *Aquatic Toxicology, 44*, 103-115.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University