ไวเทลโลเจนิน : ตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ

Vitellogenin : Biomarker for EDCs Exposure in Aquatic Environment

พอจิต นันทนาวัฒน์

Phochit Nanthanawat*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University

วันที่ได้รับบทความ 27 เมษายน พ.ศ. 2558

วันที่ตอบรับตีพิมพ์ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin, VTG) เป็นโปรตีนในพลาสมาของปลาที่ออกลูกเป็นไข่ สังเคราะห์ขึ้นในตับของปลาเพศเมียภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการรับสัมผัสต่อสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อน เนื่องจากเมื่อปลารับสัมผัสกับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อจะถูกชักนำให้สร้างไวเทลโลเจนิน เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในปลาเพศเมีย จึงนิยมใช้ผลการชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้หรือปลาวัยอ่อนนี้ มาบ่งชี้ถึงสภาวะการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำได้ การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาทำได้โดยการวัดไวเทลโลเจนินโดยตรง โดยเทคนิคทางแอนติบอดี เช่น Western blot และ ELISA เป็นต้น หรือตรวจสอบทางอ้อมจากไลโปไกลโคฟอสโฟโปรตีนของไวเทลโลเจนิน โดยเทคนิคอัลคาไลน์เลบายล์ฟอสฟอรัส หรือการย้อมสีใน Native-PAGE นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างไวเทลโลเจนินในเซลล์ตับ ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ ซึ่งทำให้ทราบถึงสภาวะการปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มนี้และประเมินถึงผลกระทบที่พบในสัตว์น้ำต่อไป

คำสำคัญ : ตัวชี้วัดทางชีวภาพ ไวเทลโลเจนิน เอสโตรเจน สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ การตรวจสอบ

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

Abstract

Vitellogenin (VTG) is plasma protein of oviparous fishes. It is synthesized by the liver of female fish in response to circulating endogenous estrogen. VTG is usually use as biomarker for exogenous estrogen exposure especially in male and juvenile fish. Because, after male or juvenile fishes exposed to these endocrine disrupting chemicals (EDCs), VTG were raised and released into circulations in the same manner as it was occurred in mature females. So, it could be use the induction of VTG in male or juvenile fishes to indicate estrogenic-EDCs pollutions in aquatic area. The VTG in fish plasma can be detected directly by immunoassay such as Western blot or ELISA. The indirect detection method by alkali labile phosphorus, Native-PAGE protein staining for the properties of lipoglycophosphoprotein of VTG. Furthermore, the detection of gene expression of VTG in liver by molecular techniques is also used for detection of the EDCs pollution and for further assesses the adverse effect in aquatic organisms.

Key words : biomarker, Vitellogenin, Estrogen, Endocrine Disrupting Chemicals; EDCs, detection

บทนำ

สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine Disrupting Chemicals; EDCs) คือ สารเคมีที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบการทำงานของต่อมไร้ท่อ โดยเฉพาะการทำงานฮอร์โมนต่าง ๆ ในร่างกาย สาร EDCs สามารถเลียนแบบหรือยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย เช่น เอสโตรเจน หรือเอนโดรเจน (Mclachlan, 2001; Diamanti-Kandarakis และคณะ 2009) เป็นต้น ซึ่งสาร EDCs ที่เป็นสารคล้ายเอสโตรเจน เช่น Nonylphenol หรือ Bisphenol-A สามารถเลียนแบบหรือชักนำให้เกิดการตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ในสิ่งมีชีวิตได้ (Campbell และคณะ, 2006) โดยการที่ปลาได้รับสัมผัสสาร EDCs อาจมีผลกระทบต่อการควบคุมวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์ การยับยั้งการตกไข่และวางไข่ได้ในกรณีที่ปลาเผชิญต่อสารในช่วงปลายของวงจรสืบพันธุ์ และอาจกระทบต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์ในปลาเพศผู้ (Nicolas, 1999) เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้พบอยู่ในเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน ยาฆ่าแมลง สารเคมีที่ใช้ในการเกษตร รวมทั้งยาและเภสัชภัณฑ์ต่าง ๆ ซึ่งแต่ละชนิดมีระดับของผลกระทบในสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันไป (Mills และ Chichester, 2005) และเมื่อสารเหล่านี้ลงสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางน้ำทิ้งจากบ้านเรือน โรงงานบำบัดน้ำเสีย น้ำผิวดินจากแหล่งเกษตรกรรม จะทำให้สิ่งมีชีวิตได้รับผลกระทบจากสาร EDCs เหล่านี้ได้

ในการติดตามการปนเปื้อนของสาร EDCs ในสิ่งแวดล้อม ทำได้โดยการวัดปริมาณสารปนเปื้อน เช่น Nonylphenol (NP) โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยตรง หรือการใช้ Biologically based assays (BBAs) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายเทคนิคในการตรวจสอบผลกระทบจาก EDCs เช่น การศึกษา cell proliferation, ligand binding ตรวจสอบการจับกันบน estrogen binding site และการชักนำให้เกิดไวเทลโลเจนินในพลาสมา ซึ่งการตรวจวัดระดับของไวเทลโลเจนินในพลาสมานับเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) สำหรับสะท้อนผลของ EDCs ในแหล่งน้ำต่าง ๆ ได้ เช่น บริเวณที่มีการปล่อยน้ำทิ้งหลังจากการบำบัดของโรงงานบำบัดน้ำเสีย แหล่งเกษตรกรรม และแหล่งอุตสาหกรรม เป็นต้น (Sole และคณะ, 2001; Desforges และคณะ, 2010)

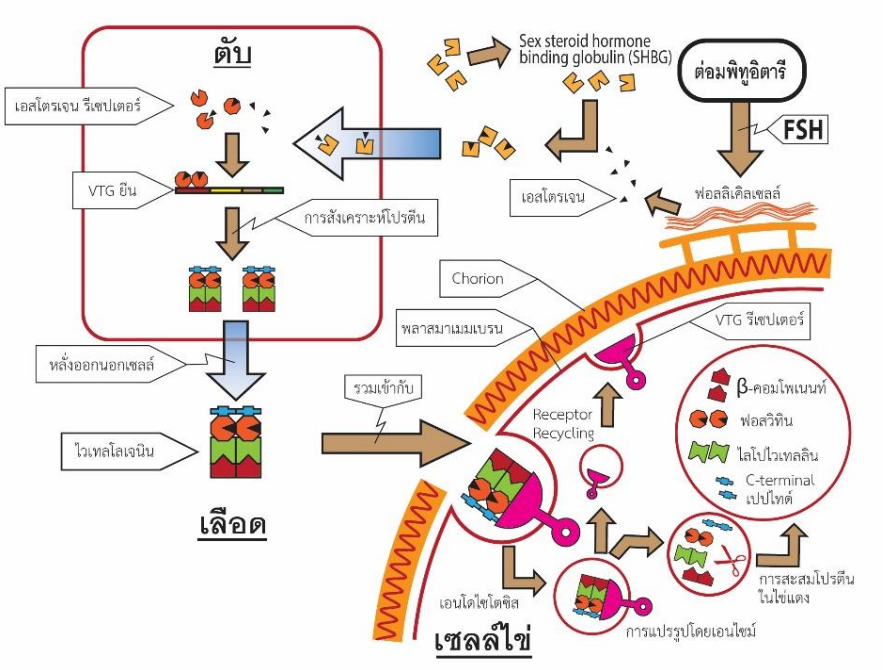
ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin, VTG) หรือ Female-Specific Serum Protein (FSSP) เป็นโปรตีนที่พบในเลือดของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบหรือเต่า หรือปลากระดูกแข็งเพศเมียที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous) ในปลาที่มีความสมบูรณ์เพศหรือช่วงที่ปลามีการสร้างไข่ ระดับของไวเทลโลเจนินในพลาสมาจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของไข่ (Nicolas, 1999) โดยเมื่อปลาอยู่ในวัยเจริญพันธุ์เอสโตรเจนในร่างกาย ได้แก่ E_2 จะควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน โดยเอสโตรเจนจะหลั่งเข้าไปในกระแสเลือดตามกลไกของวิถีเอสโตรเจน-รีเซปเตอร์และกระตุ้นให้ปลาเพศเมียสร้างไวเทลโลเจนิน

ในสภาวะปกติ ยีนสำหรับสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อน จะไม่มีการทำงาน แต่หากได้รับการกระตุ้นจากสารในกลุ่ม EDCs ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะสามารถกระตุ้นให้ปลาเหล่านี้สร้างไวเทลโลเจนินขึ้นมาได้ เช่นเดียวกับการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นจากภายในร่างกาย (Marin และ Matozzo, 2004) การเพิ่มขึ้นของระดับไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้สามารถเกิดขึ้นโดยสาร EDCs ชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน ทั้งการสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน หรือสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นสูงในเวลาสั้น ๆ สามารถชักนำการสร้างไวเทลโลเจนินได้เช่นกัน (Marx และคณะ, 2001) นอกจากนี้ระดับการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินที่เกิดขึ้นมากหรือน้อยยังขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ปลารับสัมผัสเอสโตรเจน ซึ่งทำให้ทราบได้ว่า ปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบในปลาเพศผู้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดถึงปริมาณเอสโตรเจนที่ปลาได้รับ ดังนั้นการชักนำให้เกิดการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้หรือปลาวัยอ่อน จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการรับสัมผัสกับสาร EDCs ในสิ่งแวดล้อมได้ อย่างแพร่หลาย (Watts และคณะ, 2003)

การสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenesis)

กระบวนการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน และการเจริญของตัวอ่อนของปลากระดูกแข็ง เริ่มต้นจากการมีสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมหรือสัญญาณภายในร่างกายไปที่ระบบต่อมไร้ท่อ ในปลากระดูกแข็ง เช่น แซลมอน พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH) ในเลือดจากการชักนำของฮอร์โมนเอสตราไดออลซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินขึ้นภายในตับ จากนั้น ไวเทลโลเจนินถูกหลั่งสู่กระแสเลือด และนำไปใช้ในการเจริญของไข่ โดยถูกเปลี่ยนรูปด้วยเอนไซม์ไปเป็นโปรตีนโยล์คเพื่อเก็บไว้ในไข่ ส่วนของโยล์คแกรนูลหรือโยล์คโกลบูล (yolk granule or yolk globule) โยล์คของไข่ที่สมบูรณ์ประกอบด้วยสารที่ใช้ในการเจริญและพัฒนาการของเซลล์ไข่ซึ่งใช้เป็นแหล่งสารอาหารและพลังงานในการเจริญของตัวอ่อน ในกลุ่มปลาแซลมอน ไวเทลโลเจนินเป็นตัวสำคัญในการขนส่งฟอสโฟลิปิด และโปรตีนโยล์คที่ได้จากไวเทลโลเจนินมีประมาณ 80-90% โดยน้ำหนักแห้งของไข่ที่สร้างขึ้น (Hiramatsu และคณะ, 2006)

หลังจากมีการสะสมไวเทลโลเจนินในไข่ที่กำลังเจริญ ไวเทลโลเจนินจะมีการแปรรูป ทำให้ได้เป็นโปรตีนโยล์คในปลากระดูกแข็ง โปรตีนโยล์คเหล่านี้ ได้แก่ ไลโปไวเทลลิน (Lipovitellin, Lv) ฟอสวิทิน (Phosvitin, Pv) ส่วนประกอบเบต้า (β component, β-c) และ C-terminal peptide โดยไลโปไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีลิปิดเป็นส่วนประกอบถึง 20% โดยน้ำหนัก สำหรับกระบวนการสร้างและแปรรูปไวเทลโลเจนินสรุปได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สรุปกระบวนการสร้างและแปรรูปไวเทลโลเจนินเพื่อสะสมในเซลล์ไข่ของปลากระดูกแข็ง (ดัดแปลงจาก Hiramatsu และคณะ, 2006)

ลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนิน

ในการศึกษาลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนินจากพลาสมาของปลาที่สมบูรณ์เพศหรือปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 17β-estradiol หรือสารในกลุ่ม EDCs เช่น 4-nonylphenol, 4-(tert-octyl) phenol และ bisphenol-A เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคต่างๆ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาดังกล่าว เช่น เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) เทคนิคการปั่นเหวี่ยง(Centrifugation) หรือเทคนิค HPLC (High performance liquid chromatography) หรือใช้หลายเทคนิคร่วมกัน ซึ่งสามารถสรุปลักษณะสมบัติโดยทั่วไปของไวเทลโลเจนิน (Hiramatsu และคณะ, 2006) ได้ดังนี้

(1) เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในพลาสมาของปลาเพศเมีย

(2) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโปรตีนในไข่แดง (egg yolk protein)

(3) ชักนำให้เกิดได้โดยเอสโตรเจนหรือสารคล้ายเอสโตรเจน

(4) เป็นไลโปไกลโคฟอสโฟโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 300-600 kDa

(5) เป็น carrier protein ที่มีทั้งส่วนประกอบของลิปิดและ ionic component (เช่น แคลเซียม สังกะสี แคดเมียม เหล็ก เป็นต้น)

การตรวจสอบไวเทลโลเจนิน

การตรวจสอบและการวัดระดับของไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลา มีด้วยกันหลายวิธี ทั้งวิธีทางตรงและทางอ้อม ได้แก่

1) การตรวจสอบโดยเทคนิคทางแอนติบอดี (Antibody techniques) เป็นการตรวจสอบไวเทลโลเจนินทางตรง เช่น เทคนิค single radial immunodiffusion (SRID), immunoelectrophoresis, immunohistochemistry, Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) , immunochromatography (Hiramatsu และคณะ, 2006) และ chemiluminescent immunoassay (Fukada และคณะ, 2001)

เทคนิคทางแอนติบอดีเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ใช้ความจำเพาะของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จับคู่กันเท่านั้น ซึ่งเมื่อนำตัวติดตามมาติดฉลากบนแอนติบอดี ก็ทำให้สามารถวัดผลของปฏิกิริยาได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (qualitative and quantitative assay) และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งในเนื้อเยื่อ (immunohistochemistry) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส (western blot) หรือในไมโครไตเตอร์เพลท (ELISA) วัดตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ทั้งนี้จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินที่ได้จากสัตว์สปีชีส์เดียวกัน หรือแอนติบอดีจากสัตว์ต่างสปีชีส์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อกันได้ จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้แอนติบอดีในการวิเคราะห์ ในเรื่องของความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินของปลาสปีชีส์นั้น ๆ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคทางแอนติบอดีสำหรับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินของปลาในสปีชีส์ต่าง ๆ โดยต้องทำการผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody ; PAb) หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody ; MAb) ที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลาสปีชีส์นั้น และพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้แอนติบอดีเพื่อให้เหมาะสมกับเทคนิคทางแอนติบอดีที่ต้องการใช้ (Hansen และคณะ, 1998)

2) การวัดปริมาณอัลคาไลน์ เลบายล์ฟอสฟอรัสในพลาสมา (Plasma Alkaline Labile Phosphorus; Plasma ALP) เป็นการวัดปริมาณไวเทลโลเจนินทางอ้อมโดยวิธีทางเคมีตรวจวัดฟอสฟอรัสในพลาสมา ในส่วนที่เป็นไลโปไกลโคฟอสโฟโปรตีนในพลาสมาตามลักษณะสมบัติของไวเทลโลเจนิน เทคนิคการวิเคราะห์นี้ มีข้อดีตรงที่ไม่มีข้อจำกัดเรื่องสปีชีส์ วิเคราะห์ได้ง่าย ราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีตรวจวิเคราะห์ทางตรงบางวิธี และเนื่องจากไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่มีแคลเซียมสูง จึงมีการพัฒนาเทคนิคการวัดปริมาณแคลเซียมที่อยู่ในไวเทลโลเจนิน (protein-bound calcium and phosphorus ในพลาสมาหรือน้ำเลือดได้ (Kramer และคณะ, 1998; Verslycke และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้สีย้อมโปรตีนร่วมกับการย้อมคาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส และลิปิด ใน Native-PAGE เพื่อเป็นการยืนยันสมบัติของไลโปไกลโคฟอสโฟโปรตีนอีกด้วย (Garnayak และคณะ, 2013; Wang และคณะ, 2015)

3) การตรวจสอบโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular techniques) ได้แก่ การวัดการแสดงออกของยีน Vg จากเนื้อเยื่อตับ ไปจนถึงการวัดการถอดรหัสของยีนอื่น ๆ ที่ควบคุมด้วยเอสโตรเจน เช่น Northern blotting, reverse transcription (RT-PCR) (quantitative real-time RT-PCR (*rtq*RT-PCR) (Tian และคณะ, 2009) เทคนิคเหล่านี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างสูง และต้องใช้สารเคมีและเครื่องมือที่มีราคาสูงด้วย

ทั้งนี้มีผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนินในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ และนำไปตรวจสอบการรับสัมผัสสาร EDCs ในปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือการทดสอบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาทดลองชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิคทางแอนติบอดี และได้รายงานถึงปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบ ซึ่งมีระดับแตกต่างกันไปตามชนิด ปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับสัมผัสสาร ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายงานการตรวจสอบปริมาณไวเทลโลเจนินโดยเทคนิคทางแอนติบอดีในเชิงปริมาณในปลากระดูกแข็งจากแหล่งน้ำธรรมชาติและสภาวะการรับสัมผัสต่อ estrogenic-EDCs

ที่	ชนิดของปลากระดูกแข็ง/ (ผู้ศึกษา)	เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ไวเทลโลเจนิน	ปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมา	สภาวะการเผชิญต่อ EDCs
1	*Carp (Cyprinus carpio)* /(Fukada และคณะ, 2001)	Chemiluminescent immunoassay	0.827-1,523 µg/ml	ปลาเพศเมียกินอาหารสูตรปลาป่นผสมถั่วเหลือง 20% เป็นเวลา 48 วัน
2	Killifish (*Fundulus heteroclitus*) / (Pait และ Nelson, 2003)	ELISA โดยใช้ MAb-*F. heteroclitus* VTG	0.00 mg/ml	ปลาเพศผู้หลังจากกลุ่มควบคุมที่ฉีด peanut oil 8 วัน
			620-2.42 mg/ml	ปลาเพศผู้หลังจากฉีดด้วย 4-Nonylphenol 50 mg/kg เป็นเวลา 8 วัน
			0.12-0.22 mg/ml	ปลาเพศผู้หลังจากฉีดด้วย Bisphenol-A 50 mg/kg เป็นเวลา 8 วัน
			4.31-6.31 mg/ml	ปลาเพศผู้หลังจากฉีดด้วย 17β-estradiol 0.5 mg/kg เป็นเวลา 8 วัน
3	Gold fish (*Carassius auratus*) / (Tian และคณะ, 2009)	ELISA โดยใช้ MAb-carp VTG	47.9-59.4 ng/ml	ปลาเพศผู้กลุ่มควบคุม
			280.5-290.5 ng/ml	ปลาเพศผู้ที่รับสัมผัส monocrotophos 0.01 mg/l
4	Asian catfish, *Clarias batrachus* / (Garnayak และคณะ, 2013)	ELISA โดยใช้ PAb-*C. batrachus* VTG	ต่ำกว่า 7.8 ng/ml	ปริมาณต่ำสุดในรอบปีในเดือนพฤศจิกายนถึงมีนาคมในปลาเพศเมีย
			1.959-2.416 µg/ml	ปริมาณสูงที่สุดในรอบปีในช่วง 1 เดือนก่อนวางไข่ (เดือนพฤษภาคม) ในปลาเพศเมีย
5	Gold fish (*Carassius auratus*) / (Wang และคณะ, 2015)	ELISA โดยใช้ PAb-goldfish VTG	63.5-75.9 ng/ml	ปลาเพศผู้กลุ่มควบคุม
			5,389.5-25,392 ng/ml	ปลาเพศผู้ที่รับสัมผัส monocrotophos 0.01 mg/l

บทสรุป

ไวเทลโลเจนินเป็นโปรตีนที่ถูกชักนำขึ้นได้จากฮอร์โมนเอสโตรเจนทั้งจากในร่างกายและจากสารกลุ่มรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อที่ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นไวเทลโลเจนินจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการสัมผัสหรือเผชิญกับสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนเหล่านี้ โดยการตรวจสอบไวเทลโลเจนินเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่ผู้วิจัยมีหรืออาจเลือกจากการอ้างอิงของแต่ละบุคคลและขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น ระยะเวลาในการวิเคราะห์ ความซับซ้อนของเทคนิค ต้นทุน อุปกรณ์ที่สามารถหาได้ง่าย ชนิดของเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง และความไวในการตรวจสอบ

ซึ่งในความเห็นของผู้เขียนเทคนิคทางแอนติบอดีเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงกว่าเทคนิคอัลคาไลน์ เลบาย ฟอสฟอรัสในพลาสมาซึ่งเป็นการวัดไวเทลโลเจนินทางอ้อมโดยวิธีทางเคมี เทคนิคทางแอนติบอดีมีต้นทุนในการตรวจสอบต่อตัวอย่างต่ำกว่าเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินเป็นพื้นฐาน สามารถนำมาใช้ตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ เช่น เทคนิค ELISA ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณไวเทลโลเจนินได้ในระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถนำไปตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้ทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและตรวจสอบในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสามารถนำมาพัฒนาเทคนิคที่มีความไวสูงขึ้น เช่น Chemiluminescent immunoassay ให้เหมาะสมในการบรรลุวัตถุประสงค์ของการทดลองได้ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการปนเปื้อนและผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้

เอกสารอ้างอิง

Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozei, E., & Stringfellow, W. T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, *65*(8), 1265–80.

Desforges, J.-P. W., Peachey, B. D. L., Sanderson, P. M., White, P. A, & Blais, J. M. (2010). Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. *Environmental Pollution*, *158*(10), 3279–84.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews. 30*(4), 293-342.

Fukada, H., Haga, A., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V, & Hara, A. (2001). Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *130*(1), 163–170.

Garnayak, S. K., Mohanty, J., Rao, T. V., Sahoo, S. K., & Sahoo, P. K. (2013). Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: Purification, partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA. *Aquaculture*, *392-395*, 148–155.

Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., & Blaise, C. (1998). Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *17*(7), 448–451.

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C. V., & Hara, A. (2006). Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, *149*(1), 35–47.

Kramer, V. ., Miles-Richardson, S., Pierens, S. ., & Giesy, J. . (1998). Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17β-estradiol. *Aquatic Toxicology*, *40*(4), 335–360.

Marin, M. G., & Matozzo, V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, *48*(9-10), 835–9.

Marx, a, Sherry, J., Hansen, P. D., & Hock, B. (2001). A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere*, *44*(3), 393–9. Retrieved April 27, 2015, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459144

Mclachlan, J. A. (2001). Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*. *22*(3), 319–341.

Mills, L. J., & Chichester, C. (2005). Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *The Science of the Total Environment*, *343*(1-3), 1–34.

Nicolas, J.-M. (1999). Review ,vitellogenesis in fish and the effects of PAH contaminants. *Aquatic Toxicology*, *45*, 77–90.

Pait, A. S., & Nelson, J. O. (2003). Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquatic Toxicology*, *64*(3), 331–342.

Sole, M., Porte, C., & Barcelo, D. (2001). Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analytical Chemistry*, *20*(9), 518–525.

Tian, H., Ru, S., Wang, Z., Cai, W., & Wang, W. (2009). Estrogenic effects of monocrotophos evaluated by vitellogenin mRNA and protein induction in male goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, *150*(2), 231–6.

Verslycke, T., Vandenbergh, G. F., Versonnen, B., Arijs, K., & Janssen, C. R. (2002). Induction of vitellogenesis in 17β-ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *132*(4), 483–492.

Wang, J., Bing, X., Yu, K., Tian, H., Wang, W., & Ru, S. (2015). Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *111*, 109–16.

Watts, M., Pankhurst, N. ., Pryce, A., & Sun, B. (2003). Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *134*(3), 467–476.