การพัฒนาเทคนิคดอทบลอทเพื่อตรวจสอบไวเทลโลเจนินสำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ

Development of Dot Blot Technique for Detection of Vitellogenin as a Biomarker of Endocrine Disrupting Chemicals

วิชชุดา ประสาทแก้ว[1] และ พอจิต นันทนาวัฒน์[2*]

Witchuda Prasatkaew [1] and Phochit Nanthanawat [2*]

[1] *สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี*

[2] *ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Department of Environmental Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Dhonburi Rajabhat University*

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

Received : 5 July 2018

Accepted : 27 September 2018

Published online : 8 October 2018

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคดอทบลอท (Dot blot) เพื่อตรวจสอบไวเทลโลเจนิน ในปลากะพงขาวเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการรับสัมผัสสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemicals; EDCs) ในสิ่งแวดล้อม พบว่าเทคนิคดอทบลอทโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลากะพงขาว (MAb sea bass VTG F3-23) ตรวจวัดระดับไวเทลโลเจนินได้ในระดับ 7.8 นาโนกรัม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติได้ การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb sea bass VTG F3-23 กับปลาเก๋าปะการัง และปลานิล ด้วยเทคนิคดอทบลอท พบว่า MAb sea bass VTG F3-23 สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาปลาทั้งสองชนิดที่ได้รับฮอร์โมน 17β-เอสตราไดออล โดยไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสมาจากปลากลุ่มควบคุม เมื่อนำมาตรวจสอบไวเทลโลเจนินในตัวอย่างปลา 6 ชนิด (ปลานิล ปลาหมอเทศ ปลาช่อน ปลากระดี่ ปลาหมอ และปลาตะเพียน) จากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่อุตสาหกรรม ชุมชน และเกษตรกรรม พบผลบวกของปฏิกิริยาในพลาสมาปลาเพศผู้จากแหล่งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม (33.33% และ 11.11% ตามลำดับ) แสดงถึงมีการปนเปื้อนของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ ดังนั้นเทคนิคดอทบลอทที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติ เพื่อเป็นแนวทางบ่งบอกถึงการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้

คำสำคัญ : ไวเทลโลเจนิน, ปลากะพงขาว, ตัวชี้วัดทางชีวภาพ, เทคนิคดอทบลอท, สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ

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

Abstract

Development of a dot blot technique for detection of vitellogenin in sea bass (*Lates calcarifer*) for using as a biomarker of endocrine disrupting chemicals (EDCs) exposure to the environment. Dot blot technique by using a specific monoclonal antibody to vitellogenin of sea bass (MAb-sea bass VTG F3-23) can be measured vitellogenin levels at 7.8 ng. It can be used to monitor vitellogenin in natural fish. Cross-reactivity testing of MAb-sea bass VTG F3-23 has shown the reactivity to vitellogenin from Coral grouper and Nile tilapia that were induced by injection with 17β-estradiol without cross-reactivity to control fish. The assessment of vitellogenin in 6 fish species (nile tilapia, three spotted tilapia, striped snake-head, moonbeam gourami, climbing perch, and silver barbs) from industrial, residential and agriculture area reveals that, the highest induction of VTG in male fishes were found from the industrial and agriculture area respectively (33.33% and 11.11%). These data suggest that EDCs were present in aquatic environment and vitellogenin detection using dot blot technique could be validated for a biomarker of EDCs in aquatic environment.

Keywords : vitellogenin, sea bass, biomarker, dot blot, endocrine disrupting chemicals

บทนำ

การปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemicals : EDCs) ในแหล่งน้ำถือเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่หลายประเทศให้ความสนใจ ในการตรวจสอบปริมาณของสารปนเปื้อนและศึกษาถึงผลกระทบของสารที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ (An *et al*., 2007; Duong *et al*., 2010; Yamamoto *et al*., 2017) เนื่องจากการสัมผัสสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อจะมีผลต่อการทำงานของฮอร์โมนต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยสารเหล่านี้สามารถเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อพบได้ในสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น สารซักฟอก สีทาบ้าน สีย้อมผ้า สารปราบศัตรูพืช รวมทั้งพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์พลาสติก เครื่องสำอาง และอุปกรณ์อิเลคทรอนิกส์ต่าง ๆ (Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010) และหากสารเหล่านี้ลงสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางน้ำทิ้งจากบ้านเรือน ระบบบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรม หรือแหล่งน้ำผิวดินจากพื้นที่เกษตรกรรม จะทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ เป็นผลให้สัตว์น้ำได้รับผลกระทบจากสารเหล่านี้โดยตรง (Nanthanawat, 2015)

เมื่อสัตว์น้ำได้รับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของฮอร์โมนและระบบอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การสืบพันธุ์ พฤติกรรม ภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโต และพัฒนาการ (Lomax *et al.,* 1998; Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010) นอกจากนี้การสัมผัสสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสัตว์เพศผู้หรือสัตว์วัยอ่อนยังทำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศเมียที่ออกลูกเป็นไข่ โดยจะพัฒนาไปเป็นโยล์คโปรตีนซึ่งเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อนต่อไป ผลกระทบจากการที่สัตว์เพศผู้หรือสัตว์วัยอ่อนสร้างไวเทลโลเจนิน อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศของสัตว์น้ำ ส่งผลให้อัตราส่วนประชากรเพศเมียต่อเพศผู้เปลี่ยนแปลง และอาจมีผลกระทบต่อการควบคุมวงจรสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ เช่น หากปลาเพศเมียได้รับสารในช่วงปลายของวงจรสืบพันธุ์

จะมีผลในการยับยั้งการตกไข่และวางไข่ ซึ่งกระทบต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ รวมทั้งอาจมีผลต่อจำนวนประชากรสัตว์น้ำในอนาคตได้ (Nanthanawat, 2015; Yamamoto *et al*., 2017)

การศึกษาผลกระทบของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ จึงได้นำไวเทลโลเจนินที่พบในสัตว์เพศผู้หรือสัตว์วัยอ่อน มาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งเทคนิคทางแอนติบอดีสามารถตรวจสอบไวเทลโลเจนินได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ (Nanthanawat, 2015) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบในสิ่งแวดล้อมซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องตรวจวิเคราะห์จำนวนมาก จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความสะดวก ขั้นตอนไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายน้อย และมีความแม่นยำสูง เพื่อให้ได้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ

เทคนิคดอทบลอทเป็นเทคนิคทางแอนติบอดีแบบหนึ่ง การตรวจวิเคราะห์ใช้หลักการของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกันทำปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรน เมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาจับกับแอนติเจน หรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจ แล้วนำมาเติมสับสเตรทที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นก็จะสามารถตรวจสอบผลเชิงคุณภาพได้ด้วยการสังเกตจุดสีน้ำตาลเทาบนเมมเบรน โดยอาจเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบเพื่อเพิ่มความแม่นยำ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัม ค่าใช้จ่ายน้อย และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบทั้งในเชิงสิ่งแวดล้อม การเกษตร หรือทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง (Peter *et al*., 2001; Rupprecht *et al*., 2010; Bastos *et al*., 2018) ดังนั้นเทคนิคดอทบลอทจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม

การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคทางแอนติบอดีแบบดอทบลอทเพื่อตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาวและปลาชนิดอื่น ๆ ในสิ่งแวดล้อม สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังผลกระทบที่อาจมีต่อความสมดุลและยั่งยืนของระบบนิเวศแหล่งน้ำต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคดอทบลอท

นำไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยของ Ritphoe *et al*. (2015) มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (0.15 M phosphate buffer saline pH 7.4; PBS) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จำนวน 9 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078, และ 0.0039 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร หยดไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) โดยหยดความเข้มข้นละ 2 จุด เพื่อเป็นการทำซ้ำ (replicate) หยดพลาสมาปลากะพงขาววัยอ่อนที่ไม่ได้รับฮอร์โมนสำหรับเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และพลาสมาปลากะพงขาวที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (17β-estradiol; 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักปลา) ปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัม สำหรับเป็นตัวควบคุมบวก (positive control) จากนั้นแช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนออกแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนินจากปลากะพงขาว (MAb-sea bass VTG F3-23) ที่ได้จากงานวิจัยของ Nanthanawat *et al*. (2016) ที่การเจือจางของแอนติบอดีระดับต่าง ๆ คือ 1:100, 1:1,000, 1:5,000,

1:10,000 และ 1:50,000 เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนออกล้างด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปแช่ในแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM IgG-HRP, 1:3,000) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.1% tween 20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จึงนำเมมเบรนมาทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (ไดอะมิโนเบนซิดีน 0.03%, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.03%, โคบอลต์คลอไรด์ 0.05% ใน PBS) และบันทึกผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ที่เหมาะสม ที่สามารถสังเกตผลของปฏิกิริยาสีน้ำตาลเทาได้ชัดเจน

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น

ทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb-sea bass VTG F3-23) ต่อไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่นคือ ปลาเก๋าปะการัง (*Epinephelus corallicola*) และปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เปรียบเทียบกับพลาสมาจากปลากะพงขาวด้วยเทคนิคดอทบลอท และเลือกอัตราการเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสมตามวิธีการข้างต้น โดยใช้พลาสมาจากปลาเก๋าปะการัง ปลานิลและปลากะพงขาว ชนิดละ 10 ตัว จากปลาที่ถูกชักนำให้สร้างไวเทลโลเจนินด้วยการฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจน (17β-estradiol; 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) จากงานวิจัยของ Prasatkaew *et al*. (2016)

การตรวจสอบสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำโดยใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ

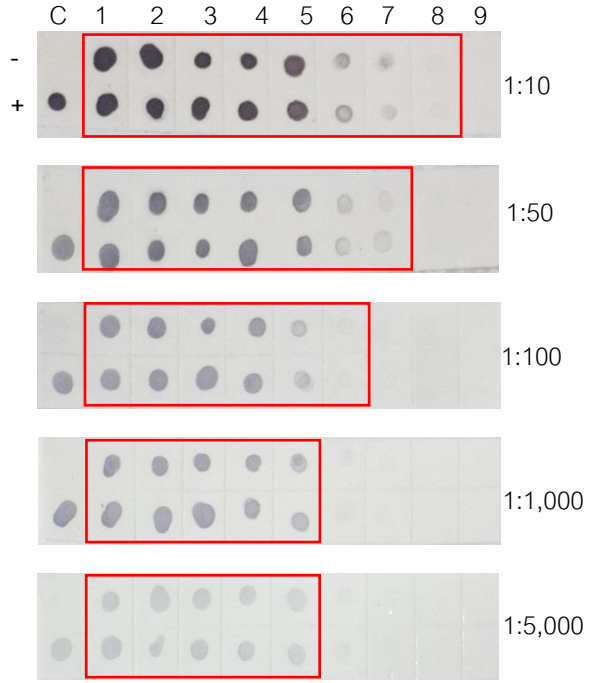
เก็บตัวอย่างปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดชลบุรี จากพื้นที่ที่ตั้งอยู่ในแหล่งที่มีโอกาสได้รับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ ได้แก่ พื้นที่อุตสาหกรรม จากแหล่งน้ำบริเวณตอนล่างของนิคมอุตสาหกรรมเครือสหพัฒน์ อำเภอศรีราชา พื้นที่เกษตรกรรม จากแหล่งเกษตรกรรม ซึ่งมีการทำนา ปลูกผลไม้ และเลี้ยงสัตว์ในอำเภอพนัสนิคม และพื้นที่ชุมชน จากบริเวณโรงบำบัดน้ำเสียชุมชนขององค์การบริหารส่วนจังหวัดชลบุรี อำเภอเมือง มาตรวจสอบการสร้างไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคดอทบลอท โดยเปรียบเทียบกับแหล่งอ้างอิงคือ ปลาที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ อำเภอศรีราชา โดยเก็บปลาจำนวน 20 ตัว จากแต่ละพื้นที่ เก็บเลือดปลาจากบริเวณคอดหางด้วยเข็มฉีดยาขนาด 22G ที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) จากนั้นนำเลือดปลาที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เก็บพลาสมาหรือสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เคลือบด้วยฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) นำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปตรวจสอบไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคดอทบลอททันที

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การพัฒนาเทคนิคดอทบลอท

การพัฒนาเทคนิคดอทบลอทเพื่อใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว พบว่าสามารถตรวจสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.0078 ไมโครกรัม (7.8 นาโนกรัม) ขึ้นไป โดยใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:10 หรือ ถ้าใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:1,000 สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระดับไวเทลโลเจนิน 0.0625 ไมโครกรัม (60.25 นาโนกรัม) ดังภาพที่ 1 ซึ่งระดับไวเทลโลเจนินที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคดอทบลอทครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินจากปลาที่พบในสิ่งแวดล้อมเพื่อเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากระดับไวเทลโลเจนินที่พบในปลา

ธรรมชาติทั่วไปมีปริมาณอยู่ระหว่าง น้อยกว่า 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Scott *et al*., 2007) และผลการศึกษาปริมาณไวเทลโลเจนินในปลาเทร้าท์ (*Salmo trutta*) จากแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่ามีค่าระหว่าง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง มากกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Bjerregaard *et al*., 2008; Morthorst *et al*., 2017) เช่นเดียวกับการสำรวจในปลา *Geophagus brasiliensis* จากแหล่งน้ำธรรมชาติในเมือง Parana ประเทศบราซิล พบระดับไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้มีปริมาณ ระหว่าง 95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในปลาเพศเมียเท่ากับ 1.3 ถึง 161.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Yamamoto *et al*., 2017) ชี้ให้เห็นว่าขีดจำกัดของวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อมได้

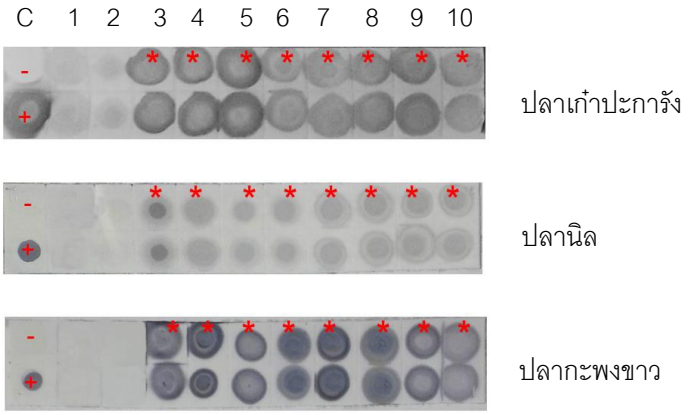


ภาพที่ 1 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคดอทบลอท โดยใช้ MAb-sea bass VTG F3-23 ที่การเจือจางระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:50 ถึง 1:5,000; ช่อง C คือ negative control (-) และ positive control (+) 1-9 คือ ไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ความเข้มข้นตั้งแต่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156, 0.0078 และ 0.0039 ไมโครกรัม ตามลำดับ; ▭ หมายถึง ช่วงของระดับไวเทลโลเจนินที่สามารถตรวจสอบได้

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น

การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาเก๋าปะการัง ปลานิล และปลากะพงขาวพบว่าแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับไวเทลโลเจนินในพลาสมาของทั้งปลาเก๋าปะการัง ปลานิล และปลากะพงขาวที่ได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol (ภาพที่ 2 ช่อง 3-10) โดยแอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยากับปลาในกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลายฮอร์โมน (ไดเมทิลซัลฟอกไซด์; DMSO ใน PBS (ภาพที่ 2 ช่อง 1, 2) ซึ่งการที่แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับปลาชนิดอื่นได้นี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ตรวจสอบกับปลาชนิดอื่น ๆ ในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไปได้ เช่นเดียวกับการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ของ Yamamoto *et al*. (2017) ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีแบบอิไลซ่า (ELISA) และ

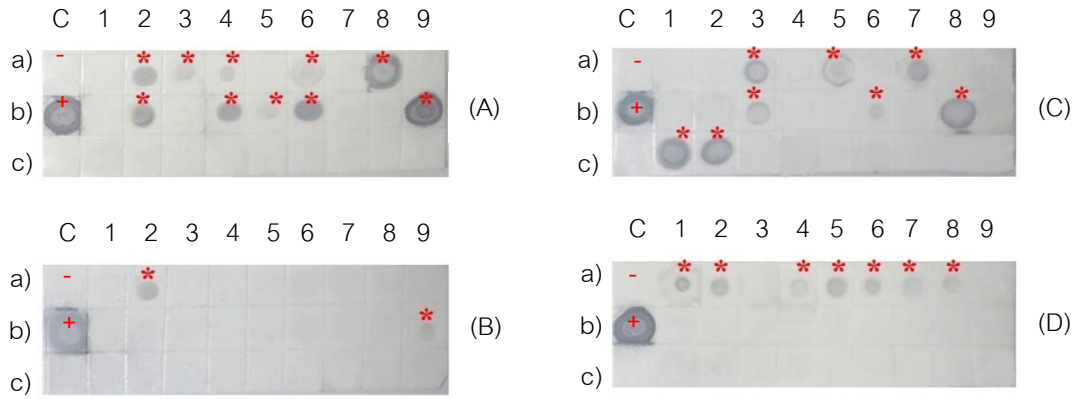
เวสเทิร์นบลอท (Western blot) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทลโลเจนินของปลา *G. brasiliensis* ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาชนิดอื่น เช่น *Astyanax bifasciatus* และ *Chrenicicla iguassuensis* ได้ เนื่องจากความสามารถในการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อฮอร์โมน 17β- เอสตราไดออล ในปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดย Prasatkaew *et al*. (2016) พบว่าหลังจากได้รับฮอร์โมน 17β- เอสตราไดออล ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลากะพงขาว ปลาเก๋าและปลานิล มีค่าเท่ากับ 45.61 ± 8.34, 37.16 ± 2.59, และ 29.01 ± 2.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฮอร์โมนมีปริมาณโปรตีน 27.50 ± 6.26, 34.62 ± 1.32 และ 24.48 ± 2.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งมีผลโดยตรงต่อการสร้างไวเทลโลเจนิน ทำให้ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของปลาแต่ละชนิดเพิ่มขึ้นต่างกัน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมาจากผลของฮอร์โมน 17β- เอสตราไดออลนั่นเอง เช่นเดียวกับการทดลองของ Garnayak *et al*. (2013) พบว่าปลา Asian catfish (*Clarias batrachus*) ที่ได้รับฮอร์โมน 17β- เอสตราไดออล มีปริมาณโปรตีนในพลาสมาเป็น 42.06 ± 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับปลากลุ่มควบคุมที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15.80 ± 0.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่แตกต่างกันนี้ อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดอทบลอทซึ่งเป็นเทคนิคเชิงคุณภาพ แสดงผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับปริมาณไวเทลโลเจนินที่เกิดสีน้ำตาลเทาได้แตกต่างกัน และหากปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลาที่ตรวจสอบมีปริมาณต่ำกว่าระดับขีดจำกัดของการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์จากปลากะพงขาว (7.8 นาโนกรัม) ซึ่งจับจำเพาะกับแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นโดยตรง ก็อาจตรวจไม่พบผลของปฏิกิริยาได้



ภาพที่ 2 การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวเทลโลเจนินในปลาเก๋าปะการัง ปลานิล และปลากะพงขาวด้วยเทคนิคดอทบลอท โดยใช้ MAb-sea bass VTG F3-23; ช่อง C คือ negative control (-) และ positive control (+), ช่อง 1-2 คือ พลาสมาปลากลุ่มควบคุม และช่อง 3-10 คือ พลาสมาปลาที่ได้รับฮอร์โมนตัวที่ 1-8 ตามลำดับ; * หมายถึง การพบผลบวกของปฏิกิริยา

การตรวจสอบสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำโดยใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ

ผลการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติซึ่งพบปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ขนาด 206.75 ± 24.78 กรัม ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ขนาด 63.5 ± 16.87 กรัม ปลาช่อน (*Channa striata*) ขนาด 506.75 ± 21.33 กรัม ปลากระดี่ (*Trichogaster microlepis*) ขนาด 42.77 ± 4.40 กรัม ปลาหมอ (*Anabas testudineus*) ขนาด 63.00 ± 13.37 กรัม และปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*) ขนาด 55.77 ± 11.15 กรัม จากพื้นที่อุตสาหกรรม ชุมชน และเกษตรกรรม ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม เปรียบเทียบกับแหล่งอ้างอิงคือบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระด้วยเทคนิคดอทบลอท (ภาพที่ 3 และตารางที่ 1) พบว่าปลาในพื้นที่อุตสาหกรรม มีการสร้างไวเทลโลเจนินมากที่สุด คิดเป็น 50.0% โดยพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ 33.3% จากจำนวนปลาเพศผู้ทั้งหมด (2 ใน 6 ตัว) รองมาคือพื้นที่เกษตรกรรม พบ 40.0% เป็นปลาเพศผู้ 11.1% (1 ใน 9 ตัว) ส่วนในพื้นที่ชุมชน และแหล่งอ้างอิงพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติ 10.0% และ 35.0% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยในแหล่งอ้างอิงยังพบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ 14.29% (1 ใน 7 ตัว) ผลการสำรวจแสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยแหล่งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมีแนวโน้มเป็นที่มาของการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม พบว่าทั้งแหล่งชุมชน การค้า และพื้นที่อุตสาหกรรม ที่ตั้งอยู่ในเมืองใหญ่เป็นพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงาน ของต่อมไร้ท่อ (Jackson & Sutton, 2008) สอดคล้องกับการสำรวจไวเทลโลเจนินในปลาคาร์พ (*Carassius carassius*) เพศผู้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่อยู่ในบริเวณตอนบนและตอนล่างของโรงบำบัดน้ำเสีย Gaobeidian ซึ่งเป็นโรงบำบัดน้ำเสียขนาดใหญ่ที่รับน้ำจากอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชนในเมืองปักกิ่ง ประเทศจีน พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบในปลาที่อยู่ตอนล่างของโรงบำบัดน้ำเสียซึ่งได้รับน้ำทิ้งจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียพบไวเทลโลเจนินสูงสุด 88.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปลาที่อยู่ตอนบนของแม่น้ำก่อนบริเวณพื้นที่โรงบำบัดน้ำเสีย ตรวจไม่พบไวเทลโลเจนิน (An *et al*., 2007) แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียเป็นแหล่งที่มาของสารรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม โดยมีผลชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้ได้



ภาพที่ 3 การตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติด้วยเทคนิคดอทบลอท ในพื้นที่อุตสาหกรรม (A) ชุมชน (B) เกษตรกรรม (C) และพื้นที่อ้างอิง (D); ช่อง C-a) คือ negative control (-) และ C-b) positive control (+) ช่อง 1-9 แถว a) คือ พลาสมาปลาตัวที่ 1-9; ช่อง 1-9 แถว b) คือ พลาสมาปลาตัวที่ 10-18 และ ช่อง 1-2; แถว C) คือ พลาสมาปลาตัวที่ 19 และ 20; ช่อง 3-9 : แถว c) ไม่มีตัวอย่าง; * หมายถึง การพบผลบวกของปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติด้วยเทคนิคดอทบลอท*

พื้นที่	เพศ		% การพบไวเทลโลเจนิน
	ผู้	เมีย	
อุตสาหกรรม N = 20	N = 6	N = 14	รวม 50.00% M = 33.33% F = 57.14%
ชุมชน N = 20	N = 8	N = 12	รวม 10.00% M = 0% F = 16.67%
เกษตรกรรม N = 20	N = 9	N = 11	รวม 40.00% M = 11.11% F = 63.64%
แหล่งควบคุม N = 20	N = 7	N = 13	รวม 35.00% M = 14.29% F = 46.15%

* จากการตรวจสอบจำนวน 3 ครั้ง

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคดอทบลอทเพื่อใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลากะพงขาว พบว่า ระดับไวเทลโลเจนินต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 7.8 นาโนกรัม ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณไวเทลโลเจนินที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในระดับนาโนกรัมถึงไมโครกรัม จึงสามารถนำไปใช้ตรวจสอบไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อมได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยเทคนิคดอทบลอทซึ่งเป็นเทคนิคเชิงคุณภาพอาจให้ผลเป็นลบหากไวเทลโลเจนินในตัวอย่างมีปริมาณต่ำกว่าขีดจำกัดของวิธีการตรวจสอบ ซึ่งปลาแต่ละชนิดอาจมีการตอบสนองต่อสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อต่างกัน ส่งผลต่อระดับการสร้างไวเทลโลเจนินที่แตกต่างกัน ผลการสำรวจไวเทลโลเจนินในปลาธรรมชาติจากแหล่งอุตสาหกรรม ชุมชน และเกษตรกรรม พบการสร้างไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้จากแหล่งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจมีที่มาจากการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 และการสนับสนุนด้านสถานที่ เครื่องมือ และบุคลากรจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

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*, 148-153.

Bastos, C.R., Mathias,L. A., Gomes-Jusi, M.M., Ferreira dos Santos, R., Pinheiro da Silva, G.C., André, M.R., Machado, R.Z., & Bürger, K.P. (2018). Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine brucellosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. (In press).

Bjerregaard, P., Hansen, P.R., Larsen, K.J., Erratico, C., Korsgaard, B., & Holbech, H. (2008). Vitellogenin as a biomarker for estrogenic effects in brown trout, *Salmo trutta*: laboratory and field investigations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*, 2387–2396.

Combalbert, S., & Hernandez-Raquet, G. (2010). Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*, 1671–1692.

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, S.D., Choi, H.K., Park, J-H., Kim, K.W., Inam, E., & Kim, S.D. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*, *78*, 286–293.

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.

Jackson, J., & Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Science of the Total Environment*, *405*(1-3), 153–160.

Lomax, D.P., Roubal, W.T., Moore, J.D., & Johnson, L.L. (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes etulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *121*, 425–436

Morthorst, J.E., Mathiesen, K.K., Holbech, H., Pedersen, K.L., & Bjerregaard, P. (2017). Vitellogenin concentrations in feral Danish brown trout have decreased: An effect of improved sewage treatment in rural areas? *Environmental Toxicology and Chemistry*, *37*, 839–845.

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

Nanthanawat, P., Khongchareonporn, N., & Srisawas, S. (2016). Development of monoclonal antibody specific to plasma Vitellogenin in Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch) Full report. (The Research grant of Burapha University through the National Research Council of Thailand, grant no. 79/2558). Chon Buri, Thailand: Burapha University. (in Thai)

Peter, L.D., Doyottea, A., Mitchelmorea, C.L., McEvoy, J., & Livingstonea, D.R. (2001). Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. *The Science of the Total Environment*, *279*, 137–150.

Prasatkaew, W., Thanomsit, C., & Nanthanawat, P. (2016). Cross-Reactivity of Monoclonal Antibody against Plasma Vitellogenin from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*) In *Proceedings the 7th National Science Research Conference*. (pp. 1–7). Phitsanulok: Naresuan University. (in Thai)

Ritphoe, S., Pimprong, A., Prasatkaew, W., & Nanthanawat P. (2015).Purification and Characterization of Vitellogenin from Asian Sea bass. In *Proceedings the 8th Science Research Conference*. (pp. 491–496). Payao : University of Payao. (in Thai)

Rupprecht, K.R., Nair, R.K., Harwick, L.C., Grote, J., Beligere, G.S., Rege, S.D., Chen, Y.Y., Lin, Z., & Fishpaugh, J.R. (2010). Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to low-molecular-mass drugs. *Analytical Biochemistry*, *407*, 160–164.

Scott, A.P., Sanders, M., Stentiford, G.D., Reese, R.A., & Katsiadaki, I. (2007). Evidence for estrogenic endocrine disruption in an offshore flatfish, the dab (*Limanda limanda* L.). *Marine Environmental Research*, *64*, 128–148.

Yamamoto, A., Garcia, J.R.E., Kupsc, A., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2017). Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River – Southern Brazil. *Chemosphere*, *186*, 88–99.