NU Science Journal 2011; 8(1): 32 - 43

การพัฒนาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Cadmium-Binding Protein จากปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) และการนำไปประยุกต์ใช้

สุกานดา ทับเมฆา[1, 2] ปภาศิริ บาร์เนท[1, 2, 3]* แววตา ทองระอา[4] และชุติมา ถนอมสิทธิ์[1, 2]

Development and Production of Polyclonal Antibody to Cadmium-Binding Protein from Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch) and Its Application

Sukanda Tubmeca[1, 2], Praparsiri Barnette[1, 2, 3] *, Waewtaa Thongra-ar[4] and Chutima Thanomsit[1, 2]

[1] โครงการบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

[4]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

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

บทคัดย่อ

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) ฉีดกระตุ้นด้วย $CdNO_3.4H_2O$ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และแยกCd-Binding Protein ที่สกัดจากตับโดยใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromotagraphy โดยการผ่าน HisTrap FF crude column ศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟลิซิส พบว่าโปรตีนหลักมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 10 kDa นำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ Cd-Binding Protein และทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี โดยใช้เทคนิค Western blot พบว่า การเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสม คือ 1:2,500โดย มีการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นค่อนข้างน้อย และพบแถบของ Cd-Binding Protein (~10 kDa) ค่อนข้างชัดเจน เมื่อนำมาประยุกต์ใช้สำรวจการสัมผัสสารเหนี่ยวนำการสร้าง Cd-binding protein ในปลาทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลเขตพื้นที่อุตสาหกรรมพบว่า บริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดมีการแสดงออก48.6% (n=148) สูงกว่าบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง ซึ่งพบ 29.1% (n=158) และเมื่อเปรียบเทียบตามฤดูกาล ฤดูแล้งพบ 51.3% (n=158) และฤดูฝน25.0% (n=148) การนำโพลีโคลนอล

แอนติบอดีต่อ Cd-binding protein จากปลากะพงขาวมาใช้สำรวจการสัมผัสสารเหนี่ยวนำการสร้าง Cd-binding protein ในปลาทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลเขตพื้นที่อุตสาหกรรมทำให้ทราบสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเล

คำสำคัญ : โพลีโคลนอลแอนติบอดี, Cadmium-Binding Protein , IMAC, ปลากะพงขาว

Abstract

Asian sea bass (*Lates calcarifer*, Bloch) was injected with $CdNO_3.4H_2O$ (4 mg/ 1 kg fish) and then Cadmium-Binding Protein was extracted from its liver by Immobilized metal ion affinity chromatography method for further using to produce polyclonal antibody specific to Cd-Binding Protein (PAb-Cd). After Electrophoresis studied, it was found that the molecular weight was 10 kDa. The PAb-Cd specificity was tested by Western blot technique. The results indicated that the appropriate dilution was 1:2,500 in which the Cd-binding protein band was clearly detected. After that this polyclonal antibody was used to evaluate the expression level of Cd-binding proteins in marine fish. It was found that its expression in the marine fish collected from Map Ta Phut industrial estate (Rayong Province) was higher than that of fish collected from Laemchabang industrial estate (Chon Buri Province); 48.6% (n=148) and 29.1% (n=158), respectively. Higher expression of Cd-binding protein in fish was revealed during summer in comparison with rainy season; 51.3 % (n=158) and 25.0% (n=148). Polyconal antibody against to Cd-binding protein produced in the Asian sea bass can be used to monitor the pollution situation in coastal industrial area

Keywords : Polyclonal antibody, Cadmium-Binding Protein, IMAC, *Lates calcarifer*

บทนำ

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมค่อนข้างมาก ส่วนใหญ่พบอยู่รวมกับสังกะสี ตะกั่วและคอปเปอร์ซัลไฟด์ แคดเมียมพบมากในวัสดุที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่สูง เช่น น้ำมันดิบและถ่านหิน (สุวัจน์ ธัญรส, 2549) อุตสาหกรรมการทำเหมือง การหลอม และการถลุงตะกั่ว สังกะสี ทำให้มีแคดเมียมเข้าไปปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่างๆ โดยเฉพาะในน้ำทะเลที่เ ป็นแหล่งสะสมของเสียแหล่งสุดท้ายของมนุษย์ ทำให้สัตว์น้ำต่างๆได้รับและสะสมแคดเมียมไว้ในร่างกาย เมื่อมนุษย์รับประทานสัตว์น้ำจึงมีโอกาสได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายอาจก่อให้เกิดอันตราย

ต่อสุขภาพได้ การตรวจวัดโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเลทำให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อน แต่การวัดปริมาณโลหะหนักทุกชนิดในสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตโดยตรงนั้นมีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาแพง ในการดำเนินการวิเคราะห์ ทั้งสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ยังมีความเป็นพิษต่อผู้ทำการวิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม การใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) เช่น Metal-Binding Protein จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบเบื้องต้นการรับสัมผัสของสิ่งมีชีวิตต่อโลหะหนัก เนื่องจากเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มี cystein สูง และสามารถเลือกจับกับโลหะได้อย่างจำเพาะ ระดับความเข้มข้นของ Metal-Binding Protein จะเพิ่มขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะหนัก เพราะมีหน้าที่สำคัญในการเมตาโบไลต์และปรับสมดุลของร่างกายให้เป็นปรกติ (Nostelbacher *et al*., 2000) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cd- Binding Protein ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความแม่นยำสูง โดยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น อีกทั้งราคาในการดำเนินการไม่สูงมาก สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) โดยใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromatography เตรียมแอนติเจน Cd-binding protein จากปลากะพงขาว (*L. calcarifer*, Bloch) ให้บริสุทธิ์ เป็นการให้โปรตีนจับกับโลหะในคอลัมน์ แล้วชะโปรตีนออกมา โดยอาศัยหลักการ metalbiospecific interaction เป็นวิธีที่ง่าย สามารถทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ ไม่ทำให้สูญเสียโปรตีนมาก และใช้เวลาน้อย (Honda *et al*., 2005) เพื่อนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี นำไปใช้สำรวจปลาทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลเขตพื้นที่อุตสาหกรรม

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ปลากะพงขาว (*L. calcarifer*, Bloch) ขนาด 80-100 กรัม จำนวน 15 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (n=5) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมไม่ได้ฉีดบัฟเฟอร์ กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มควบคุมฉีดบัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) และกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มทดลองฉีด $CdNO_3.4H_2O$ 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ใน 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 บริเวณใต้ท้อง (intraperitoneal) นาน 48 ชั่วโมง นำตับมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียว (homogenize) (35 % w/v) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (ที่มี 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT และ 150 mM NaCl) ปั่นที่ความเร็ว 15,000 X g นาน 90 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บโปรตีนส่วนบน (supernatant) หาปริมาณโปรตีน (Protein determination) (Bradford, 1976) และทดสอบคุณลักษณะของโปรตีน ด้วย 15% Gel electrophore หนูขาว (swiss mice) อายุ 6 สัปดาห์ ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม

การทำ Cd-binding protein ทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromotagraphy โดยใส่โปรตีน Cd-binding protein ที่สกัดจากตับปลากะพงขาว ปริมาณ1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน HisTrap™ FF crude column (Amersham Pharmacia Biotech) ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มี $NiSO_4.6H_2O$ เคลือบอยู่ที่ผิวเรซิน ชะโปรตีนด้วย 10 มิลลิลิตรของ 5, 50, 100, 250, 500 mM imidazol เลือกเก็บเป็นแฟรกชั่นที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จำนวน 50 แฟรกชั่น หาปริมาณโปรตีน และทดสอบคุณลักษณะของ Cd-binding protein ที่ผ่านคอลัมน์ด้วย 15% Gel electrophoresis

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

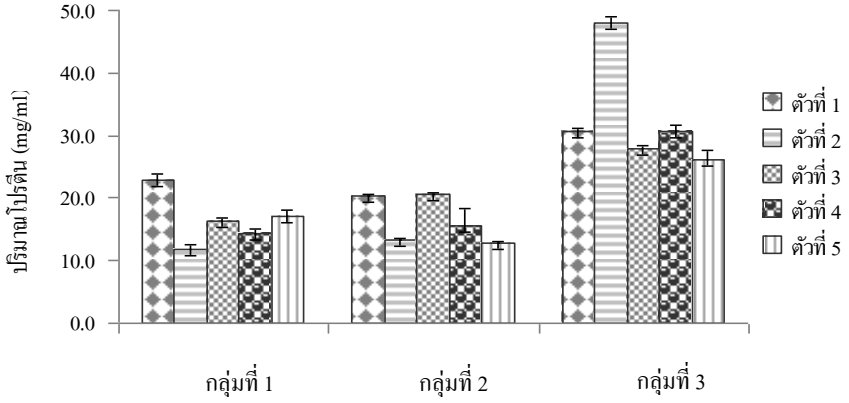
นำ Cd-binding protein ที่แยกได้จาก HisTrap™ FF crude column ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนู 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยครั้งที่ 2-4 จะผสม Cd-binding protein กับ Incomplete Freund's adjuvant หลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ จะเก็บเลือดหนูจากบริเวณหาง นำเลือดหนูเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 Xg นาน 15 นาที เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 ºC

การทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Western blot

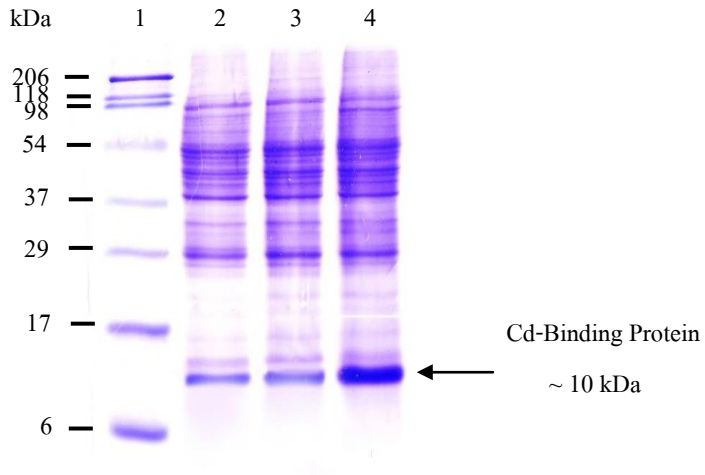
แยก Cd-binding protein ด้วย 15% Gel electrophoresis จากนั้นถ่ายโปรตีนลงบนกระดายไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยใช้ Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell นำกระดายไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แช่ใน 5% dry milk in PBS นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS/0.5%tween20 5 นาที 3 ครั้ง บ่มในโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ Cd-binding protein ที่ผลิตได้ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 1:1,000 1:2,500 1:5,000 1:7,500 และ 1:10,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงล้างด้วย PBS/0.5%tween20 5 นาที 3 ครั้งจากนั้นบ่มใน Goat anti mouse IgG-HRP (Jackson Immune Research Laboratories, Inc.) เจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS/0.5%tween20 5 นาที 3 ครั้ง แช่ในสารละลายซับ สเตรท 30% H_20_2 25 µl DAB 7 mg $CoCl_2$ 200 µl ใน PBS 20 ml ตรวจดูผล โดยเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี สำรวจการแสดงออกของ Cd-binding protein ในปลาทะเลแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรีและระยอง เก็บปลาทะเลบริเวณเขตอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและเขตนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ทำการเก็บตับและสกัดโปรตีนเพื่อตรวจการแสดงออกของ Cd-binding protein ในปลาทะเล ด้วยวิธี Western blot (ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการฉีดกระตุ้นปลากะพงขาวด้วยสาร $CdNO_3.4H_2O$ ที่ละลายใน 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เพื่อชักนำให้สร้าง Cd-Binding Protein พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมจากตับ มีปริมาณสูงกว่าปลากะพงขาวกลุ่มที่ไม่ฉีดและฉีดบัฟเฟอร์ ดังรูป 1 และศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนของปลากะพงขาวทั้ง 3 กลุ่ม พบแถบโปรตีนหลักที่มีขนาดประมาณ 10 kDa แต่กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยสาร $CdNO_3.4H_2O$ แถบโปรตีนจะหนากว่าสองกลุ่มที่เหลือเกือบ สองเท่า ซึ่งคาดว่า เป็น Cd-binding protein ดังรูป 2 เนื่องจาก Cd-Binding Protein เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็ก มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถสร้างขึ้นจากการเหนี่ยวนำของโลหะแคดเมียมที่พบในสิ่งแวดล้อม มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย cysteine สูง จึงทำให้สามารถจับกับโลหะได้ง่ายเพราะ cystein ทำหน้าที่เป็นลิแกนให้โลหะมาจับ (Nostelbacher *et al*., 2000) ส่วนกลุ่มที่ไม่ฉีดและฉีดบัฟเฟอร์ที่พบแถบโปรตีน 10 kDa แต่มีลักษณะจางกว่า น่าจะเป็น Metal-Binding Protein ที่ทำหน้าที่ปรับสมดุลของโลหะที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพราะโลหะ ที่มีความเข้มข้นสูงในร่างกายสามารถเป็นพิษได้ (Chaffai *et al*., 2000)

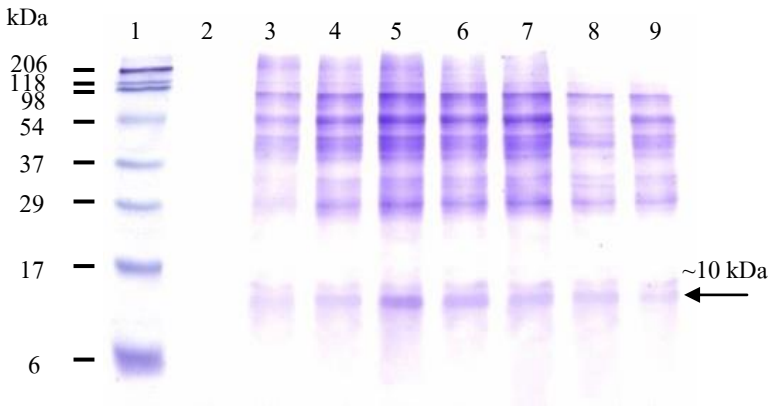


รูป 1 ปริมาณโปรตีนรวมของปลากะพงขาว กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มไม่ฉีด, กลุ่มที่ 2 คือ ฉีดบัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) และ กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มฉีด $CdNO_3.4H_2O$



รูป 2 รูปแบบของโปรตีนปลากะพงขาว (1) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Rang 310006442 (Bio-Rad, U.S.A.) (2) ปลากะพงขาวไม่ฉีดบัฟเฟอร์ (3) ปลากะพงขาวฉีดบัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) (4) ปลากะพงขาวกลุ่มฉีด $CdNO_3$ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม

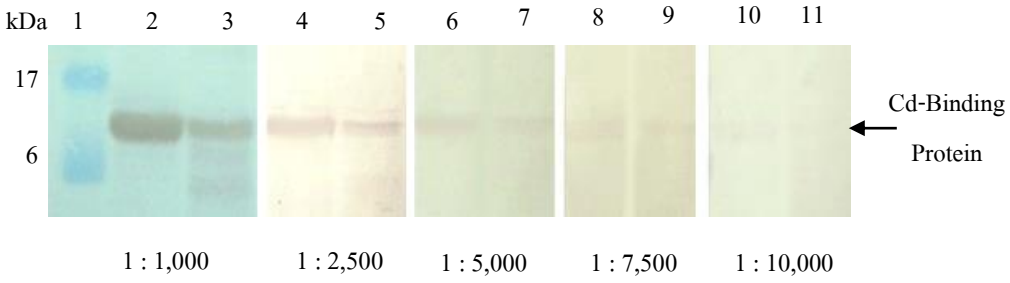
เมื่อโปรตีนผ่าน Histrap™ FF crude column ที่มีโลหะนิกเกิลเคลือบอยู่บนเรซิน โปรตีนจะจับกับ Ni^{2+} เมื่อชะ ด้วย 0-500 mM imidazol จะสามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ โดยเริ่มเห็น Cd-Binding Protein ที่มีขนาดประมาณ10 kDa ตั้งแต่แฟรกชั่นที่ 2 เป็นต้นไป ซึ่ง อยู่ในช่วง 5-50 mM imidazol ดังรูป 3 เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Honda และคณะ (2005) ใช้เทคนิค Immobilized metal ion affinity chromatography ทำ Cd-Binding Protein จาก ปลาอะเมซอน (*Colossoma macroponum*) ให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถพบ Cd-Binding Protein ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 10 kDa ตั้งแต่แฟรกชั่นที่ 2 โดยเทคนิคดังกล่าว เป็นวิธีที่อาศัยความจำเพาะระหว่าง coordinate covalent binding ของ amino acids ที่จะทำให้โปรตีนสามารถจับกับโลหะที่เคลือบอยู่บนสารเรซิน ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์



รูป 3 รูปแบบของ Cd-Binding Protein ผ่าน HisTrap™ FF crude column แยกเก็บได้ในแต่ละแฟรกชั่น (1) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Rang 310006442 (Bio-Rad, U.S.A.) (2)-(9) แฟรกชั่นที่ 1-8 ตามลำดับ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยใช้เทคนิค Western blot ที่เจือจางต่าง ๆ กันคือ 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000, 1:7,500 และ 1:10,000 พบว่าค่าการเจือจางแอนติบอดีเหมาะสมคือ 1:2,500 โดยมีการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นค่อนข้างน้อย และพบแถบโปรตีน Cd-Binding Protein (~10 kDa) ค่อนข้างชัดเจน ดังรูป 4 ซึ่งคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อ Cd-Binding protein อย่างสูง แต่อาจสามารถจับกับ Metal-Binding Protein ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างขึ้นจากโลหะหนักตัวอื่นๆ ได้ เช่น Zn, Cu, Hg, Co, Ni, Bi และ Ag (Houggett *et al*., 1992) เช่นเดียวกับ Mullin และคณะ (1999) ที่ได้ประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cd-binding Protein ในการตรวจสอบถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำ

การศึกษาครั้งนี้ใช้ค่าการเจือจางแอนติบอดีที่ 1:2,500 สำรวจการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลชนิดอื่นๆ ที่จับจากชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ในช่วงฤดูฝน (สิงหาคม- กันยายน 2550) และ ฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) ด้วยเทคนิค Western blot พบว่าปลาทะเลจากนิคมอุตสาหกรรมทั้งสองแห่งสามารถพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 10 kDa เหมือนกับปลากะพงขาวที่ทดลองฉีด $CdNO_3$ ดังรูป 5

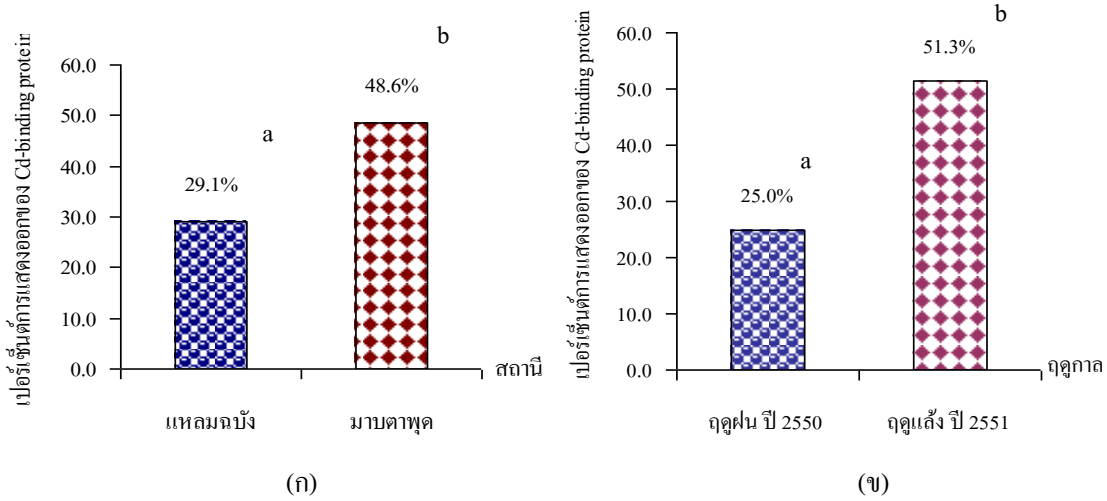


รูป 4 ทดสอบประสิทธิของPAb: Cd-binding protein จากปลากะพงขาวทดลองฉีด $CdNO_3$ (1) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Rang 310006442 (Bio-Rad, U.S.A.)(2), (3) โปรตีนสกัดจากตับปลากะพงฉีด $CdNO_3$ 4 mg/kg ยังไม่ได้ผ่านและ ผ่าน Hitrap Column ตามลำดับ ใช้ PAb เจือจาง 1:1,000 (4), (5) PAb เจือจาง 1: 2,500 (6),(7) PAb เจือจาง 1:5,000 (8),(9) PAb เจือจาง 1: 7,500 (10),(11) PAb เจือจาง 1:10,000

รูป 5 ตัวอย่างการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลที่เก็บจากบริเวณนิคมอุตสาหกรรม ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Cd-Binding Protein จากปลากะพงขาวทดลองฉีด $CdNO_3$ ที่ค่าการเจือจาง 1:2,500 ด้วยวิธี Western Blot (1) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Rang 310006442 (Bio-Rad, U.S.A.) (2) โปรตีนสกัดจากตับปลากะพงฉีด $CdNO_3$ 4 mg/kg ผ่านคอลัมน์ (3) ปลาดาบเงินตัวที่ 2 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกจาง (4) ปลาดาบเงินตัวที่ 3 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกจาง (5) ปลาดาบเงินตัวที่ 4 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกเข้ม (6) ปลาดาบเงินตัวที่ 5 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกเข้ม (7) ปลาดาบเงินตัวที่ 6 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกจาง (8) ปลาหางควายตัวที่ 1 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกจาง (9) ปลาหาควายตัวที่ 2 มาบตาพุด ฤดูแล้ง ให้ผลบวกจาง

การแสดงออกของ Cd-Binding Proteinของปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง พบสูงกว่าบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี จากการเก็บตัวอย่างปลาทะเล 29 ชนิด จำนวน 148 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 72 ตัวอย่าง คิดเป็น 48.6% (n=148) ส่วนบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี ปลาทะเล 32 ชนิด จำนวน 158 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 46 ตัวอย่าง คิดเป็น 29.1% (n=158) ดังรูป 6 (ก) โดยในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) พบ 51.3% (n=158) สูงกว่า ฤดูฝน (สิงหาคม- กันยายน 2550) พบ 25.0% (n=148) ดังรูป 6 (ข)

ซึ่งบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด เป็นแหล่งอุตสาหกรรมหนักที่ขบวนการผลิตอาจมีโลหะหนักหลายชนิดปนอยู่และคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีอาจจะจับกับโลหะหนักตัวอื่นๆ ได้ แต่มีความจำเพาะกับแคดเมียมอย่างสูง ดังนั้นเมื่อแคดเมียมปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีการปล่อยน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเหล็ก โรงงานถลุงโลหะและโรงงานถลุงเหล็ก กระบวนการผลิตสังกะสีที่ไม่เป็นสนิม โดยมีการเคลือบโลหะที่มีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบ อุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยฟอสเฟตหินฟอสเฟตที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 100 ppm (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2543) อีกทั้งยังมีคลองสาธารณะในพื้นที่นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จำนวน 9 คลอง ได้แก่ คลองพยูน คลองบางกะพรุน คลองบางเบิด คลองซากหมาก คลองตากวน คลองน้ำหู คลองห้วยใหญ่ คลองน้ำชา และคลองหลอด ที่พบว่าคุณภาพน้ำยังมีความเสื่อมโทรมทั้งทางกายภาพและทางเคมี (กรมควบคุมมลพิษ, 2550) อาจทำให้สารมลพิษถูกชะลงสู่ชายฝั่งทะเลบริเวณมาบตาพุดเพิ่มมากขึ้น



รูป 6 (ก) การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง (ข) การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลในช่วงฤดูฝน ปี 2550 และฤดูแล้ง ปี 2551; อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

นอกจากนี้ฤดูกาลยังมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ Cd-Binding Protein โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาที่ทำการสำรวจทั้ง 2 ครั้ง พบว่าการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) มีแนวโน้มสูงกว่า ฤดูฝน (สิงหาคม- กันยายน 2550) โดยในช่วงฤดูแล้งแคดเมียมในน้ำทะเลจะเพิ่มขึ้นตามความเค็มที่สูงขึ้น เนื่องจากแคดเมียมที่ยึดติดอยู่กับผิวหน้าของตะกอนที่พัดพามากับแม่น้ำ หรือจากตะกอนพื้นท้องน้ำถูกคายออกมาจากการแลกเปลี่ยนอิออนบนผิวหน้าตะกอน ทำให้แคดเมียมถูกดึงมาสร้างพันธะใหม่กับคลอไรด์หรือประจุลบอื่น ที่มีปริมาณสูงในน้ำทะเลในช่วงฤดูแล้ง มีผลให้แคดเมียมละลายน้ำได้มากขึ้น (ศรัณย์ เพ็ชร์พิรุณ และ ณรงค์ฤทธิ์ เลิศเกษตรวิทยา, 2548) โอกาสการรับสัมผัสของปลาทะเลต่อแคดเมียมจึงเพิ่มมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ ฉลวย มุสิกะ (2544) พบว่าพฤติกรรมของแคดเมียม บริเวณแม่น้ำบาง ปะกง ในฤดูแล้ง (มีนาคม 2543) น้ำมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มตั้งแต่ 8 psu บริเวณต้นน้ำจนถึง 32.5 psu พบแคดเมียมเฉลี่ย 0.036 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยบริเวณปากแม่น้ำแคดเมียมและทองแดงในส่วนของสารละลายเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความเค็ม ในขณะที่ฤดูฝน น้ำมีความเค็มตั้งแต่ 0 psu บริเวณต้นน้ำ ถึง 0.5 psu บริเวณปากแม่น้ำ พบแคดเมียมเฉลี่ย 0.026 ไมโครกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของอภิรดี เมืองเดช (2545) ที่พบว่าปริมาณโลหะตะกั่ว แคดเมียม ในหอยแครง (*Anadara granosa*) บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง และบริเวณชายฝั่งทะเลชลบุรี มีค่าเฉลี่ยสูงสุดในเดือนธันวาคม 2542 และมกราคม 2543 โดยมีค่าเท่ากับ 0.435และ 0.835 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ ส่วนในฤดูฝนปริมาณฝนที่มากอาจทำให้แคดเมียมที่ละลายในน้ำเจือจางลง ส่งผลให้การรับสัมผัสของปลาทะเลลดลงตามไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

การใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromotagraphy สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ เพื่อให้ได้ Cd-Binding Protein ที่บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) จำพาะต่อ Cd-Binding Protein ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมในบริเวณแหล่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ แต่การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเป็นต้องใช้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง เพราะอาจจะมีผลต่อความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ ดังนั้นการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบ Cd-Binding Protein ยังคงมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ความไม่จำเพาะของแอนติบอดี หรือความไวของปฏิกิริยา ดังนั้นควรมีการศึกษาการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการสารเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาทะเลจากงานวิจัย เรื่อง การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของโลหะหนักในอาหารทะเลในพื้นที่อุตสาหกรรมชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. (2550). คุณภาพน้ำคลองสาธารณะในพื้นที่นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด. วันที่ค้นหาข้อมูล 21 กันยายน 2553, เข้าถึงได้จาก *http;//www.pcd.go.th/Info_serv/pol_Maptapoot_water.html*

ฉลวย มุสิกะ. (2544). *พฤติกรรมของโลหะหนักบางชนิดในแม่น้ำบางปะกง*. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตบัณฑิต ภาควิชาวารินศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. (2543). *แหล่งน้ำกับปัญหามลพิษ*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 288 หน้า.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกัน*. กรุงเทพ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สุวัจน์ ธัญรส. (2549). *มลพิษทางทะเลและชายฝั่ง*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศรัณย์ เพ็ชร์พิรุณ และ ณรงค์ฤทธิ์ เลิศเกษตรวิทยา. (2548). การสะสมของทองแดง แคดเมียมและตะกั่วในดินตะกอนบริเวณอ่าวไทยตอนบนการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาประมง สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, หน้า 18-26

อภิรดี เมืองเดช. 2545. ปริมาณโลหะหนักในหอยแครง (Anadara granosa) บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง. *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม 4-7 กุมภาพันธ์ 2545* . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248-254.

Chaffai, A.H., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L. and Berthet, B. (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker ofin situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and physiology Part C*, *127*, 185-197.

Honda, R.T., Araujo, R.M., Horta, B.B., Val, A.L. and Dema1si, M. (2005). One- step purification of metallothionein extracted from two different sources. *Journal of Chromatography B*, *820*, 205-210.

Houggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. and Berman, H.L. (1992). *Metallothionein*. Biomarkers: Biological, Physiological and Histological markers of Anthropogenic stress. Lewis publishers. The United States of America.

Mullins, J.E., Fredrickson, R.A., Fuentealba, I.C. and Markham, R.J. (1999). Purification and partial characterization of a cadmium-binding protein from the liver of rainbow trout (Onchorynchus mykiss). *Canadian Journal of Veterinary Research*, *63*(4): 225-229.

Nöstelbacher, K., Kirchgessner, M. and Stangl, G.I. (2000). Separation and quantitation of metallothionein isoforms from liver of untreated rats by ion-exchange high-performance liquid chromatography and atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *744*(2),273-282.