การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ ELISA ในการหาปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

Development and Application of ELISA for Quantification of Lectin in Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*) Hemolymph

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

นางสาววนิดา ฤทธิเดช

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์

ที่ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2547

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สามารถทำให้เลคตินบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วยโดยการทำโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ Fetuin-agarose และแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superose 12 หรือการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม เลคตินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีนแถบเดียวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แอนติบอดีต่อเลคตินบริสุทธิ์ได้จากการฉีดเลคตินครั้งละ 20 ไมโครกรัม จำนวน 3 ครั้ง เข้าในผิวหนังและใต้ผิวหนังของกระต่าย แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาใน Dot blot กับเลคตินบริสุทธิ์และกับฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับฮีโมลิมฟ์ของกุ้งก้ามกราม ในการวิเคราะห์แบบ Western blot พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับฮีโมลิมฟ์และสารสกัดจากตับ รังไข่และกล้ามเนื้อของกุ้งแชบ๊วยได้ งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธี ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งได้ โดยมีกราฟมาตรฐานของเลคตินบริสุทธิ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0-400 นาโนกรัม ปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์ซึ่งวัดด้วยวิธี ELISA พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันในช่วงที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่าง ๆ ในขณะที่แอคทิวิทีจำเพาะของเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงมีค่าเพิ่มขึ้นตามพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ บ่งชี้ว่าอาจมีการกระตุ้นแอคทิวิทีของเลคตินซึ่งจำเป็นต่อการเจริญพันธุ์ของไข่ในช่วงที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ของกุ้งแชบ๊วย จากการฉีดแบคทีเรียในกุ้งพบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเลคตินในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 8.4 และ 33.2 เท่า หลังการฉีดนาน 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน ปริมาณเลคตินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.7 และ 2.2 เท่า หลังการฉีดนาน 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าการติดเชื้อก่อโรคอาจมีการกระตุ้นแอคทิวิทีของเลคตินที่มีอยู่ในฮีโมลิมฟ์และอาจทำให้มีการสังเคราะห์เลคตินเพิ่มขึ้นหรือเพิ่มการหลั่งเลคตินสู่ฮีโมลิมฟ์ด้วย

Abstract

Purification of lectin from hemolymph of the banana shrimp *Penaeus merguiensis* was achieved by chromatography on Fetuin-agarose column and subsequently by Superose 12 HR column or preparative PAGE. Purified lectin showed one protein band in nondenaturing PAGE. Antibody to purified lectin was successfully produced in an albino rabbit by intradermal and subcutaneous injections of each 20 μg of purified lectin for 3 times. In Dot blotting, the antibody could reacted with purified lectin and hemolymph of *P. merguiensis*, *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*, but not with that of *Macrobrachium rosenbergii*. It showed cross reactivity with hemolymph and the extract from liver, ovary and muscle of the banana shrimp as well in Western blot analysis. Moreover, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for measuring lectin level in hemolymph of this species. Using purified lectin, the standard curve for the ELISA had a linear range of 0-400 ng. The lectin contents in hemolymph, analyzing by ELISA, were not different during different ovarian stages of development whereas the specific hemagglutinating activity increased corresponding with the ovarian maturation. These results indicated that activation of lectin activity may occur and be required for the oocyte maturation during ovarian development of the shrimp. By means of *Vibrio harveyei* injection, specific hemagglutinating activity of hemolymph lectin increased significantly to 8.4-fold and 33.2-fold after 6 and 12 hours of the injection, respectively. In similar, lectin contents in hemolymph increased 1.7-fold and 2.2-fold after 6 and 12 hours of the injection, respectively. These results indicated that pathogenic infection may activate the activity of hemolymph lectin and also result in increasing either synthesis or secretion of the lectin into hemolymph.