

การตรวจหาคลอโรเฟทระไซคลินตกค้างในตัวอย่างอาหารโดยวิธีอิมมูโนแอสเสย์
แบบแลเตอร์อลโฟลว์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF CHLORTETRACYCLINE RESIDUES IN FOOD SAMPLES
BY LATERAL FLOW IMMUNOASSAY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Common Course
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาคลอโรเฟรโซคลินตกค้างในตัวอย่างอาหารโดยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ แบบแลเตอร์อลโฟลว์
โดย	น.ส.ปณิชา พวงมลัย
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาคยา งามโรจนวิชย์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกื้อการุณย์ ครูสง)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พอลิต นันทนาวัฒน์)	

ปณิชา พวงมาลัย : การตรวจหาคลอรัทเทรไซโคลินตกค้างในตัวอย่างอาหารโดยวิธีอิมมูโนแอสเสย์ แบบแลตเทอรอลโฟลว์. (DETECTION OF CHLORTETRACYCLINE RESIDUES IN FOOD SAMPLES BY LATERAL FLOW IMMUNOASSAY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.นันทิกา คงเจริญพร

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีการใช้ยาปฏิชีวนะคลอรัทเทรไซโคลิน (CTC) เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรคและเร่งการเติบโต โดยการใช้นี้ อาจมีการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้ซึ่งส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นทำให้นานาประเทศได้มีการกำหนดระดับยาปฏิชีวนะกลุ่มเทรไซโคลิน (TCs) ที่สามารถตรวจพบได้ในอาหาร (MRL) ปัจจุบันวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีแก๊ส (ICA) หรือแถบทดสอบ เป็นวิธีที่สามารถทดสอบได้รวดเร็ว สามารถประเมินผลได้ด้วยตาเปล่าและสามารถนำไปตรวจในภาคสนามได้ ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจหาคลอรัทเทรไซโคลินตกค้างในตัวอย่างอาหารจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเอง โดยทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนูสายพันธุ์ ICR ด้วย CTC-BSA โดยหนูทุกตัวมีระดับการสร้างแอนติบอดีในช่วง 1:128,000 - 1:256,000 จากนั้นทำการหลอมรวมเซลล์น้ำนมของหนูและเซลล์มัยอีโลมา P3X พบว่าได้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อ CTC อิสระที่เสถียรจำนวน 1 โคลน และศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พบว่าเป็นไอโซไทป์ IgG₁ มี ค่า LOD เท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเทรไซโคลินน้อยกว่า 0.033% และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม TCs จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไปตรวจหา CTC ด้วยวิธี ELISA และ ICA เมื่อทดสอบในน้ำนมโดยวิธี ELISA มี %Recovery อยู่ในช่วง 100-105.5 % และ %CV อยู่ในช่วง 3.3-9 % ในน้ำผึ้งมี %Recovery อยู่ในช่วง 99-104 % และ %CV อยู่ในช่วง 1.8-10.1 % จากนั้นทดสอบโดยวิธี ICA พบว่าในน้ำนม มีค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำผึ้งมีค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแถบทดสอบ CTC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจหา CTC ตกค้างในอาหารได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5872157923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: CHLORTETRACYCLINE / ELISA / IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY

Panicha Pongmalai : DETECTION OF CHLORTETRACYCLINE RESIDUES IN FOOD SAMPLES BY LATERAL FLOW IMMUNOASSAY. Advisor: Asst. Prof. Nanthika Khongchareonporn, Ph.D.

In animal husbandry, chlortetracycline (CTC) is widely used for controlling animal diseases, keeping animals healthy and promoting animal growth. Drug usage can cause drug residue in animal products, which may affect the *safety* of the *consumer*. So, many countries have set maximum residue limitation (MRL) of TCs. Presently, immunochromatographic assay (ICA) or strip test is commonly method which use to detect drug residue in food product due to its short analysis time, easy result observation and on-site detection. So, the aim of this study was to develop the Lateral flow immunochromatographic for detect CTC residues in food samples. ICR mice were immunized with CTC-BSA and then anti-serum titers showed ranging between 1:128,000 - 1:256,000. After that, the fusion of myeloma P3X with spleen cells of the immunized mice were performed. Only one the stable hybridoma clone was produced monoclonal antibody (MAb) against CTC. The isotype was identified as IgG₁. Additionally, the sensitivity in term of IC₅₀ was 0.33 ng/ml, respectively. The specificity of MAb was shown no cross reactivity with antibiotic in TCs group and other antibiotic groups. Therefore, this MAb can be used to develop the strip test for detect CTC residue in food samples. Colloidal gold was conjugated with MAb, the sensitivity of this test strip for CTC detection in buffer showed the cut off value and the visual detection limit (VLOD) at 20 and 10 ng/ml. The detection was in a range of 3-20 ng/ml. Moreover, VLOD was found at 3 ng/ml by using ImageJ v. 1.47m software analysis. In this study, *cross reaction* to TCs group or *other group of antibiotics* could *not* be performed. After that, CTC will be

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัยตลอดจนแนะนำปรับปรุงแก้ไขงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกื้อการุณย์ ครูสง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำด้านวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำและความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆอย่างเต็มที่จนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆอย่างเต็มที่จนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ รวมถึงให้กำลังใจ คำแนะนำให้สามารถทำงานวิจัยจนเกิดผลสำเร็จและมีความสุขมาโดยตลอดตั้งแต่ทำงานวิจัยจนสำเร็จเป็นเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล ที่ให้ร่วมโครงการ สนับสนุนเงินผู้ช่วยวิจัยและเงินวิจัย ภายใต้ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เลขที่สัญญา RTA 6080002 งานวิจัยสำเร็จด้วยดี

ที่สำคัญที่สุดขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่มีส่วนร่วมกับความความสำเร็จครั้งนี้ ทั้งให้คำแนะนำ คำสอนที่สามารถนำไปใช้ในชีวิตประจำวันได้

ปณิชา พวงมาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารรูปภาพ.....ฐ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....3	3
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....3	3
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....4	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....4	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....5	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6	6
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....6	6
2.1.1 ยาปฏิชีวนะคลอรัทเทอไรไซคลิน (Chlortetracycline; CTC).....6	6
2.1.2 ผลกระทบของสารตกค้างในกลุ่มเทอไรไซคลิน.....7	7
2.1.3 มาตรฐานของสารตกค้างในกลุ่มเทอไรไซคลิน.....8	8
2.2 การตรวจวิเคราะห์คลอรัทเทอไรไซคลินตกค้างในอาหาร.....9	9
2.2.1 วิธีทางเคมี.....9	9
2.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....9	9
2.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....10	10
2.3.1 แอนติเจน.....10	10
2.3.2 แอนติบอดี.....11	11

2.3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	16
2.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	19
2.4.1 indirect ELISA.....	20
2.4.2 indirect competitive ELISA.....	21
2.5 หลักการแถบทดสอบรูปแบบการไหลตามแนวราบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA).....	22
2.5.1 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ.....	22
2.5.2 รูปแบบของแถบทดสอบ.....	24
2.5.2.1 รูปแบบแข่งขัน (competitive assay format).....	24
2.5.2.2 รูปแบบแซนวิช (sandwich assay format).....	26
2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อแถบทดสอบ	28
2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	30
บทที่ 3	32
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	32
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.4 วัสดุสำหรับทำแถบทดสอบ	36
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	37
3.5.1 การเชื่อมคลอโรเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ	37
3.5.1.1 การเชื่อมคลอโรเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ.....	37
3.5.1.2 การวัดปริมาณโปรตีน	38
3.5.1.3 การหาอัตราส่วนการเชื่อมติด (molar ratio) ของคลอโรเทระไซคลินเชื่อมกับโปรตีนพาหะ.....	38

3.5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	39
3.5.2.1 การฉีดกระตุ้นหนุทดลอง (Immunization).....	39
3.5.2.2 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา (myeloma cell)	39
3.5.2.3 การเตรียมเซลล์ม้าม (Spleen cell).....	39
3.5.2.4 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion).....	40
3.5.2.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	40
3.5.3 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	42
3.5.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	42
3.5.4.1 การหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotyping).....	42
3.5.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	43
3.5.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	43
3.5.5 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CTC ด้วยวิธี icELISA ในตัวอย่างอาหาร..	44
3.5.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัด CTC ในตัวอย่างอาหาร	44
3.5.5.2 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำนม	44
3.5.5.3 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำนม.....	44
3.5.5.4 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	45
3.5.5.5 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง.....	45
3.5.6 การเตรียมแถบทดสอบต้นแบบ	45
3.5.6.1 การศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอนุภาคทองคำ ที่เหมาะสม	45
3.5.6.2 การเตรียมอนุภาคทองที่ติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb- Colloidal gold).....	46
3.5.6.3 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ	46
3.5.6.4 การทดสอบและการแปลผล	47

3.5.6.6 การหาค่าความไวของแถบทดสอบ	48
3.5.6.7 การหาค่าความจำเพาะของแถบทดสอบ.....	48
3.5.6.8 การประเมินประสิทธิภาพแถบทดสอบในตัวอย่างอาหาร	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
4.1 ผลการเชื่อมคลอรัทเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ	50
4.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	52
4.2.1 ผลการหาระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนู	52
4.2.2 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	53
4.3 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	54
4.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	55
4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	55
4.4.2 ผลการหาค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	56
4.4.3 ผลการหาค่าความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	62
4.5 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CTC ด้วยวิธี icELISA ในตัวอย่างอาหาร.....	63
4.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน	63
4.5.2 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำนม.....	66
4.5.3 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำนม	68
4.5.4 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง	69
4.5.5 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	71
4.6 การพัฒนาแถบทดสอบ	72
4.6.1 ผลการเชื่อมติดโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ.....	72
4.6.2 ติดตามการติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ	74
4.6.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ.....	75
4.6.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ T line และ C line.....	75

4.7 ผลการหาความไวของแถบทดสอบ	78
4.8 ความจำเพาะของแถบทดสอบ	81
4.9 การประเมินประสิทธิภาพแถบทดสอบในผลิตภัณฑ์อาหาร	84
4.9.1 การศึกษาเมทริกซ์ (Matrix effect) ในน้ำนม	84
4.9.2 ผลการหาความไวของแถบทดสอบในน้ำนม	85
4.8.3 การหาความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบในน้ำนม	88
4.8.4 การศึกษาเมทริกซ์ในน้ำผึ้ง	91
4.8.5 การหาความไวของแถบทดสอบในน้ำผึ้ง.....	92
4.8.6 การหาความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบในน้ำผึ้ง	95
บทที่ 5 วิจัยและสรุปผลการทดลอง	98
ภาคผนวก	101
บรรณานุกรม	111
ประวัติผู้เขียน	115

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1	ระดับยาปฏิชีวนะกลุ่มเทตระไซคลินสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร.....	8
ตารางที่ 2.2	คุณสมบัติและข้อจำกัดของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี	16
ตารางที่ 4. 1	การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับ CTC ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA	53
ตารางที่ 4. 2	ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 3 ครั้ง.....	54
ตารางที่ 4. 3	ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA.....	55
ตารางที่ 4. 4	ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง CTC-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	57
ตารางที่ 4. 5	การเปรียบเทียบค่า IC ₅₀ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ CTC-OVA เคลือบหลุมและความเข้มข้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 คู่.....	61
ตารางที่ 4. 6	ผลการทำปฏิกิริยาข้ามในกลุ่มและนอกกลุ่มเทตระไซคลินของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	62
ตารางที่ 4. 7	ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้จากการทำ icELISA ที่ใช้สำหรับเลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน.....	64
ตารางที่ 4. 8	ผลการวิเคราะห์ Intra assay และ Inter assay ในตัวอย่างน้ำนม	68
ตารางที่ 4. 9	ผลการวิเคราะห์ Intra assay และ Inter assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	71
ตารางที่ 4. 10	แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้นที่ CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	80
ตารางที่ 4. 11	แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้นที่ CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำนม	87
ตารางที่ 4. 12	ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay และ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำนม.....	90

ตารางที่ 4. 13 แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้น CTC ความเข้มข้น
0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำผึ้ง94

ตารางที่ 4. 14 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay และ intra-variation assay ในตัวอย่าง
น้ำผึ้ง97

ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน
ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA..... 102

ตารางที่ ก. 2 ปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA ด้วยวิธี BCA assay 103

ตารางที่ ก. 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย OVA มาตรฐาน
ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA..... 104

ตารางที่ ก. 4 ปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA ด้วยวิธี BCA assay 105



สารรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2. 1 โครงสร้างของสารกลุ่มเทอร์ไซคลิน.....	7
ภาพที่ 2. 2 โครงสร้างของแอนติบอดี ดัดแปลงมาจาก (15)	14
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 ไอโซไทป์.....	14
ภาพที่ 2. 4 (ก) การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและ (ข) โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	15
ภาพที่ 2. 4 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (18).....	18
ภาพที่ 2. 5 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดย de novo pathway และ salvage pathway.....	19
ภาพที่ 2. 6 หลักการ indirect ELISA (ก.) กรณีมีแอนติบอดี (ข.) กรณีไม่มีแอนติบอดี	20
ภาพที่ 2. 7 หลักการ indirect competitive ELISA (ก.) กรณีมี CTC อีสระ (ข.) กรณีไม่มี CTC อีสระ	21
ภาพที่ 2. 8 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ	23
ภาพที่ 2. 9 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ก.) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ข.) หลักการทำงานและการแปลผล	25
ภาพที่ 2. 10 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแซนวิช (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแซนวิช (ข) หลักการทำงานและการแปลผล	27
ภาพที่ 2. 11 แสดงวิธีการเชื่อมติดอนุภาคทองคำกับแอนติบอดี (ก) การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic attraction) (ข) การเชื่อมติดด้วยประจุ (ionic attraction) (ค) การเชื่อมติดด้วยแรงเดทีฟ (Dative binding) (24).....	30
ภาพที่ 4. 1 โครมาโตแกรมของ CTC 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), BSA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CTC-BSA 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—).....	51
ภาพที่ 4. 2 โครมาโตแกรมของ CTC 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), OVA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CTC-OVA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—).....	51
ภาพที่ 4. 3 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนูจำนวน 3 ตัวที่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทดสอบโดยวิธี indirect ELISA.....	52

ภาพที่ 4. 4 โครมาโตแกรมปริมาณโปรตีนแต่ละแฟรคชันจากการทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี	55
ภาพที่ 4. 5 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหลุม เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	59
ภาพที่ 4. 6 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหลุม เท่ากับ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	59
ภาพที่ 4. 7 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหลุม เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	60
ภาพที่ 4. 8 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหลุม เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	60
ภาพที่ 4. 9 กราฟมาตรฐาน CTC ในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T	65
ภาพที่ 4. 10 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางเมทริกซ์ในน้ำนมที่ระดับการเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ระดับการเจือจางที่ 5 , 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ	67
ภาพที่ 4. 11 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางเมทริกซ์ในน้ำผึ้งที่ระดับการเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ระดับการเจือจางที่ 5 , 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ	70
ภาพที่ 4. 12 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดฉลากกับ Colloidal gold	73
ภาพที่ 4. 13 โครมาโตแกรมของ Colloidal gold และ MAb-Colloidal gold	74
ภาพที่ 4. 14 (ก) แถบทดสอบที่ C line คือ GAM 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ CTC-BSA 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข) แถบทดสอบที่ C line คือ GAM 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ CTC-BSA 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ PB-T	76
ภาพที่ 4. 15 แสดงค่าความเข้มสีของแถบทดสอบ C line คือ GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ BSA-CTC ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m	77

ภาพที่ 4. 16	แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน บัฟเฟอร์ PB-T เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m	79
ภาพที่ 4. 17	กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m.....	80
ภาพที่ 4.18	แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ PB-T.....	82
ภาพที่ 4.19	แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะนอกกลุ่มเทตระไซคลิน ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ PB-T	83
ภาพที่ 4. 20	แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยน้ำนมที่ไม่เจือจางและระดับเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10....	84
ภาพที่ 4. 21 (ก)	แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายน้ำนม เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m.....	86
ภาพที่ 4. 22	กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในน้ำนมที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m	87
ภาพที่ 4. 23	การทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำนม	89
ภาพที่ 4. 24	แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยน้ำผึ้งที่ระดับเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10	91
ภาพที่ 4. 25 (ก)	แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายน้ำผึ้ง เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m.....	93
ภาพที่ 4. 26	กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายน้ำผึ้งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m.....	94
ภาพที่ 4. 27	การทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	96
ภาพที่ ก. 1	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA.....	102
ภาพที่ ก. 2	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA.....	104

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
%CR	percentage of cross-reactivity
%CV	percentage of coefficient of variation
%R	percentage of recovery
°C	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
A	absorbance
Ab	antibody
Ag	antigen
BCA assay	bicinchonic acid assay
BSA	bovine serum albumin
CTC	chlortetracycline
C	control line
C _H	Constance region of heavy chain
C _L	Constance region of light chain
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOX	doxycycline
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
g	gram
GAM	goat anti-mouse IgG
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% inhibition concentration

ICA	Immunochromatographic assay
icELISA	indirect competitive ELISA
iELISA	indirect ELISA
LC-MS/MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LOD	limit of detection
M	molar
MAB	monoclonal antibody
MC	Methacycline
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MRLs	maximum residue limits
nm	nanometer
OTC	oxycycline
OVA	ovalbumin
PAb	polyclonal antibody
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffer saline
PBST	phosphate buffer saline ที่มี 0.05% Tween 20
PB-T	phosphate buffer ที่มี 0.1% Tween 20
SD	standard deviation
T	test line
TC	tetracycline
TCs	tetracyclines
T-line	test line
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
v/v	Volume by volume
V _H	variable region of heavy chain
V _L	variable region of light chain
VLOD	Visual limit of detection
w/v	Weigh by volume

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาใส่ใจดูแลสุขภาพของตัวเองมากขึ้น จึงทำให้เกิดความต้องการอาหารที่มีคุณภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น และด้วยความต้องการอาหารที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากประชากรที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการต้องเพิ่มผลผลิตเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นจึงได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในขั้นตอนการเลี้ยงสัตว์เพื่อการรักษาโรค ป้องกันโรค และเร่งการเจริญเติบโต โดยการใช้ยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี หนึ่งในนั้นคือยาปฏิชีวนะคลอโรเตตระไซคลิน (chlortetracycline, CTC) (1) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตระไซคลิน (tetracyclines, TCs) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยกลไกการออกฤทธิ์จะไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย (2) อย่างไรก็ตาม หากมีการใช้และการควบคุมดูแลที่ไม่ได้มาตรฐาน จะทำให้เกิดการสะสมของยาปฏิชีวนะ ทำให้มีปัญหาสารตกค้างในอาหารซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหาร หากพบสารตกค้างแสดงว่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่ได้มาตรฐานความปลอดภัย รวมถึงการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะต้องหยุดชะงักและส่งผลโดยตรงต่อรายได้และความเชื่อมั่นในสินค้าของประเทศรวมถึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงทำให้มีการตระหนักถึงมาตรฐานและความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหาร ด้วยเหตุนี้หน่วยงานที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภคได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่สามารถตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) ของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตระไซคลินเท่ากับ 200-1200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (3) ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ การตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธี Confirmation method เช่น วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (4) และ Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) (5) โดยเทคนิคเหล่านี้จะให้ผลที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง จำเป็นต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญและใช้เวลานาน จึงไม่เหมาะแก่การคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีวิธี Screening method ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาสารตกค้างโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโน (Immunoassay) วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยอาศัยการเกิดสีจาก

เอนไซม์ เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงแต่ก็มีข้อจำกัดคือต้องใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากในการติดตามผล ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ เครื่องมือราคาแพง และไม่สามารถจะนำไปใช้ตรวจในภาคสนามได้ ปัจจุบันอีกเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับคือ Immunochromatographic assay (ICA) เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนเมมเบรน อาศัยการเกิดสีจากอนุภาคทองคำ เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้นหรือติดตามสารตกค้างยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากเป็นเทคนิคที่อ่านผลได้รวดเร็ว สามารถรายงานผลได้ในเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณ ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ และแถบทดสอบจะมีขนาดเล็กจึงสามารถนำไปตรวจในภาคสนามได้ (6) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะผลิตโมโนโคลนอลต่อ CTC มาพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดคลอโรเทระไซคลินที่ตกค้างในอาหาร โดยใช้เทคนิค ICA รูปแบบการไหลตามแนวราบ (Lateral flow immunochromatographic Assay; LFIA) แบบแข่งขัน เนื่องจาก CTC เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอโรเทระไซคลินและแถบทดสอบต้นแบบสำหรับตรวจหาคลอโรเทระไซคลินตกค้างในอาหาร

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. การเตรียมคลอโรเทระไซคลินที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
 - 3.1 ฉีดกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อคลอโรเทระไซคลิน
 - 3.2 หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอโรเทระไซคลิน
 - 3.3 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี ELISA
4. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
5. การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CTC ด้วยวิธี icELISA ในตัวอย่างอาหาร
6. การเตรียมแถบทดสอบต้นแบบ
7. การประเมินประสิทธิภาพแถบทดสอบในตัวอย่างอาหาร
8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานทางวิชาการและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอโรเทตระไซคลินและแถบทดสอบ
ต้นแบบสำหรับตรวจวัดคลอโรเทตระไซคลินตกค้างในอาหาร



บทที่ 2

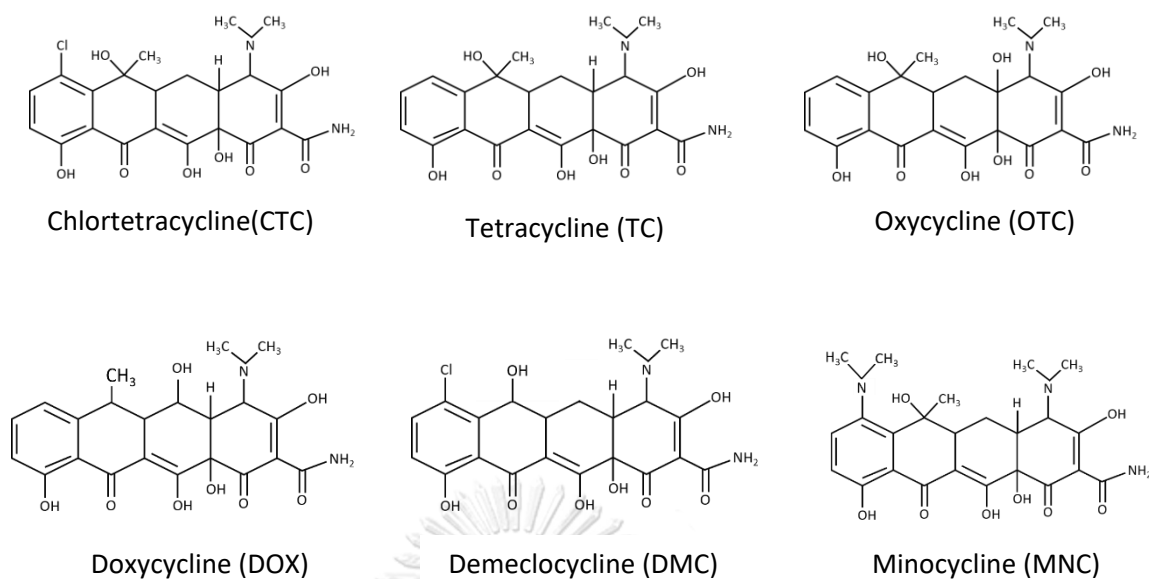
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ยาปฏิชีวนะคลออร์ทეტระไซคลิน (Chlortetracycline; CTC)

คลออร์ทეტระไซคลิน เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มтетระไซคลิน (Tetracyclines; TC) ตัวแรกที่ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2491 จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* ต่อมาในปี พ.ศ. 2493 ได้ค้นพบออกซีтетระไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) ต่อมาใน พ.ศ. 2495 ได้ผลิตยาแก๊งสังเคราะห์จากคลออร์ทეტระไซคลินในรูปแก๊งสังเคราะห์ คือ тетระไซคลิน (Tetracycline; TC) ต่อมา มีการสังเคราะห์ยาในกลุ่มนี้อีกหลายตัว เช่น ดอกซีไซคลิน (Doxycycline; DOX) และมิโนไซคลิน (Minocycline; MNC) ซึ่งยาในกลุ่มтетระไซคลินออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ เช่น *Brucella*, *Francisella*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Neisseria gonorrhoea* และ *Treponema pallidum* โดยออกฤทธิ์หยุดการเจริญเติบโต เข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยจับกับ 30S Ribosome ที่ตำแหน่ง A site ทำให้ aminoacyl-tRNA ไม่สามารถเข้าไปยังบริเวณ A site ได้ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรค และเร่งการเจริญเติบโต เพราะเป็นยาปฏิชีวนะที่มีราคาถูก การใช้งานไม่ยุ่งยาก และได้ผลดีในการรักษา

ยาปฏิชีวนะในกลุ่มтетระไซคลิน มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีรสขม มีโครงสร้างดังภาพที่ 2.1 สามารถละลายน้ำได้เล็กน้อยที่ pH เท่ากับ 7 นอกจากนี้ยาในกลุ่มтетระไซคลิน สามารถรวมตัวกับไอออนชนิดต่างๆ เช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้ไม่สามารถดูดซึมในกระเพาะอาหารและเข้าสู่ร่างกายได้ ดังนั้นการผลิตยาจึงต้องเตรียมให้อยู่ในรูปเกลือหรือในรูปที่ทำให้ยาไม่สามารถรวมตัวกับโลหะได้ (7)



ภาพที่ 2. 1 โครงสร้างของสารกลุ่มเทตระไซคลิน

2.1.2 ผลกระทบของสารตกค้างในกลุ่มเทตระไซคลิน

เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเทตระไซคลิน ในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรค และเร่งการเจริญเติบโต โดยการให้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้อง, ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือไม่หยุดใช้ยาในระยะเวลาที่กำหนด ส่งผลให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น นม ไข่ เนื้อ และอวัยวะภายในต่างๆ เป็นต้น เมื่อผู้บริโภคได้รับสารตกค้างซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคเช่น ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (allergic reactions), ตับผิดปกติ (liver damage), ฟันเหลือง (yellowing of teeth), ระบบทางเดินอาหารผิดปกติ (gastrointestinal disturbance) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยาในกลุ่มเทตระไซคลิน ยังสามารถส่งผ่านทางรกได้ ถ้าได้รับในขณะตั้งครรภ์และจะส่งผลต่อเด็กในครรภ์

2.1.3 มาตรฐานของสารตกค้างในกลุ่มเทตระไซคลิน

จากปัญหาสารตกค้างกลุ่มเทตระไซคลิน ในอาหารที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้หลายประเทศรวมถึงประเทศไทยตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงมีการกำหนดมาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยกำหนดระดับยาปฏิชีวนะกลุ่มเทตระไซคลินสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 1.1 ระดับยาปฏิชีวนะกลุ่มเทตระไซคลินสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร
(Maximum Residue Limits; MRLs)

ผลิตภัณฑ์	MRLs (µg/ml)					
	Codex	EU	US.FDA	Canada	Japan	Thailand
กล้ามเนื้อ	200	100	2,000	200	200	200
ตับ	600	300	6,000	600	600	600
ไต	1,200	600	12,000	1,200	1,000	1,200
ไข่	400	200	-	-	400	400
น้ำนม	100	100	300	100	100	100
น้ำผึ้ง	-	-	-	300*	300	-

รวมผลยาปฏิชีวนะกลุ่ม TCs (TC,CTC,OTC)

*ยาปฏิชีวนะ OTC

ที่มา (3) (8) (9) (10) (11)

2.2 การตรวจวิเคราะห์คลอโรเทอร์ระโซคลินตกค้างในอาหาร

2.2.1 วิธีทางเคมี

เนื่องจากปัญหาความปลอดภัยของคลอโรเทอร์ระโซคลินตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะปัญหาการื้อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจหาความปลอดภัยของคลอโรเทอร์ระโซคลินตกค้างในอาหาร ซึ่งมีวิธีในการตรวจคือ วิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC), เทคนิค Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง แต่ก็มีข้อเสียเช่นกัน คือ เครื่องมือมีราคาแพง, ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างค่อนข้างนาน ค่าใช้จ่ายสูง ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน และมีความจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากในภาคสนาม

2.2.2 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

เป็นวิธีที่นำความรู้ทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) มาใช้ในการตรวจสอบหาสารตกค้างในอาหาร โดยอาศัยหลักการความจำเพาะกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบหาสารตกค้างต่างๆในอาหาร ได้แก่ วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนพื้นผิวของแข็ง โดยอาศัยการเกิดสีจากเอนไซม์ เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม และวิธี Immunochromatographic assay (ICA) ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนแผ่นเมมเบรนโดยอาศัยการเกิดสีจากอนุภาคทองคำ เป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการใช้งาน ไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถนำไปใช้ตรวจที่ภาคสนามได้ โดยนิยมนำมาใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้น โดยรายงานผลการตรวจในเชิงคุณภาพ (Qualitative) และกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) (12) (13)

2.3 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.3.1 แอนติเจน

แอนติเจนคือ สารหรือสิ่งแปลกปลอมที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายโดยสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับสารแปลกปลอมหรือแอนติเจนนั้น ส่วนของแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เรียกว่า แอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ (antigenic determinant) หรือ อีพีโทป (epitope) โดยทั่วไปสารที่จะเป็นแอนติเจนต้องมีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป ถ้าสารยังมีโมเลกุลใหญ่จะยังมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาก จะถูก macrophage จับกินได้ดีขึ้น แต่ถ้าสารมีขนาดเล็กกว่า 10,000 ดาลตัน เรียกว่า เฮปแทน (hapten) โดยเฮปแทนมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่มีคุณสมบัติไม่ครบถ้วน มีความจำเพาะแต่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องนำไปเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะเพื่อให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (14)

คุณสมบัติทั่วไปของแอนติเจน

1. ความแปลกปลอม (Foreignness)

เป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งโดยปกติแล้วไม่มีอยู่ในร่างกาย หรืออาจมีอยู่ในร่างกายแต่ไม่เคยได้สัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2. ขนาดของโมเลกุล (size)

สารที่จะเป็นแอนติเจนได้ดี ต้องเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน ขึ้นไป ทั้งนี้เพราะสารยิ่งโมเลกุลใหญ่ ยิ่งมี antigenic determinant มาก สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตันไม่สามารถเป็นแอนติเจน หรือเป็นได้ไม่ดีจำเป็นต้องนำไปรวมกับโปรตีนพาหะ

3. ความซับซ้อนของสูตรโครงสร้าง (Chemical complexity)

สารที่ยิ่งมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนจะเป็นแอนติเจนที่ดีกว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างง่าย ๆ เช่น พวก polymer จะกระตุ้นได้ดีกว่าพวก monomer

4. ปริมาณและทิศทางการเข้าสู่ร่างกายของสาร (dose and route of administration)

ปริมาณอิมมูโนเจนมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หากใช้ในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปอาจทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันลดลง นอกจากนี้ทิศทางการนำอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายที่แตกต่างกันก็มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน

5. สารเสริมฤทธิ์ (Adjuvant)

เป็นสารที่เป็นไขมันโดยจะเข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจน โดยจะค่อยๆ ปล่อยแอนติเจนออกมาทีละน้อย ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานมากขึ้น เพื่อให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น สารเสริมฤทธิ์ ที่นิยม คือ Freund's adjuvant

สารเสริมฤทธิ์ Freund's adjuvant แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. complete Freund's adjuvant เป็นสารเสริมฤทธิ์ที่มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ตายแล้ว ทำให้เกิดการอักเสบรุนแรงบริเวณที่ฉีด ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีได้ดียิ่งขึ้น ส่วนใหญ่จะใช้ฉีดสัตว์ทดลองครั้งแรก (primary immunization)
2. Incomplete Freund's adjuvant เป็นสารเสริมฤทธิ์ที่ใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งต่อมา (booster)

2.3.2 แอนติบอดี

แอนติบอดี หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เป็นไกลโคโปรตีนที่ถูกผลิตจากบีเซลล์ (B-cell) ได้มากในม้าม ต่อม้ำน้ำเหลือง และ ไขกระดูก เมื่อร่างกายมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้ามา B cell จะได้รับการกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์กลายเป็น เซลล์พลาสมา มีหน้าที่สร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนโดยแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ถูกผลิตออกมาจะมีคุณสมบัติในการจดจำแอนติเจนที่จำเพาะโดยจะเข้าจับที่บริเวณ อีพิโทป (epitope) ของแอนติเจน โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดีจะเป็นรูปตัววาย (Y shape) ดังภาพ 2.2 ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 สายเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สายพอลิเปปไทด์ 4 สายประกอบด้วยสายยาว 2 สายเรียกว่า Heavy (H-chain) และสายสั้นอีก 2 สายเรียกว่า Light chain (L-chain)

ปลายด้านหนึ่งของสายพอลิเปปไทด์ ด้าน amino terminal ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโนสูงมาก เรียกว่าบริเวณแปรปรวน (variable region) ส่วนปลายของบริเวณแปรปรวนของสายพอลิเปปไทด์ ทั้ง H-chain และ L-chain เป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน antigen determinants หรือ อีพิโทป ของแอนติเจน (antigen binding site) เรียกว่า Fab ส่วนปลายสายพอลิเปปไทด์ ด้าน carboxyl terminal เป็นบริเวณที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน เรียกว่า constant region หรือ Fc ส่วนบริเวณข้อพับที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยึดหยุ่น ทำให้แขนทั้งสองข้างของแอนติบอดียืดห่างออกจากกันเพื่อช่วยในการจับแอนติเจนได้ดี

L-chain เป็นสายพอลิเปปไทด์เส้นสั้น ประกอบด้วยกรดอะมิโนมาเรียงกันโดยปลายด้านหนึ่งเป็น amino terminal และอีกปลายด้านเป็น carboxyl terminal แบ่งเป็น 2 type คือ kappa(**K**) chain และ lamda (**λ**) chain

H-chain เป็นสายพอลิเปปไทด์เส้นยาวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนมาเรียงกันโดยปลายด้านหนึ่งเป็น amino terminal และอีกปลายด้านเป็น carboxyl terminal โดยสามารถแบ่งไอโซไทป์แอนติบอดีได้ 5 คลาส ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE (ภาพที่ 2.3)

1. Immunoglobulin M (IgM)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินตัวแรกที่พบในกระแสเลือดเมื่อมีแอนติเจนเข้ามา สร้างเมื่อเกิด primary immune response มีขนาดใหญ่ประกอบด้วย 5 โมเลกุล

2. Immunoglobulin G (IgG)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มากที่สุดในกระแสเลือด สร้างเมื่อเกิด secondary immune response สามารถเคลื่อนผ่านรกจากแม่ไปสู่ลูกได้

3. Immunoglobulin A (IgA)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบมากในบริเวณสารคัดหลั่ง เช่น น้ำลาย, น้ำตา, น้ำมูก, น้ำเมือกในหลอดอาหาร, ลำไส้, กระเพาะปัสสาวะ และน้ำนมเหลือง เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัสในบริเวณเยื่อเมือก

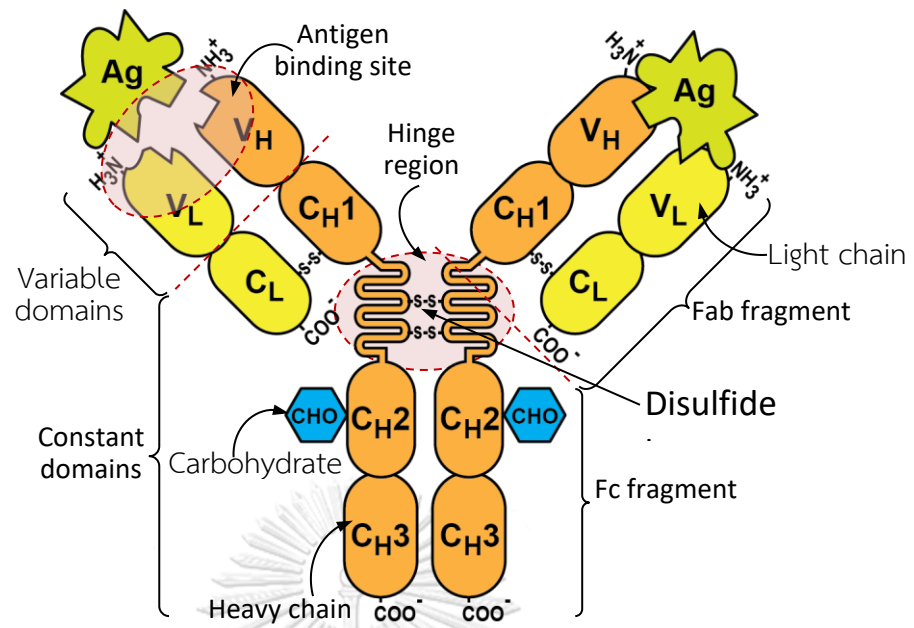
4. Immunoglobulin D (IgD)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบบนผิวของ B-cell คาดว่าเป็นตัวรับรู้เบื้องต้น (primary receptor) กับแอนติเจนบนผิว B-cell และกระตุ้นใน B-cell เปลี่ยนเป็นเซลล์พลาสมาหรือเซลล์ผลิตแอนติบอดี และ memory cell

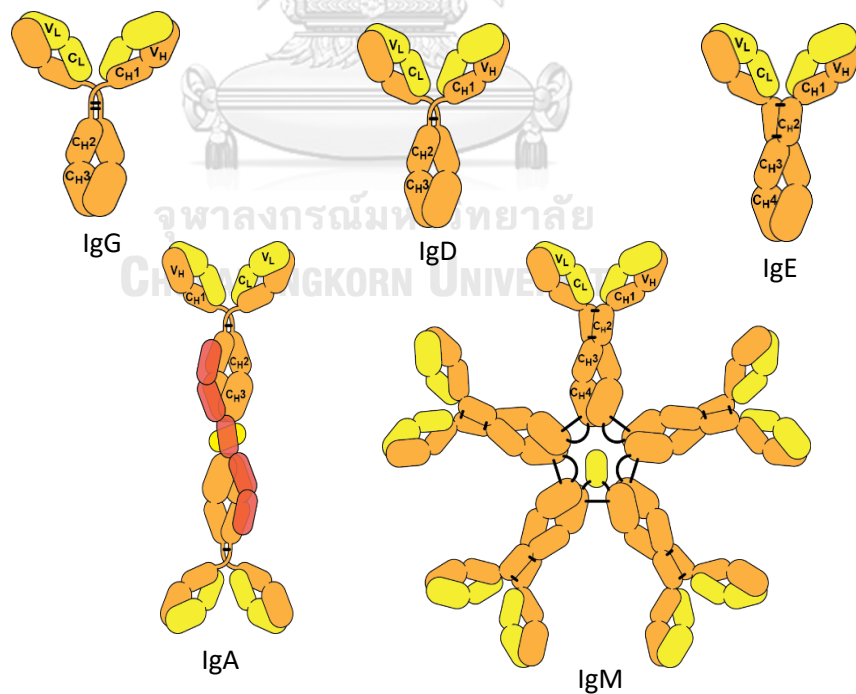
5. Immunoglobulin E (IgE)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดใหญ่กว่า IgG เล็กน้อย มีปริมาณน้อยที่สุดในเลือด มักจับอยู่บนผิวมาสต์เซลล์ (mast cell) หรือ เซลล์เบโซฟิล (basophils cell) เมื่อ IgE บนผิวเซลล์จับกับแอนติเจน จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้



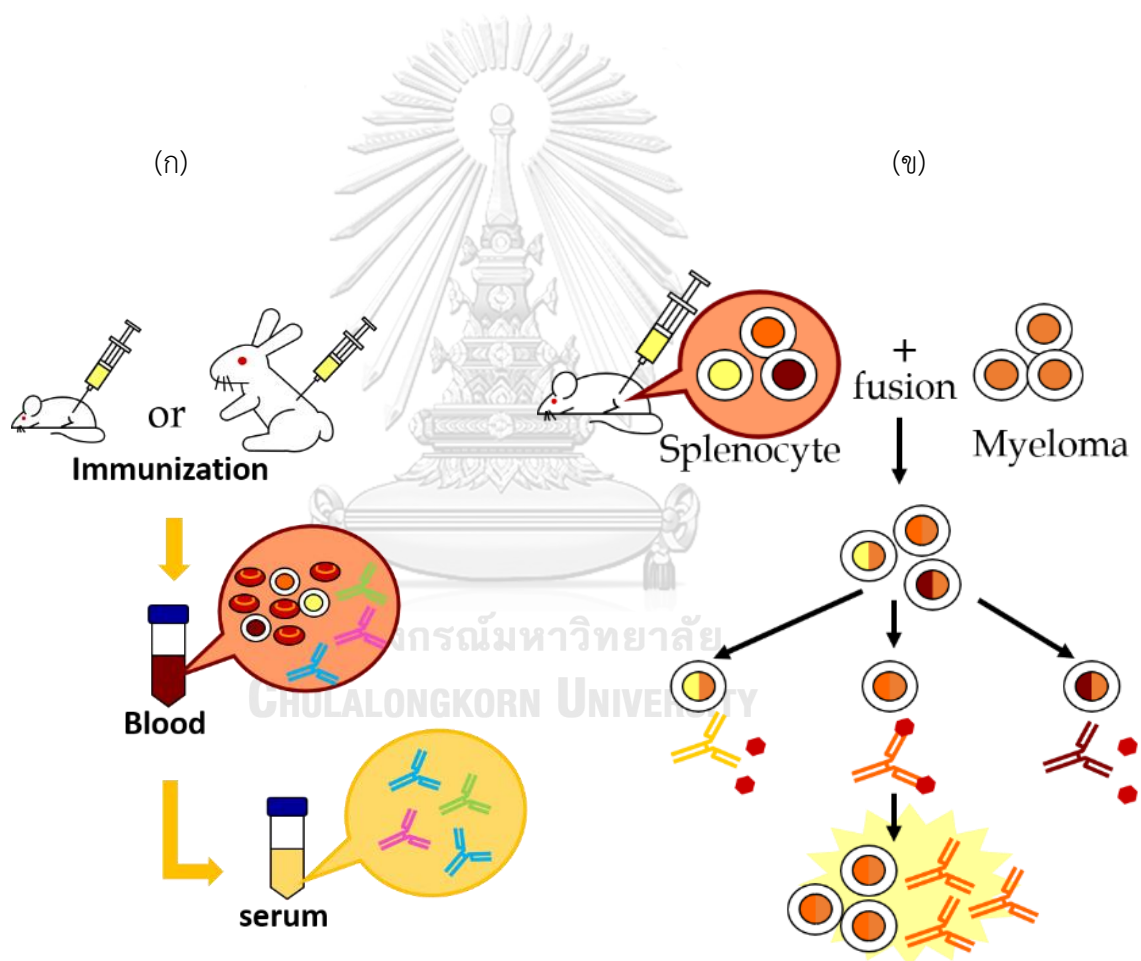


ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของแอนติบอดี ดัดแปลงมาจาก (15)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 ไอโซไทป์ (15)

แอนติบอดี แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) โพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีหลายชนิดที่มาจากซีรัม มีความหลากหลายในการจับอีพิโทปได้หลายอีพิโทปบนแอนติเจนเดียวกัน เนื่องจากมีส่วนของบริเวณแปรปรวนที่แตกต่างกัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจาก B-cell ที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน มีความจำเพาะกับอีพิโทปเดียวบนแอนติเจนและคุณสมบัติเหมือนกัน ซึ่งขั้นตอนการผลิตแอนติบอดีทั้ง 2 ประเภท ดังภาพที่ 2.4 และความแตกต่างของแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด ดังตารางที่ 2.2



ภาพที่ 2. 4 (ก) การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและ (ข) โมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติและข้อจำกัดของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

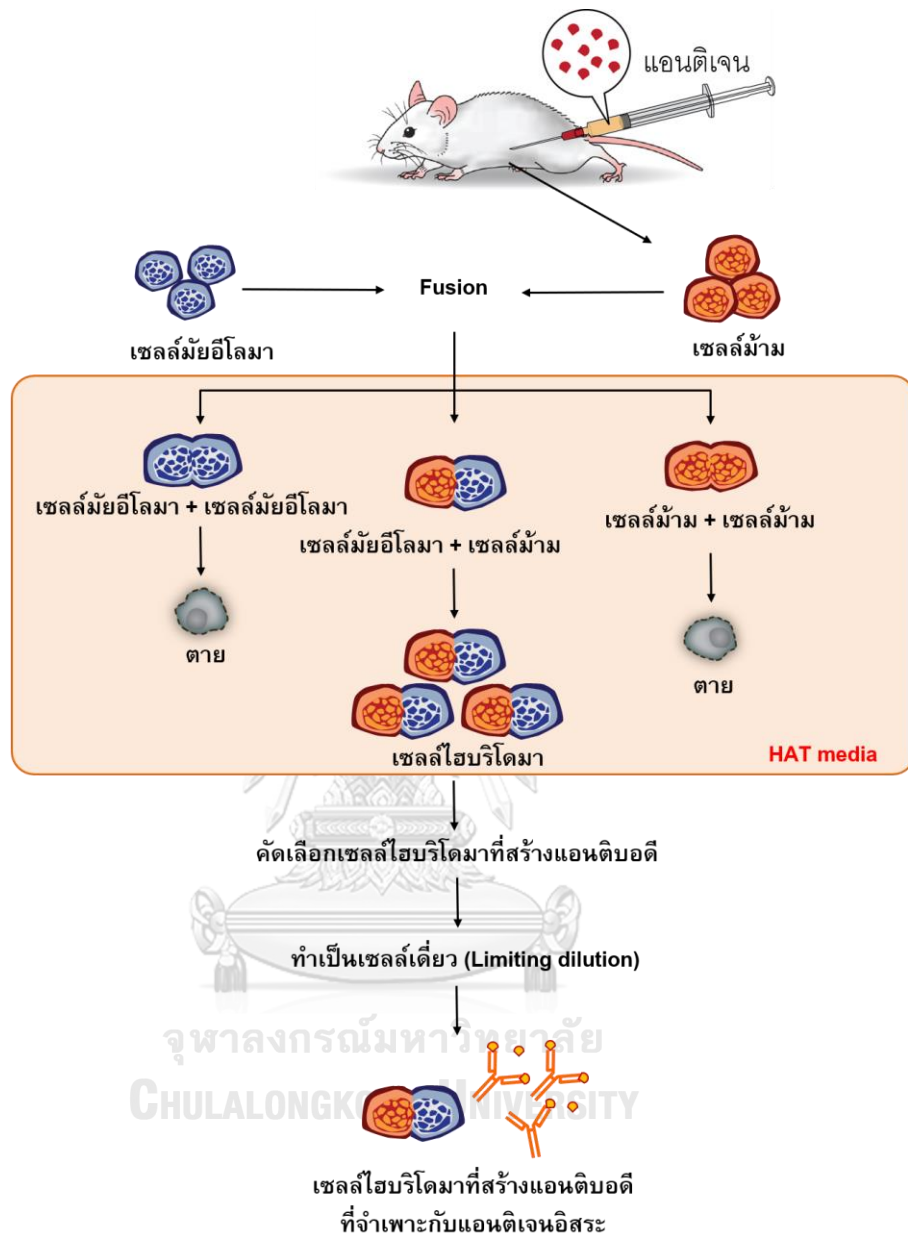
คุณสมบัติ	โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำ	ความจำเพาะสูง
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้เพียงอิพิโทปเดียวต่อแอนติเจน
ความแปรปรวน	ความแปรปรวนสูงเนื่องจากการผลิตแต่ละครั้งคุณสมบัติแอนติบอดีไม่เหมือนกัน	ความแปรปรวนต่ำเนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมา มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน
ขั้นตอนการผลิต	ไม่ยุ่งยาก	มีความยุ่งยาก
เวลาในการผลิต	ระยะเวลาสั้น ประมาณ 6 สัปดาห์	ระยะเวลายาว อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต้นทุนต่ำ	ต้นทุนสูง
กระบวนการผลิต	ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการผลิต	จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการผลิต

ที่มา (16)

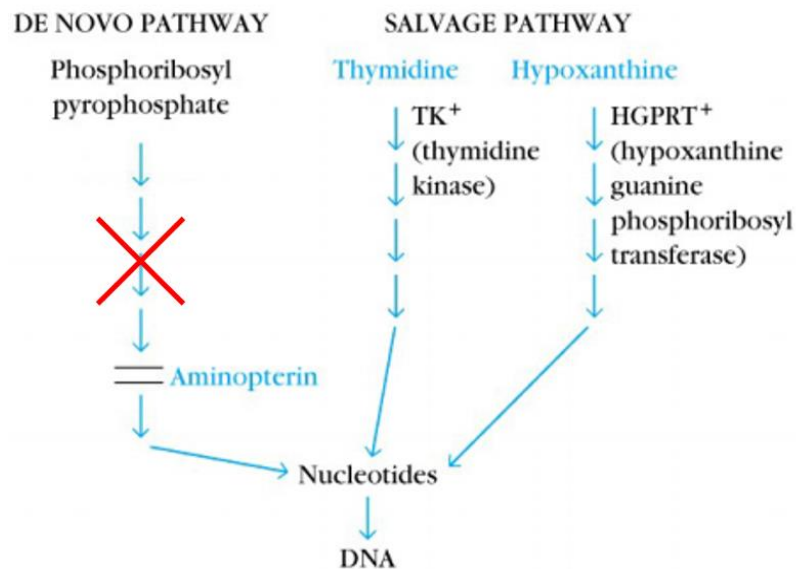
2.3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เทคนิคการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาโดยการเชื่อมเซลล์ที่เราสนใจกับเซลล์มะเร็ง โดย hybridoma technique ถูกคิดค้นในปี ค.ศ. 1975 โดย Kohler และ Milstein ปกติการเลี้ยงบีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนภายนอกร่างกายเป็นไปได้ยาก เนื่องจากบีเซลล์มีการแบ่งตัวที่จำกัดและตายตามอายุขัย ดังนั้นจึงต้องมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตามขั้นตอนการผลิต ภาพที่ 2.5 โดยนำม้ามที่มีเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี มาทำการหลอมรวม (fusion) กับเซลล์มัยอีโลมา (myeloma) ได้เซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติ สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัดในหลอดทดลองและสามารถสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้ โดย polyethylene glycol (PEG) จะทำให้ phospholipid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบชั่วคราวและกลับสู่สภาวะปกติ ทำให้เซลล์ถูกเชื่อมกันทั้งผนังเซลล์และนิวเคลียส เมื่อเกิดการแบ่งตัว นิวเคลียสจึงรวมกันเกิดเป็นเซลล์ลูกผสมหรือ เซลล์ไฮบริโดมา ในการหลอมรวมเซลล์แต่ละครั้งจะมีบีเซลล์ที่เชื่อมกันเอง, เซลล์มัยอีโลมาที่เชื่อมกันเอง, บีเซลล์ที่เชื่อมกับเซลล์มัยอีโลมา และ

เซลล์ที่ไม่ได้เชื่อมกับเซลล์อื่น ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (ปีเซลล์กับเซลล์มัยอีโลมา) โดยใช้ selective medium ซึ่งมีสาร aminopterin, hypoxanthin และ thymidine โดยปกติเซลล์จะมี 2 วิธีทางในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์เพื่อสร้าง DNA คือ de novo pathway โดยจะสร้างนิวคลีโอไทด์ ใหม่โดยใช้กรดอะมิโนและ salvage pathway ซึ่งสร้างนิวคลีโอไทด์ใหม่ จากการย่อยของนิวคลีโอไทด์เก่า แต่ใน media มี aminopterin ซึ่งจะยับยั้ง coenzyme ที่ใช้สังเคราะห์ DNA ทาง de novo pathway ดังนั้นเซลล์จึงต้องสร้าง DNA ในทาง salvage pathway แทน จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ Thymidine kinase (TK) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่งเซลล์จะไม่สามารถสร้าง DNA และตายในที่สุด ดังนั้นเซลล์มะเร็งที่หลอมรวมกันเองไม่มีเอนไซม์ HGPRT ทำให้เซลล์ตาย ส่วนปีเซลล์ที่หลอมรวมกันเองจะสามารถเติบโตใน HAT medium ได้ในระยะเวลาหนึ่งจะตายไป จะมีแต่ปีเซลล์และเซลล์มะเร็งเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ใน HAT medium (ภาพที่ 2.6) จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการได้ โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) แล้วทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution เพื่อให้มั่นใจว่ามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน (17)



ภาพที่ 2. 5 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (18)



ภาพที่ 2. 6 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดย de novo pathway และ salvage pathway

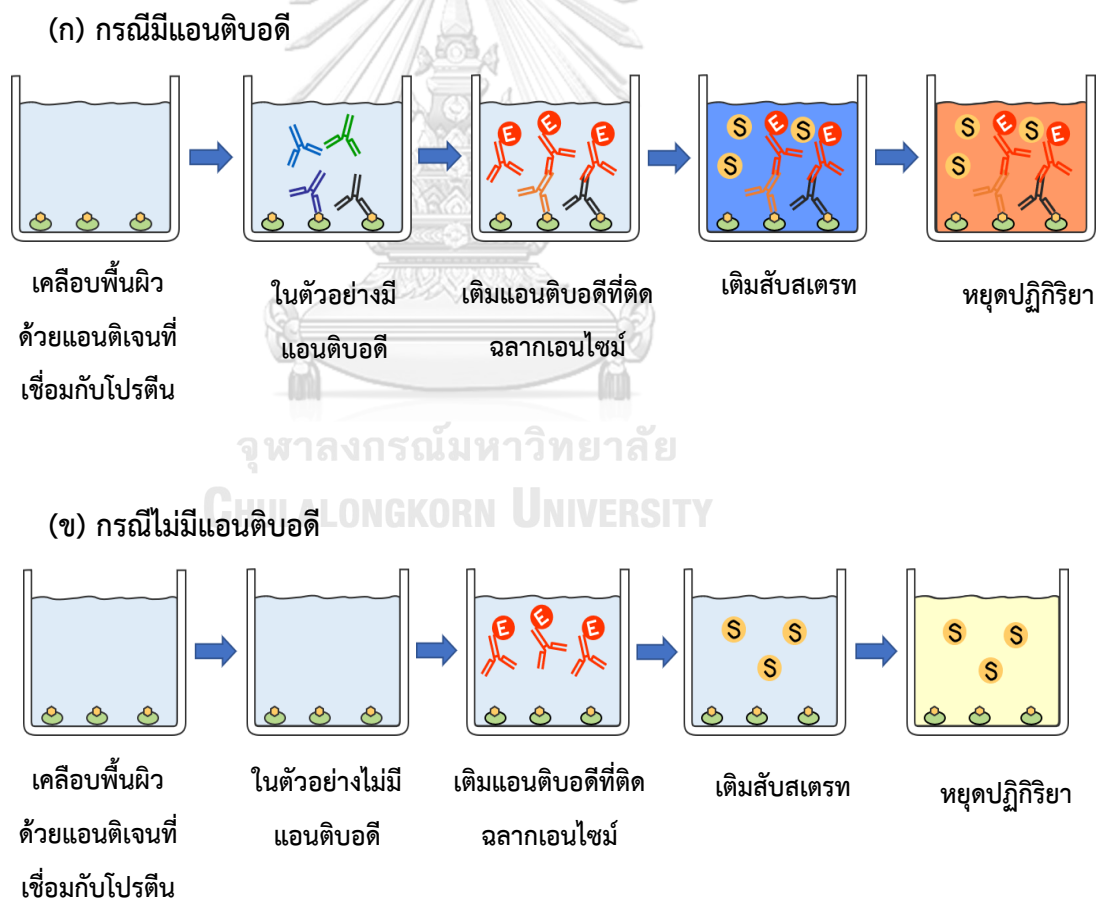
2.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนตแอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์มาเชื่อมติดฉลากกับแอนติบอดี เมื่อเติมสับสเตรต เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ทำการวัดความเข้มของสีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะสูง (19)

เทคนิค ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

2.4.1 indirect ELISA

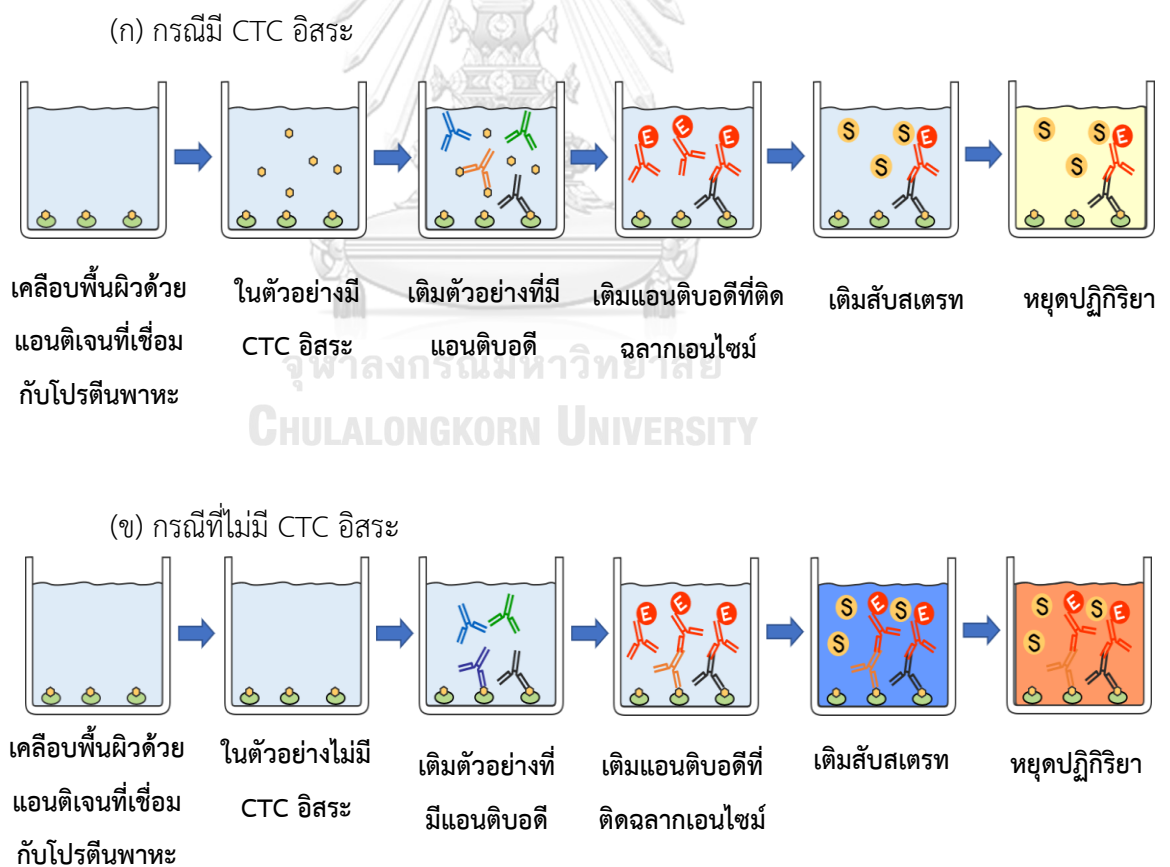
วิธีนี้ใช้ในกรณีทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ จากนั้นเติมซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ ในกรณีที่ในซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์มีแอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนที่เคลือบที่ก้นหลุม จากนั้นใส่แอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เติมสับสเตรทของเอนไซม์และหยุดปฏิกิริยา จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง การแปลผลถ้าในซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์มีแอนติบอดี สีของสารละลายจะมีสีเข้มตามปริมาณแอนติบอดีที่มากขึ้น (ภาพที่ 2.7ก) แต่ถ้าในกรณีที่ในซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีแอนติบอดีสารละลายจะไม่มีสีเกิดขึ้น (ภาพที่ 2.7ข) ดังนั้นความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณของแอนติบอดี



ภาพที่ 2. 7 หลักการ indirect ELISA (ก.) กรณีมีแอนติบอดี (ข.) กรณีไม่มีแอนติบอดี

2.4.2 indirect competitive ELISA

วิธีนี้เป็นรูปแบบของการแย่งจับกันแอนติบอดีกับแอนติเจนอิสระในสารละลายและแอนติเจนที่เคลือบที่ก้นหลุม โดยทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ กรณีที่ในสารละลายตัวอย่างลงไป เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์หรือแอนติบอดี จากนั้นใส่แอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เติมสับสเตรทของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในกรณีที่ในสารละลายตัวอย่างมีแอนติเจนอิสระ จะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เคลือบที่ก้นหลุมและแอนติเจนอิสระ สีของสารละลายจะไม่มีสี (2.8 ก.) แต่ในกรณีที่สารละลายตัวอย่างไม่มีแอนติเจนอิสระ (2.8 ข.) สีของสารละลายจะมีสีเข้มขึ้น ดังนั้นความเข้มของสีจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจน



ภาพที่ 2. 8 หลักการ indirect competitive ELISA (ก.) กรณีมี CTC อิสระ (ข.) กรณีไม่มี CTC อิสระ

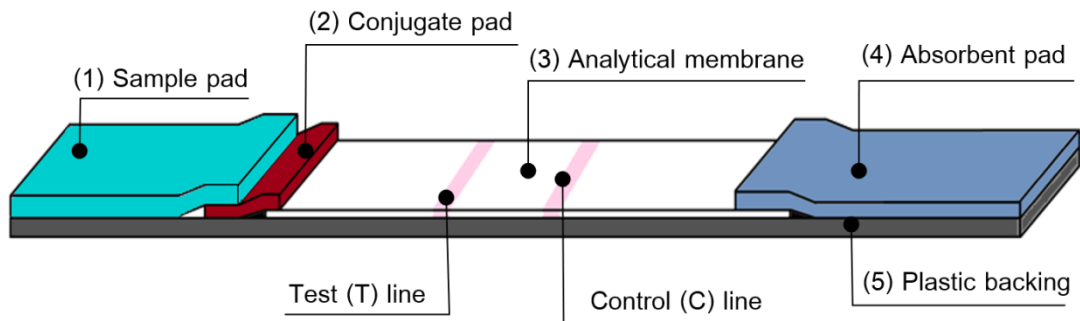
2.5 หลักการแถบทดสอบรูปแบบการไหลตามแนวราบ (Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA)

แถบทดสอบรูปแบบการไหลตามแนวราบเป็นการนำเทคนิคโครมาโตกราฟีมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยหลักการความจำเพาะกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนแผ่นเมมเบรน โดยใช้อนุภาคทองคำติดฉลากกับแอนติบอดีเพื่อให้เกิดสี สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า วิธีนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารต่างๆ เช่น การตรวจตั้งครรภ์ การตรวจวินิจฉัยโรค และการตรวจติดตามสารปนเปื้อนในอาหาร เป็นต้น (6) (20)

2.5.1 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ

แถบทดสอบจะมีส่วนประกอบหลักๆทั้งหมด 5 ส่วน (ภาพที่ 2.8) ได้แก่

1. Sample pad ทำหน้าที่ รองรับและกรองสารตัวอย่าง
2. Conjugate pad ทำหน้าที่ เป็นส่วนที่ตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากและจำเพาะกับสารที่ต้องการทดสอบ
3. Analytical membrane ทำหน้าที่เป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน จะประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ เส้นทดสอบ (Test line; T line) เป็นบริเวณที่มีการตรึงแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ และเส้นควบคุม (Control line; C line) เป็นบริเวณที่มีการตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีติดฉลากอนุภาคทองคำ
4. Absorbent pad ทำหน้าที่ ดูดซับสารส่วนเกินที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยา และป้องกันการย้อนกลับของสารตัวอย่างไปยัง Analytical membrane
5. Plastic backing card ทำหน้าที่ ยึดส่วนประกอบทั้งหมดของแถบทดสอบ



ภาพที่ 2. 9 ส่วนประกอบของแถบทดสอบ

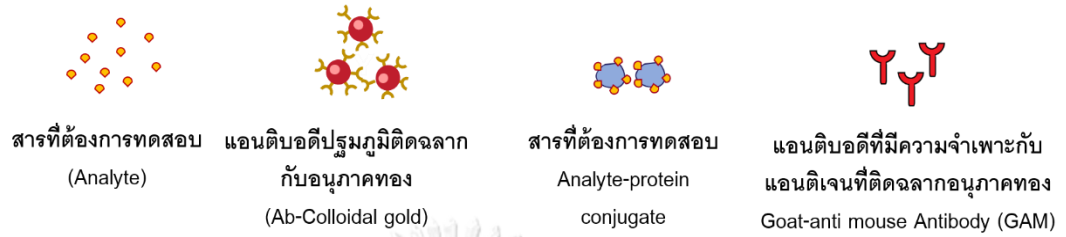
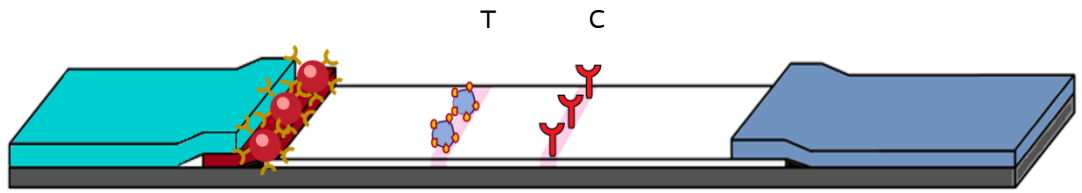
2.5.2 รูปแบบของแถบทดสอบ

รูปแบบของแถบทดสอบแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือรูปแบบแข่งขัน (competitive assay format) และรูปแบบแซนวิช (sandwich assay format)

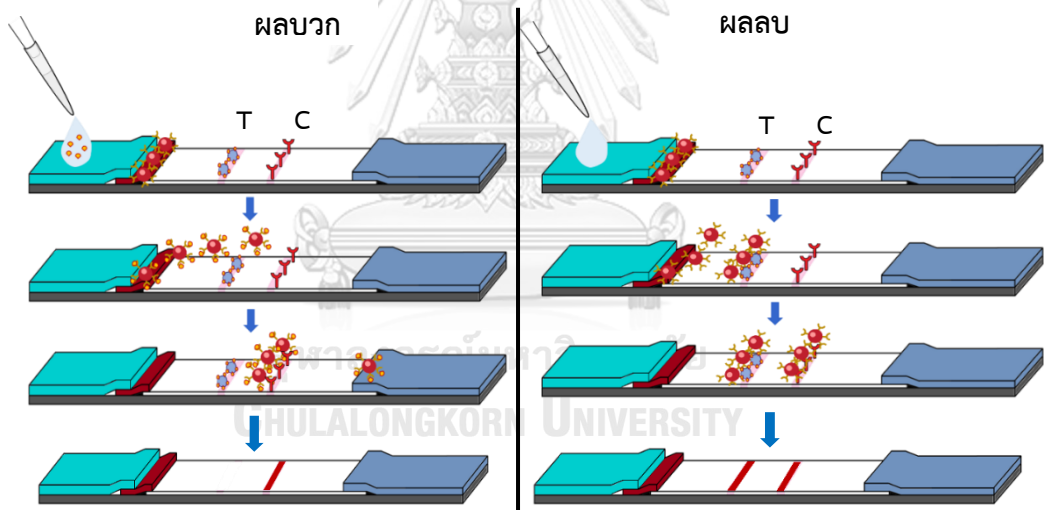
2.5.2.1 รูปแบบแข่งขัน (competitive assay format)

แถบทดสอบรูปแบบการแข่งขันเหมาะสำหรับการตรวจหาสารที่ต้องการทดสอบ ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก มีส่วนประกอบดังภาพที่ 2.10 ก หลักการของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน คือ เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างลงบน sample pad สารจะเคลื่อนที่ไปยัง conjugate pad ที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทองคำ และจำเพาะกับสารที่ต้องการทดสอบ ในกรณีผลบวก (positive) หรือในสารละลายตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำที่บริเวณนี้ จากนั้นเมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปบน analytical membrane ไปยังเส้น T line แอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทองคำจะไม่จับกับแอนติเจนที่ตรึงบริเวณ T line เนื่องจากมีการแข่งขันกันระหว่างแอนติเจนในสารละลายตัวอย่างและแอนติเจนที่ถูกตรึงที่บริเวณ T line และเมื่อเคลื่อนที่ผ่านบริเวณ C line จะถูกจับโดยแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำ ดังนั้นจึงเห็นแถบทดสอบเกิดแถบสีที่บริเวณ C line แถบเดียว แต่ในกรณีผลลบ (negative) หรือในสารละลายตัวอย่างไม่มีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ เมื่อสารจะเคลื่อนที่ไปยัง conjugate pad แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำจะเคลื่อนที่มายังบริเวณ T line และจับกับแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนบริเวณนี้ จากนั้นแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำที่เหลือจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ C line และถูกแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำที่บริเวณนี้ ดังนั้นจึงเห็นแถบทดสอบเกิดแถบสี 2 แถบที่บริเวณ T line และ C line (ภาพ 2.10 ข) (21)

(ก.)



(ข.)



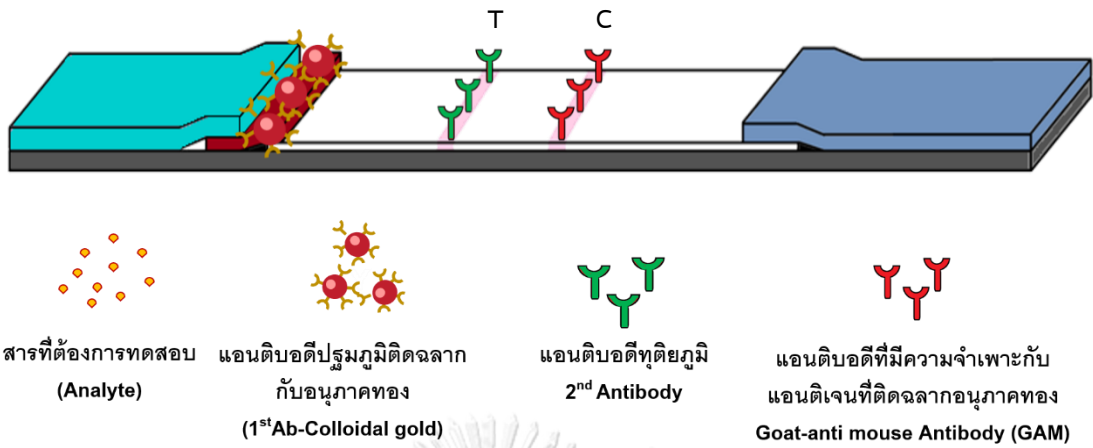
ภาพที่ 2. 10 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน (ก.) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน

(ข.) หลักการทำงานและการแปลผล

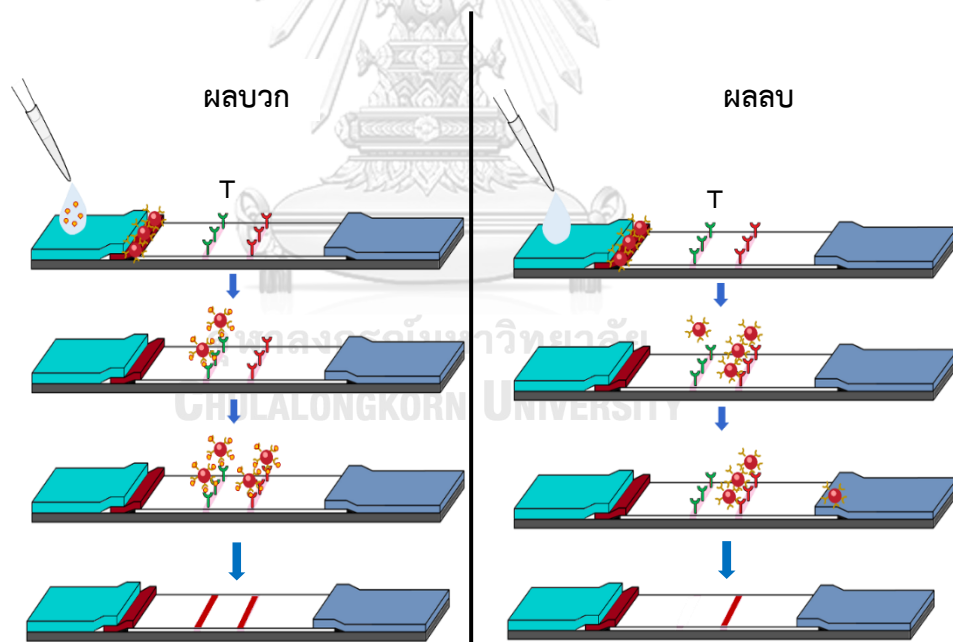
2.5.2.2 รูปแบบแซนวิช (sandwich assay format)

แถบทดสอบรูปแบบแซนวิชเหมาะสำหรับการตรวจหาสารที่ต้องการทดสอบที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีส่วนประกอบดังภาพที่ 2.11 ก. หลักการของแถบทดสอบรูปแบบแซนวิชคือ เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างลงบน sample pad สารจะเคลื่อนที่ไปยัง conjugate pad ที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทองคำ และจำเพาะกับสารที่ต้องการทดสอบ ในกรณีผลบวกหรือในสารละลายตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่ติดฉลากอนุภาคทองคำ (1stAb-Colloidal gold) และเคลื่อนที่ไปยัง analytical membrane สารที่ติดอยู่กับ 1stAb-Colloidal gold จะถูกแอนติบอดีทุติยภูมิ (2nd antibody) ที่ตรึงอยู่บน T line จับกับอีพิโทปที่เหลือบนแอนติเจน ส่งบนให้บริเวณ T line ปรากฏสีขึ้นมา และ 1stAb-Colloidal gold ที่เหลือ จะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ C line และถูกจับด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะกับ 1stAb-Colloidal gold ดังนั้นจึงเห็นแถบทดสอบเกิดแถบสี 2 แถบที่บริเวณ T line และ C line แต่ในกรณีผลลบหรือในสารละลายตัวอย่างไม่มีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ เมื่อสารจะเคลื่อนที่ไปยัง conjugate pad แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองคำ (1stAb-Colloidal gold) จะเคลื่อนที่มายังบริเวณ T line จะไม่สามารถจับกับ 2nd antibody ที่บริเวณนี้ได้ จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ C line จะถูกจับด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีติดฉลากอนุภาคทองคำที่บริเวณนี้ ดังนั้นจึงเห็นแถบทดสอบเกิดแถบสี 1 แถบที่บริเวณ C line (ภาพที่ 2.11 ข.)

(ก.)



(ข.)



ภาพที่ 2. 11 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแซนวิช (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบรูปแบบแซนวิช (ข) หลักการทำงานและการแปลผล

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อแถบทดสอบ

1. ชนิดของวัสดุเมมเบรน

การเลือกวัสดุเมมเบรนที่ใช้สำหรับแถบทดสอบมีผลต่ออัตราการไหลของตัวอย่าง ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความหนาของวัสดุ, ลักษณะของพื้นผิว และรูพรุนของวัสดุ ส่วนทดสอบที่ใช้สำหรับแถบทดสอบประกอบด้วย 4 ส่วนหลักได้แก่ sample pad, conjugated pad, analytical pad และ absorbent pad

1.1 sample pad

วัสดุที่นำมาทำ sample pad ควรมีคุณสมบัติการซึมผ่านของตัวอย่างได้สม่ำเสมอ ไม่จับกับสารที่ต้องการทดสอบ วัสดุที่นิยมนำมาใช้คือ คอตตอน (cotton) และแผ่นใยแก้ว (glass fiber) โดยควรพิจารณาจากปริมาตรและประเภทของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

1.2 conjugate pad

วัสดุที่นำมาทำ conjugate pad ควรมีคุณสมบัติซึมผ่านของตัวอย่างได้สม่ำเสมอ ไม่จับกับสารที่นำมาตรึงและสารที่ต้องการทดสอบที่เคลื่อนที่มาจาก sample pad วัสดุที่นิยมนำมาใช้คือแผ่นใยแก้ว

1.3 analytical membrane

analytical membrane ถือเป็นส่วนสำคัญของแถบทดสอบเนื่องจาก เป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของแถบทดสอบ วัสดุที่นำมาใช้ต้องง่ายต่อการตรึงโปรตีนบนเมมเบรนและมีรูพรุนของ analytical membrane ที่เหมาะสม โดยรูพรุนจะส่งผลต่ออัตราการไหลของตัวอย่างผ่าน analytical membrane หากตัวอย่างไหลผ่าน analytical membrane ได้เร็วเกินไป อาจจะทำให้แอนติบอดีกับแอนติเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยากันได้ โดยปกตินิยมใช้ในโพรเซสโลสเมมเบรน ที่มีขนาดรูพรุน 0.05-12 ไมครอน

1.4 absorbent pad

วัสดุที่นำมาทำ absorbent pad ควรมีคุณสมบัติในการดูดซับที่ดี เนื่องจากเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ดูดซับการตัวอย่างที่เหลือจากปฏิกิริยาบน analytical membrane วัสดุที่นิยมใช้คือ คอตตอน

2. แอนติบอดี

การเลือกใช้แอนติบอดีสำหรับพัฒนาแถบทดสอบเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากแถบทดสอบอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน โดยชนิดของแอนติบอดีที่นำมาใช้ในแถบทดสอบมี 2 ชนิด คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากส่งผลต่อความไวและความจำเพาะต่อแอนติเจนของแถบทดสอบ นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีก็มีความสำคัญ เนื่องจากถ้านำแอนติบอดีที่ไม่บริสุทธิ์มาใช้ จะทำให้แอนติบอดีไม่จับกับแอนติเจนหรือจับได้ไม่ดี (22)

3. อนุภาคทองคำ

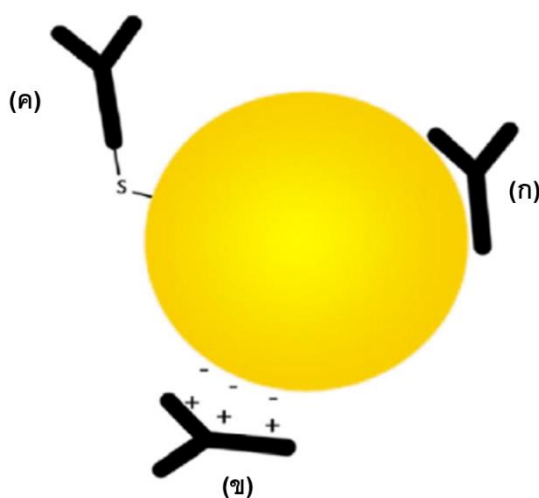
อนุภาคทองคำ คือ โลหะทองที่มีขนาดนาโนที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยารีดิวชันของไอออนทองคำให้เป็นโลหะทองและใช้สารช่วยกระจายตัวเพื่อไม่ให้อนุภาครวมกันเป็นก้อนใหญ่โดยอนุภาคทองคำมีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัดชีวภาพ (biosensors) และใช้ในการตรวจวัดระดับโมเลกุลได้ (molecular sensors) โดยการใช้แถบทดสอบในการตรวจวัดสารตกค้าง นิยมใช้อนุภาคทองคำเป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพเพื่อใช้ตรวจติดตาม โดยนำแอนติบอดีมาเชื่อมติดกับพื้นผิวของอนุภาคทองคำ (23)

วิธีการเชื่อมติดแอนติบอดีกับพื้นผิวของอนุภาคทองคำหรือโมเลกุลอื่น ทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี

วิธีทางกายภาพมี 3 รูปแบบ (ภาพที่ 2.12) คือ

1. การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic attraction) อาศัยแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างแอนติเจนกับพื้นผิวอนุภาคทองคำ
2. การเชื่อมติดด้วยประจุ (Ionic attraction) โดยอาศัยระหว่างแรงประจุลบของอนุภาคทองคำกับประจุบวกของแอนติบอดี
3. การเชื่อมติดด้วยแรงเดทึฟ (Dative binding) หรือพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ โดยอาศัยแรงของอิเล็กตรอนระหว่างอนุภาคทองคำกับแอนติบอดีที่มีโมเลกุลของซัลเฟอร์

ส่วนวิธีทางเคมีมีหลายวิธีเช่น การใช้เทคนิคการดูดซับทางเคมี (Chemisorption) และการใช้ adapter molecules หรือการใช้ตัวเชื่อมต่อ bifunctional เป็นต้น (24)



ภาพที่ 2. 12 แสดงวิธีการเชื่อมติดอนุภาคทองกับแอนติบอดี (ก) การเชื่อมติดด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic attraction) (ข) การเชื่อมติดด้วยประจุ (ionic attraction) (ค) การเชื่อมติดด้วยแรงเคทีฟ (Dative binding) (24)

2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zhao และคณะ (2008) ได้ตรวจหาคลอร์เททระไซคลินตกค้างในเนื้อสัตว์โดยใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอร์เททระไซคลิน ที่ผลิตจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่าย โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความไว IC_{50} เท่ากับ 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถวัดคลอร์เททระไซคลินในบัพเฟอร์ได้อยู่ในช่วง 0.1-312.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาตรวจหาคลอร์เททระไซคลิน ในอาหารโดยวิธี ELISA พบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบคือ 1.18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นได้เปรียบเทียบกับวิธี HPLC พบว่าวิธี ELISA มีความไว ความจำเพาะและมีความน่าเชื่อถือในการตรวจวัดคลอร์เททระไซคลินตกค้างในอาหารเบื้องต้น (25)

Le และคณะ (2011) ได้ตรวจหาคลอร์เททระไซคลินตกค้างในเนื้อสัตว์โดยผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอร์เททระไซคลินที่ได้จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความไว IC_{50} เท่ากับ 0.66 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาตรวจวัดคลอร์เททระไซคลินในเนื้อไก่โดยวิธี ELISA ได้ต่ำสุด 0.06 นาโนกรัมต่อกรัม, %recovery เท่ากับ 7.8-92.2 และ %CV เท่ากับ 3.2-9.5 และในตับไก่ตรวจวัดขั้นต่ำได้ 0.07 นาโนกรัมต่อกรัม, %recovery เท่ากับ 80.3-9.2

และ %CV เท่ากับ 6.5-10.2 และวิธีแถบทดสอบ ตรวจวัดขั้นต่ำได้ 0.12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจวัดคลอร์เททระไซคลินในเนื้อไก่และตับไก่ ได้ต่ำสุด 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %recovery ในเนื้อไก่ เท่ากับ 79.0-88.6 ในตับเท่ากับ 75.2-87.0 โดยใช้เวลาประเมินผลภายใน 10 นาที และเมื่อตรวจสอบคลอร์เททระไซคลินตกค้างในตัวอย่างด้วยวิธี HPLC เมื่อเปรียบเทียบกับ ทั้ง 3 วิธี พบว่าทั้ง 3 วิธีให้แนวโน้มไปทิศทางเดียวกัน (26)

Taranova และคณะ (2015) ได้พัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจหาเททระไซคลินตกค้างใน น้ำนมโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเททระไซคลินโดยใช้แถบทดสอบในรูปแบบแข่งขัน ซึ่งสามารถ ตรวจวัดเททระไซคลินได้ในช่วง 60 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 90-112% (27)

Chen และคณะ (2016) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเททระไซคลินและพัฒนา วิธี ELISA และแถบทดสอบในการตรวจวัดเททระไซคลิน ออกซีเททระไซคลิน และ คลอร์เททระไซคลินตกค้างในนมและน้ำผึ้ง โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเททระไซคลินมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.72 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเททระไซคลิน ได้แก่ ออกซีเททระไซคลิน (21.9%), คลอร์เททระไซคลิน (10.9%), ดอกซีไซคลิน (7%) เดเมโคลไซคลิน (22.6%) และ เมตาไซคลิน (4%) โดยวิธี ELISA สามารถตรวจวัดเททระไซคลิน ได้ในช่วง 0.26–2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร %recovery ของ เททระไซคลิน ออกซีเททระไซคลิน และ คลอร์เททระไซคลิน ในนมเท่ากับ 82–102, 91–105, และ 90–101 ตามลำดับและในน้ำผึ้งเท่ากับ 88–101, 89–101, และ 89–95 ตามลำดับ วิธี ICA ค่า cutoff values ของ เททระไซคลิน ออกซีเททระไซคลิน และคลอร์เททระไซคลินในนมเท่ากับ 15, 15, และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และในน้ำผึ้ง เท่ากับ 40, 40, และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้จากวิธี ELISA และ ICA สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดเททระไซคลิน ออกซีเททระไซคลิน และคลอร์เททระไซคลินในนมผึ้ง เนื่องจากมีความไวและรวดเร็วในการตรวจวัด (28)

Naik และคณะ (2018) ได้พัฒนาแถบทดสอบในการตรวจวัดออกซีเททระไซคลินตกค้างใน น้ำนม โดยใช้แถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ ออกซีเททระไซคลินที่ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นโดยวิธี ทดสอบโดยการ spiked ออกซีเททระไซคลินลงในตัวอย่างน้ำนม อ่านผลภายใน 5 นาทีจากผลการทดลองพบว่าแถบทดสอบ สามารถตรวจวัดออกซีเททระไซคลิน ตกค้างในน้ำนมได้ต่ำสุด 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (29)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนู ICR (outbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบอนุญาตใช้สัตว์ เลขที่ 1673031
เซลล์ไมอีโบลมา P3X	สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon ,Tokyo, Japan
คอลัมน์ Hitrap Protein G Sepharose	GE Healthcare, Sweden
เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	Corning, USA
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	Udono-Rll memmert, Japan
เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-s และ รุ่น AG204	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy tm HT	BIO-TEK Instrument, Inc, USA
เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Seveneasy	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35	M.S.E. LTD, England
เครื่อง Affinity Chromatography (AKTA™ Start)	GE Healthcare, Sweden

ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂ incubator)	Yamato Scientific Co., Ltd., Japan
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-124	International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
ปีเปตอัตโนมัติขนาด 300 ไมโครลิตร	HLT, Warsaw, Poland
ปีเปตอัตโนมัติขนาด 10, 200, 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร	Eppendorf, Hamburg, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	Memmert, Germany
2. อุปกรณ์	
กระบอกฉีดยาขนาด 1, 10 มิลลิลิตร	Nipro, Ayutthaya, Thailand
เข็มขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
ขวดแก้ว	Boro, Germany
จานทดสอบ ELISA 96 หลุม	Corning, USA
จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Coster, USA
ถุง dialysis	CelluSep, USA
ทิปขนาด 10, 200, 300, 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร	Axygen, Union city, California
ปีเปตแก้ว	HBG, Germany
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California
หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acetic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Albumin, from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Albumin, from chicken egg white (OVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois

Chlotetracycline hydrocholine (CTC)	Fluka, Luoyang, China
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylformamide (DMF)	Merck, Darmstadt, Germany
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Germany
Di-sodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany
Doxycycline (DTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Ethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom, Berlin, Germany
40% formaldehyde	Carlo Erba, Milan, Italy
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Gentamicin	T. P. drug laboratories, Thailand
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Goat anti mouse IgG (GAM)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
Goat anti mouse IgG-Horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Darmstadt, Germany
30% Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Germany
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
ISF-1 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
2-(N-morpholino)ethansulfonic acid (MES)	Fluka, China
Norflaxacin	sigma aldrich,USA
Oxytetracycline dehydrate (OTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri

Penicilin	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Potassium citrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Skim milk	Anline, Bangkok, Thailand
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Carlo Erba, Milan, Italy
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	sigma aldrich,USA
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma aldrich,USA
Thimerosal	Sigma aldrich,USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Gllinyham, UK

3.4 วัสดุสำหรับทำแถบทดสอบ

วัสดุ	แหล่งที่มา
ตลับพลาสติกสำหรับแถบทดสอบ (Plastic cassette)	DCN, Carlsbad, California
ไนโตรเซลลูโลส เออี 99 (Nitrocellulose membrane AE99)	Whatman, Kent, UK
แผ่นคอตตอน ซีเอฟ 7 (Cotton linter CF 7)	Whatman, Kent, UK
แผ่นใยแก้ว จีเอฟ 33 (Fiberglass GF 33)	Whatman, Kent, UK
แผ่นใยแก้ว สแตนดาร์ด 17 (Standard 17)	Whatman, Kent, UK
แผ่นรองพลาสติก (Plastic backing card)	DCN, Carlsbad, California

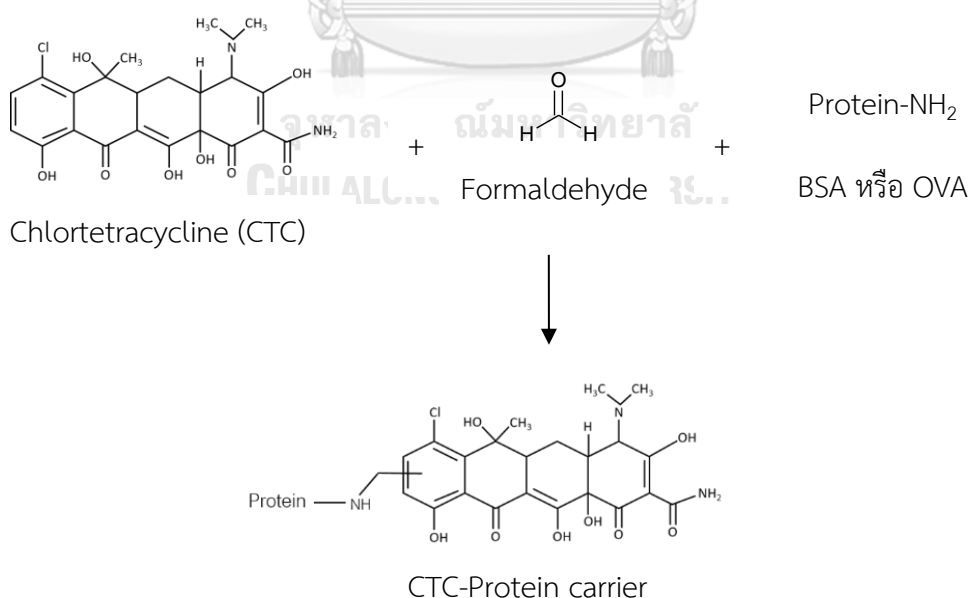


3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเชื่อมคลออร์ทเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ

3.5.1.1 การเชื่อมคลออร์ทเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ

ทำการเชื่อมคลออร์ทเทระไซคลิน (chlortetracycline; CTC) กับโปรตีนพาหะ Bovine serum albumin; BSA สำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู (CTC-BSA) และ โปรตีนพาหะ Ovalbumin; OVA สำหรับเคลือบหลุมจาน ELISA (CTC-OVA) โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich (ภาพที่ 3.1) นำคลออร์ทเทระไซคลิน 10 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโปรตีนพาหะ 10 มิลลิกรัมที่ละลายอยู่ใน 0.1 M 2-(N-morpholino) ethansulfonic acid; MES pH 4.7 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 37% (v/v) ฟอर्मัลดีไฮด์ (Formaldehyde) 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน จากนั้นการทำไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ 0.01 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline; PBS) pH 7.4 เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) (30)



ภาพที่ 3. 1 การเชื่อมคลออร์ทเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะ (BSA หรือ OVA) โดยปฏิกิริยา Mannich

3.5.1.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีนหลังจากเชื่อมต่อคลอรัทเทระไซคลินกับโปรตีนพาหะด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay kit ของบริษัท Pierce โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ PBS และสารตัวอย่างจะถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:2, 1:4 และ 1:6 จากนั้นเตรียม working reagent โดยการผสม reagent A กับ reagent B ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบ 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent 200 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่มีโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

3.5.1.3 การหาอัตราส่วนการเชื่อมติด (molar ratio) ของคลอรัทเทระไซคลินเชื่อมกับโปรตีนพาหะ

นำสารละลาย CTC, BSA, OVA, CTC-BSA และ CTC-OVA วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-400 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดของ CTC ที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA จากค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorbance coefficient; ϵ) จากสูตร (28)

$$\text{โมเลกุลการเชื่อมติด CTC กับโปรตีนพาหะ} = \frac{\epsilon_{\text{CTC โปรตีนพาหะ}} - \epsilon_{\text{โปรตีนพาหะ}}}{\epsilon_{\text{CTC}}}$$

3.5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.5.2.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (Immunization)

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองสายพันธุ์ ICR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วย CTC-BSA ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนู โดยการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะใช้ CTC-BSA ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 3 ครั้ง ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้น 7 วัน ทำการเจาะเลือดจากแก้มหนู (Facial vein) หลังจากเลือดแข็งตัว เก็บส่วนใสซึ่งเป็นส่วนซีรัมมาทดสอบหาระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วย CTC-BSA ที่ไม่ผสม FIA ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน

3.5.2.2 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา (myeloma cell)

นำเซลล์มัยอิโลมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี 15 % Fetal bovine serum (FBS) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 1 วัน ในวันหลอมรวมเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเตรียมไปหลอมรวมกับเซลล์ม้าม

3.5.2.3 การเตรียมเซลล์ม้าม (Spleen cell)

การุณยฆาตหนูทดลองโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เก็บเลือกจากหัวใจเพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไปทำการผ่าเอาม้ามโดยวิธีปลอดเชื้อทำความสะอาดม้ามด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี gentamycin บดม้ามให้ละเอียดโดยใช้ด้ามหลอดฉีดยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเตรียมไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา

3.5.2.4 การหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

นำเซลล์ม้ามาจากข้อ 3.5.2.3 และเซลล์มัยอีโลมาจากข้อ 3.5.2.2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที 5 นาที เทส่วนใสออก ค่อยๆ หยดโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol; PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ภายใน 1 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเจือจาง PEG นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี aminopterin hypoxanthin thymidine และ 15% FBS ทำการกระจายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมจำนวน 15 plate บ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้น 7 วัน เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาชนิด HT ที่มี 15% FBS และเมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุมและสื่ออาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยต่อเซลล์ด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA

3.5.2.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

ก. การคัดเลือกเซลล์โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CTC-OVA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างส่วนเกินด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่มี Tween20 (PBS-T) ความเข้มข้น 0.05% (w/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมหาสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ใน PBS ความเข้มข้น 5 % (v/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ถูกเชื่อมกับเอนไซม์ horse radish peroxidase (GAM-HRP) อัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมหาสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ละลายอยู่ใน 0.2 M บัฟเฟอร์ซิเตรท (Citrate buffer) pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 1 M กรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) หลุมละ 100

ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader

ข. คัดเลือกชั้น 2 โดยวิธี Indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับคลอโรเทระไซคลินในรูปอิสระ ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CTC-OVA บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างส่วนเกินด้วย PBS-T หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลาย skim milk หลุมละ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลาย CTC ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ผูกเชื่อมกับเอนไซม์ horse radish peroxidase (GAM-HRP) อัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตรบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำละลายสับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ละลายอยู่ใน 0.2 M Citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 1M กรดซัลฟิวริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาหลุมที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ CTC อิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

ค. การแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อทำให้เซลล์ไฮบริโดมาจากต้นกำเนิดเดียวกันโดยนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CTC อิสระ มาเจือจางให้ได้ 1 เซลล์ต่อ 1 หลุม โดยเลือกหลุมที่เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวในหลุม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจว่าเซลล์ไฮบริโดมายังสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CTC อิสระ ได้หรือไม่

3.5.3 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลต่อ CTC ในรูปอิสระที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ISF-1 serum free เพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography ด้วยเครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) โดยใช้คอลัมน์สำเร็จรูป HiTrap Protein G ขนาด 5 มิลลิลิตร ๕๕ ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 และปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อปรับคอล์มน์ให้เข้าสู่ภาวะสมดุล เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการชะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ให้ออกจากคอลัมน์ ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละหลอดมี 1 M Tris-HCl, buffer pH 9.0 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH ให้ประมาณ 7 โดยสารละลายแต่ละหลอดจะผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรจากเครื่อง หลังจากนั้นนำหลอดที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีมารวมกัน นำไปไดอะไลซิสใน บัฟเฟอร์ PBS และ BB เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำ 0.01% thimerosal และนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

3.5.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.5.4.1 การหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotyping)

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CTC-OVA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างส่วนเกินด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่มี Tween20 (PBS-T) ความเข้มข้น 0.05% (w/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ใน PBS ความเข้มข้น 5 % (v/v) หลุมละ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดี Isotyper (BIO-RAD) ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgG kappa และ IgG Lamda อัตราการเจือจาง 1:10 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง Goat anti-rabbit-HRP

(GAR-HRP) อัตราการเจือจาง 1:5000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ละลายอยู่ใน 0.2 M บัฟเฟอร์ซีเตรท pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยเติม 1 M กรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader

3.5.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง (The concentration at 50% inhibition, IC₅₀) และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) โดยวิธี Indirect competitive ELISA ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่าง CTC อีสาระในสารละลายและ CTC-OVA ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม คำนวณเป็นค่า IC₅₀ และ LOD จากกราฟที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5 โดยแกน Y คือค่า %B/B₀ และแกน X คือ ค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของ CTC อีสาระเมื่อ B₀ คือค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่ไม่มี CTC และ B คือค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มี CTC

3.5.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารในกลุ่มได้แก่ Tetracycline, Oxycycline, Deoxycycline, Methacycline และ Minocycline และนอกกลุ่มเทตระไซคลินได้แก่ Chloramphenicol, Norfloxacin และ Sulfamethazine โดยวิธี Indirect competitive ELISA ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันระหว่างสารที่ต้องการทดสอบในรูปอีสาระในสารละลายและ CTC-OVA ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม นำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่า IC₅₀ โดยโปรแกรม GraphPad Prism 5 จากนั้นนำค่า IC₅₀ ของสารแข่งขันแต่ละตัวมาคำนวณหา %ปฏิกิริยาข้าม (%Cross reactivity) จากสูตร

$$\% \text{Cross reactivity} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของ CTC}}{\text{IC}_{50} \text{ ของตัวแข่งขัน}} \times 100$$

3.5.5 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CTC ด้วยวิธี icELISA ในตัวอย่างอาหาร

3.5.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัด CTC ในตัวอย่างอาหาร

นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำการทดสอบหาความไวด้วยวิธี icELISA มาสร้างกราฟโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 โดยให้แกน X เป็นอวกาศที่มของ ความเข้มข้นของ CTC ในรูปแบบบิสระ และแกน Y คือ $\%B/B_0$ จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่สามารถสร้างกราฟเส้นตรงได้ จึงเรียกกราฟเส้นตรงนี้ว่า กราฟมาตรฐาน ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ได้นี้ใช้สำหรับการคำนวณหา CTC ในตัวอย่างอาหารนํ้านมและนํ้าผึ้งต่อไป

3.5.5.2 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างนํ้านม

เตรียมนํ้านม มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสมาทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง 5, 10, 20 และ 40 เท่า ทำการเติม CTC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 31.2, 0.97, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดด้วยวิธี icELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ CTC ที่เติมลงไปในตัวอย่ง และแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CTC ที่ละลายใน PBS

3.5.5.3 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างนํ้านม

เตรียมนํ้านม มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสมาทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้ ทำการตรวจวัดด้วยวิธี icELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ศึกษาความแปรปรวนของการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และทำการทดลองซ้ำในระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) นำไปหาค่าความแม่นยำจาก % coefficient of variation (%CV)

3.5.5.4 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

เตรียมน้ำฝิ่งมาเจือจางที่ระดับการเจือจาง 5, 10, 20 และ 40 เท่า เติม CTC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 1.95, 0.97, 0.48, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดด้วยวิธี icELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ CTC ที่เติมลงไปในตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CTC ที่ละลายใน PBS

3.5.5.5 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

เตรียมน้ำฝิ่งมาเจือจางที่ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้ เติม CTC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40 และ 80 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการตรวจวัดด้วยวิธี icELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำและทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ศึกษาความแปรปรวนของการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และทำการทดลองซ้ำในระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) นำไปหาค่าความแม่นยำจาก % coefficient of variation (%CV)

3.5.6 การเตรียมแถบทดสอบต้นแบบ

3.5.6.1 การศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอนุภาคทองคำที่เหมาะสม

นำสารละลายอนุภาคทองคำ (Colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาปรับ pH ให้เท่ากับ 8.2 ด้วย 0.2 M Na_2CO_3 pH 9.0 เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีความเข้มข้นในช่วง 0–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 2 mM sodium borate buffer (BB), pH 9.0 เติมลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายอนุภาคทองคำ ที่ปรับ pH แล้ว 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 10% NaCl ลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พิจารณาจากความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต่ำที่สุดที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด

3.5.6.2 การเตรียมอนุภาคทองที่ติดฉลากกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb-Colloidal gold)

นำสารละลายอนุภาคทองคำ pH 8.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 10:1) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย 5% BSA เขย่าที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย MAb-Colloidal gold ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้งไป ละลายตะกอน MAb-Colloidal gold ด้วยบัฟเฟอร์ BB 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อล้างส่วนที่ไม่เชื่อมติดทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายละลายตะกอนกลับด้วย 2% ซูโครส 1 มิลลิลิตรที่ละลายในบัฟเฟอร์ BB จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400-800 นาโนเมตร

3.5.6.3 การเตรียมส่วนประกอบของแถบทดสอบ

ก. การเตรียม sample pad และ absorbent pad

นำแผ่น sample pad (standard 17) และ absorbent pad (CF7) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน

ข. การเตรียม conjugate pad

นำแผ่นใยแก้ว GF 33 มาบดด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1% (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ PB เป็นเวลา 15 นาที อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำพ่นลงบนแผ่น Conjugate pad ด้วยอัตราการพ่น 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

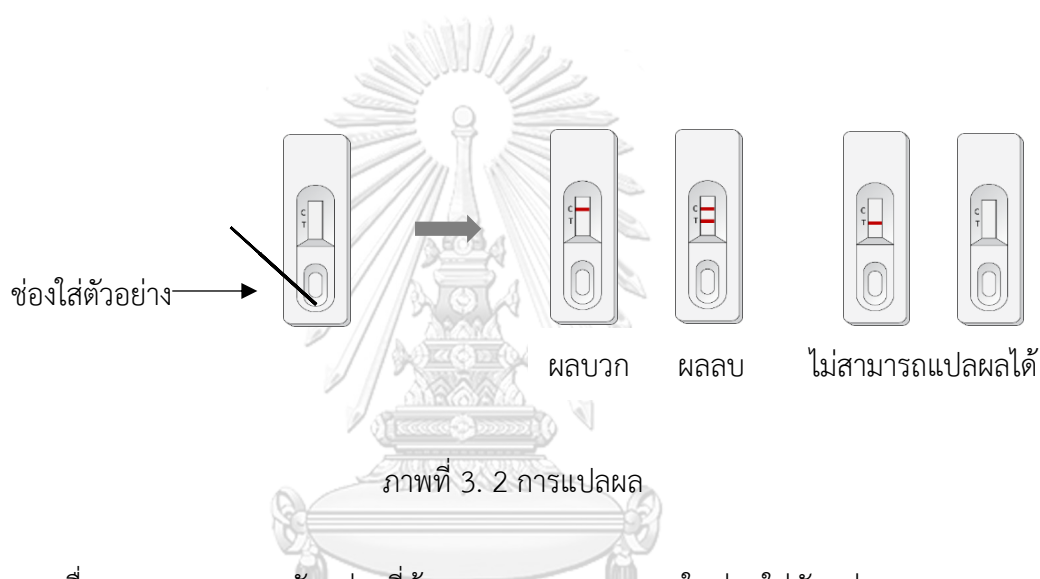
ค. การเตรียม analytical pad

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสติดบนแผ่นรองพลาสติก นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปพ่นเส้นทดสอบ T-line คือ CTC-BSA และเส้นควบคุม C-line คือ GAM ด้วยเครื่อง Dispense Platform (Biodot) อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร

ง. การประกอบแถบทดสอบ

นำ absorbent pad ติดลงบน plastic backing card โดยให้ปลายด้านล่างแหล่้อมทับกับ analytical pad จากนั้นติด conjugate pad ที่พ่นด้วย colloidal gold ให้ด้านบนเกยทับ analytical pad และติด sample pad ให้ด้านบนเกยทับ conjugate pad จากนั้นนำมาตัดให้มีขนาด 4x25 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องตัดแถบทดสอบ Guillotine Cutter (Biodot)

3.5.6.4 การทดสอบและการแปลผล



เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบหยดลงในช่องใส่ตัวอย่าง สารละลายจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ conjugate pad ถ้าในสารละลายตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองจะจับกับแอนติเจน จากนั้นสารละลายจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณ เส้น T-line ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกตรึงด้วยแอนติเจน เนื่องจากแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองจับกับแอนติเจนในสารละลายตัวอย่างทำให้ไม่สามารถสำหรับจับกับแอนติเจนบริเวณ T-line จึงไม่ปรากฏแถบสีที่บริเวณ T-line เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ไปบริเวณ C-line ซึ่งบริเวณนี้ถูกตรึงด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยทองจึงปรากฏเป็นแถบสีที่บริเวณ C-line โดยจะแปรผลด้วยตาเปล่า ถ้าบริเวณ analytical membrane ปรากฏแถบสีที่บริเวณ C-line แถบเดียว แสดงว่าให้ผลบวก (Positive) สารละลายตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบ ในทางกลับกันถ้าบริเวณ analytical membrane ปรากฏแถบสี 2 แถบที่บริเวณ T-line และ C-line แสดงว่าให้ผลลบ (Negative) สารละลายตัวอย่างไม่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบ ในกรณีที่แถบทดสอบปรากฏแถบสีเดียวที่ T-line หรือไม่ปรากฏสีเลย แสดงว่าแถบทดสอบนั้นมีปัญหาไม่สามารถแปลผลได้ (ภาพที่ 3.2)

3.5.6.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ

ก. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CTC-BSA ที่บริเวณ T-line และ GAM ที่บริเวณ C-line

พ่นเส้นทดสอบ T-line ด้วย CTC-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นควบคุม C-line ด้วย goat anti-mouse antibody (GAM) ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Dispense Platform (Biodot) อัตราการพ่น 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.5.6.6 การหาค่าความไวของแถบทดสอบ

เตรียมสารละลาย CTC ให้มีความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงแถบทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยประเมินด้วยตาเปล่า หาค่า cut off คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของเส้น T line หายไป และค่า Visual Limit of Detection (VLOD) คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังคงเห็นสีของเส้น T line ด้วยตาเปล่า จากนั้นอ่านค่าความเข้มสีจากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47 m นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ CTC และหาค่า LOD จากกราฟมาตรฐานโดยพิจารณาจาก % การลดลงของสีที่ 20 %

3.5.6.7 การหาค่าความจำเพาะของแถบทดสอบ

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของแถบทดสอบกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs ได้แก่ Tetracycline (TC), Oxycycline (OTC), Doxycycline (DOX), และ นอกกลุ่ม ได้แก่ Chloramphenicol, Norfloxacin และ Sulfamethazine ความเข้มข้น 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T

3.5.6.8 การประเมินประสิทธิภาพแถบทดสอบในตัวอย่างอาหาร

ก. การศึกษาผลของแมทริกซ์ในตัวอย่างอาหาร

เจือจางน้ำนมและน้ำผึ้งให้มีระดับการเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10 ปีเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรมาทดสอบกับแถบทดสอบ พิจารณาเลือกระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ทำให้แถบสี บริเวณ T line ใกล้เคียงกับ control

ข. การหาความไวของแถบทดสอบในตัวอย่างอาหาร

เตรียมตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.6.7 ก. เติมคลอร์เทระไซคลิน ให้ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ปีเปตสารละลาย ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบ โดยประเมินด้วยตาเปล่า หาค่า cut off และค่า VLOD จากนั้นอ่านค่าความเข้มสีจากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47 m นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ CTC และหาค่า LOD จากกราฟมาตรฐานโดยพิจารณาจาก % การลดลงของสีที่ 20 %

ค. การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision)

การหาค่าความถูกต้องของแถบทดสอบคลอร์เทระไซคลิน โดยนำตัวอย่างน้ำนมและน้ำผึ้ง นำตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.6.8 ก. เติม CTC ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ปีเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบ นำไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47 m นำค่าความเข้มสี ที่อ่านได้จากโปรแกรมมาเทียบกับกราฟมาตรฐานคลอร์เทระไซคลิน เพื่อคำนวณหาปริมาณคลอร์ เทระไซคลิน ที่มีอยู่ในตัวอย่าง นำไปหาค่าความถูกต้องจาก % recovery

การหาค่าความแม่นยำของแถบทดสอบคลอร์เทระไซคลิน โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างให้ ความเข้มข้นคลอร์เทระไซคลิน สุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 นาโนกรัมต่อมิลลิตร โดย เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำและทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ศึกษาความแปรปรวนของการทดลอง ซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และทำการทดลองซ้ำในระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) นำไปหาค่าความแม่นยำจาก %CV

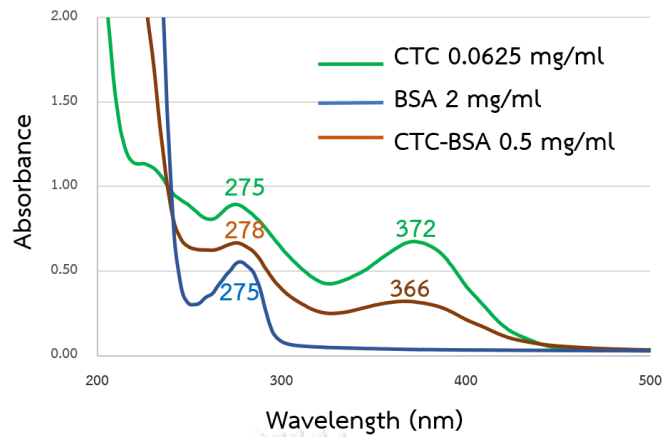
บทที่ 4

ผลการทดลอง

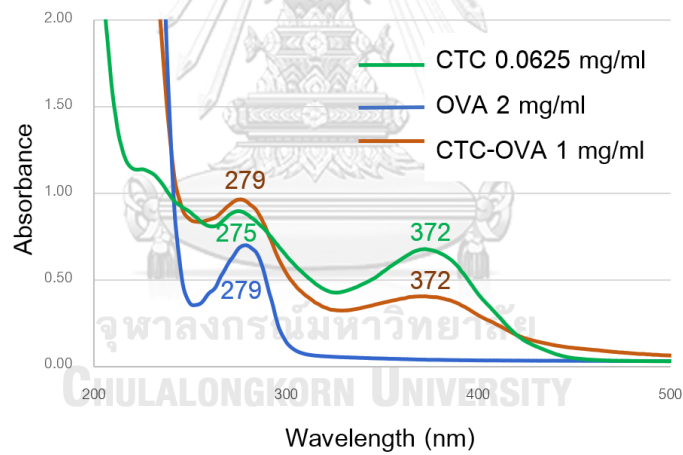
4.1 ผลการเชื่อมคลอรัทเทอร์ไฮคลินกับโปรตีนพาหะ

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ต้องการที่จะผลิตแอนติบอดีต่อ CTC ซึ่ง CTC เป็นแอนติเจนที่มีขนาดเล็กที่เรียกว่า เฮปแทน ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อสร้างแอนติบอดีต่อ CTC ได้โดยตรงจึงต้องมีการเชื่อม CTC กับโปรตีนพาหะเพื่อให้มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเชื่อม CTC กับ โปรตีนพาหะ BSA (CTC-BSA) สำหรับการฉีดกระตุ้นหนู ขณะเดียวกัน CTC ไม่สามารถเรียงพันหลุมจาน ELISA ได้โดยตรงเช่นกัน ดังนั้นจึงต้องทำการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ เนื่องจากในซีรัมหนูจะมีแอนติบอดีต่อทั้ง CTC และ BSA เพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CTC ดังนั้นจึงเลือกโปรตีนพาหะ OVA มาเชื่อมกับ CTC (CTC-OVA) โดยในการเชื่อมต่อ CTC กับโปรตีนพาหะใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งในปฏิกิริยาจะมีการเติม formadehyde ทำให้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมกันระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีนพาหะกับวงพีนอลของ CTC จากนั้นหาปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA และ CTC-OVA ด้วยวิธี BCA Protein Assay Kit พบว่าปริมาณโปรตีน CTC-BSA และ CTC-OVA เท่ากับ 2.78 และ 2.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการเชื่อมติด CTC กับโปรตีนพาหะแล้วนำมาตรวจหาอัตราส่วนการเชื่อมติดของ CTC กับโปรตีนพาหะ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ CTC ก่อนและหลังเชื่อมติดโปรตีนพาหะ (CTC-BSA และ CTC-OVA) โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่เปลี่ยนไปของ CTC ก่อนและหลังเชื่อมติดโปรตีนพาหะ จากการทดลองพบว่า CTC มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 275 และ 372 นาโนเมตร, BSA มีค่า λ_{max} เท่ากับ 278 นาโนเมตร และ CTC-BSA มีค่า λ_{max} เท่ากับ 275 และ 366 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.1) OVA มีค่า λ_{max} เท่ากับ 279 นาโนเมตร และ CTC-OVA ค่า λ_{max} เท่ากับ 279 และ 372 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.2) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบ λ_{max} ของ CTC ก่อนเชื่อมโปรตีนพาหะและหลังเชื่อมโปรตีนพาหะมีค่า λ_{max} ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นแสดงว่ามีการเชื่อมติดระหว่าง CTC กับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง CTC และ BSA จากค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 7:1 นั้นหมายถึง BSA 1 โมเลกุล มี CTC 7 โมเลกุลเชื่อมต่ออยู่ และอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง CTC และ OVA เท่ากับ 3:1 นั้นหมายถึง OVA 1 โมเลกุล มี CTC 3 โมเลกุลเชื่อมต่ออยู่ ดังนั้น สรุปได้ว่าการเชื่อมต่อระหว่าง CTC กับโปรตีนพาหะในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ



ภาพที่ 4. 1 โคโรมาโตแกรมของ CTC 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), BSA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CTC-BSA 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

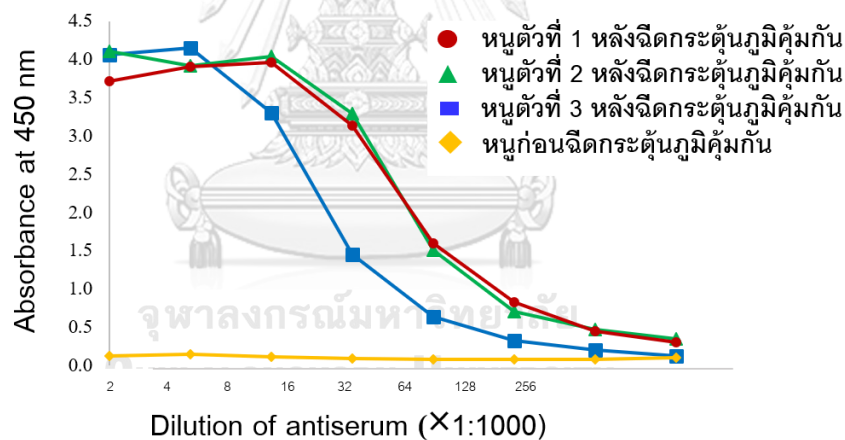


ภาพที่ 4. 2 โคโรมาโตแกรมของ CTC 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), OVA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CTC-OVA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

4.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.2.1 ผลการหาระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนู

เมื่อเชื่อมติด CTC กับโปรตีนพาหะ BSA นำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองทั้งหมด 3 ตัว หลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 เป็นเวลา 7 วันเจาะเลือดนำซีรัมหนูมาหาระดับแอนติบอดี (titer) และการสร้างแอนติบอดีต่อ CTC ด้วย Indirect ELISA พบว่าหนูทั้ง 3 ตัว มีระดับการสร้างแอนติบอดี ในช่วง 1:128,000 - 1:256,000 (ภาพที่ 4.3) จากนั้นนำมาทดสอบหาความสามารถของแอนติบอดี ในการจับกับ CTC อีสระโดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยเลือกระดับความเจือจางในซีรัมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ประมาณ 1 พบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูทั้ง 3 ตัวสามารถจับกับ CTC อีสระได้ โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ลดลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการแย่งจับ CTC อีสระ อยู่ในช่วง 86.58-91.39 % (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4. 3 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมหนูจำนวน 3 ตัวที่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทดสอบโดยวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 4. 1 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับ CTC ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

หนูตัวที่	ระดับความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		% การแข่งขัน
		ไม่มี CTC	มี CTC	
1	1:16,000	1.4520	0.1941	86.63
2	1:32,000	1.5122	0.2029	86.58
3	1:32,000	1.5934	0.1372	91.39

4.2.2 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

เมื่อทำการตรวจสอบระดับแอนติบอดีในซีรัมจากเลือดหนูแล้วพบว่าหนูทั้ง 3 ตัวมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ CTC จึงทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์ไมโอโลมาด้วย 50% PEG จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20% FBS เซลล์ไฮบริโดเมานั้นที่จะสามารถเติบโตได้หลังจากนั้น 7 วันเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20% FBS จากนั้นเมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเกิดการเจริญเติบโตจนเป็นโคลนี่ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีไฮบริโดมามาทดสอบว่าไฮบริโดมาหลุมใดมีการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของหลุมที่ให้ผลบวกมาทดสอบว่าเซลล์ไฮบริโดมาสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ CTC อิสระได้หรือไม่ โดยวิธี Indirect competitive ELISA ให้ผลดังตาราง 4.2

จากผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 พบว่ามีไฮบริโดมาที่เจริญเติบโต 356 หลุม และมีเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CTC-OVA 40 หลุม แต่ไม่สามารถจับกับ CTC อิสระได้ จึงไม่สามารถนำมาทำการวิจัยต่อไป

จากผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 พบว่ามีไฮบริโดมาที่เจริญเติบโต 871 หลุม และมีเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CTC-OVA 119 หลุม และมีความสามารถจับกับ CTC อิสระได้ 6 หลุม แต่เมื่อนำมาแยกเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution พบว่าเซลล์ได้สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป เนื่องจากโคลนที่ได้ไม่มีความคงตัว (stability) จึงไม่สามารถนำมาทำการวิจัยต่อไป

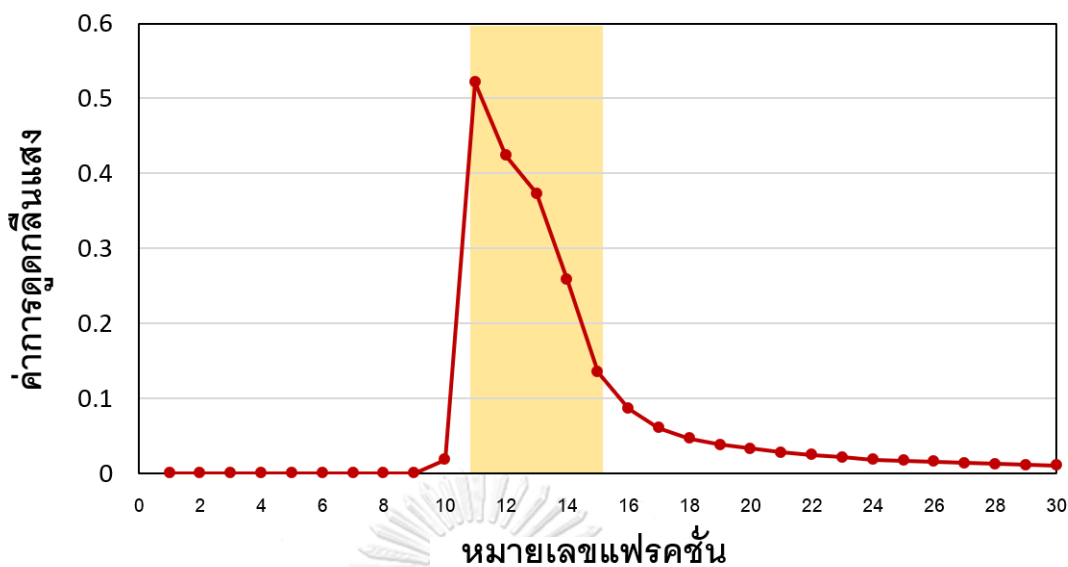
จากผลการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 พบว่ามีไฮบริโดมาที่เจริญเติบโต 646 หลุม และมีเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CTC-OVA 217 หลุม และมีความสามารถจับกับ CTC อิสระได้ 8 หลุม และเมื่อนำมาแยกเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาเพียง 1 โคลน ที่ยังสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CTC อิสระและมีความเสถียร จึงนำมาทำการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 4. 2 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 3 ครั้ง

ครั้งที่	จำนวนตั้งต้น		จำนวนที่เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ		จำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี		จำนวนเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อ CTC อีสระ		จำนวนโคลนที่ได้	
	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)
1	1440	100	356	24.7	40	2.8	-	-	-	-
2	1440	100	871	60.5	119	8.3	6	0.4	-	-
3	1440	100	646	44.9	217	15.1	8	0.6	1	0.1

4.3 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

หลังจากได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CTC นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ISF-1 serum free เพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column) ซึ่งโปรตีน G ผลิตได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม Streptococcus โดยโปรตีน G จะจับกับแอนติบอดีตรงบริเวณ Fc region ซึ่งโปรตีน G นั้นจำเพาะกับแอนติบอดีไอโซไทป์ IgG ซึ่งในงานวิจัยนี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีไอโซไทป์ IgG₁ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงถูกจับอยู่ในคอลัมน์โดยใช้เครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) หรือ AKTA และทำการชะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ นาที ทั้งหมด 25 แฟรคชัน หาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ แฟรคชัน 11-15 (ภาพที่ 4.4) จากนั้นนำแต่ละแฟรคชันมารวมกัน แล้วหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay ได้ 1.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4. 4 โครมาโตแกรมปริมาณโปรตีนแต่ละแฟรคชั่นจากการทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ Isotyper (BIO-RAD) ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgG kappa และ IgG Lamda ด้วยวิธี Indirect ELISA เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลที่ผลิตได้ คือ IgG₁ และสับไอโซไทป์ คือ K (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4. 3 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	K	λ
0.7481	0.1148	0.1060	0.1059	0.0964	0.1103	1.7435	0.0911

4.4.2 ผลการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากความเข้มข้นของ CTC-OVA ที่ตรึงพื้นผิวกับความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ให้มีผลต่อความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จึงทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CTC-OVA ที่ตรึงพื้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เมื่อทำปฏิกิริยากันแล้วให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD เท่ากับ 0.8-1.2) โดยเจือจาง CTC-OVA ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดี ความเข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่าได้อัตราส่วนระหว่างของ CTC-OVA ที่ตรึงพื้นหลุมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 คู่ คู่ที่ 1 คือ CTC-OVA 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร คู่ที่ 2 คือ CTC-OVA 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร คู่ที่ 3 คือ CTC-OVA 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และคู่ที่ 4 คือ CTC-OVA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) ซึ่งทั้ง 4 คู่จะถูกนำไปทดสอบความไวด้วยวิธี indirect competitive ELISA ต่อไป

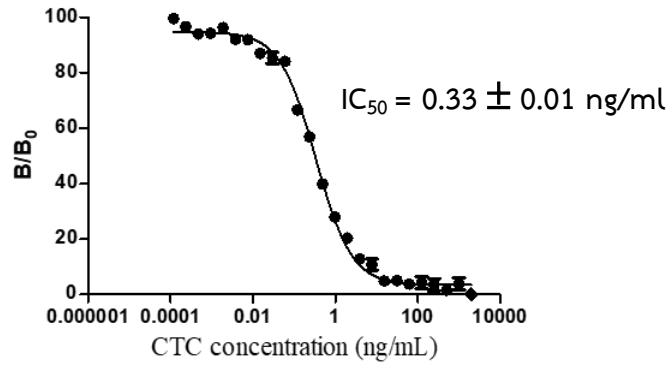
ตารางที่ 4. 4 ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง CTC-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

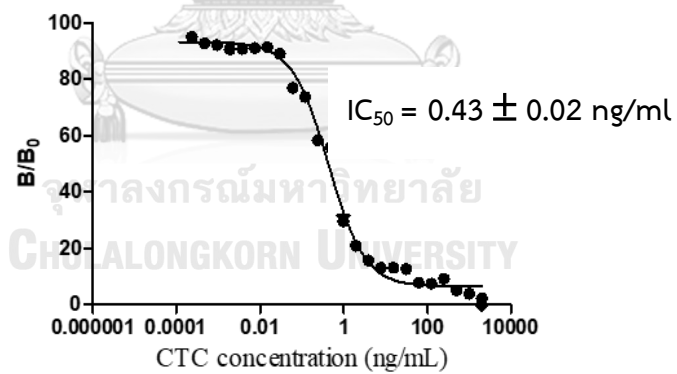
ความเข้มข้นของ MAb (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ CTC-OVA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.625	1.25	2.5	5
100	2.6370	2.6819	2.6153	2.9492
90	1.4120	1.5906	1.7995	1.9326
80	1.2558	1.4760	1.7540	1.9625
70	1.1483	1.3515	1.4998	1.7845
60	1.0380	1.2126	1.3211	1.5528
50	0.9003	1.0440	1.1324	1.3722
40	0.7274	0.8512	0.9489	1.1161
30	0.4765	0.5770	0.6908	0.7877
20	0.4414	0.5194	0.6041	0.6384
10	0.3213	0.3772	0.4909	0.4666
1	0.1885	0.2346	0.2487	0.205
0	0.0796	0.0812	0.0716	0.0790

การหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยเกิดการแย่งจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับ CTC-OVA ที่เคลือบกันหลุมและ CTC อีสระ โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CTC-OVA ที่เคลือบกันหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 4.4.1 นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad เพื่อหาความไวโดยเปรียบเทียบว่าคู่ไหนให้ความไวสูงที่สุด โดยเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้จากทั้ง 4 คู่ (ตารางที่ 4.5) พบว่าคู่ที่ 1 CTC-OVA ความเข้มข้น 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.5), คู่ที่ 2 CTC-OVA ความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.6), คู่ที่ 3 CTC-OVA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ MAb ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.46 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.7) และคู่ที่ 4 CTC-OVA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Mab ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.8)

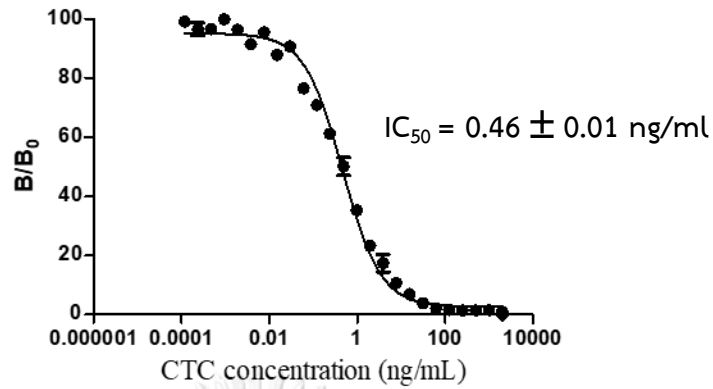
จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} พบว่า เมื่อใช้คู่ที่ 1 CTC-OVA ที่เคลือบกันหลุม 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโมโนโคลนอลแอนติบอดี 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ 0.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นแสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้มีความไวสูงที่สุด



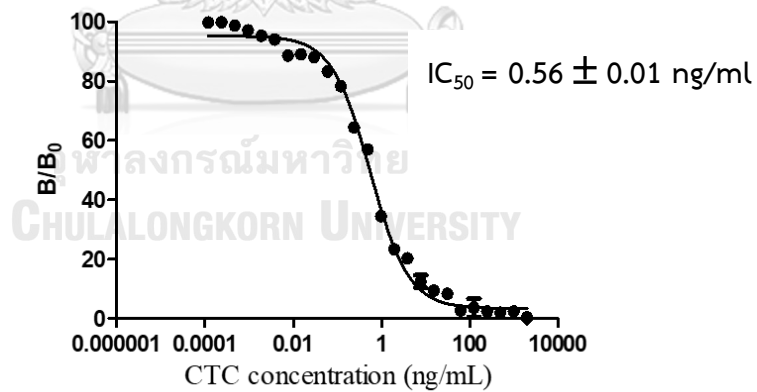
ภาพที่ 4. 5 ผลการหาค่า IC₅₀ โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหุ้มน เท่ากับ 0.625 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4. 6 ผลการหาค่า IC₅₀ โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหุ้มน เท่ากับ 1.25 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4. 7 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหุ้มน เท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4. 8 ผลการหาค่า IC_{50} โดยใช้แอนติเจน CTC-OVA เคลือบหุ้มน เท่ากับ 5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และโมโนโคลนอลแอนติบอดีความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4. 5 การเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของโมนโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ CTC-OVA เคลือบหลุม และความเข้มข้นโมนโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 คู่

ความเข้มข้น CTC-OVA เคลือบหลุม ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นโมนโนโคลนอล แอนติบอดี (ng/ml)	IC_{50} (ng/ml)
0.625	40	0.33 ± 0.01
1.25	50	0.43 ± 0.02
2.5	50	0.46 ± 0.01
5	60	0.56 ± 0.01



4.4.3 ผลการหาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการหาความจำเพาะโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์โดยการทดสอบกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มเตตระไซคลินจากตารางที่ 4.6 พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่ม เตตระไซคลิน นั้นแสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงมากต่อคลอร์เตตระไซคลิน

ตารางที่ 4. 6 ผลการทำปฏิกิริยาข้ามในกลุ่มและนอกกลุ่มเตตระไซคลินของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่มสาร	สารที่ใช้ทดสอบ	IC ₅₀ (ng/ml)	% ปฏิกิริยาข้าม
สารในกลุ่ม เตตระไซคลิน	Chlortetracycline	0.33	100
	Tetracycline	>1,000	0
	Oxycycline	>1,000	0
	Doxycycline	>1,000	0
	Minocycline	>1,000	0
สารนอกกลุ่ม เตตระไซคลิน	Chloramphenicol	>1,000	0
	Norfloxacin	>1,000	0
	Sulfamethazine	>1,000	0

4.5 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CTC ด้วยวิธี icELISA ในตัวอย่างอาหาร

4.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

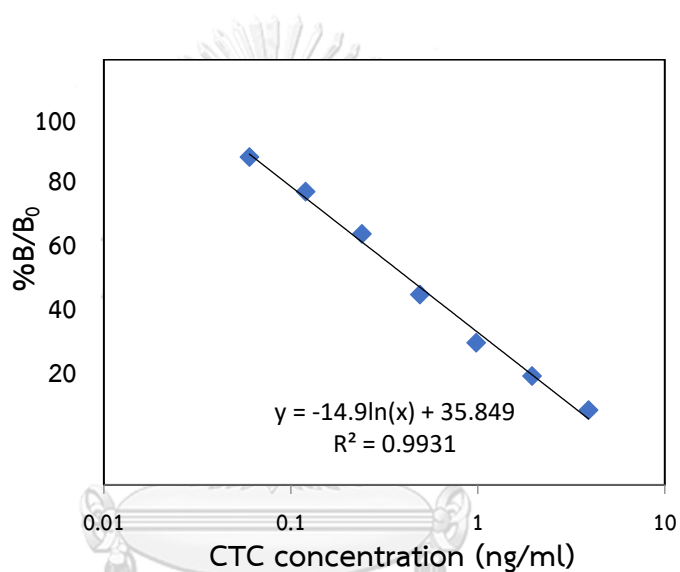
ทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และได้เลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่ 0.06-3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7)



ตารางที่ 4. 7 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรที่ได้จากการทำ icELISA ที่ใช้สำหรับเลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น CTC (ng/ml)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 nm	%B/B ₀
0	1.31	100
0.0001	1.31	99.6
0.0002	1.27	96.9
0.00045	1.24	94.4
0.0009	1.24	94.6
0.00019	1.27	96.5
0.0038	1.21	92.6
0.0076	1.22	92.4
0.015	1.16	87.8
0.03	1.13	86.3
0.06	1.01	77.0
0.12	0.90	68.9
0.24	0.78	59.02
0.49	0.58	44.7
0.98	0.43	33.4
1.96	0.33	25.6
3.91	0.23	17.6
7.81	0.21	16.5
15.65	0.14	11.0
31.25	0.14	11.1
62.5	0.13	10.0
125	0.13	10.4
250	0.12	9.8
500	0.10	7.8
1000	0.13	10.1

เมื่อทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CTC ในรูปอิสระสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่ แกน X เป็นค่า %B/B₀ และ แกน Y เป็นค่าความเข้มข้นของ CTC ในรูปอิสระ หน่วยเป็น นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.9) ซึ่งจากกราฟ ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ 0.9931 ซึ่งให้ช่วงความเข้มข้นของ CTC ที่เป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.06-3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งยอมรับได้ ดังนั้น จากค่าความเชื่อมั่นยืนยันได้ว่า สามารถใช้ช่วงความเข้มข้นของ CTC นี้ทำเป็นกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจสอบหา CTC ในตัวอย่างอาหารในขั้นตอนต่อไปได้

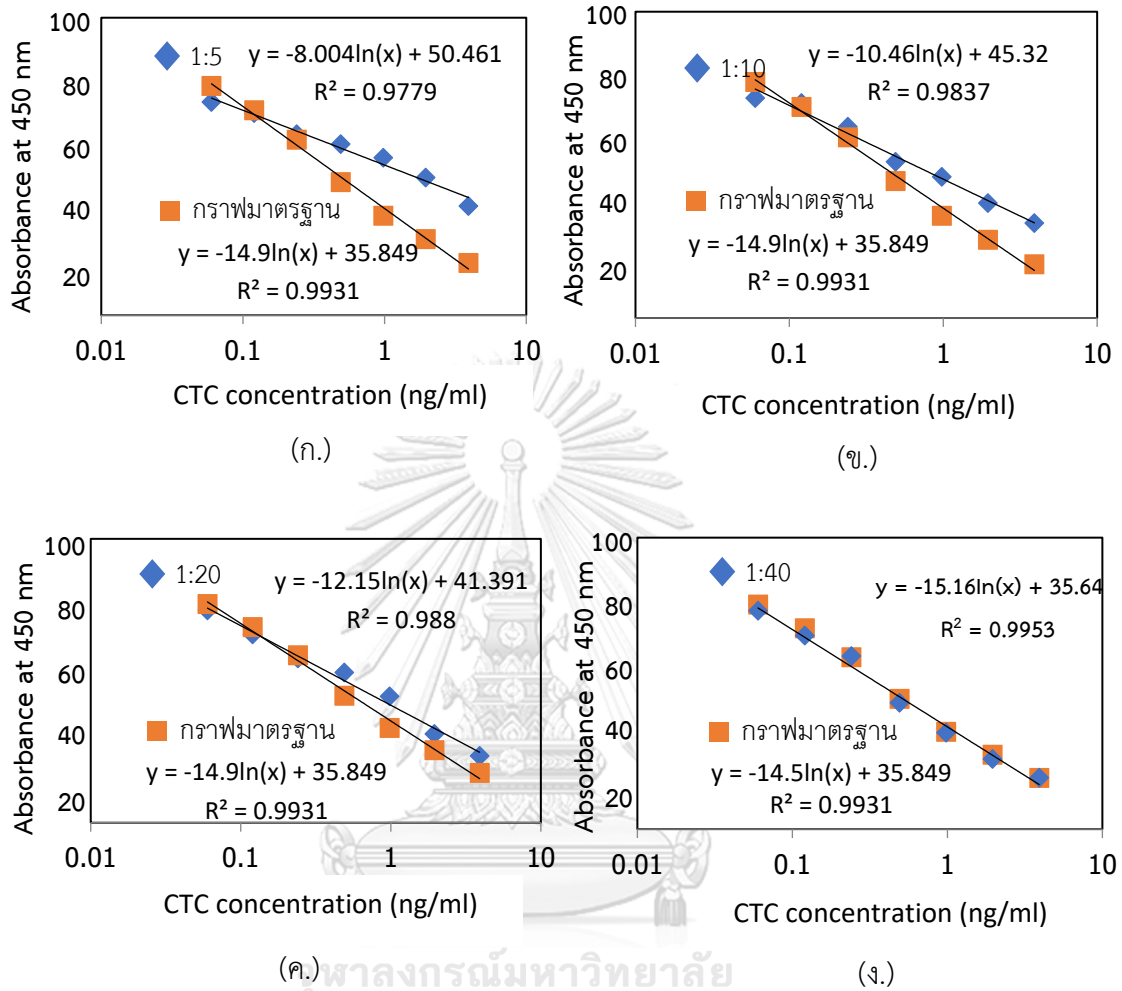


ภาพที่ 4.9 กราฟมาตรฐาน CTC ในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T

4.5.2 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำนม

แมทริกซ์ต่างๆในอาหารมีผลต่อระบบ ELISA ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกในน้ำนมโดยการหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้แมทริกในน้ำนมไม่มีผลต่อ ELISA สามารถลดแมทริกในตัวอย่างน้ำนม จากการสกัดน้ำนม โดยเติม CTC ลงไปในน้ำนมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย หลังการเจือจาง 5, 10, 20 และ 40 คือ 0, 0.06, 0.12, 0.24, 0.49, 0.98, 1.96 และ 3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าที่ระดับการเจือจางที่เพิ่มขึ้นทำให้เส้นกราฟใกล้เคียงกับเส้นกราฟมาตรฐานมากขึ้น จนในที่สุดที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า เส้นกราฟทับกับเส้นมาตรฐานสนิท แสดงว่าระดับการเจือจาง 40 เท่า ที่เหมาะสมในน้ำนม ก่อนการทดสอบสามารถลดการรบกวนของแมทริกซ์ในตัวอย่างได้ จึงเลือกใช้อัตราการเจือจาง 40 เท่า ในการเตรียมตัวอย่างน้ำนมก่อนนำไปตรวจวัดปริมาณ (ภาพที่ 4.10)





ภาพที่ 4. 10 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางเมทริกซ์ในน้ำนมที่ระดับการเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ระดับการเจือจางที่ 5 , 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ

4.5.3 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำนม

เมื่อเติม CTC ลงไปในตัวอย่างน้ำนมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการเจือจาง 1:40 เท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี icELISA เพื่อวิเคราะห์หา CTC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัด โดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของ %recovery และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV พบว่า เมื่อทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ intra assay และทำการทดลองในวันละเวลาต่างกัน หรือ inter assay ผลการตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำนมด้วย icELISA ให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 95-102.5 % และ 100-105.5 % ตามลำดับ และ %CV อยู่ในช่วง 2.1-4.8 % และ 3.3-9.0 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4. 8 ผลการวิเคราะห์ Intra assay และ Inter assay ในตัวอย่างน้ำนม

ปริมาณ CTC (ng/ml)	Intra assay (n = 3)			Inter assay (N=3, n = 3)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV
5.0	5.1 ± 0.2	102	3.9	5.1 ± 0.4	102	7.8
10.0	9.5±0.2	95	2.1	10.0 ± 0.9	100	9
20.0	20.5 ± 1.0	102.5	4.8	21.1 ±1.4	105.5	6.6
40.0	40.7 ± 1.1	101.7	2.7	40.2 ± 1.6	100.5	3.9
60	59.3 ± 1.2	98.8	2.2	60.2 ± 1.4	103.3	3.9
80	81.2 ± 2.1	101.5	2.6	80.9 ± 2.7	101.1	3.3

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

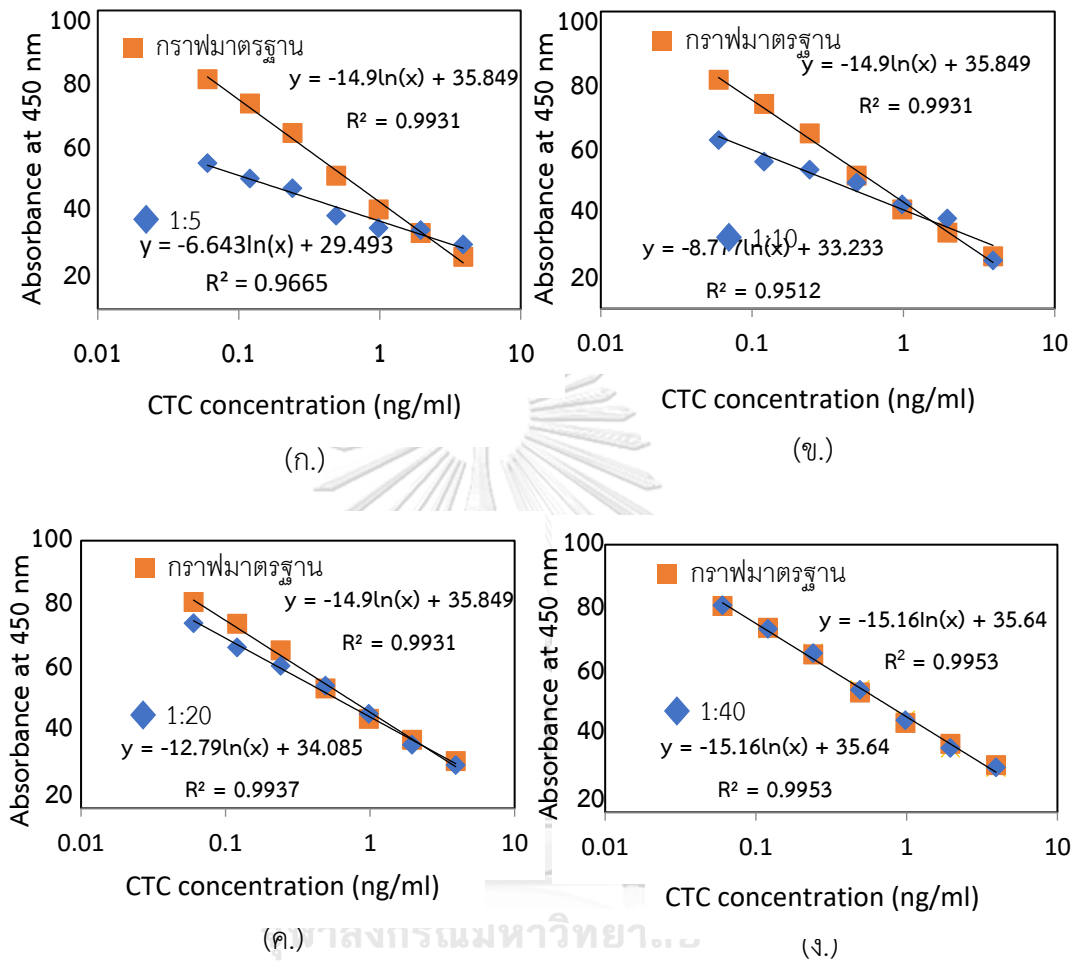
Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.5.4 การศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ความหนืดในน้ำผึ้งเป็นแมทริกสำคัญที่มีผลต่อระบบ ELISA ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกในน้ำผึ้งโดยการหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้แมทริกในน้ำผึ้งไม่มีผลต่อ ELISA สามารถลดแมทริกในตัวอย่างน้ำผึ้ง จากการเจือจางอย่างน้ำผึ้ง โดยเติม CTC ลงไปในน้ำผึ้งให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย หลังการเจือจาง 5, 10, 20 และ 40 เท่า คือ 0, 0.06, 0.12, 0.24, 0.49, 0.98, 1.96 และ 3.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าที่ระดับการเจือจางที่เพิ่มขึ้นทำให้เส้นกราฟใกล้เคียงกับเส้นกราฟมาตรฐานมากขึ้น จนในที่สุดที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า เส้นกราฟทับกับเส้นมาตรฐานสนิท แสดงว่า ระดับการเจือจาง 40 เท่า ที่เหมาะสมในน้ำผึ้งก่อนการทดสอบสามารถลดการรบกวนของแมทริกในตัวอย่างได้ จึงเลือกใช้อัตราการเจือจาง 40 เท่า ในการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งก่อนนำไปตรวจวัดปริมาณ (ภาพที่ 4.11)





ภาพที่ 4. 11 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางเมทริกซ์ในน้ำผึ้งที่ระดับการเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ระดับการเจือจางที่ 5 , 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ

4.5.5 การตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

เมื่อเติม CTC ลงไปในตัวอย่างน้ำฝิ่งให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายหลังการเจือจาง 1:40 เท่ากับ 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี icELISA เพื่อวิเคราะห์หา CTC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัด โดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของ %recovery และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV พบว่า เมื่อทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ intra assay และทำการทดลองในวันละเวลาต่างกัน หรือ inter assay ผลการตรวจวัดปริมาณ CTC ในตัวอย่างน้ำฝิ่งด้วย icELISA ให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 96-102.5 % และ 99-104 % ตามลำดับ และ %CV อยู่ในช่วง 1.1-7.8 % และ 1.8-10.1 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4. 9 ผลการวิเคราะห์ Intra assay และ Inter assay ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ปริมาณ CTC (ng/ml)	Intra assay (n = 3)			Inter assay (N=3, n = 3)		
	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV
5.0	5.1 ± 0.4	102	7.8	5.2 ± 0.4	104	7.6
10.0	9.6 ± 0.4	96	4.1	9.9 ± 1.0	99	10.1
20.0	20.5 ± 0.6	102.5	2.9	20.5±1.0	102.5	4.8
40.0	40.0 ± 0.5	100	1.2	40.0 ± 1.0	100	2.5
60	60.3 ± 0.7	100.5	1.1	60.3 ± 1.1	100.5	1.8
80	80.8± 1.4	101	1.7	80 ± 2.3	100	2.8

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

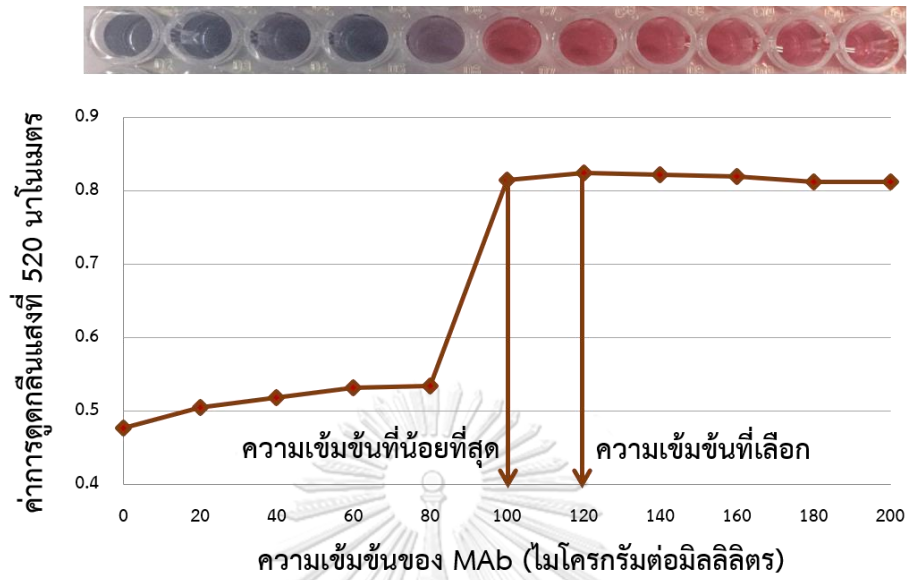
Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.6 การพัฒนาแถบทดสอบ

4.6.1 ผลการเชื่อมติดโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ

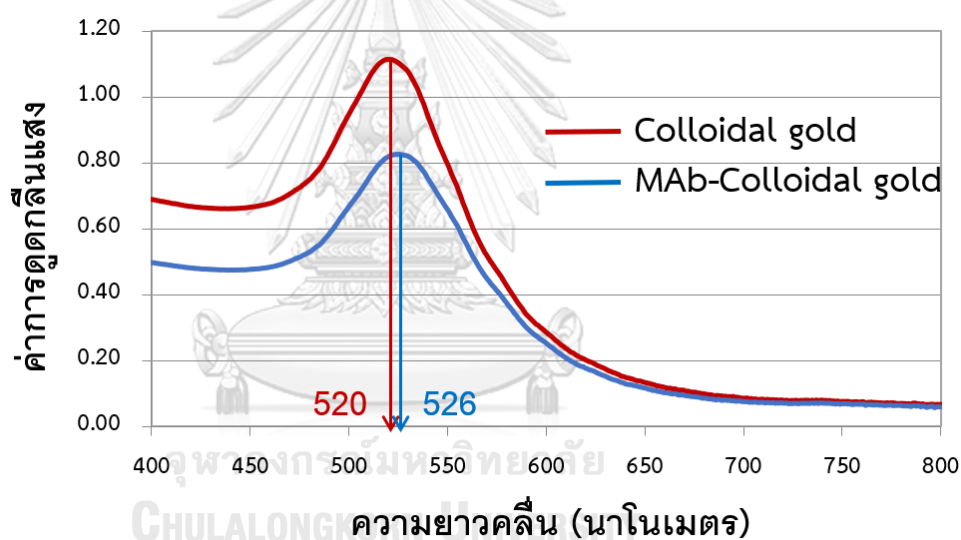
ทำการหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดอนุภาคทองคำ เพื่อไม่ให้อนุภาคทองคำเกิดการจับกันเองและตกตะกอนลงมา เนื่องจากส่งผลต่อความเสถียรของอนุภาคทองคำ โดยทำการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี ให้มีความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย colloidal gold pH 8.2 จากนั้นเติมสารละลาย NaCl และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายยังคงเป็นสีแดงเนื่องจากมีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพียงพอในการติดต่อกับอนุภาคทองคำทำให้อนุภาคทองคำไม่เกิดการจับตัวและตกตะกอนลงมา ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สารละลาย Colloidal gold เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีม่วงเทาเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีน้อยเกินไปทำให้ประจุของ Colloidal gold เปลี่ยนไป เกิดการจับกันเองและตกตะกอนลงมา ความเข้มข้นของ Mab ที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด หรือปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุดที่ทำให้สีสารละลายอนุภาค Colloidal gold เริ่มไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากพิจารณาจากจุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ เพื่อให้การติดต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำมีความเสถียร (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4. 12 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการติดฉลากกับ Colloidal gold

4.6.2 ติดตามการติดตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ

เมื่อได้เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Mab คือ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาติดตามกับ Colloidal gold ทำการติดตามการติดตามระหว่างอนุภาคทองคำก่อนและหลังติดตามด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-800 นาโนเมตร จากภาพที่ 4.13 พบว่า λ_{\max} ของ Colloidal gold เท่ากับ 520 นาโนเมตร ในขณะที่ λ_{\max} ของ Mab-Colloidal gold เพิ่มขึ้นเท่ากับ 526 นาโนเมตร แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีการเชื่อมต่อกับ Colloidal gold ทำให้ค่า λ_{\max} เปลี่ยนไป แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีติดตามกับ Colloidal gold แล้ว จึงนำสารละลาย Colloidal gold-MAb ไปใช้ในการทดลองต่อไป

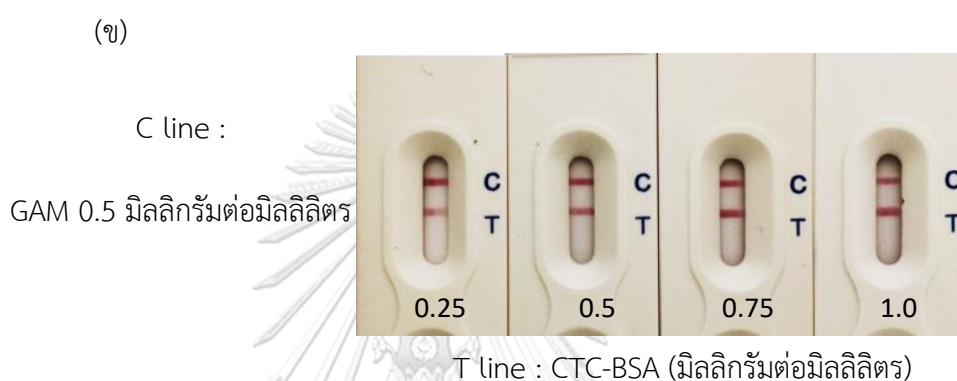
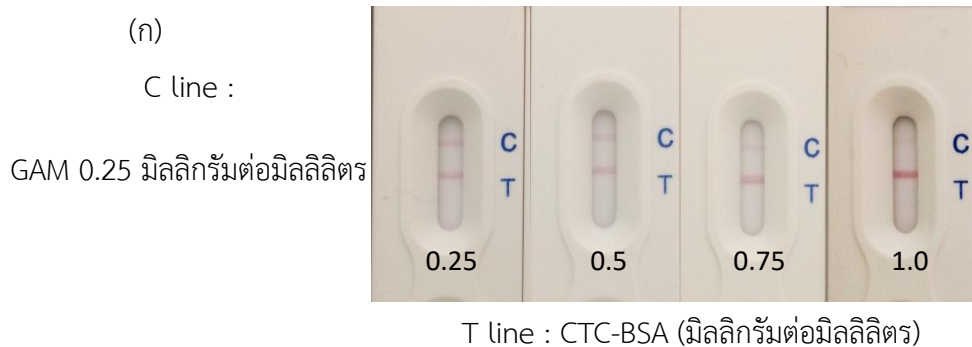


ภาพที่ 4. 13 โครมาโตแกรมของ Colloidal gold และ MAb-Colloidal gold

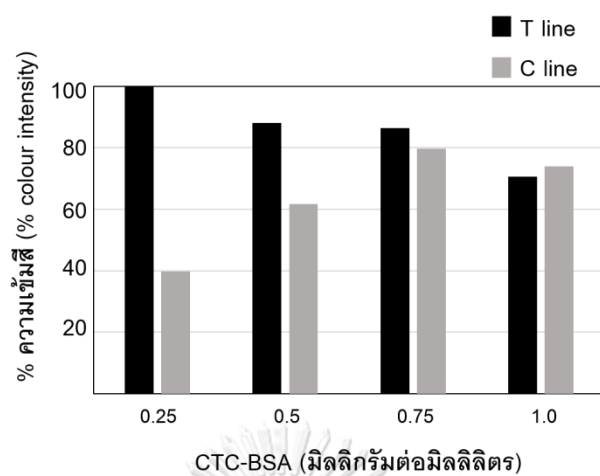
4.6.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ

4.6.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ T line และ C line

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของ C line ที่ตรึงด้วย GAM ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line ที่ตรึงด้วย CTC-BSA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ conjugated pad ที่พ่น MAb-Colloidal gold ด้วยอัตราการพ่น 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร โดยทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ PB-T จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ T line จะทำให้แถบสีที่เกิดขึ้นเพิ่มขึ้น เนื่องจาก Mab-Colloidal gold เคลื่อนที่และจับกับ CTC-BSA ได้มากขึ้น และเมื่อเคลื่อนที่ผ่าน C line ความเข้มข้น 0.25 ให้แถบสีที่จางลงตาม Mab-colloidal gold ที่เหลือจาก T line และ MAb-colloidal gold สามารถจับกับบริเวณนี้ได้เล็กน้อย เพราะ C line มีความเข้มข้นที่น้อยเกินไป (ภาพที่ 4.14 ก.) ในทางกลับกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ C line มากขึ้น MAb-colloidal gold ที่เหลือสามารถถูกจับได้ที่บริเวณ C line ได้มากขึ้น (ภาพที่ 4.14 ข.) ดังนั้นจึงเลือก C line ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแถบทดสอบ C line ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาอ่านค่าความเข้มสีโดยใช้โปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m โดยพิจารณาเลือกความเข้มสีของ T line ที่ใกล้เคียงกับ C line จากการอ่านค่าความเข้มสีโดยใช้โปรแกรมพบว่า T line ที่ให้ความเข้มสีใกล้เคียงกับ C line คือ T line ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4. 14 (ก) แถบทดสอบที่ C line คือ GAM 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ CTC-BSA 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข) แถบทดสอบที่ C line คือ GAM 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ CTC-BSA 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ PB-T

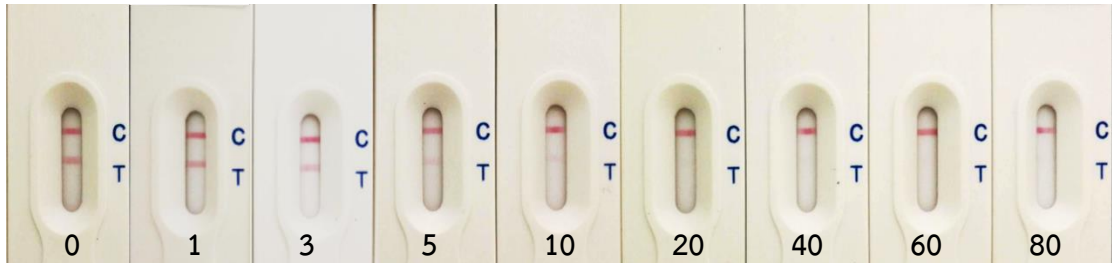


ภาพที่ 4. 15 แสดงค่าความเข้มสีของแถบทดสอบ C line คือ GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ BSA-CTC ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

4.7 ผลการหาความไวของแถบทดสอบ

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบ ได้สภาวะ C line คือ GAM ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ T line คือ CTC-BSA 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พัน MAb-Colloidal gold ด้วยอัตราสารพัน 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นเตรียมแถบทดสอบที่สภาวะข้างต้นมาหดยสารละลายมาตรฐาน CTC เข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในช่องตัวอย่างแถบทดสอบ โดยจะอ่านผลการทดลองภายใน 15 นาที โดยหาค่าความไวของแถบทดสอบโดยพิจารณาจากค่าตัดออก (cut off) คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของเส้น T line หายไป และค่า VLOD คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยังคงเห็นสีของเส้น T line ด้วยตาเปล่า และค่า LOD จากค่าความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของความเข้มสีที่เท่ากับ 20 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มของของ CTC ในสารละลายมาตรฐานเพิ่มมากขึ้น CTC ในสารละลายจะจับกับ MAb-Colloidal gold ที่อยู่บน conjugate pad ทำให้เหลือ MAb-Colloidal gold ที่จะจับบริเวณ T line น้อยลง ทำให้สีจางลง และเมื่อ Mab-colloidal gold ถูกจับกับ CTC จนหมด จะส่งผลให้ไม่ปรากฏแถบสีที่บริเวณเส้น T line (ภาพที่ 4.16 ก) จากการอ่านผลการทดลองด้วยตาเปล่าพบว่าค่า cutoff เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า VLOD เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ภาพที่ 4.16 ข) นำค่า % ความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ตารางที่ 4.10) มาสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายน้ำฝิ่งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ ได้สมการเส้นตรงคือ $y = -17\ln(x) + 61.952$ (ภาพที่ 4.17) พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 2.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

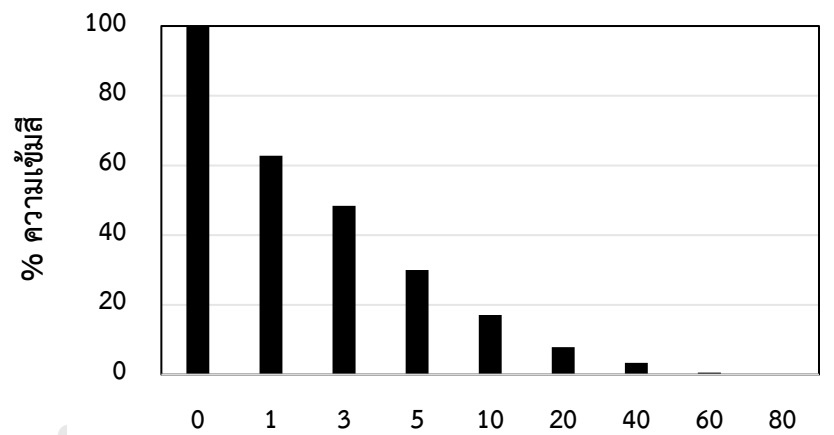
(ก)



สารละลายมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ PBT



(ข)

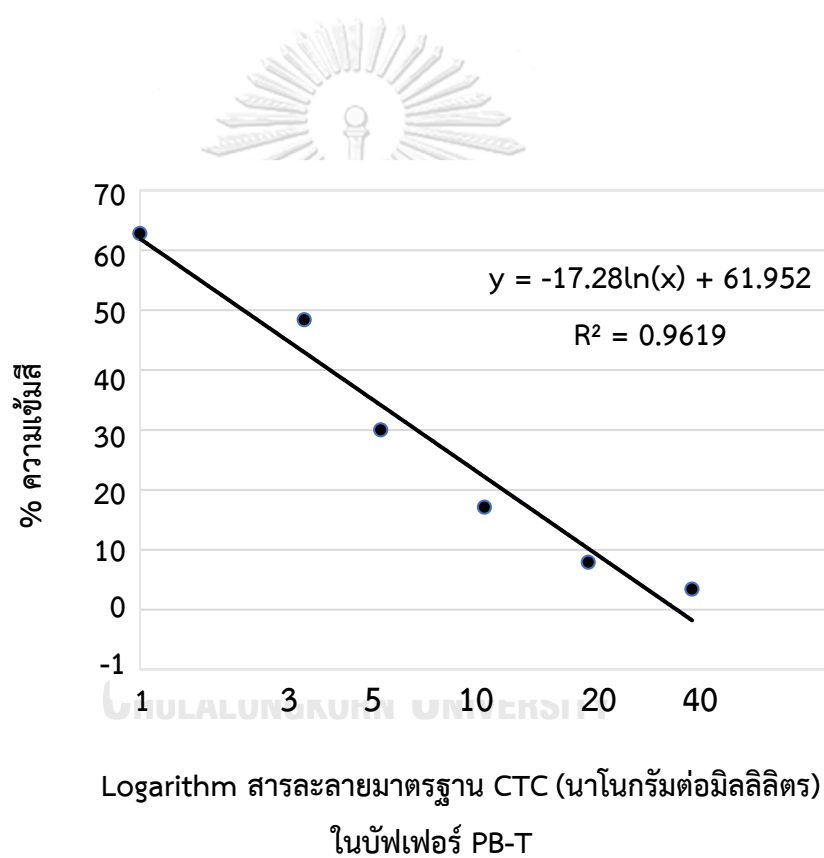


สารมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ PB-T

ภาพที่ 4. 16 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน บัฟเฟอร์ PB-T เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของT line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

ตารางที่ 4. 10 แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้น CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

	ความเข้มข้น CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)									
	0	1	3	5	10	20	40	60	80	
% ความเข้มข้น	100	62.8	48.4	30	17.1	7.9	3.4	0.6	0	
% การลดลงของ ความเข้มข้น	0	37.2	51.6	70.0	82.9	92.1	96.6	99.4	100	



ภาพที่ 4. 17 กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

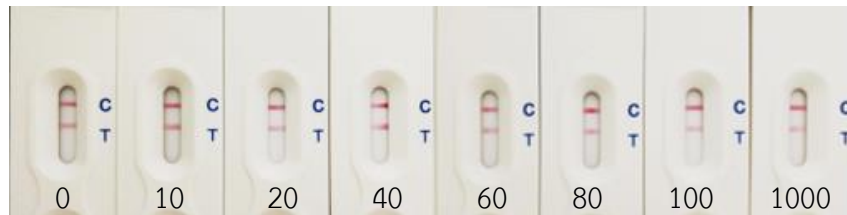
4.8 ความจำเพาะของแถบทดสอบ

ทดสอบความจำเพาะของแถบทดสอบ โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะในกลุ่มเทตระไซคลิน ได้แก่ Tetracycline (TC), Oxycycline (OTC), Doxycycline (DOX), และยาปฏิชีวนะนอกกลุ่ม ได้แก่ Chloramphenicol, Norfloxacin และ Sulfamethazine ที่ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยจะอ่านค่าภายใน 15 นาที จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายยาปฏิชีวนะในกลุ่มและนอกกลุ่มเตตราไซคลินเพิ่มขึ้น ไม่ทำให้บริเวณเส้น T line หายไป แสดงว่าแถบทดสอบ CTC มีความจำเพาะต่อ CTC เท่านั้น และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม (ภาพที่ 4.18) และนอกกลุ่มเทตระไซคลิน (ภาพที่ 4.19)

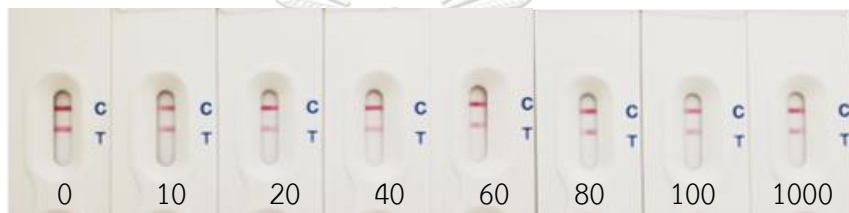




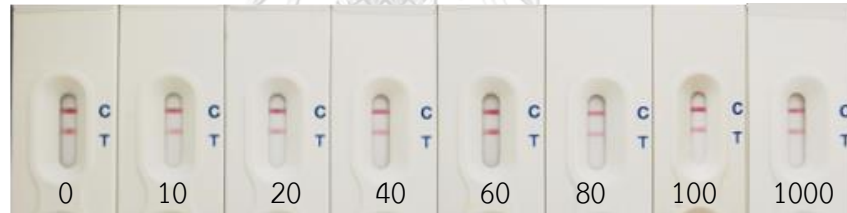
สารละลายมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



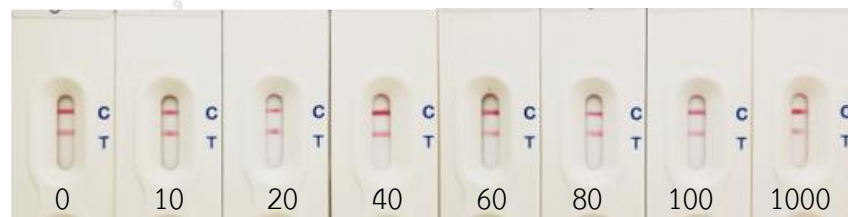
สารละลายมาตรฐาน TC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



สารละลายมาตรฐาน OTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



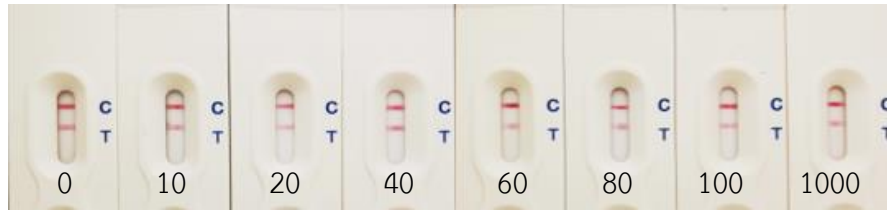
สารละลายมาตรฐาน DC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



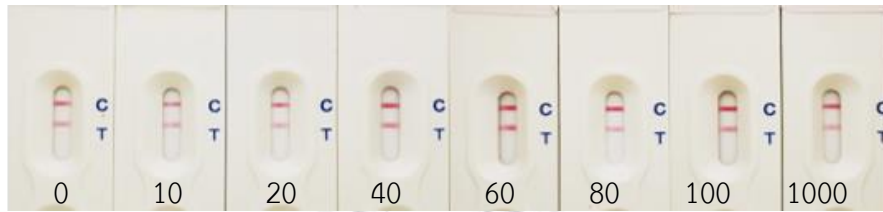
สารละลายมาตรฐาน MNC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาพที่ 4.18 แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม TCs ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ PB-T

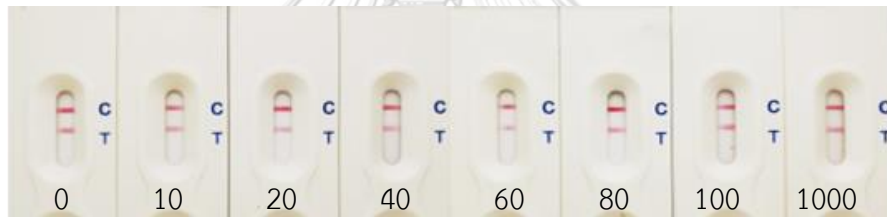
0-



สารละลายมาตรฐาน Chloramphenicol (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



สารละลายมาตรฐาน Norfloxacin (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



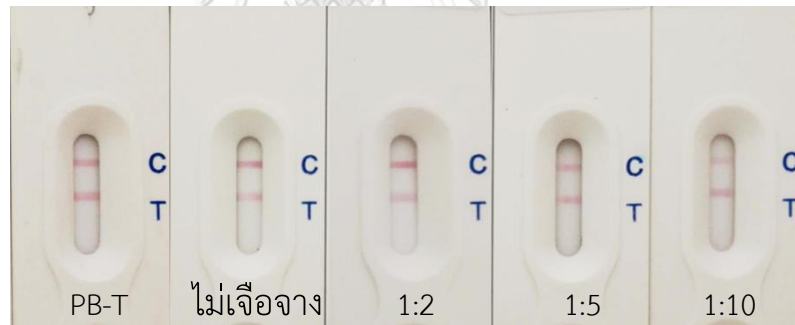
สารละลายมาตรฐาน Sulfamethazine (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาพที่ 4.19 แถบทดสอบที่ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะนอกกลุ่มเทตระไซคลิน ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ PB-T

4.9 การประเมินประสิทธิภาพแถบทดสอบในผลิตภัณฑ์อาหาร

4.9.1 การศึกษาเมทริกซ์ (Matrix effect) ในน้ำมัน

เมทริกซ์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ โดยในนมมีองค์ประกอบต่างๆ เช่น ไขมัน แร่ธาตุ และสารอื่นๆ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของแถบทดสอบ โดยทดสอบกับน้ำมันที่ไม่เจือจางและเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T เนื่องจากวิธีการเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดผลของเมทริกซ์ เมื่อนำมาทดสอบกับแถบทดสอบพบว่าน้ำมันทุกการเจือจางสามารถเคลื่อนที่ผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปได้ (ภาพที่ 4.20) จึงเลือกน้ำมันที่ระดับการเจือจาง 1:5 โดยพิจารณาจากระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ให้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวควบคุมซึ่งระดับการเจือจาง 1:5 จะใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำมันสำหรับการประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำมันต่อไป



ระดับการเจือจางน้ำมัน

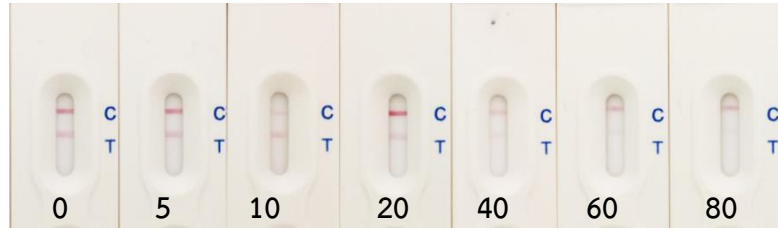
ภาพที่ 4. 20 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยน้ำมันที่ไม่เจือจางและระดับเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10

4.9.2 ผลการหาความไวของแถบทดสอบในน้ำนม

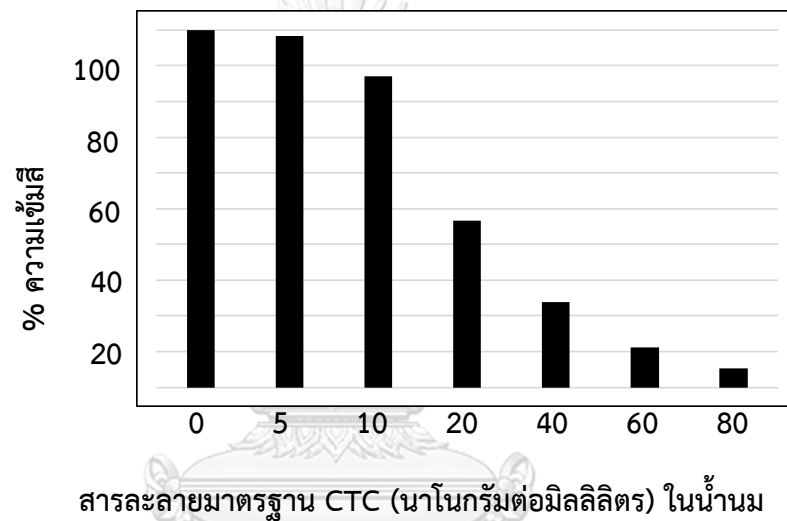
จากการศึกษาผลของเมทริกซ์ในน้ำนมพบว่าใช้น้ำนมที่ระดับการเจือจาง 1:5 เท่านั้นทดสอบกับแถบทดสอบมาทดสอบหาความไวโดยเติม CTC ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับแถบทดสอบ 100 ไมโครลิตร จากภาพที่ 4.21 ก จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น CTC แถบสีของ T line จะจางลงเนื่องจาก MAb-Colloidal gold เกิดการแย่งกับ CTC อิสระในสารละลายจึงไม่เหลือ Mab-Colloidal gold ที่จะจับกับ CTC-BSA ที่ T line จาก การอ่านผลการทดลองด้วยตาเปล่าพบว่าค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ภาพที่ 4.21ข) นำค่า % ความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ตารางที่ 4.11) มาสร้าง กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายน้ำนมที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ ได้สมการ เส้นตรงคือ $y = -36.23\ln(x) + 160.57$ (ภาพที่ 4.22) พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 9.2 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร

จากการเปรียบเทียบกับความไวของแถบทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T พบว่าค่าความไวของแถบทดสอบลดลงจาก 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย ตัวอย่างน้ำนม เนื่องจากการเจือจางเพื่อลดผลของเมทริกซ์ในน้ำนม ก็ยังส่งผลถึงค่าความไวของแถบ ทดสอบด้วย

(ก.)



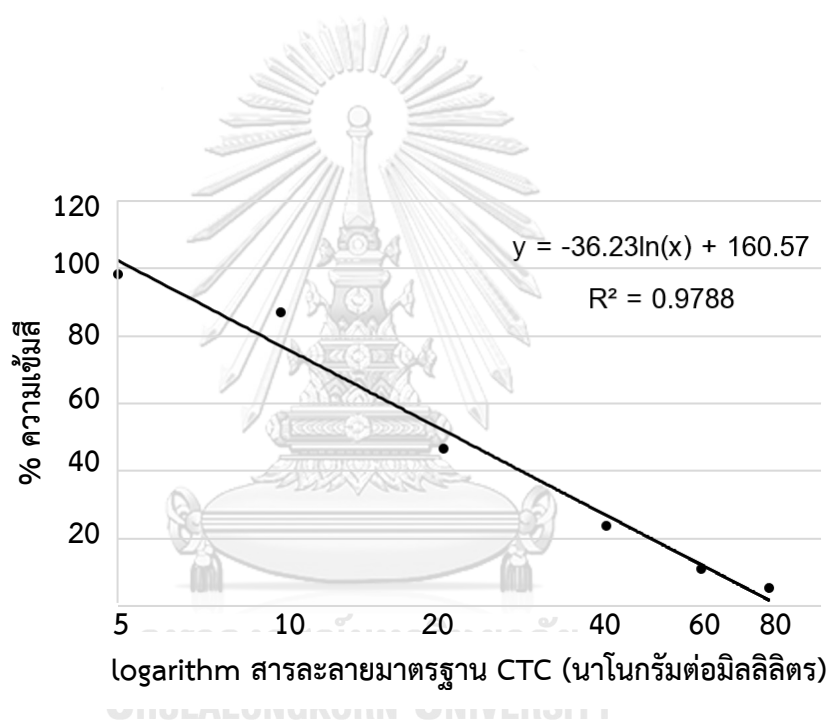
(ข)



ภาพที่ 4. 21 (ก) แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายน้ำนม เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

ตารางที่ 4. 11 แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้น CTC ความเข้มข้น
0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำนม

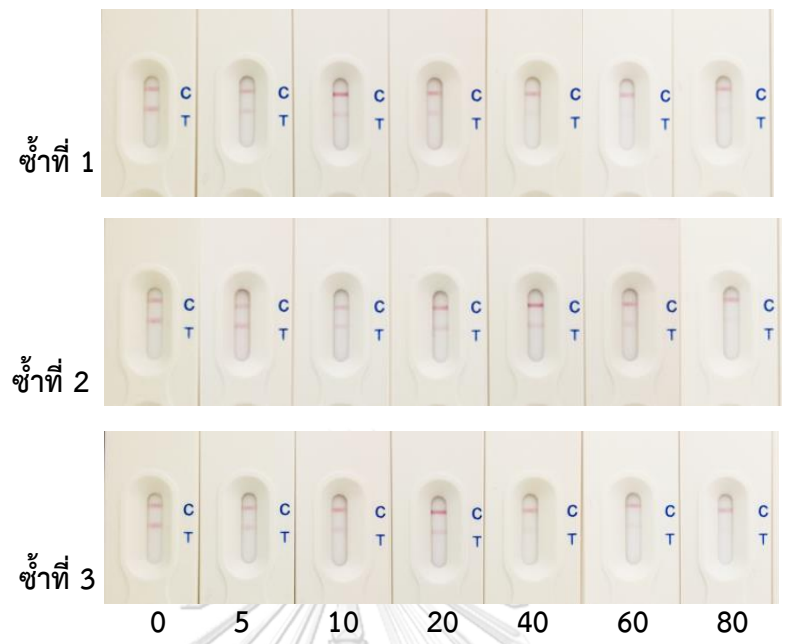
	ความเข้มข้น CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	5	10	20	40	60	80
% ความเข้มข้น	100	98.4	87.0	46.6	23.9	11.1	5.3
% การลดลงของความเข้มข้น	0	1.6	13	53.4	76.1	88.9	94.7



ภาพที่ 4. 22 กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในน้ำนมที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ โดยอ่านค่า
ความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

4.8.3 การหาความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบในน้ำนม

หาปริมาณคลอโรเทระไซคลิน ที่เติมในตัวอย่งน้ำนม โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรมาทดสอบกับแถบทดสอบ จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m มาทำกราฟมาตรฐานของคลอโรเทระไซคลิน ในสารละลายตัวอย่างน้ำนม (ภาพที่ 4.22) หาความเข้มข้นคลอโรเทระไซคลินที่เติมลงไป โดยนำมาหาความถูกต้องจากการคำนวณ %recovery และความแม่นยำจากการคำนวณ %CV ที่ได้จากการทำ Intra-variation assay และ Inter-variation assay โดยนำค่าความเข้มสีของแถบทดสอบที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m มาใส่ในสมการเส้นตรงคือ $y = -36.23\ln(x) + 160.57$ จากผลการทดลองพบว่าการทำ Intra-variation assay มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 76.3-113.7% และ % CV อยู่ในช่วง 1.1-17.6 % และการทำ Inter-variation พบว่าค่า %recovery และ %CV อยู่ในช่วง 85.3-114.5% และ 1.09-15.4 % (ตารางที่ 4.12) จากการทดลองทำ Intra-variation assay และ Inter-variation พบว่าค่า %recovery และ %CV อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 80-120 % และไม่เกิน 20% ตามลำดับ จากผลการทดลองหาความถูกต้องและความแม่นยำโดยอ่านค่าความเข้มสีโดยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m พบว่าแถบทดสอบสามารถตรวจวัดปริมาณคลอโรเทระไซคลิน ในสารละลายตัวอย่างน้ำนมได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ



สารละลายมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในตัวอย่างน้ำนม

ภาพที่ 4.23 การทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำนม

ตารางที่ 4. 12 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay และ inter-variation assay ในตัวอย่าง
น้ำนม

ปริมาณ CTC (ng/ml)	Intra assay (n = 3)			Inter assay (N=3, n = 3)		
	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV
5.0	5.2 ± 0.5	108	9.6	5.2 ± 0.1	104	1.9
10.0	11.3 ± 2.0	113	17.6	11 ± 1.7	110	15.4
20.0	21.0 ± 2.2	105	10.4	20.5 ± 0.8	102.5	3.9
40.0	45.5 ± 2.2	113.7	4.8	45.8 ± 0.5	114.5	1.09
60	54.2 ± 0.6	90.3	1.1	54.7 ± 2.9	91.1	4.2
80	61 ± 1.08	76.3	1.7	68.3 ± 10	85.3	14.6

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.8.4 การศึกษาเมทริกซ์ในน้ำฝิ่ง

เนื่องจากความหนืดของน้ำฝิ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อการไหลและการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของแถบทดสอบ จึงทำการเจือจางเพื่อลดเมทริกซ์โดยเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T เมื่อนำมาทดสอบกับแถบทดสอบ พบว่าน้ำฝิ่งที่ระดับการเจือจาง 1:2 ไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนได้ ส่วนระดับการเจือจาง 1:5 และ 1:10 สามารถเคลื่อนที่ผ่านไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนได้ (ภาพที่ 4.24) จึงเลือกน้ำฝิ่งที่ระดับการเจือจาง 1:10 โดยพิจารณาจากระดับการเจือจางที่น้อยที่สุดที่ให้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวควบคุมซึ่งระดับการเจือจาง 1:10 จะใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำฝิ่งต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระดับการเจือจางน้ำฝิ่ง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

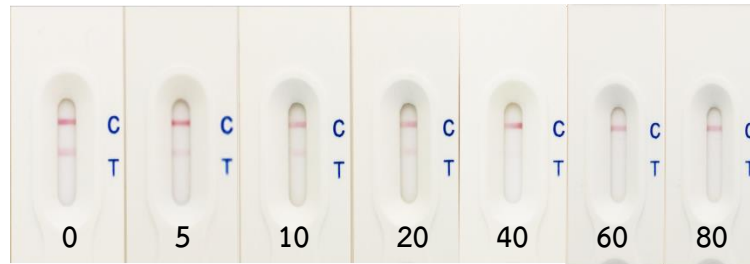
ภาพที่ 4. 24 แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยน้ำฝิ่งที่ระดับเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10

4.8.5 การหาความไวของแถบทดสอบในน้ำฝิ่ง

จากการศึกษาผลของเมทริกซ์ในน้ำฝิ่งพบว่าใช้น้ำฝิ่งที่ระดับการเจือจาง 1:10 มาทดสอบกับ แถบทดสอบมาทดสอบหาความไวโดยเติม CTC ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับแถบทดสอบ 100 ไมโครลิตร จากภาพที่ 4.25 ก จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น CTC แถบสีของ T line จะจางลงเนื่องจาก MAb-Colloidal gold เกิดการแย่ง กับ CTC อิสระในสารละลายจึงไม่เหลือ Mab-Colloidal gold ที่จะจับกับ CTC-BSA ที่ T line จากการอ่านผลการทดลองด้วยตาเปล่าพบว่าค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ภาพที่ 4.25 ข) นำค่า % ความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m (ตารางที่ 4.13) มาสร้าง กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายน้ำฝิ่งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบ ได้สมการเส้นตรง คือ $y = -15.69\ln(x) + 74.544$ (ภาพที่ 4.26) พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 2.66 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

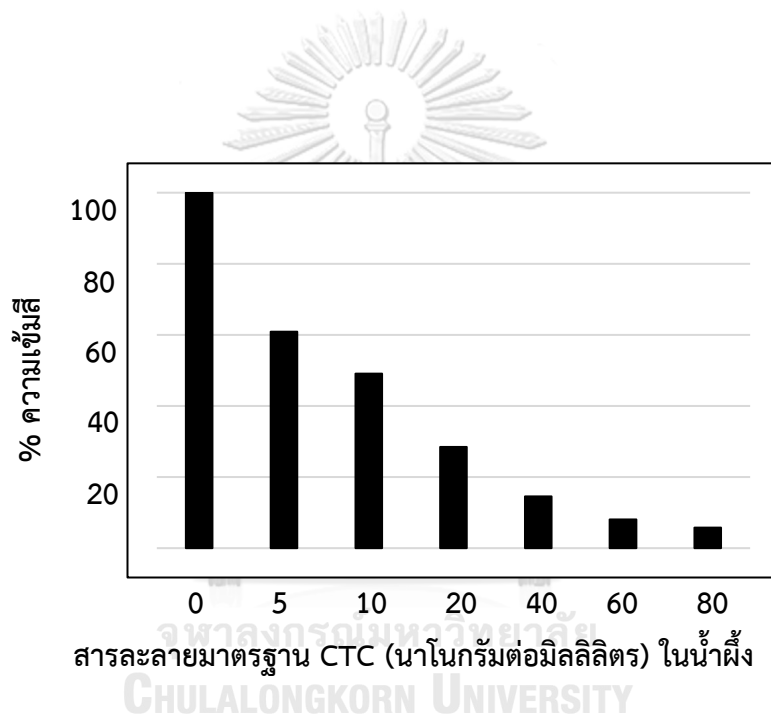
จากการเปรียบเทียบกับความไวของแถบทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ PB-T พบว่าค่าความ ไวของแถบทดสอบลดลงจาก 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย ตัวอย่างน้ำฝิ่ง เนื่องจากการเจือจางเพื่อลดผลของเมทริกซ์ในน้ำฝิ่ง ก็ยังส่งผลถึงค่าความไวของแถบ ทดสอบด้วย

(ก)



สารละลายมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในน้ำฝิ่ง

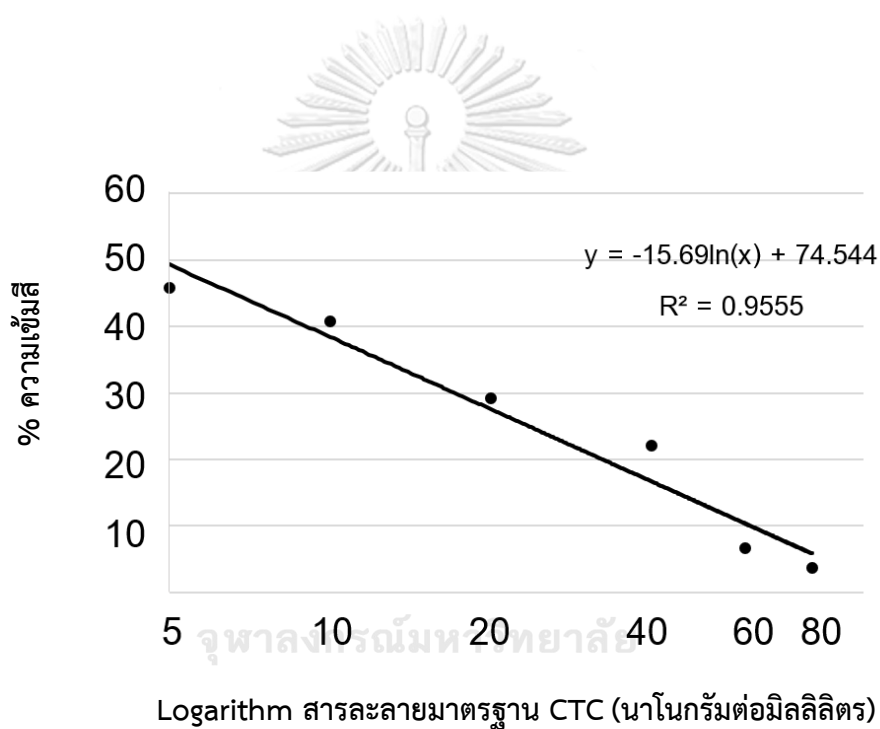
(ข.)



ภาพที่ 4. 25 (ก) แถบทดสอบที่ทดสอบด้วยสารละลายมาตรฐาน CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายน้ำฝิ่ง เพื่อหาความไวของแถบทดสอบ และ (ข) แสดงค่า % ความเข้มสีของ T line ที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

ตารางที่ 4. 13 แสดง % ความเข้มข้นและการลดลงของความเข้มข้น CTC ความเข้มข้น 0-80 นาโนกรัมต่อมิลลิตรในน้ำผึ้ง

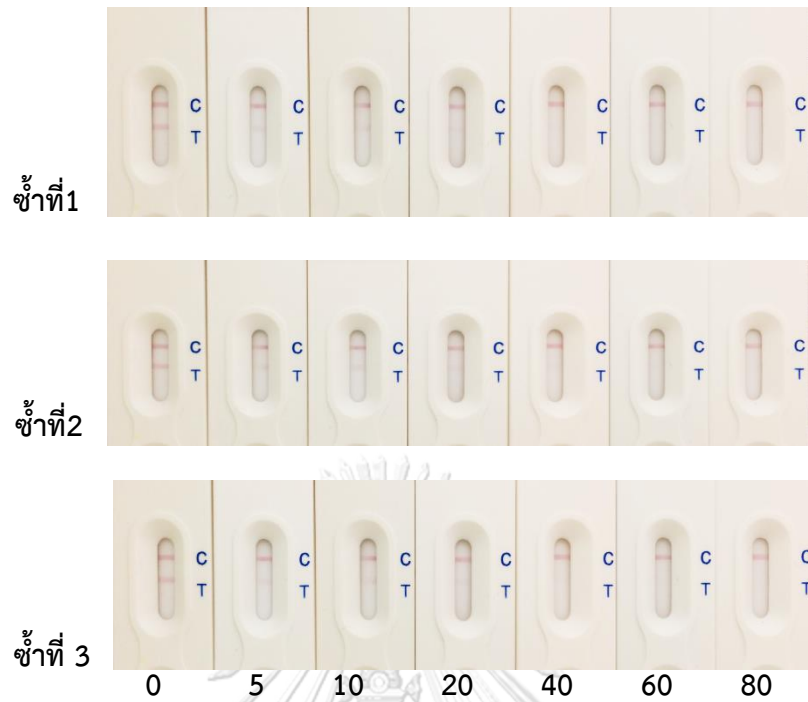
	ความเข้มข้น CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)						
	0	5	10	20	40	60	80
% ความเข้มข้น	100	60.9	49.1	28.47	14.55	8.08	5.8
% การลดลงของความเข้มข้น	0	39.1	50.9	71.53	85.4	91.9	94.2



ภาพที่ 4. 26 กราฟสารละลายมาตรฐานของ CTC ในสารละลายน้ำผึ้งที่ทดสอบด้วยแถบทดสอบโดยอ่านค่าความเข้มข้นด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m

4.8.6 การหาความถูกต้องและความแม่นยำของแถบทดสอบในน้ำฝิ่ง

หาปริมาณคลอโรเทอเรไซคลิน ที่เติมในตัวอย่างน้ำฝิ่ง โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับแถบทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำค่าความเข้มสีที่ได้จากโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m มาทำกราฟมาตรฐานของคลอโรเทอเรไซคลิน ในสารละลายตัวอย่างน้ำฝิ่ง (ภาพที่ 4.27) หาความเข้มข้นคลอโรเทอเรไซคลิน ที่เติมลงไป โดยนำมาหาความถูกต้องจากการคำนวณ %recovery และความแม่นยำจากการคำนวณ %CV ที่ได้จากการทำ Intra-variation assay และ Inter-variation assay โดยนำความเข้มสีของแถบทดสอบที่อ่านด้วยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m มาใส่ในสมการเส้นตรงคือ $y = -15.69\ln(x) + 74.544$ จากผลการทดลองพบว่าการทำ Intra-variation assay มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 66-133% และ % CV อยู่ในช่วง 14.2-29.9 % และการทำ Inter-variation พบว่าค่า %recovery และ %CV อยู่ในช่วง 76-132% และ 6.6-38.4 % (ตารางที่ 4.14) จากการทดลองทำ Intra-variation assay และ Inter-variation พบว่าค่า %recovery และ %CV อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเกณฑ์ที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 80-120 % และไม่เกิน 20% ตามลำดับ จากผลการทดลองหาค่าความถูกต้องและความแม่นยำโดยอ่านค่าความเข้มสีโดยโปรแกรม ImageJ รุ่น 1.47m พบว่าแถบทดสอบสามารถตรวจวัดปริมาณคลอโรเทอเรไซคลิน ในสารละลายตัวอย่างน้ำฝิ่งได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ



สารละลายมาตรฐาน CTC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ภาพที่ 4. 27 การทดสอบ CTC ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4. 14 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay และ inter-variation assay ในตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ปริมาณ CTC (ng/ml)	Intra assay (n = 3)			Inter assay (N=3, n = 3)		
	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery	%CV
5.0	3.3 ± 0.5	66	14.2	3.9 ± 1.5	78	38.4
10.0	13.8 ± 3.0	130	21.7	13.2 ± 0.8	132	6.6
20.0	16.4 ± 3.9	82	23.7	19.2 ± 5.1	96	26.5
40.0	53.5 ± 16.0	133	29.9	40 ± 12	100	30
60	59.7 ± 17.3	99.5	28.9	63.6 ± 12	106	18.8
80	76.4 ± 15.7	95.5	20.5	79.2 ± 8.6	99	10.8

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

วิธีการตรวจหา CTC ตกค้างในอาหารสามารถทำได้ทั้งวิธีการยืนยันผลโดยใช้เครื่องมือ (confirmation method) และวิธีการคัดกรองเบื้องต้น (screening method) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีทางอิมมูโนแอสเสย์ ทั้งวิธี ELISA และ immunochromatography รูปแบบการแข่งขัน (competitive format) เนื่องจาก CTC เป็นสารขนาดโมเลกุลเล็ก ดังนั้นจึงต้องพัฒนาวิธีการตรวจหา CTC ตกค้างในอาหาร โดยการเปรียบเทียบวิธี ELISA และ immunochromatography พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่ให้ผลเชิงปริมาณซึ่งอ่านสัญญาณการตรวจวัดของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน โดยการพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยาเอนไซม์กับสับสเตรท อ่านผลด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA จึงเป็นวิธีที่มีความไวสูง มีหลายขั้นตอนและใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง (ไม่รวมขั้นตอนการเคลือบหลุมจาน ELISA) ในขณะที่วิธี immunochromatography ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาสารตกค้างในอาหาร โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลเชิงคุณภาพ (ผลบวกหรือผลลบ) หรือกึ่งปริมาณ (มากกว่าหรือน้อยกว่าค่า cutoff) ซึ่งอ่านสัญญาณการตรวจวัดด้วยอนุภาคทองคำเชื่อมติดกับแอนติบอดีจึงสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววิธี immunochromatography มีความไวน้อยกว่าวิธี ELISA อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้มีขั้นตอนที่ง่ายมีเพียงขั้นตอนเดียวและใช้เวลาประมาณ 15 นาที อีกทั้งมีขนาดเล็กจึงสามารถเคลื่อนย้ายไปทดสอบภาคสนามได้รวมทั้งไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบและไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง โดยเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 วิธีจะพบว่าวิธี ICA เป็นวิธีที่ง่ายและเร็วกว่าวิธี ELISA ดังนั้นซึ่งนำไปสู่งานวิจัยในครั้งนี้ที่จะพัฒนาวิธีแถบทดสอบในการตรวจวัด CTC ตกค้างในตัวอย่างน้ำมันและน้ำผึ้ง

เนื่องจาก CTC เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลน้อยจึงไม่เหมาะสมในกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลอง ให้สร้างแอนติบอดีต่อ CTC โดยตรงได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเชื่อม CTC กับโปรตีนพาหะ BSA ให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ก่อนจึงจะนำไปฉีดสัตว์ทดลองได้ หลังจากฉีดกระตุ้นหนูทดลองและนำซีรัมของหนูแต่ละตัวไปหาระดับแอนติบอดี (ไตเตอร์) พบว่าให้ระดับไตเตอร์อยู่ในช่วง 1:128,000-1:156,000 และสามารถทำปฏิกิริยากับ CTC ในรูปอิสระได้ จากนั้นจึงนำเซลล์ม้าของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย CTC มาหลอมรวมกับเซลล์มัยโอโลมา P3X ทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่เสถียรในการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CTC เพียง 1 โคลน จากการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG₁ มีค่า LOD เท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความไว

(IC₅₀) เท่ากับ 0.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความจำเพาะสูงต่อ CTC ซึ่งเกิดปฏิกิริยาข้ามต่ำกับ สารในและนอกกลุ่มเทพระไซคลินน้อยกว่า 0.033% โดยวิธี icELISA จึงเหมาะสำหรับตรวจวัด เฉพาะ CTC

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานการผลิตแอนติบอดีต่อ CTC ทั้งในรูปแบบโพลีโคลนอล แอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยในปี 2008 Zhao และคณะ ได้ผลิตโพลีโคลนอล แอนติบอดีต่อ CTC ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.0 ± 6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกิดปฏิกิริยาข้ามต่ำกับ TC เท่ากับ 3 % โดยวิธี ELISA (25) และในปี 2011 ได้พัฒนาวิธี ELISA และ ICA โดยใช้ MAb ต่อ CTC ที่ผลิตได้ พบว่าวิธี ELISA ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.66 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ สารในกลุ่มและนอกกลุ่มเทพระไซคลินน้อยกว่า 0.06% (26) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในงานวิจัยครั้งนี้โมโน โคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวสูงกว่าและมีความจำเพาะต่อ CTC

จากข้อมูลของวิธี ELISA แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไวสูงพอสำหรับ นำไปพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจหา CTC โดยวิธี immunochromatography แบบ lateral flow ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ ซึ่งพบว่าแถบทดสอบ ต้นแบบ บริเวณ T-line ใช้ BSA-CTC ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ใช้ โมโน โคลนอลแอนติบอดีเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเชื่อมติดกับอนุภาคของค่าขนาด 40 นา โนเมตร หลังจากประกอบเป็นชุดแถบทดสอบพบว่าแถบทดสอบให้ค่าความไวหรือค่า cutoff ที่ความ เข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า VLOD ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อแปลผลด้วย ตาเปล่า นอกจากนี้ได้ถ่ายรูปและใช้โปรแกรม Image J รุ่น 1.47 m ในการอ่านผลทดสอบพบว่าให้ ค่า LOD เท่ากับ 2.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการใช้เครื่องมือมาช่วยในการอ่านผลจะ สามารถหาความไวได้สูงกว่าการแปลผลด้วยสายตา และในส่วนของความจำเพาะของแถบทดสอบนั้น พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาในกลุ่มและนอกกลุ่มเทพระไซคลิน เช่นเดียวกับวิธี ELISA

การนำ MAb ไปใช้ในการตรวจหา CTC ในตัวอย่างน้ำนมและน้ำผึ้งโดยการเติมสารมาตรฐาน CTC ลงไปในตัวอย่างและนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA และ ICA โดยผลของส่วนประกอบหรือเมทริกซ์ ที่อยู่ในอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความถูกต้อง (%recovery) และความแม่นยำ (%CV) (28) (25) ดังนั้นเพื่อลดผลการรบกวนดังกล่าวจึงทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนการทดสอบด้วย วิธี ELISA ในน้ำนมและน้ำผึ้งซึ่งเจือจาง 1:40 ก่อนทำการทดสอบ สำหรับวิธี ICA ตัวอย่างน้ำนมและ น้ำผึ้งจะถูกเจือจาง 1:5 และ 1:10 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมทริกซ์ในอาหารมีผลกระทบต่อวิธี ELISA มากกว่าวิธี ICA

เมื่อทดสอบในน้ำนมโดยวิธี ELISA มี %Recovery อยู่ในช่วง 100-105.5 % และ %CV อยู่ในช่วง 3.3-9 % ในน้ำผึ้งมี %Recovery อยู่ในช่วง 99-104 % และ %CV อยู่ในช่วง 1.8-10.1 % จากนั้นทดสอบโดยวิธี ICA พบว่าในน้ำนม มีค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ในน้ำผึ้งมีค่า VLOD เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า cutoff เท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแถบทดสอบ CTC ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจหา CTC ตกค้างในอาหารได้อยู่ในเกณฑ์ความเชื่อมั่นและยอมรับได้โดยสามารถตรวจวัด CTC ได้ต่ำกว่าค่า MRLs ในน้ำนมเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำผึ้ง เท่ากับ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CTC ที่ผลิตได้นั้นมีความไวสูงและมีปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มเทอร์ราไซคลินต่ำ จึงสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาแถบทดสอบ CTC ต้นแบบที่สามารถใช้งานง่ายและแปลผลทดสอบได้รวดเร็วภายใน 15 นาทีด้วยตาเปล่า ดังนั้นแถบทดสอบนี้จึงสามารถนำไปตรวจคัดกรองเบื้องต้นเพื่อหา CTC ในตัวอย่างน้ำนมและน้ำผึ้งได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแถบทดสอบนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจคัดกรองสารตกค้างเบื้องต้นซึ่งสามารถรายงานผลในเชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณเท่านั้น อย่างไรก็ตามหากต้องการผลที่มีความแม่นยำมากกว่านี้อาจจำเป็นต้องทำการทดสอบในสารละลายตัวอย่างจำนวนซ้ำเพิ่มขึ้น โดยในงานวิจัยครั้งนี้ทดสอบกับตัวอย่างสารละลายน้ำผึ้งและน้ำนมเพียงจำนวน 3 ซ้ำซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อความถูกต้องและความแม่นยำ นอกจากนี้ยังสามารถนำแถบทดสอบไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหา CTC ในตัวอย่างอาหารประเภทอื่นได้ เช่น ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (เนื้อสัตว์, ตับ, ไต, ไข่)



ภาคผนวก

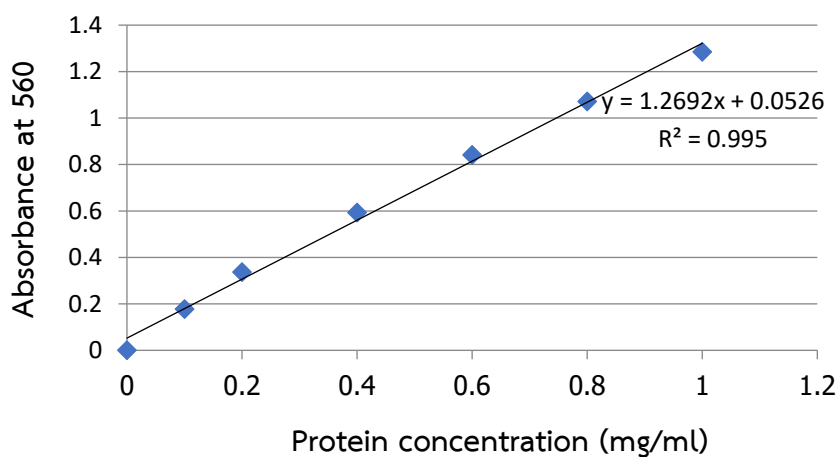
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐานด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA

ความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0.0000
0.1	0.1770
0.2	0.3366
0.4	0.5926
0.6	0.8407
0.8	1.0712
1	1.2845



ภาพที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA

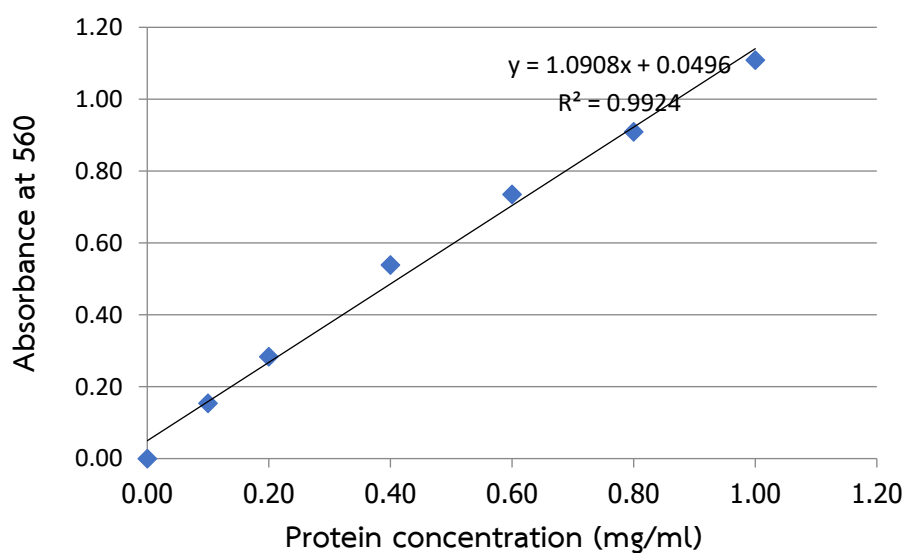
ตารางที่ ก. 2 ปริมาณโปรตีนของ CTC-BSA ด้วยวิธี BCA assay

ระดับการเจือจาง CTC-BSA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ CTC-BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/4	1.03	2.77
1/8	0.61	2.87
1/16	0.37	2.71
ค่าเฉลี่ย		2.78



ตารางที่ ก. 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย OVA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0.0000
0.1	0.1540
0.2	0.2835
0.4	0.5386
0.6	0.7349
0.8	0.9092
1	1.1087



ภาพที่ ก. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA

ตารางที่ ก. 4 ปริมาณโปรตีนของ CTC-OVA ด้วยวิธี BCA assay

ระดับการเจือจาง CTC-OVA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ CTC-OVA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/4	1.03	2.74
1/8	0.58	2.67
1/16	0.36	2.51
ค่าเฉลี่ย		2.63



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ข.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อม CTC กับโปรตีนพาหะ

1) 0.1 M MES, pH 4.7 ที่มี 0.15 M NaCl

MES monohydrate	21.33	กรัม
-----------------	-------	------

NaCl	8.77	กรัม
------	------	------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

ปรับ pH ให้ได้ 4.7 ด้วย 1 M HCl

2) 37% (v/v) Formaldehyde

40 % Formaldehyde	9.25	มิลลิลิตร
-------------------	------	-----------

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้เป็น	0.75	มิลลิลิตร
----------------------------	------	-----------

ข.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

1) Stock HAT 100X

Hypoxanthine	0.1361	กรัม (ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
--------------	--------	--------------------------------

Aminopterin	0.0018	กรัม (ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
-------------	--------	--------------------------------

Thymidine	0.038	กรัม (ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
-----------	-------	--------------------------------

ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 22

ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ เนื่องจาก Aminopterin ละลายยากให้นำไปอุ่นที่ water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิด 60 องศา

เซลเซียสจนกว่าจะละลาย

2) Stock 100XHT

Hypoxanthine	0.0018	กรัม (ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
--------------	--------	--------------------------------

Thymidine	0.038	กรัม (ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
-----------	-------	--------------------------------

ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 22

ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

RPMI 1640	10.4	กรัม
NaHCO ₃	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดแก้วปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) 50% PEG (Polyethylene glycol)

นำ PEG อุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการหลุมรวมเซลล์นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5) น้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	90	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

1) 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 (equilibrated buffer หรือ buffer A)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.85	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.65	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ไตเตรทสารละลาย Na₂HPO₄ ด้วยสารละลาย NaH₂PO₄ จนได้ pH 7 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) 0.1 M Glycine-HCl buffer, pH 2.7 (eluted buffer หรือ บัฟเฟอร์ B)

Glycine-HCl	7.5	กรัม
ละลายน้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 2.7 ด้วย 6 M HCl กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) 1M Tris-HCl, pH 9.0

Tris base	12.11	กรัม
-----------	-------	------

ปรับ pH ให้ได้ 2.7 ด้วย 6 M HCl กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข.4 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในวิธี ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 (PB stock)

NaH_2PO_4	27.60	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
---------------------------	-------	--------------------------

Na_2HPO_4	71.63	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
---------------------------	-------	--------------------------

ไตเตรทสารละลาย Na_2HPO_4 ด้วยสารละลาย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4

2) 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4

PB stock	1	ลิตร
----------	---	------

NaCl	175	กรัม
------	-----	------

น้ำปราศจากไอออน	18	ลิตร
-----------------	----	------

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
----------	-----	-----------

PBS	1	ลิตร
-----	---	------

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
---------------	---	------

PBS	100	มิลลิลิตร
-----	-----	-----------

5) 0.2 M Citrate buffer pH 4.0

Potassium citrate	33.2	กรัม
-------------------	------	------

Citric acid	21.54	กรัม
-------------	-------	------

น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
-----------------	---	------

ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0

6) Substrate solution

3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	มิลลิลิตร
DMSO	300	มิลลิลิตร
0.2 M Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	3.4	ไมโครลิตร

7) 1 M H₂SO₄ (Stopping reagent)

H ₂ SO ₄ (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	902	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อน

ข.5 Buffers and reagents for ICA test strip

1) 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB)

0.01 PB stock	50	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	950	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำปราศจากไอออนผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อน

2) 0.1% (v/v) Tween-20 in PB (PBT)

Tween-20	1	มิลลิลิตร
PB	1	ลิตร

3) 2 mM sodium borate buffer, pH 8.2 (BB)

Sodium tetraborate	0.76	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
Boric acid	0.12	กรัม (ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ไตเตรทสารละลาย sodium tetraborate ด้วย สารละลาย boric acid จนได้ pH 8.2

4) 0.2 M sodium carbonate

Sodium carbonate	2.12	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

5) 10% (w/v) NaCl

NaCl	10	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

6) 5% (w/v) BSA

BSA	50	มิลลิกรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	มิลลิลิตร

7) 2% (w/v) sucrose

Sucrose	20	มิลลิกรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	มิลลิลิตร

8) 1% (w/v) BSA ใน PB-T (membrane blocking solution)

BSA	100	มิลลิกรัม
PB-T	10	มิลลิลิตร



บรรณานุกรม

1. Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L, et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:288-.
2. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(12):3675-81.
3. Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL 2-2018. [Online]. 2018 [30 ตุลาคม 2561]. Available from: <http://www.fao.org/fao-whocodexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BMRL%2B2%252FMRL2e.pdf> .
4. Navratilova P, Borkovcova I, Dračkova M, Janštova B, Vorlova LJJoFS. Occurrence of tetracycline, chlortetracyclin, and oxytetracycline residues in raw cow's milk. 2009;27(5):379-85.
5. Tarapoulouzi M, Papachrysostomou C, Constantinou S, Kanari P, Hadjigeorgiou M. Determinative and confirmatory method for residues of tetracyclines in honey by LC-MS/MS. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2013;30(10):1728-32.
6. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*. 2016;60(1):111-20.
7. กมลชัย ตรงวานิชนาม. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
8. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulation, Title 21. [Online]. 2018 [2 พฤศจิกายน 2561]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=556.150>.
9. Health Canada. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods. [Online]. 2017 [30 ตุลาคม 2561]. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>.

10. The Japan Food Chemical Research Foundation. Revision of MRLs of agricultural chemicals, feed additives and veterinary drugs in foods. [Online]. 2016 [30 ตุลาคม 2561]. Available from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>.
11. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง. [Online]. 2550 [1 พฤศจิกายน 2561]. : Available from: <http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2/lawfda/38063/1.pdf>.
12. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*. 2016;60(1):111-20.
13. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen AJA, chemistry b. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. 2009;393(2):569-82.
14. สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติเจน (Antigen) [Online]. [20 ตุลาคม 2561.] Available from: http://file.siam2web.com/siam85/pdf/201086_41733.pdf. [Internet].
15. Luttmann Werner, Bratke Kai, Kupper Michael, Myrtek D. *Immunology*. Massachusetts: Elsevier; 2006.
16. ไพศาล สิทธิกรกุล. วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำหรับการเรียนรู้และการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพมหานคร; 2548.
17. Liu JK. The history of monoclonal antibody development—Progress, remaining challenges and future innovations. 2014;3(4):113-6.
18. Liddell JE, Cryer A. *A practical guide to monoclonal antibodies*: John Wiley & Sons; 1991.
19. Wild D. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*: Newnes; 2013.
20. O'Farrell B. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. *Lateral flow immunoassay*: Springer; 2009. p. 1-33.
21. Sajid M, Kawde A-N, Daud MJJoSCS. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. 2015;19(6):689-705.
22. H.Y. WRCaT. *Lateral flow immunoassay*. USA: Springer.
23. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech AJTJoPCB. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. 2006;110(32):15700-7.

24. Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam BJS, research b-s. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. 2016;9:17-22.
25. Zhao C, Peng D, Wang Y, Huang L, Chen D, Tao Y, et al. Preparation and validation of the polyclonal antibodies for detection of chlortetracycline residues. 2008;19(2):163-74.
26. Le T, Yi S-H, Zhao Z-W, Wei WJFA, A CP. Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tissues. 2011;28(11):1516-23.
27. Taranova NA, Kruhlik AS, Zvereva EA, Shmanai VV, Vashkevich II, Semyonov DA, et al. Highly Sensitive Immunochromatographic Identification of Tetracycline Antibiotics in Milk. International journal of analytical chemistry. 2015;2015:347621-.
28. Chen Y, Kong D, Liu L, Song S, Kuang H, Xu CJFAM. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody. 2016;9(4):905-14.
29. Naik L, Sharma R, Mann B, Lata K, Rajput Y, Nath BSJFc. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. 2017;219:85-92.
30. Hermanson GT. Bioconjugate techniques: Academic press; 2013.
31. Faraj BA, Ali FM. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1981;217(1):10-4.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปณิชา พวงมาลัย
วัน เดือน ปี เกิด	19 พฤศจิกายน 2535
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	29/353 หมู่บ้านวรารักษ์ ตำบลคลอง 3 อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
ผลงานตีพิมพ์	Production and characterization of monoclonal antibody against chlortetracycline



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY