รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

Development of tetracycline test kit by enzyme-linked immunosorbent assay

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

นายอณุมาศ บัวเขียว

สำนักงานคณะกรรมกาวิจัยแห่งงชาติ (วช)

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2555 เพื่อให้โครงการวิจัยสำเร็จตามเป้าหมาย

ขอขอบคุณ นางสาวสุภาภรณ์ เทศวิเชียร นิสิตปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการดำเนินการวิจัยนี้สำเร็จไปตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และบุคคลากรของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในงานวิจัยครั้งนี้ให้ประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัย

เลขหมู่ 016175 2555
เลขทะเบียน 016175
วัน, เดือน, ปี 30 ม.ย. 57

บทคัดย่อภาษาไทย

เตตราไซคลิน (TC) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ในวงกว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวกและแกรมลบ มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในปศุสัตว์ เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งนำไปสู่การตกค้างของ TC ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ได้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในหลายประเทศจึงมีการกำหนดค่า MRLของ TC เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจ TC ที่ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำสูงและความจำเพาะสูง จากการทดลองเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ 3 แบบที่พัฒนาขึ้น โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี MAb-12-3F) พบว่า biotin-indirect competitive ELISA เป็นชุดตรวจสอบต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด มีค่าเฉลี่ย IC_{50} และปริมาณต่ำที่สุดที่ตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.63 และ 0.19 ppb ตามลำดับ โดยสามารถตรวจหา TC ในช่วง 2.5 ถึง 100 ng/ml นอกจากนั้นพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีปฏิกิริยาข้ามต่อสารกลุ่ม TC ในช่วง 19-86% โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่นำมาทดสอบ เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปทดสอบกับตัวอย่างน้ำผึ้ง พบว่าได้ % recovery อยู่ในช่วง 85-99% และ % CV อยู่ในช่วง 3-16% ดังนั้นจากผลการวิจัยพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ TC ที่ตกค้างในน้ำผึ้งได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

Abstract

Tetracycline (TC) is a broad-spectrum antibiotic used against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. which have been commonly used in veterinary for the purpose of prevention and treatment of infectious diseases. The widespread use of TCs could lead to TCs residues in animal-producing foods. To ensure food safety for the consumers, several authorities around the world have established the maximum residue limit (MRL) for TCs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered to be a good alternative because of its simplicity, rapidity, high sensitivity and specificity. Three type of ELISA were developed base on monoclonal antibody (MAb 12-3F) against TC. It was found that biotin-indirect competitive ELISA test kit is the most suitable method with the average inhibition concentration at 50% (IC_{50}) and limit of detection (LOD) value of 2.63 ng/ml and 0.19 ng/ml, respectively. The detection range of the prepared test kit was from 2.5 to 100 ng/ml. The specificity of the test kit was also tested and found to cross-reacted with antibiotics in TC group between 19-86% and did not cross-reacted with other tested compounds. The detection of TC in honey-spiked samples revealed the %recovery value between 85%-99% and the % coefficient of variation (CV) between 3-16%. The result obtained from this study indicated that the biotin-indirect competitive ELISA was suitable for the detection of ractopamine in meat samples. These indicated that the prototype test kit can be used to accurately and efficiently determine the amount of tetracycline

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
รายการตารางประกอบ	ช
รายการรูประกอบ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิดและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	4
2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์สารกลุ่มเตตราไซคลิน	4
2.1.2 มาตรฐานยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs	6
2.1.3 การตรวจวิดเคราะห์เตตราไซคลิน	8
2.1.4 สถานการณ์และทิศทางการพัฒนาชุดตรวจสอบในประเทศไทย	10
2.1.5 หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	11
2.1.6 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA	16
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	29
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	32
3.4.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ TC	32
3.4.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การหาปริมาณแอนติบอดี	32
3.4.4 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างเตตราไซคลินกับ OVA	33
3.4.5 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระ	34
3.4.6 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	34
3.4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA	35
3.4.7.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA	35
3.4.7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA	37
3.4.7.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Biotin-indirect competitive ELISA	37
3.4.8 การสร้างกราฟมาตรฐาน	38
3.4.9 การเตรียมตัวอย่าง	39
3.4.10 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ	39
3.4.11 การวิเคราะห์เตตราไซคลินในน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย	42
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปราย	43
4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	43
4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์	44
4.3 การตรวจสอบความสามารถของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระ	44
4.4 การเชื่อมต่อระหว่าง TC กับ OVA (TC-OVA)	46
4.5 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA	47
4.5.1 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA	47
4.5.2 ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA	49
4.5.3 ชุดตรวจสอบแบบ Biotin indirect competitive ELISA	51
4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Biotin-indirect competitive ELISA	54
4.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน	54
4.6.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการบ่ม TC-OVA กับ Ab-biotin และ TC ในรูปอิสระ	56

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6.3 การศึกษาปัจจัยของชนิดของ blocking solution	57
4.6.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ	58
4.6.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ	59
4.7 การวิเคราะห์ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ	60
4.7.1 การวิเคราะห์ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	60
4.7.2 ผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย โดยวิธี biotin-in direct ELISA	62
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	68

รายการตารางประกอบ

	หน้า
2.1 ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residues Limits, MRLs)	7
2.2 การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลินด้วยวิธีทางเคมี	8
2.3 ประเทศผู้ผลิตและผู้ใช้ชุดตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์รายใหญ่ของโลก	10
2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี	18
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	29
4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA	44
4.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี direct competive ELISA	48
4.3 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA โดยวิธี indirect competitive ELISA	50
4.4 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี Biotin indirect competitive ELISA	52
4.5 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ	54
4.6 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ biotin-indirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ	55
4.7 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity, CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มTC	60
4.8 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	61
4.9 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง	62
4.10 แสดงผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย	63

รายการรูปประกอบ

หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม TCs 5

2.2 ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปยี่ห้อ RIDASCREEN® Tetracycline 10

2.3 หลักการของ direct ELISA 12

2.4 หลักการของ indirect ELISA 13

2.5 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ข) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ค) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin 15

2.6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน โปรตีนสายสั้น (light chain) และโปรตีนสายยาว 16

2.7 ตัวอย่างของ biotin-streptavidin system 22

4.1 โครมาโตแกรมแสดงลำดับส่วน (fraction) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโปรตีนที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 2.7 44

4.2 ผลการทำ SDS-PAGE 45

4.3 กราฟแสดงผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี Biotin-indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 5 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 2 ug/ml 46

4.4 โครมาโตแกรมของ OVA (A) และ TC-OVA (B) โดยวิธี MALDI-TOF MS 47

4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเตตราไซคลินในรูปอิสระด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA โดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ TC-HRP ที่ความเข้มข้น 5 และ 0.25 ug/ml และความเข้มข้นที่ 2.5 และ 0.25 ug/ml ตามลำดับ 49

4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับTCในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย เคลือบหลุมด้วย TC-OVA 1, 1.25 และ 2.5 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.05, 0.025 และ 0.025 ug/ml ตามลำดับ 51

4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับ TC ในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วน ระหว่าง TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี Biotin indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125, 0.5 และ 0.25 ug/ml และ Ab-biotin ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.1 และ 0.05 ug/ml ตามลำดับ 53

4.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ biotin-indirect competitive ELISA 56

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

4.9 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ ที่บ่ม ด้วยเวลาที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ug/ml ด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA 57

4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อTCในรูปอิสระ ที่ใช้ blocking solution ต่างๆ กันคือ 1% OVA, 1% BSA และ 5% skim milk ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ug/ml และแอนติบอดีความ ข้มข้น 0.25 ug/ml ด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA 58

4.11 กราฟของ TC น้ำผึ้งที่ละลาย ในสารละลาย PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับ TC ใน PBS ที่ไม่มีน้ำผึ้ง 59

4.12 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ที่ใช้ในการวิเคราะห์หา TC จากน้ำผึ้ง 61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งสินค้าเกษตรและอาหารที่สำคัญของโลก ปัญหาสารตกค้างในกลุ่มยาปฏิชีวนะ เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ มีการนำยาปฏิชีวนะหลายชนิดมาใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อเร่งการเจริญเติบโต เพื่อป้องกันและรักษาโรค แต่การใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ถ้าเกษตรกรมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้โดยไม่มีการควบคุมที่ดี เช่น ขนาดที่จะใช้ ระยะเวลาการใช้ ระยะเวลาหยุดใช้ พบว่าจะนำไปสู่ปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างและการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น ดังนั้นหน่วยงานที่ รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภค จากประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย เช่น Codex (Joint FAO/WHO Food Standard Program) EU คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้มีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดที่สามารถตรวจพบในผลิตภัณฑ์อาหาร (Maximum Residue Limits; MRLs) ขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ

เตตราไซคลิน (Tetracycline: TC) เป็นหนึ่งในกลุ่มยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ (antibiotic) ประกอบด้วยสารเช่น เตตราไซคลิน (TC) ออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline:OTC) และ คลอเตตราไซคลิน (Chrotetracycline: CTC) เป็นต้น มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง แกรมบวกและแกรมลบ โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการจับของ tRNA บนไรโบโซมเชื้อทำให้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์อย่างแพร่หลาย เช่น ในสุกร โค ไก่ และผึ้ง หรือใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานานเพื่อเร่งการเจริญเติบ โต ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในเนื้อ ไข่ น้ำนม หรือน้ำผึ้ง จากการสำรวจของสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1993 ตรวจพบเตตราไซคลินตกค้างอยู่ในสัตว์บ่อยถึง 4% ของสัตว์ที่มียาตกค้างอยู่ (Lee และคณะ, 2001) การตกค้างในเนื้ อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้น อาจก่อให้เกิดการเป็นพิษหรือการแพ้ในผู้บริโภค รวมถึงการเกิดการ ดื้อยาในเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบได้ จาก สาเหตุดังกล่าว ทำให้แต่ละประเทศหันมาเน้นเรื่องความปลอดภัยของอาหารโดยมีการตรว จสอบการตกค้างของสารเตตราไซคลินในผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ สำหรับอาหารที่จัดได้ว่าได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะต้องพบปริมาณสารเตตราไซคลินปนเปื้อนในผลิตภัฑณ์อาหารจากสัตว์ ได้แก่ กล้ามเนื้อ ตับ ไต ไข่ และ นม น้อยกว่า 0.2, 0.6, 1.2, 0.4 และ 0.1 ug/ml ตามลำดับ

(กระทรวงสาธารณสุข , 2550) และในสหรัฐอเมริกาได้กำหนดค่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตกค้างได้สำหรับเตตราไซคลินในกล้ามเนื้อ ตับ และ ไต เป็น 2, 6 และ 12 ug/ml (Moats, 2000) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์และ ะผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Pena และคณะ, 2005; Zhenfeng และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2008) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)/LC MS-MS) (Koesukwiwat และคณะ, 2007; Giannett และคณะ, 2010) ซึ่งการตรวจโดยวิธีเหล่านี้สามารถหาปริมาณสารตกค้างได้ถูกต้องและแม่นยำสูง แต่เครื่องมือมีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของวิธี colorimetric method โดยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิดเกิดสีที่แตกต่างกัน มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ใช้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างสูง (ระดับ ug/ml) เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกัน เช่นเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางใ นการตรวจหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (Pastor-Navarro และคณะ, 2007; Zhangและคณะ, 2007; Jeon และคณะ, 2008) โดยอาศัยหลักการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถหาสารตกค้างปริมาณน้อยได้ การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่ างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำไปตรวจโดยการใช้เครื่องมือ เช่น LC-MS จึงทำให้ต้นทุนในการตรวจสารนี้ลดลง ตัวอย่างชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย เช่น MaxSignal™ Tetracycline ELISA Test Kit ใช้ตรวจสอบเตตราไซคลินที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ สามารถตรวจสอบความเข้มข้นที่ต่ำที่ต่ำสุดถึง 0.1 ng/ml ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินแล้ว (รายงานฉบับสมบูรณ์ ทุนรัชดา) และจะนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธี ELISA สำหรับงานวิจัยนี้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

พัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลินต้นแบบ โดยวิธี ELISA

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน

2. ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3. เตรียมชุดตรวจสอบเตตราไซคลินโดยวิธี ELISA แบบต่างๆ

4. ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน

5. วิเคราะห์เตตราไซคลินด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำชุดตรวจสอบเตตราไซคลินต้นแบบ โดยวิธี ELISA ไปวิเคราะห์หาเตตราไซคลินตกค้างในน้ำผึ้งได้

บทที่ 2

แนวคิดและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์สารกลุ่มเตตราไซคลิน

สารกลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นสารที่ผลิตขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์ในวงกว้าง ทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สารในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจาก แบคทีเรียในตระกูล Streptomyces สารตัวแรกที่ค้นพบคือคลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline; CTC) ค้นพบในปี ค.ศ. 1048 โดยแยกได้จาก *Streptomyces aureofaciens* อีก 2 ปีต่อมาก็ค้นพบออกซิเตตราไซคลิน (Oxytetracycline; OTC) โดยแยกได้จาก *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตสารกลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดึงเอาอะตอมของคลอรีนออกจาก CTC สารที่ผลิตได้ใหม่นี้จะเรียกว่าเตตราไซคลิน (Tetracycline; TC) เหมือนชื่อกลุ่มสาร ในปัจจุบันนี้ได้มีการผลิตสารในกลุ่มนี้ตัวใหม่ขึ้นมาใช้อีกหลายตัว ได้แก่ดอกซีไซคลิน (Doxycycline; DC) ดีมีคลอไซคลิน (Demechlocycline; DMC) เมธาไซคลิน (Methacycline; MC) และโรลิเตตราไซคลิน (Rolitetracycline; RTC) (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TC สามารถเกิดได้หลายแบบ ดังนี้

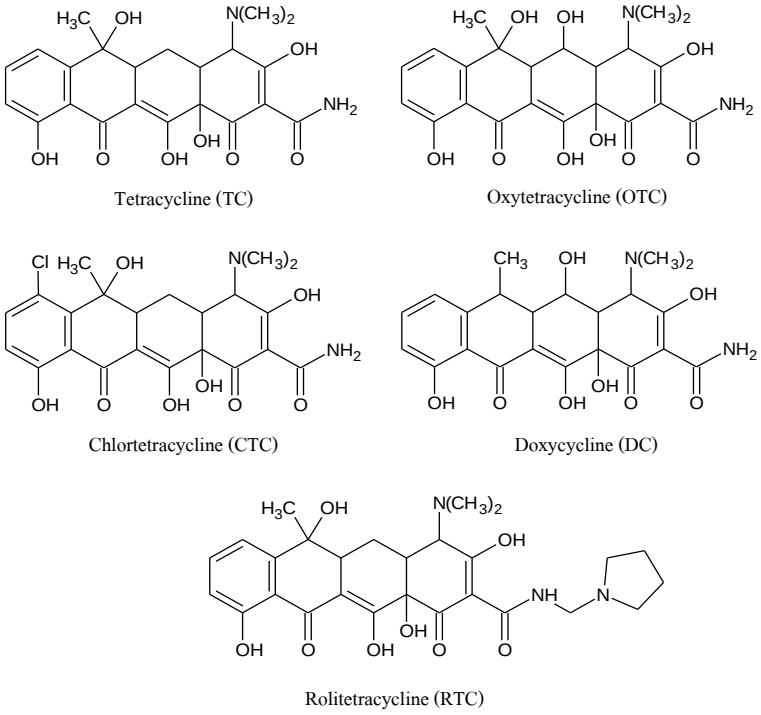
1) Active chelation ของไอออนบวก (cation) โดยจะไปเกาะกับแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม ยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ร่างกายสัตว์
2) ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเป็น โดย CTC จะยับยั้ง organic nitroreductase ของแบคทีเรีย
3) ขัดขวางการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียที่กำลังเจริญแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ โดยจะไปเกาะกับส่วน ไรโบโซมย่อย 50s ของ 70s ไรโบโซม ของแบคทีเรีย ไปขัดขวางการขนย้ายกรดอะมิโน จาก aminoacyl t-RNA ไปยังส่วนพอลิเปปไทด์ ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและแบ่งเซลล์ (bacteriostatic)

ขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม TCs แบ่งออกได้ดังนี้

1) ออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectrum) ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารจะไปออกฤทธิ์ยับยังการเจริญและแบ่งเซลล์ของ แบคทีเรีย โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเ ชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่า แบคทีเรียแกรมลบ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารในกลุ่มนี้ได้แก่ β-hemolytic Streptococci, nonhemolytic Streptococci, Clostridium, Brucella, Hemophius และ Klebsiella
2) ออกฤทธิ์ทำลาย pathogenic agent บางชนิดที่สา รปฏิชีวนะชนิดอื่นทำลายไม่ได้ เช่น Rickettsiae, ไวรัสขนาดใหญ่ เช่น Psittacosis ในสัตว์ และ Lymphogranuloma venereum ในคน
3) ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ Mycoplasma, Spirochete และ Actinomycetes
4) ถ้าให้ปริมาณสูงๆจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโปรโตซัวได้

สูตรโครงสร้างทางเคมี ลักษณะ และสมบัติของสารในกลุ่ม TCs

สารทุกตัวในกลุ่ม TCs จะมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคือ hydronapthacene skeleton หรือเรียกว่า Tetracycline nucleus ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่ม TCs

สาร TCs ในรูปผงผลึกจะมีสีเหลือง ไม่มีกลิ่น และมีรสขมเล็กน้อย เก็บไว้ได้นาน สารกลุ่มนี้ในรูปเป็นเบสจะละลายน้ำได้เล็กน้อยที่ pH 7 ละลายได้เพียง 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร สารในกลุ่ม TCs จัดเป็น amphoteric compound สามารถเกิดเป็นเกลือกับกรดหรือด่าง เช่น การ เกิดเกลือกับกรดไฮโดรคลอริก เกลือของสารกลุ่มนี้จะสามารถละลายน้ำได้ดี สารกลุ่ม TC ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์มักนิยมให้กินในรูปแคปซูล แต่สารนี้จะเกิดเป็นสารประกอบโลหะเชิงซ้อนกับ chelating agent และไอออนของโลหะเช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก จึงอาจเกิดสารประกอบเ ชิงซ้อนที่ไม่สามารถถูกดูดซึมในทางเดินอาหารได้ ฤทธิ์ของสารที่ให้กินจึงขึ้นกับสารส่วนที่ไม่จับกับไอออนของโลหะเนื่องจากจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยตรง ตามปกติ pH ของทางเดินอาหารและ pKa ของสารกลุ่มนี้เหมาะสำหรับการที่สารจะถูกดูดซึมเข้าไปออกฤทธิ์ในร่างกาย (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547)

พิษของยาตกค้าง TC

การเกิดการตกค้างของสาร TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ug/ml) จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากการที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรค จึงไม่ทำให้เชื้อโรคที่มีในร่างการตายแต่กลับทำให้เชื้อโรคนั้นปรับตัวและดื้อต่อยา ทำให้เกิดปัญหาการรักษาโรคในภายหลังได้ และถ้าตรวจพบในระดับ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำเกิดอันตรายต่อร่า งกายของผู้บริโภคได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยจะสามารถทำลาย normal flora จนทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนจากเชื้อรา และแบคทีเรียอื่นๆ ทำให้มีอาการท้องเดิน มีไข้จากแบคทีเรีย *Staphylococci* เกิดการติดเชื้อรา *Candida albicans* ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือทางเดินอาหาร มีผลต่อกระดูกและฟัน โดย TC จะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟัน ยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟัน สารที่เกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันมีสีน้ำตาลและเมื่อถูกแสงสีน้ำตาลจะยิ่งเข้มขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้ ดังนั้นถ้าใช้ขณะตั้งครรภ์จะทำให้ฟันน้ำนมของทารกมีสีน้ำตาลแต่จะไม่มีผลกับฟันแท้ นอกจากนี้สาร TCs ทุกชนิดยังทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ และรู้สึกชาบริเวณที่ถูกแสงเป็นต้น (ปริญญา มาสวัสดิ์, 2550)

2.1.2. มาตรฐานยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง ได้ให้นิยามคำว่า <u>*ยาสัตว์*</u> หมายความว่า สารใดๆที่ให้แก่สัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ เช่น สัตว์ที่ให้เนื้อหรือนม สัตว์ปีก สัตว์น้ำและผึ้ง เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษา ป้องกัน หรือวินิจฉัยโรค หรือเพื่อวัตถุประสงค์ในการเปลี่ยนแปลงทางสรีระหรือพฤติกรรมของสัตว์นั้น <u>*ยาสัตว์ตกค้าง*</u> หมายความว่า ยาสัตว์ที่เป็นสารประกอบตั้งต้น (Parent drug) สารในกระบวนการสร้างและสลายของสัตว์ (Metabolite) และสารอื่นที่

ปนมากับยาสัตว์ (Associated impurities) *อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง* หมายความว่า ส่วนของเนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือผลิตผลของสัตว์ที่บริโภคได้ ซึ่งพบยาสัตว์ตกค้าง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs สูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (Maximum Residues Limits, MRLs)

ชนิดของยาสัตว์ตกค้าง	ชนิดของสัตว์	ชนิดของเนื้อเยื่อ หรือผลิตผลของสัตว์	ปริมาณตกค้างสูงสุด (ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม หรือต่อ 1 ลิตรของน้ำนม)
คลอเตตราไซคลิน/ออกซิเตตราไซคลิน/เตตราไซคลิน ในรูปของคลอเตตราไซคลิน/ออกซิเตตราไซคลิน/เตตราไซคลิน อย่างหนึ่งอย่างใด หรือผลรวมของยาทั้ง 3 ชนิด (Chlotetracycline/ Oxytetracycline/Tetracycline, single or in combination)	โค	กล้ามเนื้อ	200
	โค	ตับ	600
	โค	ไต	1,200
	โค	น้ำนม	100
	สุกร	กล้ามเนื้อ	200
	สุกร	ตับ	600
	สุกร	ไต	1,200
	แกะ	กล้ามเนื้อ	200
	แกะ	ตับ	600
	แกะ	ไต	1,200
	แกะ	น้ำนม	100
	สัตว์ปีก	กล้ามเนื้อ	200
	สัตว์ปีก	ตับ	600
	สัตว์ปีก	ไต	1,200
	สัตว์ปีก	ไข่	400
	ปลา*	กล้ามเนื้อ	200
	กุ้งกุลาดำ*	กล้ามเนื้อ	200

ที่มา : ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง

หมายเหตุ * ออกซีเตตราไซคลิน ชนิดเดียว

2.1.3 การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลิน

2.1.3.1 การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลินด้วยวิธีทางเคมี

เนื่องจาก TC เป็นยาปฏิชีวนะที่มีการนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องมีการตรวจหาการตกค้างของ TC ด้วยเทคนิคต่างๆ การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลิน โดยวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิคดังแสดงในตาราง 2.4 โดยเทคนิคทางเคมีที่เป็นที่นิยม คือ เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ แต่เทคนิคนี้ต้องใช้เวลาในก ารวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนาน จึงทำการตรวจตัวอย่างได้น้อย ต้นทุนในการวิเคราะห์มีราคาสูง เนื่องจากเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง อีกทั้งจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์อีกด้วย ทำให้ไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก

ตารางที่ 2.2 การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลินด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ค่า LOD (ng/ml)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
HPLC-FL	110	น้ำผึ้ง	นรินทร์ และคณะ, 2551
	750	นมพร่องมันเนยและนมที่มีไขมัน	Siva และคณะ,2005
HPLC-ESI-TOF-MS	0.05	น้ำผึ้ง	Pancorbo และคณะ, 2008
HPLC-UV	50	น้ำผึ้ง	Thompson และคณะ, 2005
LC-UV	15	น้ำผึ้ง	Vinas และคณะ, 2004

หมายเหตุ Detector: Fl: fluorescence, ESI-TOF-MS: diode array electrospray time-of-flight- mass spectrometry, UV: Ultraviolet, LOD: limited of detection

2.1.3.2 การตรวจวิเคราะห์เตตราไซคลินโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยามีความสะดวกในการนำไปใช้ตรวจคัดกรองนอกสถานที่ และประหยัดกว่าเทคนิคทางเคมีดังที่กล่าวไปเบื้องต้น จึงทำให้เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นที่นิยมใช้กัน ในปัจจุบันการวิเคราะห์ที่อาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological method) ได้แก่ วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ที่เป็น immunochromatographic assay (strip test) หรือ sensor chip เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะ (specificity) สูง เนื่องจากอาศัยการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี สามารถตรวจเตตราไซคลิน ได้ในระดับพิโคกรัม (picogram) และ นาโนกรัม (nanogram)

ส่วนหลักการของเทคนิค ELISA นั้นอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ เตตราไซคลิน กับแอนติบอดีต่อ เตตราไซคลิน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนสารกัมมันตภาพรังสี โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอน ติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับกันของเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น จึงเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว ความจำเพาะสูง และมีการจับกันอย่างเหนียวแน่น (high affinity) เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันมีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคี ยงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย

เนื่องจากเทคนิค ELISA มีข้อดีในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างก่อนส่งตรวจด้วยเทคนิคทางเคมี จึงมีชุดตรวจสอบ TC ออกมาจำนวนมาก ซึ่งในประเทศไทยมีการนำเข้ามาจำหน่าย ตัวอย่างเช่น ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปยี่ห้อ RIDASCREEN® Tetracycline (รูปที่ 2.2) ที่เป็น indirect ELISA ใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์ น้ำนม และน้ำผึ้ง ราคาชุดละประมาณ 20,000 – 30,000 บาท มีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี สามารถตรวจสาร tetracycline และ rolitetracycline ได้ในระดับ 1.5 ng/ml ในน้ำนม 15 ng/ml ในน้ำผึ้ง และ 6 ng/ml ในเนื้อสัตว์ เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs เท่ากับ 5-125% (สถาบันอาหาร, 2553 ; R-Biofarm, 2009)

ส่วนอีกยี่ห้อ คือ MaxSignal® Tetracyclinerecovery ที่เป็น indirect ELISA มีอายุการใช้งานประมาณ 1 ปีเมื่อเก็บ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์และน้ำผึ้งได้ต่ำสุดที่ 2 และ 2.5 ng/ml เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs เท่ากับ 6-122% (Bioo, 2009)

รูปที่ 2.2 ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปยี่ห้อ RIDASCREEN® Tetracycline

2.1.4 สถานการณ์และทิศทางการพัฒนาชุดตรวจสอบในประเทศไทย

ประเทศสหรัฐอเมริกาและเยอรมัน เป็นผู้ผลิตชุดตรวจสอบรายใหญ่ที่สุดของโลก (ดังตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ประเทศผู้ผลิตและผู้ใช้ชุดตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์รายใหญ่ของโลก

ประเทศ	ตลาดด้านการผลิตคิดเป็นร้อยละของมูลค่าตลาดโลก	ตลาดด้านการใช้คิดเป็นร้อยละของมูลค่าตลาดโลก
สหรัฐอเมริกา	48	45
เยอรมัน	29	10
สหภาพยุโรป (ยกเว้นเยอรมัน)	15	22
ประเทศอื่น	8	23

แหล่งข้อมูล : The Theta reports diagnostic market and technology trends: year 2000 and beyond 2000 (ธารารัตน์ ธารากุล, 2545)

โดยประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งที่สั่งซื้อชุดตรวจสอบจากต่างประเทศรวมมูลค่ามหาศาลในแต่ละปีและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยมีการนำเข้าชุดตรวจสอบร้อยละ 95 โดยมีการผลิตภายในประเทศน้อยกว่าร้อยละ 5 ซึ่งส่วนใหญ่ใช้งานด้านการแพทย์ ด้านปศุสัตว์ ด้านสิ่งแวดล้อม และการใช้งานทางการเกษตร เพื่อวินิจฉัยการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และตรวจสอบสารตกค้างในอาหารด้วย ปัจจุบันมีความตื่นตัวที่จะทำการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยอยู่พอสมควร เนื่องจากชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทย าภูมิคุ้มกัน มีการใช้กันอย่างกว้างขวางสามารถนำไปใช้งานได้ทันที โดยไม่ต้องทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอีก โดยระยะที่ผ่านมามีการพัฒนาอย่างก้าวกระโดดร่วมกับเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้สามารถพัฒนาการผลิตแอนติบอดี และแอนติเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำ คัญในชุดตรวจที่มีคุณภาพดีขึ้นอย่างชัดเจน รวมถึงการพัฒนาชนิด และคุณภาพของเทคโนโลยีในการวัดและตรวจจับสัญญาณ (signal detection) ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วย ร่วมกับการพัฒนาการเพิ่มความไวของการตรวจวัดอีกด้วย [18] ชุดตรวจสอบที่ใช้ในปัจจุบันมีราคาต่อหน่วยค่อนข้างสูง (รูปที่ 2.5) จากสถานการณ์นี้ทำให้มีความสนใจที่จะทำการพัฒนาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากมีโอกาสพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีราคาเหมาะสมต่อการใช้งานในสภาวะที่เหมาะกับภูมิภาคและอาจจะสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้

การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบอย่างเป็นระบบ จะทำให้ประเทศไทยสามารถที่จะวิจัยพัฒนาและผลิตชุดตรวจสอบคุณภาพสูงได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งจะเป็นผลดีต่อเศรษฐกิจ สุขภาพอนามัย สังคม รวมทั้งต่อการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีของชาติ อันจะเป็นพื้นฐานของการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในด้านอื่นๆ ต่อไป (ธารารัตน์ ธารากุล, 2545)

2.1.5 หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน คือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดพื้นผิว และตรวจวัดสัญญาณจากปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดฉลากบนแอนติเจนหรือแอนติบอ ดี วิธี ELISA ได้พัฒนาต่อมาจาก radioimmunoassay (RIA) โดยเปลี่ยนจากการติดฉลากด้วยสารรังสี เป็นการติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์และเปลี่ยนสีได้เมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนจากสารรังสีมาเป็นเอนไซม์นี้ทำให้การตรว จมีความสะดวกมากขึ้น ไม่ต้องใช้รังสีที่มีอันตราย ทิ้งของเสียได้ง่ายขึ้น และชุดตรวจมีอายุการใช้งานได้นานเพราะไม่มีการหมดอายุของสารรังสี การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบใน เชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง [18] กลไกการทำปฏิกิริยา

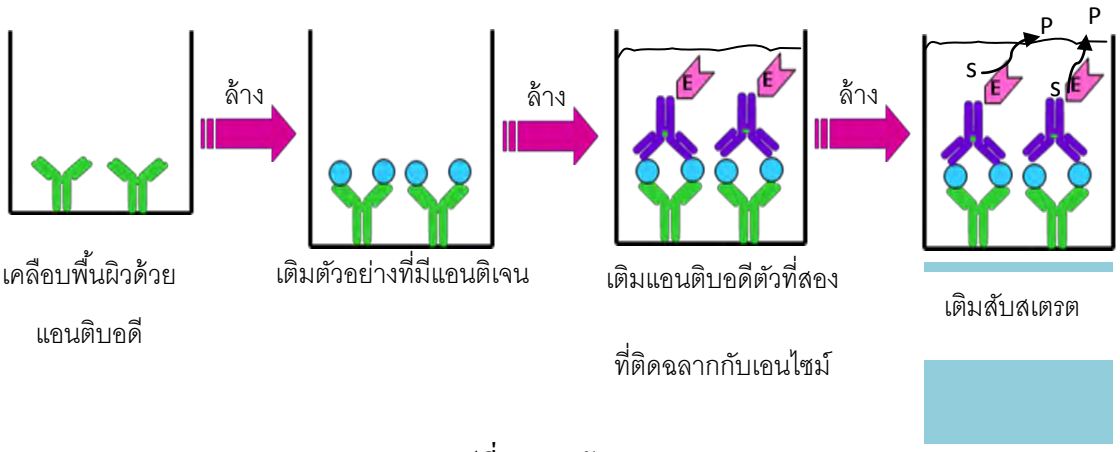
ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ competitive ELISA และ non competitive ELISA

2.1.5.1 non competitive ELISA

การทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจสอบหาแอนติบอดีและแอนติเจน โดยอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ

ก. direct ELISA

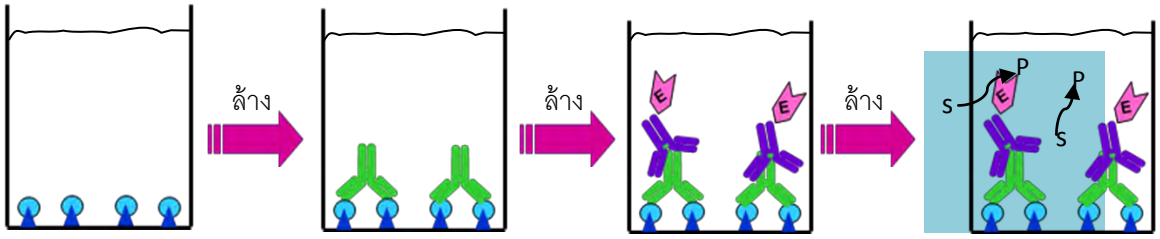
หลักการแสดงในรูปที่ 2.3 คือเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง เมื่อเติมสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติเจน พร้อมกับเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติเจนทั้งสองจะจับกับแอนติบอดีดังกล่าว จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่ อแอนติเจน ที่ต้องการตรวจและติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปในปริมาณที่มากพอ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต จะเป็นสัดส่วนโดยต รงกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ อาจเรียกวิธีนี้ว่า sandwich ELISA



รูปที่ 2.3 หลักการของ direct ELISA

ข. indirect ELISA

หลักการแสดงในรูปที่ 2.6 คือ ดัดแปลงวิธี direct ELISA ให้มีความสะดวกมากขึ้น โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ไม่ได้ติดด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ (secondary antibody)โดยแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวแรกซึ่งจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ หลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่างที่ตรวจสอบ



เคลือบพื้นผิวด้วย แอนติเจน | เติมแอนติบอดีที่จำเพาะ | เติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

รูปที่ 2.4 หลักการของ indirect ELISA

2.1.5.2 competitive ELISA

เป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นตัวกระทำในการทดสอบ

ก. competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

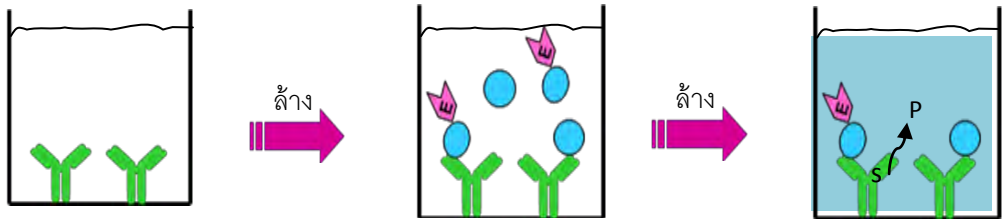
วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงในรูป 2.5 ก ในการทดสอบจะเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดี แล้วเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หากมีแอนติเจนในตัวอย่ างจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีที่พื้นผิวระหว่างแอนติเจนกับแอนติเจนที่ติดฉลาก ทำให้แอนติเจนติดฉลากที่เติมลงไปส่วนหนึ่งจับกับแอนติบอดีได้น้อย แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของ สับสเตรตจ ะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

ข. competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

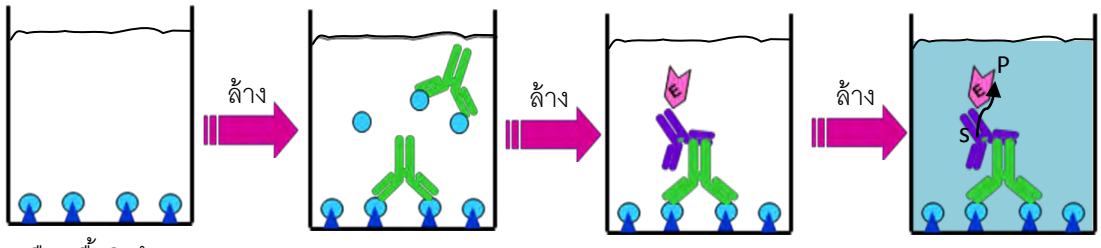
วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงในรูป 2.5 ข จะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วย เอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่ เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

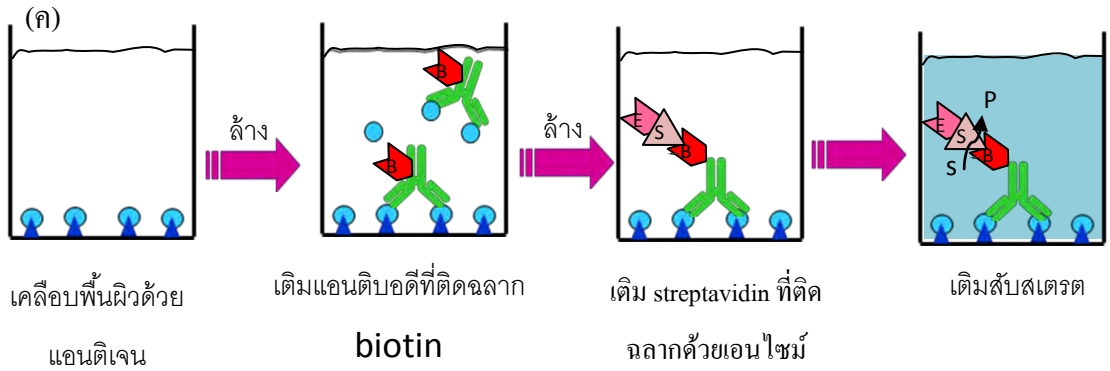
นอกจากนี้สามารถเตรียมชุดตรวจสอบแบบ competitive ELISA โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (รูปที่ 2.5 ค) โดยทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อม กับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วย biotin แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม สับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

(ก)



(ข)





รูปที่ 2.5 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ข) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ค) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin

(หมายเหตุ คือแอนติบอดี, คือแอนติเจนเชื่อมโปรตีน, คือแอนติเจนอิสระ คือแอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์)

2.1.6 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA (ธารารัตน์ ธารากุลม, 2545)

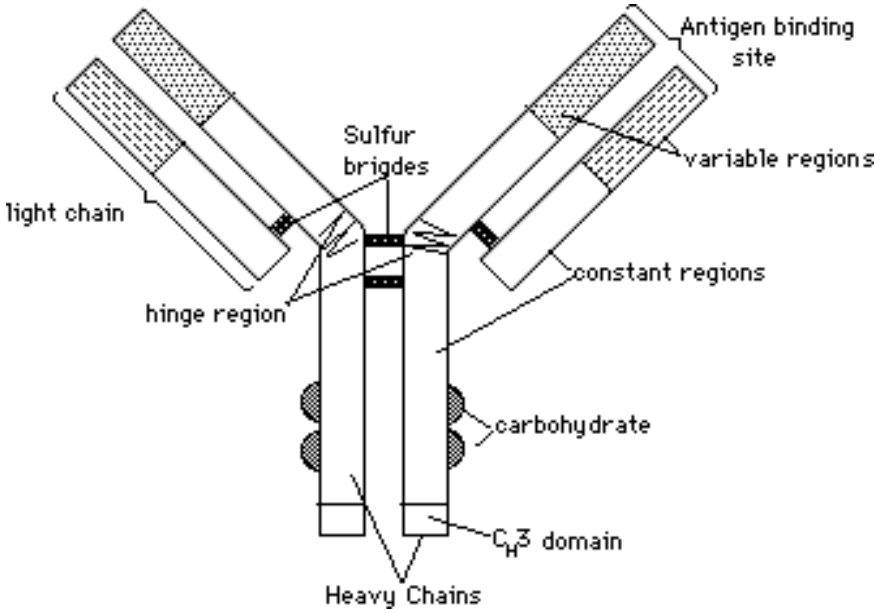
2.1.6.1 แอนติเจน (antigen, Ag)

แอนติเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดความจำเพาะของการตรวจหาแอนติบอดี เนื่องจากในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันนั้นอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นกลไกหลักในการตรวจ ซึ่งจับกับแอนติบอดีได้ดีและสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะได้ง่าย คุณสมบัติของแอนติเจนสำหรับชุดตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางภูมิคุมกันวิ ทยา คือ ความจำเพาะ (specificity) ความบริสุทธิ์ (purity) ความคงรูปโครงสร้างของแอนติเจนให้สามารถจับกับแอนติบอดีที่ต้องการได้ (structural integrity) ความสามารถในการผลิตปริมาณมาก (up-scale production) และมีคุณภาพคงที่ (sustainability)

2.1.6.2 แอนติบอดี (antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจน ที่เรียกว่าอิพิโทป (epitope) สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติ บอดีเรียกว่า พลาสมาเซลล์ แอนติบอดีที่

หลั่งเข้าสู่กระแสเลือดจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity) โครงสร้างของแอนติบอดี (รูปที่ 2.6) ซึ่งความแตกต่างระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงดังตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน โปรตีนสายสั้น (light chain) และโปรตีนสายยาว (heavy chain) แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความแปรปรวนสูง (variable region) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน (antigen binding site) ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณคงที่ (constant region) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน โปรตีนสายยาวจะมีบริเวณข้อพับ (hinge region) (ไพศาล สิทธิกรกุลม, 2548)

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามได้กับสารอื่นๆได้	ความจำเพาะสูงเนื่องจากจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวเท่านั้น
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อิพิโทปเดียว

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความเข้มข้นแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 µg/ml เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบปั่นกวน
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	ขึ้นกับขนาดเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ
ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ผลิต	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นจึงจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอิพิโทปเดียวจึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ในการผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น
ข้อดีหลัก	ต้นทุนต่ำ	มีความจำเพาะสูง
	ง่ายต่อการผลิต	ขยายขนาดการผลิตได้โดยปรับภาวะการผลิตได้
ข้อเสียหลัก	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุลม, 2548

2.1.6.2.1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridization หรือโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้กระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน ให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาใน

กระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี จึงมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิ ดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัวกันก็อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอน ติบอดีที่ผลิตขึ้นทุกๆ ครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดในด้านปริมาณและคุณภาพ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ไปเรื่อยๆ รวมทั้งมีความสะดวกในการควบคุมคุณภาพที่ดีกว่า เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป ใน ระยะยาวค่าใช้จ่ายในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงอาจจะไม่สูงมากนัก

2.1.6.2.2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (Antigen specificity)

ชุดตรวจวินิจฉัยส่วนใหญ่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นส่วนประกอบหลัก เนื่องจากมีความจำเพาะแอนติเจนสูงกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีมาก เนื่องจากผลิตจากเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวกัน จึงมีโมเลกุลของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเหมือนกันทุกประการ ทำให้มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียว ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลายชนิดประกอบกัน โดยที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่ออิ พิโทป แตกต่างกันได้ ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมจากเลือดของมนุษย์หรือสัตว์ มีความจำเพาะต่อหลายอิพิโทป บนโมเลกุลของแอนติเจน เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้วจะเห็นได้ว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดีมีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่า

2.1.6.2.3 ความเหนียวแน่นในการจับกับแอนติเจน (Affinity) และอะวิดิตี (Avidity) ของแอนติบอดี

affinity และ avidity เป็นคุณสมบัติของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลโดย ค่า affinity เป็นความเหนียวแน่นของการจับ (strength of binding) ระหว่างอิพิโทปของแอนติเจน กับแขนข้างหนึ่งของแอนติบอดี (monovalent binding site) ส่วน avidity เป็นความเหนียวแน่นของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีทั้งโมเลกุล (overall strength of binding) คุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของบริเวณแปรผัน (variable region) นั่นเอง affinity เป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละ

ชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่าง พัฒนาการของบีลิมโฟไซต์ จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่างๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มี affinity มากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยมักจะต้องการโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูง เพื่อให้สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างเหนียวแน่น ดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้วิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลง affinity ของแอนติบอดีนั้นๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มี affinity ดีขึ้นกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก บีลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้น avidity และ affinity นี้เป็นผลเฉลี่ยที่เป็นผลรวมของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางแต่สามารถเพิ่มให้ดีได้ โดยดัดแปลงขั้นตอนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและขั้นตอนการทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

2.1.6.2.4 หน้าที่การทำงานของแอนติบอดี (Effector function)

หน้าที่และความสามารถในการทำงานของแอนติบอดี ขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลส่วน heavy chain constant region ว่าเป็นชนิด class หรือ subclass โดย effector function เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แตกต่ างกันไปในแต่ละ isotype และ subclass ของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวจะมี effector function ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว โดยมีส่วน heavy chain ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้านเนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน

2.1.6.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา (Detection system)

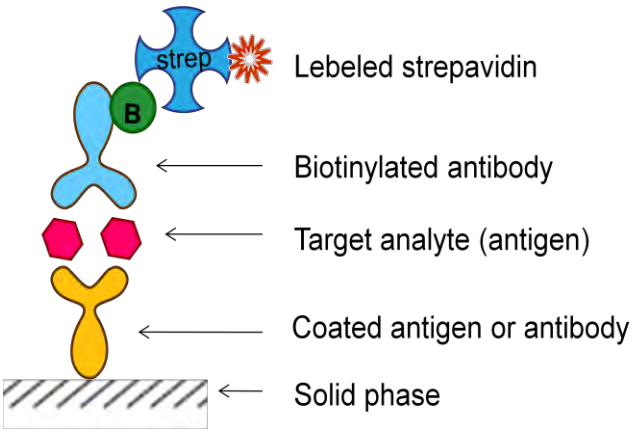
เอนไซม์เป็นสารสำคัญที่ใช้ในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นส่วนของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา ใช้โดยการเชื่อม (conjugate) หรือติดฉลาก (label) เอนไซม์เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish Peroxidase (HRP) และ Alkaline Phosphatase (AP) เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมาะสมกับชุดตรวจสอบเกือบทุก

รูปแบบ ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน อาศัยการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์และสับสเตรต ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนสามารถตรวจวัดได้ เช่น เปลี่ย นสีหรือสามารถดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นจำเพาะได้ การเปลี่ยนสีหรือคุณสมบัติของ สับสเตรต นี้จึงเป็นตัวบ่งบอกว่าเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยระบบนี้ มักจะตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น (colorimetry) โดยอ่านค่าเป็นการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical Density, O.D.) ซึ่งเป็นระบบการตรวจวัดหลักของวิธี ELISA นอกจากนี้อาจสามารถเพิ่มความแรงของสัญญาณการตรวจวัดปฏิกิริยาทำให้ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้น โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เนื่องจากระบบของ biotin-streptavidin มีสัมพรรคภาพสูงกว่าแอนติบอดีกับแอนติเจน นิยมใช้มากในกรณีที่ต้องการเพิ่มความแรงของสัญญาณให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณต่ำได้

biotin-streptavidin อาศัยคุณสมบัติของ biotin ที่สามารถจับกับ streptavidin ได้อย่างแน่นมาก ($Kd = 10^{-15}$ M) ซึ่งมากกว่า affinity ของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยเฉลี่ย จึงเป็น detection system ที่มีความไวสูง และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา ค่อนข้างสั้น (รูปที่ 2.7)

biotin เป็นสารขนาดโมเลกุลเล็กที่มีอยู่ในธรรมชาติ ทำหน้าที่เป็น coenzyme โดยเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ carboxylase โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้ว ย imidazolinone ring เชื่อมกับ thiophan ring ที่มี valerate side chain สามารถเชื่อมต่อกับ biotin conjugate ค่อนข้างง่ายและได้ผลดี

สารกลุ่ม streptavidin ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันได้จากการ คัดแปลงโมเลกุลจากสารตั้งต้นที่มีอยู่ในธรรมชาติ 2 แหล่ง คือ avidin และ streptavidin โดย avidin เป็นไกลโคโปรตีนจากไข่ขาว ประกอบด้วย tetramer ที่แต่ละหน่วยสามารถจับ biotin 1 โมเลกุล ทำให้ avidin 1 โมเลกุล สามรถจับกับ 4 โมเลกุล biotin ส่วน streptavidin เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) สร้างโดยเชื้อยีสต์ *Streptomyces* หลายชนิด โดยเฉพาะ *Streptomyces avidinii* มีโครงสร้างสามมิติที่คล้ายกับ avidin และสามารถจับกับ biotin ได้ดีเช่นกัน แต่ streptavidin มีค่า pI ต่ำกว่าและไม่มี carbohydrate group ทำให้มี non-specific binding น้อยกว่า avidin ระบบการตรวจที่ใช้ biotin-streptavidin มีความไวสูง เพราะเกิดการขยายสัญญาณได้ เนื่องจาก biotin มี multiple binding site กับโปรตีนและ streptavidin มี multiple lebeling site นอกจากนี้ยังมี non-specific binding ต่ำ ทำให้ background level ต่ำ



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างของ biotin-streptavidin system

2.1.6.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง

ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน นิยมใช้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวในรูปแบบของ solid phase ก่อน เรียกว่า การเคลือบ (coating) หรือ การตรึง (mobilization) หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยาตามลำดับขั้นตอน แล้วอ่านผลของปฏิกิริยานั้น การใช้ solid phase ยึดตรึงสามารถช่วยให้ขั้นตอนการล้างเอาสารเกินออกได้ดี ทำให้ลดการเกิด background signal ได้ดี และอ่านผลของปฏิกิริยาได้สะดวกขึ้น ซึ่งรูปแบบการใช้ผิวสำหรับยึดตรึงในชุด ELISA มีหลายแบบ ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน คือ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หรือ microtitre plate หรือ 96 well-plate ทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็น พอลิเมอร์แบบ organic ที่มี hydrophobic surface สามารถจับกับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ดีและค่อนข้างเกาะ เป็นเนื้อเดียวตลอดพื้นที่ การเคลือบที่ได้มีความเสถียร เมื่อทำใน microtitre plate จะมีคุณสมบัติในการโปร่งแสงที่ดี ทำให้สามารถใช้กับเครื่องอ่าน spectrophotometer ได้สะดวก นอกจากรูปแบบที่เ ป็นเพลทแล้ว อาจใช้หลอด (tube) เม็ด (bead และ microsphere) หรือใช้ membrane ชนิดต่างๆ

2.1.6.5 สับสเตรต (substrate)

การวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะต้องใช้สับสเตรต เป็นตัววัดสามารถเลือกใช้ได้ ขึ้ นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น colorimetry, fluorometry และ chemiluminescence แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ วิธี colorimetry วิธีนี้เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต ที่เกิดจากเอนไซม์ แล้วทำการอ่านผลด้วยเครื่องมือที่อ่านค่าการดูดกลืนแสง electrophotometer หรือ ELISA reader substrate ที่ทำให้เกิดสีนี้เรียกว่า chromogenic

substrate ซึ่งเดิมไม่มีสีแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำให้สีเข้มขึ้น โดยสับสเตรต แต่ละชนิดจะอ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และการใช้สับสเตรตขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจวัดด้วย เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ ABTS (2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียว อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 415 นาโนเมตร, TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีฟ้า และเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดจะมีสีเหลือง อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร และ OPD (o-phenylenediamine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นส้มหรือสีน้ำตาล อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร ส่วนเอนไซม์ alkaline phosphatase สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ PNP (p-nitrophenyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร , PMP (Phenolphthalein monophosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร และ 1NP (1-napthyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

2.1.6.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ (performance)

ข้อมูลสำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยวิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. ความไว (sensitivity) บ่งบอกความสามารถที่จะตรวจพบสารในปริมาณต่ำสุด (lower limit of detection, LOD) ที่สามารถวัดได้ด้วยชุดตรวจสอบนั้น

2. ความแม่นยำ (precision) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลเหมือนกันเมื่อทดสอบหลายๆ ครั้ง โดยทั่วไปจะระบุเป็น %CV (percent coefficient of variation) และ SD (standard deviation)

3. ความถูกต้อง (accuracy) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน โดยทั่วไปจะระบุเป็น %recovery

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Faraj และ Ali (1981) ได้ผลิตแอนติบอดีต่อ TC โดยทำการเชื่อม TC-HCl เข้ากับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich แล้วฉีดเข้ากระต่าย หลังจากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาตรวจวัดสาร TC โดยใช้วิธี radioimmunoassay (RIA) โดยใช้ตัวแข่งขันที่เป็น [^{3}H]TC พบว่าสามารถตรวจสอบสาร TC ได้ โดยมีค่าขีดจำกัดในการวัด และค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50% of

inhibition concentration; IC_{50}) เท่ากับ 1 และ 7 นาโนกรัมตามลำดับ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ OTC และ CTC เท่ากับ 10 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปตรวจสอบ TC ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของสุนัขพบว่ามี %recovery อยู่ระหว่าง 90 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Lee และคณะ (2001) ใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ในการตรวจสอบสารเตตราไซคลิน TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างในพลาสมาของสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่เพื่อทำนายสารเหล่านี้ที่จะตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยปริมาณ TC, OTC และ CTC ที่ตรวจวัดได้น้อยที่สุดของชุดตรวจสอบนี้ คือ 0.05, 0.01 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทำการให้ TC ทางปากสุกร 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรต่อวัน ฉีด OTC เข้าทางกล้ามเนื้อสุกร 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสุกรต่อวัน และให้ CTC ทางปากสุกร 1.1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารสัตว์ต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบโดยนำพลาสมาจากที่ได้จากเลือดสุกรมาทำ ELISA พบว่าไม่สามารถตรวจสอบ TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างอยู่ในเลือดเมื่อเลิกให้ยา 3, 8 และ 4 วันได้

Pena และคณะ (2005) ใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนส์ เพื่อตรวจสอบสารเตตราไซคลิน TC และ OTC ในน้ำผึ้งโดยสกัดสารตัวอย่างที่ตกค้างด้วย Na_2-EDTA-Mcllvaline buffer, pH 4.0 และ solid-phase extraction (SPE) ที่แตกต่างกัน mobile phase ที่เหมาะสมคือสารละลาย acetonitrile และ oxalate buffer ในอัตราส่วน 20:80 pH 2 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} Nucleocil ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ TC และ OTC ที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.050 และ 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Koesukwiwat และคณะ (2007) ได้ใช้เทคนิค LC-MS สำหรับตรวจสอบการตกค้างของสารเตตราไซคลิน TC, OTC และ CTC ในน้ำนมโค พบว่าปริมาณสารที่ ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 0.67, 0.65 และ 2.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตรวจสอบแบบปริมาณวิเคราะห์ได้น้อยที่สุดที่ 0.95, 1.03 และ 8.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Pastor-Navarro และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำผึ้งโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารในกลุ่ม TCs ที่ถูกทำให้เป็นสารอนุพันธุ์ของ carboxamido และ diazo ก่อนจะเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการวัดที่ต่ำที่สุดถึง 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml) เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ RTC, OTC, MC และ CTC ถึง 91, 30, 14 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถใช้ในน้ำผึ้งตัวอย่างได้ %recovery อยู่ระหว่าง 79 ถึง 108 เปอร์เซ็นต์

Zhang และคณะ (2007) ได้พัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำนมโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วย TC ที่ใช้วิธีในการเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน 3 วิธี เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจส อบโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่ามี IC_{50} เท่ากับ 3.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ug/ml) เกิดการทำปฏิกิริยา

ข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ CTC ถึง 112 เปอร์เซ็นต์ และ OTC น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำไปตรวจในน้ำนมตัวอย่างได้ %recovery อยู่ระหว่าง 74 ถึง 116 เปอร์เซ็นต์

Jeon และ Paeng (2008) ได้ใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จากแกะ ในการตรวจหาปริมาณ TC ในน้ำผึ้ง โดยวิธี biotin-avidin mediated ELISA ใช้ PBS-EDTA buffer pH 7.2 เป็นสารละลายสกัดและไม่ต้องเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบ (no additional pre-treatment) พบว่า ปริมาณสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจได้ (dynamic range) เท่ากับ 1.52 -152 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับในในกลุ่ม TCs เมื่อนำไปตรวจในตัวอย่างน้ำผึ้งได้ %recovery อยู่ระหว่าง 95% ถึง 101%

และปีเดียวกัน Jeon และคณะได้พัฒนาวิธีการการตรวจหาปริมาณ TC ในน้ำนม โดย วิธี biotin-avidin mediated ELISA และใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC จากแกะ ใช้ PBS-EDTA buffer pH 7.2 เป็นสารละลายสกัด พบว่าปริมาณสารที่ต่ำ ที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจได้ (dynamic range) เท่ากับ 0.316-316 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ CTC, OTC, และ DC เท่ากับ 13.7%, 10% และน้อยกว่า 1% ตามลำดับ สามารถนำไปตรวจ TC ในน้ำนมได้ % recovery ประมาณ 90%

Zhoa และคณะ (2008) ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอเตตราไซคลิน (Chlortetracycline: CTC) และพัฒนาวิธี ELISA เพื่อวิเคราะห์หา CTC เนื้อสัตว์สำหรับการบริโภค พบว่า ได้ช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้ 0.1-312.5 ug/kg และให้ค่า IC50 เท่ากับ 15$\pm$6.0 ug/kg เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี HPLC และ commercial kit พบว่า วิธี ELISA ที่พัฒนามีประสิทธิภาพเทียบเท่า

Adrian และคณะ (2012) รายงานการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ doxycycline เป็นครั้งแรก และได้ทำการพัฒนาวิธี indirect competive ELISA ในการตรวจหา doxycycline ในตัวอย่างน้ำนม ได้ต่ำถึง 5 ug/l

Gao และคณะ (2013) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ doxycycline และพัฒนาวิธี indirect competitive ELISA สำหรับวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะกลุ่ม TC 7 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อและนมวัว พบว่า มีปฏิกิริยาข้ามในกลุ่ม TC อยู่ในช่วง 47%-102% ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ อยู่ในช่วง 1.5-6.9 ng/ml % recovery อยู่ในช่วง 75.3%-106.8% ค่าความแปรปรวนต่ำกว่า 10.9% ดังนั้นวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ติดตามการตกค้างของยาปฏิชีวนะกลุ่ม TC ในตัวอย่างเนื้อและนมวัวได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC รหัส 12-3F ที่พัฒนาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 .2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon Corporation, Japan
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง	D.S.C. group Co., Ltd, Taiwan
- เครื่องกวนแม่เหล็ก	Corning, USA
- เครื่องชั่งหยาบและละเอียด	Mettler Toledo Co., Ltd, Switzerland
- เครื่องผสมด้วยแรงหมุน	Scientific Industries, Inc, USA
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส	Mettler Toledo Co., Ltd, Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ	M.S.E. Ltd, England
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท	Titertek multiskan, Finland

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน ขนาด 1 ลิตร	Techne, USA
- ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Rad, USA
- ถังแช่แข็งเซลล์ไนโตรเจนเหลว	Tayloy-Wharton, USA
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato Scientific Co., Ltd, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ	Scientific Supply Co., Ltd, Thailand
- ตู้เย็น	Toshiba, Thailand
- ปั๊มสุญญากาศ	Iwaki, Japan
- ตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)	Sanyo, Thailand
- ตู้แช่แข็ง (-70 องศาเซลเซียส)	Sanyo, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany
2. อุปกรณ์ต่างๆ	
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	Boro, Germany
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Costar, USA
- ทิป ขนาด 10, 200, 300, 1000 ไมโครลิตร	Axygen, USA
- ปิเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	HBG, Germany

- ปิเปตต์อัตโนมัติ	Discovery, Poland
- ปิเปตต์มัลติชาเนล ขนาด 300 ไมโครลิตร	Discovery, Poland
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
- หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
- หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Corning Incoporated, Mexico

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Acetonitrile	เฟสเคลื่อนที่ใน HPLC	Sigma-Aldrich, USA
Acrylamide gel	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
Aminohexanoyl-biotin-*N*- hydroxy succinimide	เชื่อมต่อTC กับแอนติบอดี	Zymed, USA
Ammoniumpersulfate (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol (CAP)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Fluka, China

Coomassie brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce, USA
Dimethyl sulfoxide	ละลายสับสเตรท TMB	Fluka, Switzerland
Disodium hydrogenphosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carloerba, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Doxycycline (DC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	ตัวทำละลาย	BDH, England
Fetal calf serum (FCS)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	PAA, Austria
Furazolidone (FZD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	Fluka, Switzerland
Hydrochloric acid	ใช้ปรับค่ากรด-เบส	Sigma-Aldrich, USA
L-Glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Sulfuric acid (H_2SO_4)	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck, Germany
RPMI 1640	อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา	Biochrome , Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB)	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	Sigma-Aldrich, USA
N, N, N, N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Pierce, USA
Thimerosal	สารป้องกันการปนเปื้อน	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trisma base)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	สารลดแรงตึงผิว	Riedel-de Haën, UK
	สำหรับล้างจานหลุม	Sigma-Aldrich, USA

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ TC

นำเซลล์ไฮบริ โดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ TC รหัสโคลน 12-3F ที่เก็บไว้ที่ไนโตรเจนเหลว ออกมาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 °C และถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และควบคุมความชื้น เมื่อเซลล์โฮบริโดมามีจำนวนมากพอ ย้ายลงในขวดเลี้ย งเซลล์ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงเซลล์ไฮบริมาต่อไปจนอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ที่ 1500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี เพื่อนำไปทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อไป

3.4.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา มาทำการแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยการผ่านคอลัมน์ protein G sepharose ปรับ pH คอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ปรับให้โปรตีนจีเข้าสู่ภาวะสมดุล โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในคอลัมน์ จากนั้นแยกส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นชะส่วนที่จับคอลัมน์ออกด้วย ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine-HCl) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ใส่ในหลอดที่มีทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris- HCl) pH 9.0 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตร เพื่อปรับให้ค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน และนำมาทำ dialysis ด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง

3.4.3 การหาปริมาณแอนติบอดี

การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยนำแอนติบอดี ที่ผ่านการไดอะไลซิส แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (IgG) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35 และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน (Johnstone and Thrope, 1987)

3.4.4 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างเตตราไซคินกับ OVA

3.4.4.1 การเชื่อมต่อ TC กับ OVA (TC-OVA)โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich (Hermanson, 2008)

ทำการเชื่อมต่อ TC กับ OVA โดยเริ่มจากการนำ OVA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลาย 0.1 M MES, pH 4.7 ที่มี 0.15 M sodium chloride ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 37 % formaldehyde (v/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิสด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.4.2 การหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมติดของ TC-OVA โดยวิธี MALDI- TOF MS

คำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติด ของ TC กับ OVA โดยคำนวณจากมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปโดยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร

$$\text{จำนวนโมเลกุลของ TC ที่เชื่อมติด} = \frac{\text{(มวลโมเลกุล TC-OVA) – (มวลโมเลกุลของ OVA)}}{\text{มวลโมเลกุลของTC}}$$

3.4.4.3 การวัดปริมาณโปรตีนของ TC-OVA

ทำการหาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ OVA ที่เชื่อมต่อกับ TC โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit (PIERCE) โดยเริ่มจากเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับรีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50: 1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน OVA ที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (TC- OVA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ที่ความเจือจาง 10 และ 20 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจาน ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจาน ELISA ชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำจาน ELISA ชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.4.5 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระ

เตรียมสาร TCที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 – 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ตามข้อ 3.4.7.2) โดยทำการเติม TC ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

3.4.6 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.4.6.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียม 15% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.2 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หวีเพื่อเป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว 30 นาที

3.4.6.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายสีย้อมทีมี SDS, ß-mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1: 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปิเปตในหลุมเจล

3.4.6.3 การทำ electrophoresis

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับ electrophoresis chamber ที่มี SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (Tris-glycine-HCL) (running buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง นำสารละลายตัวอย่างมาปิเปตในหลุมเจลไม่เกินหลุมละ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของโปรตีนมาตรฐาน ให้ปิเปตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้านำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue (staining solution) ข้ามคืนและล้างในสารละลายของเอทานอลและกรดอะซิติก (destaining solution) จนกว่าเจลจะใสและเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

3.4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบทั้งหมด แบบ คือ

A : การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA

B : การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA

C : การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Biotin-indirect competitive ELISA

3.4.7.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA

ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA เตรียมโดยเริ่ม จากการเคลือบแอนติบอดีต่อ TC ในจาน ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่อง

มันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็ นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมTC ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆใน PBS หลุมละ 50 ไมโครลิตร ลงไปพร้อมกับTCที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer pH, 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.7.1.1 การเชื่อม TC กับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (TC-HRP) (Hermanson, 2008)

การเชื่อมต่อ TCเ ข้ากับ HRP โดยเริ่มจากการนำ HRP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลาย MES, pH 4.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้น 37 % (v/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปไดอะไลซ์ด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.7.1.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ TC-HRP

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.5, 1, 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ TC- HRP ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ PBS แทน TC ในรูปอิสระ แล้วทำการทดลองด้วยวิธี direct competitive ELISA และทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.4.7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA

ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย TC -OVA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมTCในรูป

อิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (Goat anti-mouse-HPR ที่เจือจาง 1: 10,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 1 ชั่วโมง ล้างห ลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายที่ใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.7.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC-OVA และแอนติบอดี

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ TC- OVA โดยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ TC- OVA 0.1- 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ PBS แทน TC ในรูปอิสระ แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect competive ELISA และทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.4.7.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Biotin-indirect competitive ELISA

ทำการเคลือบ TC- OVA บนพื้นผิวในของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม TC ในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร พร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน จากข้อ 3.4.7.3.1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1: 4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.7.3.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน (Ab-biotin)

การเชื่อมต่อ Ab-Biotin เริ่มจากนำแอนติบอดี 1.5 มิลลิกรัมไปทำไดอะไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer, pH 8.4 ข้ามคืน แล้วทำการเติมไบโอติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO กวนเบาเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิสด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.7.3.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC- OVA กับ Ab-biotin

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง TC- OVA กับAb-biotin โดยการแปรความเข้มข้นของ TC ที่เชื่อมต่อกับ OVA 0.1- 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 0.01-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA และทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.4.8 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเคลือบ TC- OVA ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนพื้นผิวในของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมTCในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับ Ab-biotin ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1: 4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่า ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.9 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบทำโดยชั่งน้ำผึ้งปริมาณ 1 กรัม ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด แล้วเติม TC ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาเจือจางด้วย PBST ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตรวจสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ Biotin-indirect competitive ELISA เปรียบเทียบความเข้มข้นของ TC ที่ได้กับกราฟมาตรฐานฟ

3.4.10 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.4.10.1 การหาค่าความไว (sensitivity)

นำอัตราส่วนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ได้ จากชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบ มาทดสอบกับ TCใ นรูปอิสระตั้งแต่ 0-1,000 ng/ml นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 และคำนวณเป็นค่า LOD และ LOQ โดยค่า IC_{50} หาได้จาก 50% B/B_0 คือ

$$IC_{50} \quad : \quad 50\%\ B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มี TC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มี TC

หาค่า LOD และ LOQ (Limit of Quantitation) จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n = 9) ที่ไม่มีเตตราไซคลิน (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ โดยนำค่าความเข้มข้นของ TC มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของ TC และแกน Y เป็นค่า % B/B_0

$$LOD \quad : \quad B_0 - 3SD$$

$$LOQ \quad : \quad B_0 - 10SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยที่ไม่มี TC

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

LOD คือ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้

LOQ คือ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง

3.4.10.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TC และนอกกลุ่ม TC ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Biotin-indirect competitive ELISA โดยสารในกลุ่มเตตราไซคลิน ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl), คลอเตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl), โรลิเตตราไซคลิน (RTC), ออกซีเตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl) และด็อกซีเตตราไซคลิน (DC) ส่วนยาปฏิชีวนะนอกกลุ่มเตตราไซคลิน ได้แก่ เพนิซิลลินจี (penicllin G), ฟูราโซลิโดล (furasolidole) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) และคลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) รวมถึงเคลนบูเทรอล (clenbuterol) ซึ่งเป็นสารเร่งเนื้อแดง

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดจาก 50% B/B_0 แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของ TC} \times 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}}$$

3.4.10.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

นำตัวอย่างที่มีการเติม TC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ng/ml มาหาค่า % recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของ TC ที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้น TC จากกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ TC ที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของ TC ที่เติมลงไป}}$$

3.4.10.4 การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ

หาได้จากการศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) ดังนี้

3.4.10.4.1 intra-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย standard deviation (SD) และ % coeffecient of variation (% CV) ของการวิเคราะห์ตัวอย่าง 9 ซ้ำจากชุดตรวจสอบต้นแบบ ซึ่ง % CV คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{SD} \times 100}{\mu}$$

โดยที่ % CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

μ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรโดยวิธี

Biotin-indirect competitive ELISA

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

3.4.10.4.2 Inter-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย μ, ค่า standard deviation (SD) และ % coeffecient of variation (% CV) ของการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน 8 ครั้ง ที่เวลาต่างกันด้วยวิธี Ab-captured direct competitive ELISA แต่ทำการทดสอบโดยที่แต่ละครั้งทำ 9 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 72 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า μ, SD และ % CV

3.4.11 การวิเคราะห์เตตราไซคลินในน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย

ชั่งน้ำผึ้งปริมาณ 1 กรัม จาก 9 แหล่ง ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 9 หลอด มาเจือจางด้วย PBST ปริมาณ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบกับชุดตรวจสอบต้ นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของ เตตราไซคลิน ที่ได้กับสารละลายมาตรฐานเตตราไซคลิน

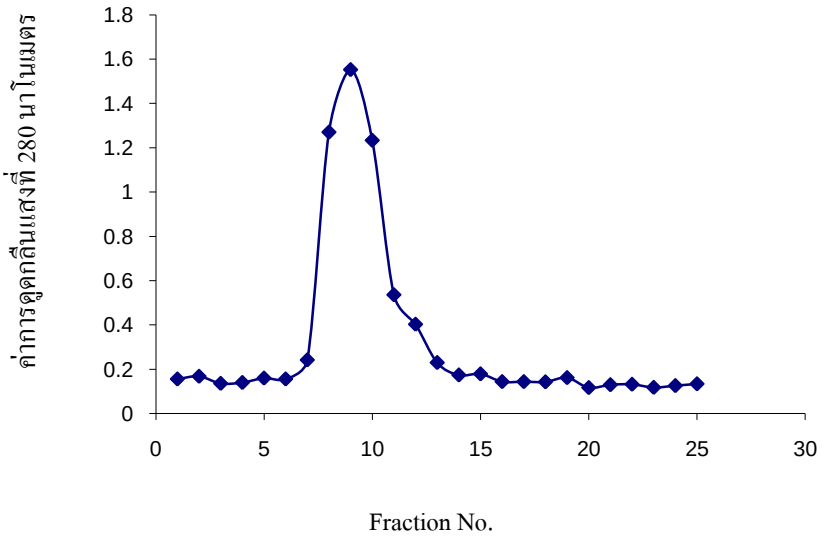
บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปราย

4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากการนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC รหัสโคลน 12-3F ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยง RPMI-1640 ที่มี 10% FCS และทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ผ่านคอลัมน์ Protein G affinity chromatography โดยแอนติบอดีจะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ และจะถูกชะออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 โดยเก็บทีละส่วน (fraction) และนำมาตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่า fraction ที่ 8-12 มีค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.4-1.55 (รูปที่ 4.1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นส่วนที่โปรตีนหรือแอนติบอดีถูกชะออกมา

จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่เก็บได้ใน fraction ที่ 8-12 มารวมกันและหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA พบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์โคลน 12-3F ก่อนและหลังทำให้บ ริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 5.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ3.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าปริมาณโปรตีนก่อนทำให้บริสุทธิ์สูงกว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจาก ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีการเติมซีรัมและส่วนผสมอื่นเพิ่มเติมเข้าไปเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนส่วนในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะได้เฉพาะแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีนจีนั้นมีความจำเพาะสูงในการจับแอนติบอดีไว้ในคอลัมน์ ทำให้ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่าต่ำกว่า ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมแสดงลำดับส่วน (fraction) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโปรตีนที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 2.7 ( )

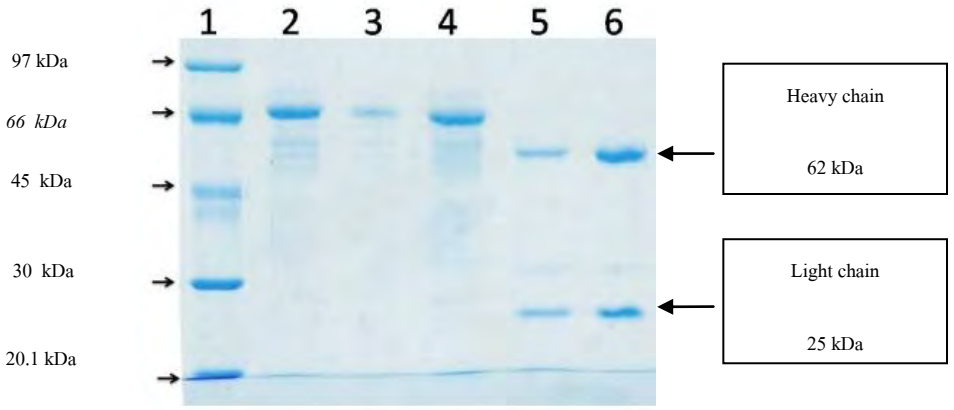
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	5.30
หลังทำให้บริสุทธิ์	3.67

4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์

จากการนำแอนติบอดีที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ โดยแสดงผลในรูปที่ 4.2 จะพบแถบโปรตีนอย่างชัดเจนที่บริเวณ 66 กิโลดาลตัน

(kDa) ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์และแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์ แต่ ในตัวอย่างแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะพบแถบโปรตีน 2 แถบ คือที่ 62 และ 25 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องมาจากในตัวอย่างก่อนการทำให้บริสุทธิ์นั้นจะมีโปรตีนจากซีรัมที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ปนอยู่มาก แต่เมื่อนำตัวอย่างไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนเหล่านี้ จะถูกกำจัดออกทำให้ไม่พบแถบของโปรตีนดังกล่าวในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ อีกทั้งมีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วน heavy-chain และ light-chain แยกออกจากกัน ดังนั้นหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แอนติบอดีมีความเข้มข้นขึ้นจึงพบแถบโปรตีนดังกล่าว ซึ่งขนาดของโปรตีนทั้งสองแถบ นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ (2008) และ Harlow และ Lane (1988) ที่พบแถบย่อย 2 แถบ คือ H-chain และ L-chain ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของสาย พอลิเพปไทด์ของแอนติบอดี



รูปที่ 4.2 ผลการทำ SDS-PAGE ช่องหมายเลข 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม)

ช่องหมายเลข 2 คือ FBS (5 ไมโครกรัม)

ช่องหมายเลข 3 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

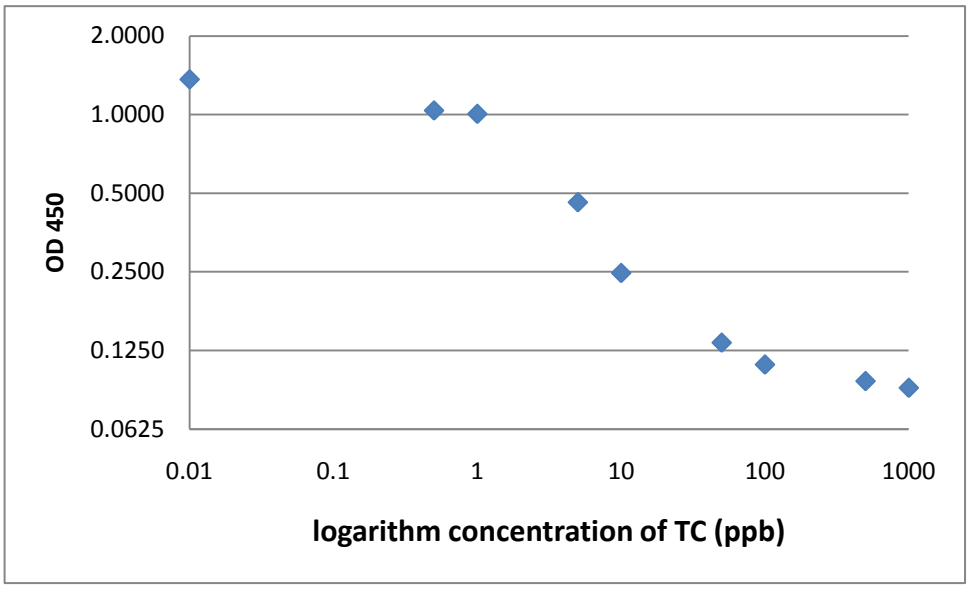
ช่องหมายเลข 4 คือแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS (5 ไมโครกรัม)

ช่องหมายเลข 5 คือ แอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว (5 ไมโครกรัม)

ช่องหมายเลข 6 คือ แอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว (10 ไมโครกรัม)

4.3 การตรวจสอบความสามารถของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระ

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการจับกับ TC ในรูปอิสระ ด้วย Indirect competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ PBS และตัวควบคุมบวก คือ ความเข้มข้นของเตตราไซคลินที่ 1,000 ng/ml พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของเตตราไซคลินในรูปอิสระสูงขึ้น ดังแสดงดัง รูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นยังคงมีสามารถจับ TC ในรูปอิสระได้

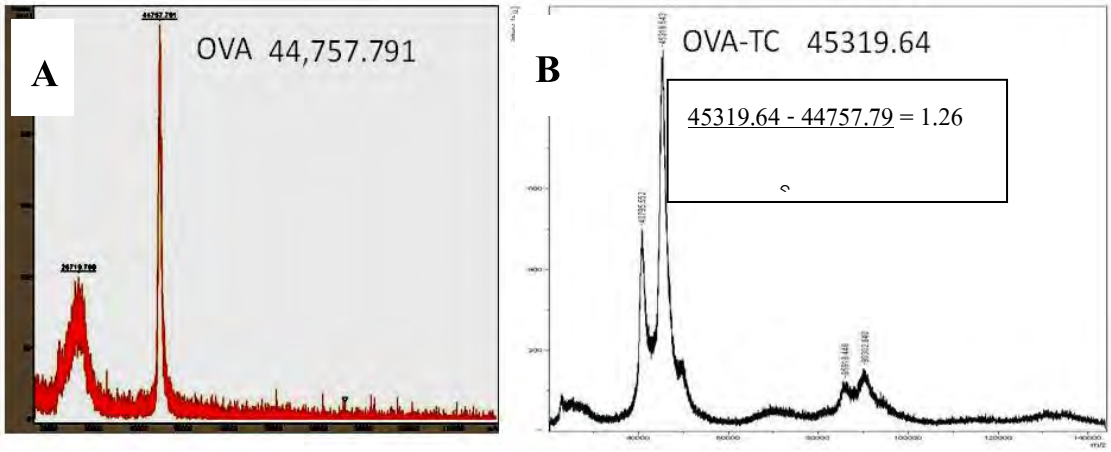


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี Biotin-indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 5 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 2 ug/ml

4.4 การเชื่อมต่อระหว่าง TC กับ OVA (TC-OVA)

เนื่องจาก TC มีขนาดโมโลกุลเล็ก (มวลโมเลกุล 444 ดาลตัน) ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเคลือบจาน ELISA โดยตรง ดังนั้นจึงต้องทำการเชื่อมต่อ TC กับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ สำหรับการทำ ELSA โดยได้ทำการเชื่อม TC กับ OVA และทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมติด โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI- TOF MS จากโครมาโทแกรมที่ได้ (รูปที่.4.4.) พบว่า OVA มีมวลโมเลกุล 4,4757.79 ดาลตัน และสารเชื่อมต่อที่

ได้มีมวลโมเลกุล 45,319.64 ดาลตัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 561.85 ดาลตัน เนื่องจาก TC มีมวลโมเลกุล 444.44 ดาลตัน จึงสามารถคำนวณหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมติดของ TC บน OVA ได้ เท่ากับ 1.26 โมเลกุล



รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมของ OVA (A) และ TC-OVA (B) โดยวิธี MALDI-TOF MS

4.5 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA

4.5.1 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA

4.5.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ TC-HRP สำหรับการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.5, 1, 2.5 และ 5 ug/ml และใช้ความเข้มข้นของ TC-HRP อยู่ในช่วง 0.1-1.0 ug/ml โดยมีเกณฑ์ในการกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ direct ELISA ประมาณ 1.0-1.5 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน โดยแอนติบอดีที่ 5, 2.5 และ 1 ug/ml จะใช้ TC-HRP ที่ 0.25, 0.25 และ 2.5 ug/ml ตามลำดับ จึงนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระต่อไป

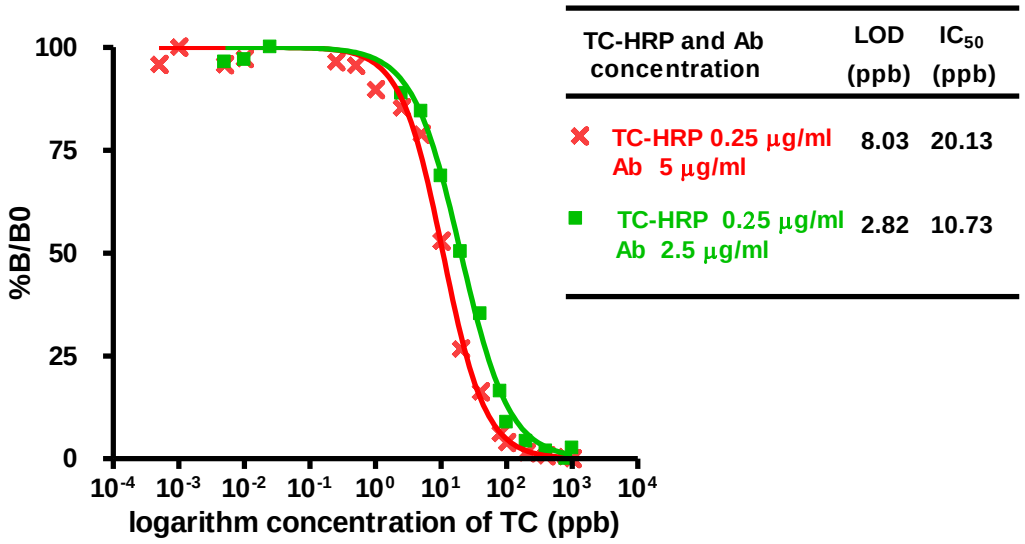
ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี direct competive ELISA

ความเข้มข้นของ TC-HRP (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้นของ Ab (ug/ml)			
	5	2.5	1	0.5
0.10	0.894	0.701	0.411	0.190
0.25	**1.435***	**1.123***	0.609	0.227
0.50	1.865	1.526	0.818	0.239
1.00	2.209	1.769	0.956	0.356

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ TC รูปอิสระ

4.5.1.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่เคลือบหลุม และ TC-HRP ที่หาได้ มาทดสอบกับ TC ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ng/ml นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B/B_0 โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่มี TC ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มี TC จากนั้นหาค่าความไวของแอนติบอดีด้วยวิธีนี้โดยดูจากค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ TC อิสระที่ให้ค่า % B/B_0 เท่ากับ 50% พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 5 ug/ml และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 0.25 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 20.13 ng/ml เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 2.5 ug/ml และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 0.25 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.73 ng/ml (ผลดังรูปที่ 4.5) จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้จากทั้ง 2 ภาวะ พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 2.5 ug/ml และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 2.5 ug/ml ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การตรวจด้วยวิธี direct competitive ELISA มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเตตราไซคลินในรูปอิสระด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA โดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ TC-HRP ที่ความเข้มข้น 5 และ 0.25 ug/ml และความเข้มข้นที่ 2.5 และ 0.25 ug/ml ตามลำดับ

4.5.2 ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA

4.5.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วย indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย TC-OVA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.25, 2.5 และ 5 ug/ml แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.01-2 ug/ml แล้วเลือกอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง ประมาณ 1.0-1.5 โดยพบความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน คือ ภาวะที่ความเข้มข้นของ TC-OVA ที่ 1, 1.25 และ 2.5 ug/ml กับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.05, 0.025 และ 0.025 ug/ml ตามลำดับ ดังในตารางที่ 4.3 แล้วนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปหาความไวต่อ TC ในรูปอิสระต่อไป

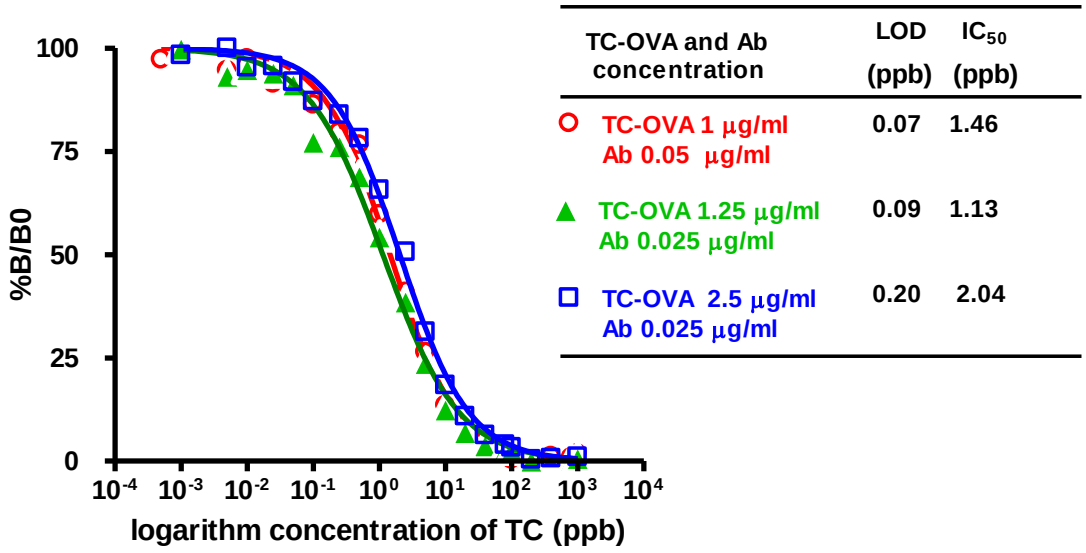
ตารางที่ 4.3 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA โดยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ TC-OVA (ug/ml)				
	0.5	1.00	1.25	2.50	5.0
0.010	0.501	0.605	0.685	0.209	0.661
0.025	0.848	1.113	**1.178***	**1.209***	1.166
0.050	1.166	**1.465***	1.585	1.566	1.504
0.100	1.575	1.841	1.918	2.002	1.977

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ TC ในรูปอิสระ

4.5.2.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาขีดความสามารถของชุดตรวจสอบชนิด Indirect competitive ELISA โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA 3 อัตราส่วน มาทดสอบกับ TC ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ng/mlได้ผลแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อใช้ TC-OVA 1 ug/ml กับแอนติบอดี 0.05 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.46 ng/ml เมื่อใช้ TC-OVA 1.25 ug/ml กับแอนติบอดี 0.025 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.13 ng/ml และเมื่อใช้ TC-OVA 2.5 ug/ml กับแอนติบอดี 0.025 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.04 ng/ml ดังนั้นอัตราส่วนที่ให้ความไวสูงสุด คือ ความเข้มข้นของ TC-OVA และแอนติบอดี ที่ 1.25 ug/ml และ 0.025 ug/ml ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับ TCในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดย เคลือบหลุมด้วย TC-OVA 1, 1.25 และ 2.5 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.05, 0.025 และ 0.025 ug/ml ตามลำดับ

4.5.3 ชุดตรวจสอบแบบ Biotin indirect competitive ELISA

4.5.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง TC-OVA กับ Ab-biotin

ทำการหาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่าง TC-OVA ที่เคลือบหลุมกับ Ab-biotin ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ biotin-indirect competitive ELISA โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของ TC-OVA ในช่วง 0.125-1.0 ug/ml และ Ab-biotin ในช่วง 0.025-0.25 ug/ml และเมื่อนำ Ab-biotin ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบ ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน คือ TC-OVA 0.125, 0.25 และ 0.5 ug/ml กับ Ab-biotin ที่ 0.05, 0.1 และ 2.5 ug/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อ TC ในรูปอิสระต่อไป

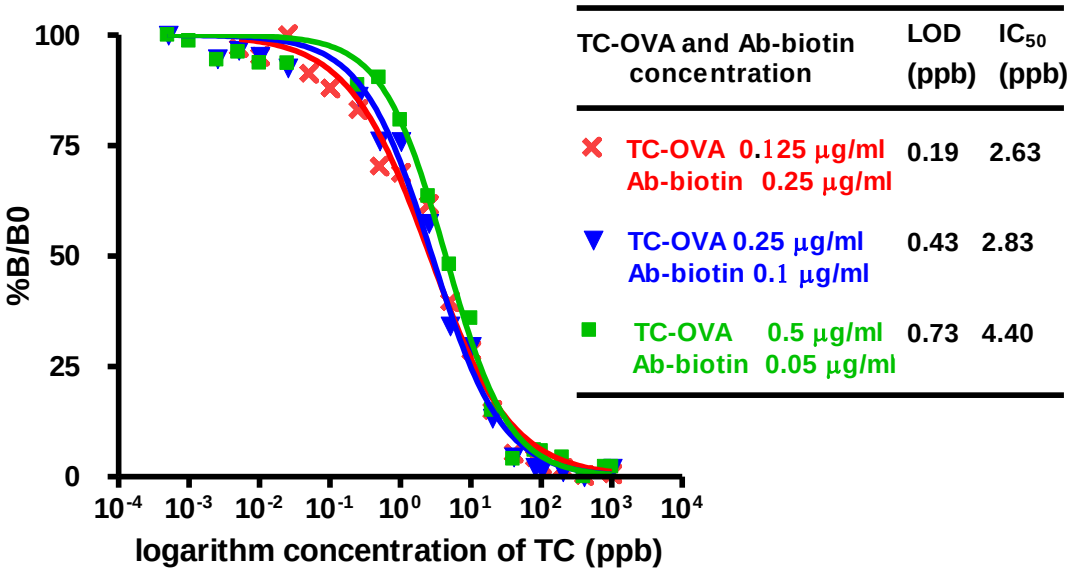
ตารางที่ 4.4 ผลการหา อัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี Biotin indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ TC-OVA (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ Ab-biotin (ug/ml)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
0.125	0.266	0.431	0.746	**1.115***	1.615
0.250	0.345	0.678	**1.395***	1.959	2.444
0.500	0.665	**1.303***	2.303	2.609	2.783
1.000	0.772	1.611	2.639	2.772	1.646

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ TC ในรูปอิสระ

4.5.3.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาความสามารถระหว่า ง Ab-biotin กับ TC ในรูปอิสระด้วยวิธี biotib-indirect competitive ELISA จากอัตราส่วนที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน มาทดสอบกับTCในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ng/ml พบว่าในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.125 ug/ml และ Ab-biotin ที่ 0.25 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.63 ng/ml ส่วนในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.25 ug/ml และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 0.1 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.83 ng/ml ส่วนในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.5 ug/ml และ Ab-biotin ที่ 0.5 ug/ml ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.40 ng/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนที่ให้ความไวมากที่สุดคือ TC-OVA ความเข้มข้น 0.125 ug/ml และ Ab-biotin ที่ 0.25 ug/ml ดังแสดงในรูป 4.7



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับ TC ในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วน ระหว่าง TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี Biotin indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125, 0.5 และ 0.25 ug/ml และ Ab-biotin ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.1 และ 0.05 ug/ml ตามลำดับ

4.5.4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบ ELISA ทั้ง 3 แบบที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบจากค่า IC_{50} และ LOD ได้ผลสรุปดังแสดงในตาราง 4.5 โดยพบว่าชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA มีความไวสูงสุด รองลงมาคือ biotin-indirect competitive ELISA, direct competitive ELISA ตามลำดับ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.13, 2.63, และ 10.73 ng/ml

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ ทั้ง 3 แบบข้างต้น จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบทุกแบบมีค่า LOD และ IC_{50} ที่ต่ำ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบ TCที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MRL (25 ng/ml)ได้ แต่มี 2 วิธี คือ indirect competitive ELISA และ biotin-indirect competitive ELISA ที่สามารถนำมาตรวจตัวอย่างในน้ำผึ้งได้ เนื่องจากในขั้น ตอนการเตรียมตัวอย่างต้องมีการเจือจางอีก อย่างน้อย 10 เท่า ค่าLOD ของทั้งสองวิธีนี้ก็ยังสามารถตรวจได้ครอบคลุมช่วง MRL แต่ในการทดลองครั้งนี้จะเลือกใช้ biotin-indirect competitive ELISA สำหรับเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่อไป เนื่องจากใช้เวลาที่น้อยกว่าวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการทดสอบ ได้ผลการทดสอบรวดเร็วขึ้น

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

รูปแบบของชุดตรวจสอบ	วัตราส่วนที่เหมาะสม	เวลาในการทดสอบ (ชั่วโมง)	IC_{50} (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Direct competitive ELISA	Ab 1 ug/ml TC-HRP 2.5 ug/ml	2.15	10.73	2.88
Indirect competitive ELISA	TC-OVA 1.25 ug/ml Ab 0.025 ug/ml	3.15	1.13	0.09
Biotin-indirect competitive ELISA	TC-OVA 0.125 ug/ml Ab-biotin 0.25 ug/ml	2.15	2.63	0.19

4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Biotin-indirect competitive ELISA

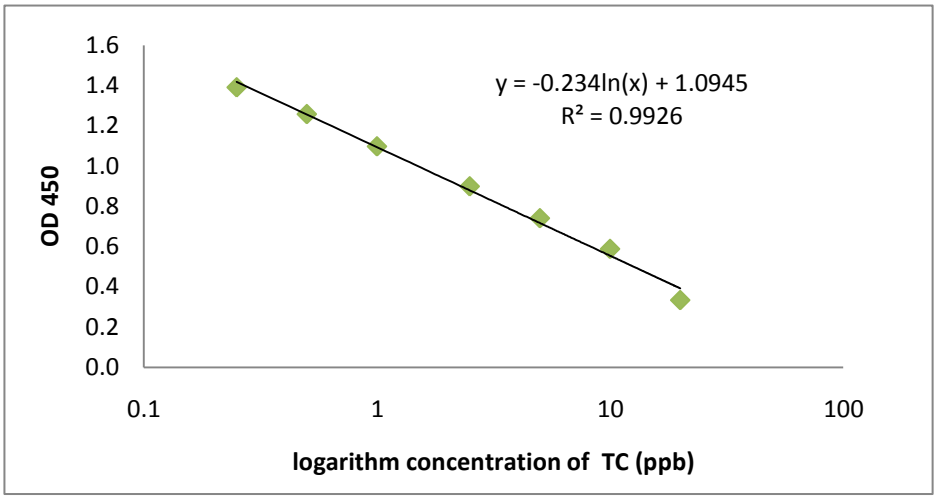
4.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

หลังจากการคัดเลือกชุดตรวจสอบที่มีความไวสูงสุดดังที่กล่าวข้างต้น จึงทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA โดยใช้ความเข้มข้นของ TC-OVA เคลือบหลุมเท่ากับ 0.125 ug/ml และ Ab-biotin เข้มข้น 0.25 ug/ml และแปรความเข้มข้นของ TCใ นรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-1,000 ng/ml และนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของTCที่มีหน่วยเป็น ng/ml และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นทำการเลือกช่วงกราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้ความเข้มข้นในช่วง 0- 20 ng/ml แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.6 และรูปที่4.8

ตารางที่ 4.6 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ biotin-indirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ TCต้นแบบ

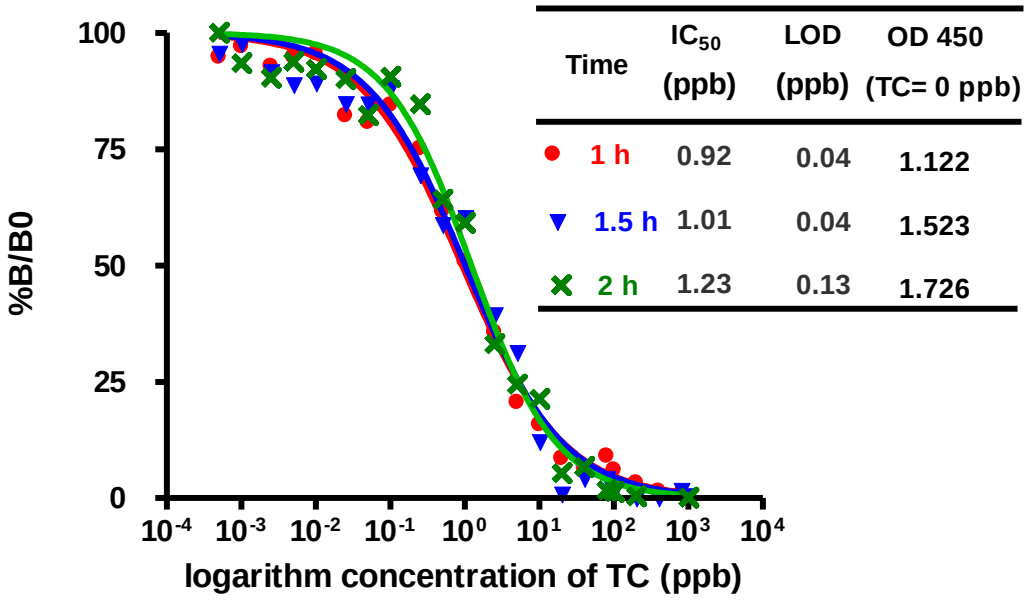
ความเข้มข้นTC (ng/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	SD
0	1.387	0.096
0.25	1.392	0.059
0.5	1.259	0.078
1	1.099	0.047
2.5	0.900	0.057
5	0.742	0.003
10	0.589	0.016
20	0.335	0.034



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ biotin-indirect competitive ELISA

4.6.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการบ่ม TC-OVA กับ Ab-biotin และ TC ในรูปอิสระ

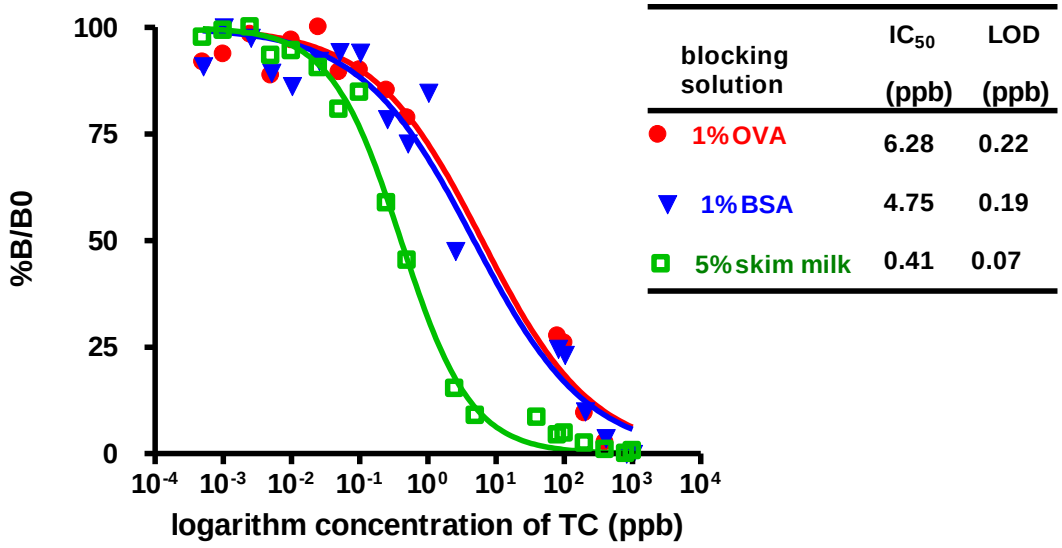
ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสิ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่าง คือ เวลาในขั้นตอนต่างๆ ของชุดตรวจสอบ ดังนั้นในการพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบจึงต้องคำนึงถึงเวลาที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งานมากที่สุด โดยทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA โดยแปรเวลาในการบ่ม 3 ภาวะ คือ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบความไว (sensitivity) พบว่าค่า IC_{50} ในการบ่มที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.92, 1.01 และ 1.23 ng/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.9) โดยบ่มที่เวลา 1 ชั่วโมง ให้ค่า IC_{50} และ LOD ต่ำที่สุด แต่จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของการบ่มที่ 1 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่าการบ่มที่เวลา 2 ชั่วโมงมาก (รูปที่ 4.9) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเวลาดังกล่าวยังเกิดการทำปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลา 1.5 ชั่วโมง เป็นเวลาในการทำปฏิกิริยา และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ biotin-indirect competitive ELISA ต่อไป



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ TC ในรูปอิสระ ที่บ่มด้วยเวลาที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ug/ml ด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA

4.6.3 การศึกษาปัจจัยของชนิดของ blocking solution

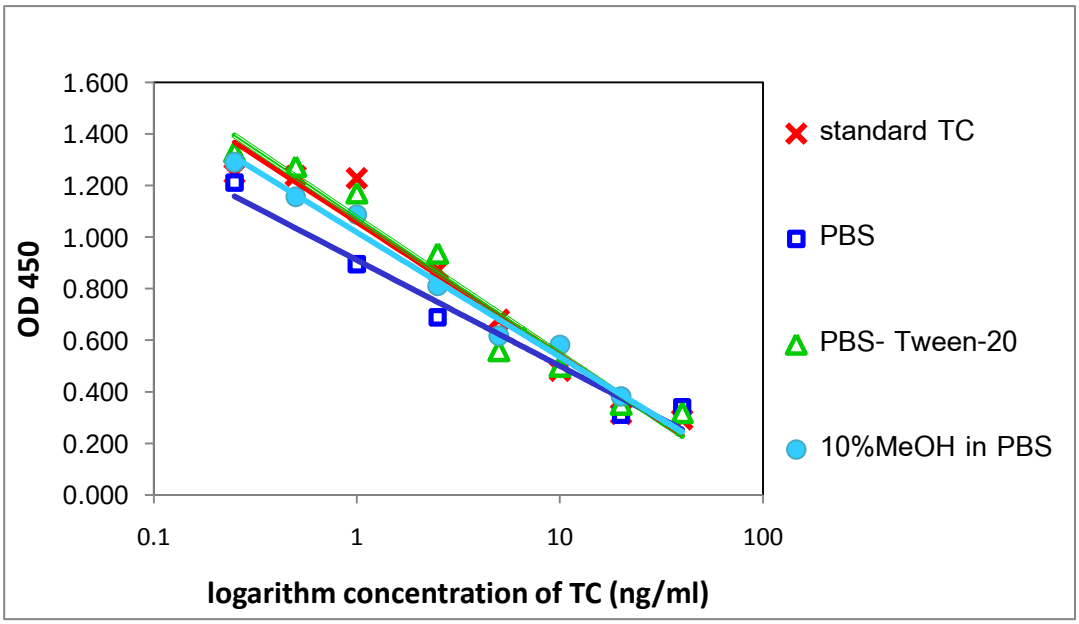
เนื่องจากมีรายงานว่าชนิดของ blocking solution มีผลกระทบต่อ ELISA ในขั้นตอนการทดสอบตัวอย่าง (Jeon and Peang, 2008) จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของ blocking solution โดยทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA โดยแปรชนิดของ blocking solution เป็น 3 ชนิด คือ 5% สารละลายนมพร่องมันเนย , 1% BSA และ 1% OVA และเปรียบเทียบความไวของชุดทดสอบ พบว่าได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.41, 4.75 และ 6.28 ng/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) ดังนั้น 5% นมพร่องมันเนย จึงเป็น blocking solution ที่เหมาะสมที่สุด ที่นำมาใช้กับชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบวิธี biotin-indirect competitive ELISA เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อTCในรูปอิสระ ที่ใช้ blocking solution ต่างๆ กันคือ 1% OVA, 1% BSA และ 5% skim milk ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ug/ml และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ug/ml ด้วยวิธี biotin-indirect competitive ELISA

4.6.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

มีรายงานการใช้ เมทานอล , PBS และ PBST มาใช้สกัดน้ำผึ้ง (Pastor-Navarro, 2007; R-Biofarm,2009; Bioo, 2009) ดังนั้นจึงใช้ตัว จึงเลือกตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล มาใช้ละลายน้ำผึ้งที่อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อน้ำผึ้ง 1 กรัม โดยเตรียมความเข้มข้นของ TC สุดท้ายเป็น 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ng/ml เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานใน PBS ที่ไม่มีน้ำผึ้ง พบว่า PBST เป็นตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการละลายตัวอย่างน้ำผึ้งได้ดีที่สุด เนื่องจากแสดงกราฟที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า PBST สามารถลด matrix effect จากตัวอย่างได้และไม่รบกวนระบบของ biotin-indirect competitive ELISA ทำให้สามารถตรวจสาร TC ในน้ำผึ้งได้ จึงเลือกสารละลายนี้ มาใช้ละลายตัวอย่าง และใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบต้นแบบต่อไป (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 กราฟของ TC น้ำผึ้งที่ละลาย ในสารละลาย PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับ TC ใน PBS ที่ไม่มีน้ำผึ้ง

4.6.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ TC จากตารางที่ 4.7 พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่ม TC ที่นำมาทดสอบ โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (percent of cross reactivity) ที่ 100, 86, 27, 23 และ 19% ตามลำดับ และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TC ได้แก่ เพนิซิลลินจี (penicllin G), ฟูราโซลิโดล (FZD), นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) คลอแรมฟีนิคอล (CAP) และ เคลนบูเทรอล (clenbuterol) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามต่ำกว่า 0.01% (ตารางที่ 4.11) เนื่องจากสารในกลุ่ม TC มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันกับ TC มาก โดยสารในกลุ่ม ที่มีโครงสร้างคล้าย TC ได้แก่ TC ไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl), โรลิTC (RTC), ด็อกซีเตตราไซคลิน (DC), คลอเตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl) และออกซีเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl) ทำให้แอนติบอดีสามารถจดจำและจับโครงสร้างที่เหมือน TC ได้ แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม TCสูงและไม่ทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่มTC

ตารางที่ 4.7 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity, CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มTC

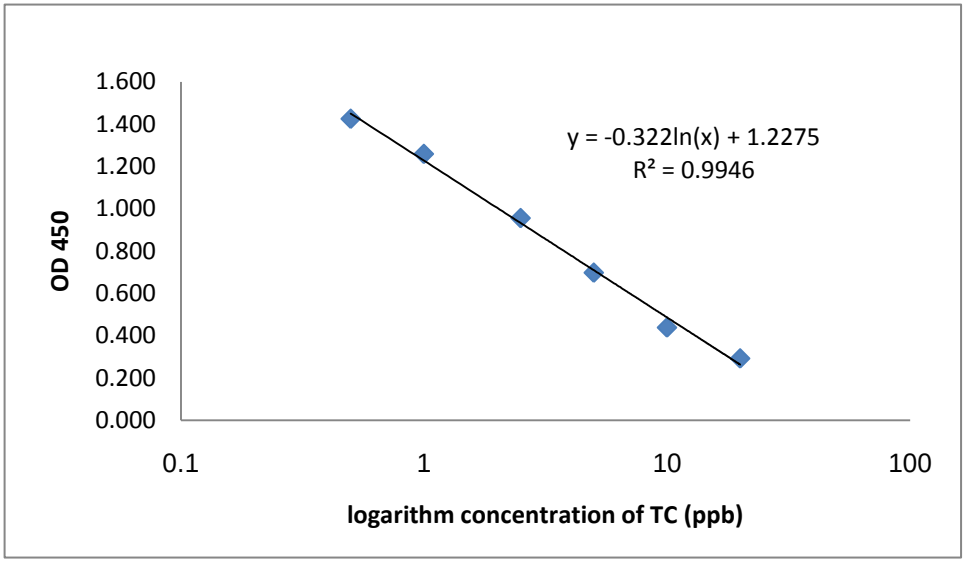
	สารทดสอบ	CR (%)
สารในกลุ่ม TC	เตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl)	100
	โรลิเตตราไซคลิน (RTC)	86
	ด็อกซีเตตราไซคลิน (DC)	27
	คลอเตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl)	23
	ออกซีเตตราไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl)	19
สารนอกกลุ่ม TC	เพนิซิลลินจี (penicllin G)	<0.01
	ฟูราโซลิโดล (FZD)	<0.01
	นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin)	<0.01
	คลอแรมฟีนิคอล (CAP)	<0.01
	เคลนบูเทรอล (clenbuterol)	<0.01

4.7 การวิเคราะห์TCในตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.7.1 การวิเคราะห์ TC ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ TCที่เติมลงในตัวอย่าง น้ำผึ้งโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, และ100 ng/ml ทำการหาความเข้มข้น ที่วัดได้ โดยนำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน รูปที่ 4.12 คำนวณหา %recovery และ %CV พบว่า ความเข้มข้นของ TC ที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับที่เติมลงในตัวอย่าง %recovery อยู่ในช่วง ที่ยอมรับได้ (80-120%) และ %CV ที่ได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เช่นกัน ซึ่งไม่เกิน 20% แสดงดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ดังนั้น

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปผลได้ว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความสามารถวัดTCในตัวอย่างน้ำผึ้งได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานของ TC ที่ใช้ในการวิเคราะห์หา TC จากน้ำผึ้ง

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ปริมาณ TCที่เติมลงในตัวอย่างน้ำผึ้ง (ng/ml)	intra-variation assay (n=8)		
	ปริมาณ TC ที่วัดได้ ± SD (ng/ml)	%recovery	%CV
2.5	2.13±0.08	85.34	3.43
5	4.97±0.28	99.35	5.64
10	9.94±0.50	99.38	5.06
25	24.68±1.57	98.72	6.51

50	45.82±3.03	91.63	7.11
100	91.74±4.18	91.74	4.72

หมายเหต n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง 8 ซ้ำ

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ปริมาณ TCที่เติมลงในตัวอย่างน้ำผึ้ง (ng/ml)	inter-variation assay (N=4) ปริมาณ TC ที่วัดได้ ± SD (ng/ml)	%recovery	%CV
2.5	2.45±0.40	97.84	16.58
5	4.97±0.64	99.36	12.95
10	9.94±1.32	99.39	13.3
25	24.68±3.14	98.72	12.75
50	45.82±8.24	91.64	17.94
100	91.74±13.25	91.74	14.44

หมายเหตุ N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.7.2 ผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย โดยวิธี biotin-in direct ELISA

จากการนำน้ำผึ้งที่วางจำหน่ายในไทย 9 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ โดยเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน TC พบว่ามีน้ำผึ้ง 2 ยี่ห้อที่ตรวจพบสาร TC เกินกว่าค่า MRL ที่กำหนด

คือ น้ำผึ้งยี่ห้อ H5 และ H8 ตรวจพบ TC ในปริมาณ 49.50 และ 28.78 ng/ml ตามลำดับ ส่วนยี่ห้ออื่นๆ ที่เหลือตรวจพบ TC อยู่ที่ 6.7- 16.90 ng/ml ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ทั้งสิ้น แสดงผลดังตาราง 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย

น้ำผึ้ง	OD 450	ปริมาณ TC ที่พบ (ng/ml)
H1	1.197	11.00
H2	1.067	16.48
H3	1.245	10.56
H4	1.355	6.70
H5	0.710	49.50
H6	1.059	16.90
H7	1.234	9.80
H8	0.887	28.78
H9	1.251	9.30

หมายเหตุ H คือสัญลักษณ์ใช้แทนน้ำผึ้งแต่ละยี่ห้อ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

หลังจากเตรี ยมโมโนโคลนอลแอนติให้บริสทธิ์ แล ะนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ TC โดยวิธี ELISA 3 แบบ พบว่า ชุดตรวจสอบที่ให้ความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 1.13 และ 0.09 ng/ml ตามลำดับ รองลงมาคือ biotin-indirect competitive ELISA ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 2.63 และ 0.19 ng/ml ตามลำดับ และชุดตรวจสอบที่มีความไวน้อยที่สุด ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 10.73 และ 2.88 ng/ml ตามลำดับ

ชุดตรวจสอบ แบบ biotin-indirect competitive ELISA เป็นชุดตรวจสอบที่เลือกมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ สามารถสร้างกราฟมาตรฐานตรวจTCได้ในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 20 ng/ml โดยใช้TC ที่เชื่อมต่อกับ OVA เคลือบหลุมที่ความเข้มข้น 0.125 ug/ml และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเข้มข้น 0.25 ug/ml โดยพบว่ามีความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของ TCต่ำที่สุดเท่ากับ 0.19 ng/ml และสามารถตรวจวัดTCได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 0.63 ng/ml มีปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TC อยู่ในช่วง 19-86% และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TC ที่นำมาทดสอบ จากการ ทดสอบความ ถูกต้องและแม่นยำของชุดตรวจสอบ พบว่า % recovery และ %CVอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และจากการนำชุดตรวจสอบมาวิเคราะห์หา TC ตกค้างในน้ำผึ้งที่มีจำหน่าย 9 ยี่ห้อ พบมีน้ำผึ้ง 2 ยี่ห้อที่ตรวจพบสาร TC เกินกว่าค่า MRL ที่กำหนดในปริมาณ 49.50 และ 28.78 ng/ml ตามลำดับ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าชุดตรวจสอบ TC ตกค้าง โดยวิธี biotin-indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้ในการตรวจหา TC ตกค้างในน้ำผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะ

สามารถประยุกต์ใช้ชุดตรวจสอบ TC ต้นแบบ ไปวิเคราะห์หา TC ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารอื่น เช่น ในน้ำนม เนื้อไก่ ได้ แต่ต้องศึกษาถึงวิธีสกัด และผลของ matrix ต่อระบบของ ELISA ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

กระทรวงสาธารณสุข. 2550. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [ออนไลน์], แหล่งที่มา: http://www.fda.moph.go.th/fdanet/html/product/food/ntfmoph/ntf231.htm. [2552, มกราคม 6]

ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ. 2551. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเททระไซคลิน . วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต . หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .

ธารารัตน์ ธารากุล . 2545. ชุดตรวจสอบวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน : การวิจัยและ พัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ.

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์และสุภาพร แสงศรีจันทร์. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตร้าไซ - คลินที่ตกค้างในน้ำผึ้งของภาคเหนือโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถภาพสูง. ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโน โลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34, 31 ตุลาคม 2551 ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On-line SPE-FIA. LAB.TODAY 6 (สิงหาคม): 41-48.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สถาบันอาหาร . 2553 .Thailand: Food safety testing equipment [ออนไลน์], แหล่งที่มา : http://www.nfi.or.th/our-services/our-services-thai6.html. [2552, มกราคม]

Adrian, J., Fernandez, F., Sanchez-Baeza, F. and Marco, M.P. 2012. Preparation of antibodies and development kof an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the determination of doxycycline antibiotic in milk sample. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 60: 3837-3846.

Capezzuto, A., Chelini, M.O., Felippe, E.C., and Oliveira C.A. 2006. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. Animal Reproductive Science. (11): 001.

Faraj, B.A., and Ali, F.M. 1981. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 127: 10-14.

Gao, F., Zhao, G.X., Zhang, H.C., Wang, P. and Wang, J.P. 2013. Production of monoclonal antibodies against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk. Journal of environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food contaminants, and Agricultural Wastes. 48(2), 92-100.

Giannetti, L.; Longo, F.B.; Russo, M.V.; and Neri, B. 2010. Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according tocommiss decision 2002/657/EC. Analytical Bioanalytical Chemistry. 398: 1017-1023.

Hermanson, G.T. 2008. Bioconjugate techniques. U.K: Academic Press.

Jeon, M.; and Paeng, I.R. 2008. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sentitive immunoassay. Analytica Chimica Acta 626: 180-185.

Jeon, M., Kim, J., Paeng, K.J., Park, S.W. and Paeng, I.R. 2008. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. Microchemical Journal 88:26-31.

Johnstone, A.,and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge: Cambridge University Press.

Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; and Leepipatpiboon, N. 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracycline, and pyrimethamine in milk. Journal of Chromatography A. 1140:147-156.

Lee, H.; Lee, M.; Ryu, P.; Lee, H.; and Cho, M. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assays for screening the plasma residue of tetracycline antibiotics in pigs. Journal of Veterinary and Medical Science. 63(5): 553-556.

Moats, W.A. 2000. Determination of tetracycline antibiotics in beef and pork tissues using ion- paired liquid chromatography. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 2244-2248.

Pancorbo, A.C., Terrones, S.C., Carretero, A.S., and Gutierrez, A.F. 2008. Reversed- phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. Journal of Chromatography A. 1195: 107-116.

Pastor-Navarro, N.; Morais, S.; Maquieira, A.; and Puchades, R. 2007. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues Application to honey samples. Analytica Chemica Acta. 594, 211-218.

Pena, A.; Pelantova, C.; Lino, C.M.; Silveira, M.I.N.; and Solich, P. 2005. Validation of an analytical methodology for detection of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53: 3784-3788.

R-Biofarm. RIDASCREEN® Tetracycline [online], source:http://www.biokits.com/productinfo/912/RIDASCREEN-reg-Tetracycline .html. [2009, january 6]

Silva, L.S., Trevisan, M.G., Rath, S., Poppi, R. J., and Reyes, FG. R. 2005. Chromatographic determination of riboflavin in the presence of tetracyclines in and full cream milk using fluorescence detection.Journal of Brazilian Chemical Society 16(6A): 1174-1178.

Unisensor, S.A. Tetrasensor [online], source: http://www.thaibees.com/papers/paper005.php. [2009, January 6]

Vinas, P., Balsalobre, N., Lopez-Erroz, C., and Herndez-Cardoba, M. 2004.Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. Journal of Chromatography A. 1022(1-2): 125-129.

Wang, L.F.; Peng, J.D.; and Lui, M.L. 2008. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotic. Analytica Chimica Acta 630: 101-106.

Zhang, Y.; Lu, S.; Lui, W.; Zhao, C.; and Xi, R. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55: 211-218.

Zhao, C.B., Peng, D.P., Wang, Y.L., Huang, L.L., Chen, D.M., Tao, Y.F. and Yuan, Z.H. 2008. Preparation and validation of the polyclonal antibodies for detection of chlortetracycline residues. Food and Agricultural Immunology. 19(2): 163-174.

Zhenfeng, y.; Yueming, Q.; Xiuyum, L.; and Caini, J. 2006. Determination of muti-residues of tetracycline and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry 34(9): 1255-1259.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ชั่ง	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 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	65	มิลลิลิตร
fetal bovine serum	25	มิลลิลิตร
dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ BCA protein assay เพื่อทำกราฟ มาตรฐาน

<u>BCA™ reagent A และ BCA™ reagent B</u> (BCA™ protein assay kit ของบริษัท Pierce)

ก่อนใช้ผสม Reagent A: B ในอัตราส่วน 50: 1

4. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. <u>0.1 M citrate buffer, pH 6, 4.5, 3.5 และ 3</u>

citric acid	0.1	โมลลาร์ (M)
Na_2HPO_4	0.1	โมลลาร์ (M)

ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 6, 4.5, 3.5 และ 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M phosphate buffer, pH 8

ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

hydrochloric acid (HCl) 1 M

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

5. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. stracking gel and separating gel

reagent	**stacking gel** (5%)	**separation gel** (10%)
sterile distilled water (ml)	1.46	3.84
40% acrylamide gel (ml)	0.25	2.0
1.5 M Tris, pH 8.8 (ml)	-	2.0
1.0 M Tris, pH 6.8 (ml)	0.25	-
10% SDS (ml)	0.02	0.08
10% APS (ml)	0.02	0.08
TEMED (ml)	0.002	0.0032
final volume (ml)	2	8

2. sample buffer

SDS 2%

60 mM Tris (pH 6.8)

bromophenol blue 0.01%

glycerol 10%

beta-mercaptoethanol 10%

3. running buffer (1X) 1 L

Tris	3.02 กรัม
glycine	18.8 กรัม
SDS	1.0 กรัม

4. coomassie brilliant blue (250 ml)

coomassie brilliant blue R-250	0.25%
methanol	50%
acetic acid	10%

5. destaining solution (1 L)

methanol	5%
acetic acid	10%

6. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1. 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 (stock reagent)

ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

2. 0.01 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

0.2 M phosphate buffer, pH 7.4	1,000	มิลลิลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

ผสมให้เข้ากัน

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อแอนลีน	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

5. 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0

$C_2H_3O_2$ $Na.3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด้วย glacial acetic acid จนได้ pH 6.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. substrate TMB

3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine	1	มิลลิกรัม
0.15 M phosphate citrate buffer	10	มิลลิลิตร
DMSO	100	ไมโครลิตร
30% H_2O_2	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7. 1 M H_2SO_4 (stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	102	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	898	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)