

เอนไซม์ลิ่งคิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจหาซีโพรฟลอกซาซินตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร



นางสาวอรพรรณ เสี่ยงเกษม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CIPROFLOXACIN RESIDUE
DETECTION IN FOOD PRODUCTS

Miss Orapan Siengkasem



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ลึงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจหา
	ซีโพรฟลอกซาซินตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร
โดย	นางสาวอรพรรณ เสี่ยงเกษม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวงนิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

อรรถพรณ เสียงเกษม : เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับการตรวจหาซิโพรฟลอกซาซินตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CIPROFLOXACIN RESIDUE DETECTION IN FOOD PRODUCTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, 121 หน้า.

ซิโพรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin, CFX) เป็นสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์กว้างในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำปศุสัตว์และการประมง อย่างไรก็ตาม CFX ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของมนุษย์และการเพิ่มขึ้นของเชื้อโรคดื้อยา จึงได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในอาหาร (maximum residue limit) ในหลายประเทศ ซึ่งโดยทั่วไปนั้น วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (ELISA) เป็นที่ยอมรับและถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจคัดกรองเพื่อตรวจสอบยาตกค้าง ในการศึกษานี้ จึงใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อ CFX ในการเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA แบบแข่งขันใน 3 รูปแบบ ได้แก่ direct competitive ELISA (dcELISA), indirect competitive ELISA (icELISA-GAM) และ direct competitive ELISA (dcELISA-SV) พบว่า ชุดตรวจสอบแบบ dcELISA คือ รูปแบบที่ไวที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ ความจำเพาะของการทดสอบได้ถูกศึกษาและแสดงค่าในรูปของร้อยละของการทำปฏิกิริยาข้าม พบว่า MAb สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนเท่านั้น มีค่าอยู่ในช่วง 0.5% - 18% แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ทำการศึกษา โดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทำ dcELISA จะอยู่ระหว่าง 0.00375 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการตรวจวัด CFX ในตัวอย่างอาหาร เนื้อหมู เนื้อไก่ และ นม ที่ถูกเติม CFX ไว้ พบว่ามีค่าความถูกต้องซึ่งแสดงในรูปของร้อยละของการนำกลับอยู่ในช่วง 83-110% และค่าความแม่นยำในรูปของร้อยละของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 2.2-15.4% ซึ่งทั้งค่าความถูกต้องและความแม่นยำนั้นยอมรับได้ ดังนั้นจากการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า dcELISA มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหา CFX ในผลิตภัณฑ์อาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5772256223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ELISA / CIPROFLOXACIN / SENSITIVITY / DETECTION

ORAPAN SIENGKASEM: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CIPROFLOXACIN RESIDUE DETECTION IN FOOD PRODUCTS. ADVISOR: ASST. PROF. NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 121 pp.

Ciprofloxacin (CPFX) is a broad-spectrum fluoroquinolone (FQ) antibiotic used in livestock and fishery. However, the CPFX residue in animal product could cause health problems in human and increase of drug resistance pathogens. The maximum residual limits (MRLs) have been set in many countries. In general, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is widely accepted and used as a screening method to detect many drug residues. In this research, monoclonal antibodies (MAb) 11-5A1-B3, which specifically binds to ciprofloxacin, was applied in 3 formats of competitive ELISA such as direct competitive ELISA (dcELISA), indirect competitive ELISA (icELISA-GAM) and direct competitive ELISA (dcELISA-SV). It was found that the dcELISA was the most sensitive format with the 50% inhibition concentration (IC_{50}) value of 0.15 ng/ml. In addition, specificity of the test was studied and quantified in term of % cross reactivity. The MAb was cross-reacted only to the FQs in a range of 0.5% - 18 % but not to other test antibiotics. The working suitable range of dcELISA was between 0.00375 and 0.96 ng/ml. The detection of CPFX in CPFX-spiked pork, shrimp and milk samples revealed the accuracy in term of the % recovery value between 83 -110% and the precision in term of % coefficient of variation (CV) between 2.25-15.4%. Both the accuracy and the precision were acceptable. Therefore, these result indicated that the dcELISA was suitable for the detection of CPFX in food products.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนแนะนำปรับปรุงแก้ไขงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และ

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำทางด้านวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำและความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และการประยุกต์ใช้ และทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2559 (GRB_APS_60_59_61_05)

ขอขอบคุณ พี่ๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ รวมถึงให้กำลังใจ คำแนะนำให้สามารถทำงานวิจัยจนเกิดผลสำเร็จและมีความสุขมาโดยตลอดตั้งแต่ทำการวิจัยจนสำเร็จเป็นเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่มีส่วนร่วมกับความสำเร็จครั้งนี้ ทั้งให้คำแนะนำ คำสอนที่สามารถนำไปใช้ในชีวิตประจำวันได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูป.....	ณ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ถ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 สารซีโพรฟลอกซาซิน.....	4
2.1.2 ผลกระทบจากการใช้สารปฏิชีวนะ CPFX.....	6
2.1.3 การตรวจวิเคราะห์ CPFX.....	8
2.1.3.1 การตรวจวิเคราะห์ CPFX ด้วยวิธีทางเคมี.....	9
2.1.3.2 การตรวจวิเคราะห์ CPFX ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา.....	9
2.1.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA).....	10
2.1.4.1 Non competitive ELISA.....	11
2.1.4.2 Competitive ELISA.....	13

2.1.5 องค์ประกอบที่สำคัญของวิธี ELISA	16
2.1.5.1 แอนติบอดี (antibody, Ab).....	16
2.1.5.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb).....	17
2.1.5.3 แอนติเจน (antigen).....	20
2.1.5.4 เอนไซม์ (Enzyme).....	21
2.1.5.5 สับสเตรท (Substrate).....	22
2.1.5.6 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง (Solid support).....	22
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	25
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.3 เซลล์ที่เลือกใช้	28
3.4 ขั้นตอนการวิจัย	29
3.4.1 การเชื่อมต่อสารซีโทรฟลอกซาซินกับโปรตีนพาหะ	29
3.4.1.1 การเชื่อมต่อสารซีโทรฟลอกซาซินกับโอวัลบูมิน	29
3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ CPFX โดยวิธี BCA assay.....	30
3.4.2 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPFX.....	30
3.4.2.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CPFX.....	30
3.4.2.2 การแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา.....	31
3.4.2.3 การทดสอบการสร้าง MAb จำเพาะต่อ CPFX ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....	31
3.4.3 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์.....	32
3.4.3.1 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography.....	32

3.4.3.2 การทดสอบความสามารถในการจับกับ CPFX ของ MAb ด้วยวิธี indirect ELISA	32
3.4.4. การเตรียมชุดตรวจสอบ CPFX ด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ	33
3.4.4.1. วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (dcELISA)	33
3.4.4.1.1 การเชื่อมต่อ CPFX กับเอนไซม์ HRP	33
3.4.4.1.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม	33
3.4.4.1.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA	35
3.4.4.2 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (dcELISA-SV).....	37
3.4.4.2.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA	37
ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb-biotin.....	37
3.4.4.2.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV.....	39
3.4.4.3 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (icELISA-GAM).....	41
3.4.4.3.1 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA	41
3.4.4.3.2 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM	43
3.4.5 การวิเคราะห์ผล.....	45
3.4.5.1 วิธีการหาค่าความไว	45
3.4.5.2 วิธีการหาค่าความจำเพาะ	46
3.4.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน	46
3.4.6. ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPFX ด้วยวิธี ELISA ต้นแบบกับตัวอย่างอาหาร.....	46
3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA .	47
3.4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู	47
3.4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	49

3.4.6.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกึ่งสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA..	51
3.4.6.2.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อกึ่ง	51
3.4.6.2.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง.....	53
3.4.6.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA...	55
3.4.6.3.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างน้ำนม	55
3.4.6.3.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำนม	57
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	59
4.1 การเชื่อมต่อระหว่างซีโพรฟลอกซาซินกับ OVA	59
4.2 การทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะต่อ CPFX ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....	61
4.3 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์ และการทดสอบความสามารถในการจับกับ CPFX ของ MAb ด้วย วิธี indirect ELISA หลังทำให้บริสุทธิ์	62
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ CPFX ด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ.....	64
4.4.1 วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (dcELISA)	64
4.4.1.1 การเชื่อมต่อ CPFX กับเอนไซม์ HRP	64
4.4.1.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-HRP และ MAb ที่ เคลือบพื้นหลุม.....	65
4.4.1.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA.....	66
4.4.2 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไปโอติน (dcELISA-SV).....	68
4.4.2.1 การเชื่อมต่อระหว่าง MAb กับไปโอติน	68
4.4.2.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA และ MAb- biotin.....	69
4.4.2.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV	70
4.4.3 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (icELISA-GAM).....	72

4.4.3.1 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้น หุลุม และ MAb.....	72
4.4.3.2 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM.....	73
4.5 การวิเคราะห์ผล	76
4.5.1 การเปรียบเทียบค่าความไวของ ELISA 3 รูปแบบ	76
4.5.2 การหาค่าความจำเพาะ.....	77
4.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน.....	78
4.6 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPF-X ด้วยวิธี dcELISA กับตัวอย่างอาหาร.....	82
4.6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPF-X ด้วยวิธี dcELISA.....	82
4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู	82
4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPF-X ในตัวอย่างเนื้อหมู	83
4.6.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้งสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPF-X ด้วยวิธี dcELISA.....	85
4.6.2.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกและเมทานอลในตัวอย่างเนื้อกุ้ง.....	85
4.6.2.2 การศึกษาระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อกุ้ง	85
4.6.2.3 เปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPF-X ในเนื้อกุ้งที่สกัดโดย ไม่ใช่ เมทานอลกับสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25 และ 50%	90
4.6.2.4 การตรวจวัดปริมาณ CPF-X ในตัวอย่างเนื้อกุ้ง	92
4.6.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPF-X ด้วยวิธี dcELISA	93
4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่าง น้ำนม	93
4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPF-X ในตัวอย่างน้ำนม.....	95
4.6.4 เปรียบเทียบค่าความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวัด CPF-X ของงานวิจัยนี้ กับ งานวิจัยอื่นๆ	97
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	99

รายการอ้างอิง	101
ภาคผนวก.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	121



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2. 1ค่า MRL ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรป สำหรับซีโพรฟลอกซาซินที่ตกค้างในเนื้อเยื่อ ต่างๆ.....	7
ตารางที่ 2. 2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี	18
ตารางที่ 4. 1 ปริมาณโปรตีนของ CPFY-OVA ด้วยวิธี BCA assay.....	59
ตารางที่ 4. 2 การหาอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFY กับ OVA.....	61
ตารางที่ 4. 3 ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์.....	64
ตารางที่ 4. 4 ปริมาณโปรตีนของ CPFY-HRP ด้วยวิธี BCA assay.....	64
ตารางที่ 4. 5 ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง MAb ที่เคลือบพื้นหลุม กับ	65
ตารางที่ 4. 6 ผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA ของอัตราส่วนความ เข้มข้นระหว่าง MAb กับ CPFY-HRP	68
ตารางที่ 4. 7 ปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin ด้วยวิธี BCA assay.....	68
ตารางที่ 4. 8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง MAb-biotin กับ CPFY-OVA ที่เคลือบพื้น หลุม ด้วยวิธี direct ELISA.....	69
ตารางที่ 4. 9 ผลการทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อซีโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วย วิธี Direct competitive ELISA (dcELISA-SV).....	72
ตารางที่ 4. 10 ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง MAb กับ CPFY-OVA ที่ เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี Indirect ELISA (iELISA-GAM).....	73
ตารางที่ 4. 11 ผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ของ อัตราส่วนระหว่าง MAb กับ CPFY-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม	76
ตารางที่ 4. 12 สรุปผลการเปรียบเทียบ ELISA รูปแบบต่างๆ.....	77

ตารางที่ 4. 13 ตารางเปรียบเทียบค่าความไวของ ELISA ที่ใช้ตรวจหา CPFX ในตัวอย่างอาหาร ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ.....	77
ตารางที่ 4. 14 ผลการทำปฏิกิริยาข้ามของ MAb โดยวิธี dcELISA.....	78
ตารางที่ 4. 15 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ ได้จากการทำ dcELISA ที่ใช้สำหรับเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่เหมาะ สำหรับใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน	79
ตารางที่ 4. 16 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้ จากการทำ dcELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน	81
ตารางที่ 4. 17 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	84
ตารางที่ 4. 18 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	84
ตารางที่ 4. 19 ผลการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณซีโพรฟลอกซาซินในเนื้อกึ่ง ระหว่างการสกัดโดยไม่ใช้เมทานอลกับสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25 และ 50% โดยการทำ Direct competitive ELISA.....	91
ตารางที่ 4. 20 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง.....	92
ตารางที่ 4. 21 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง.....	93
ตารางที่ 4. 22 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างน้ำมัน.....	95
ตารางที่ 4. 23 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างน้ำมัน.....	96
ตารางที่ 4. 24 ผลการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวัด CPFX ของ งานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ	98
ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPFX-OVA	107
ตารางที่ ก. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPFX-HRP	108
ตารางที่ ก. 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย IgG มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb	109

ตารางที่ ก. 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin.....	110
ตารางที่ ก. 5 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดย dcELISA (intra assay).....	111
ตารางที่ ก. 6 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดย dcELISA (inter assay).....	112
ตารางที่ ก. 7 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกุ้งโดย dcELISA (intra assay).....	113
ตารางที่ ก. 8 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกุ้งโดย dcELISA (inter assay).....	114
ตารางที่ ก. 9 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างน้ำมันโดย dcELISA (intra assay).....	115
ตารางที่ ก. 10 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างน้ำมันโดย dcELISA (inter assay)	116
ตารางที่ ก. 11 การหาอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ OVA.....	117
ตารางที่ ก. 12 แสดงค่าความเข้มข้นของเมทานอลมีผลต่อระบบ dcELISA.....	118



สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2. 1 โครงสร้างซีโทรฟลอกซาซินและสารอื่นๆในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน	5
รูปที่ 2. 2 ปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในปศุสัตว์	6
รูปที่ 2. 3 วิธีการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิคต่างๆ	8
รูปที่ 2. 4 หลักการของ Direct ELISA	11
รูปที่ 2. 5 หลักการของ Indirect ELISA	12
รูปที่ 2. 6 หลักการของ Direct competitive ELISA (dcELISA).....	13
รูปที่ 2. 7 หลักการของ Direct competitive ELISA (dcELISA-SV).....	14
รูปที่ 2. 8 หลักการของ Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM).....	15
รูปที่ 2. 9 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี.....	17
รูปที่ 2. 10 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง	20
รูปที่ 3. 1 การเชื่อมต่อ CPFX กับโปรตีนพาหะ OVA ด้วยวิธี Carbodimide active ester method	29
รูปที่ 3. 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสม.....	34
รูปที่ 3. 3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA.....	36
รูปที่ 3. 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb-biotin ด้วยวิธี direct ELISA (dcELISA-SV)	38
รูปที่ 3. 5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV.....	40
รูปที่ 3. 6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb ด้วยวิธี Indirect ELISA (iELISA-GAM).....	42
รูปที่ 3. 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM	44
รูปที่ 3. 8 กราฟแสดงตัวอย่างการหาค่าความไว.....	45

รูปที่ 3. 9 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบและระดับการเจ็บจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	48
รูปที่ 3. 10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	50
รูปที่ 3. 11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบของแมทริกและระดับการเจ็บจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อกุ้ง.....	52
รูปที่ 3. 12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกุ้ง.....	54
รูปที่ 3. 13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบและระดับการเจ็บจางแมทริกในตัวอย่างน้ำนม.....	56
รูปที่ 3. 14 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำนม.....	58
รูปที่ 4. 1 UV-Visible spectra ของ CPFX ที่ความเข้มข้น 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), OVA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CPFX-OVA.....	60
รูปที่ 4. 2 กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะกับ CPFX ของเซลล์ไฮบริโดมาท์สโคลน 11-5A-B3 ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร ที่ไมใส่เซรัม (SFM) ด้วยวิธี icELISA-GAM.....	62
รูปที่ 4. 3 โครมาโตแกรมจากเครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) แสดงปริมาณโปรตีนแต่ละแฟรคชันที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (—) และแสดงผลการตรวจสอบ MAb ด้วยวิธี Indirect ELISA ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (—).....	63
รูปที่ 4. 4 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA.....	67
รูปที่ 4. 5 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV.....	71
รูปที่ 4. 6 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM.....	75
รูปที่ 4. 7 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของ CPFX ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism Ver. 5.0 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน,(1), และกราฟมาตรฐาน,(2).....	80
รูปที่ 4. 8 กราฟมาตรฐานโดยที่แกน X เป็นค่า %B/B ₀ แกน Y เป็นความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	81

รูปที่ 4. 9	กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมูที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....	83
รูปที่ 4. 10	กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกุ้งที่ถูกสกัดด้วย PBS (เมทานอล0%) ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....	87
รูปที่ 4. 11	กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกุ้งที่ถูกสกัดด้วยเมทานอล 25% ที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. และ จ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 4 และ 80 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....	88
รูปที่ 4. 12	กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกุ้งที่ถูกสกัดด้วยเมทานอล 50% ที่ระดับ การเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. จ. และ ฉ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 40, 80 และ 160 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....	89
รูปที่ 4. 13	กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในน้ำมันที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. และ จ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 40 และ 80 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....	94
รูปที่ ก. 1	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPIX-OVA	107
รูปที่ ก. 2	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPIX-HRP	108
รูปที่ ก. 3	กราฟมาตรฐานของสารละลาย IgG ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb.....	109
รูปที่ ก. 4	กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ....	110

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
%CR	percentage of cross-reactivity
%CV	percentage of coefficient of variation
%R	percentage of recovery
°C	degree celsius
μg	microgram
μl	microlitre
A	absorbance
Ab	antibody
Ag	antigen
BCA assay	bicinchonic acid assay
BSA	bovine serum albumin
CPFX	ciprofloxacin
dcELISA	direct competitive ELISA
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
g	gram
GAM	goat anti-mouse IgG
GAR	goat anti-rat IgG
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% inhibition concentration
icELISA-GAM	indirect competitive ELISA using GAM-HRP
dcELISA-SV	direct competitive ELISA using streptavidin-HRP
iELISA	indirect ELISA
Da	Dalton
LOD	limit of detection
M	molar
MAb	monoclonal antibody
PBS	phosphate buffer saline
PBST	phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์จำนวนมากเพื่อนำผลิตภัณฑ์จากสัตว์มาบริโภค มีการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ในการรักษาและป้องกันเพิ่มขึ้น หนึ่งในบรรดาสารปฏิชีวนะต่างๆ คือ ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin , CFX) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones, FQs) ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ในวงกว้าง โดยการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และ CFX เป็นยาที่ใช้ง่ายมีทั้งแบบเม็ดใช้รับประทานและแบบน้ำซึ่งใช้สำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จึงเหมาะสำหรับใช้รักษาและป้องกันโรคติดเชื้อตามส่วนต่างๆ ของร่างกายทั้งในคนและการปศุสัตว์ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบทางเดินหายใจ ทั้งนี้การใช้ CFX ในปริมาณเพิ่มขึ้น อาจตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ ส่งผลต่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดย CFX ที่ตกค้างอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ (Huang และ คณะ, 2011) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระบายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และบางครั้งอาจเกิดอาการซึมเศร้า นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้น อีกทั้งมีการศึกษาในสัตว์พบว่า CFX ส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อตัวอ่อนในครรภ์ (Schaefer, 1996) ดังนั้นหน่วยงานที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารจึงได้กำหนดค่าปริมาณต่ำสุด (Maximum Residue Limit, MRL) ของ CFX ในอาหารไว้ที่ 100-300 นาโนกรัมต่อกรัม ขึ้นกับชนิดของอาหาร เช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ และนม มีค่า MRL เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อกรัม (Commission Regulation (EU), 2009) และที่สำคัญที่สุด คือ ห้ามไม่ให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวในสัตว์ที่ผลิตไปสำหรับบริโภค (Maise และ คณะ, 2011) สำหรับการตรวจหา CFX ตกค้าง สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Gorla และ คณะ, 2010; Said และ คณะ, 2015), Turbulent Flow Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (TFC-MS/MS) (X. Chen และ คณะ, 2009; Krebber และ คณะ, 2009) และ Capillary Electrophoresis (CE) (Barron และ คณะ, 2001; Piñero และ คณะ, 2012; Zhao และ คณะ, 2014) ซึ่งการตรวจวัดหาปริมาณสารปฏิชีวนะ CFX ด้วยวิธีทางเคมีเหล่านี้มีความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ จึงไม่เหมาะแก่การคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก ในทางตรงกันข้าม วิธีทางภูมิคุ้มกัน

วิทยา เช่น Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์คัดกรองตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (screening) (Cháfer-Pericás และ คณะ, 2010) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ (Dzantiev และ คณะ, 2014) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ ความไวสูง รวดเร็ว ดังนั้นจึงพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ ELISA ในการตรวจ CPFX ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ชุดตรวจ CPFX ในผลิตภัณฑ์นม (Huang และ คณะ, 2010) ชุดตรวจ CPFX และ เอนโรฟลอกซาซิน (ENR) ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (Hu และ คณะ, 2010) และชุดตรวจ CPFX ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมู (Yuan และ คณะ, 2010)

จากงานวิจัยดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่า ELISA นั้น มีความไวสูง ส่วนความถูกต้องและความแม่นยำนั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วย HPLC แต่ในประเทศไทยนั้นต้องทำการสั่งซื้อชุดตรวจหา CPFX ด้วยวิธี ELISA จากต่างประเทศ ทำให้มีราคาสูง ในงานวิจัยดังกล่าวนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี ELISA สำหรับตรวจหา CPFX ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งจะช่วยให้ต้นทุนในการตรวจวัดการตกค้างของ CPFX ลดลงและเป็นการลดการนำเข้าสินค้าต่างประเทศ โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) จำเพาะต่อ CPFX รหัสโคลน 11-5A-B3 ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์มาใช้ ซึ่งมีความไวสูงเมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 0.054 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.0008 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความจำเพาะสูง เมื่อพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ซึ่งรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของ MAb (% cross reactivity) กับสารในกลุ่มและนอกกลุ่ม เท่ากับ 0.01-0.44 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาคภูมิ นันทินิตย์วรกุล, 2554) จึงมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจหา CPFX ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี ELISA

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับตรวจหา CPFX ตกค้างในอาหาร

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.3.2 เตรียมแอนติเจนโดยการเชื่อม CPFX กับโปรตีนพาหะ (CPFX-OVA)
- 1.3.3 เพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPFX

- 1.3.4 ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
- 1.3.5 ทดสอบความไวในการวัดซีโปรฟลอกซาซินด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ
 - 1.3.5.1 รูปแบบที่ 1. วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (CPFX-HRP) เรียกว่า Direct competitive ELISA (dcELISA)
 - 1.3.5.2 รูปแบบที่ 2. วิธีใช้ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (SV-HRP) เรียกว่า Direct competitive ELISA (dcELISA-SV)
 - 1.3.5.3 รูปแบบที่ 3. วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM-HRP) เรียกว่า Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM)
- 1.3.6 ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPFX ด้วยวิธี ELISA ต้นแบบกับตัวอย่างอาหาร
- 1.3.7 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานทางวิชาการและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้สภาวะการตรวจวัด CPFX ตกค้างในอาหารด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่มีประสิทธิภาพ

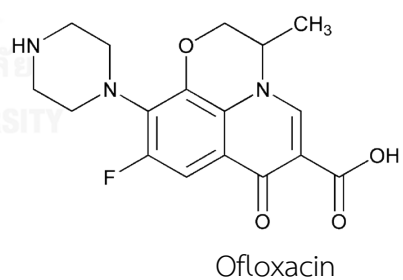
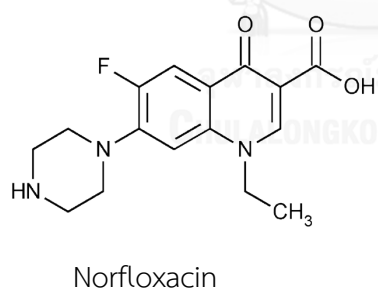
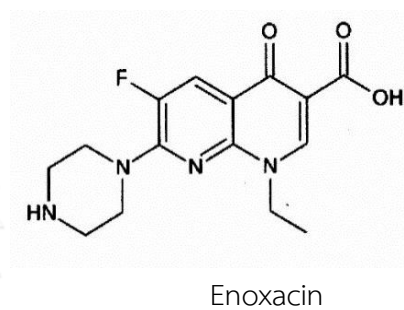
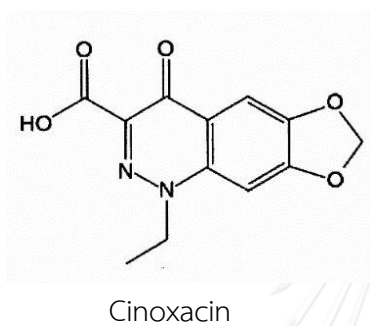
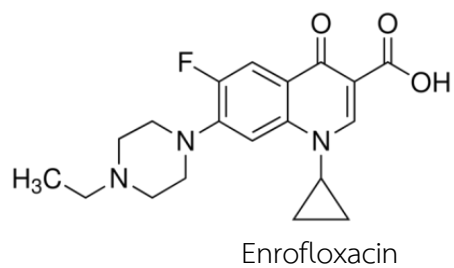
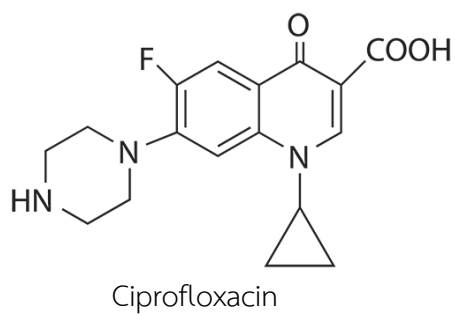
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารซีโพรฟลอกซาซิน

ซีโพรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin, CFX) จัดเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน มีชื่อทางเคมี คือ 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-1H-quinoline-3-carboxylic acid สูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 331.342 ดาลตัน เป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์โดยใช้โครงสร้างพื้นฐานของสารในกลุ่มควิโนโลน ซึ่งเป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และมีหมู่คาร์บอกซิลิกตรงตำแหน่งที่ 3 (รูปที่ 2.1) ซึ่งทำให้สารนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ในแบคทีเรียแกรมลบ (Holtzapple และ คณะ, 2001) และยับยั้งเอนไซม์ ดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรสโฟร์ ในแบคทีเรียแกรมบวก (DNA topoisomerase IV) (Bertino และ Fish, 2000) ซึ่งทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดที่ DNA สายเดี่ยวให้แยกตัวออกจากกัน (Replication fork) ในขั้นตอนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA Replication) จึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ ด้วยคุณสมบัติที่ออกฤทธิ์กว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงมีใช้แพร่หลายในการปศุสัตว์และการประมง (Hu และ คณะ, 2010) เพื่อรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารในสัตว์ นอกจากนี้ยังใช้ในคนเพื่อรักษาการติดเชื้อของหูชั้นกลาง ไชนัสอักเสบ ทางเดินปัสสาวะอักเสบกระเพาะปัสสาวะอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด (อภัย ราษฎร์จิตร, 2560)

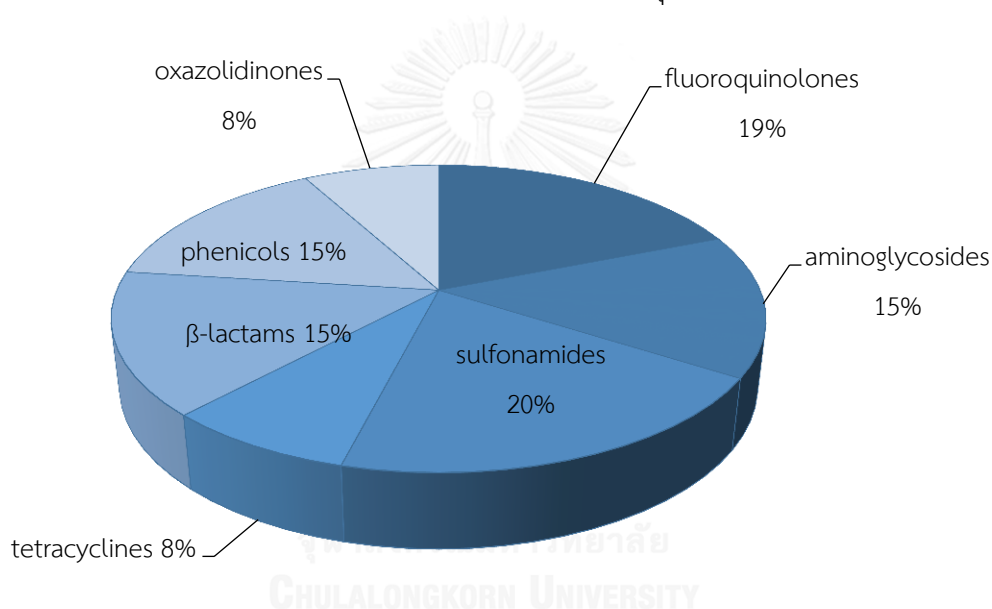


รูปที่ 2. 1 โครงสร้างซีพโรฟลอกซาซินและสารอื่นๆในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน

ที่มา : Potamia และ Calokerinos (2013)

2.1.2 ผลกระทบจากการใช้สารปฏิชีวนะ CPMX

เนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนสำหรับการรักษาอาการติดเชื้อในการปศุสัตว์และประมงอย่างแพร่หลาย รองลงมาจากยาปฏิชีวนะกลุ่มซัลโฟเอไมด์ (Sulfonamides) (รูปที่ 2.2) (Cháfer-Pericás และ คณะ, 2010) โดยไม่มีการกำหนดปริมาณการใช้ อย่างชัดเจน จึงอาจมีการใช้ในปริมาณที่มากเกินไปจนเกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์เหล่านี้ได้ เช่น นม ไข่ เนื้อ และ อวัยวะภายในต่างๆ เป็นต้น ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสได้รับสารตกค้างเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย ส่งผลข้างเคียงต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมดูแลในด้านความปลอดภัยในอาหาร ทั้งในประเทศไทยและนานาชาติ จึงได้มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในอาหารบริโภค หรือ MRL (Maximum residue limits) ในสุกร โค และสัตว์ปีก ดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.2 ปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคในปศุสัตว์
ที่มา: Cháfer-Pericás และ คณะ (2010)

ตารางที่ 2. ค่า MRL ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรป สำหรับซีโพรฟลอกซาซินที่ตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ

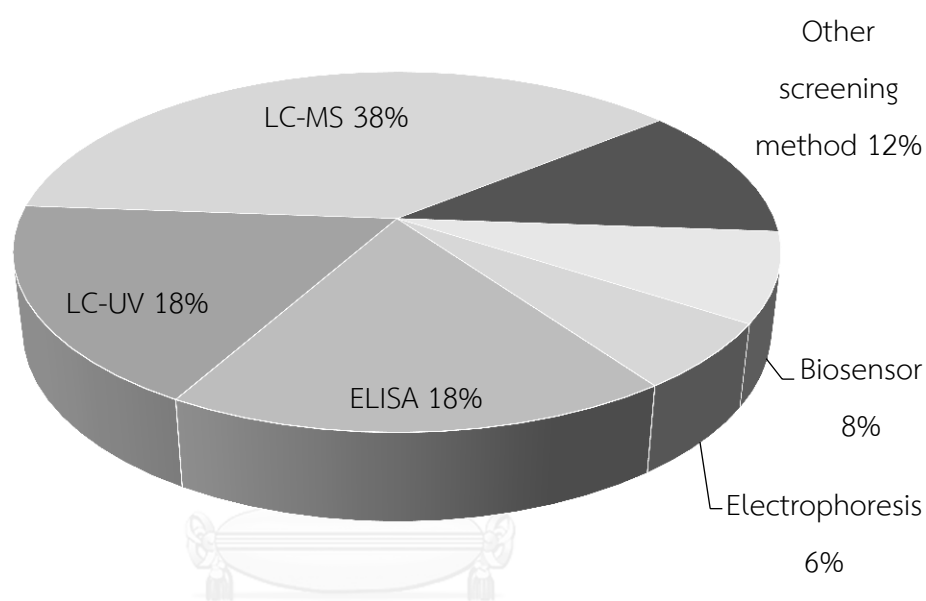
ชนิดสัตว์	MRLs (ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม)**	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	หมายเหตุ
โค, แกะ, แพะ	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	300	ตับ	
	200	ไต	
	100	นม	
หมู, กระจ่าง	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	ห้ามให้ใช้ในสัตว์ที่ ผลิตไข่สำหรับบริโภค
	100	หนังและไขมัน	
	200	ตับ	
	300	ไต	
สัตว์ทุกชนิดยกเว้น โค, แกะ, แพะ, หมู, กระจ่างและสัตว์ปีก	100	กล้ามเนื้อ	
	100	ไขมัน	
	200	ตับ	
	200	ไต	

** ค่าที่แสดงเป็นผลรวมระหว่างสารปฏิชีวนะซีโพรฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซิน

แหล่งที่มา : COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 (2009)

2.1.3 การตรวจวิเคราะห์ CPFX

ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ในระบบฟาร์มมาตรฐาน เกษตรกรต้องดูแลฟาร์มไม่ให้มีการใช้ยาที่ห้ามใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จึงไม่สามารถรู้ได้ว่า อาหารสัตว์ ยาสัตว์ หรือปัจจัยการผลิตต่างๆ ที่นำไปใช้เลี้ยงสัตว์มีสารที่ห้ามใช้หรือไม่ เนื่องจากไม่มีเครื่องมือในการตรวจสอบที่จะสามารถทำได้ในเบื้องต้น แม้ว่าการตรวจสอบสินค้าก่อนการส่งออกนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็น สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปขึ้นอยู่กับประเภทของเทคนิคที่นำมาประยุกต์ใช้ จากรูปที่ 2.3 จะเห็นว่า การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS สูงถึง 38% ตามด้วย LC-UV (18%) และ ELISA (18%) (Cháfer-Pericás และ คณะ, 2010)



รูปที่ 2.3 วิธีการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิคต่างๆ
ที่มา: Cháfer-Pericás และ คณะ (2010)

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ CPFX นั้น แบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

2.1.3.1 การตรวจวิเคราะห์ CPFX ด้วยวิธีทางเคมี

เนื่องจากการตกค้างของ CPFX ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดย CPFX ที่ตกค้างอาจก่อให้เกิดการติดยาของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจหาปริมาณสารตกค้างของ CPFX ซึ่งมีวิธีในการตรวจคือ วิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) (Gorla และ คณะ, 2010; Said และ คณะ, 2015), เทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS) (X. Chen และ คณะ, 2009) และเทคนิค capillary electrophoresis (CE) (Barron และ คณะ, 2001; Pintero และ คณะ, 2012) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่ก็มีข้อเสียเช่นกัน คือ เครื่องมือมีราคาแพง, ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างค่อนข้างนาน ทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และมีความจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก

2.1.3.2 การตรวจวิเคราะห์ CPFX ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

จากข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างในตัวอย่าง โดยวิธีทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method) คือ เทคนิคเอนไซม์ลิงคิอิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ (Dzantiev และ คณะ, 2014) สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่าวิธีทางเคมี และทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญการทำการวิเคราะห์เหมือนวิธีทางเคมี

2.1.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในเซรัม หรือการตรวจหาการตกค้างของสารต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์มาเชื่อมต่อหรือติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำการตรวจหา Antigen-Antibody complex ที่เกิดขึ้นโดยให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต ของเอนไซม์ที่ใช้ เมื่อสับสเตรต ถูกย่อยจะได้สารที่มีสีเกิดขึ้นสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าหรือทำการวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ตรวจหา (Wild, 2001) กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ competitive ELISA และ non competitive ELISA

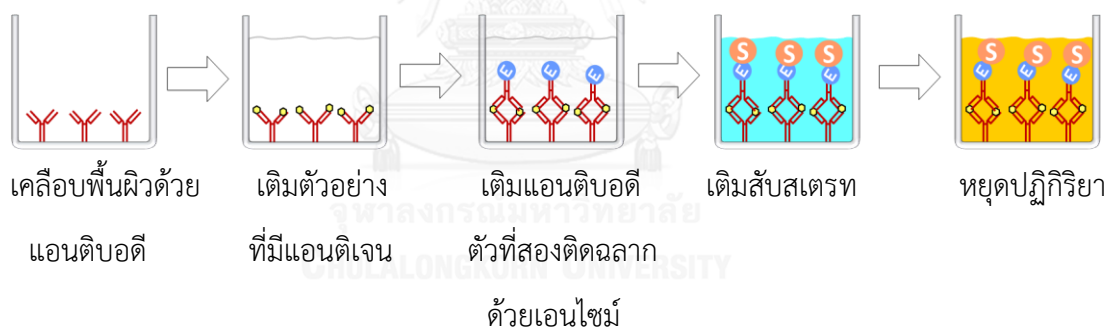


2.1.4.1 Non competitive ELISA

การทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจสอบหาแอนติบอดีและแอนติเจน โดยอาจแบ่งได้เป็น ประเภทหลัก คือ

ก. Direct ELISA

เริ่มต้นด้วยการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา เมื่อใส่แอนติเจนในรูปอิสระ แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีดังกล่าว จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนในรูปอิสระและติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปในปริมาณที่มากพอ ซึ่งจะ去做ปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรทของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรท จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ อาจเรียกรูปแบบนี้ว่า sandwich ELISA (Gan และ Patel, 2013; Kuang และ คณะ, 2013) (รูปที่ 2.4)



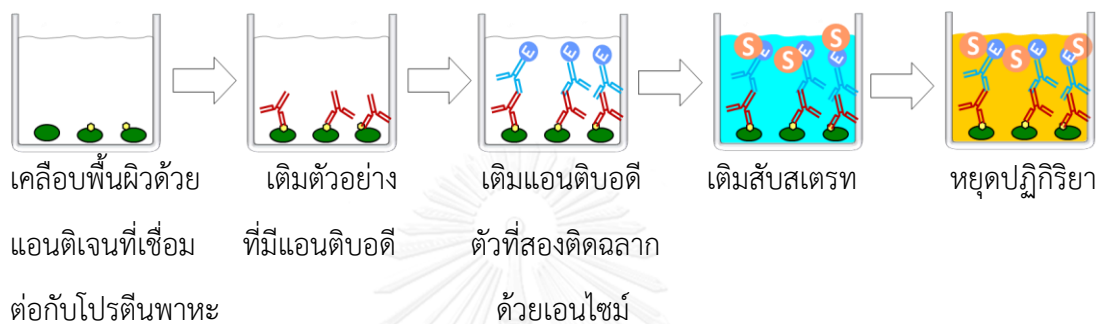
รูปที่ 2. 4 หลักการของ Direct ELISA

ที่มา: Gan และ Patel, 2013; Kuang และ คณะ, 2013

หมายเหตุ:  คือ แอนติบอดี,  คือ แอนติเจน,  คือ แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์,  คือ สับสเตรท





ข. Indirect ELISA

สำหรับวิธี ELISA ที่นิยมใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี ได้แก่วิธี Indirect ELISA ซึ่งมีหลักการคือ ให้แอนติบอดีที่ต้องการตรวจหาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่เคลือบบน solid phase ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก จากนั้นเติม anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้วจึงเติมสับสเตรท โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณของแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจ (Gan และ Patel, 2013) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2. 5 หลักการของ Indirect ELISA

ที่มา: Gan และPatel (2013)

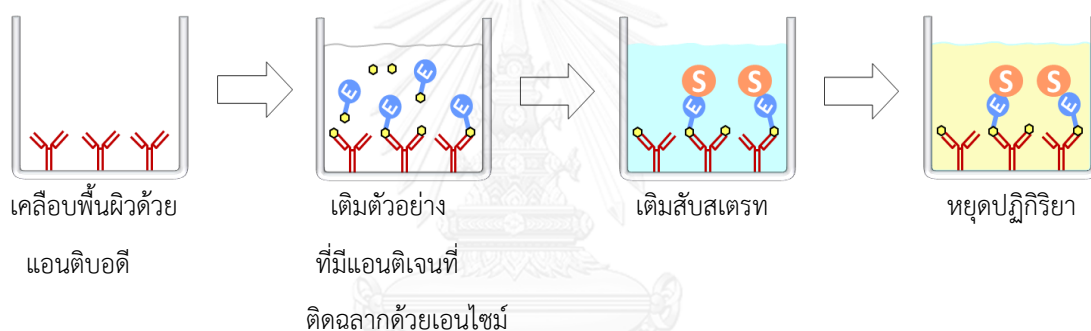
หมายเหตุ:  คือ แอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ,  คือ แอนติบอดี,  คือ แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์,  คือ สับสเตรท

2.1.4.2 Competitive ELISA

เป็นวิธีการตรวจสอบที่ใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนในรูปอิสระ โดยอาศัยแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาใช้ในการตรวจสอบ





ก. ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Direct competitive ELISA, dcELISA)

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดี เติมน้ำแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์พร้อมกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ แอนติเจนในตัวอย่าง (รูปอิสระ) จะแย่งจับแอนติบอดี ทำให้แอนติเจนที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์จับแอนติบอดีได้น้อยลง เมื่อล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกและเติมสับสเตรทของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ความเข้มของสีของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง (Y. Zhang และ คณะ, 2013) (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2. 6 หลักการของ Direct competitive ELISA (dcELISA)

ที่มา: Y. Zhang และ คณะ (2013)

หมายเหตุ:  คือ แอนติบอดี,  คือ แอนติเจน,  คือ แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์,  คือ สับสเตรท

ข. ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

(Direct competitive ELISA, dcELISA-SV)

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอตินซึ่งจำเพาะกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่พร้อมกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน แอนติเจนในตัวอย่างจะแย่งจับแอนติบอดี ทำให้แอนติเจนที่เคลือบอยู่ถูกจับกับแอนติบอดีได้น้อยลง จากนั้นใส่ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ streptavidin จะเข้าจับกับไบโอติน (อาศัยการจับกันระหว่าง streptavidin กับไบโอติน) ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรทของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ความเข้มของสีของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง (Lakshmipriya และ คณะ, 2016)

(รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2. 7 หลักการของ Direct competitive ELISA (dcELISA-SV)

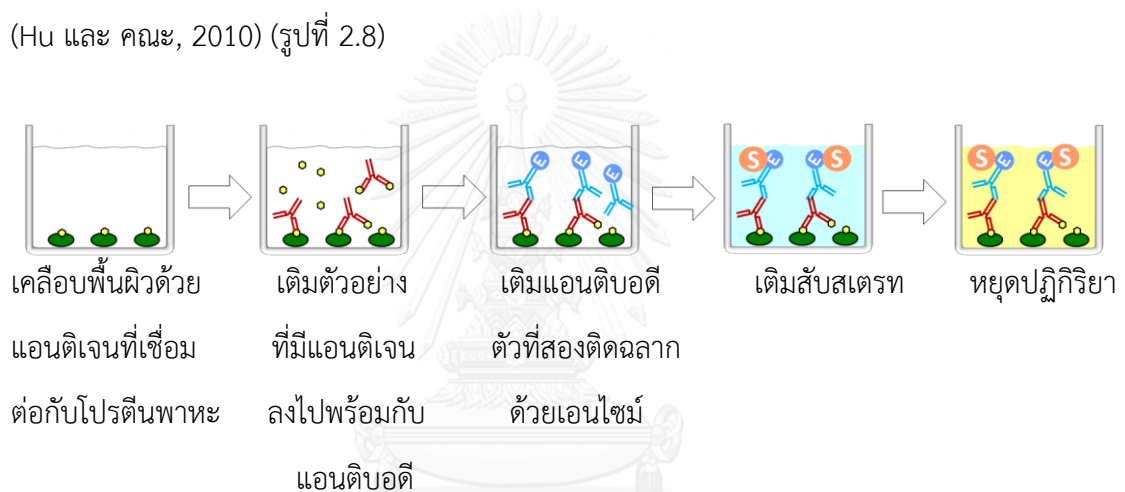
ที่มา: Lakshmipriya และ คณะ (2016)

หมายเหตุ: คือ แอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ, คือ แอนติบอดี, คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือ แอนติเจน, คือ สับสเตรท

ค. ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

(Indirect competitive ELISA, icELISA-GAM)

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เติมแอนติบอดีซึ่งจำเพาะกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่พร้อมกับตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีที่เติมไปพร้อมกัน แอนติเจนในตัวอย่าง (รูปอิสระ) จะแย่งจับแอนติบอดี ทำให้แอนติเจนที่เคลือบอยู่ถูกจับกับแอนติบอดีได้น้อยลง เมื่อใส่แอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีที่ใส่ลงไปตัวแรก และล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรทของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ความเข้มของสีของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง (Hu และ คณະ, 2010) (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2. 8 หลักการของ Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM)

ที่มา: Hu และ คณະ (2010)

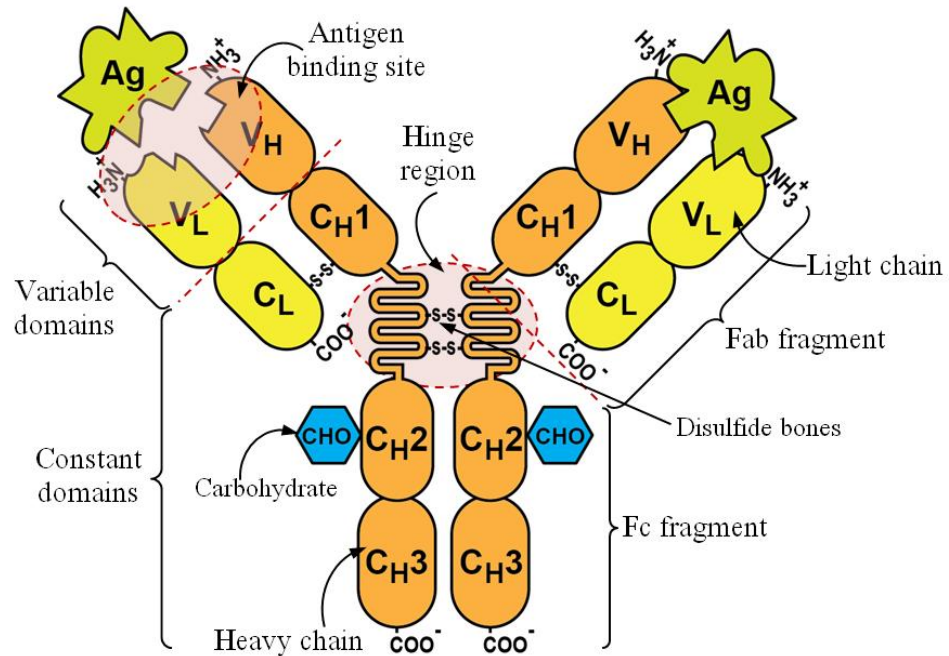
หมายเหตุ: คือ แอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ, คือ แอนติบอดี, คือ แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือ แอนติเจน, คือ สับสเตรท

2.1.5 องค์ประกอบที่สำคัญของวิธี ELISA

2.1.5.1 แอนติบอดี (antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นโกลโคโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์และสัตว์ชั้นสูง ซึ่งทำหน้าที่ตรวจจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งเรียกว่า แอนติเจน ที่เข้าสู่ในร่างกาย เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เป็นต้น แอนติบอดีสร้างขึ้นจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด บี-ลิมโฟไซต์ พบได้ในกระแสเลือดหรือของเหลวในร่างกาย เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด บี-ลิมโฟไซต์ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน จะมีการแบ่งเซลล์กลายเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่หลักในการสร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายแอนติเจน เรียกว่า เซลล์พลาสมา โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ถูกผลิตออกมาจะมีคุณสมบัติในการจดจำแอนติเจนที่จำเพาะของมัน โดยจะเข้าจับที่บริเวณ อีพิโทป (epitope) ของแอนติเจน ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนและถูกกำจัดออกจากร่างกาย

โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีอยู่ในรูปตัววาย (Y shape) ดังรูปที่ 2.9 ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) 4 สาย คือ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy (H) chain 2 สาย เป็นส่วนที่ใช้ในการแบ่งไอโซไทป์ของแอนติบอดีโดยอาศัยความแตกต่างของ H chain ซึ่งมีอยู่ 5 ไอโซไทป์ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE และส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเบาเรียกว่า Light (L) chain 2 สาย แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งมีการดออะมิโนลำดับที่ 1-100 ตัวแรกจากปลาย N (N-terminal) เป็นโดเมนแรกจะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนสูงมาก จึงเรียกส่วนนี้ว่า บริเวณแปรปรวน (Variable region) ซึ่งแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับแอนติเจน (antigen binding site) ส่วนบริเวณข้อพับที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยึดหยุ่น ทำให้แขนทั้งสองข้างของแอนติบอดียืดห่างออกจากกันเพื่อช่วยในการจับแอนติเจนได้ดี และส่วนประกอบที่สำคัญสุดท้ายคือ บริเวณส่วนโคนของแอนติบอดี เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมาก เรียกบริเวณส่วนโคนนี้ว่า constant domains (Edelman, 1973; Nisonoff และ คณะ, 1975)



รูปที่ 2. 9 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี

ที่มา: Wongtangprasert (2012) ดัดแปลงจาก Luttmann และ คณะ (2006)

2.1.5.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb)

แอนติบอดี แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ พอลิโคลนอลแอนติบอดี (PAb) และ MAb ซึ่ง PAb ก็คือ MAb หลายๆ ชนิดรวมกันนั่นเอง ส่วน MAb นั้น คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาที่กำเนิดมาจาก บี ลิมโฟไซต์เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมามีคุณสมบัติทั้งด้านองค์ประกอบของอิมมูโนโกลบูลินและด้านความจำเพาะต่อเอพิโทปของแอนติเจนที่เหมือนกันทุกประการ (Singh และ คณะ, 2014) ความแตกต่างระหว่าง PAb และ MAb ดังตารางที่ 2.2

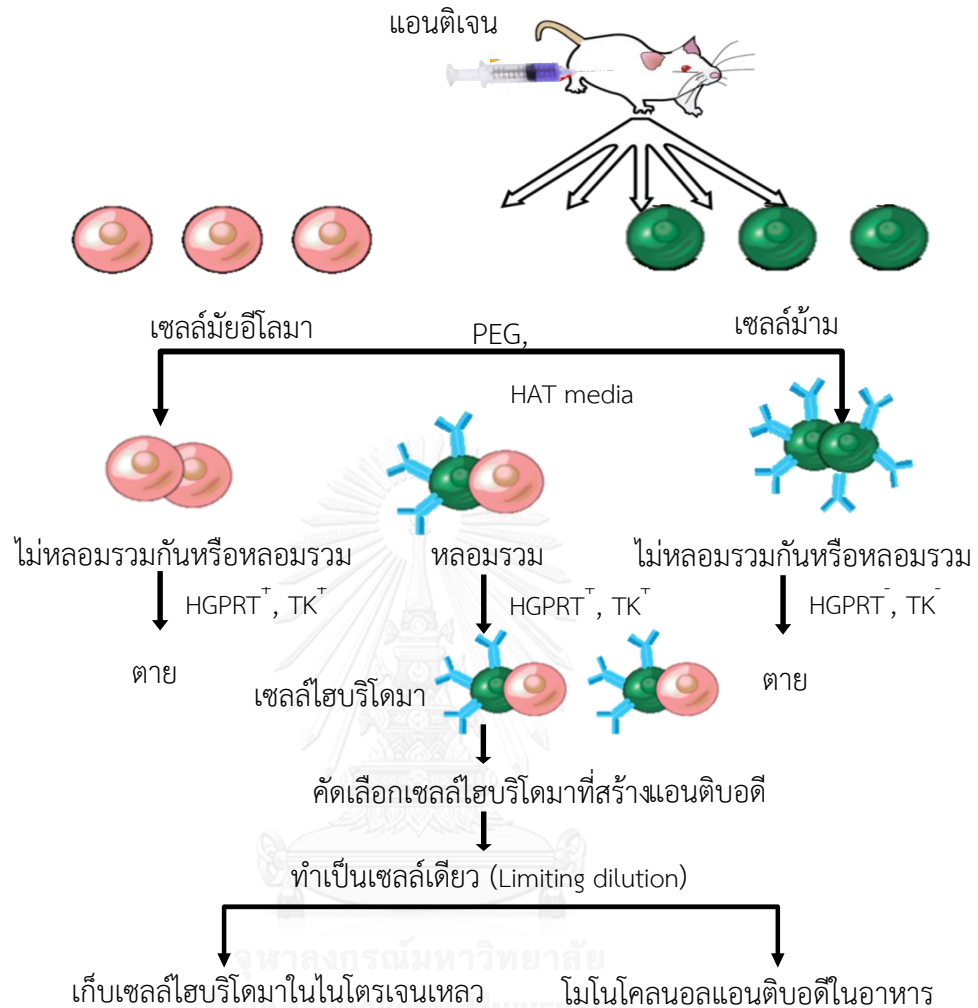
ตารางที่ 2. 2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (Specificity)	ความจำเพาะไม่สูง มักพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม	มีความจำเพาะสูง มีความคงที่เป็นมาตรฐาน เดียว
สัมพรรคภาพ (Affinity)	จับได้หลายอีพิโทปต่อ แอนติเจน	จับได้เพียงอีพิโทปเดียว
ปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้	ประมาณ 100 มิลลิลิตร จาก ซีรัมกระต่าย	ปริมาณไม่จำกัด
การปนเปื้อนของแอนติบอดี ชนิดอื่น	อาจสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์	จะไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่อาจพบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำช่องท้อง
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้ในการ กระตุ้นจึงจำเป็นต้องทำให้ บริสุทธิ์	จำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจึง ไม่ จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาในการผลิต	ระยะสั้น ไม่เกิน 6 สัปดาห์	ระยะยาว อย่างน้อย 4 เดือน
ข้อดี	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ผลิตได้ไม่จำกัด
ข้อเสีย	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละ ครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาในการผลิตมาก ต้นทุนสูง

2.1.5.2.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเทคนิค somatic hybridization

ในสภาวะปกติร่างกายจะมีเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาสมาที่สามารถผลิต MAb ได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะแบ่งตัวได้ไม่ดีและตายในเวลาอันสั้น ทำให้ไม่สามารถผลิต MAb ในหลอดทดลองได้ ในขณะที่เดียวกันมีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งกำเนิดมาจากเซลล์พลาสมาเรียกว่า เซลล์มัยโอโลมา (myeloma) มีสมบัติสามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป แต่เซลล์กลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ ในกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี somatic hybridization แสดงดังรูปที่ 2.10 มีหลักการที่จะนำสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มารวมไว้ในเซลล์เดียวกัน

ในปี 1975 Kohler และ Milstein ได้เป็นคนคิดค้นวิธีเตรียมเซลล์ให้สามารถสร้างแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะได้ และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมาก โดยอาศัยหลักการของการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) หรือ somatic cell hybridization ระหว่าง บี-ลิมโฟไซต์ปกติ ซึ่งเป็นเซลล์สร้างแอนติบอดีกับเซลล์มัยโอโลมาหรือ plasmacytomas ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่อาศัยสารที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ เช่น พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ผลที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ คือ เซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ซึ่งสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการและมีอายุที่ยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์มัยโอโลมา ซึ่งเรียกเซลล์ดังกล่าวว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) และเรียกแอนติบอดีที่ได้ว่า MAb นั้นเองเนื่องจาก MAb นี้จะสร้างจากเซลล์ที่ได้มาจากโคลนเดียวกัน และมีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวเท่านั้น (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



รูปที่ 2. 10 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง

ที่มา: ไพศาล สิทธิกรกุล (2548)

2.1.5.3 แอนติเจน (antigen)

โดยปกติแล้ว เฮปแทน (hapten) หรือ แอนติเจนที่มีขนาดเล็ก โมเลกุลเล็ก อาทิ เช่น สารเคมี ไม่สามารถยึดเกาะพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมซึ่งผลิตจาก polystyrene จึงต้องทำการเชื่อมต่อโมเลกุลของแอนติเจนเข้ากับโปรตีนพาหะ เพื่ออาศัยคุณสมบัติโมเลกุลของโปรตีนที่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ด้วย noncovalent binding (Hofstetter และ คณะ, 1997)

2.1.5.4 เอนไซม์ (Enzyme)

เทคนิค ELISA พัฒนามาจากเทคนิคที่ใช้สารรังสีไอโซโทปในการตรวจวิเคราะห์ หรือที่เรียกว่า Radioimmunoassay (RIA) โดยเทคนิคนี้ได้ใช้สารกัมมันตภาพรังสีซึ่งเป็นอันตราย จึงเปลี่ยนมาเป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท ทำให้สารละลายเกิดสี จึงสามารถตรวจวัด การจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนได้โดยการวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น โดยอ่าน ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical density; OD) ดังนั้น เอนไซม์จึงถือว่าเป็น สารสำคัญที่ใช้ในการตรวจวัดปฏิกิริยา เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบ มี 2 ชนิด ได้แก่ Alkaline phosphatase (AP) และ Horseradish peroxidase (HRP) (Wild, 2001)

AP เป็นเอนไซม์ที่ได้จากลำไส้ของวัว (bovine intestinal mucosa) หรือเตรียม ได้จาก *E.coli* ที่ผ่านวิธีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 84 กิโลดาลตัน ซึ่งทำหน้าที่คะตะไลซ์เกิดไฮโดรไลซิสของ phosphate ester บนสับสเตรท ทำให้มีสี เกิดขึ้น ซึ่งโมเลกุลของ AP มีหมู่อะมิโนจำนวนมากสำหรับการเชื่อมต่อแอนติเจนหรือแอนติบอดี (Wild, 2001)

HRP เป็นเอนไซม์ที่ได้จากส่วนรากของต้นหัวไชเท้า หรือ horseradish (*Amoracia rusticana*) ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44 กิโลดาลตัน เอนไซม์จะถูกออกซิไดส์ด้วย hydrogen peroxide เกิดเป็น oxidized horseradish peroxidase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สับสเตรทที่เหมาะสมทำให้มีสีที่เปลี่ยนไป ซึ่งการเชื่อมต่อหรือติดฉลากเอนไซม์ HRP เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้โดยอาศัยกรดอะมิโน lysine 4 ตัวที่อยู่ในโมเลกุลของ เอนไซม์ (Wild, 2001)

นอกจากการตรวจสอบโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทแล้ว ยังสามารถอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ ตรวจวัดสัญญาณ โดยระบบของ biotin/streptavidin นี้ สามารถเพิ่มความแรงของสัญญาณ ให้ชุดตรวจสอบมีความไว (Sensitivity) สูงขึ้น เนื่องจาก streptavidin 1 โมเลกุลสามารถจับกับ โมเลกุลของ biotin ได้ถึง 4 โมเลกุล (Wild, 2001)

2.1.5.5 สับสเตรท (Substrate)

เนื่องจาก เทคนิค ELISA เป็นการตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ จึงต้องใช้สับสเตรทเป็นตัววัด และการเลือกใช้สับสเตรทขึ้นอยู่กับชนิดของกับเอนไซม์ที่ใช้ ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดของเทคนิค ELISA คือ Colorimetry, Fluorometry และ Chemiluminescence วิธีการตรวจวัดที่เป็นที่นิยมที่สุดคือ Colorimetry

Colorimetry เป็นการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดหลังจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละตัวเมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีต่างกัน ทำให้การอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน (Wild, 2001) เช่น

ก. เอนไซม์ AP สามารถเลือกใช้สับสเตรทได้ดังนี้

- PNP (p-nitrophenyl phosphate) อ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร
- 1NP (1-naphthyl phosphate) อ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร
- PMP (Phenolphthalein monophosphate) อ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ข. เอนไซม์ HRP สามารถเลือกใช้สับสเตรทได้ดังนี้

- OPD (O-Phenylenediamine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาล จึงสามารถอ่านผลค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
- ATBS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonate) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียวจึงสามารถอ่านผลค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร
- TMB (3',3',5,5'-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง จึงสามารถอ่านผลค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.1.5.6 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง (Solid support)

ในขั้นตอนแรกๆของเทคนิค ELISA จะต้องมีการยึดตรึงหรือเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวจานทดสอบก่อน เรียกขั้นตอนแรกนี้ว่า coating หรือ immobilization ซึ่งปัจจุบันใช้จานทดสอบชนิด 96 หลุม (96-well-plate) ทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็นออร์แกนิกพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติการโปร่งแสงที่ดีช่วยให้เครื่อง spectrophotometer สามารถอ่านค่าการดูดกลืนแสงได้สะดวก และที่สำคัญคือ ออร์แกนิกพอลิเมอร์นี้ มี hydrophobic surface

ที่สามารถจับกับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ดีด้วย noncovalent binding ทำให้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีนั้นเป็นเนื้อเดียวตลอดพื้นและไม่หลุดออกมาง่ายๆ ในระหว่างขั้นตอนการล้างและการทำปฏิกิริยา (Hofstetter และ คณะ, 1997)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

CPFEX เป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านปศุสัตว์และการประมง และเนื่องจากการใช้ในปริมาณที่มาก ทำให้มีการตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค และอาจเป็นสาเหตุก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค จึงมีการกำหนดค่า MRL โดย EU ด้วยเหตุนี้จึงมีรายงานการตรวจหา CPFEX ที่ตกค้างในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

ปี 2010 Yuan และคณะ ทำการเปรียบเทียบการตรวจวัดสาร CPFEX ที่ตกค้างในตัวอย่างเนื้อหมู CPFEX โดยใช้วิธีทางเคมี คือ HPLC กับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ ELISA ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM) พบว่า ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ด้วยวิธี HPLC และ ELISA เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าวิธี ELISA ให้ความไวสูงกว่าวิธี HPLC ตามลำดับ จากนั้นทำการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำการพามาตรฐานสำหรับการตรวจวัด CPFEX ในตัวอย่างน้ำนม พบว่า วิธี HPLC และ ELISA ได้ค่าความเข้มข้นในช่วง 10 ถึง 5,120 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.32-5,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบ CPFEX ในเนื้อหมู เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องและความแม่นยำของทั้ง 2 วิธี พบว่าวิธี HPLC ให้ค่าความถูกต้องซึ่งแสดงในรูปของร้อยละของการนำกลับ (% recovery, RV) อยู่ในช่วง 75.73 ถึง 85.98 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความแม่นยำซึ่งแสดงในรูปของร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of variation, CV) อยู่ในช่วง 5.49 ถึง 9.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธี ELISA ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ RV อยู่ในช่วง 48.32 ถึง 75.58 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ CV อยู่ในช่วง 4.83 ถึง 7.50 เปอร์เซ็นต์

ปี 2010 Huang และคณะ มีการใช้กระดาษในการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CPFEX เพื่อใช้สำหรับตรวจ CPFEX ที่ตกค้างในน้ำนม เมื่อตรวจสอบความสามารถของ MAb ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM) พบว่า ค่า LOD คือ 0.095 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.47 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นมีการวัดศึกษาหาความจำเพาะ (Specificity) ของ MAb โดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน พบว่าไม่มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม (%Cross reactivity <0.005) และมีการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มอยู่ในช่วง 11 ถึง 28.8 เปอร์เซ็นต์ (Enrofloxacin 28 เปอร์เซ็นต์,

Fleroxacin 22.6 เปอร์เซ็นต์, Pefloxacin 20.4 เปอร์เซ็นต์, Ofloxacin 13.1 เปอร์เซ็นต์ และ Norfloxacin 11 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นทำการหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำการกราฟมาตรฐาน สำหรับการตรวจวัด CPF_X ในตัวอย่างน้ำนม ได้ค่าความเข้มข้นในช่วง 0.19 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ recovery (%RV) อยู่ในช่วง 63 ถึง 84.6 เปอร์เซ็นต์ และ เปอร์เซ็นต์ Coefficient of variation (%CV) อยู่ในช่วง 6.26 ถึง 12.2 เปอร์เซ็นต์

ปี 2010 Hu และคณะ มีการใช้หนูในการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CPF_X เพื่อใช้สำหรับตรวจ CPF_X และ Enrofloxacin (ENR) ที่ตกค้างในน้ำนม เมื่อตรวจสอบความสามารถของ MAb ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM) พบว่า ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 45.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, ค่า IC₅₀ เท่ากับ 245.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับค่า IC₅₀ ของ ENR เท่ากับ 290.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นมีการวัดศึกษาหาความจำเพาะ (Specificity) ของ MAb โดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน พบว่าไม่มีการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มและสารในกลุ่ม (%Cross reactivity <0.01) ยกเว้นเอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin, ENR) เปอร์เซ็นต์ Cross reactivity เท่ากับ 84.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก ENR เป็นสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่มีโครงสร้างคล้ายกับ CPF_X และเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่าง MAb กับ ENR ค่อนข้างสูง คณะผู้จัดทำจึงใช้ MAb ในงานวิจัยนี้ตรวจสอบทั้ง CPF_X และ ENR ในตัวอย่างสัตว์น้ำ เช่น ปลานิล ปู เต่า ปลาทับทิม และกุ้งขาว โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery (%RV) อยู่ในช่วง 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และ เปอร์เซ็นต์ Coefficient of variation (%CV) ต่ำกว่า 8 เปอร์เซ็นต์

ปัจจุบันได้มีชุดตรวจสอบ CPF_X มากมายจากหลายบริษัททั่วโลก ยกตัวอย่าง เช่น ชุดตรวจสอบจากบริษัท Cusabio biotech จำกัด (Cusabio biotech CO.,Ltd.) ชื่อชุดตรวจสอบ Ciprofloxacin (CPF_X) ELISA Kit หมายเลข Catalog คือ CSB-E12034f เป็นชุดตรวจสอบที่ใช้วิธี ELISA รูปแบบ dcELISA (ใช้แอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์) ระบุค่า LOD เท่ากับ 1.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้ตรวจสอบ CPF_X ที่ตกค้างใน นม เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อปลา และเนื้อกุ้ง

ปี 2554 ภาคภูมิ นันทนิตยวรรกุล ได้ทำการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CPF_X จากหนู ได้เซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 11-5A-B3 ที่สามารถผลิต MAb ได้ และเมื่อศึกษาคุณสมบัติ พบว่า MAb ที่ได้มีไอโซไทป์ IgG1 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.054 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 0.0008 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม พบว่า การทำปฏิกิริยาข้ามกับสารภายในกลุ่มต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่ม

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น TMS	บริษัท Nikon Corporation, Japan
คอลัมน์ Hitrap Protein G Sepharose	บริษัท GE Healthcare, Sweden
เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	บริษัท Corning, USA
เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-s และ รุ่น AG204	บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy tm HT	บริษัท BIO-TEK Instrument, Inc, USA
เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Sevensasy	บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35	บริษัท M.S.E. LTD, England
เครื่อง Affinity Chromatography (AKTA TM Start)	บริษัท GE Healthcare, Sweden
จานทดสอบ ELISA 96 หลุม (Ninety-six-well ELISA)	บริษัท Corning, USA
ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Yamato Scientific Co., Ltd., Japan
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-	บริษัท International Scientific Supply

124	Co., Ltd., Thailand
ปิเปตอัตโนมัติ	บริษัท Gilson, France
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	บริษัท Memmert, Germany
2. อุปกรณ์ต่างๆ	
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	บริษัท Nipro, Thailand
ขวดแก้ว	บริษัท Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc, Denmark
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	บริษัท Nunc, Denmark
ปิเปตแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	บริษัท HBG, Germany
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	บริษัท Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc, Denmark

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acetic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Albumin, from bovie serum (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Albumin, from chicken egg white (OVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois
Biotinamido hexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Ciprofloxacin hydrochloride monohydrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Citric acid, trisodium salt dihydrate	Acros Oranics BVBA ,Belgium
Dimethylformamide (DMF)	Merck, Darmstadt, Germany
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Germany
Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Germany

Enoxacin	sigma aldrich,USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Fetal bovine serum	Biochrom, Berlin, Germany
Furazolidone	sigma aldrich,USA
Goat anti mouse IgG (GAM)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
Goat anti mouse IgG-Horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Darmstadt, Germany
30% Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Germany
ISF-1 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
Nitrofurantoin	sigma aldrich,USA
Norfloxacin	sigma aldrich,USA
Ofloxacin	sigma aldrich,USA
Peroxidase from horseradish	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
RPMI 1640 medium	Biochrom, Berlin, Germany
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	Carlo Erba, Milan, Italy
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Streptavidin horseradish peroxidase conjugate	Invitrogen, Carlsbad, California
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany

Tetracycline hydrochloride	sigma aldrich,USA
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	sigma aldrich,USA
Thimerosal	sigma aldrich,USA

3.3 เซลล์ที่เลือกใช้

เซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 11-5A-B3

โดยสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์



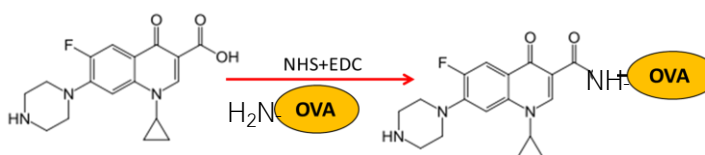
3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 การเชื่อมต่อสารซีโพรฟลอกซาซินกับโปรตีนพาหะ

3.4.1.1 การเชื่อมต่อสารซีโพรฟลอกซาซินกับโอวัลบูมิน

ทำการเชื่อมต่อ CFPX กับโปรตีนพาหะ คือ โอวัลบูมิน (ovalbumin, OVA) ด้วยวิธี Carbodimide active ester method วิธีนี้จะทำให้หมู่คาร์บอกซิลของ CFPX เชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนของ OVA เริ่มขั้นตอนด้วยการนำ CFPX 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ N-Hydroxysuccinimide (NHS) 10 มิลลิกรัม ละลายใน Dimethylformamide (DMF)

100 ไมโครลิตร มาผสมกัน และค่อยๆ เติม N-(3-Dimethylaminopropyl)-n-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 30 มิลลิกรัม ละลายใน Dimethylformamide (DMF) 300 ไมโครลิตร พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยแท่งกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงค่อยๆ หยดสารละลาย OVA 10 มิลลิกรัม ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิตร พร้อมทั้งกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งให้เกิดปฏิกิริยาข้ามคืน เพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลของ CFPX เชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนของ OVA (รูปที่ 3.1) จากนั้นกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการทำไดอะลิซิสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) ที่ pH 7.4 เปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน จึงนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณความเข้มข้น OVA ที่เชื่อมต่อกับ CFPX ด้วยวิธี BCA assay และหาอัตราส่วนของการเชื่อมต่อระหว่าง CFPX กับ OVA โดยการสแกนช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่ 200-400 nm จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (Huang และ คณະ, 2010)



รูปที่ 3. 1 การเชื่อมต่อ CFPX กับโปรตีนพาหะ OVA ด้วยวิธี Carbodimide active ester method
ที่มา: Huang และ คณະ (2010)

3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ CPMX โดยวิธี BCA assay

หลังจากทำการเชื่อมต่อ CPMX กับ OVA แล้ว ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดทดสอบ BCA Protein assay kit จากบริษัท Pierce เริ่มจากทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานโบวันซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และเจือจางสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:2, 1:4 และ 1:8 ด้วย PBS จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 ปริมาตรต่อปริมาตร เติมน้ำละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและสารตัวอย่างที่ถูกเจือจางลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติมน้ำ working reagent ลงไปในหลุมที่มีโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน

3.4.2 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CPMX

3.4.2.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CPMX

นำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 11-5A-B3 ที่จำเพาะต่อ CPMX (ภาคภูมิ, 2554) ออกจากไนโตรเจนเหลว มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวอยู่ละลาย เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมด จึงถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 10 มิลลิตร เพื่อล้างน้ำยาแช่แข็งออกจากเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ Fetal bovine serum (FBS) โดยปริมาตร โดยเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide, CO₂) ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆ ลดความเข้มข้นของ FBS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 จาก 10% FBS เหลือ 5% FBS เพื่อปรับสภาพเซลล์ให้พร้อมที่จะเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี FBS (Serum free media; SFM) จากนั้นจึงขยายพื้นที่การเลี้ยงโดยทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 500 มิลลิตร เลี้ยง ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับ CO₂ ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.2.2 การแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์ไฮบริโดมาในช่วงที่เจริญเติบโตสูงที่สุด (log phase) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ขณะเย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆจนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ ถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

3.4.2.3 การทดสอบการสร้าง MAb จำเพาะต่อ CPFX ด้วยวิธี Indirect competitive

ELISA

เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาถูกเก็บแช่แข็งไว้อย่างถาวร เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมายังมีความสามารถในการผลิต MAb ดังนั้น หลังถูกนำออกมาเลี้ยงอีกครั้ง จึงต้องนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา มาตรวจทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะต่อ CPFX-OVA และ CPFX ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุมด้วย CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 (PBST) 3 ครั้ง เติมน้ำสารละลายนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำ CPFX ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งถูกเจือจางด้วย PBS 1:5-1:5,120 เท่า ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เชื่อมอยู่ (horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG; GAM-HRP) ที่เจือจางด้วย PBS 1:10,000 เท่า ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ประกอบด้วย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 1 M sulfuric acid (H_2SO_4) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.3 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์

3.4.3.1 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography

วิธีการทำ MAb ให้บริสุทธิ์ ด้วยเครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) เริ่มจากนำโปรตีน G เซฟาโรส (protein G sapharose) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาด 5 มิลลิลิตร ชะด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 และปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MAb (จากข้อ 3.3.2.1) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปในคอลัมน์โปรตีน G เซฟาโรส ทำการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่าของคอลัมน์ จึงทำการชะ MAb ที่จับกับโปรตีน G ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 ปริมาตร 6 เท่าของคอลัมน์ โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ปริมาตรแฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละแฟรคชันมี 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 32 ไมโครลิตร สำหรับปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายให้เป็นกลาง สารละลายแต่ละแฟรคชันจะผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรจากเครื่อง จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อยืนยันว่าในแต่ละแฟรคชันมี MAb ที่มีความสามารถในการจับกับ CPFX ได้หรือไม่ หลังจากนั้นนำหลอดที่มี MAb มารวมกัน และนำไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay ดังข้อ 3.3.1.2 โดยใช้ แอนติบอดี IgG เป็นโปรตีนมาตรฐานแทน BSA

3.4.3.2 การทดสอบความสามารถในการจับกับ CPFX ของ MAb ด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่าในแต่ละแฟรคชันมี MAb ที่ยังคงมีความสามารถในการจับกับ CPFX ได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุมด้วย CPFX-OVA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแต่ละแฟรคชันที่ถูกเจือจางความเข้มข้น 1:500 เท่า ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม GAM-HRP ที่เจือจาง 1 : 10,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทของ เอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3.4.4. การเตรียมชุดตรวจสอบ CPF_X ด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ

เตรียมรูปแบบ ELISA 3 รูปแบบ สำหรับตรวจหา CPF_X ได้แก่

- รูปแบบที่ 1. วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (CPF_X-HRP) เรียกว่า Direct competitive ELISA (dcELISA)
- รูปแบบที่ 2. วิธีใช้ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (SV-HRP) เรียกว่า Direct competitive ELISA (dcELISA-SV)
- รูปแบบที่ 3. วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM-HRP) เรียกว่า Indirect competitive ELISA (icELISA-GAM)

3.4.4.1. วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (dcELISA)

3.4.4.1.1 การเชื่อมต่อ CPF_X กับเอนไซม์ HRP

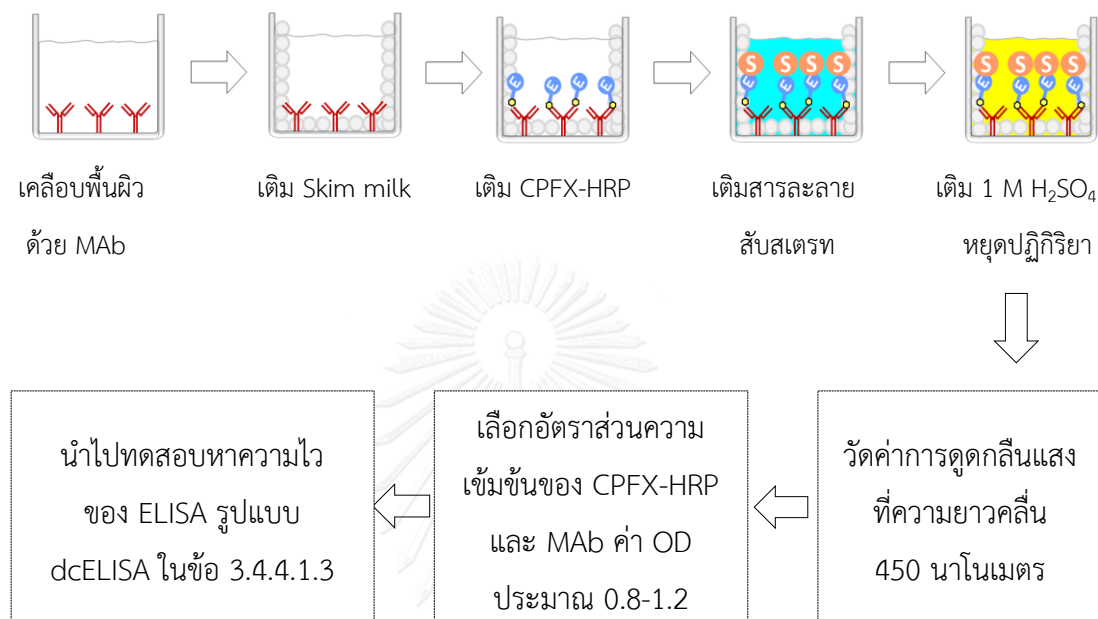
เนื่องจากเอนไซม์ HRP เป็นโปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อ CPF_X กับเอนไซม์ HRP ด้วยวิธี Carbodimide active ester method เพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลของ CPF_X เชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนของ HRP (Huang และ คณะ, 2010) เช่นเดียวกับวิธีเชื่อมต่อ CPF_X กับ OVA

ดั่งข้อ 3.4.1.1





3.4.4.1.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPF_X-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม

หลังจากทำการเชื่อมต่อ CPF_X กับเอนไซม์ HRP แล้ว ทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง MAb ที่เคลือบพื้นหลุม กับ CPF_X-HRP ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม ด้วยวิธี Direct ELISA (dELISA) เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย MAb ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำสารละลายฟรอมันเนน 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม CPF_X-HRP ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H₂SO₄

ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นเลือกอัตราส่วนความเข้มข้นของ CPFX-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD ประมาณ 0.8-1.2) เพื่อนำมาทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA ต่อไป (รูปที่ 3.2)



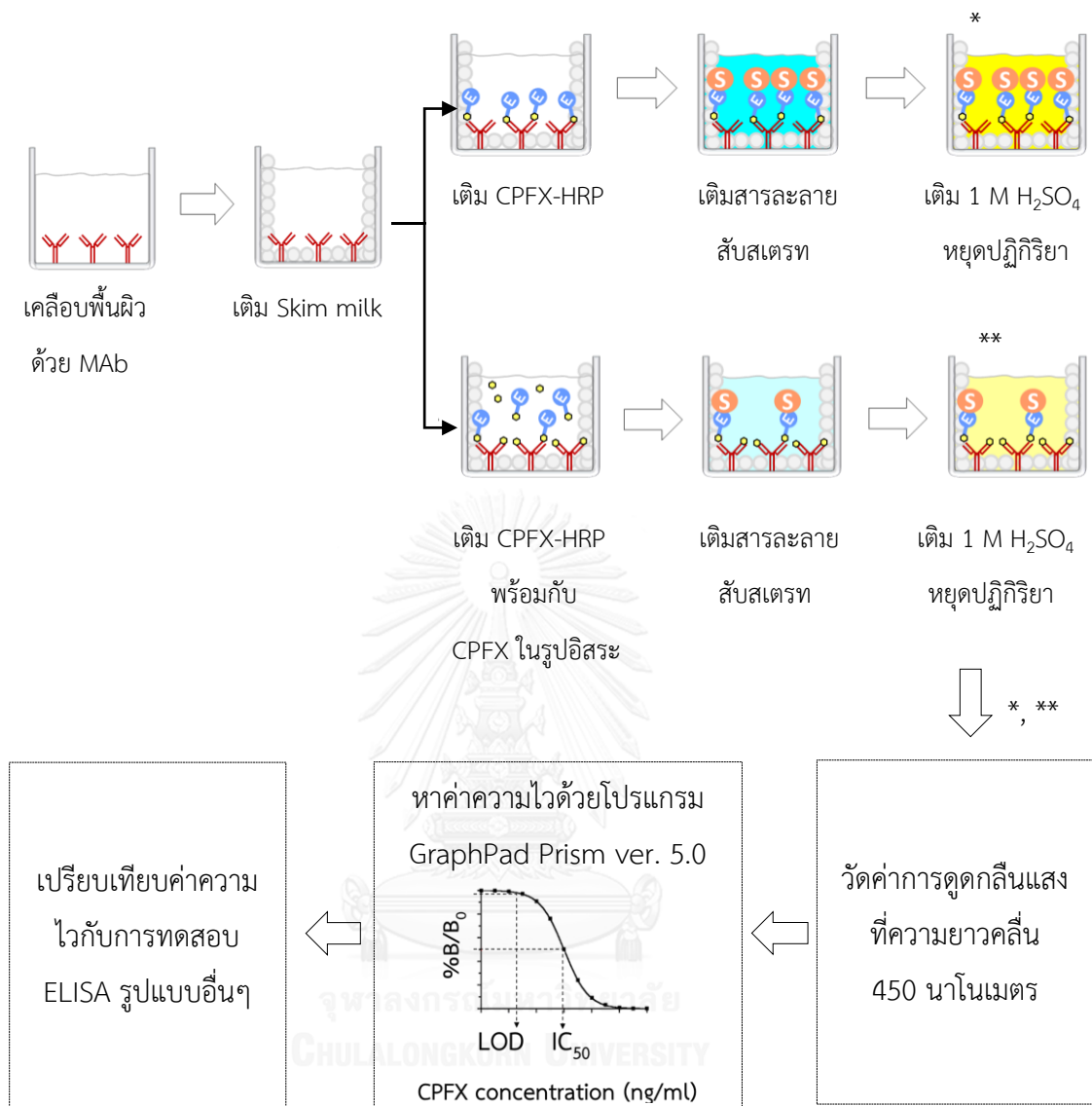
รูปที่ 3. 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม

หมายเหตุ:  คือ แอนติบอดี,  คือ skim milk,  คือ CPFX-HRP,  คือ สับสเตรท

3.4.4.1.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA

การทดสอบความไวของ ELISA นั้น เพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ MAb ระหว่าง CPF_X ในรูปอิสระ และ CPF_X-HRP โดยทำการเจือจาง CPF_X ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม และ CPF_X-HRP ด้วยวิธี dcELISA ดังนี้

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย MAb ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.4.4.1.2 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำละลายพว่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม CPF_X ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และ CPF_X-HRP ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1.2 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำละลายสับสเตรท ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาความไวโดยการสร้างกราฟ ให้แกน X คือ ลอการิทึมของความเข้มข้นของ CPF_X ในรูปแบบอิสระ และแกน Y คือ %B/B₀ เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วน B₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 หาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง CPF_X-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม ที่ให้ค่าความไวสูงที่สุดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบแบบอื่นต่อไป (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA

หมายเหตุ: คือ แอนติบอดี, คือ skim milk, คือ CFX รูปอิสระ, คือ CFX-HRP, คือ สับสเตรท

* ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B₀ เนื่องจากไม่ใส่ CFX ในรูปแบบอิสระ
 ** ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B เนื่องจากใส่ CFX ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.4.2 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอดีน (dcELISA-SV)

3.4.4.2.1 การเชื่อมต่อระหว่าง MAb กับไบโอดีน

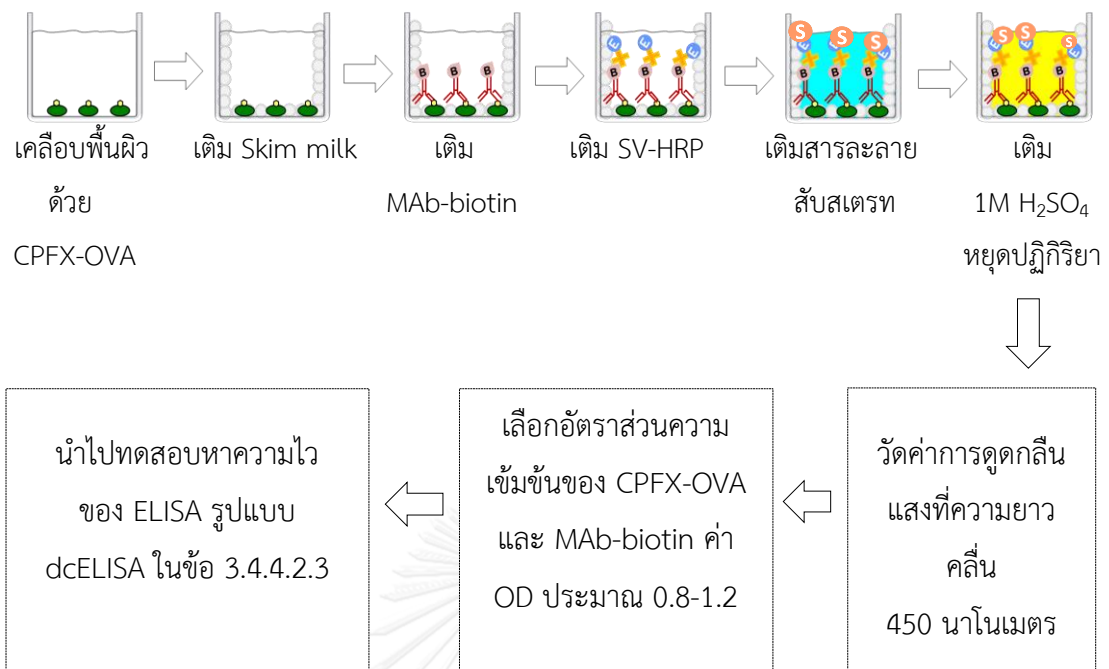
การเชื่อมต่อ MAb กับ biotin เริ่มจากนำ MAb 2 มิลลิกรัม

(จากสารละลายเข้มข้น 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร) มาทำไดอะลิซิสใน 0.1M bicarbonate buffer ที่ pH 8.4 เมื่อเปลี่ยนบัฟเฟอร์ครบ 3 ครั้ง จึงทำการเชื่อมต่อกับ biotin โดยการเติม biotin 0.2 มิลลิกรัม (จากสารละลายเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร) เพื่อให้ได้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างไบโอดีนกับแอนติบอดี เท่ากับ 1:10 (น้ำหนัก: น้ำหนัก) กวนเบาๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบ โดยการทำไดอะลิซิสใน PBS ที่ pH 7.4 ทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณความเข้มข้น MAb-biotin ด้วยวิธี BCA assay ดังข้อ 3.4.1.2

3.4.4.2.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CFPX-OVA

ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb-biotin

ทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง CFPX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม กับ MAb-biotin ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม ด้วยวิธี Direct ELISA (dELISA-SV) เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CFPX-OVA ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายพอร์ซันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 และ 2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP (SV-HRP) ซึ่งจำเพาะต่อ biotin ที่เจือจาง 1:4,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของแอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาแอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นเลือกอัตราส่วนของ CFPX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD ประมาณ 0.8-1.2) จำนวน 3 คู่ เพื่อนำมาทดสอบหาความไวของ ELISA รูปแบบ dcELISA-SV ต่อไป (รูปที่ 3.4)



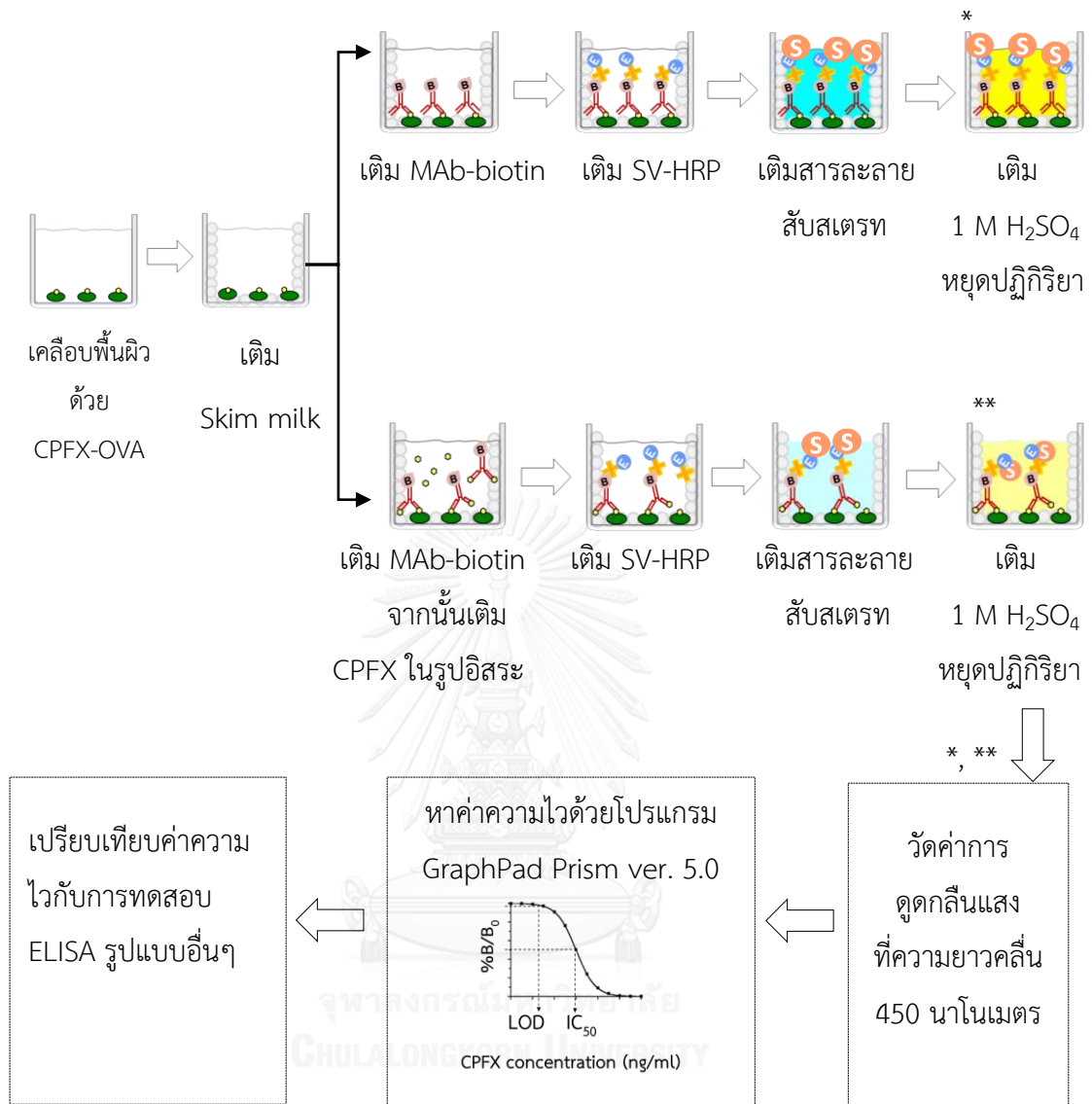
รูปที่ 3. 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb-biotin ด้วยวิธี direct ELISA (dcELISA-SV)

หมายเหตุ: คือ CPFX-OVA, คือ skim milk, คือ MAb-biotin, คือ SV-HRP, คือ สับสเตรท

3.4.4.2.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV

การทดสอบความไวของ ELISA นั้น เพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ MAb-biotin ระหว่าง CPFEX ในรูปอิสระ และ CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม จึงทำการเจือจาง CPFEX ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับ MAb-biotin และ CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมด้วยวิธี dcELISA-SV ดังนี้

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CPFEX-OVA ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.4.4.2.2 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายฟรอมงมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม CPFEX ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และ MAb-biotin ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.4.4.3.2 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม SV-HRP ซึ่งจำเพาะต่อ biotin ที่ความเข้มข้น 1:4,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาความไวโดยการสร้างกราฟ ให้แกน X คือ ลอการิทึมของความเข้มข้นของ CPFEX ในรูปแบบอิสระ และแกน Y คือ $\%B/B_0$ เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วน B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 หาคู่ความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb-biotin ที่ให้ค่าความไวสูงที่สุดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับทดสอบแบบอื่นต่อไป (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3. 5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV

หมายเหตุ: คือ CFX-OVA, คือ skim milk, คือ MAb-biotin, คือ CFX ในรูปอิสระ, คือ SV-HRP, คือ สับสเตรท

* ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B₀ เนื่องจากไม่ใส่ CFX ในรูปแบบอิสระ

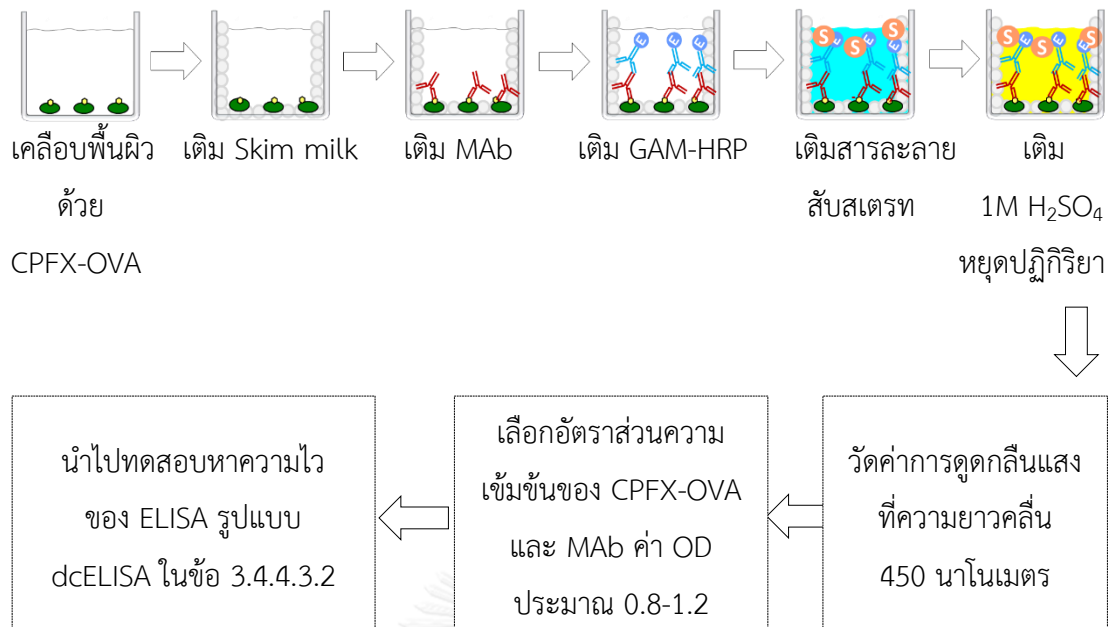
** ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B เนื่องจากใส่ CFX ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.4.3 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (icELISA-GAM)






3.4.4.3.1 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPF-X-OVA

ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb

ก่อนทำการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ต้องทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง MAb กับ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสมด้วยวิธี Indirect ELISA (iELISA-GAM) เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CPF-X-OVA ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำละลายพอร์ซันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำที่ความเข้มข้น 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 และ 2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำ GAM-HRP ที่เจือจาง 1:10,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 1 M H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นเลือกอัตราส่วนของ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD ประมาณ 0.8-1.2) เพื่อนำมาทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ต่อไป (รูปที่ 3.6)



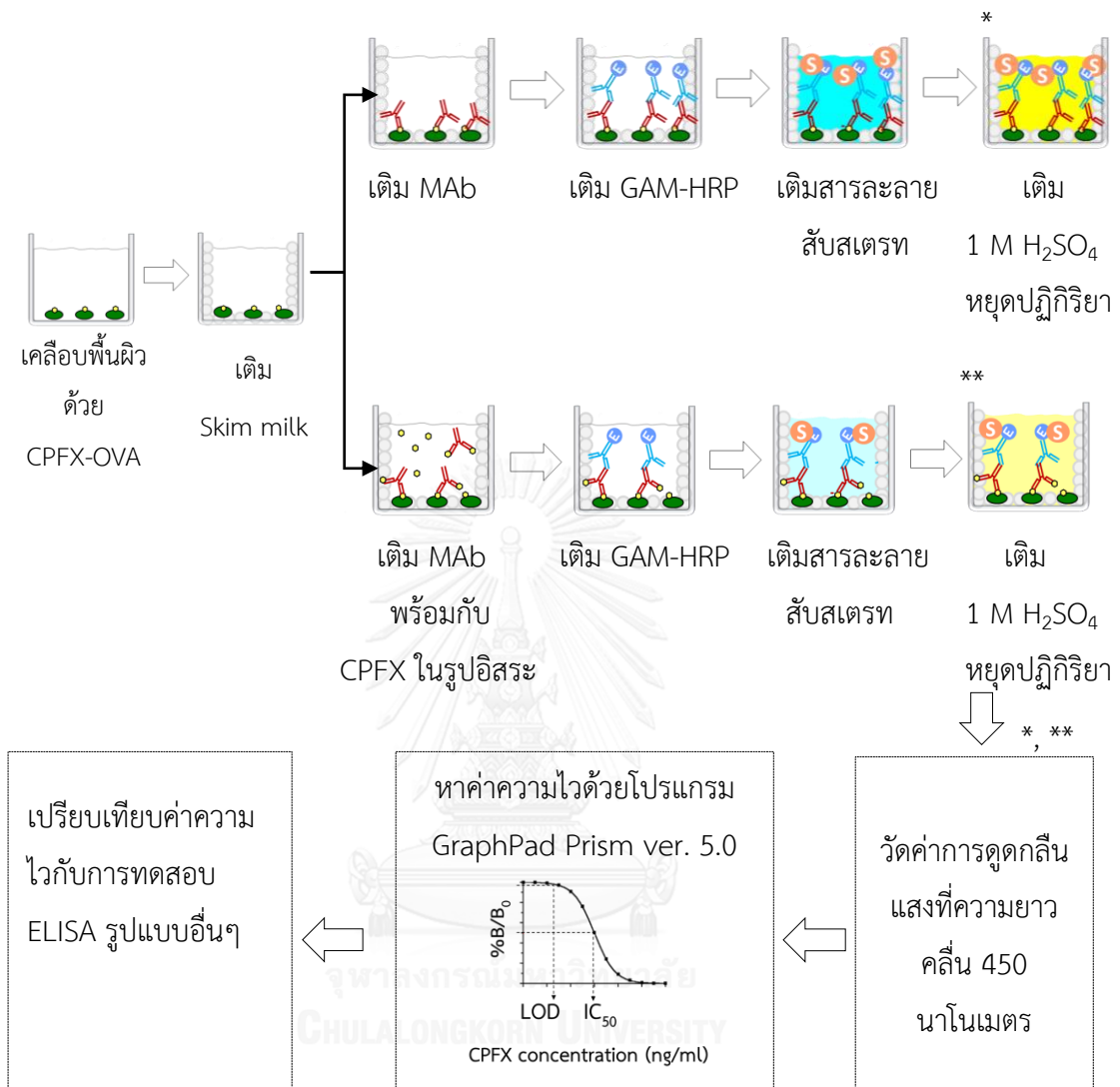
รูปที่ 3. 6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CFPX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb ด้วยวิธี Indirect ELISA (iELISA-GAM)

หมายเหตุ:  คือ CFPX-OVA,  คือ skim milk,  คือ MAb,  คือ GAM-HRP,  คือ สับสเตรท

3.4.4.3.2 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM

การทดสอบความไวของ ELISA นั้น เพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ MAb ระหว่าง CPFEX ในรูปอิสระ และ CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม จึงทำการเจือจาง CPFEX ในรูปอิสระ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับ MAb และ CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี icELISA-GAM ดังนี้

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย CPFEX-OVA ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.4.4.3.1 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำละลายยว้อมมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม CPFEX ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และ MAb ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากข้อ 3.4.4.2.1 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม GAM-HRP ที่เจือจาง 1:10,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำละลายยว้อมของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer ที่ pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาความไวโดยการสร้างกราฟ ให้แกน X คือ ลอการิทึมของความเข้มข้นของ CPFEX ในรูปแบบอิสระ และแกน Y คือ $\%B/B_0$ เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วน B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 หาคู่เหมาะสมระหว่าง CPFEX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb ที่ให้ค่าความไวสูงที่สุดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับ การทดสอบแบบอื่นต่อไป (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3. 7 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM

หมายเหตุ: คือ CFX-OVA, คือ skim milk, คือ MAb, คือ GAM-HRP, คือ CFX ในรูปอิสระ, คือ สับสเตรท

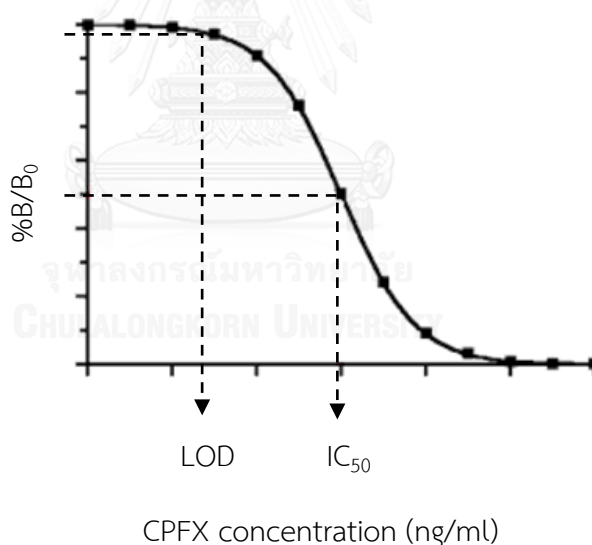
* ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B₀ เนื่องจากไม่ใส่ CFX ในรูปแบบอิสระ

** ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คือ B เนื่องจากใส่ CFX ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.5 การวิเคราะห์ผล

3.4.5.1 วิธีการหาค่าความไว

เพื่อเป็นการคัดเลือกหาวิธี ELISA ที่ให้ความไวสูงที่สุด หลังจากทำการทดสอบหาความไวของ ELISA ครบทั้ง 3 รูปแบบด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 แล้ววิเคราะห์และเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ของ ELISA แบบต่างๆ โดยพิจารณาผลจากปริมาณ CPFX ต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (the limit of detection, LOD) และค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง (The concentration at 50% inhibition, IC_{50}) โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณ คือ IC_{50} เท่ากับ $50\% B/B_0$ เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วน B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนในรูปแบบอิสระ (รูปที่ 3.8) เมื่อได้ค่าความไวของ ELISA ครบทั้ง 3 รูปแบบ ทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} เพื่อหารูปแบบที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (ค่าความไวสูงที่สุด) ซึ่งรูปแบบที่ถูกคัดเลือกนั้นจะถูกนำไปหาค่าความจำเพาะโดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนต่อไป



รูปที่ 3. 8 กราฟแสดงตัวอย่างการหาค่าความไว

3.4.5.2 วิธีการหาค่าความจำเพาะ

หลังจากเปรียบเทียบค่าความไวของวิธี ELISA ทั้ง 3 รูปแบบ รูปแบบที่ให้ค่าความไวสูงสุดจะถูกนำไปหาค่าความจำเพาะ โดยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม ฟลูออโรควิโนโลน (กลุ่มของ CPFX) ได้แก่ Enrofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin , Cinoxacin และ Enoxacin และสารนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ได้แก่ Chloramphenicol, Neomycin, Tetracycline, Furazolidone และ Nitrofurantoin นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 โดยคิดจาก 50% B/B_0 แล้วคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของ CPFX}}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}}$$

3.4.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำการทดสอบหาความไวของ ELISA รูปแบบที่ถูกคัดเลือกไว้ มาสร้างกราฟโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism ver. 5.0 โดยให้ แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของ CPFX ในรูปแบบอิสระ และแกน Y คือ % B/B_0 จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่สามารถสร้างกราฟเส้นตรงได้ จึงเรียกกราฟเส้นตรงนี้ว่า กราฟมาตรฐาน ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ได้นี้ใช้สำหรับการคำนวณหา CPFX ในตัวอย่างอาหารต่อไป

3.4.6. ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPFX ด้วยวิธี ELISA ต้นแบบกับตัวอย่าง อาหาร

ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPFX ด้วยวิธี ELISA ต้นแบบกับตัวอย่างอาหาร โดยพิจารณาจากคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

ความไว (sensitivity) บ่งบอกความสามารถที่ตรวจพบสารในปริมาณต่ำสุด (lower limit of detection, LOD) ที่สามารถวัดได้ และค่าความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง (The concentration at 50% inhibition, IC_{50})

ความแม่นยำ (precision) หาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (percent coefficient of variation, % CV) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (standard deviation, SD) เพื่อบ่งบอกความสามารถที่ให้ผลเหมือนกันเมื่อทดลองหลายๆ ครั้ง

ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

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

โดยที่ μ คือค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น CFX ที่ตรวจวัดได้

โดยทำการตรวจสอบทั้ง 2 แบบ ดังนี้

- Intra-assay ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ละ 8 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน
- Inter-assay ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ละ 8 ครั้ง ในเวลาที่ต่างกัน

ความถูกต้อง (accuracy) คือการหา %recovery เพื่อบ่งบอกความสามารถที่ให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน

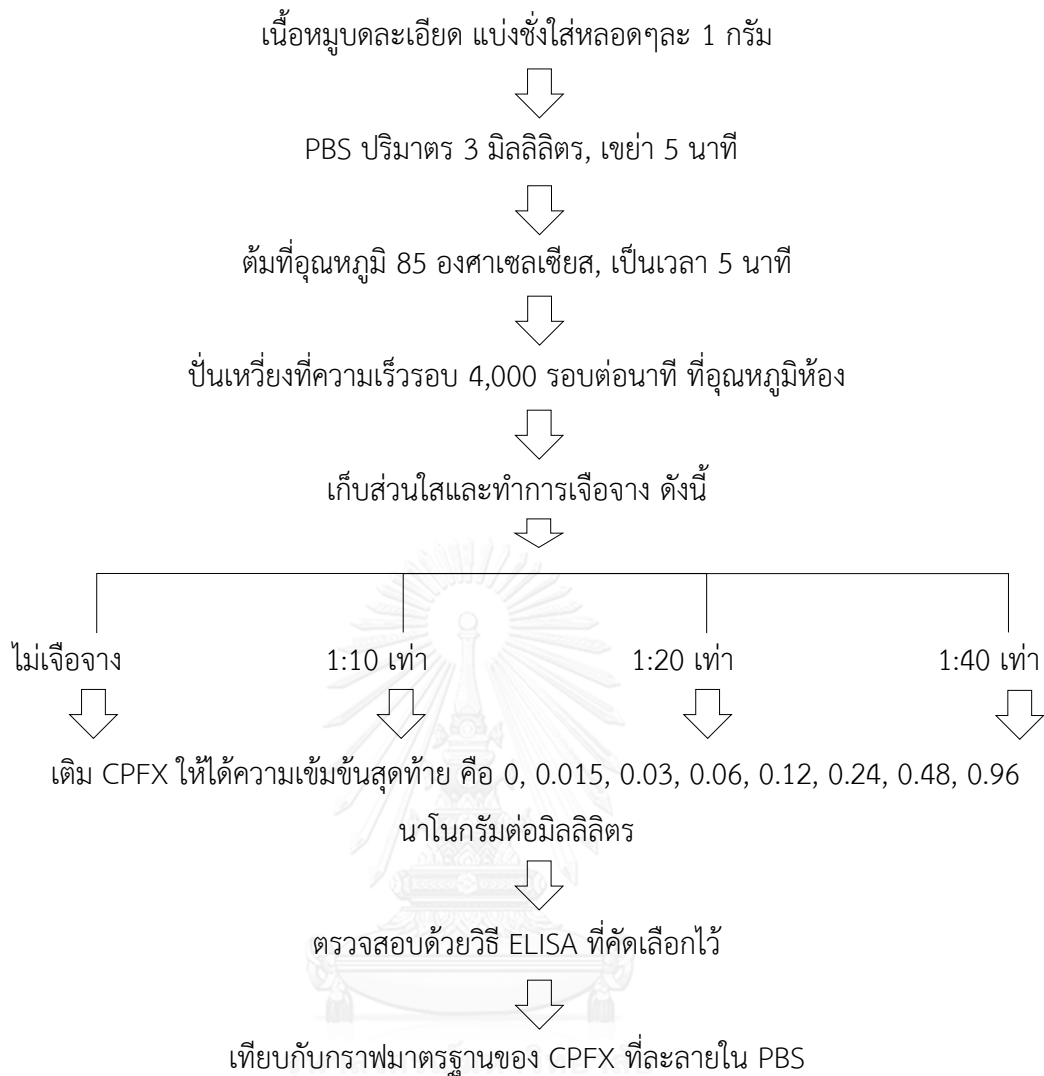
$$\%recovery = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\text{ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป}}$$

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสำหรับตรวจวัดปริมาณ CFX ด้วยวิธี dcELISA

หลังจากทดสอบค่าความไว และหาช่วงความเข้มข้นเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแล้ว จะทำการวัดปริมาณ CFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยมีขั้นตอนดังนี้

3.4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

นำเนื้อหมูที่บดละเอียดแล้ว แบ่งชั่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จากนั้นใส่ PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เนื้อหมูและ PBS เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไปต้มที่ อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า และไม่เจือจาง ที่แต่ละระดับการเจือจางและไม่เจือจาง ทำการเติม CFX ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ที่คัดเลือกไว้ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ CFX ที่เติมลงไปในตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า %B/B₀ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CFX ที่ละลายใน PBS (Yuan และ คณะ, 2010) (รูปที่ 3.9)

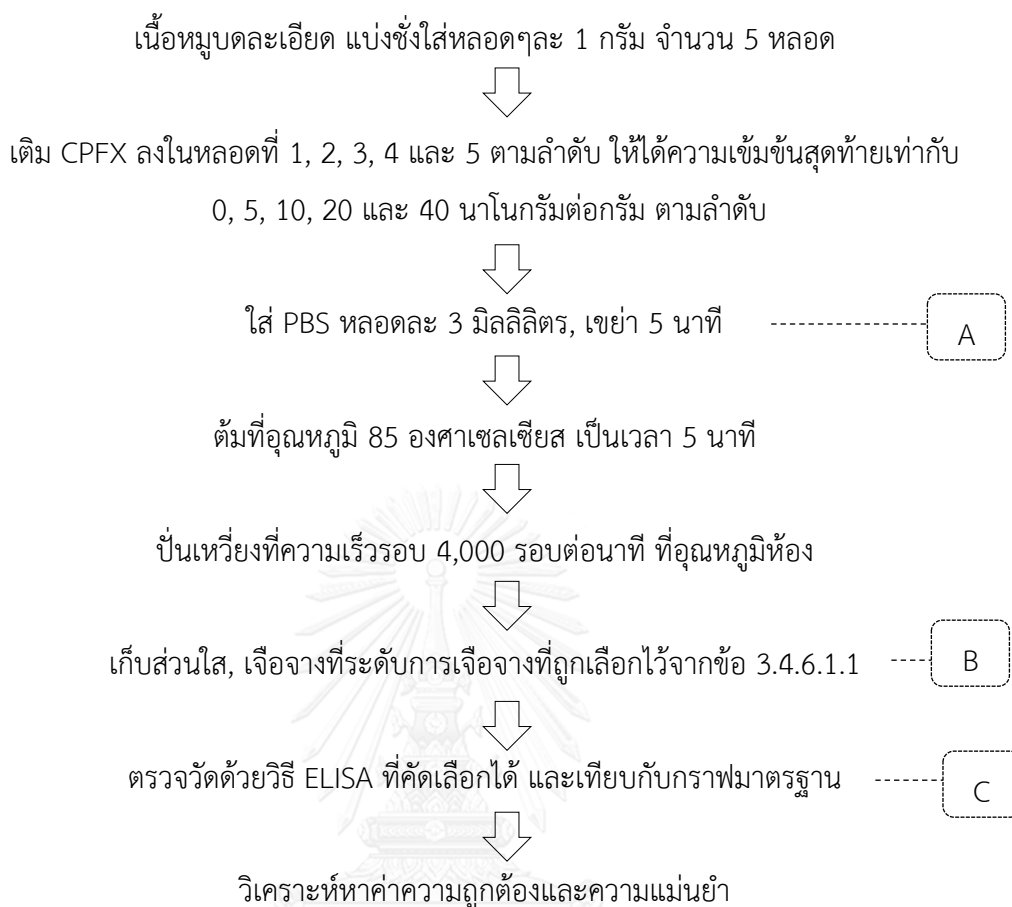


รูปที่ 3. 9 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

3.4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมู

นำเนื้อหมูที่บดละเอียดแล้ว แบ่งชิ้นใส่หลอดๆ ละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด แต่ละหลอดทำการเติม CPFX ลงในหลอดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นใส่ PBS หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เนื้อหมูและ PBS เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไปต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไขมันและโปรตีนเกิดการเสียสภาพ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง ที่คัดเลือกไว้แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ที่คัดเลือกไว้ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ (Yuan และ คณะ, 2010) (รูปที่ 3.10)





รูปที่ 3. 10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหุม

CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ: ปริมาณความเข้มข้น CPFX หลังตรวจสอบด้วย ELISA = $A \times B \times C$

A คือ ปริมาณ PBS ที่ใส่ลงไปในช่วงขั้นตอนการสกัด

B คือ ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้

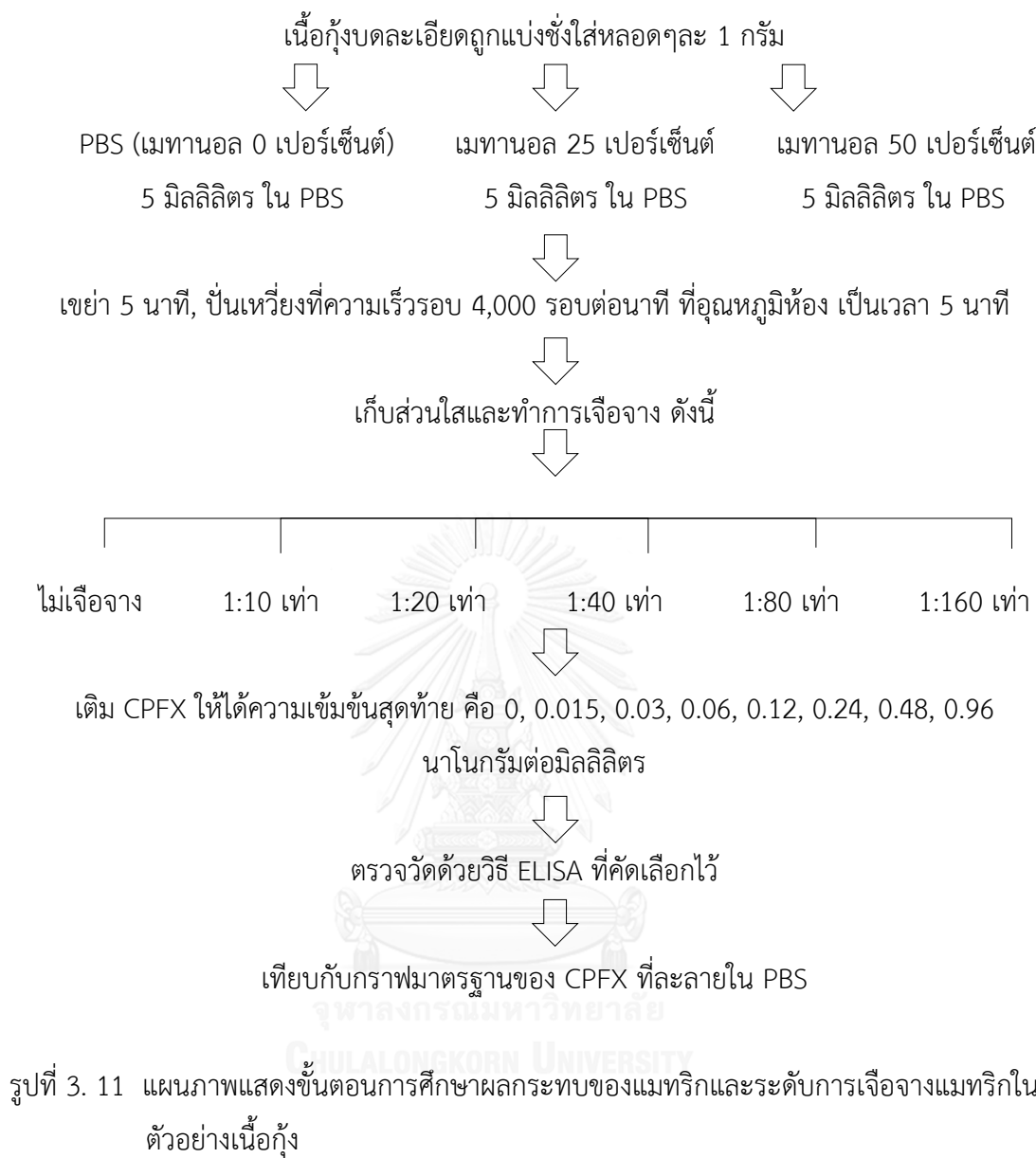
C คือ ค่าที่ได้หลังจากแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.4.6.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกึ่งสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPIX ด้วยวิธี dcELISA

3.4.6.2.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

นำเนื้อกึ่งที่บดละเอียดแล้ว แบ่งชั่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จากนั้นแบ่งเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1, 2 และ 3 ใส่ PBS, เมทานอลความเข้มข้น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เนื้อกึ่งและสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง 10, 20, 40, 80, และ 160 เท่าและไม่เจือจาง ที่แต่ละระดับการเจือจางและไม่เจือจาง ทำการเติม CPIX ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ที่คัดเลือกไว้ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ CPIX ที่เติมลงไป ตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CPIX ที่ละลายใน PBS (รูปที่ 3.11)

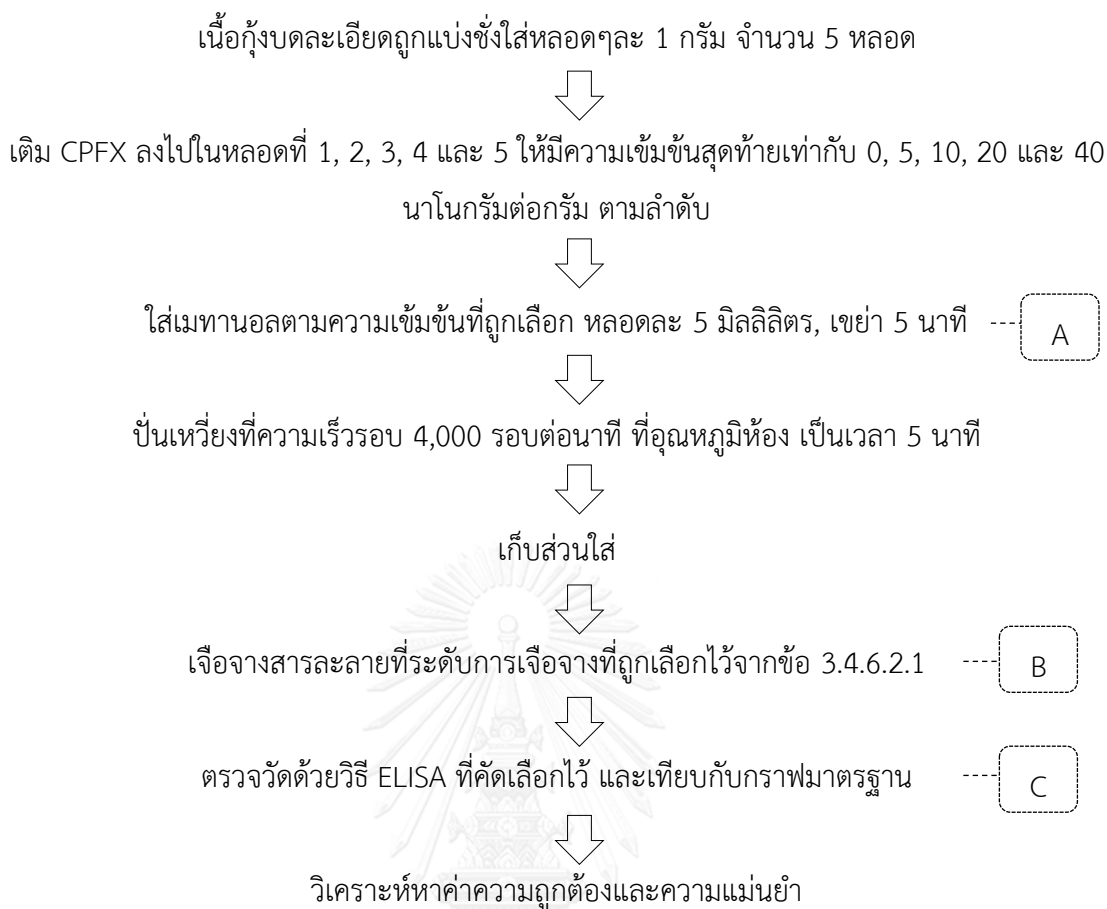




3.4.6.2.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

นำเนื้อกึ่งที่บดละเอียดแล้ว แบ่งชั่งใส่หลอดๆละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด แต่ละหลอดทำการเติม CPFX ลงไปในหลอดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นใส่เมทานอลตามความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6.2.1 หลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เนื้อกึ่งและสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจางที่ถูกเลือกจากข้อ 3.4.6.2.1 ทำการตรวจวัด ELISA ที่คัดเลือกไว้ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ (H. T. Zhang และ คณะ, 2011) (รูปที่ 3.12)





รูปที่ 3. 12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกุ้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ: ปริมาณความเข้มข้น CPFX หลังตรวจสอบด้วย ELISA = A x B x C

A คือ ปริมาณ Methanol ที่ใส่ลงไปในช่วงขั้นตอนการสกัด

B คือ ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้

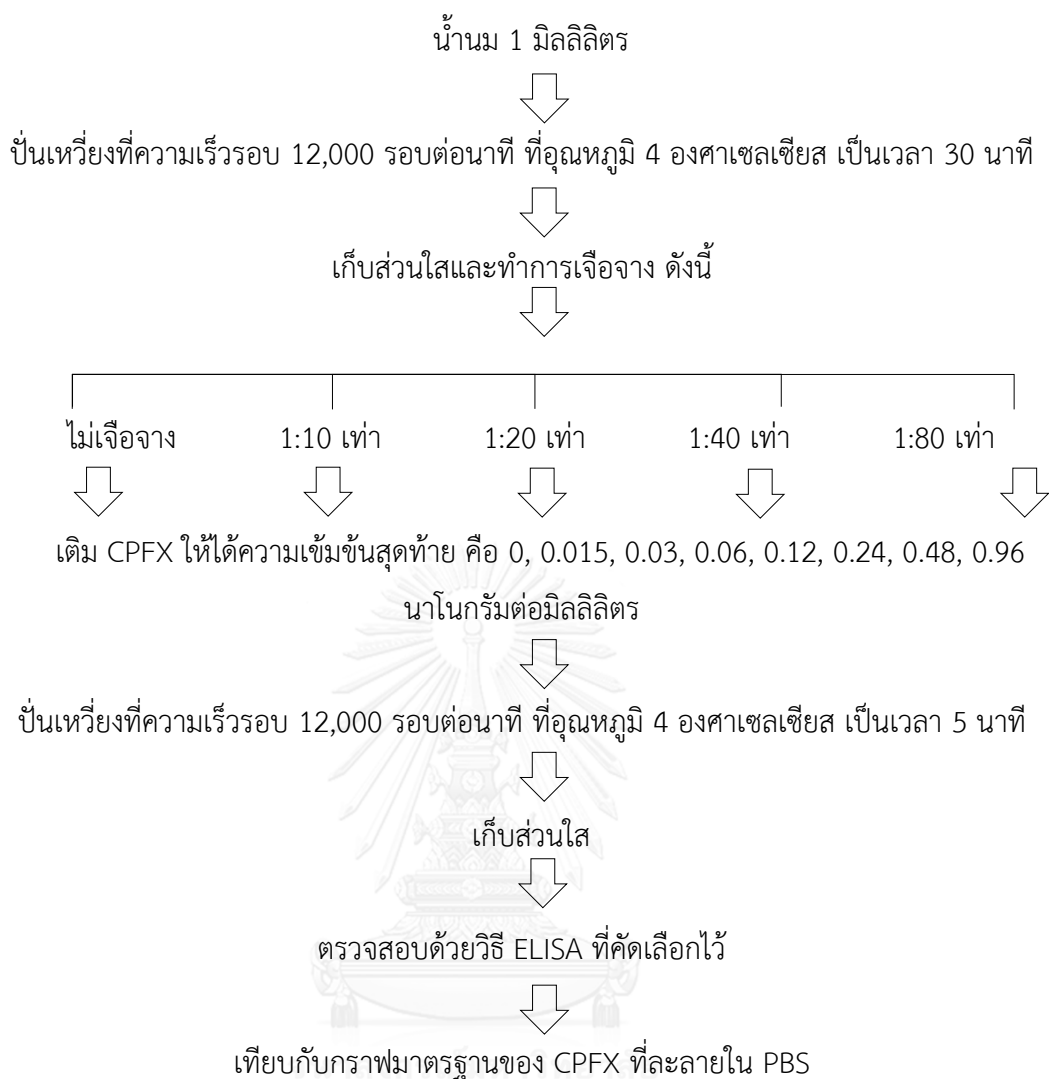
C คือ ค่าที่ได้หลังจากแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

3.4.6.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA

หลังจากทดสอบค่าความไว และหาช่วงความเข้มข้นเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแล้ว จะทำการวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยมีขั้นตอนดังนี้

3.4.6.3.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างน้ำนม

เตรียมน้ำนมใส่หลอด ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไขมันลอยตัวแยกขึ้นมา จากนั้นเก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง 10, 20, 40 และ 80 เท่าด้วย PBS และไม่เจือจาง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการเติม CPFX ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ที่คัดเลือกไว้ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ CPFX ที่เติมลงไปในตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CPFX ที่ละลายใน PBS (Huang และ คณะ, 2010) (รูปที่ 3.13)

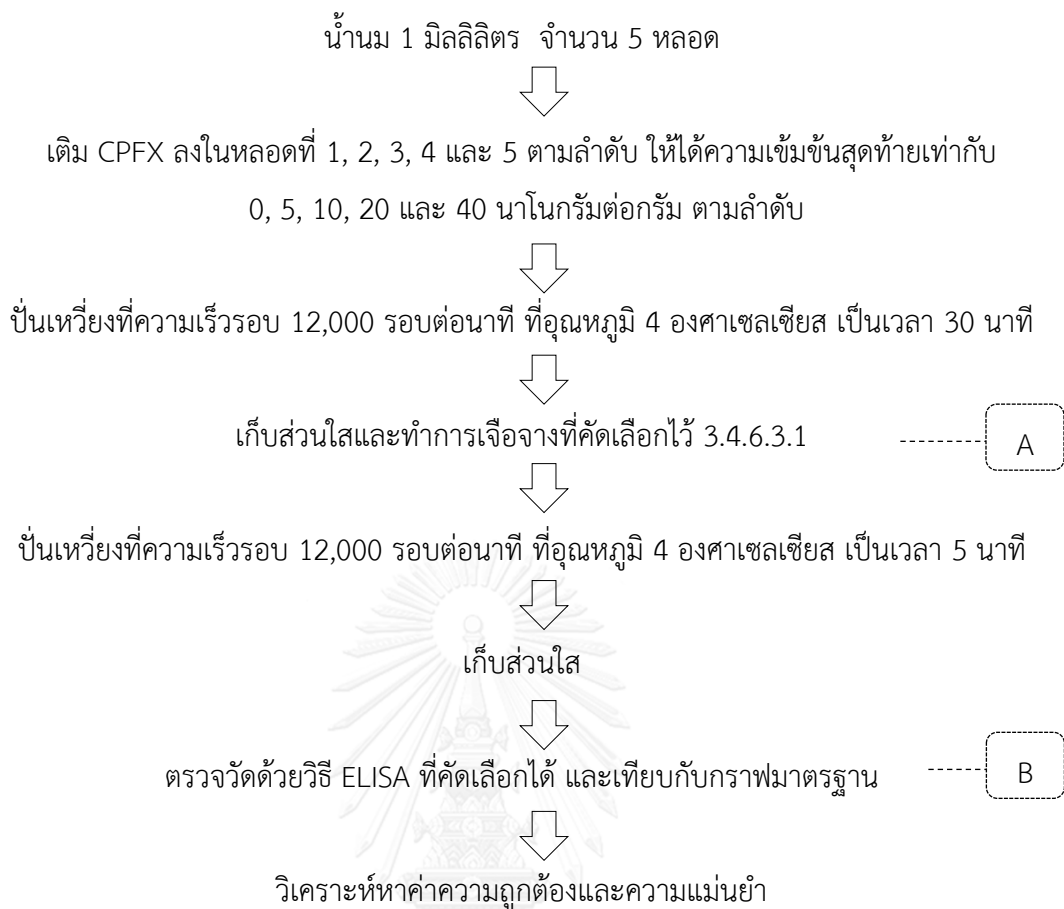


รูปที่ 3. 13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างน้ำนม

3.4.6.3.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำมัน

เตรียมน้ำมันใส่หลอด ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด ทำการเติม CPFX ลงไปในหลอดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไขมันลอยตัวแยกขึ้นมา จากนั้นเก็บส่วนใส ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ที่คัดเลือกไว้ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่าความถูกต้องและความแม่นยำ (Huang และ คณะ, 2010) (รูปที่ 3.14)





รูปที่ 3. 14 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำนม

CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ: ปริมาณความเข้มข้น CPFX หลังตรวจสอบด้วย ELISA = A x B

A คือ ระดับการเจือจางที่คัดเลือกไว้

B คือ ค่าที่ได้หลังจากแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การเชื่อมต่อระหว่างซีโพรฟลอกซาซินกับ OVA

ในขั้นตอนแรกของการทำ Indirect ELISA และ Indirect competitive ELISA นั้น ต้องเคลือบพื้นหลุมด้วยแอนติเจน ซึ่งแอนติเจนในงานวิจัยนี้ คือ CPF₂X ซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีมวลโมเลกุล 331.34 Da ไม่เหมาะแก่การเกาะที่พื้นหลุมของจาน ELISA ได้โดยตรง จึงต้องทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเชื่อมต่อระหว่าง CPF₂X กับ ovalbumin (OVA) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 45,000 Da ด้วยวิธี Carbodimide active ester method เพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลของ CPF₂X เชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนของ OVA (Huang และ คณะ, 2010) หลังจากกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากกระบอกโดยการทำให้ละลายใน PBS ที่ pH 7.4 ได้ทำการหาปริมาณความเข้มข้นของ OVA ที่เชื่อมต่อกับ CPF₂X ด้วยวิธี BCA assay พบว่ามีความเข้มข้นของ CPF₂X-OVA เฉลี่ยเท่ากับ 1.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งน้อยกว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนก่อนทำการเชื่อมต่อ คือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

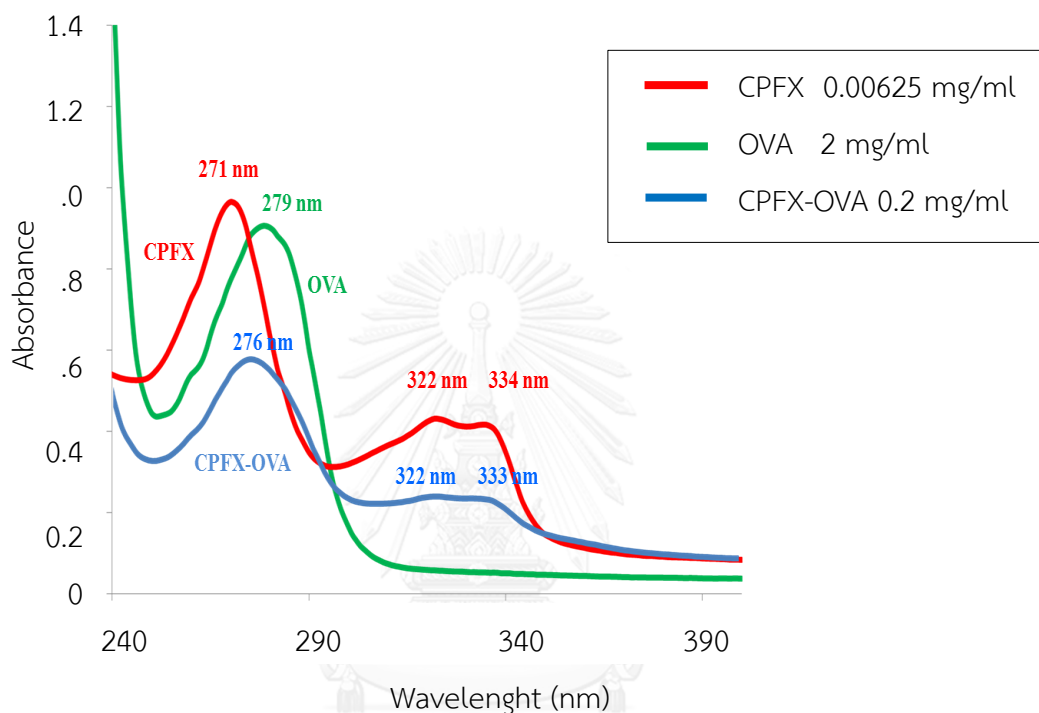
ตารางที่ 4. 1 ปริมาณโปรตีนของ CPF₂X-OVA ด้วยวิธี BCA assay

ระดับการเจือจาง CPF ₂ X-OVA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ CPF ₂ X-OVA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/2	0.7666	1.31
1/4	0.4007	1.36
1/8	0.1818	1.24
ค่าเฉลี่ย ± SD		1.30 ± 0.06

หมายเหตุ: กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีน CPF₂X-OVA แสดงไว้ในภาคผนวก ก

จากการหาอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPF₂X กับ OVA โดยการสแกนช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่ 240-400 นาโนเมตร โดยเตรียม CPF₂X, OVA, CPF₂X-OVA ความเข้มข้นที่ 0.00625, 2 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (OD เท่ากับ 0.2-0.8) ผลจากการสแกน คือ OVA และ CPF₂X ให้ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ 279 และ 271 นาโนเมตร ตามลำดับ

ในขณะที่ CPFX-OVA ให้ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) ที่ 276 นาโนเมตร เมื่อหาอัตราส่วนการเชื่อมตึระหว่าง CPFX-OVA โดยวิธี UV-Vis spectroscopy method (Le และ คณะ, 2009) พบว่าอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ OVA เท่ากับ 1.92:1 นั้น หมายถึง OVA 1 โมเลกุล มี CPFX ประมาณ 2 โมเลกุล เชื่อมต่ออยู่ ดังนั้น สรุปได้ว่าการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ OVA ในครั้งนี้ประสบความสำเร็จ (รูปที่ 4.1 และ ตารางที่ 4.2)



รูปที่ 4. 1 UV-Visible spectra ของ CPFX ที่ความเข้มข้น 0.00625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—), OVA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—) และ CPFX-OVA ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

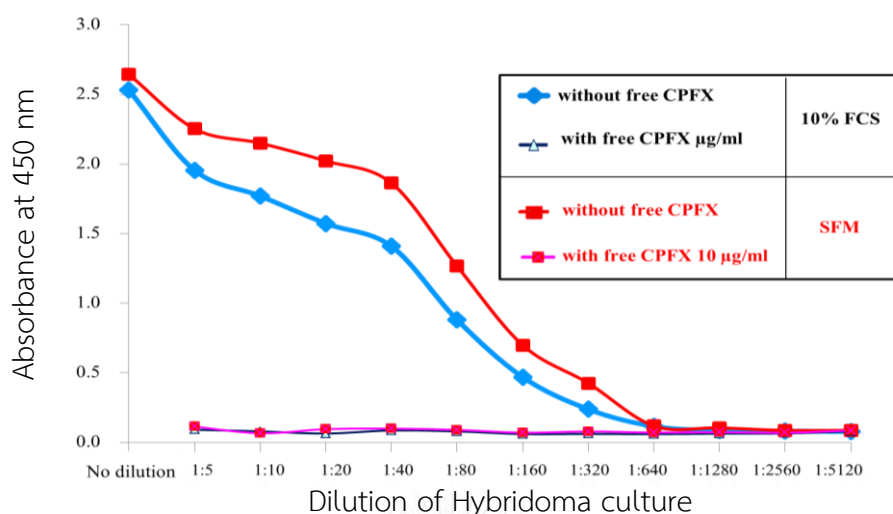
ตารางที่ 4. 2 การหาอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ OVA

สารประกอบ	มวลโมเลกุล	ความเข้มข้น		A 271 nm	Molar Absorbility	Hapten density
		mg/ml	M			
CPFEX	331.341	0.00625	1.8863×10^{-5}	0.9646	51,137.84	-
OVA	45,000	2	4.4444×10^{-5}	0.7707	17,340.75	-
CPFEX-OVA	45,331.341	0.2	0.4412×10^{-5}	0.5091	115,390.9	1.92

หมายเหตุ: การคำนวณหา Hapten density แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.2 การทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะต่อ CPFEX ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาถูกเก็บแช่แข็งไว้อย่างถาวรในไนโตรเจนเหลว จึงทำการทดสอบว่าเซลล์ไฮบริโดมายังมีความสามารถในการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CPFEX อยู่ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เซลล์เจริญเติบโตในอาหาร ค่อยๆ ลดความเข้มข้นของ FBS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่เซรัม (serum free medium, SFM) นำอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ไม่ใส่เซรัมมาทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะต่อ CPFEX ด้วยวิธี icELISA-GAM พบว่าหลังการหยุดปฏิกิริยา ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรสอดคล้องตามหลักการของ ELISA คือ ในหลุมที่ใส่ CPFEX ในรูปอิสระ ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ เนื่องจากเกิดการแย่งจับ MAb กันระหว่าง CPFEX-OVA ที่เคลือบไว้พื้นหลุมและ CPFEX ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าหลุมที่ไม่ใส่ CPFEX ในรูปอิสระ ซึ่งหลุมที่ไม่ใส่ CPFEX ในรูปอิสระ ให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มระดับการเจือจางของแอนติบอดีในอาหาร จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า เซลล์ไฮบริโดมายังสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ CPFEX ทั้งในรูปอิสระและ CPFEX-OVA และการเลี้ยงในอาหารที่เติม FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร SFM เซลล์ก็ยังคงสร้าง MAb ที่จำเพาะกับ CPFEX ได้เป็นอย่างดี จึงทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร SFM เพื่อลดการปนเปื้อนของ immunoglobulin จาก FBS (รูปที่ 4.2)

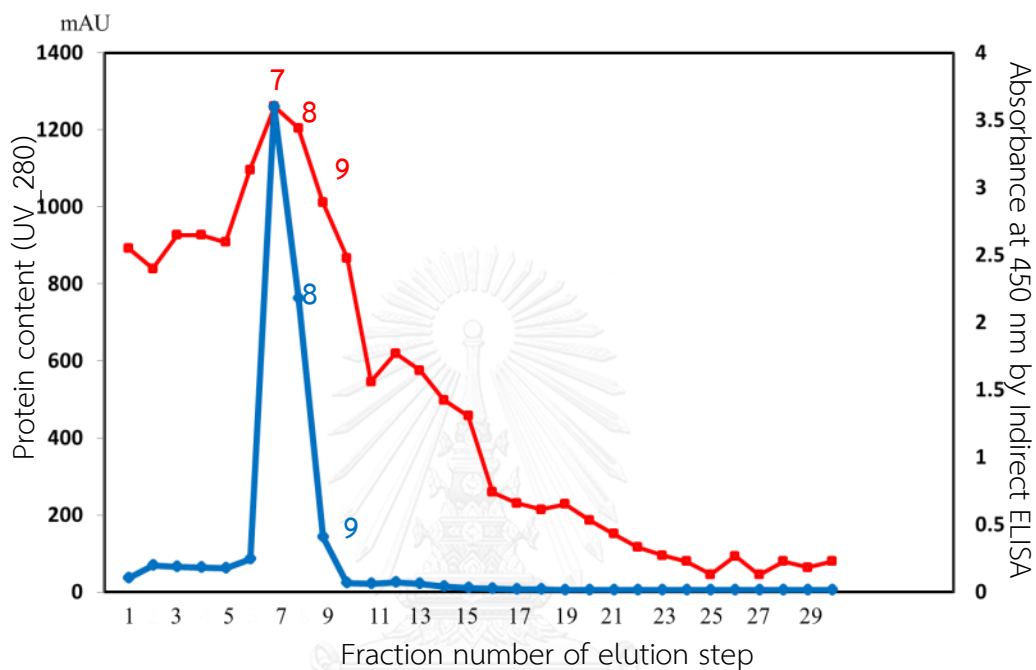


รูปที่ 4. 2 กราฟแสดงผลการทดสอบการสร้าง MAb ที่จำเพาะกับ CFX ของเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 11-5A-B3 ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร ที่ไม่ใส่เซรัม (SFM) ด้วยวิธี icELISA-GAM

4.3 การทำ MAb ให้บริสุทธิ์ และการทดสอบความสามารถในการจับกับ CFX ของ MAb ด้วยวิธี indirect ELISA หลังทำให้บริสุทธิ์

หลังจากตรวจสอบการสร้าง MAb ด้วยวิธี icELISA-GAM แล้วพบว่าเซลล์ไฮบริโดมายังคงมีความสามารถในการผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CFX นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำการปั่นแยกเซลล์แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำมาแยก MAb ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column) โปรตีน G เป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม Streptococcus โดยโปรตีน G จะจับกับแอนติบอดีตรงบริเวณ Fc region ซึ่งโปรตีน G นั้นจำเพาะกับแอนติบอดีไอโซไทป์ IgG โดยเฉพาะแอนติบอดีที่ผลิตจากหนู กระต่าย และแพะ ซึ่งในงานวิจัยนี้ MAb มีไอโซไทป์ IgG1 ซึ่งผลิตมาจากหนู (ภาคภูมิ, 2554) เรียกวิธีในการทำให้บริสุทธิ์ครั้งนี้ว่า Protein G affinity column chromatography โดยใช้เครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) หรือ AKTA ในการทดลองนี้ หลังทำการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 แล้ว ได้ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 ปริมาตร 6 เท่าของคอลัมน์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นจึงเก็บได้ทั้งหมด 30 แฟรคชัน ซึ่ง 3 แฟรคชันที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนสูง คือ แฟรคชันที่ 7, 8 และ 9 ซึ่งเครื่อง AKTA วัดค่าปริมาณโปรตีนได้ 1259.14, 761.62 และ 143.10 mAU ตามลำดับ

จากนั้นนำทั้ง 30 แฟรคชัน มาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:500 เท่า เพื่อตรวจสอบหา MAb โดยวิธี Indirect ELISA พบว่ามี MAb ทุกแฟรคชัน ซึ่งแฟรคชันที่ 7, 8 และ 9 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงคือ 3.6016, 3.4415 และ 2.8912 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่เครื่องวัดได้ จึงทำการเก็บแฟรคชันที่ 7, 8 และ 9 มารวมกันและทำการหาปริมาณโปรตีนของ MAb ด้วยวิธี BCA assay ได้ 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4. 3 โครมาโตแกรมจากเครื่อง affinity chromatography (AKTA™ Start) แสดงปริมาณโปรตีนแต่ละแฟรคชันที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (—) และแสดงผลการตรวจสอบ MAb ด้วยวิธี Indirect ELISA ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (—)

ตารางที่ 4. 3 ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

ระดับการเจือจาง ของแอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ MAb (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/10	0.46	2.63
1/20	0.24	2.77
1/40	0.11	2.60
ค่าเฉลี่ย \pm SD		2.67 \pm 0.09

หมายเหตุ: กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีแสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ CPFX ด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ

4.4.1 วิธีใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (dcELISA)

4.4.1.1 การเชื่อมต่อ CPFX กับเอนไซม์ HRP

ทำการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ HRP ด้วยวิธี Carbodimide active ester method เพื่อให้หมู่คาร์บอกซิลของ CPFX เชื่อมต่อกับหมู่อะมิโนของ HRP (Huang และ คณะ, 2010) หลังจากกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากกระบบโดยการทำให้ละลายใน PBS ที่ pH 7.4 ได้ทำการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่เชื่อมต่อกับ CPFX ด้วยวิธี BCA assay พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 1.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในขั้นตอนการเชื่อมต่อ CPFX-HRP นั้น ได้ใช้สารละลาย HRP ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4. 4 ปริมาณโปรตีนของ CPFX-HRP ด้วยวิธี BCA assay

ระดับการเจือจาง CPF-X-HRP	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ CPF-X-OVA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/5	0.4486	1.80
1/10	0.2276	1.83
1/20	0.1079	1.73
ค่าเฉลี่ย \pm SD		1.79 \pm 0.05

หมายเหตุ: กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีน CPF-X-HRP แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.4.1.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPIX-HRP และ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม

หาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม และ CPIX-HRP โดยการเจือจาง MAb ที่เคลือบพื้นหลุมให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02 - 1.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CPIX-HRP ตั้งแต่ 0.125- 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณความเข้มข้นระหว่าง MAb ที่เคลือบพื้นหลุม และ CPIX-HRP ที่ทำปฏิกิริยากันแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD เท่ากับ 0.8-1.2) คือ MAb ที่เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 0.16, 0.32 และ 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคู่กับ CPIX-HRP ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนของ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม และ CPIX-HRP ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 3 คู่นี้ จะถูกนำไปทดสอบหาความไวของวิธี ELISA ในรูปแบบ dcELISA ต่อไป (ตารางที่ 4.5)

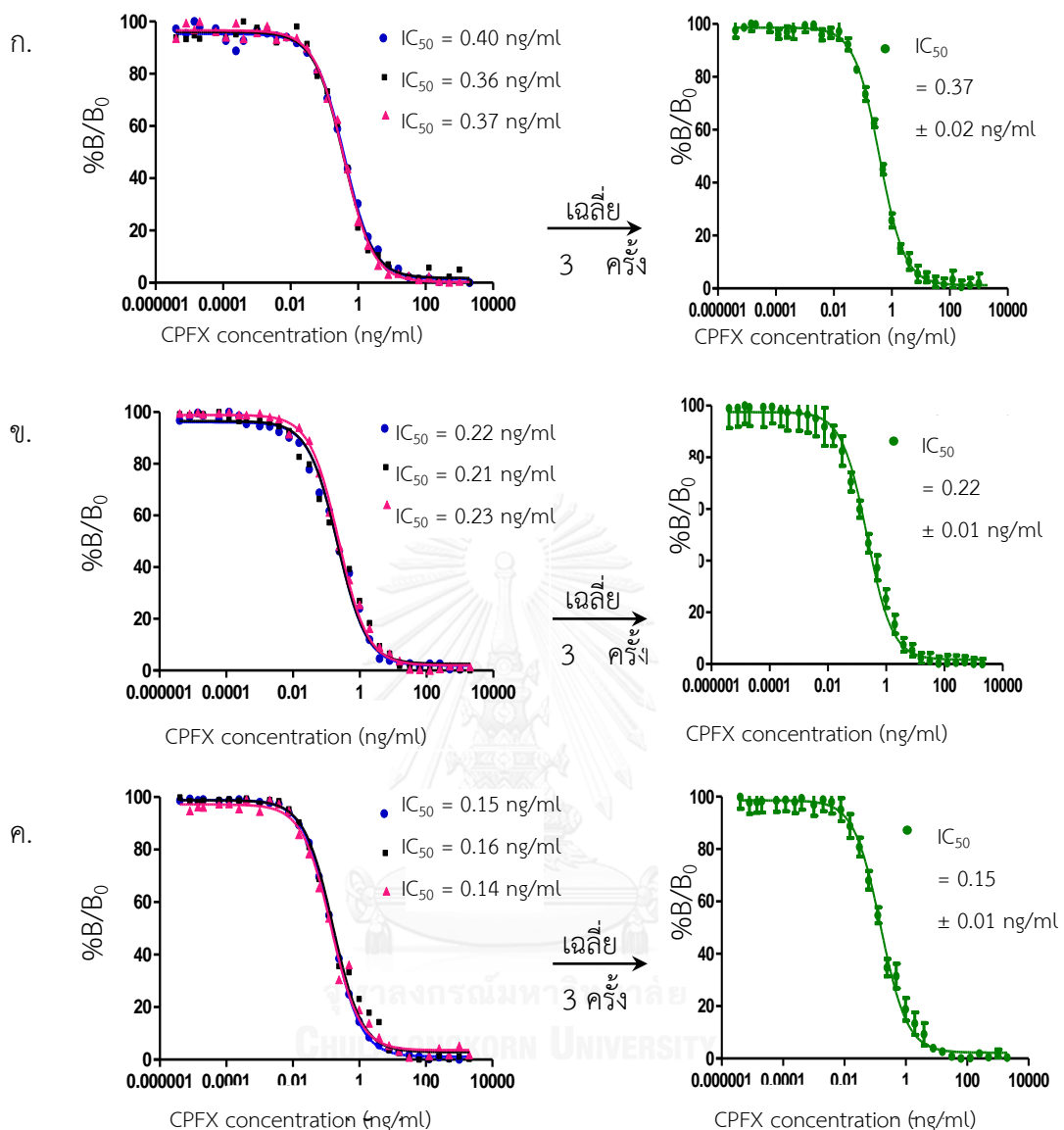
ตารางที่ 4.5 ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง MAb ที่เคลือบพื้นหลุม กับ CPIX-HRP ด้วยวิธี Direct ELISA

ความเข้มข้นของ MAb (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ CPIX-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0.125	0.25	0.5	1	2	3
0.02	0.0713	0.0835	0.1149	0.1724	0.3224	0.4152
0.04	0.0947	0.1281	0.1838	0.3162	0.5180	0.6673
0.08	0.1091	0.1615	0.2527	0.4505	0.7963	1.2828
0.16	0.1518	0.2489	0.4319	0.8765	1.1435	2.3544
0.32	0.2292	0.4015	0.7415	1.0631	2.6237	3.6016
0.64	0.3532	0.6220	1.1330	2.6024	3.9656	4.1220
1.28	0.5025	1.3529	1.8795	3.6942	4.2534	4.0754

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 ที่ได้จากการทำ Direct ELISA ที่ใช้ MAb เคลือบพื้นหลุม และ CPIX-HRP ที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับใช้ในการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA ต่อไป

4.4.1.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA

จากการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MAb ที่เคลือบหลุมและ CPFX-HRP ทั้ง 3 คู่ ได้แก่ MAb ที่เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 0.16, 0.32 และ 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคู่กับ CPFX-HRP ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงทำการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA โดยแปรความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระ ในช่วง 0 - 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแข่งขันกับ CPFX-HRP ในการแย่งจับ MAb ซึ่งในการวิเคราะห์นั้น จะนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B และ B₀ โดยที่ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มี CPFX ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ B₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ในภาวะไม่มี CPFX ในรูปแบบอิสระ จากนั้นทำการหาค่า IC₅₀ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ B₀ (%B/B₀ เท่ากับ 50%) จากการเปรียบเทียบทั้ง 3 คู่ที่เลือกมา พบว่าเมื่อใช้ MAb ที่เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CPFX-HRP ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด คือ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแสดงว่าเป็นอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ชุดตรวจจสอบรูปแบบ dcELISA มีความไวสูงสุด (รูปที่ 4.4 และ ตารางที่ 4.6)



รูปที่ 4. 4 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA โดยที่ ก. คือ MAb เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CFX-HRP ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร , ข. คือ MAb เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CFX-HRP ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค. คือ MAb เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CFX-HRP ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: จากกราฟ ●, ■, ▲, ● แทนการทดสอบหาความไวของวิธี ELISA รูปแบบ dcELISA ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2, ครั้งที่ 3 และ เฉลี่ยรวม 3 ครั้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4. 6 ผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA ของอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง MAb กับ CFPX-HRP

ความเข้มข้นของ MAb (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ CFPX-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC ₅₀ ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.64	0.5	0.37 ± 0.02	0.013 ± 0.007
0.32	1	0.22 ± 0.01	0.0003 ± 0.0001
0.16	2	0.15 ± 0.01	0.0068 ± 0.0002

4.4.2 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (dcELISA-SV)

4.4.2.1 การเชื่อมต่อระหว่าง MAb กับไบโอติน

หลังจากทำการเชื่อมต่อ MAb กับ biotin และกำจัดสารขนาดเล็กที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อออกจากระบบโดยการทำไดอะลิซิสใน PBS ที่ pH 7.4 ได้ทำการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA assay พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 2.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7) ซึ่งในขั้นตอนการเชื่อมต่อ MAb กับ biotin นั้น ได้ใช้สารละลาย MAb ที่มีความเข้มข้น 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4. 7 ปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin ด้วยวิธี BCA assay

ระดับการเจือจาง MAb-biotin	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1/5	0.6960	2.31
1/10	0.4003	2.34
1/20	0.2060	2.50
ค่าเฉลี่ย ± SD		2.38 ± 0.10

หมายเหตุ: กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีน MAb-biotin แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.4.2.2 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA และ MAb-biotin

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ CPFX-OVA และ MAb-biotin โดยการแปรค่าความเข้มข้นของ MAb ที่ตั้งแต่ 0.04 – 2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CPFX-OVA ตั้งแต่ 0.0625- 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณความเข้มข้นระหว่าง MAb และ CPFX-OVA ที่ทำปฏิกิริยากันแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD เท่ากับ 0.8-1.2) คือ MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 0.32, 0.64 และ 2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคู่กับความเข้มข้นของ CPFX-OVA ที่ความเข้มข้น 1.5, 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งทำการคัดเลือกอัตราส่วนความเข้มข้นของ MAb-biotin และ CPFX-OVA จำนวน 3 คู่นี้ ไปทดสอบหาความไวของวิธี ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV ต่อไป (ตารางที่ 4.8)

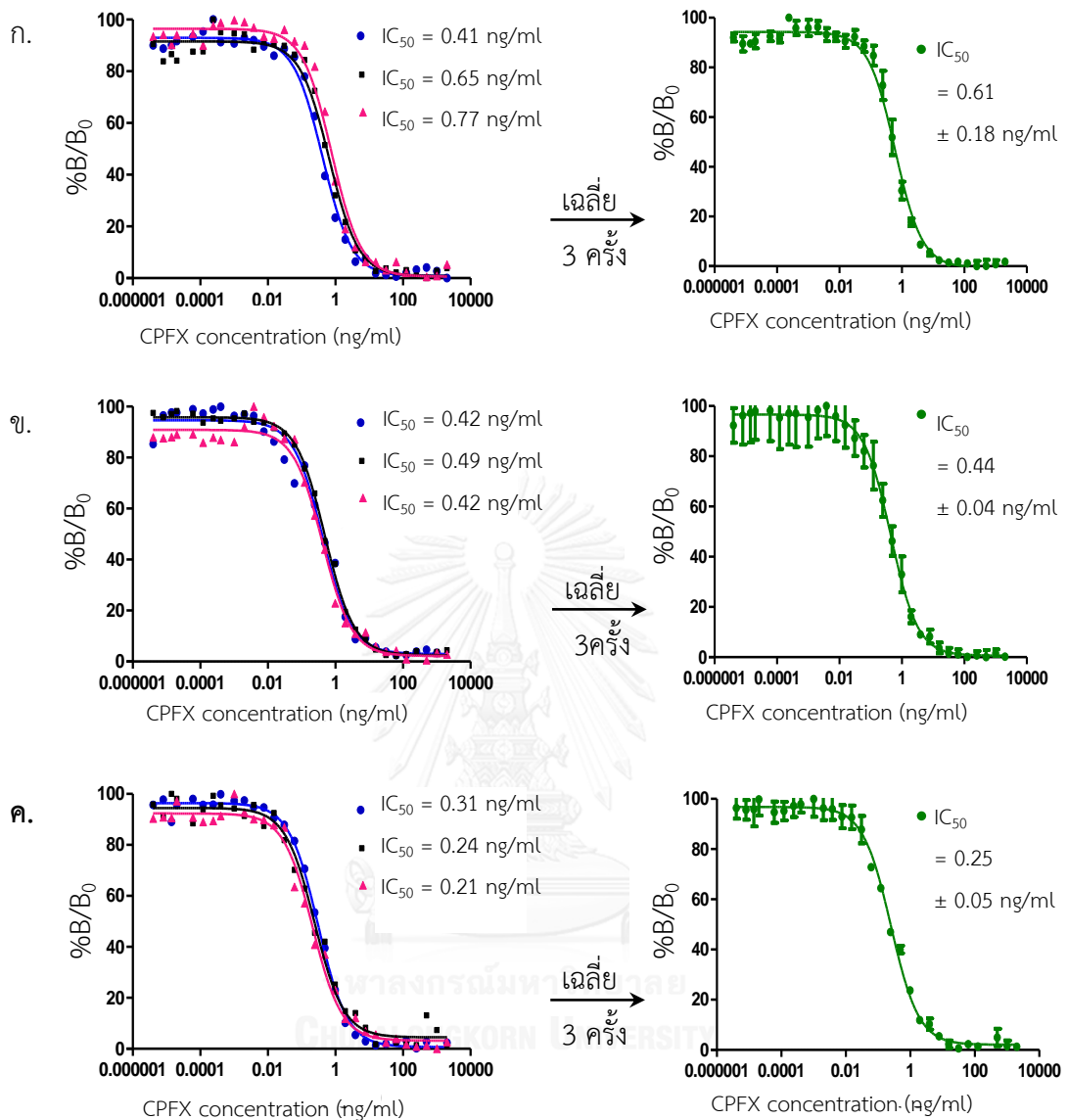
ตารางที่ 4. 8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง MAb-biotin กับ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี direct ELISA

ความเข้มข้นของ MAb-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2
0.04	0.1131	0.1231	0.1685	0.2159	0.2138	0.2246	0.2673
0.08	0.1088	0.1373	0.2263	0.3472	0.3833	0.3520	0.3932
0.16	0.1209	0.1225	0.2012	0.3321	0.4003	0.4159	0.4879
0.32	0.1147	0.1258	0.2250	0.4457	0.7879	0.9747	1.4862
0.64	0.1279	0.1203	0.1951	0.5557	0.9593	1.2893	1.5874
1.28	0.1409	0.1249	0.2112	0.6236	1.3795	2.0089	2.893
2.56	0.1593	0.1722	0.2271	0.9484	1.4995	2.5803	3.798





หมายเหตุ: ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 ที่ได้จากการทำ Indirect ELISA (iELISA-SV) ที่ใช้ CPFX-OVA เคลือบพื้นหลุม และ MAb ที่มีความเข้มข้นที่เลือก สำหรับใช้ในการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV ต่อไป

4.4.2.3 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV

เพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ MAb-biotin ระหว่าง CPF₂X ในรูปอิสระ และ CPF₂X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม จึงทำการแปรความเข้มข้นของ CPF₂X ในรูปอิสระตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับ MAb-biotin และ CPF₂X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี dcELISA-SV เพื่อทำการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPF₂X-OVA ที่เคลือบหลุมและ MAb-biotin ที่หาได้จากข้อ 4.4.2.2 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B และ B₀ โดยที่ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มี CPF₂X ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ B₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ในภาวะไม่มี CPF₂X ในรูปแบบอิสระ จากนั้นทำการหาค่า IC₅₀ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ CPF₂X ในรูปอิสระทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ B₀ (%B/B₀ เท่ากับ 50%) จากการทดลอง พบว่าเมื่อใช้ CPF₂X-OVA ที่ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด คือ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ชุดตรวจสอบรูปแบบ dcELISA-SV มีความไวสูงสุด (รูปที่ 4.5 และ ตารางที่ 4.9)



รูปที่ 4. 5 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ dcELISA-SV โดยที่ ก. คือ CPFX-OVA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ข. คือ CPFX OVA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค. คือ CPFX OVA เคลือบพื้นหลุมที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb-biotin ที่ความเข้มข้น 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: จากกราฟ , , ,  แทนการทดสอบหาความไวของวิธี ELISA รูปแบบ dcELISA-SV ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2, ครั้งที่ 3 และ เฉลี่ยรวม 3 ครั้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4. 9 ผลการทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อซีโพรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วยวิธี

Direct competitive ELISA (dcELISA-SV)

ความเข้มข้นของ MAb-biotin (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ CPF-X-OVA (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	IC ₅₀ ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
2.56	0.5	0.61 ± 0.18	0.045 ± 0.02
0.64	1	0.44 ± 0.04	0.019 ± 0.002
0.32	1.5	0.25 ± 0.05	0.007 ± 0.0015

4.4.3 วิธีใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (icELISA-GAM)

4.4.3.1 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม และ MAb

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb โดยการแปรค่าความเข้มข้นของ MAb ตั้งแต่ 0.04-2.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ตั้งแต่ 0.0625- 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณความเข้มข้นระหว่าง MAb และ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมที่ทำปฏิกิริยากันแล้วได้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (OD เท่ากับ 0.8-1.2) คือ MAb ที่ความเข้มข้น 0.32, 0.64 และ 1.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคู่กับความเข้มข้นของ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมความเข้มข้น 1.5, 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งทำการคัดเลือกอัตราส่วนของ MAb และ CPF-X-OVA จำนวน 3 คู่นี้ ไปทดสอบหาความไวของวิธี ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ต่อไป (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4. 10 ผลการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง MAb กับ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี Indirect ELISA (iELISA-GAM)

ความเข้มข้นของ MAb (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	1.5	2
0.04	0.1131	0.1306	0.1371	0.1091	0.2751	0.3529	0.4527
0.08	0.1088	0.1378	0.2016	0.1522	0.2287	0.4054	0.6754
0.16	0.1209	0.1306	0.1371	0.1091	0.3275	0.5529	0.6831
0.32	0.1147	0.1876	0.3151	0.5061	0.7217	1.1166	1.6271
0.64	0.1279	0.2011	0.3764	0.7537	1.0868	1.6518	2.2135
1.28	0.1409	0.3067	0.4969	0.9761	1.2068	1.7656	2.545
2.56	0.1593	0.3250	0.5824	1.3061	1.5009	1.9374	3.0172

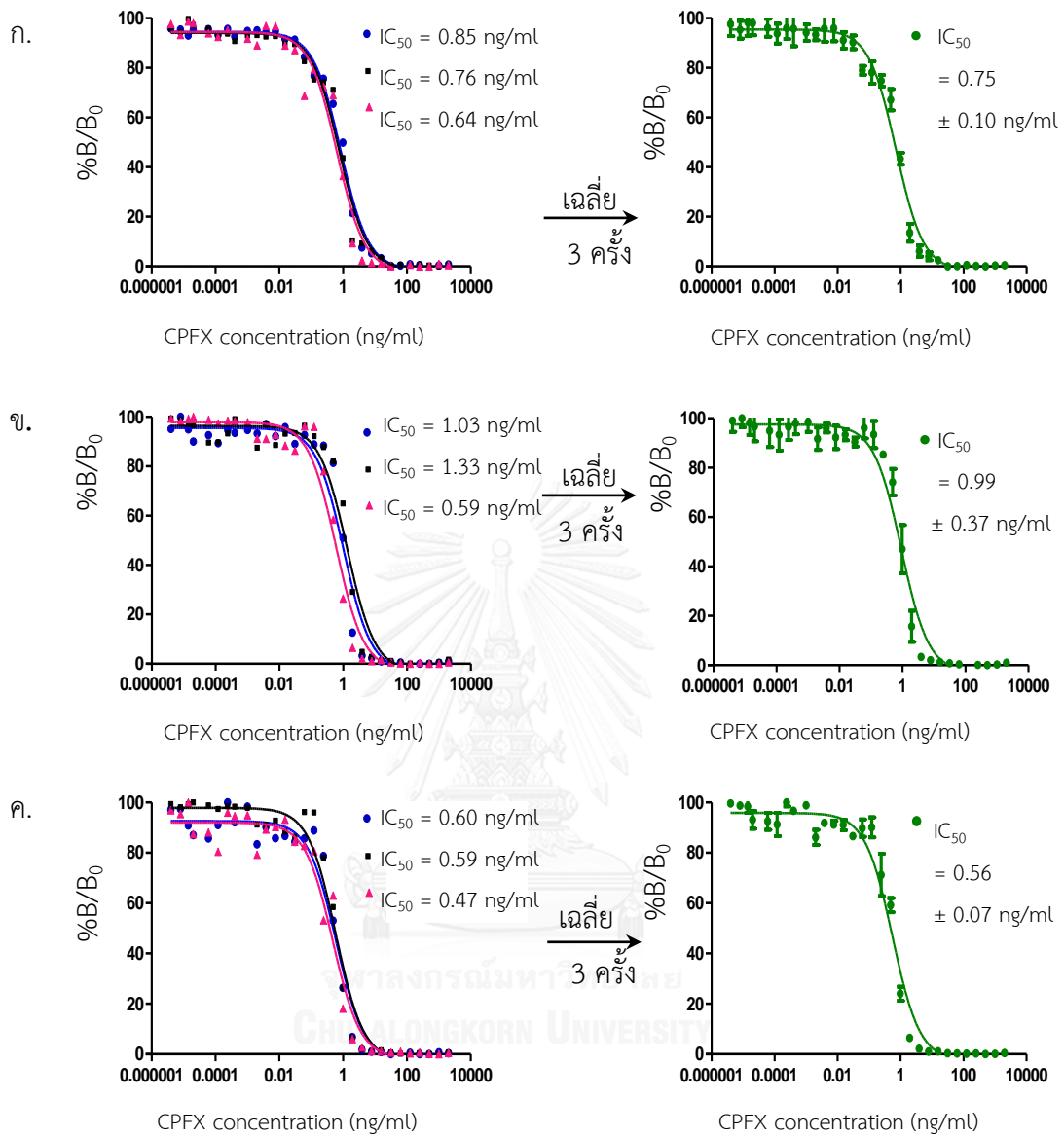
หมายเหตุ: ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.2 ที่ได้จากการทำ Indirect ELISA (iELISA-GAM) ที่ใช้ CPFX-OVA เคลือบพื้นหลุม และ MAb ที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ต่อไป

4.4.3.2 การทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM

เพื่อให้เกิดการแย่งจับกับ MAb ระหว่าง CPFX ในรูปอิสระ และ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม จึงทำการเจือจาง CPFX ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้นของ ตั้งแต่ 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับ MAb และ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม ด้วยวิธี icELISA-GAM โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CPFX-OVA ที่เคลือบพื้นหลุมและ MAb ที่หาได้จากข้อ 4.4.3.1 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B และ B₀ โดยที่ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มี CPFX ในรูปแบบอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ B₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ในภาวะไม่มี CPFX ในรูปแบบอิสระ จากนั้นทำการหาค่า IC₅₀ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ B₀

(%B/B₀ เท่ากับ 50%) จากการทดลอง พบว่าเมื่อใช้ CPMX-OVA ที่ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด คือ 0.56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การชุดตรวจสอบรูปแบบ icELISA-GAM มีความไวสูงสุด (รูปที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.11)





รูปที่ 4. 6 กราฟแสดงผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM โดยที่ ก. คือ CFX-OVA เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb ที่ความเข้มข้น 1.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ข. คือ CFX-OVA เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb ที่ความเข้มข้น 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ค. คือ CFX-OVA เคลือบพื้นหลุมที่มีความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MAb ที่ความเข้มข้น 0.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ: จากกราฟ , , , แทนการทดสอบหาความไวของวิธี ELISA รูปแบบ icELISA-GAM ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2, ครั้งที่ 3 และ เฉลี่ยรวม 3 ครั้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4. 11 ผลการทดสอบหาความไวของ ELISA ในรูปแบบ icELISA-GAM ของอัตราส่วนระหว่าง MAb กับ CPF-X-OVA ที่เคลือบพื้นหลุม

ความเข้มข้นของ MAb (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ CPF-X-OVA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC ₅₀ ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD ± SD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
1.28	0.5	0.75 ± 0.10	0.01 ± 0.01
0.64	1	0.99 ± 0.37	0.005 ± 0.004
0.32	1.5	0.56 ± 0.07	0.0008 ± 0.0001

4.5 การวิเคราะห์ผล

4.5.1 การเปรียบเทียบค่าความไวของ ELISA 3 รูปแบบ

เมื่อวิเคราะห์วิธี competitive ELISA ทั้ง 3 รูปแบบ และเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบจากค่า IC₅₀ และ LOD ได้ผลสรุปดังแสดงตารางที่ 4.12 โดยพบว่า ELISA รูปแบบ dcELISA มีความไวสูงสุด รองลงมาคือ dcELISA-SV และ icELISA-GAM โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.16, 0.25, 0.51 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) จะเห็นว่าค่า IC₅₀ ของทั้ง 3 รูปแบบ ต่ำกว่าค่า MRL ของ CPF-X ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์รวมถึงผลิตภัณฑ์มาจากสัตว์ ซึ่งถูกกำหนดไว้ไม่เกิน 100-300 นาโนกรัมต่อกรัม จึงสามารถนำมาใช้ตรวจสอบ CPF-X ใน หมู กุ้ง และนม ในขั้นตอนต่อได้ทั้ง 3 รูปแบบ แต่จะมีเพียงรูปแบบเดียวที่จะนำไปใช้ โดยพิจารณาจากค่า IC₅₀ ที่ต่ำที่สุด จึงเลือกใช้ ELISA รูปแบบ dcELISA เพื่อทำการประเมินหาประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPF-X ในตัวอย่างอาหาร (หมู กุ้ง และ นม) ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบค่าความไวของชุด ELISA จากงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้ตรวจหา CPF-X ในตัวอย่างอาหาร พบว่าค่าความไวของ ELISA ในงานวิจัยนี้สูงกว่างานวิจัยอื่นๆ (ตาราง 4.13)

ตารางที่ 4. 12 สรุปผลการเปรียบเทียบ ELISA รูปแบบต่างๆ

รูปแบบของวิธี	อัตราส่วนความเข้มข้น		IC ₅₀ (ng/ml)	LOD (ng/ml)
	แอนติบอดี (µg/ml)	แอนติเจน (µg/ml)		
competitive ELISA				
dcELISA	0.16	2	0.15 ± 0.01	0.007 ± 0.0002
dcELISA-SV	0.32	1.5	0.25 ± 0.05	0.007 ± 0.0015
icELISA-GAM	0.32	1.5	0.56 ± 0.07	0.001 ± 0.0001

ตารางที่ 4. 13 ตารางเปรียบเทียบค่าความไวของ ELISA ที่ใช้ตรวจหา CPFX ในตัวอย่างอาหารของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

นักวิจัย	ELISA ที่ใช้ตรวจหา CPFX	IC ₅₀ (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Yuan และ คณะ (2010)	icELISA-GAR	-	0.32
Hu และ คณะ (2010)	icELISA-GAM	245.86	45.25
Huang และ คณะ (2010)	icELISA-GAR	1.47	0.095
H. T. Zhang และ คณะ (2011)	icELISA-GAR	9.4	0.2
J.-J. Chen และ Jiang (2013)	icELISA-GAM	0.56	0.03
บริษัท CUSABIO BIOTECH จำกัด	dcELISA	-	1.95
งานวิจัยชิ้นนี้	dcELISA	0.15	0.007

4.5.2 การหาค่าความจำเพาะ

จากรูปแบบที่ให้ค่าความไวสูงสุด คือ dcELISA นำไปหาค่าความจำเพาะโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb โดยทำการทดสอบกับสารในกลุ่มและสารนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน เมื่อทดสอบกับสารในกลุ่ม ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Cinoxacin และ Enoxacin พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนทุกสาร (ยกเว้น Cinoxacin 0%) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามไม่เกิน 17.83 % (ตารางที่ 4.14) ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำเมื่อทดสอบกับสารนอกกลุ่ม ได้แก่ Chloramphenicol, Neomycin, Tetracycline, Furazolidone

และ Nitrofurantoin ซึ่งใช้ในการแข่งขันที่ความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงใกล้เคียง 1 นั้นแสดงว่าสารเหล่านี้ไม่แย่งจับกับ MAb ที่เคลือบพื้นหลุม ทำให้มีค่า IC₅₀ สูงกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม 0 % แสดงให้เห็นว่ารูปแบบ dcELISA ไม่สามารถจับกับสารเหล่านี้ได้

ตารางที่ 4. 14 ผลการทำปฏิกิริยาข้ามของ MAb โดยวิธี dcELISA

กลุ่มสาร	สารที่ใช้ทดสอบ	IC ₅₀ (นาโนเมตรต่อมิลลิลิตร)	Cross-reactivity (เปอร์เซ็นต์)
สารในกลุ่ม ฟลูออโรควิโนโลน	Ciprofloxacin	0.1	100.00
	Enrofloxacin	2.16	4.88
	Norfloxacin	1.28	5.60
	Ofloxacin	21.98	0.48
	Cinoxacin	> 1,000	0
	Enoxacin	0.60	16.66
สารนอกกลุ่ม	Chloramphenicol	> 1,000	0
	Neomycin	> 1,000	0
	Tetracycline	> 1,000	0
	Furazolidone	> 1,000	0
	Nitrofurantoin	> 1,000	0

4.5.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

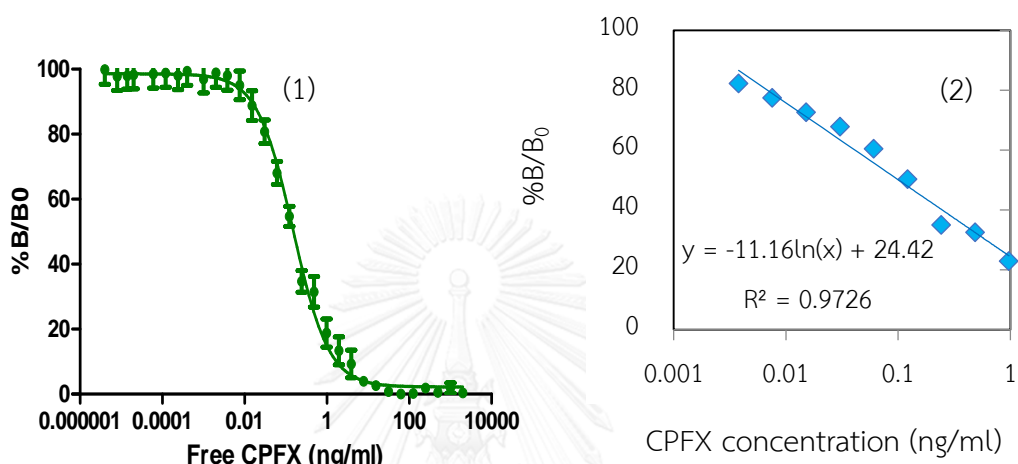
ทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และได้เลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่ 0.016 – 0.976 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4. 15 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ dcELISA ที่ใช้สำหรับเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น CPF _X (ng/ml)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 nm	SD (N=3, n=3)	%B/B ₀
0	1.030	0.005	100
0.001	0.848	0.058	82
0.002	0.863	0.060	84
0.004	0.846	0.006	82
0.008	0.796	0.017	77
0.015	0.747	0.007	73
0.031	0.698	0.009	68
0.061	0.622	0.048	60
0.122	0.546	0.042	53
0.244	0.360	0.045	35
0.488	0.335	0.064	33
0.978	0.235	0.058	23
1.953	0.193	0.058	19
3.906	0.161	0.058	16
7.813	0.119	0.017	12
15.625	0.109	0.018	11
31.250	0.094	0.019	9
62.500	0.088	0.020	9
125.000	0.090	0.017	9
250.000	0.103	0.018	10
500.000	0.092	0.016	9
1000.000	0.103	0.021	10
2000.000	0.091	0.018	9

สำหรับสร้าง
กราฟ
มาตรฐาน

เมื่อทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่ แกน X เป็นค่า %B/B₀ และ แกน Y เป็นค่าความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระ หน่วยเป็น นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.7) ซึ่งจากกราฟ ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ 0.9726 ซึ่งให้ช่วงความเข้มข้นของ CPFX ที่เป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.004-0.978 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งยอมรับได้ ดังนั้น จากค่าความเชื่อมั่นยืนยันได้ว่า สามารถใช้ช่วงความเข้มข้นของ CPFX นี้ทำเป็นกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจสอบหา CPFX ใน ตัวอย่างอาหารในขั้นตอนต่อไปได้



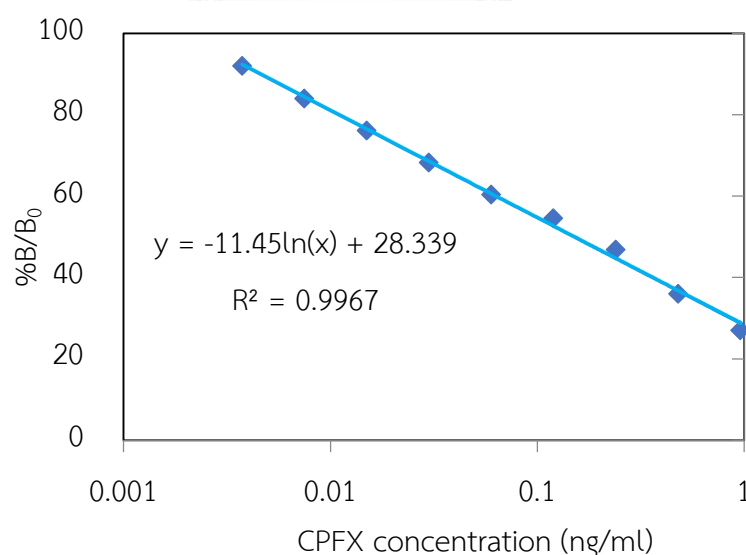
รูปที่ 4. 7 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของ CPFX ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism Ver. 5.0 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน,(1), และกราฟมาตรฐาน,(2)

เพื่อให้เกิดความสะดวกเวลาเตรียมสาร จึงได้มีการกำหนดความเข้มข้นของ CPFX ใหม่แต่ยังใกล้เคียงและอยู่ในช่วงความเข้มข้นเดิมที่เลือกไว้ โดยใช้ความเข้มข้นของ CPFX ดังนี้ 0.00375, 0.0075, 0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.4 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการเตรียมกราฟมาตรฐานในการทดลองต่อไป เมื่อทดสอบด้วยวิธี dcELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน X เป็นค่า %B/B₀ แกน Y เป็นความเข้มข้นของ CPFX ในรูปอิสระหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.16 รูปที่ 4.8)

ตารางที่ 4. 16 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการ ทำ dcELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น CPFX (นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	SD (N=6, n=3)	%B/B ₀
0	1.1024	0.08	100
0.00375	1.0144	0.19	92
0.0075	0.9257	0.16	84
0.015	0.8391	0.13	76
0.03	0.7523	0.12	68
0.06	0.6658	0.15	60
0.12	0.6013	0.13	55
0.24	0.5160	0.09	47
0.48	0.3969	0.08	36
0.96	0.2974	0.05	27

หมายเหตุ: N = จำนวนครั้งการทำ, n = จำนวนซ้ำในแต่ละครั้งของแต่ละความเข้มข้น



รูปที่ 4. 8 กราฟมาตรฐานโดยที่แกน X เป็นค่า %B/B₀ แกน Y เป็นความเข้มข้นของ CPFX ในรูป อีสระหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัด CPFX ด้วยวิธี dcELISA กับตัวอย่างอาหาร

4.6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA

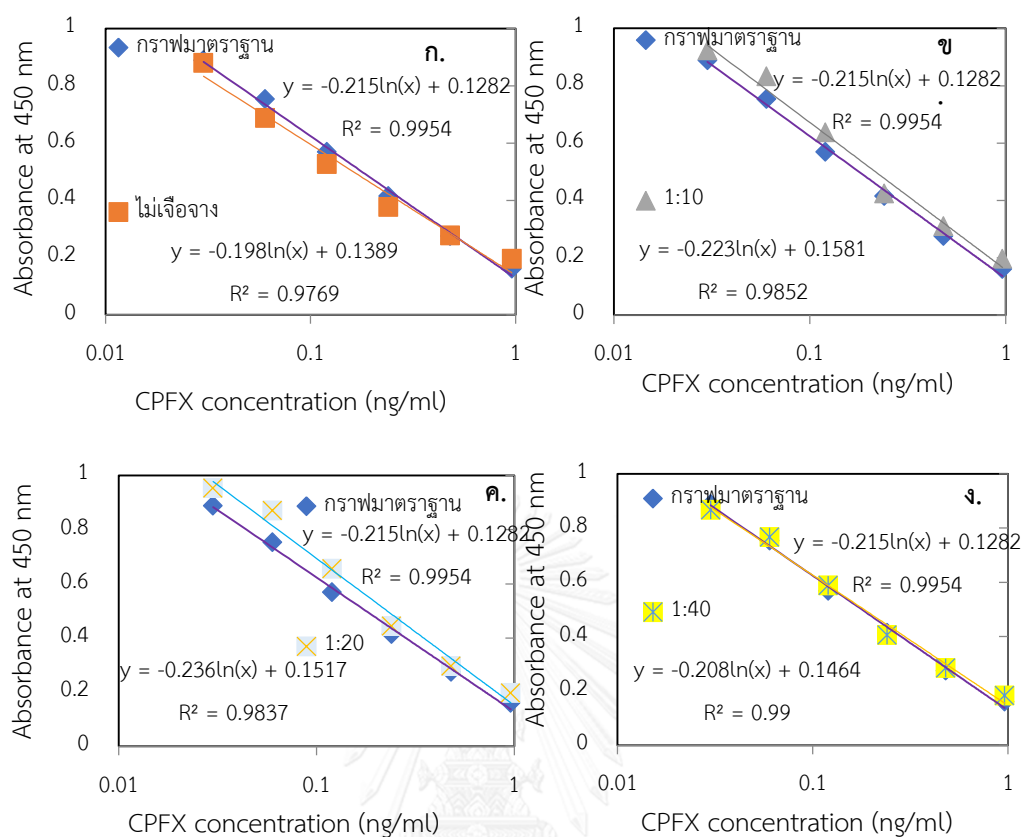
4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

ไขมันในเนื้อหมูเป็นแมทริกสำคัญที่รบกวนระบบ ELISA ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกในเนื้อหมูโดยการหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้แมทริกในเนื้อหมูไม่มีผลต่อ ELISA ทำการสกัดเนื้อหมูด้วยวิธีของ Yuan และ คณะ 2001 จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ไม่ถูกเจือจางและ เจือจางที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า มาเติม CPFX ลงไปในส่วนใสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟมาตรฐานของ CPFX ที่ละลายใน PBS จะถูกเปรียบเทียบกับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใส

ซึ่งการทดลองนี้มีการวิเคราะห์ 2 ส่วน คือ ในส่วนแรกนั้น ศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูโดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานกับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใสที่ไม่ได้ทำการเจือจาง พบว่าเส้นกราฟคลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐานมาก กล่าวได้ว่าแมทริกในเนื้อหมูมีผลต่อระบบ ELISA

การวิเคราะห์ในส่วนที่ 2 คือ การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน กับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใสที่ถูกเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า เพื่อศึกษาระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู พบว่าที่ระดับการเจือจาง 10 และ 20 เท่า เส้นกราฟยังเบนออกห่างจากเส้นกราฟมาตรฐาน แสดงว่ายังไม่สามารถลดผลของแมทริกจากเนื้อหมูได้ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า นั้น สามารถลดผลของแมทริกจากเนื้อหมูได้ เนื่องจากเส้นกราฟเบนเข้าใกล้กับเส้นกราฟมาตรฐานมากจนเกือบทับกัน แสดงให้เห็นว่าที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า เป็นค่าการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในเนื้อหมู ด้วยวิธี dcELISA (รูปที่ 4.9)

จากการศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู สรุปได้ว่าแมทริกมีผลต่อระบบ ELISA และสามารถลดแมทริกลงได้เมื่อทำการเจือจางที่ 40 เท่า



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมูที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน

4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมู

จากการเติม CPFX ลงไปในตัวอย่างเนื้อหมูให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม แล้วจึงทำการสกัด จนได้ส่วนใสออกมา ทำการเจือจางส่วนใสเพื่อลดแมทริกที่ 1:40 เท่า ตรวจสอบด้วยวิธี dcELISA เพื่อวิเคราะห์หา CPFX โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมกับหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัด โดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของ %recovery (RV) และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV

พบว่าเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ intra assay และทำการทดลองในวันเวลาต่างกัน หรือ inter assay ค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPFX ในเนื้อหมูอยู่ที่ 86 -103 เปอร์เซ็นต์ และ 83-101 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 80-120 เปอร์เซ็นต์ (Abbott และ คณะ, 2010) ส่วนค่าความแม่นยำอยู่ที่ 3.6-8.5 เปอร์เซ็นต์ และ 8.9-15.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ %CV <20 เปอร์เซ็นต์ (Y. Zhang และ คณะ, 2007) (ตารางที่ 4.17 และ 4.18)

ตารางที่ 4. 17 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างเนื้อหมู

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra assay (n = 2)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
5.0	4.3 ± 0.4	86 ± 7	3.6 ± 2.1
10.0	8.9 ± 0.8	89 ± 7	7.1 ± 3.1
20.0	20.0 ± 1.7	100 ± 9	5.2 ± 1.7
40.0	41.1 ± 2.4	103 ± 6	8.5 ± 4.2

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 4. 18 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อหมู

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อกรัม)	Inter assay (N=8, n = 4)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
5.0	4.8 ± 0.5	95 ± 10	15.4 ± 2.9
10.0	8.3 ± 0.2	83 ± 2	12.6 ± 4.9
20.0	17.0 ± 0.9	85 ± 5	8.9 ± 4.2
40.0	40.6 ± 4.0	101 ± 10	9.9 ± 4.0

หมายเหตุ: Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.6.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกึ่งสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA

4.6.2.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกและเมทานอลในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

เพื่อทำการศึกษผลกระทบของแมทริกในเนื้อกึ่ง ทำการสกัดกึ่งด้วยวิธีของ Zhang และ คณะ 2011 จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ไม่ถูกเจือจางมาเติม CPFX ลงไปในส่วนใสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟมาตรฐานของ CPFX ที่ละลายใน PBS จะถูกเปรียบเทียบกับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใส เนื่องจากการทดลองนี้ใช้เมทานอลในการสกัด จึงแบ่งความเข้มข้นของเมทานอลออกเป็น 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0%, 25% และ 50% พบว่า

การสกัดวิธีแรก “ไม่ใช้เมทานอล” เส้นกราฟของ CPFX ที่ใส่ลงไปในส่วนใส ที่ไม่ถูกเจือจางนั้นคลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐานมาก ดังนั้นกล่าวได้ว่า แมทริกในเนื้อกึ่งมีผลต่อระบบ ELISA ทำให้การตรวจวัดปริมาณ CPFX คลาดเคลื่อน (รูปที่ 4.10)

การสกัดวิธีที่ 2 “ใช้เมทานอล 25%” เส้นกราฟของ CPFX ที่ใส่ลงไปในส่วนใส คลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐานมาก ดังนั้น มีผลของแมทริกในเนื้อกึ่งและการใช้เมทานอล ความเข้มข้นที่ 25% ไม่สามารถดึง CPFX ออกมาจากเนื้อกึ่งมาได้ หรือ อาจสามารถดึง CPFX ออกมาจากเนื้อกึ่งมาได้ แต่ด้วยความเข้มข้นเมทานอลที่สูงถึง 25% จึงมีผลต่อระบบ ELISA (ดังผลที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก) ทำให้การตรวจวัดปริมาณ CPFX คลาดเคลื่อนได้ (รูปที่ 4.11)

ส่วนการสกัดวิธีที่ 3 “ใช้เมทานอล 50%” เส้นกราฟของ CPFX ที่ใส่ลงไปในส่วนใส คลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐาน เนื่องจากเข้มข้นเมทานอลที่ค่อนข้างสูงถึง 50% จึงมีผลต่อระบบ ELISA (ดังผลที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก) ทำให้การตรวจวัดปริมาณ CPFX คลาดเคลื่อนได้ (รูปที่ 4.12)

สรุปได้ว่า แมทริกในเนื้อกึ่ง และความเข้มข้นของเมทานอลที่ 25 % และ 50% มีผลต่อระบบ ELISA

4.6.2.2 การศึกษาการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

จากการศึกษาผลกระทบของแมทริกและเมทานอลข้างต้น พบว่าการสกัดโดยใช้ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0%, 25% และ 50% นี้ ให้เส้นกราฟคลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐานมาก เนื่องจากแมทริกจากเนื้อกึ่งและความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อระบบ ELISA ดังนั้น การเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดทั้งแมทริกจากเนื้อกึ่งและผลกระทบจากความเข้มข้นของเมทานอลได้

จึงต้องทำการหาระดับการเจือจางที่สามารถลดทั้งแมทริกในเนื้อกึ่งและผลกระทบจากความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการสกัดออกไปได้ โดยทำการการสกัดกึ่งก่อนทำการเติม CPFX ด้วยวิธีของ Zhang และ คณะ 2011 จากนั้นเจือจางส่วนใสที่ระดับการเจือจางตั้งแต่ 10, 20, 40, 80 และ 160 เท่า จึงจะทำการเติม CPFX ลงไป ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบเส้นกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใสกับเส้นกราฟมาตรฐาน พบว่า

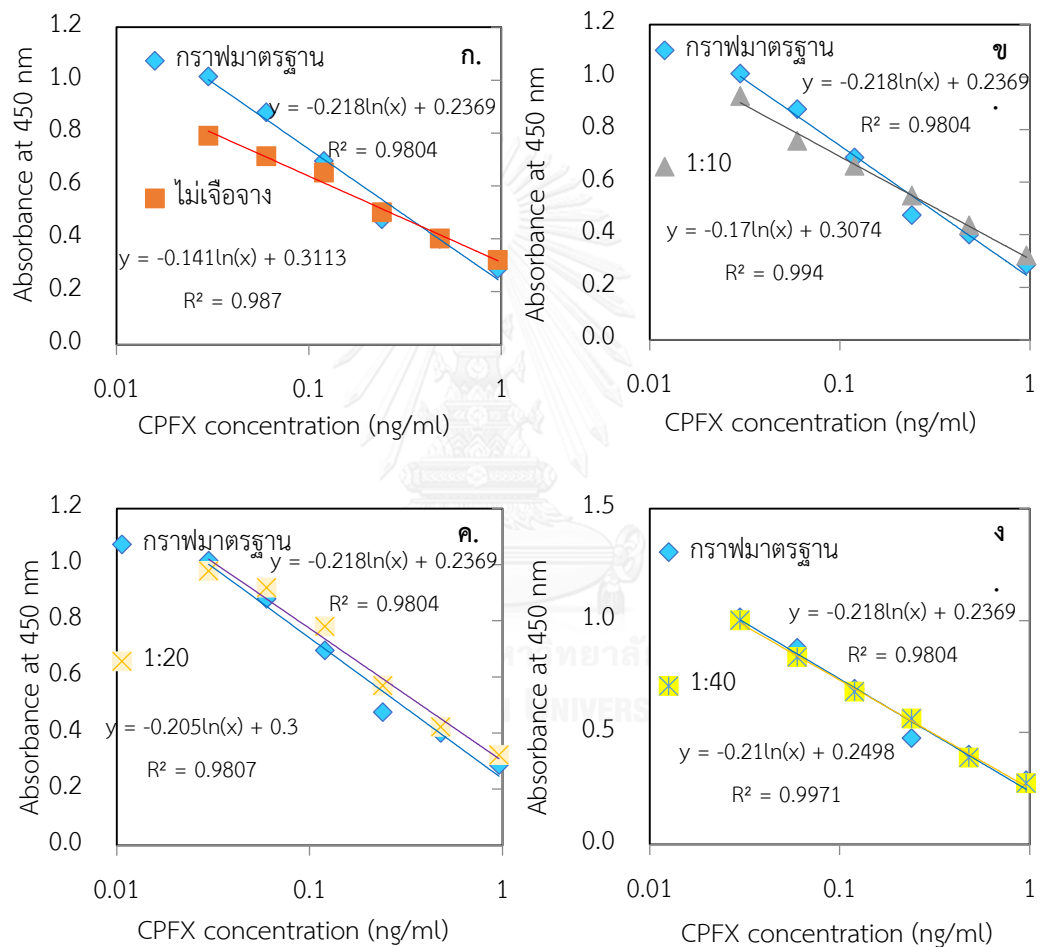
การสกัดวิธีแรก “ไม่ใช้เมทานอล” ที่ระดับการเจือจาง 10 เท่า และ 20 เท่า เส้นกราฟยังเบนออกห่างจากเส้นกราฟมาตรฐาน แสดงว่ายังไม่สามารถผลของแมทริกจากเนื้อกึ่งได้ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า เส้นกราฟทับเส้นกราฟมาตรฐาน ดังนั้น ที่ระดับการเจือจาง 40 เท่า เป็นค่าการเจือจางที่สามารถลดผลของแมทริกจากเนื้อกึ่งได้ จึงถูกเลือกนำไปใช้ในการหาตรวจวัด CPFX ในเนื้อกึ่งด้วยวิธี dcELISA เปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการตรวจวัดกับวิธีการสกัดอีก 2 วิธี เพื่อหาวิธีที่ดีที่สุดไปใช้ (รูปที่ 4.10)

การสกัดวิธีที่ 2 “ใช้เมทานอล 25%” พบว่าที่ระดับการเจือจาง 10 และ 20 เท่า เส้นกราฟยังเบนออกห่างจากเส้นกราฟมาตรฐาน แสดงว่ายังไม่สามารถลดผลของแมทริกจากเนื้อกึ่งได้ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 40 และ 80 เท่า สามารถลดได้ทั้งผลกระทบจากแมทริกและผลกระทบจากความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการสกัด เนื่องจากเส้นกราฟทับเส้นกราฟมาตรฐานสนิท จึงเลือกระดับการเจือจางที่ 40 และ 80 เท่า ไปใช้ในการตรวจวัด CPFX ในเนื้อกึ่งด้วยวิธี dcELISA เปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการตรวจวัดกับวิธีการสกัดอีก 2 วิธี เพื่อหาวิธีที่ดีที่สุดไปใช้ (รูปที่ 4.11)

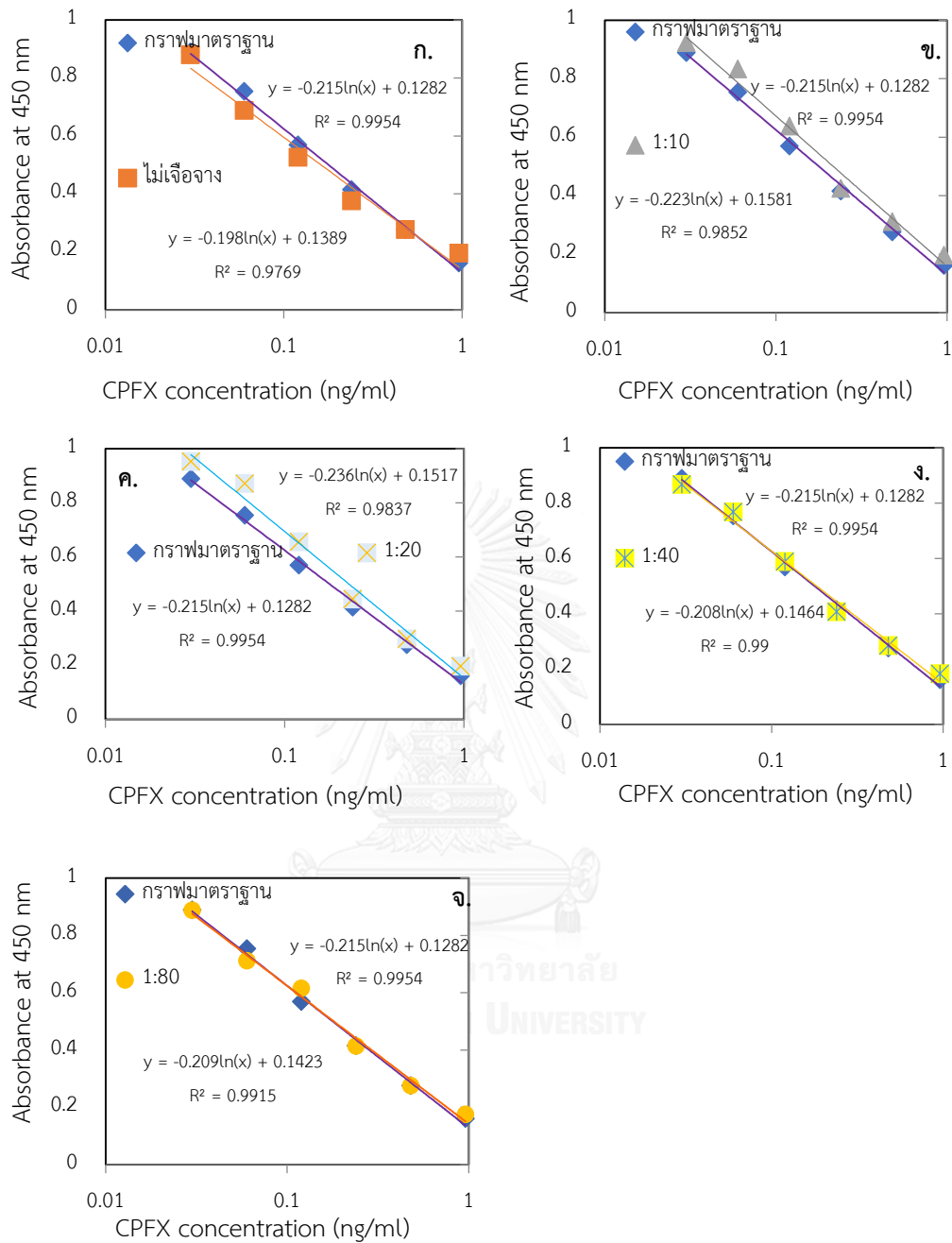
ส่วนการสกัดวิธีที่ 3 “ใช้เมทานอล 50%” ที่ระดับการเจือจาง 10 เท่า เส้นกราฟยังเบนออกห่างจากเส้นกราฟมาตรฐาน เนื่องจากไม่สามารถลดผลของแมทริกจากเนื้อกึ่งและผลของความเข้มข้นเมทานอล (ที่เหลืออยู่ 5 % หลังจากถูกเจือจาง) ได้ ส่วนที่ระดับการเจือจาง 20, 40 และ 80 เท่า สามารถลดผลจากความเข้มข้นของเมทานอลที่เหลืออยู่เพียง 1.25 และ 0.625 % ตามลำดับได้ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อระบบ ELISA (ดังผลในภาคผนวก ก.) แต่ยังไม่สามารถลดผลของแมทริกได้เนื่องจากเส้นกราฟไม่ทับกับเส้นกราฟมาตรฐาน แต่ที่ระดับการเจือจาง 160 เท่า พบว่าเส้นกราฟทับเส้นกราฟมาตรฐานสนิท จึงเลือกระดับการเจือจาง 160 เท่า ไปใช้ในการหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัด CPFX ในเนื้อกึ่งด้วยวิธี dcELISA เนื่องจากสามารถลดผลกระทบของแมทริกจากเนื้อกึ่งและผลจากความเข้มข้นของเมทานอล (ที่เหลืออยู่เพียง 0.312 %) ได้ (รูปที่ 4.12)

ต่อมาทำการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการตรวจวัด CPFX ในเนื้อกึ่งเพื่อหาวิธีที่ให้ค่าความถูกต้องมากที่สุด โดยใช้วิธีการสกัดที่คัดเลือกไว้ทั้ง 3 วิธี ดังนี้

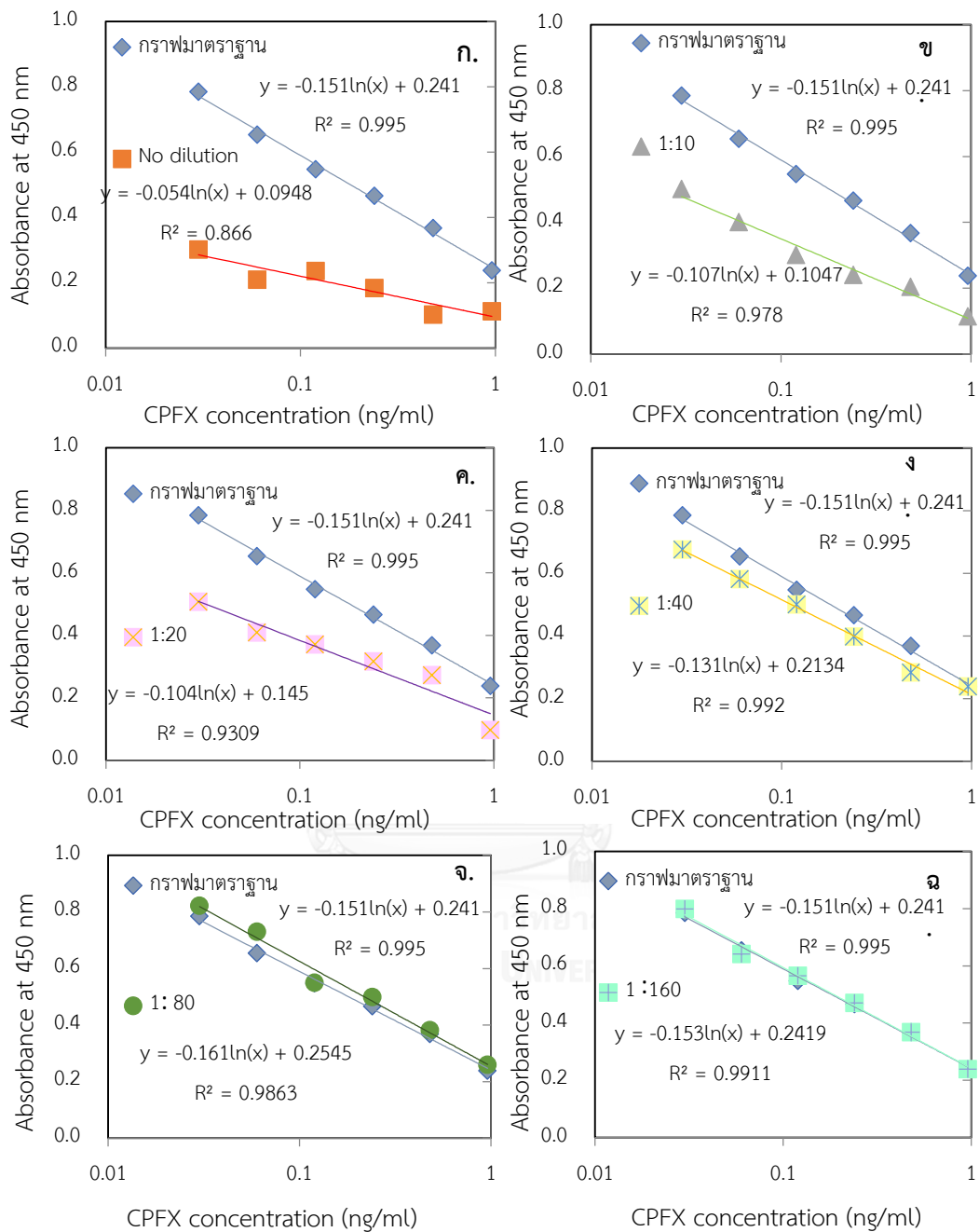
- การสกัดวิธีแรก “ไม่ใช้เมทานอล” เลือกระดับการเจือจางที่ 40 เท่า
- การสกัดวิธีที่ 2 “ใช้เมทานอล 25%” เลือกระดับการเจือจางที่ 40 และ 80 เท่า
- การสกัดวิธีที่ 3 “ใช้เมทานอล 50%” เลือกระดับการเจือจางที่ 160 เท่า



รูปที่ 4. 10 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกึ่งที่ถูกสกัดด้วย PBS (เมทานอล 0%) ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. และ ง. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20 และ 40 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 4. 11 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกึ่งที่ถูกสกัดด้วยเมทานอล 25% ที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. และ จ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 40 และ 80 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 4. 12 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อกุ้งที่ถูกสกัดด้วยเมทานอล 50% ที่ระดับ การเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. จ. และ ฉ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 40, 80 และ 160 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.6.2.3 เปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPFX ในเนื้อกึ่งที่สกัดโดยไม่ใช่เมทานอลกับสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25 และ 50%

จากการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPFX ในเนื้อกึ่งระหว่างการสกัดโดยไม่ใช่เมทานอลกับสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25 และ 50% โดยการทำให้ Direct competitive ELISA โดยใช้ค่าระดับการเจือจางแมทริกที่ถูกเลือกไว้ข้างต้น พบว่า การสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งโดยไม่ใช่เมทานอล ให้ค่าความถูกต้องในการตรวจเพียง 4.12% แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับการเจือจางแมทริก 40 เท่า นี้ สามารถกำจัดผลกระทบของแมทริกต่อการทำ ELISA ไปได้ แต่การสกัดแบบไม่ใช่เมทานอลนั้นไม่สามารถสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งได้ ส่วนการสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งโดยไม่ใช่เมทานอลความเข้มข้นที่ 25% โดยใช้ระดับการเจือจางแมทริกที่ 1:40 และ 1:80 ให้ค่าความถูกต้องในการตรวจเพียง 8.87% และ 13.69% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับการเจือจางแมทริก 40 และ 80 เท่า นี้ สามารถกำจัดผลกระทบของแมทริกต่อการทำ ELISA ไปได้ แต่การสกัดแบบใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25% นั้นไม่สามารถสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งได้ สุดท้ายการสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งโดยไม่ใช่เมทานอลความเข้มข้นที่ 50% โดยใช้ระดับการเจือจางแมทริกที่ 160 เท่า ให้ค่าความถูกต้องในการตรวจที่ 85.63% แสดงให้เห็นว่าการสกัดแบบใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 50% นั้นสามารถสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่งได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ CPFX ที่ถูกเติมเข้าไปก่อนทำการสกัด (ตารางที่ 19)

ขั้นตอนต่อไป ทำการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง โดยเลือกใช้เมทานอลที่ความเข้มข้น 50% ที่ระดับการเจือจางแมทริก 160 เท่า ในการสกัด CPFX ออกจากเนื้อกึ่ง เนื่องจากให้ค่าความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4. 19 ผลการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณซีโทรฟลอกซินในเนื้อกุ้งระหว่างการสกัด โดยไม่ใช้เมทานอลกับสกัดโดยใช้เมทานอลความเข้มข้นที่ 25 และ 50% โดยการทำ Direct competitive ELISA

ความเข้มข้นของ เมทานอลที่ใช้ในการ สกัด (%)	ระดับการเจือจาง แมทริกในตัวอย่างกุ้ง	ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อกรัม)	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
0	1:40	5.0	0.2 ± 0.1	4 ± 1	4.4 ± 3.7
25	1:40	5.0	0.4 ± 0.1	9 ± 2	4.2 ± 2.9
	1:80	5.0	0.7 ± 0.1	14 ± 2	7.0 ± 4.1
50	1:160	5.0	4.3 ± 0.2	86 ± 3	3.4 ± 2.0

4.6.2.4 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

หลังจากได้วิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อกึ่งที่เหมาะสม คือ สกัดด้วยเมทานอล 50% และนำมาเจือจางที่ระดับการเจือจาง 1:160 ก่อนนำมาทดสอบหา CPFX ด้วยวิธี dcELISA โดยการเติม CPFX ลงไปในตัวอย่างเนื้อกึ่งให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม เทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัดโดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของ %recovery (RV) และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV พบว่าเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่งที่ทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ intra assay และทำการทดลองในวันเวลาต่างกัน หรือ inter assay ค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPFX ในเนื้อกึ่งอยู่ที่ 86-110 เปอร์เซ็นต์ และ 84-96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนค่าความแม่นยำอยู่ที่ 3.6-8.6 เปอร์เซ็นต์ และ 9.6-13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แมทริกในเนื้อกึ่งไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ CPFX ด้วยวิธี Direct competitive ELISA เนื่องจากมีความถูกต้องสูง ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 80-120 เปอร์เซ็นต์ (Abbott, 2011) อีกทั้งมีความแม่นยำเนื่องจากมี %CV ไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ %CV <20 เปอร์เซ็นต์ (Zhang, 2007) ดังนั้นวิธี ELISA รูปแบบ dcELISA ที่ถูกคัดเลือกนี้มีความสามารถในการวัด CPFX ในตัวอย่างเนื้อกึ่งได้อย่างถูกต้อง (ตารางที่ 4.20 และ 4.21)

ตารางที่ 4. 20 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อกรัม)	Intra assay (n = 2)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
5.0	4.3 ± 0.3	86 ± 6	3.6 ± 2.1
10.0	11.0 ± 0.8	110 ± 8	7.1 ± 3.1
20.0	20.3 ± 2.0	101 ± 12	5.2 ± 1.7
40.0	42.1 ± 3.7	105 ± 9	8.5 ± 4.2

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 4. 21 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อกรัม)	Inter assay (N=8, n = 4)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อกรัม)	%Recovery	%CV
5.0	4.8 ± 0.6	96 ± 11	13.5 ± 4.2
10.0	9.0 ± 1.0	90 ± 10	13.2 ± 6.5
20.0	16.9 ± 1.3	84 ± 7	10.7 ± 5.1
40.0	36.0 ± 2.3	90 ± 6	9.6 ± 1.7

หมายเหตุ: Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.6.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันสำหรับตรวจวัดปริมาณ CPFX ด้วยวิธี dcELISA

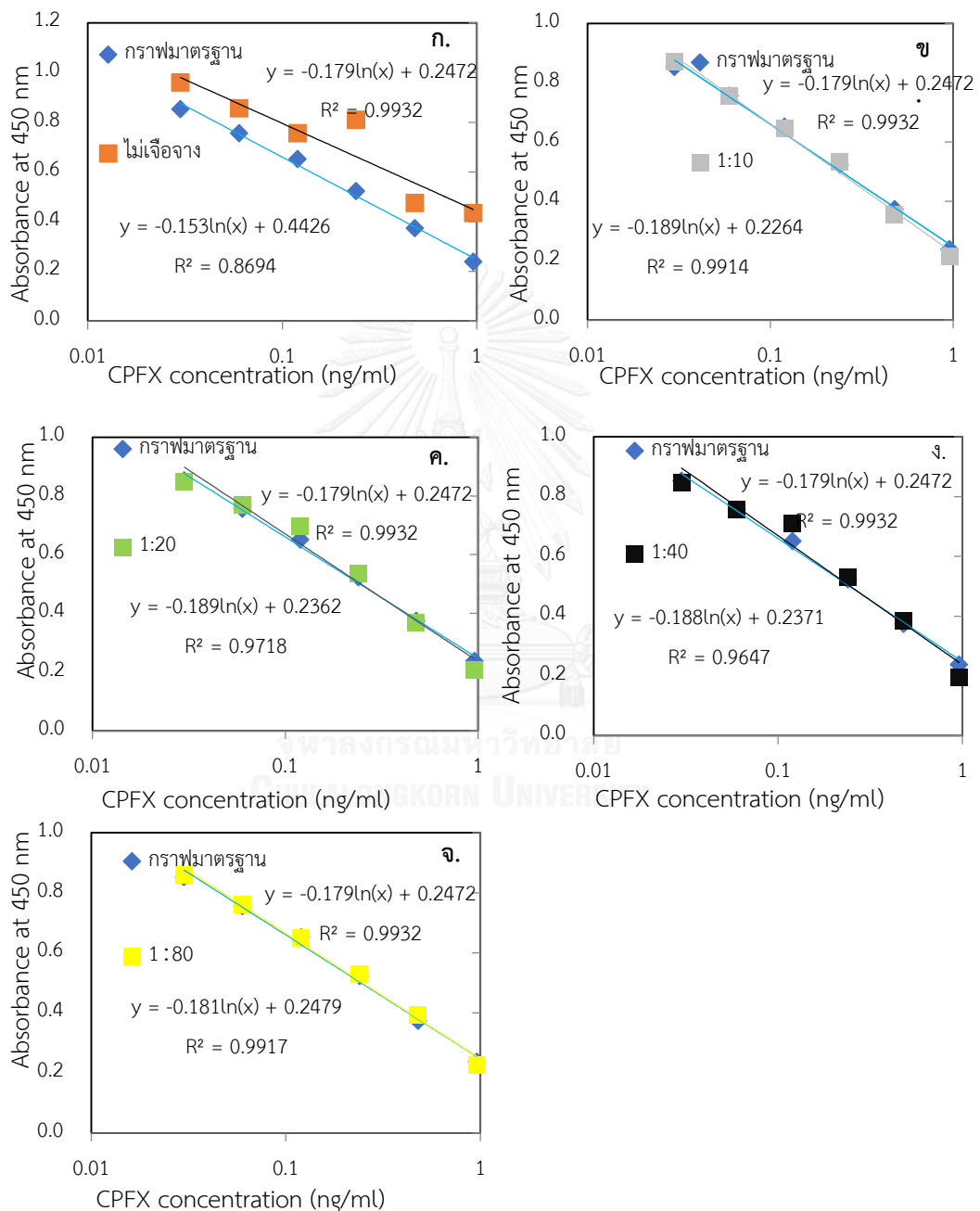
4.6.1.1 การศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของแมทริกในตัวอย่างน้ำมัน

ไขมันในน้ำมันเป็นแมทริกสำคัญที่รบกวนระบบ ELISA ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกในน้ำมันโดยการหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้แมทริกในน้ำมันไม่มีผลต่อ ELISA เพื่อทำการศึกษาผลกระทบของแมทริกและระดับการเจือจางที่สามารถลดแมทริกในตัวอย่างน้ำมัน ทำการสกัดน้ำมันด้วยวิธีของ Huang และ คณะ (2010) จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ไม่ถูกเจือจาง และ เจือจางที่ระดับการเจือจาง 10, 20, 40 และ 80 เท่า มาเติม CPFX ลงไปในส่วนใสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 และ 0.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CPFX ที่ละลายใน PBS

ซึ่งการทดลองนี้มีการวิเคราะห์ 2 ส่วน คือ ในส่วนแรกนั้น ศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างน้ำมันโดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานกับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใสที่ไม่ได้ทำการเจือจาง พบว่าแมทริกในน้ำมันมีผลต่อระบบ ELISA เนื่องจากเส้นกราฟคลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟมาตรฐานมาก

การวิเคราะห์ในส่วนที่ 2 คือ การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน กับกราฟของ CPFX ที่ละลายในส่วนใสที่ถูกเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า พบว่าที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า เส้นกราฟเกือบทับกับเส้นกราฟมาตรฐานสนิท แสดงว่าสามารถลดผลของแมทริกจากน้ำมันได้ แต่ยังเหลือผลกระทบของแมทริกอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนที่ระดับการเจือจาง 80 เท่า นั้น เส้นกราฟทับเส้นกราฟมาตรฐานสนิท แสดงว่าสามารถลดผลของแมทริกจากน้ำมัน

ได้ จึงเลือกระดับการเจือจางที่ 80 เท่า เป็นค่าการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณ CFX ในเนื้อหมู ด้วยวิธี dcELISA (รูปที่ 4.13) จากการศึกษาผลกระทบและระดับการเจือจางของ แมทริกในตัวอย่างน้ำนม สรุปได้ว่า แมทริกมีผลต่อระบบ ELISA และสามารถลดแมทริกลงได้เมื่อทำการเจือจางที่ 80 เท่า



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงผลของระดับการเจือจางแมทริกในน้ำนมที่ระดับการเจือจางต่างๆ โดยที่ ก. ข. ค. ง. และ จ. คือ ไม่เจือจาง, เจือจางที่ 10, 20, 40 และ 80 เท่า ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.6.1.2 การตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำนม

เมื่อเติม CPFX ลงไปในตัวอย่างน้ำนมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อกรัม แล้วสกัดตามวิธีของ Huang และ คณะ, 2010 จนได้ส่วนใสออกมา จึงทำการเจือจางส่วนใสเพื่อลดผลกระทบจากแมทริกที่ 1:40 เท่า จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี dcELISA เพื่อวิเคราะห์หา CPFX โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความถูกต้องในการตรวจวัด โดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของ %recovery (RV) และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV พบว่าเมื่อทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ intra assay และทำการทดลองในวันละเวลาต่างกัน หรือ inter assay ผลการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างน้ำนมด้วย dcELISA ให้ค่าความถูกต้องในการวัดปริมาณ CPFX ในน้ำนมอยู่ที่ 91-109 เปอร์เซ็นต์ และ 95 - 107 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 80-120 เปอร์เซ็นต์ (Abbott, 2011) ส่วนค่าความแม่นยำอยู่ที่ 2.2-5.5 เปอร์เซ็นต์ และ 6.2-9.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ %CV <20 เปอร์เซ็นต์ (Zhang, 2007) (ตารางที่ 4.22 และ 4.23)

ตารางที่ 4. 22 ผลการวิเคราะห์ Intra assay ในตัวอย่างน้ำนม

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Intra assay (n = 8)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	%Recovery	%CV
5.0	4.6 ± 0.4	92 ± 8	5.5 ± 5.5
10.0	9.6 ± 0.7	96 ± 7	2.8 ± 3.5
20.0	18.1 ± 1.9	91 ± 10	2.2 ± 2.0
40.0	43.6 ± 1.6	109 ± 4	3.6 ± 4.6

หมายเหตุ: Intra assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาเดียวกัน

n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 4. 23 ผลการวิเคราะห์ Inter assay ในตัวอย่างน้ำนม

ปริมาณ CPFX (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Inter assay (N=8, n = 2)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	%Recovery	%CV
5.0	5.0 ± 0.7	100 ± 13	6.9 ± 3.0
10.0	10.7 ± 0.9	107 ± 9	9.3 ± 3.5
20.0	20.3 ± 2.0	101 ± 10	6.6 ± 3.5
40.0	38.1 ± 3.5	95 ± 9	6.2 ± 1.6

หมายเหตุ: Inter assay คือ การวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 8 ครั้ง ในเวลาต่างกัน

N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง, n คือจำนวนซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

4.6.4 เปรียบเทียบค่าความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวัด CPF_X ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

หลังจากทำการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวัดปริมาณ CPF_X ด้วยวิธี dcELISA กับตัวอย่างอาหารต่างๆ พบว่าค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องและความแม่นยำกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ดังนี้

ปี 2001 งานวิจัยของ Yuan และ คณะ ใช้ icELISA-GAR ในการตรวจวัดปริมาณ CPF_X ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผ่านการสกัดด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความถูกต้องและความแม่นยำในงานวิจัยดังกล่าวอยู่ในช่วง 74-76% และ 4.5-11.54% ตามลำดับ ขั้นตอนการสกัด CPF_X ของ Yuan และ คณะ จึงถูกนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งให้ค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วง 83-103% และ 3.6-15.4% ตามลำดับ

ปี 2010 งานวิจัยของ Hu และ คณะ ใช้ icELISA-GAM ในการตรวจวัดปริมาณ ENR และ CPF_X ในตัวอย่างเนื้อสัตว์น้ำ ได้แก่ กุ้ง ปลา ตะพาบ เป็นต้น ซึ่งผ่านการสกัดด้วย 1M HCl-acetonitrile และ n-hexane ค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วง 80-95% และ 4.5-1.8-8.0% ตามลำดับ ปี 2011 Zhang และ คณะ ได้ใช้ icELISA-GAR ในการตรวจวัดปริมาณ ENR และ CPF_X ในเนื้อหมูและเนื้อวัว ซึ่งทำการสกัด CPF_X ออกจากตัวอย่างอาหารด้วยใช้ Methanal 50% พบว่าค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วง 86-109% และ 6.8-13.1% ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้การสกัด CPF_X ของ Zhang และ คณะ ในตัวอย่างเนื้อกุ้ง พบว่าค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วง 84-110% และ 3.6-13.5% ตามลำดับ

ปี 2010 Huang และ คณะ ใช้ icELISA-GAM ในการตรวจวัดปริมาณ CPF_X ในตัวอย่างน้ำมัน ที่ผ่านการสกัดโดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความถูกต้องและความแม่นยำในงานวิจัยดังกล่าวอยู่ในช่วง 63-85% และ 6.3-12.2% ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคการสกัดดังกล่าวมาใช้สกัด CPF_X ในตัวอย่างน้ำมัน ซึ่งให้ค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในช่วง 87-109% และ 2.2-9.3% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.24)

ตารางที่ 4. 24 ผลการเปรียบเทียบค่าความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวัด CPIX ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ

นักวิจัย	ตัวอย่าง	วิธีการสกัด CPIX	ELISA ที่ใช้ตรวจหา CPIX	%Recovery	%CV
Yuan และคณะ, 2001	เนื้อหมู	ต้มที่อุณหภูมิ 85 °C	icELISA-GAR	74-76	4.5-11.5
งานวิจัยชิ้นนี้	เนื้อหมู	ต้มที่อุณหภูมิ 85 °C	dcELISA	83-103	3.6-15.4
Hu และคณะ, 2010	เนื้อสัตว์น้ำ เช่น ปลา กุ้ง เป็นต้น	1M HCl-acetonitrile และ n-hexane	icELISA-GAM	80-95	1.8-8.0
Zhang และคณะ, 2011	เนื้อหมู, เนื้อวัว	Methanal 50%	icELISA-GAR	86-109	6.8-13.1
งานวิจัยชิ้นนี้	เนื้อกุ้ง	Methanal 50%	dcELISA	84-110	3.6-13.5
Huang และคณะ, 2010	น้ำมัน	ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C	icELISA-GAR	63-85	6.3-12.2
งานวิจัยชิ้นนี้	น้ำมัน	ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C	dcELISA	87-109	2.2-9.3

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์รหัสโคลน 11-5A-B3 ซึ่งสามารถผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ CPFX ด้วยอาหาร RPMI ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS จากนั้นค่อยๆ ลดความเข้มข้นของ FBS เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ จึงย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในอาหาร SFM เพื่อลดการปนเปื้อนของ immunoglobulin จาก FBS แล้วทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าขั้นตอนการทำ MAb ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Protein G Affinity Chromatography ได้ปริมาณความเข้มข้น 2.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 3 มิลลิลิตร จากนั้น ทำการหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MAb และ แอนติเจน เพื่อใช้ในการทดสอบหาความไว CPFX ด้วย ELISA ในรูปแบบต่างๆ 3 รูป ได้แก่ dcELISA, dcELISA-SV และ icELISA-GAM

จากการทดสอบ พบว่า ELISA รูปแบบ dcELISA มีความไวสูงสุด รองลงมาคือ dcELISA-SV และ icELISA-GAM โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.16, 0.25 และ 0.51 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เนื่องจากวิธี dcELISA มีการแข่งขันกันจับแอนติบอดีระหว่าง CPFX ในรูปอิสระและ CPFX-HRP ในภาวะที่เป็นอิสระ ในระหว่างที่วิธี dcELISA-SV และ icELISA-GAM มีการแข่งขันกันจับแอนติบอดีระหว่าง CPFX ในรูปอิสระและ CPFX-OVA ในภาวะที่ไม่เป็นอิสระ (เคลือบไว้พื้นหลุม) อย่างไรก็ตาม สามารถนำ ELISA ทั้ง 3 รูปแบบ มาทำการประเมินหาประสิทธิภาพของการตรวจวัดปริมาณ CPFX ในตัวอย่างอาหารได้ เนื่องจากค่า IC_{50} ทั้ง 3 รูปแบบ ต่ำกว่าค่า MRL ของ CPFX ที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ รวมถึงผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งถูกกำหนดไว้ไม่เกิน 100-300 นาโนกรัมต่อกรัม (Commission Regulation (EU), 2009) แต่เลือกรูปแบบที่ใช้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดไปใช้ จึงเลือกใช้ ELISA รูปแบบ dcELISA ซึ่งรูปแบบดังกล่าว นอกจากจะให้ค่าความไวต่ำที่สุด ข้อดีคือ ใช้เวลาในการทำน้อยกว่า รูปแบบอื่นๆ และประหยัดต้นทุนเนื่องจากใช้ CPFX-HRP ซึ่งทำการเชื่อมต่อเอง จึงไม่ต้องใช้ทั้ง Secondary antibody และ Streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งต้องทำการสั่งซื้อ

ก่อนนำไปตรวจสอบหา CPFX ในตัวอย่างอาหาร ได้ทำการหาค่าความจำเพาะโดยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb พบว่า เมื่อทดสอบกับสารในกลุ่ม พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Cinoxacin และ Enoxacin ไม่เกิน 17.83 % ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม ได้แก่ Chloramphenicol, Neomycin, Tetracycline, Furazolidone และ Nitrofurantoin (ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม 0%)

เมื่อทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ CPIX ในรูปอิสระ เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ตรวจสอบหา CPIX ในตัวอย่างอาหารในขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณาจากผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ได้จากการทำ dcELISA พบว่าช่วงความเข้มข้นของ CPIX ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.004-0.978 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.9726 ซึ่งยอมรับได้

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ CPIX ที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อหมู เนื้อกุ้ง และน้ำนมโดยทำการทดลองในวันและเวลาเดียวกัน หรือ Intra assay และทำการทดลองในวันละเวลาต่างกัน หรือ Inter assay ค่าความถูกต้องและความแม่นยำในการวัดปริมาณ CPIX อยู่ในช่วง 83 -110% และ 2.2-15.4% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังนั้นวิธี ELISA รูปแบบ dcELISA ที่ถูกคัดเลือกนี้มีความสามารถในการวัด CPIX ในตัวอย่างอาหารได้

ชุดตรวจสอบ CPIX dcELISA ที่ได้นี้มีความสามารถในการตรวจวัด CPIX ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ความถูกต้องและความแม่นยำสูง แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป เช่น อายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ การเตรียมซบเสตรรที่พร้อมใช้งานได้ทันที เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่สามารถผลิตและจำหน่ายทางการค้าได้

รายการอ้างอิง

- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S. B., Ulberth, F., Van Hengel, A. J., . . . Yeung, J. M. (2010). Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, *93*, 442-450.
- Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Cano, J. and Barbosa, J. (2001). Determination of residues of enrofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, *759*, 73-79.
- Bertino, J. and Fish, D. (2000). The safety profile of the fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics*, *22*, 798-817.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á. and Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(9), 1038-1049.
- Chen, J.-J. and Jiang, J.-Q. (2013). Monoclonal antibody-based solvent tolerable indirect competitive ELISA for monitoring ciprofloxacin residue in poultry samples. *Food and Agricultural Immunology*, *24*(3), 331-344.
- Chen, X., Wang, Y., X. and Jim, M. (2009). Determination of ciprofloxacin residue in fish/ shellfish tissues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standard dilution technique. *Chinese Journal of Chromatography*, *1*, 39-43.
- Commission Regulation (EU). (2009). No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. . *Official Journal of the European Union.*, *15*, 1-76.
- Dzantiev, B. B., Byzova, N. A., Urusov, A. E. and Zherdev, A. V. (2014). Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *55*, 81-93.
- Edelman, G. M. (1973). Antibody structure and molecular immunology. *Science*, *180*(88), 830-840.

- Gan, S. D. and Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3.
- Gorla, N., Chiostrì, E., Ugnia, L., Weyers, A. and Giacomelli, N. (2010). HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8, 253–256.
- Hofstetter, O., Hofstetter, H., Then, D., Schuring, V. and Green, B. S. (1997). Direct binding of low molecular weight haptens to ELISA plates. *Journal of Immunological Methods*, 210, 89-92.
- Holtzapple, C. K., Buckley, S. A. and Stanker, L. H. (2001). Determination of fluoroquinolone in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 754, 1-9.
- Hu, K., Huang, X., Jiang, Y., Fang, W. and Yang, X. (2010). Monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fishery products. *Aquaculture*, 310(1-2), 8-12.
- Huang, B., Yin, Y., Lu, L., Ding, H., Wang, L., Yu, T., . . . Zhang, Y. Z. (2010). Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 11(10), 812-818.
- Krebber, R., Hoffend, A. and Ruttman, F. (2009). Simple and rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in edible tissues by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC-MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, 637, 208-213.
- Kuang, H., Wang, W., Xu, L., Ma, W., Liu, L., Wang, L. and Xu, C. (2013). Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(4), 1598-1608.
- Lakshmipriya, T., Gopinath, S. C. B. and Tang, T. H. (2016). Biotin-Streptavidin Competition Mediates Sensitive Detection of Biomolecules in Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Public Library of Science*, 11(3).

- Le, T., Yu, H., Guo, Y., Ngom, B., Shen, Y. and Bi, D. (2009). Development of an indirect competitive ELISA for the detection of doxycycline residue in animal edible tissues. *Food and Agricultural Immunology*, 20, 111-124.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. and Myrtek, D. (2006). Immunology. *Massachusetts: Elsevier*.
- Maisa, M., Nashwa, M. and Atti., A. (2011). Ciprofloxacin drug residues in table eggs. *Suez Canal Veterinary Medicine Journal*, 11(2), 137-149.
- Nisonoff, A., Hooper, J. E. and Spring, S. B. (1975). The antibody molecule. . New York: Academic Press.
- Piñero, M., Garrido-Delgado, R., Bauza, R., Arce, L. and Valcárcel, M. (2012). Easy sample treatment for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in raw bovine milk by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 33, 2978-2986.
- Potamia, M. T. and Calokerinos, A. C. (2013). Applications of Sensitized Fluorescence in Chemiluminescence: A Review. *Analytical Letters*, 46(17), 2657-2672.
- Said, A., El-Nabtity, S., Mobarez, E. and Abdel-Hafeez, M. (2015). Residues of Ciprofloxacin in Rabbit Tissues by HPLC. *Zagazig Veterinary Journal*, 43, 28-36.
- Schaefer, C. (1996). Pregnancy outcome after prenatal quinolone exposure: evaluation of a case registry of the European Network of Teratology Information Services (ENTIS). *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 69, 83-89.
- Singh, A., Chaudhary, S., Agarwal, A. and Verma, A. S. (2014). Chapter 15 - Antibodies: monoclonal and polyclonal. In: Singh ASV, editor. *Animal Biotechnology*. San Diego; Academic Press, 265-287.
- Wild, D. (2001). *The Immunoassay Handbook* (2nd ed.). The United Kingdom: Nature Publishing Group.
- Wongtangprasert, T. (2012). *Development of enzyme-linked immunosorbent and immunochromatographic assays for detection of oxytetracycline residues*. Doctoral dissertation Chulalongkorn University, Bangkok.

- Yuan, Z., Duan, J., Fan, S. and Kong, K. (2010). Comparison of an ELISA and a HPLC for Determination of Ciprofloxacin Residues in Pork. *Food and Agricultural Immunology*, 13(3), 199-204.
- Zhang, H. T., Jiang, J. Q., Wang, Z. L., Chang, X. Y., Liu, X. Y., Wang, S. H., . . . Chen, J. S. (2011). Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 12(11), 884-891.
- Zhang, Y., Gao, A. H., Liu, B., Sheng, W., Tan, C., Yuan, M. and Wang, S. (2013). A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of anilofos residues in agricultural products and environmental samples. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 48(1), 1-8.
- Zhang, Y., Lu, S., Liu, 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 Agricultural and Food Chemistry*, 55, 211-218.
- Zhao, S., Zhao, H., Zhu, H., Li, C., Lu, X. and Bi, S. (2014). Determination of norfloxacin and ciprofloxacin in chicken meat based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chemistry*, 7, 1-5.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษาค้นคว้าเพื่อใช้ในการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพมหานคร.
- ภาณุภูมิ นันทินิตย์วรกุล. (2554). การผลิตและการหาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อซีโพรฟลอกซาซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.
- อภัย ราชภูริวิจิตร. (2560). ซีโพรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin). Retrieved from <http://haamor.com/th/%E0%B9%84%E0%B8%8B%E0%B9%82%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%9F%E0%B8%A5%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%8B%E0%B8%B2%E0%B8%8B%E0%B8%B4%E0%B8%99/>

ภาคผนวก

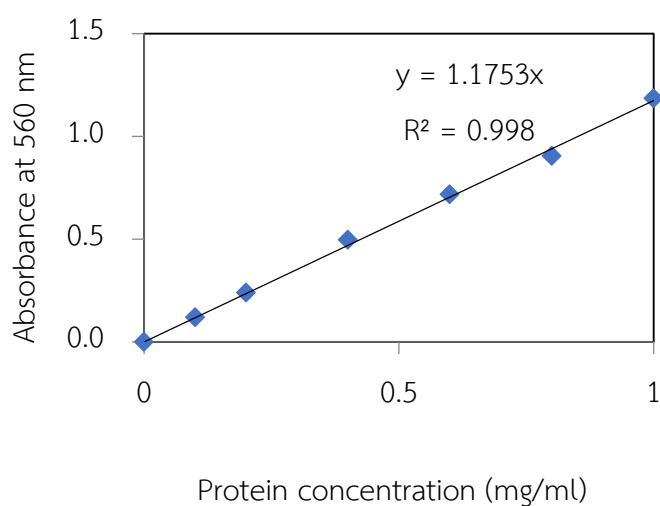


ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay

ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPF-X-OVA

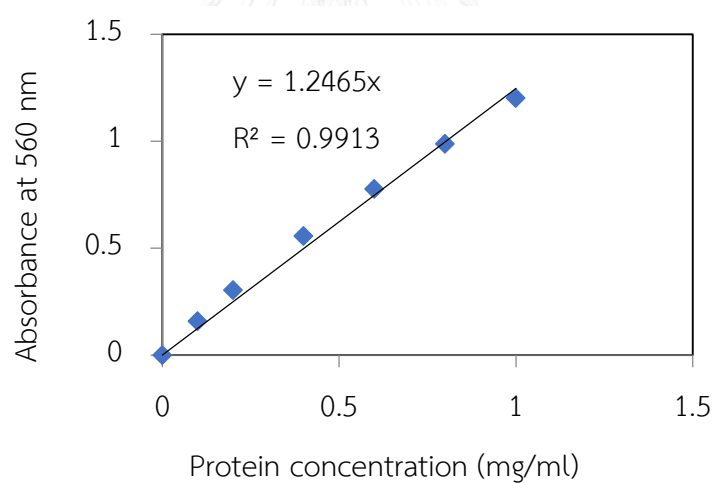
ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0.0000
0.1	0.1194
0.2	0.2396
0.4	0.4969
0.6	0.7174
0.8	0.9044
1	1.1849



รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPF-X-OVA

ตารางที่ ก. 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPFX-HRP

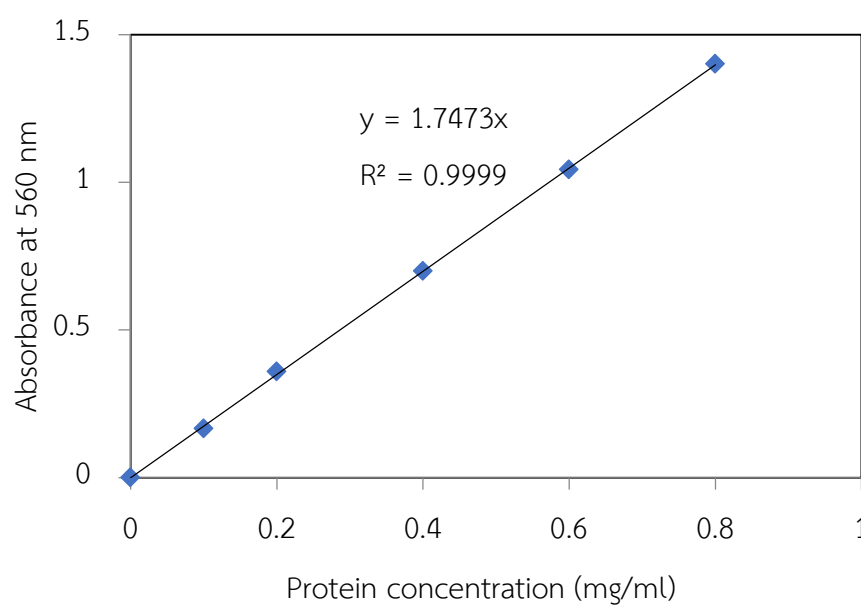
ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0.1147
0.1	0.2746
0.2	0.4185
0.4	0.6629
0.6	0.8893
0.8	1.1025
1	1.3114



รูปที่ ก. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ CPFX-HRP

ตารางที่ ก. 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย IgG มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb

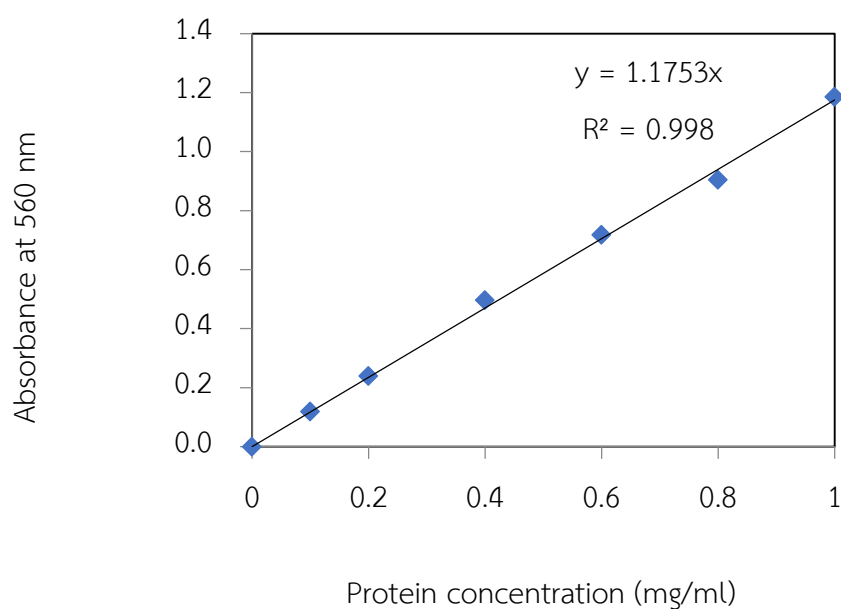
ความเข้มข้นของสารละลาย IgG มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0
0.1	0.1661
0.2	0.3588
0.4	0.6998
0.6	1.0432
0.8	1.4001



รูปที่ ก. 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย IgG ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb

ตารางที่ ก. 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
0	0.0000
0.1	0.1194
0.2	0.2396
0.4	0.4969
0.6	0.7174
0.8	0.9044
1	1.1849



รูปที่ ก. 4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ MAb-biotin

ตารางที่ ก. 5 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดย dcELISA (intra assay)

Spike (ng/g)	หลอด ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV	Spike (ng/g)	หลอด ที่	Measure (ng/g)	%RV	%CV	Spike (ng/g)	หลอด ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV
5.0	1	4.8	96	5.0	10.0	1	8.7	87	4.0	20.0	1	20.9	105	4.8
5.0	2	4.4	89	0.7	10.0	2	9.3	92	13.6	20.0	2	21.1	105	5.0
5.0	3	3.9	78	4.5	10.0	3	9.5	95	9.5	20.0	3	18.7	94	6.8
5.0	4	4.5	91	1.4	10.0	4	9.8	98	7.3	20.0	4	18.0	90	5.9
5.0	5	4.6	92	7.2	10.0	5	7.9	79	5.7	20.0	5	22.6	113	5.8
5.0	6	3.9	77	2.0	10.0	6	9.1	91	6.5	20.0	6	21.4	107	1.4
5.0	7	4.0	79	4.0	10.0	7	7.7	79	4.5	20.0	7	18.0	90	5.9
5.0	8	4.4	87	3.7	10.0	8	9.5	95	5.7	20.0	8	19.2	96	6.1
	μ	4.3	86	3.6		μ	8.9	89	7.1		μ	20.0	100	5.2
	SD	0.4	7	2.1		SD	0.8	8	3.1		SD	1.7	9	1.7

ตารางที่ ก. 6 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อหมูโดย dcELISA (inter assay)

Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		%RV	%CV	Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		%RV	%CV	Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		%RV	%CV	Spike (ng/g)	
		%RV	%CV					%RV	%CV					%RV	%CV				
5.0	1	4.9	98	18.5	10.0	8.4	84	12.6	20.0	1	18.0	90	6.3	40.0	1	37.3	93	9.5	5.0
5.0	2	4.2	83	15.4	10.0	8.3	83	17.8	20.0	2	16.1	80	7.4	40.0	2	43.0	107	5.6	5.0
5.0	3	4.3	87	11.6	10.0	8.1	81	17.3	20.0	3	17.7	88	10.8	40.0	3	40.5	101	7.9	5.0
5.0	4	4.8	96	17.7	10.0	8.4	84	17.9	20.0	4	16.0	80	6.4	40.0	4	44.1	110	8.2	5.0
5.0	5	5.1	102	19.3	10.0	8.7	87	7.8	20.0	5	17.3	86	12.7	40.0	5	36.0	90	13.1	5.0
5.0	6	4.1	82	12.2	10.0	8.0	80	8.3	20.0	6	16.3	82	2.5	40.0	6	35.7	89	10.4	5.0
5.0	7	5.5	109	14.5	10.0	8.0	80	5.6	20.0	7	18.4	92	9.6	40.0	7	41.1	103	6.5	5.0
5.0	8	5.3	105	14.3	10.0	8.4	84	13.9	20.0	8	16.2	81	15.8	40.0	8	46.9	117	17.9	5.0
	μ	4.8	95	15.4		8.3	83	12.6		μ	17.0	85	8.9		μ	40.6	101	9.9	
	SD	0.5	10	2.9		0.2	2	4.9		SD	0.9	5	4.2		SD	4.0	10	4.0	

ตารางที่ ก. 7 ผลการตรวจสอบ CPFX ในตัวอย่างเนื้อกุ้งโดย dcELISA (intra assay)

Spike (ng/g) ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV	Spike (ng/g) ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV	Spike (ng/g) ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV	Spike (ng/g) ที่	*Measure (ng/g)	%RV	%CV
5.0 1	4.4	88	5.0	10.0 1	11.4	114	4.0	20.0 1	21.4	107	4.8	40.0 1	36.6	91	10.1
5.0 2	4.6	93	0.7	10.0 2	11.9	119	13.6	20.0 2	19.0	95	5.0	40.0 2	45.5	114	8.3
5.0 3	4.5	91	4.5	10.0 3	11.3	113	9.5	20.0 3	16.7	83	6.8	40.0 3	41.8	105	8.4
5.0 4	4.0	81	1.4	10.0 4	11.9	119	7.3	20.0 4	21.6	108	5.9	40.0 4	44.5	111	15.4
5.0 5	4.3	85	7.2	10.0 5	10.7	107	5.7	20.0 5	17.3	86	5.8	40.0 5	36.1	90	10.6
5.0 6	3.8	77	1.9	10.0 6	11.0	110	6.5	20.0 6	22.5	113	1.4	40.0 6	44.7	112	6.5
5.0 7	4.1	82	4.1	10.0 7	10.7	107	4.5	20.0 7	20.8	104	5.9	40.0 7	43.7	109	8.6
5.0 8	4.6	92	3.7	10.0 8	9.5	95	5.7	20.0 8	22.8	114	6.1	40.0 8	43.7	109	0.4
μ	4.3	86	3.6	μ	11.0	110	7.1	μ	20.3	101	5.2	μ	42.1	105	8.5
SD	0.3	6	2.1	SD	0.8	8	3.1	SD	2.3	12	1.7	SD	3.7	9	4.2

ตารางที่ ก. 8 ผลการตรวจสอบ CPIX ในตัวอย่างเนื้อกุ้งโดย dcELISA (inter assay)

Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		Spike (ng/g)	ครั้งที่	*Measure (ng/g)		%RV	%CV	%RV	%CV
		ที่	ที่			ที่	ที่			ที่	ที่				
5.0	1	4.7	9.0	10.0	1	9.0	16.7	20.0	1	16.7	83	9.2	87	9.4	
5.0	2	4.2	10.3	10.0	2	10.3	16.0	20.0	2	16.0	80	12.6	96	12.5	
5.0	3	4.8	8.7	10.0	3	8.7	14.9	20.0	3	14.9	74	8.4	90	11.7	
5.0	4	5.4	9.4	10.0	4	9.4	17.6	20.0	4	17.6	88	4.2	80	9.6	
5.0	5	4.0	7.4	10.0	5	7.4	19.4	20.0	5	19.4	97	7.2	99	8.7	
5.0	6	5.7	10.2	10.0	6	10.2	17.3	20.0	6	17.3	87	8.4	92	8.7	
5.0	7	4.9	8.3	10.0	7	8.3	16.3	20.0	7	16.3	82	16.1	87	9.4	
5.0	8	4.6	8.6	10.0	8	8.6	16.7	20.0	8	16.7	84	19.6	89	7.0	
μ		4.8	9.0		μ	9.0	16.9		μ	16.9	84	10.7	90	9.6	
SD		0.6	1.0		SD	1.0	1.3		SD	1.3	7	5.1	6	1.7	

ตารางที่ ก. 10 ผลการตรวจสอบ CPMX ในตัวอย่างน้ำดื่มโดย dcELISA (inter assay)

Spike (ng/ml)	ครั้งที่	*Measure (ng/ml)	%RV	%CV	Spike (ng/ml)	ครั้งที่	Measure (ng/ml)	%RV	%CV	Spike (ng/ml)	ครั้งที่	*Measure (ng/ml)	%RV	%CV	Spike (ng/ml)	ครั้งที่	*Measure (ng/ml)	%RV	%CV
5.0	1	5.5	110	6.9	10.0	1	12.0	120	13.7	20.0	1	22.4	112	4.3	40.0	1	41.0	102	6.8
5.0	2	5.4	109	4.1	10.0	2	11.5	115	12.2	20.0	2	19.9	99	4.0	40.0	2	38.0	95	4.0
5.0	3	5.1	101	5.7	10.0	3	9.3	93	9.5	20.0	3	17.0	85	3.9	40.0	3	44.2	110	4.0
5.0	4	4.6	93	7.3	10.0	4	10.6	106	6.2	20.0	4	20.1	100	13.7	40.0	4	37.8	95	8.5
5.0	5	3.6	72	2.2	10.0	5	9.6	96	11.6	20.0	5	19.5	98	8.1	40.0	5	33.5	84	6.2
5.0	6	5.7	115	10.4	10.0	6	11.3	113	2.8	20.0	6	22.9	114	6.6	40.0	6	39.5	99	6.7
5.0	7	5.1	102	11.1	10.0	7	10.9	109	9.2	20.0	7	21.8	109	3.5	40.0	7	35.3	88	7.7
5.0	8	4.9	97	7.3	10.0	8	10.3	103	9.6	20.0	8	18.8	94	8.9	40.0	8	35.3	88	5.6
5.0	μ	5.0	100	6.9		μ	10.7	107	9.3		μ	20.3	101	6.6		μ	38.1	95	6.2
	SD	0.7	13	3.0		SD	0.9	9	3.5		SD	2.0	10	3.5		SD	3.5	9	1.6

ตารางที่ ก. 11 การหาอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFX กับ OVA

สารประกอบ	มวลโมเลกุล	ความเข้มข้น		A 271 nm	Molar Absorbility	Hapten density
		mg/ml	M			
CPFEX	331.341	0.00625	1.8863×10^{-5}	0.9646	51,137.84	-
OVA	45,000	2	4.4444×10^{-5}	0.7707	17,340.75	-
CPFEX-OVA	45,331.341	0.2	0.4412×10^{-5}	0.5091	115,390.9	1.92

การคำนวณหา Hapten density ตาม (Le และ คณະ, 2009) ดังนี้

จากสูตร Hapten density = $\frac{\epsilon_{\text{conjugate}} - \epsilon_{\text{protein}}}{\epsilon_{\text{hapten}}}$ โดย Beer-Lambert law: $\epsilon = \frac{A}{c \cdot l}$

เมื่อหา Hapten density = $\frac{115,390.9 - 17,340.75}{51,137.84} = 1.92$

ดังนั้นอัตราส่วนการเชื่อมตติระหว่าง CPFEX-OVA โดยวิธี UV-Vis spectroscopy method (Le และ คณະ, 2009) พบว่าอัตราส่วนการเชื่อมต่อระหว่าง CPFEX กับ OVA เท่ากับ 1.92:1 นั้น หมายถึง OVA 1 โมเลกุล มี CPFEX ประมาณ 2 โมเลกุล

ตารางที่ ก. 12 แสดงค่าความเข้มข้นของเมทานอลมีผลต่อระบบ ELISA (dcELISA)

ความเข้มข้นของ เมทานอลใน PBS (เปอร์เซ็นต์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm หลังจากทำ dcELISA			เฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
0	1.0283	0.9928	1.0382	1.0198
0.125	0.9982	1.0381	1.016	1.0174
0.25	0.9937	1.1039	1.093	1.0635
5	0.9881	0.9928	1.083	1.0213
10	0.9492	0.9432	0.9321	0.9415
15	0.9327	0.9272	0.9028	0.9209
20	0.8427	0.8572	0.8452	0.8484
25	0.7635	0.8163	0.771	0.7836
30	0.6729	0.7453	0.6732	0.6971
35	0.6241	0.5952	0.6173	0.6122
40	0.4726	0.5625	0.5153	0.5168
45	0.3721	0.4524	0.4425	0.4223
50	0.4015	0.3872	0.3726	0.3871
55	0.3562	0.3284	0.2952	0.3266
60	0.2982	0.2872	0.2672	0.2842
65	0.1736	0.1873	0.1783	0.1797
70	0.2039	0.1717	0.1229	0.1662
75	0.1936	0.1546	0.1562	0.1681
80	0.1213	0.0927	0.1103	0.1081
85	0.1062	0.072	0.0672	0.0818
90	0.0664	0.0457	0.1352	0.0824
95	0.0573	0.0452	0.0634	0.0553
100	0.0752	0.0637	0.0727	0.0705

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

ซัง	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 แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แบ่งใส่ขวดแก้วปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (Freezing medium)

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ใน

น้ำแข็ง)

4) 1N HCl		
Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในวิธี ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 (PB stock)			
NaH ₂ PO ₄	27.60	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
Na ₂ HPO ₄	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
ไตเตรท Na ₂ HPO ₄ ด้วย NaH ₂ PO ₄ จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock			
2) 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4			
PB stock	1		ลิตร
NaCl	175		กรัม
น้ำกลั่น	18		ลิตร
3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)			

	Tween 20	500	ไมโครลิตร
	PBS	1000	มิลลิลิตร
4)	5% นมพร่องมันเนย (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)		
	นมพร่องมันเนย	5	กรัม
	PBS	100	มิลลิลิตร
5)	0.2 M Citrate buffer pH 4.0		
	Potassium citrate	33.2	กรัม
	Citric acid	21.54	กรัม
	ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
	ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้ได้ pH 4.0		
6)	Substrate solution		
	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB)	3.0	มิลลิลิตรกรัม
	DMSO	300	มิลลิลิตร
	0.2 M Citrate buffer	10	มิลลิลิตร
	30% H ₂ O ₂	3.4	ไมโครลิตร
	ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)		
7)	1 M H ₂ SO ₄ (Stopping reagent)		
	H ₂ SO ₄ (96%)	98	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร
	ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน		

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องขณะเทกรด เนื่องจากจะเกิดความร้อน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรพรรณ เสียงเกษม เกิดเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทาง การเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2555 และเข้า ศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 และได้นำเสนอผลงานเรื่อง ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR CIPROFLOXACIN RESIDUE DETECTION IN FOOD PRODUCTS ในการนำเสนอ ผลงานวิจัยระดับนานาชาติในระดับบัณฑิตศึกษา ในงาน Food Innovation Asia Conferences 2017 ที่ ไบเทคบางนา กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 15-17 มิถุนายน 2560 ได้รับรางวัลรอง ชนะเลิศอันดับ 1 เสนอผลงานโปสเตอร์

