

การพัฒนาแบบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว



นางสาววิภาทรา วงศ์พยัคฆ์

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 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF TEST STRIP FOR BOVINE CASEIN DETECTION

Miss Wipatthra Wongphayak



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 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว
โดย	นางสาววิภัตรา วงศ์พยัคฆ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นัตยา งามโรจนวิชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.รัฐพล เฉลิมโรจน์)

วิภัทรา วงศ์พยัคฆ์ : การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว (DEVELOPMENT OF TEST STRIP FOR BOVINE CASEIN DETECTION) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ธนา ภัทร ปาลกะ, 106 หน้า.

น้ำนมวัวเป็นแหล่งโภชนาการที่สำคัญของมนุษย์ ประกอบไปด้วย โปรตีน วิตามิน แร่ธาตุ และแคลเซียม อย่างไรก็ตามเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่อยู่ในน้ำนมวัวนั้น ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้บริโภค บางรายได้ ซึ่งมีอาการตั้งแต่เบาจนถึงหนัก เช่น หายใจไม่ออก อาเจียน เป็นลมพิษ หรือตาย เป็นต้น ดังนั้นในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำนมวัว จะต้องมีการระบุแจ้งบนฉลากตามที่กฎหมายได้กำหนดไว้ แต่ในอาหารหลายชนิดไม่มีการระบุดังกล่าว ดังนั้นวิธีตรวจเคซีนอย่างง่ายสำหรับผู้บริโภคที่แพ้ ต่อเคซีนจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจด้วยอิมมูโนวิทยา แบบ การไหลในแนวระนาบ (lateral flow immunoassay) ในรูปแบบแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัด เคซีนจากวัว โดยในการเตรียมแถบทดสอบจะใช้วิธีการเติมสารต่างๆ ลงบนแถบทดสอบ 2 วิธีคือ การ หยดสารละลายลงบนขอบกระจกสไลด์แล้วประทับลงบนเมมเบรน และการจ่ายสารละลายด้วย เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบอัตโนมัติ จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบโดยใช้ วิธีการประทับด้วยกระจกสไลด์ในการเติมสารนั้น พบว่า ต้องตรึงเคซีนที่เส้นทดสอบและตรึง IgG-Fc ที่เส้นควบคุมด้วยความเข้มข้น 1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าตัดออก (cut-off value) อยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าความเข้มข้นของสีที่ปรากฏบนแถบทดสอบมีความไม่แน่นอน ในการหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบโดยใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลาย แบบอัตโนมัติในการเติมสาร พบว่าต้องใช้ เคซีน 0.2 ไมโครกรัม และ IgG-Fc 0.0125 ไมโครกรัม ตามลำดับ และใช้อนุภาคทองระดับนาโนที่ติดกับแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เติมลงบนส่วนแผ่นคอนจูเกต โดยมีค่าตัดออกอยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความ เข้มของสีที่ปรากฏบนแถบทดสอบมีความแน่นอนมากกว่าวิธีแรก เมื่อนำแถบทดสอบที่เตรียมได้ไป ตรวจหาเคซีนจากวัวที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมควาย น้ำนมแพะ และน้ำนมถั่วเหลือง พบว่ามีค่าตัด ออกอยู่ที่ 22.5, 9 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สามารถ นำแถบทดสอบไปใช้ตรวจในตัวอย่าง นมควาย นมแพะ และนมถั่วเหลือง ที่มีการปนเปื้อนเคซีนของ นมวัวได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5872054923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CASEIN / IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY / TEST STRIP

WIPATTHRA WONGPHAYAK: DEVELOPMENT OF TEST STRIP FOR BOVINE CASEIN DETECTION. ADVISOR: ASSOC. PROF.KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.TANAPAT PALAGA, Ph.D., 106 pp.

Milk is an excellent nutritional source for human since it contains proteins, vitamins, minerals and calcium. However, casein, the major cow milk protein, causes allergy in some consumers. Allergic symptoms range from mild to severe for example wheezing, vomiting, hives and death. Consequently, foods containing cow milk must be labeled to inform the consumer as mandated by law. However, in many cases, this label is not available for many foods. Therefore, simple casein detection method for those who are allergic to caseins is essential. In this work, the objective was to develop lateral flow immunoassay (LFIA) in the form of test strip to detect bovine casein. To prepare a test strip, solutions were applied onto the membrane by two methods. In the first method, a solution was dropped on the edge of a glass slide which was stamped on the assigned area of the membrane. In the second method, solutions were applied onto the membrane by an automatic solution dispenser. For the first method, the optimized concentration of casein for test line and goat anti mouse IgG for control line immobilization was found to be 1.0 mg ml^{-1} and 0.25 mg ml^{-1} , respectively. The gold nanoparticle-antibody conjugate at $300 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ was loaded in the conjugate pad. The cut-off value was $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ for casein detection. However, color intensity of the test strip was inconsistency. For the second method, the optimal concentration of casein and IgG was found to be $0.2 \text{ } \mu\text{g}$ and $0.0125 \text{ } \mu\text{g}$, respectively. The cut-off value was also found at $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, and the color intensity of the strips prepared by the dispenser was more consistent than that of the strips prepared by the first method. The developed test strips were used to detect bovine casein spiked in buffalo milk, goat milk and soybean milk. The cut-off value of casein in buffalo milk, goat milk and soybean milk were found at 22.5, 9 and 15 mg ml^{-1} , respectively. From all results, it could be concluded that the developed test strips could be used to detect cow caseins in soy milk, goat milk and buffalo milk.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต และดร. รัฐพล เฉลิมโรจน์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณทรงจันทร์ ภูทอง คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ คุณอนุมาศ บัวเขียว และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอด ตั้งแต่เริ่มทำงานวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยบางส่วนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา มาโดยตลอด จนผู้วิจัยประสบความสำเร็จเช่นในวันนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 นมวัว และส่วนประกอบของนมวัว	4
2.1.2 เคซีนในนมวัว	5
2.1.2.1 โครงสร้างของเคซีน	5
2.1.3 การแพ้เคซีนในนมวัว	7
2.1.4 วิธีตรวจวิเคราะห์เคซีน	8
2.1.4.1 Ion exchange chromatography	8
2.1.4.2 Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).....	8
2.1.4.4 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	9
2.1.5 แอนติเจน (antigen)	10

2.1.6 แอนติบอดี.....	11
2.1.7 หลักการของแถบทดสอบ รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (lateral flow immunochromatographic Assay: LFIA)	16
2.1.7.1 ส่วนประกอบแถบทดสอบ	16
2.1.7.2 รูปแบบของแถบทดสอบ.....	17
2.1.7.2.1 รูปแบบแข่งขัน (competitive assay format).....	17
2.1.7.2.2 รูปแบบแซนวิช (sandwich assay format).....	20
2.1.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจด้วยแถบทดสอบ	22
2.1.8 อนุภาคทอง (gold particle).....	22
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	28
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	30
3.4.1 การตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	30
3.4.2 การตรวจการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น	30
3.4.3 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร.....	31
3.4.3.1 การหาความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ.....	31
3.4.3.2 การเชื่อมมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ	32
3.4.4 การเตรียมแถบทดสอบ LFIA	32
3.4.4.1 การเตรียม sample pad และ absorbent pad.....	33
3.4.4.2 การเตรียม conjugate pad.....	33

3.4.4.3 การเตรียม analytical membrane	34
3.4.4.4 การเตรียม plastic backing card	34
3.4.4.5 การประกอบแถบทดสอบ	34
3.4.5 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีน	35
3.4.5.1 ศึกษาผลของบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรน	35
3.4.5.2 หาภาวะที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad	36
3.4.5.3 หาภาวะที่เหมาะสมของการเตรียม T-line และ C-line	36
3.4.5.3.1 หาภาวะที่เหมาะสมของเคซีนที่ T-line	36
3.4.5.3.2 หาภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line	36
3.4.6 การประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบในการตรวจวัดเคซีน	36
3.4.7 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีนด้วยเครื่องจ่ายสารละลาย (เครื่องฉีด แถบทดสอบ Biodot รุ่น XYZ 3000)	37
3.4.7.1 หาภาวะที่เหมาะสมของเคซีนที่ T-line และภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line	37
3.4.7.2 การหาค่าคัดออก	37
3.4.7.3 การประเมินการใช้แถบทดสอบเคซีน ตรวจสอบการปลอมปนของเคซีนนม วัวกับตัวอย่างนมอื่นๆ	37
3.4.7.3.1 ศึกษาผลของเมทริกซ์ (matrix effect) ในตัวอย่างนมอื่นๆ	37
3.4.7.3.2 การหาค่าคัดออก	38
3.4.7.3.3 การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนาย ผลบวก และค่าทำนายผลลบ	38
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
4.1 การตรวจวัดระดับมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	40

4.2 การตรวจการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น	41
4.3 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร.....	43
4.3.1 การหาความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ.....	43
4.3.2 การเชื่อมมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ.....	44
4.4 การเตรียมแถบทดสอบ lateral flow immunochromatographic Assay (LFIA)	45
4.4.1 การศึกษาผลของบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรน โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์.....	45
4.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของเคซีนที่ T-line โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์.....	48
4.4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad	49
4.4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์.....	50
4.4.5 การหาค่าคัดออก (cut-off value).....	51
4.4.6 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีน ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Biodot รุ่น XYZ 3000).....	52
4.4.6.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเคซีนที่ T-line ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ.....	53
4.4.6.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ IgG-Fc ที่ C-line ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ.....	54
4.4.6.3 การหาค่าคัดออกของแถบทดสอบที่ทำด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ.....	55
4.5 การประเมินการใช้แถบทดสอบเคซีน ตรวจสอบการปลอมปนของเคซีนนมวัวกับตัวอย่างนมอื่นๆ.....	56

4.5.1 การศึกษาผลของเมทริกซ์ (matrix effect) ในตัวอย่างนมอื่นๆ	56
4.5.2 การหาคัดออกของแถบทดสอบในตัวอย่างนม.....	59
4.5.3 การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในการตรวจด้วยแถบทดสอบ	62
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	66
รายการอ้างอิง	69
ภาคผนวก ก.....	75
ภาคผนวก ข.....	102
ภาคผนวก ค.....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	106



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติของ PAb และ MAb	15
ตารางที่ 3.1	ดัชนีที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบ	39
ตารางที่ 4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อสารอื่นด้วยวิธี indirect competitive ELISA	43
ตารางที่ 4.2	แสดงปริมาณการปนเปื้อนของนมวัวที่น้อยที่สุดในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ที่แถบทดสอบสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้	61
ตารางที่ 4.3	การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ	65
ตารางที่ ก.1	การวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อหาระดับปฏิกิริยาการตอบสนองของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีน	75
ตารางที่ ก.2	การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมวัว ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	76
ตารางที่ ก.3	การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมกระป๋อง ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	77
ตารางที่ ก.4	การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมแพะ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	78
ตารางที่ ก.5	การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร ที่ค่าดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร	79
ตารางที่ ก.6	แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมกระป๋องในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบทดสอบ	90
ตารางที่ ก.7	แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมแพะในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบทดสอบ	94
ตารางที่ ก.8	แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมถั่วเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบทดสอบ	98

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Waugh และ Nobel.....	6
ภาพที่ 2.2 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Morr.....	6
ภาพที่ 2.3 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Holt.....	7
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของแอนติบอดี.....	12
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ IgG, IgA, IgD, IgE และ IgM	14
ภาพที่ 2.6 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี	15
ภาพที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ	17
ภาพที่ 2.8 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน: (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบ (ข) หลักการทำงาน และ (ค) การแปรผลแถบทดสอบ	19
ภาพที่ 2.9 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแซนวิท: (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบ (ข) หลักการทำงาน และ (ค) การแปรผลแถบทดสอบ	21
ภาพที่ 2.10 การสังเคราะห์อนุภาคทอง.....	23
ภาพที่ 2.11 วิธีการเชื่อมติดอนุภาคทองกับแอนติบอดี (ก) Ionic attraction (ข) Hydrophobic attraction (ค) Dative binding	24
ภาพที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ (1) Sample pad (2) Conjugate pad (3) Analytical membrane (4) Absorbent pad (5) Plastic backing card.....	33
ภาพที่ 3.2 แถบทดสอบที่ประกอบเสร็จแล้วในถלבพลาสติก	34
ภาพที่ 3.3 การตรึง C-line และ T-line บน Analytical membrane ด้วยกระดาษไลต์.....	35
ภาพที่ 4.1 ระดับปฏิกิริยาการตอบสนองของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (CN1F4) ต่อเคซีน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วยเคซีนความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีทุติยภูมิ (GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราการจัดจาง 1:10,000 40	
ภาพที่ 4.2 ค่า IC ₅₀ จากการใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 5: (ก) เคซีนในนมวัว (ข) เคซีนในนมกระป๋อง และ (ค) เคซีนในนมแพะ	42

ภาพที่ 4.3	ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร.....	44
ภาพที่ 4.4	โครมาโตแกรมของสารละลายอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร (—) และมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร(—).....	45
ภาพที่ 4.5	ตัวอย่างการทดสอบเคซินที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ด้วยแถบทดสอบที่ใช้เมมเบรนวิเคราะห์ชนิดต่างๆ	46
ภาพที่ 4.6	ตัวอย่างการทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการเคลือบเมมเบรน ด้วย 1% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT เคลือบเมมเบรนก่อน และเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรน และไม่เคลือบเมมเบรน.....	48
ภาพที่ 4.7	ตัวอย่างการทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการตรึงเคซินด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์	49
ภาพที่ 4.8	ตัวอย่างการทดสอบระดับค่าการเจือจางต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad ด้วยแถบทดสอบ	50
ภาพที่ 4.9	ตัวอย่างการทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ทำการตรึง IgG-Fc ด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์.....	51
ภาพที่ 4.10	ตัวอย่างการทดสอบเคซินที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์.....	52
ภาพที่ 4.11	การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการตรึงปริมาณเคซินที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ	54
ภาพที่ 4.12	การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการตรึงปริมาณ IgG-Fc ที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ	55
ภาพที่ 4.13	ตัวอย่างการทดสอบเคซินที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ.....	56
ภาพที่ 4.14	การทดสอบการรบกวนของเมทริกซ์ในตัวอย่างต่างๆ ที่ค่าการเจือจางแตกต่างกันด้วยแถบทดสอบ: (ก) นมกระป๋อง (ข) นมแพะ และ (ค) นมถั่วเหลือง.....	58

ภาพที่ 4.15 ตัวอย่างการทดสอบเคซินที่ละลายด้วยตัวอย่างนมในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก: (ก) นมกระป๋อง (ข) นมแพะ และ (ค) นมถั่วเหลือง 60

ภาพที่ ก.1 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ด้วยแถบทดสอบที่ใช้เมมเบรนวิเคราะห์ชนิดต่างๆ..... 80

ภาพที่ ก.2 การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT เคลือบเมมเบรนก่อน และเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรน และไม่เคลือบเมมเบรน..... 81

ภาพที่ ก.3 การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการตรึงเคซินด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์ 82

ภาพที่ ก.4 การทดสอบระดับค่าการเจือจางต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad ด้วยแถบทดสอบ..... 83

ภาพที่ ก.5 การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ทำการตรึง IgG-Fc ด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์..... 84

ภาพที่ ก.6 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์ 85

ภาพที่ ก.7 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ 86

ภาพที่ ก.8 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยนมกระป๋องในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก..... 87

ภาพที่ ก.9 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยนมแพะในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก..... 88

ภาพที่ ก.10 การทดสอบเคซินที่ละลายด้วยนมถั่วเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก 89

ภาพที่ ค.1 ใบรับรองการวิเคราะห์อนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร 104

ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร..... 105

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นมวัวเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่สมบูรณ์ และมีกรดอะมิโนที่จำเป็น ลักษณะของนมวัวนั้น จะเป็นของเหลวสีขาวประกอบไปด้วย น้ำ แลคโตส ไขมัน โปรตีน และสารอนินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้นมวัวมาเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารหลายๆ ประเภท ทั้งของคาวและของหวาน แต่ทว่าการบริโภคนมวัวนั้น อาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการแพ้นมวัว ซึ่งหากมีอาการแพ้อย่างรุนแรงจะส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตได้ ดังนั้นบนฉลากอาหารส่วนใหญ่จึงมีการระบุว่าอาหารชนิดใดมีส่วนประกอบของนมวัว หรือองค์ประกอบของนมวัวเป็นส่วนผสม ทั้งนี้โปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้นมวัว คือ เคซีน (casein) (ประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด) ซึ่งประกอบไปด้วยชนิด แอลฟาเอส1 (αS_1) แอลฟาเอส2 (αS_2) บีตา (β) และแคปปา (κ) ในอัตราส่วน 32%, 10%, 28% และ 10% ตามลำดับ [1] ปกติเคซีนจะรวมตัวกันอยู่ในรูปของไมเซลล์ กระจายเป็นแบบคอลลอยด์ในนม ภายในไมเซลล์ประกอบไปด้วยแคลเซียมฟอสเฟต และโปรตีนอื่นๆ [2] ในเคซีนทั้ง 4 ชนิด แอลฟาเอสเคซีน จะประกอบไปด้วยหมู่ฟอสเฟตมากที่สุด แอลฟาเอส1 มี 8 - 10 หมู่ฟอสเฟต และแอลฟาเอส 2 มี 10 - 13 หมู่ฟอสเฟต ส่วนในบีตาเคซีนจะมีหมู่ฟอสเฟต 5 หมู่ และในแคปปาเคซีนมีหมู่ฟอสเฟตเพียงหมู่เดียว ซึ่งส่งผลให้เคซีนสามารถทำปฏิกิริยากับเกลือแคลเซียม ก่อให้เกิดเป็นตะกอน นอกจากนี้เคซีนยังไม่ไวต่อความร้อน และ pH ซึ่งส่งผลต่อการละลายของเคซีนอีกด้วย [3] ทั้งนี้ในปัจจุบันการตรวจวัดเคซีนนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการใช้เครื่องมือ ion exchange chromatography แยกโปรตีนต่างๆ ในนม [4] หรือการใช้ high performance liquid chromatography-UV (HPLC-UV) ที่มีคอลัมน์ชนิด reverse phase มาวิเคราะห์หาโบไวน์แอลฟาเคซีน บีตาเคซีน แคปปาเคซีน แอลฟาแลคโตบูมิน และบีตาแลคโตบูมินในตัวอย่างนม [5] หรือใช้ mass spectrometric (MS) ในการตรวจสอบเคซีน และโปรตีนหางนมที่อาจปลอมปนมาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยตัวอย่างที่นำมาจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ก่อนจะนำไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง HPLC-MS/MS ต่อไป [6] ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ที่ได้ยกตัวอย่างมาทั้งหมดนั้นมีการใช้อุปกรณ์จำเพาะซึ่งมีราคาแพงและต้องการผู้เชี่ยวชาญในการควบคุม อุปกรณ์เครื่องมือวิเคราะห์เหล่านั้น นอกจากนี้ในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองก็มีความยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างหลายๆ ตัว จากเหตุผลข้างต้น การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยิมนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เคซีน อันถือได้ว่าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการวิเคราะห์ทดสอบในปัจจุบัน

วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน ถึงแม้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบนี้จะมีความจำเพาะสูง และสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี แต่มีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานการตรวจภาคสนาม ดังนั้นอีกหนึ่งวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน คือ immunochromatographic assay (ICA) ซึ่งมีหลักการเช่นเดียวกับ ELISA ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเยื่อเลือกผ่าน และใช้อนุภาคทองที่มีสีเป็นตัวติดฉลากยังผลให้สามารถวัดผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเทคนิคการวิเคราะห์แบบนี้สามารถตรวจวัดจำนวนตัวอย่างได้มากกว่า ในระยะเวลาที่สั้นกว่า อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อเครื่องมือที่มีราคาแพงเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้งานการตรวจภาคสนามอันเป็นประโยชน์อย่างมากต่อผู้บริโภค เนื่องจากจะช่วยลดความเสี่ยงของผู้ที่เกิดอาการแพ้ให้น้อยลง โดยเฉพาะผู้ที่มีอาการแพ้อย่างรุนแรง เพราะผู้ที่เสียชีวิตส่วนมากนี้เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีโปรตีนเคซีนเข้าไป และแพทย์รักษาไม่ทันการณ์

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีผู้พัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว หากต้องการตรวจวิเคราะห์เคซีนจากวัว ต้องทำการสั่งซื้อนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ ราคาประมาณ 600 บาทต่อหนึ่งชุดตรวจ ซึ่งเป็นราคาค่อนข้างสูง จากเหตุผลที่กล่าวมาในข้างต้นการพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัวเพื่อใช้เองภายในประเทศ จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัวสำเร็จ ยังผลให้สามารถนำมาพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัวได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว
2. ประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบในการตรวจวัดเคซีนจากวัว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ค้นคว้า ศึกษา และรวบรวมข้อมูลสำหรับการทำวิจัย
2. หาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดด้วยอนุภาคทองคำ
3. หาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ
4. ประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบในการตรวจวัดเคซีนจากวัว
5. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แถบทดสอบต้นแบบที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 นมวัว และส่วนประกอบของนมวัว

น้ำนม เป็นอาหารที่สำคัญของทารกแรกเกิด ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ซึ่งให้ทั้งพลังงาน สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย และสารที่ให้ภูมิคุ้มกันต้านเชื้อโรคแก่ทารก น้ำนมนั้นจะประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ จึงจัดว่าเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์มาก น้ำนมจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดใช้เป็นอาหารมนุษย์ หนึ่งในนั้นคือ นมวัว ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร ของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้นิยามความหมายน้ำนมโคดิบ (raw cow milk) หมายถึง น้ำนมที่ได้จากแม่โคหลังคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน ต้องไม่มีน้ำนมเหลือง (colostrum) ผ่านการแยกองค์ประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งของน้ำนมออก หรือเติมสารอื่นใด และไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น [7] ซึ่งน้ำนมนั้นมีลักษณะเป็นของเหลว ที่มีโครงสร้างเป็นอิมัลชัน (emulsion) แบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) มีไขมันนมแขวนตัวเป็นหยดน้ำมันกระจายตัวอยู่ในน้ำ มีโปรตีน เช่น เคซีน มีแลคโตส ละลายอยู่ในรูปสารละลายคอลลอยด์ (colloid solution) และมีวิตามิน กับเกลือแร่ละลายอยู่ในรูปสารละลายแท้ องค์ประกอบทางเคมีของนมวัวจะประกอบด้วย น้ำ 87.3 - 88.1% ทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้โปรตีน และไขมันนมกระจายตัวอยู่ได้ ส่งผลให้เกิดเป็นลักษณะอิมัลชัน และยังทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายแลคโตส วิตามิน รวมไปถึงเกลือแร่ในนมวัว และพบเถ้า 0.7% พบโปรตีน 3.2 - 3.4% ที่ช่วยสร้างเสริมร่างกายให้แข็งแรง พบไขมันนม 3.1 - 3.3% อันเป็นสารที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) มีวิตามินที่สามารถละลายได้ในไขมัน เช่น วิตามิน A, D, E, K และ แร่ธาตุละลายอยู่ ซึ่งไขมันนมนี้มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างรสชาติความรู้สึกเมื่ออาหารอยู่ในปาก และความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น เนย ผลิตภัณฑ์นมวัว และอาหารที่มีผลิตภัณฑ์นมวัวเป็นส่วนผสม นอกจากนี้ในน้ำนมนั้นยังประกอบไปด้วยแลคโตส 4.5-5.1% เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) 1 โมเลกุล กับ น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) อีก 1 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะ บีตา 1-4 ไกลโคซิดิก (β 1-4 glycosidic bond) โดยปกตินมวัวควรมีปริมาณเนื่อนมไม่รวมไขมันหรือน้ำของแข็งไม่รวมไขมันนม (milk solids not fat) ไม่ต่ำกว่า 8.25% โดยน้ำหนัก มีปริมาณโปรตีน ไม่ต่ำกว่า 3.00% โดยน้ำหนัก และไขมันนมไม่ต่ำกว่า 3.35% โดยน้ำหนัก ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของ

นมวัวผันแปรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของพันธุ์ สัตว์แต่ละตัว อาหาร ฤดูกาล สภาวะแวดล้อม อายุของสัตว์ ระยะการให้นม และสภาวะของเต้านม [8, 9]

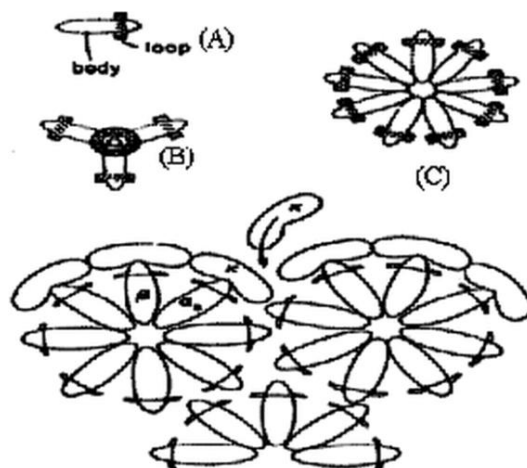
2.1.2 เคซีนในนมวัว

เคซีน มีประมาณ 80% ของโปรตีนในน้ำนมทั้งหมด มีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่นรส โดยปกติเคซีนจะอยู่ในรูปของไมเซลล์ซึ่งเป็นการรวมตัวกันของโปรตีนกับแคลเซียมฟอสเฟสกระจายเป็นแบบคอลลอยด์ในนมวัว [2] เคซีนจะมีลักษณะเป็นทรงกลมอย่างหยาบ มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 50-600 นาโนเมตร (โดยเฉลี่ยจะอยู่ที่ 150 นาโนเมตร) [10] สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิทำพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ณ อุณหภูมิประมาณ 62-71 องศาเซลเซียสได้ ในการแยกเคซีนออกจากนมวัวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนนมที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.6 (pH 4.6) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ การทำให้น้ำนมเย็นจัดจนแข็งตัว หรือการเติมเอนไซม์ ซึ่งในเชิงอุตสาหกรรมมีการใช้เคซีนทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ เช่น เป็นส่วนผสมลงในขนมปัง เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร หรือใช้เคซีนเป็นตัวประสานในการทำผลิตภัณฑ์ใส่กรอก หรือใช้เคซีนเป็นส่วนผสมในการทำกระดุม หวี ตัวปากกาหมึกซึม เป็นต้น [11]

2.1.2.1 โครงสร้างของเคซีน

เคซีน เป็นโมเลกุลของฟอสโฟโปรตีนที่มีการรวมตัวกันของฟอสฟอรัสและแคลเซียมเป็นคอลลอยด์ในรูปแบบไมเซลล์ เคซีนไมเซลล์จะประกอบไปด้วยโปรตีนประมาณ 93% ของน้ำหนักแห้ง และอีก 7% ของน้ำหนักแห้งจะเป็นสารอนินทรีย์กลุ่มแคลเซียมฟอสเฟต ซึ่งเคซีนไมเซลล์ในนมวัวนั้นประกอบไปด้วยเคซีน 4 ชนิด คือ แอลฟาเอส 1 เคซีน แอลฟาเอส 2 เคซีน บีตาเคซีน และแคปปาเคซีน

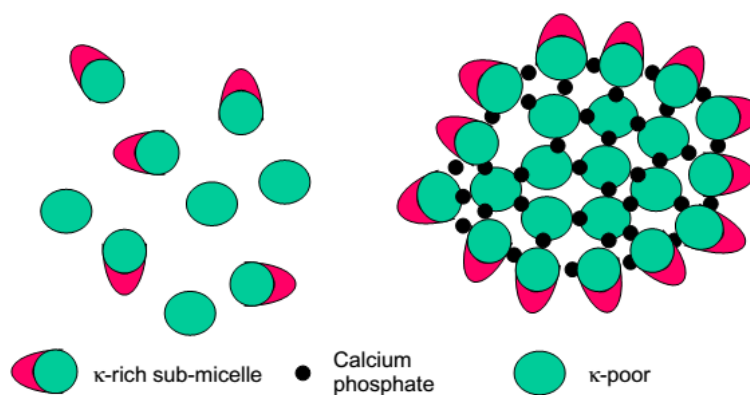
ในการศึกษาโครงสร้างของเคซีนนั้น ในปี 1965 Waugh และ Nobel ได้นำเสนอโมเดลแรก โดยอาศัยให้ความสามารถในการละลายของเคซีนในสารละลายแคลเซียม ซึ่งโมเดลนี้ได้อธิบายไว้ว่า ในกรณีที่ไม่มีแคลเซียม มอนอเมอร์ (monomer) ของเคซีนจะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตที่มีประจุ ก่อนให้เกิดการรวมตัวกันตกตะกอนลงมา (ภาพที่ 2.1A, B) แต่ถ้ามีการเติมแคลเซียมลงไป แคลเซียมจะช่วยให้เคซีนสามารถกระจายตัว ไม่ก่อให้เกิดการตกตะกอนลงมา (ภาพที่ 2.1C)



ภาพที่ 2.1 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Waugh และ Nobel

ที่มา: [10]

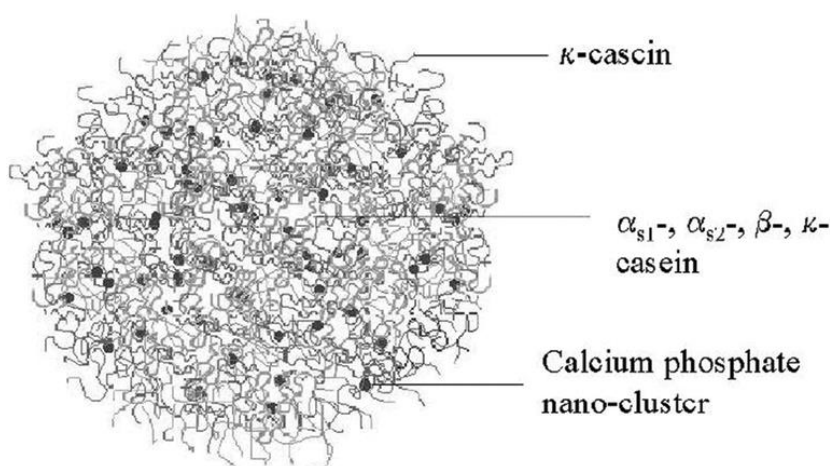
โมเดลถัดมา ถูกคิดค้นในปี 1967 โดย Morr (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมุ่งความสนใจไปที่การรวมกลุ่มของมอนอเมอร์ แอลฟาเอส 1 เคซีน บีตาเคซีน และแคปปาเคซีน กลายเป็นซับไมเซลล์ (submicell) ซึ่งซับไมเซลล์จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มด้วยพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bonding) และ salt bridge โดยมีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อม ต่อมาโมเดลนี้ถูกอธิบายเพิ่มเติมโดย Slattery Evard และ Horne ในซับไมเซลล์ที่รวมตัวกัน จะแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มี แคปปาเคซีน และชนิดที่ไม่มีแคปปาเคซีน ในซับไมเซลล์นั้น ส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกของโมเลกุล (ซับไมเซลล์ที่มีแคปปาเคซีน) จะรวมตัวกันอยู่ตรงกลางเป็นแกนของเคซีนไมเซลล์ ในขณะที่ส่วนที่เป็นไฮโดรฟิลิก (ซับไมเซลล์ที่ไม่มีแคปปาเคซีน) จะโอบล้อมอยู่ภายนอก [12, 13]



ภาพที่ 2.2 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Morr

ที่มา: [13]

อีกหนึ่งโครงสร้างที่เป็นโมเดลทางเลือก ถูกศึกษาโดย Holt (ภาพที่ 2.3) โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โมเดลนี้จะมุ่งเน้นในเรื่องการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเคซีน กับแคลเซียมฟอสเฟตที่ยึดโมเชลล์เข้ามารวมกลุ่มกันแคลเซียมฟอสเฟตในรูปของ nanocluster จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับ phosphoseryl cluster ที่อยู่บนเคซีน ซึ่งเคซีนนั้นมี cluster มากกว่า 2 ตำแหน่ง ส่งผลให้สามารถจับกับ nanocluster ตัวอื่น ก่อให้เกิดการเชื่อมโยงเครือข่าย nanocluster ในรูปแบบโครงสร้าง 3 มิติ



ภาพที่ 2.3 แสดงโมเดลโครงสร้างเคซีน ของ Holt

ที่มา: [10]

2.1.3 การแพ้เคซีนในนมวัว

การแพ้นมวัว (cow's milk allergy : CMA) เกิดจากกลไกการแพ้เหมือนกับการแพ้อาหาร แพ้ยา หรือสารอื่นๆ คือการที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเห็นโปรตีนในนมวัวเป็นสิ่งแปลกปลอม และพยายามกำจัดออก ทำให้เกิดอาการไม่สบายต่างๆ ตามระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และระบบผิวหนัง [14] การแพ้นมวัวนั้นจะแตกต่างจากภาวะขาดเอนไซม์ย่อยแล็กเทส (lactose tolerance) ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายไม่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) มาย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องอืด หรือท้องเสีย หลังการรับประทานนม หรือผลิตภัณฑ์จากนม แต่ไม่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย [15] ซึ่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ ได้แก่ แอลฟา แลตตัลบูมิน (α lactalbumin) บีตา แล็กโทโกลบูลิน (β lactoglobulin) และเคซีน แต่โปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้มากที่สุด คือ เคซีน เนื่องจากสามารถพบเคซีนในปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ [1] หากผู้ที่แพ้นมวัวได้รับนมเข้าไป สารที่ทำให้แพ้ในนมจะกระตุ้นการผลิตสารแอนติบอดีชนิด immunoglobulin E

(IgE) ขึ้นเพื่อป้องกันร่างกาย เมื่อครั้งต่อไปที่ร่างกายได้รับโปรตีนชนิดนี้ IgE จะเกิดปฏิกิริยาและส่งสัญญาณให้ระบบภูมิคุ้มกันปล่อยสารฮีสตามีน และสารเคมีอื่นๆ จนเกิดเป็นอาการแพ้ ซึ่งผู้ที่แพ้นมวัวจะเกิดอาการแพ้แตกต่างกันออกไปในแต่ละบุคคล อาจเกิดอาการแพ้แบบรวดเร็วหลังจากได้รับนมวัว หรืออาจเกิดอาการแบบช้าๆ ต่อเนื่องกัน 7-10 วันก็ได้ ผู้ที่มีอาการแพ้นมวัวจะเหมือนกับการแพ้อาหารชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ จะต้องหลีกเลี่ยงนม หรืออาหารที่มีส่วนประกอบของนม ในกรณีที่แพ้หรือรับประทานอาหารจากนมวัวจนมีอาการแพ้ หากไม่รุนแรงมาก อาจบรรเทาอาการได้ด้วยยาแก้แพ้ ส่วนผู้ที่มีอาการแพ้รุนแรงจำเป็นต้องใช้การฉีดยาแบบฉุกเฉินด้วยตัวยาอิพิเนพริน (epinephrine) ทั้งนี้ในการตรวจสอบว่าแพ้นมวัวหรือไม่นั้น สามารถไปพบแพทย์เพื่อทำการตรวจร่างกาย ดูประวัติภูมิแพ้ต่างๆ หรืออาจทำการทดสอบที่ผิวหนัง (skin test) เพื่อดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หากมีการนูนแดงบริเวณที่ฉีดสารทดสอบ แสดงว่ามีอาการแพ้เกิดขึ้น [16, 17]

2.1.4 วิธีตรวจวิเคราะห์เคซีน

2.1.4.1 Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography คือวิธีการวิเคราะห์แขนงหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) แบบคอลัมน์ เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลว กับเฟสคงที่ (stationary phase) ที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย ซึ่งของแข็งที่นำมาใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออนมีหลายชนิดทั้งที่มีอยู่ตามธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้น [18] ในปี 1985 Andrews และคณะ ได้ทำการแยกโปรตีนเคซีน 4 ชนิด (แอลฟาเอส 1 เคซีน แอลฟาเอส 2 เคซีน บีตาเคซีน และแคปปาเคซีน) โดยใช้ Mono S เป็นคอลัมน์ และใช้บัฟเฟอร์ที่มียูเรียผสม pH 3.4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่สามารถใช้คอลัมน์ Mono S แยกโปรตีนจากหางนมได้ [19] ต่อมาในปี 1998 Gerberding และ Byers ได้ใช้ ion exchange chromatography แยกโปรตีนในหางนม ได้แก่ แอลฟา แลตต์ลบูมิน บีตา แล็กโทโกลบูลิน serum albumin immunoglobulin G และแลคโตส ออกมาได้ [4]

2.1.4.2 Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกพัฒนาเพื่อแยกสาร หรือวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ โดยจะใช้เฟสคงที่ที่มีสภาพขั้วต่ำแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วสูงกว่าไล่สารที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ซึ่งสารที่มีสภาพขั้วต่ำจะออกมาช้ากว่าสารที่มีสภาพขั้วสูง [20] เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูง ความแม่นยำมาก จึงถูกใช้ในการแยกโปรตีนหลักๆ ในนมวัว โดยในปี

1998 Bobe และคณะ ได้ทำการแยกโปรตีนในน้ำนมของวัว 234 ตัว ให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ พบโปรตีนหลัก 6 ชนิด ได้แก่ แอลฟาเอส 1 เคซีน แอลฟาเอส 2 เคซีน บีตาเคซีน แคปตาเคซีน แอลฟา แลตต์ลบูมิน และ บีตา แล็กโทโกลบูลิน [21] ต่อมาในปี 2009 Yüksel และ Erdem ได้ทำการแยกโปรตีนในน้ำนมเช่นเดียวกัน แต่มีการปรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้ใส่ตัวทำละลายละลาย (solvent) สำหรับเฟสเคลื่อนที่เข้าไปผสม ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะส่งผลให้สามารถแยก แอลฟาเคซีน บีตาเคซีน แคปตาเคซีน แอลฟา แลตต์ลบูมิน และ บีตา แล็กโทโกลบูลิน ได้ชัดเจน และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เมื่อเทียบกับการเตรียมตัวอย่างแบบอื่นๆ [5]

2.1.4.3 High performance liquid chromatography mass spectrometer (HPLC-MS/MS)

HPLC-MS/MS เป็นเทคนิคที่สามารถใช้วิเคราะห์หาชนิดของสารตัวอย่างในปริมาณต่ำๆ ได้ และมีความจำเพาะสูง ส่งผลให้เหมาะกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพของสารตัวอย่าง [22] ซึ่งในปี 2015 Jira และ Schwägele ได้ใช้เครื่อง HPLC-MS/MS เข้ามาตรวจหาเคซีน และโปรตีนหางนมที่อาจปลอมปนมาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยตัวอย่างที่นำมาจะถูกละลายด้วยเอนไซม์ ก่อนจะนำไปตรวจวัดปริมาณ จากการศึกษาพบว่าเครื่อง HPLC-MS/MS มี limits of detection (LOD) ต่ำกว่า 1 ppm สำหรับตรวจหาโปรตีนในนม และประมาณ 3 ppm ในโปรตีนหางนม [6]

2.1.4.4 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา จะอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะกันเข้าช่วยในการทดสอบ โดยทั่วไปจะนึกถึงเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) อันอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีบนพื้นผิวของแข็ง เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง ง่ายกว่าการตรวจด้วยวิธีทางเคมี แต่มีข้อจำกัดในใช้งานการตรวจภาคสนาม ดังนั้นอีกหนึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ immunochromatographic Assay (ICA) ซึ่งมีหลักการเช่นเดียวกับ ELISA ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจน แต่ปฏิกิริยาจะมาเกิดบนเยื่อเลือกผ่านแทน เทคนิคนี้สามารถใช้งานได้ง่าย ไม่มีเครื่องมือยุ่งยากซับซ้อน ไม่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำการทดสอบสารตัวอย่าง สามารถนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม อีกทั้งยังมีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีทางเคมี จึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น โดยสามารถรายงานผลการตรวจได้ในเชิงคุณภาพ (qualitative) และกึ่งปริมาณ (semi-qualitative) [23]

2.1.5 แอนติเจน (antigen)

แอนติเจน คือ โมเลกุลของสารที่เป็นสิ่งแปลกปลอมสำหรับร่างกาย สามารถกระตุ้นให้คนหรือสัตว์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือสร้างแอนติบอดีขึ้น ซึ่งแอนติบอดีที่เกิดขึ้นนั้นจะมีสมบัติทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ ส่วนประกอบของแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เรียกว่า แอนติเจนิก ดีเทอร์มิแนนท์ (antigenic determinant) ซึ่งอาจเป็นกลุ่มของกรดอะมิโน หรือน้ำตาล หรือสารขนาดเล็กอื่น แอนติเจนทุกตัวไม่ได้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogen) โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กๆ ที่เรียกว่า แฮปเทน (hapten) จะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แต่ถ้าได้รวมตัวกับสารโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่า พาหะ (carrier) จึงกลายเป็นอิมมูโนเจนที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ [24, 25]

คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน

1. ความแปลกปลอม (foreignness)

ต้องเป็นสิ่งแปลกปลอมซึ่งปกติไม่พบในร่างกาย หรืออาจเป็นสิ่งที่อยู่ในร่างกายแต่ไม่เคยสัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกัน ถ้าความแปลกปลอมมาก ยิ่งกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น

2. ขนาดของโมเลกุล (size)

โดยทั่วไปหากเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก มักจะไม่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หรือกระตุ้นได้ไม่ดี จำเป็นต้องนำไปติดกับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ก่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ในทางกลับกันหากเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 10,000 ดาลตัน ขึ้นไปจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ เพราะสารยิ่งโมเลกุลใหญ่ยิ่งมี antigenic determinant มาก ซึ่งจะถูกกินโดย macrophage ได้สะดวกขึ้น

3. ความซับซ้อนของสูตรโครงสร้าง (chemical complexity)

สารที่ยิ่งมีสูตรโครงสร้างซับซ้อนจะเป็นแอนติเจนที่ดีกว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างง่ายๆ เช่น พวก polymer จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าพวก monomer

4. การเข้าถึงระบบภูมิคุ้มกัน (accessibility)

การเข้าถึงระบบภูมิคุ้มกันจะขึ้นกับการเรียงตัวของ antigenic determinant หากแอนติเจนมี antigenic determinant ที่เรียงตัวกันหนาแน่นเกินไปอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่ตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ ได้

5. ปริมาณและทิศทางการเข้าสู่ร่างกายของสาร (dose and route of administration)

ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้มีความสำคัญต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หากมีการใช้อิมมูโนเจนมากหรือน้อยเกินไป การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอาจลดลง นอกจากนี้ทิศทางการนำอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกายที่แตกต่างกันก็มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งในแง่ของระยะเวลาและปริมาณที่แตกต่างกัน

6. พันธุกรรมของร่างกาย (host genetics)

ความเป็นแอนติเจนที่ดีจะขึ้นกับคุณสมบัติของ host ด้วย นั่นคือในสัตว์ต่าง species กันก็ตอบสนองต่อแอนติเจนไม่เหมือนกัน นอกจากนี้ อายุ เพศ พันธุกรรม อาหาร ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย (dose) รวมทั้งทิศทางการที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย (route) ก็มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วย

7) Adjuvant

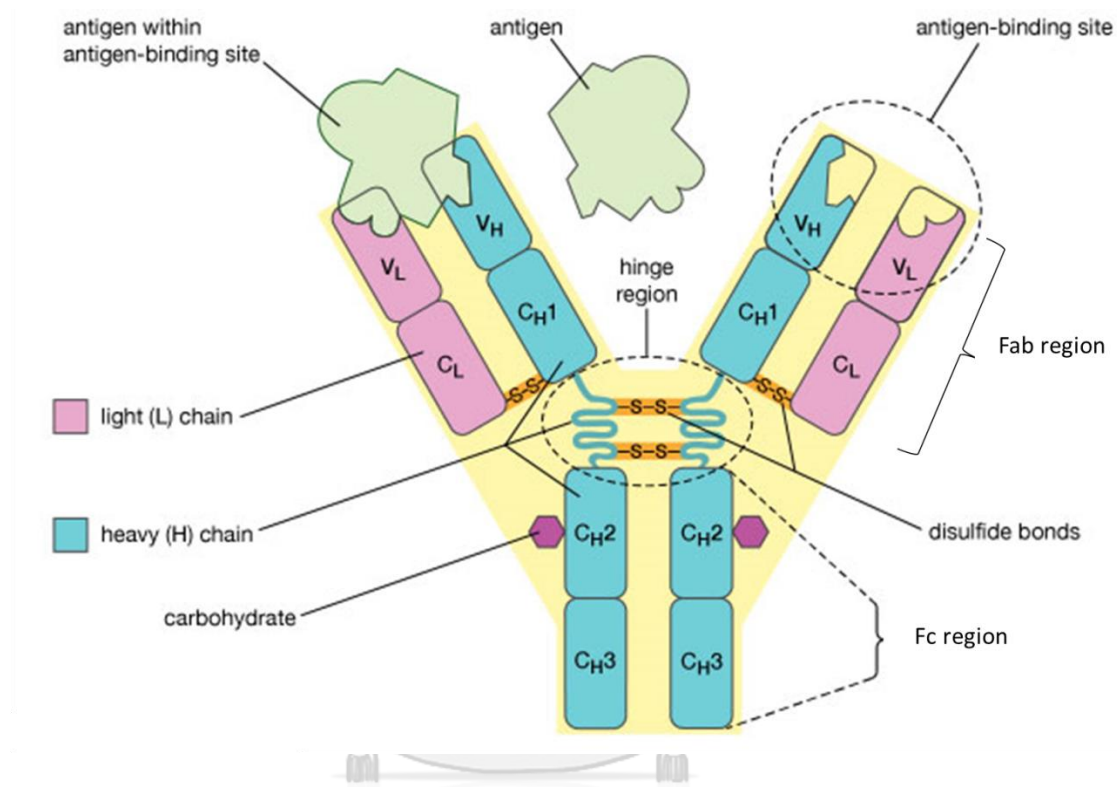
เป็นสารที่ให้เข้าสู่ร่างกายพร้อมกับแอนติเจน ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น โดยอาจจะไปยืดระยะเวลาของแอนติเจนให้อยู่ในร่างกายได้นานขึ้น ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้น ด้วยแอนติเจนได้มากขึ้น หรือทำให้เกิดการอักเสบบริเวณที่ฉีด ทำให้มีการชุมนุมของเม็ดเลือดขาวส่งผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น [26, 27]

2.1.6 แอนติบอดี

แอนติบอดี คือ สารไกลโคโปรตีนที่ร่างกายของคนหรือสัตว์สร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านต่อแอนติเจนที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีจะมีปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติเจนที่มากระตุ้นเท่านั้น โดยส่วนใหญ่จะพบแอนติบอดีในซีรัมของเลือด ในส่วน แคมมา โกลบูลิน (γ -globulin) และเนื่องจากแอนติบอดีโกลบูลินทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig)

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินจะมีลักษณะคล้ายอักษร Y ประกอบไปด้วย พอลิเพปไทด์ 4 สาย เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พอลิเพปไทด์ทั้ง 4 สาย ประกอบด้วยสายยาว 2 สายที่เหมือนกัน เรียกว่า heavy chain หรือ H-chain และสายสั้น 2 สายที่เหมือนกัน เรียกว่า light chain หรือ L-chain ซึ่ง H-chain แต่ละสายจะเชื่อมกับ L-chain ด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนของอิมมูโนโกลบูลินที่จับกับแอนติเจน เรียกว่า Fab (antigen-binding site) เป็นบริเวณที่เปลี่ยนแปลงได้ของเพปไทด์ทั้ง H-chain และ L-chain ส่วนบริเวณ Fc (fragment crystallizable) จะมีความสำคัญในการจับกับรีเซพเตอร์ของเซลล์ชนิดต่าง ๆ หรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเมนต์ ใน

การจับระหว่างอิมมูโนโกลบูลินกับแอนติเจน จะอาศัยพันธะไฮโดรเจน แรงอิเล็กโตรสแตติก และแรงดึงดูดแวนเดอวาล (Van Der Waals force) เนื่องจากอิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุลมีบริเวณที่จะจับกับแอนติเจนได้ 2 บริเวณการเรียงตัวเช่นนี้เรียกว่า ไบวาเลนต์ (bivalent) (ภาพที่ 2.4) [25, 28]



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของแอนติบอดี

ที่มา: ดัดแปลงจาก [28]

แอนติบอดีสามารถแบ่งออกมาได้ 5 กลุ่ม คือ IgG, IgA, IgD, IgE และ IgM ซึ่งแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางด้านโครงสร้าง จะมีตำแหน่งในการทำหน้าที่ และความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ต่างกัน (ภาพที่ 2.5)

1. Immunoglobulin G หรือ IgG

IgG เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบมากที่สุดในซีรัม คือ ประมาณ 75% ของซีรัมในอิมมูโนโกลบูลิน เนื่องจากเป็นอิมมูโนโกลบูลินเพียงตัวเดียวที่สามารถผ่านไปยังรกได้ จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันไม่ให้ทารกแรกเกิดติดเชื้อ เช่น โรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส บาดทะยัก เป็นต้น

2. Immunoglobulin A หรือ IgA

IgA เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีมากในซีรัมรองจาก IgG คือ มีอยู่ประมาณ 13% ของซีรัมในอิมมูโนโกลบูลิน ส่วนใหญ่พบตามสารคัดหลั่ง เช่น น้ำตา น้ำมูก น้ำลาย น้ำเมือกในหลอดอาหาร ในลำไส้ และในกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น ในอิมมูโนโกลบูลินชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าไปในร่างกาย ช่วยปกป้องเยื่อเมือกจากการบุกรุกของแบคทีเรียและไวรัส และป้องกันการติดเชื้อที่ช่องว่างในร่างกายได้

3. Immunoglobulin D หรือ IgD

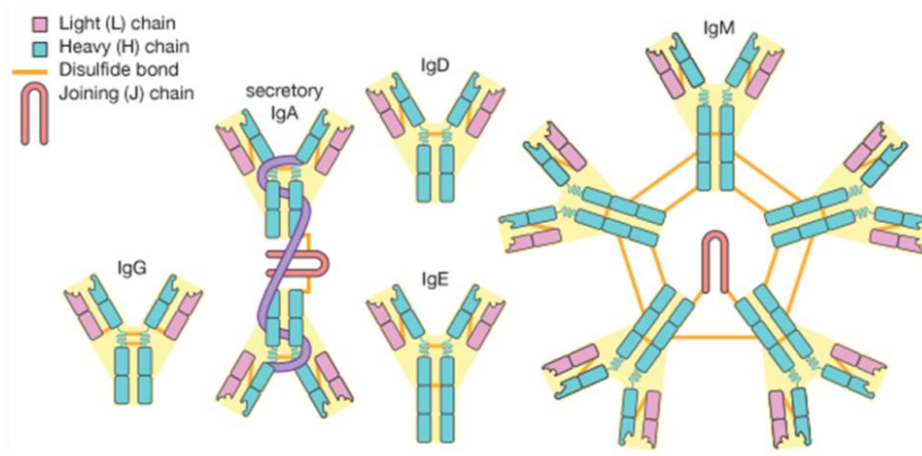
IgD เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบน้อยมากในซีรัม อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้เบื้องต้น (primary receptor) กับแอนติเจนบนผิวบีลิมโฟไซต์ของทารก และอาจควบคุมการสังเคราะห์ในอิมมูโนโกลบูลินอื่น ๆ

4. Immunoglobulin E หรือ IgE

IgE เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบน้อยที่สุดในเลือด แอนติบอดีนี้มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยากับการแพ้ เนื่องจากมีคุณสมบัติชอบเกาะกับเซลล์เบโซฟิล (basophils cell) และแมสเซลล์ (mast cell) เมื่อมีการจับกันของแอนติเจนต่อ IgE บนเซลล์ จะส่งผลให้แอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์กระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิไวเกิน (immediate hypersensitivity) โดยกระตุ้นให้เบโซฟิลปล่อยสารที่ทำให้เกิดการแพ้ ออกมา เช่น ฮิสตามีน ซีโรโทนิน จึงอาจเรียก IgE ว่า โฮโมไซโตโทรปิก แอนติบอดี (homocytotropic antibody) นอกจากนี้ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อปรสิต จะพบว่าในร่างกายจะมีปริมาณ IgE เพิ่มขึ้น แสดงว่าเกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านกับโรคติดเชื้อปรสิต

5. Immunoglobulin M หรือ IgM

IgM เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยหน่วยพื้นฐาน 5 หน่วยมาเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เป็นรูปดาว IgM ไม่สามารถผ่านรกได้ แต่ถ้าทารกมีการติดเชื้อ จะสามารถสร้าง IgM ขึ้นมาได้ ถือว่าเป็น Ig ชนิดแรกที่ทารกสร้างขึ้นเอง [29]

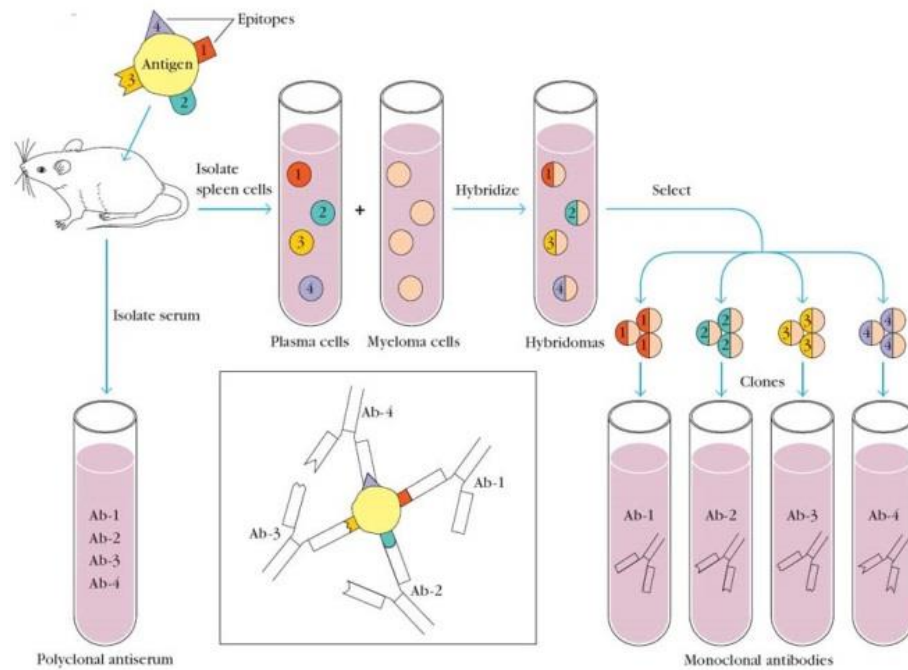


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ IgG, IgA, IgD, IgE และ IgM

ที่มา: [28]

2.1.6.1 พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) และ มอนอโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAb)

ในการแบ่งประเภทของแอนติบอดีอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ PAb กับ MAb โดย PAb จะประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในการจับกับส่วนต่างๆ ของแอนติเจนมากกว่า 1 อีพิโทป ซึ่งแต่ละโมเลกุลของ PAb จะมีโครงสร้างในส่วน variable region แตกต่างกันและมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) และความสามารถในการจับกับแอนติเจน (affinity) แตกต่างกัน เป็นแอนติบอดี ที่เตรียมได้จากซีรัมของสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย สารชนิดต่างๆ กลายเป็นแอนติบอดีชนิดนี้ (ภาพที่ 2.6) ส่วน MAb เป็นโมเลกุลของแอนติบอดีเพียง ชนิดเดียว ที่มีส่วนโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการจับกับอีพิโทปเพียง 1 อีพิโทปบนแอนติเจน [30] ซึ่ง ความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ประเภท ดังแสดงในตารางที่ 2.1



ภาพที่ 2.6 การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีและพอลิโคลนอลแอนติบอดี

ที่มา: [31]

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของ PAb และ MAb

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	มอโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ และความสามารถในการจับ	ความจำเพาะต่ำ จับกับแอนติเจนได้มากกว่า 1 อีพิโทป	ความจำเพาะสูง จับได้อีพิโทปเดียว
ความแปรปรวน	ความแปรปรวนสูง ในการผลิตแต่ละครั้งจะได้แอนติบอดีไม่เหมือนกัน	ความแปรปรวนต่ำ สามารถใช้เซลล์ไฮบริโดมา ผลิตแอนติบอดีได้ไม่จำกัด และมีคุณภาพเท่าเดิม
เวลาที่ใช้ในการผลิต	ใช้ระยะเวลาสั้น (ไม่เกิน 6 สัปดาห์)	ระยะเวลาที่ใช้ผลิตยาวนาน (ใช้เวลาอย่างน้อย 4 เดือน)
ต้นทุนการผลิต	ต้นทุนต่ำ	ต้นทุนสูง
กระบวนการผลิต	ไม่ต้องการคนที่มีทักษะในการผลิตมาก	ผู้ทำการผลิตต้องมีความรู้ความชำนาญ

ที่มา; [32, 33]

2.1.7 หลักการของแถบทดสอบ รูปแบบการไหลในแนวระนาบ (lateral flow immunochromatographic Assay: LFIA)

Lateral flow immunochromatographic Assay: LFIA หรือ test strip เป็นการนำเทคนิคทางโครมาโตกราฟีมาใช้ร่วมกับเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีการตรวจแบบ ELISA แต่ปฏิกิริยาจะเกิดบนแผ่นเมมเบรนแทน (membrane) LFIA เริ่มมีใช้ตั้งแต่ ค.ศ. 1984 เพื่อตรวจการตั้งครรภ์ ซึ่งสามารถอ่านผลได้เองโดยผู้ใช้ เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการรู้ผลการทดสอบสั้น สามารถพกพาชุดทดสอบได้ง่าย เก็บรักษาค่อนข้างสะดวก อีกทั้งราคาไม่แพงนัก ส่งผลให้ในปัจจุบันมีการนำ LFIA มาประยุกต์ใช้ในหลายๆ สาขา เช่น ใช้วินิจฉัยโรคในปศุสัตว์ ใช้หาสารเคมีที่ปนเปื้อนในอาหาร หรือใช้ในการตรวจคัดกรองโรคในโรงพยาบาล เป็นต้น [34, 35]

2.1.7.1 ส่วนประกอบแถบทดสอบ

โดยปกติ LFIA จะประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลักๆ 5 ส่วน ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป (ภาพที่ 2.7) ได้แก่

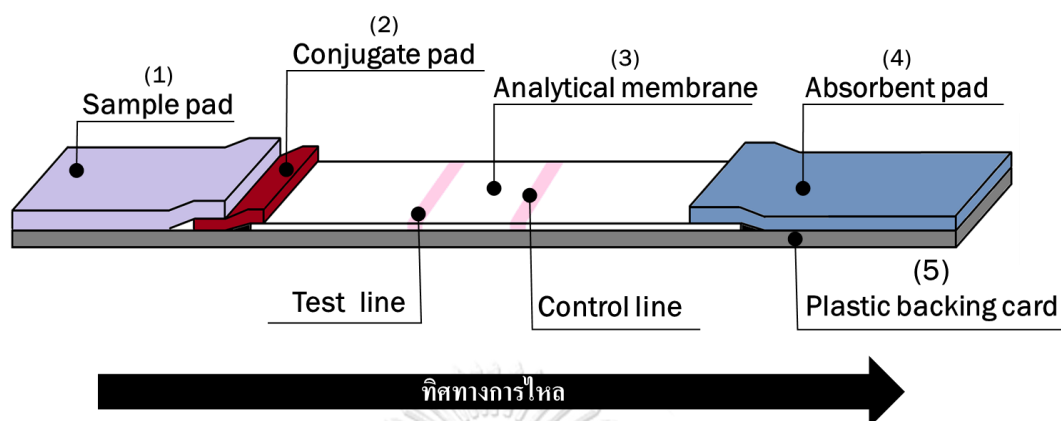
1. Sample pad จะผลิตขึ้นจาก cellulose หรือ glass fiber เป็นส่วนที่รองรับสิ่งส่งตรวจ หรือใช้ในการกรองสิ่งส่งตรวจได้ สมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ทำ sample pad ต้องมีอัตราซึมผ่านของตัวอย่างที่สม่ำเสมอ ไม่จับกับสารที่ต้องการทดสอบ

2. Conjugate pad เป็นส่วนที่มีการตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากไว้ และแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่จะนำมาทดสอบ สมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ทำ conjugate pad ต้องมีอัตราซึมผ่านของสารที่ตรงอย่างสม่ำเสมอ ไม่จับกับสารที่ใช้ตรึงรวมถึงสารที่ต้องการทดสอบที่เคลื่อนที่มาจาก sample pad

3. Analytical membrane เป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา จะประกอบไปด้วยเส้น 2 เส้น คือ เส้นควบคุม (control line; C-line) และเส้นทดสอบ (test line; T-line)

4. Absorbent pad เป็นบริเวณที่ใช้รองรับสารที่เหลือจากการตรวจ โดยอาศัยแรง capillary และช่วยป้องกันการไหลย้อนกลับไปยัง analytical pad ของสารที่นำมาทดสอบ สมบัติของวัสดุที่นำมาใช้ทำ absorbent pad จะต้องมีอัตราการดูดซับที่ดี เนื่องจากเป็นส่วนสุดท้ายของแถบทดสอบที่ทำการดูดซับตัวอย่างที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยาบน analytical pad ซึ่งวัสดุที่นิยมนำมาใช้คือ คอตตอน

5. Plastic backing card จะทำหน้าที่ยึดส่วนประกอบทั้งหมดของแถบทดสอบ



ภาพที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ

ที่มา: [36]

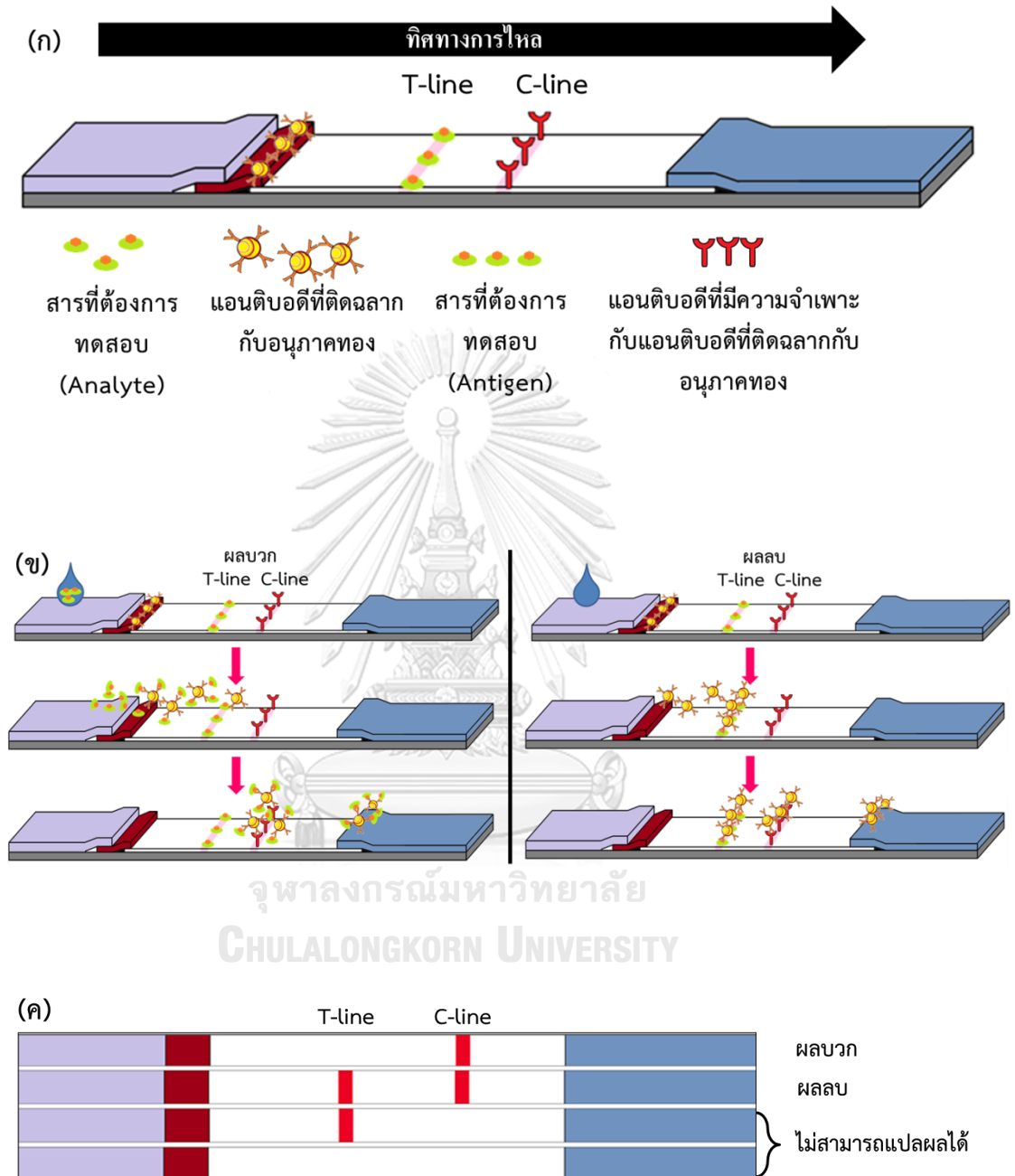
2.1.7.2 รูปแบบของแถบทดสอบ

รูปแบบของแถบทดสอบแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ รูปแบบแข่งขัน (competitive assay format) และรูปแบบแซนวิช (sandwich assay format)

2.1.7.2.1 รูปแบบแข่งขัน (competitive assay format) มีส่วนประกอบแสดงดังภาพ 2.8 หลักการของรูปแบบแข่งขัน จะเริ่มจากหยดตัวอย่างสารที่ต้องการนำมาทดสอบลงบน sample pad ตัวอย่างนั้นจะค่อยๆเคลื่อนที่ผ่าน conjugate pad ซึ่งบน conjugate pad นั้นจะมีการตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากไว้ และแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่จะนำมาทดสอบ โดยทั่วไปมักจะนำแอนติบอดีไปติดฉลากกับอนุภาคทอง (Ab-colloidal gold) ในกรณีที่ให้ผลบวก จะเกิดแถบสีแถบเดียว บริเวณ C-line เนื่องจากสารที่ต้องการตรวจสอบที่ปนอยู่ในตัวอย่าง และสารที่ตรึงอยู่บน T-line จะทำการแข่งขันแย่งกันจับกับ Ab-colloidal gold ส่งผลให้เมื่อสารละลายเคลื่อนมาถึงบริเวณ T-line แล้วไม่เหลือ Ab-colloidal gold ไปจับกับสารที่ตรึงไว้บน T-line จึงไม่ปรากฏแถบสีขึ้นมา ต่างจากบริเวณ C-line ที่ตรึงแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง เมื่อสารที่จับกับ Ab-colloidal gold เคลื่อนที่มาถึงจึงถูกจับไว้ ปรากฏเป็นแถบสีขึ้น ส่วนในกรณีที่เป็นผลลบ คือในตัวอย่างไม่มีสารที่ต้องการตรวจสอบ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่าน conjugate pad แล้ว Ab-colloidal gold จะไหลผ่าน analytical membrane และจับกับสารที่ถูกตรึงไว้บน T-line ซึ่งสารที่ถูกตรึงไว้จะเป็นสารที่มีความจำเพาะกับ

แอนติบอดีที่นำมาติดฉลากกับอนุภาคทอง ส่งผลให้เกิดแถบสีที่ T-line หลังจากนั้น สารที่จับกับ Ab-colloidal gold ที่เหลือจะเคลื่อนที่ผ่านไปยัง C-line แล้วถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง ก่อให้เกิดแถบสีขึ้นมา (ภาพที่ 2.8ข) ในกรณีที่เกิดแถบสีแถบเดียวที่ T-line หรือไม่ปรากฏแถบสีเลย แสดงว่าแถบทดสอบมีปัญหา ไม่สามารถแปลผลออกมาได้ (ภาพที่ 2.8ค) [37]

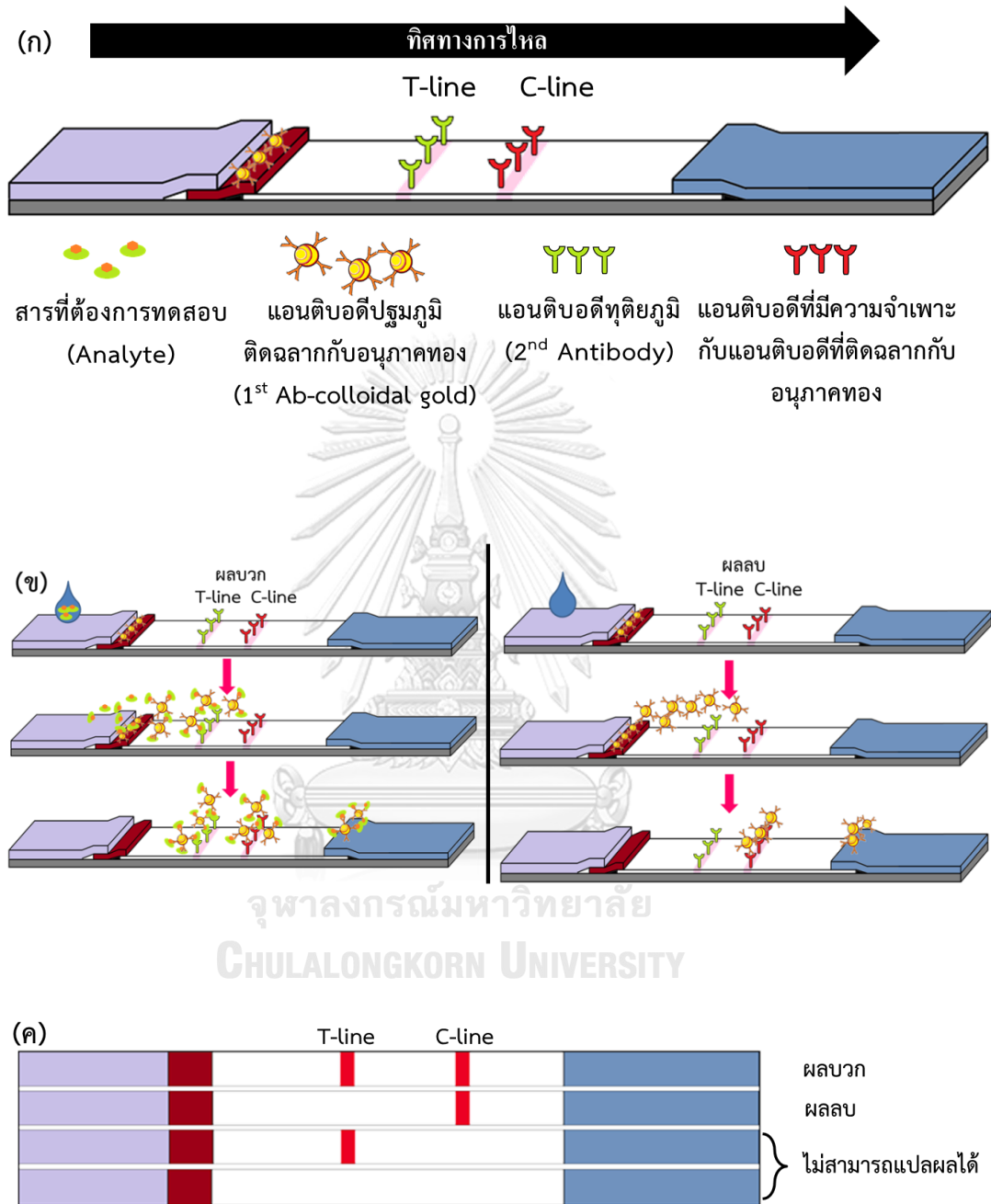




ภาพที่ 2.8 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแข่งขัน: (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบ (ข) หลักการทำงาน และ (ค) การแปลผลแถบทดสอบ

ที่มา: [36]

2.1.7.2.2 รูปแบบแซนวิช (sandwich assay format) มีส่วนประกอบ แสดงดังภาพ 2.9ก หลักการของรูปแบบแข่งขัน จะเริ่มจากหยดตัวอย่างสารที่จะต้องการนำมา ทดสอบลงบน sample pad ตัวอย่างนั้นจะค่อยๆเคลื่อนที่ผ่าน conjugate pad ซึ่งบน conjugate pad นั้นจะมีการตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากไว้ และแอนติบอดีนั้นมีความจำเพาะกับแอนติเจนที่จะ นำมาทดสอบ โดยทั่วไปมักจะนำแอนติบอดีไปติดฉลากกับอนุภาคทอง (Ab-colloidal gold) ในกรณี ที่ให้ผลบวก จะเกิดแถบสีขึ้น 2 แถบ บริเวณ T-line และ C-line เนื่องจากสารที่ต้องการตรวจสอบที่ ปนอยู่ในตัวอย่าง (analyte) จะจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิ ที่ติดฉลากอยู่กับอนุภาคทอง (1^{st} Ab-colloidal gold) และเคลื่อนที่ผ่านไปยัง analytical membrane และสารที่ติดอยู่กับ 1^{st} Ab-colloidal gold จะถูกแอนติบอดีทุติยภูมิ (2^{nd} antibody) ที่ตรึงอยู่บน T-line จับกับอิมูโนโกลบูลินที่เหลือ บนแอนติเจน ส่งผลให้บริเวณ T-line ปรากฏแถบสีขึ้นมา และ 1^{st} Ab-colloidal gold ที่เหลือจะ เคลื่อนที่ผ่าน T-line ไปยัง C-line ซึ่งตรึงแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับ อนุภาคทอง เมื่อสารที่จับกับ 1^{st} Ab-colloidal gold เคลื่อนที่มาถึงจึงถูกจับไว้ ปรากฏเป็นแถบสีขึ้น ส่วนในกรณีที่เป็นผลลบ คือในตัวอย่างไม่มีสารที่จะต้องการตรวจสอบ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่าน conjugate pad แล้ว 1^{st} Ab-colloidal gold จะไหลผ่าน analytical membrane และไม่เกิดการ จับ 2^{nd} antibody ที่ถูกตรึงไว้บน T-line ส่งผลให้ไม่เกิดแถบสีที่ T-line หลังจากนั้น 1^{st} Ab-colloidal gold ที่เหลือจะเคลื่อนที่ผ่านไปยัง C-line แล้วถูกจับด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ แอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง ก่อให้เกิดแถบสีขึ้นมา (ภาพที่ 2.9ข) ในกรณีที่เกิดแถบสีแถบ เดียวที่ T-line หรือไม่ปรากฏแถบสีเลย แสดงว่าแถบทดสอบมีปัญหา ไม่สามารถแปลผลออกมาได้ (ภาพที่ 2.9ค) [37]



ภาพที่ 2.9 แสดงแถบทดสอบรูปแบบแซนวิช: (ก) ส่วนประกอบของแถบทดสอบ (ข) หลักการทำงาน และ (ค) การแปลผลแถบทดสอบ

ที่มา: [36]

2.1.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจด้วยแถบทดสอบ

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการตรวจด้วยแถบทดสอบ จะมี 2 ปัจจัยหลักๆ ที่สำคัญ คือ

1. ชนิดของ analytical membrane ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของแถบทดสอบ โดยเกิดปฏิกิริยาจับกันระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนบน analytical membrane ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาช้า หรือเร็ว จะขึ้นกับอัตราการไหลผ่านของตัวอย่างบน analytical membrane หากตัวอย่างที่นำมาทดสอบสามารถไหลผ่าน analytical membrane ได้เร็ว จะลดการเกิดปฏิกิริยาบนระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนบน analytical membrane ลง [44] ดังนั้นชนิดของ analytical membrane จึงถือเป็นส่วนสำคัญในการทำแถบทดสอบ ซึ่งวัสดุที่นำมาใช้ทำ analytical membrane ต้องง่ายต่อการตรึงโปรตีนบนเมมเบรน ไม่ทำปฏิกิริยากับ Buffer ที่ใช้ทดสอบ รวมถึงมีอัตราการไหลผ่านของตัวอย่างบน analytical membrane ที่เหมาะสม โดยปกติจะนิยมใช้ในโตรเซลลูโลส ที่มีขนาดรูพรุน 0.05 ถึง 12 ไมครอน เป็น analytical membrane

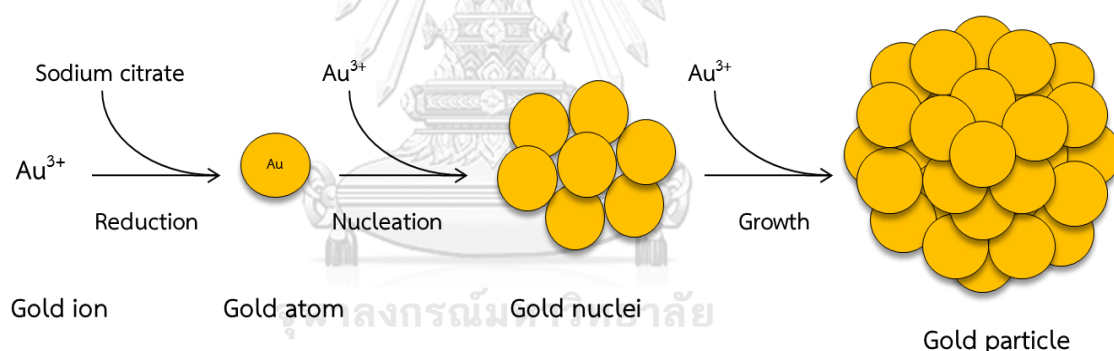
2. สมบัติของแอนติบอดี เนื่องจากแถบทดสอบอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจน การเลือกใช้แอนติบอดีที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญ หากแอนติบอดีที่ใช้สำหรับพัฒนาแถบทดสอบไม่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ หรือไม่มีความไวพอ จะส่งผลต่อการประเมินความถูกต้องในการตรวจ นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีก็มีความสำคัญ หากแอนติบอดีที่นำมาใช้ไม่มีความบริสุทธิ์ จะทำให้แอนติบอดีไม่สามารถจับกับแอนติเจน หรือ จับกันได้ไม่ตึง ส่งผลกระทบต่อแถบทดสอบเช่นเดียวกัน [38]

2.1.8 อนุภาคทอง (gold particle)

อนุภาคทอง คือ โลหะทองที่มีขนาดนาโน มักจะเตรียมขึ้นมาจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์อนุภาคทอง (gold-cation) ให้กลายเป็นโลหะทอง โดยใช้สารช่วยการกระจายตัวเพื่อไม่ให้อนุภาคเกาะกันเป็นก้อนใหญ่ อนุภาคทองนั้นมีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจวัดทางชีววิทยา (biosensor) และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดระดับโมเลกุลได้ (molecular sensor) อนุภาคทองคำค้นพบครั้งแรกในปี 1857 โดย Faraday หลังจากนั้น ในต้นศตวรรษที่ยี่สิบ อนุภาคทองก็เริ่มเข้ามามีบทบาททางด้านวิทยาศาสตร์มากขึ้น ซึ่งในปี 1971 Faulk และ Taylor ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ colloidal gold โดยใช้ phosphorus แต่ทว่าไม่ประสบความสำเร็จ จนกระทั่ง Frens ได้เข้ามาทำการสังเคราะห์ colloidal gold โดยใช้ sodium citrate ในการทำปฏิกิริยารีดักชัน

ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่สามารถควบคุมคุณลักษณะรูปร่าง และขนาดของ colloidal gold ได้อย่างแน่นอน ต่อมาในปี 1981 Leuvering และคณะ ได้มีการใช้แอนติบอดีที่ตรงเข้ากับอนุภาคทอง เพื่อใช้ในการ วินิจฉัยโรค หลังจากนั้นอนุภาคทองก็มีการนำมาใช้หลากหลายขึ้น จนกระทั่งในปัจจุบัน มีการใช้ อนุภาคทองติดฉลากกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนหลายๆ ชนิด ในการทำแถบทดสอบ [38]

ในการเตรียม colloidal gold นั้น วิธีที่ได้รับความนิยมสำหรับใช้ในการเตรียมอนุภาคทอง ก็คือ วิธีการของ Turkevich ซึ่งถูกคิดค้นตั้งแต่ปี 1951 โดยใช้กระบวนการรีดักชันของการเติม reducing agent ลงในสารตั้งต้น chloroauric acid หรือ HAuCl_4 เมื่อเกิดการทำปฏิกิริยา Au^{3+} จะ ถูกรีดิวซ์กลายเป็น Au ผลของการสังเคราะห์อนุภาคทอง (AuNPs) จะได้ขนาด 20 nm หลังจากที่ Frens ได้นำวิธี Turkevich มาพัฒนาต่อ ส่งผลให้สามารถควบคุมขนาดอนุภาคทองได้ตามต้องการ จากอัตราส่วนผลสมระหว่าง reducing และ stabilizing ซึ่งในที่นี้คือ trisodium citrate และ chloroauric acid (ภาพที่ 2.10) [39]



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 2.10 การสังเคราะห์อนุภาคทอง

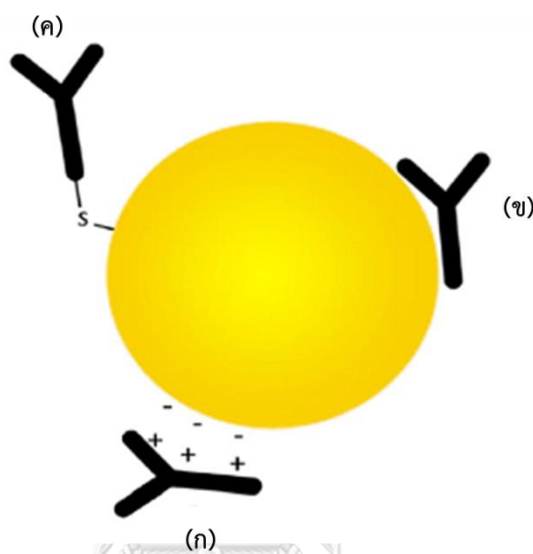
ที่มา: [40]

วิธีการเชื่อมติดอนุภาคทองกับแอนติบอดี หรือ โมเลกุลอื่นๆ มี 2 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ (physical) และวิธีทางเคมี (chemical) โดยวิธีทางกายภาพแบ่งออกเป็น 3 วิธี

1. Ionic attraction เป็นการอาศัยแรงจับระหว่างประจุลบของอนุภาคทอง และประจุบวกของแอนติบอดี
2. Hydrophobic attraction เป็นการเชื่อมติดแอนติบอดีบนผิวของอนุภาคทองด้วยแรงไฮโดรโฟบิก

3. Dative binding เป็นการอาศัยการเชื่อมติดจากแรงอิเล็กตรอนระหว่างอนุภาคทองกับแอนติบอดี ที่มีโมเลกุลของซัลเฟอร์ (ภาพที่ 2.11)

ส่วนวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การใช้เทคนิคการดูดซับทางเคมี (chemisorption) การใช้ adapter molecules หรือ การใช้ตัวเชื่อมต่อ bifunctional เป็นต้น [41]



ภาพที่ 2.11 วิธีการเชื่อมติดอนุภาคทองกับแอนติบอดี (ก) Ionic attraction (ข) Hydrophobic attraction (ค) Dative binding

ที่มา: [41]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULONGKORN UNIVERSITY

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การแพ้อาหาร คือ อาการผิดปกติของร่างกาย เมื่อทานอาหารบางอย่างเข้าไป แล้วระบบภูมิคุ้มกันเกิดการตอบสนอง โดยทั่วไปการแพ้อาหารจะพบในเด็กเล็กมากกว่าผู้ใหญ่ เพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ที่มีการแพ้อาหารต่างๆ ได้รับสารที่ต้นแพ้เข้าไป สหภาพยุโรป (EU) จึงได้ออกกฎระเบียบ directive 2003/89/EC ว่าด้วยเรื่อง การระบุส่วนผสมที่มีอยู่ในอาหาร เพื่อเป็นบทเสริมต่อจากกฎระเบียบการติดฉลากอาหารทั่วไป ซึ่งนมถือเป็นหนึ่งในสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ที่จะต้องมีการระบุลงฉลากของผลิตภัณฑ์อาหารด้วย [42] แต่ทว่าในผลิตภัณฑ์อาหารบางอย่างก็ไม่มีฉลากแสดงส่วนประกอบ หรือผลิตภัณฑ์บางประเภทก็มีการผสมนมลงไปโดยไม่บอกผู้บริโภค ส่งผลให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้จนมึนงงได้ จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการนำวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเข้ามาช่วยในการ

ทดสอบนมวัว เนื่องจากสามารถแปลผลได้เร็ว และสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

ในปี 2006 ได้มีการพัฒนาชุดทดสอบ sandwich ELISA เพื่อใช้ตรวจสอบ และวัดปริมาณการปลอมปนนมวัวในผลิตภัณฑ์ชีสเนื้อมูม 3 ชนิด คือชีสเนื้อมูมที่ผลิตจากนมแกะ จากนมแพะ และจากนมกระป๋อง โดยชุดทดสอบสามารถตรวจวัดว่ามีการปลอมปนของนมวัวในนมแกะ หรือนมกระป๋องได้ต่ำที่สุด เมื่อมีการปลอมปนที่ 0.001% และตรวจพบการปลอมปนนมวัวในนมแพะได้ต่ำที่สุดที่ 0.01% แต่ถ้าเป็นการใช้ชุดทดสอบ ELISA ในการตรวจชีสเนื้อมูมที่ทำจากนมแกะ นมแพะ และนมกระป๋อง จะสามารถตรวจพบการปลอมปนนมวัวในนมแกะ หรือนมกระป๋องต่ำที่สุดเมื่อมีการปลอมปนที่ 0.01% และตรวจพบการปลอมปนนมวัวในชีสเนื้อมูมนมแพะเมื่อมีการปลอมปนต่ำที่สุดที่ 0.001% ซึ่งชุดทดสอบ ELISA นี้มีค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปร (coefficient of variation; CV) น้อยกว่า 10% จึงมีความเหมาะสมที่จะพัฒนาไปเป็นชุดทดสอบที่ใช้คัดกรองเบื้องต้นสำหรับการปนเปื้อนนมวัวในผลิตภัณฑ์ชีสเนื้อมูม 3 ชนิด [43] ในปีเดียวกันได้พบข้อมูลเกี่ยวกับการ พัฒนาชุดทดสอบ immunochromatography แบบ dipstick ซึ่งมีหลักการเดียวกับ LFA แต่มีการทำปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรนในแนวตั้งแทน เพื่อตรวจการปลอมปนของนมวัวในชีสนมแกะ เนื่องจากชีสนมแกะเป็นที่นิยมในตุรกี แต่นมแกะมีราคาแพงกว่านมวัว ผู้ผลิตบางรายจึงมีการปนนมวัวลงไปเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยได้นำชุดทดสอบนี้ไปใช้ทดสอบในชีสนมแกะ 100 ตัวอย่าง จากตลาดอิสตันบูล (Istanbul) พบว่า 48% ของตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีการปลอมปนของนมวัว จากผลที่ปรากฏบ่งบอกว่าควรมีการดำเนินการควบคุมของชีสนมแกะในตุรกี [44]

ถัดมาในปี 2007 มีการพัฒนาชุดทดสอบ indirect ELISA กับใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบนมวัวที่ปลอมปนในชีสนมแกะ และนมแพะ ซึ่งพบว่าทั้ง 2 วิธีมีความน่าเชื่อถือ และนำมาใช้ตรวจสอบการปลอมปนนมวัวในชีสที่ปริมาณต่างๆ ได้ แต่ชุดทดสอบ indirect ELISA จะมีราคาถูก ตรวจสอบได้รวดเร็ว มีขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก และมีความเหมาะสมกับการนำมาใช้ในภาคสนามมากกว่าเทคนิค PCR [45]

ต่อมาในปี 2009 ได้มีการพัฒนาแถบทดสอบ immunochromatography แบบ sandwich dipstick เพื่อตรวจ bovine rennet whey ที่ปนเปื้อนในน้ำนม และนมผง โดยในชุดทดสอบจะใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดี 2 ชนิด จับกับ casein glycomacropptide (cGMP) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่ามี rennet whey ในนม พบว่าแถบทดสอบสามารถตรวจวัด cGMP ได้ต่ำสุดที่ 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบในตัวอย่างนมดิบ 60 ตัวอย่าง พบว่าหากมีการปลอมปนของ rennet whey ในนมดิบมากกว่า 4% จะสามารถตรวจพบทั้งหมด [46]

ในปี 2014 ทำการพัฒนาชุดทดสอบ ELISA สำหรับตรวจนมวัวที่ปลอมปนในนมจามรี (yak milk) ซึ่งในขณะนั้น การขายนมจามรีถือเป็นรายได้ที่สำคัญของชาวธิเบต นมจามรีที่ถูกขายไปจะถูกนำไปผลิตเป็นชีส หรือโยเกิร์ต ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพของนมจามรีว่าถูกปลอมปนด้วยนมวัวหรือไม่จึงมีความสำคัญ ซึ่งชุดทดสอบ ELISA ที่พัฒนานี้ มีความจำเพาะสูงสามารถนำไปใช้ตรวจ bovine β -casein ที่ 10-8,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจนมวัวที่ถูกเจือจางอยู่ในนมจามรี 2 เท่า ถึง 1,300 เท่าได้ ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจพบการปลอมปนนมวัวในนมจามรีได้ต่ำที่สุดเมื่อมีการปลอมปนที่ 1% และมีค่า %CV น้อยกว่า 10% [47]

ต่อมาในปี 2015 ได้มีการพัฒนาแถบทดสอบ LFIA เพื่อตรวจเคซีน และบีตา แล็กโทโกลบูลิน ในนมวัว โดยในเคซีนรูปแบบของแถบทดสอบจะเป็นแบบแซนวิท ส่วนในบีตา แล็กโทโกลบูลิน รูปแบบแถบทดสอบจะเป็นแบบแข่งขัน ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 เป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ในนมวัว ทั้งนี้ แถบทดสอบสามารถตรวจวัดโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารได้ต่ำสุดที่ 0.1 ppm โดยทำการประเมินผลได้ภายใน 15 นาที [48]



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีน รหัส CN1F4 ที่พัฒนาจากกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และการประยุกต์ใช้ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
● 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Casein sodium salt from bovine milk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Thimerosal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
● Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo, Erba, Milan, Italy
● Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
● Sodium chloride (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
● Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, Germany
● Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Darmstadt, Germany
● Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Germany
● Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Darmstadt, Germany
● Sodium tetraborate	Riedel-de Haën, Seelze, Germany
● Sucrose	Ajax Finechem, New South Wales, Australia
● Goat anti mouse IgG-Fc (IgG-Fc)	Jackson Immuno, Pennsylvania, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
● Colloidal gold 40 nm	Kestrel Biosciences Co., Ltd., ปทุมธานี
● Goat anti mouse IgG-Horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Jackson Immuno, West Grove, Pennsylvania
● BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois
● Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Fluka, Switzerland
● นมวัว รสจืด ยี่ห้อ Dutch mill	บริษัท Dutch mill, นครปฐม
● นมกระป๋อง รสจืด ยี่ห้อ Murrah	Murrah dairy company limited, ฉะเชิงเทรา
● นมแพะ รสจืด ยี่ห้อ ยานาฟาร์ม	ยานาฟาร์ม, สระบุรี
● นมถั่วเหลือง หวานน้อย ยี่ห้อ Tofusan	Tofusan Co., Ltd., สมุทรสาคร

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
● เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multisken, Helsinki, Finland
● เครื่องกวนสารละลาย	IKA Work, Wilmington, North Carolina
● เครื่องเขย่าสาร	Corning, USA
● เครื่องชั่งหยاب และละเอียด	Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland
● เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
● เครื่องผสมสารละลาย	Scientific industries, Boulder, Colorado
● เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส	Fisher Scientific, UE Tech Pake, Singapore
● เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Synergy HT	Bio-TEK, Richmond, Virginia
● เครื่องขีดแถบทดสอบ Biodot รุ่น XYZ 3000	Biodot, Irvine, USA
● ตู้ปลอดเชื้อ	Lab Survice Ltd., Bangkok, Thailand
● ตู้อบลมร้อน รุ่น UNB, SNB, INB	Memmert, Schwabach, Germany
● ตู้บ่ม รุ่น Forma Series II	Yamato, Tokyo, Japan
● โถดูดความชื้น	Duran group, Mainz, Germany
● งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Corning, USA

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
● ขวดแก้วขนาดต่าง	Boro, Germany
● ทิปขนาด 10, 200, 300, 1,000, 5,000 และ 10,000ไมโครลิตร	Axygen, Union city, California
● ปิเปตมัลติแชลแนล ขนาด 300 ไมโครลิตร	HTL, Warsaw, Poland
● ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 10, 200, 300, 1,000, 5,000 และ 10,000ไมโครลิตร	Eppendorf, Hamburg, Germany
● หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California
● หลอดทดลอง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	Axygen, Union city, California
● Sample pad (bound glass fiber, STANDARA 17)	Whatman, Kent, USA
● Analytical membrane (AE 98 fast และ AE99)	Whatman, Kent, USA
● Absorbent pad (100% cotton linter, CF 7)	Whatman, Kent, USA
● Conjugate pad (bound glass fiber, GF 33)	Whatman, Kent, USA
● Analytical membrane (CN95)	Sartorius, Gottingen, Germany
● Plastic backing card	DNC, Carlsbad, California
● ตลับพลาสติกสำหรับแถบทดสอบ	DNC, Carlsbad, California

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยโพรไวน์เคซินความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอนุหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 ที่มี 0.05% (v/v) tween20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม 5% (v/v) ซีรัมลูกวัวที่เป็นตัวบล็อกลงไป หลุมละ 300 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่างแอนติบอดีที่ทำการเจือจางด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่มีความจำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมต่อกับ ฮอส-แรดดิช เปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG-HRP; GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 3,3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) ความเข้มข้น 1.0 M หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.2 การตรวจการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น

ทำ indirect competitive ELISA โดยทำการเคลือบพื้นหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยโพรไวน์เคซินความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอนุหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงทำการเติม 5% (v/v) ซีรัมลูกวัวที่เป็นตัวบล็อกลงไป หลุมละ 300 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมตัวอย่างแอนติเจนที่ทำการเจือจางด้วย PBS ลงไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร พร้อมกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเคซิน หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม

กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1.0 M หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม Graph Pad Prism 5 โดยคิดจาก $50\% B/B_0$ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

$$IC_{50} = 50\% \frac{B}{B_0}$$

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากผลการทำ ELISA ที่มีสารทดสอบที่ต้องการวัดการเกิดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากผลการทำ ELISA ที่ไม่มีสารทดสอบที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อได้ค่า IC_{50} ของสารที่นำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามแล้ว สามารถคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{ cross-reactivity} = \frac{IC_{50} \text{ ของเคซีนจากนมวัว}}{IC_{50} \text{ ของเคซีนจากสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

3.4.3 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร

3.4.3.1 การหาความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ

นำสารคอลลอยด์อนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร มาปรับให้มี pH 9.0 โดยใช้ 0.2 M Na_2CO_3 หลังจากนั้นนำจานทดสอบชนิด 96 หลุมมาเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ทำการเจือจางด้วย 2mM sodium borate buffer (BB), pH 9.0 ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตร แล้วเติมสารคอลลอยด์อนุภาคทองคำที่ปรับ pH ไว้ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10% NaCl ลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ปริมาณ

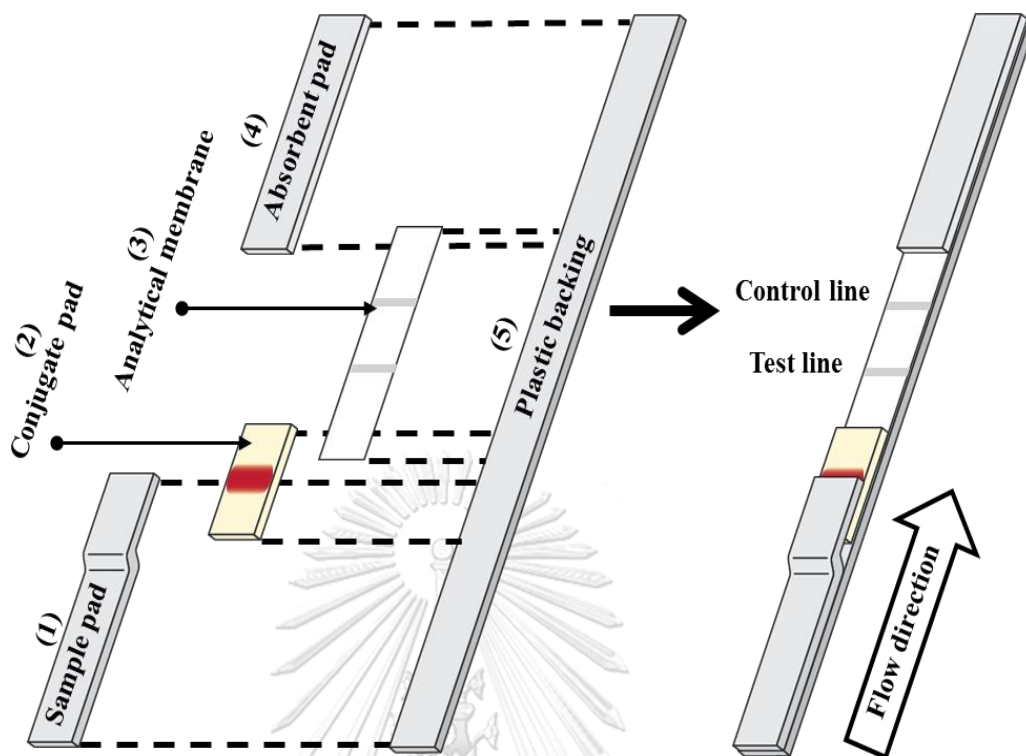
ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมกับอนุภาคทองคำจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด [49]

3.4.3.2 การเชื่อมมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ

นำสารคอลลอยด์อนุภาคทองคำ 5 มิลลิลิตร มาปรับให้มี pH 9.0 โดย 0.2 M Na_2CO_3 หลังจากนั้นเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่หาระดับความเข้มข้นจากข้อ 3.4.3.1 ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะเติมตัวบล็อกคอลลอยด์อนุภาคทองคำซึ่งเป็น 5% BSA ใน BB ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าต่อไปเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ $25,000 \times g$ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ที่มีส่วนใส และล้างผลึกของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำด้วย 5 มิลลิลิตร BB หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนต่อ โดยจะทำการล้างทั้งสิ้น 3 ครั้ง สุดท้ายผลึกของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำจะถูกละลายด้วย 2% sucrose ใน BB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับอนุภาคทองคำที่ยังไม่ติดกับแอนติบอดี หากมอนอโคลนอลแอนติบอดีติดกับอนุภาคทองคำแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดจะเปลี่ยนแปลงไป ในส่วนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำแล้ว ให้แบ่งเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [48]

3.4.4 การเตรียมแถบทดสอบ LFIA

ในการเตรียมแถบทดสอบ LFIA ในรูปแบบแข่งขัน (competitive assay format) จะมีส่วนประกอบหลักๆ 5 ส่วน (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของแถบทดสอบ (1) Sample pad (2) Conjugate pad
(3) Analytical membrane (4) Absorbent pad (5) Plastic backing card

3.4.4.1 การเตรียม sample pad และ absorbent pad

นำ sample pad ซึ่งในที่นี้เลือกใช้ standard17 และ absorbent pad คือ CF7 มาตัดให้มีขนาด 4x17 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4.4.2 การเตรียม conjugate pad

นำ conjugate pad ซึ่งในที่นี้เลือกใช้แผ่นใยแก้ว CF33 มาตัดให้มีขนาด 4x10 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4.4.3 การเตรียม analytical membrane

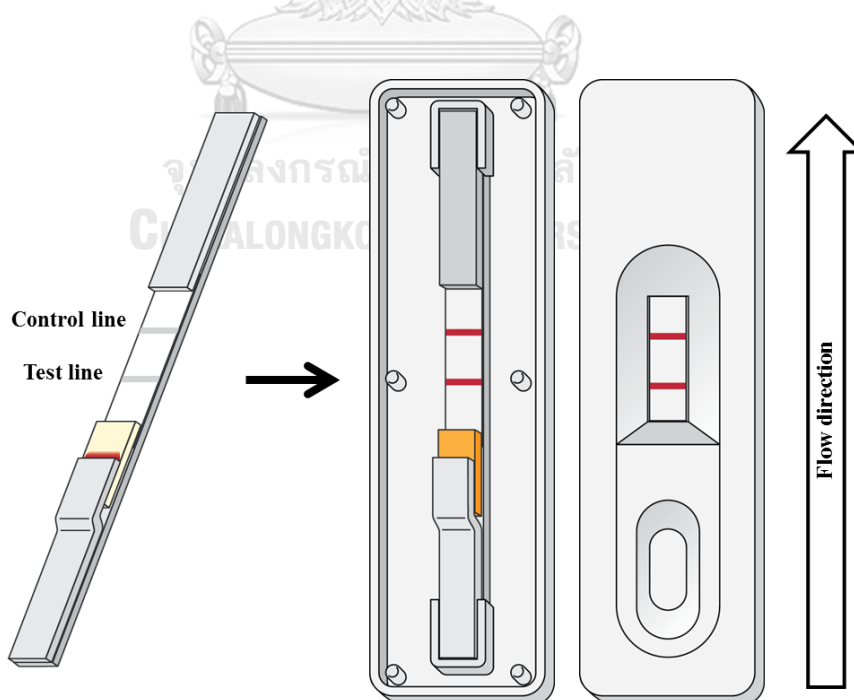
นำ analytical membrane ซึ่งในที่นี่ คือ AE98fast AE99 และ CN95 มาตัดให้มีขนาด 4x25 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4.4.4 การเตรียม plastic backing card

นำ plastic backing card มาตัดให้มีขนาด 4x60 มิลลิเมตร

3.4.4.5 การประกอบแถบทดสอบ

ในการประกอบแถบทดสอบจะเริ่มจากการนำ analytical membrane ที่มีการประทับ หรือพ่นด้วยเคซีนตรง T-line และประทับ หรือพ่น IgG-Fc ตรง C-line มาติดลงบน plastic backing card จากนั้นนำ conjugate pad ที่มีการหยด MAb-Colloidal gold ติดลงไปบน plastic backing card โดยให้ด้านบนเกยทับกับ analytical membrane ประมาณ 2 มิลลิเมตร นำ sample pad ติดลงไปบน plastic backing card โดยให้ด้านบนเกยทับกับ conjugate pad ประมาณ 4 มิลลิเมตร สุดท้ายให้นำ absorbent pad มาติดลงไปบน plastic backing card โดยให้ด้านปลายเกยทับกับ analytical membrane ประมาณ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.1) จากนั้นนำแถบทดสอบใส่ตลับพลาสติกสำหรับแถบทดสอบ (ภาพที่ 3.2)

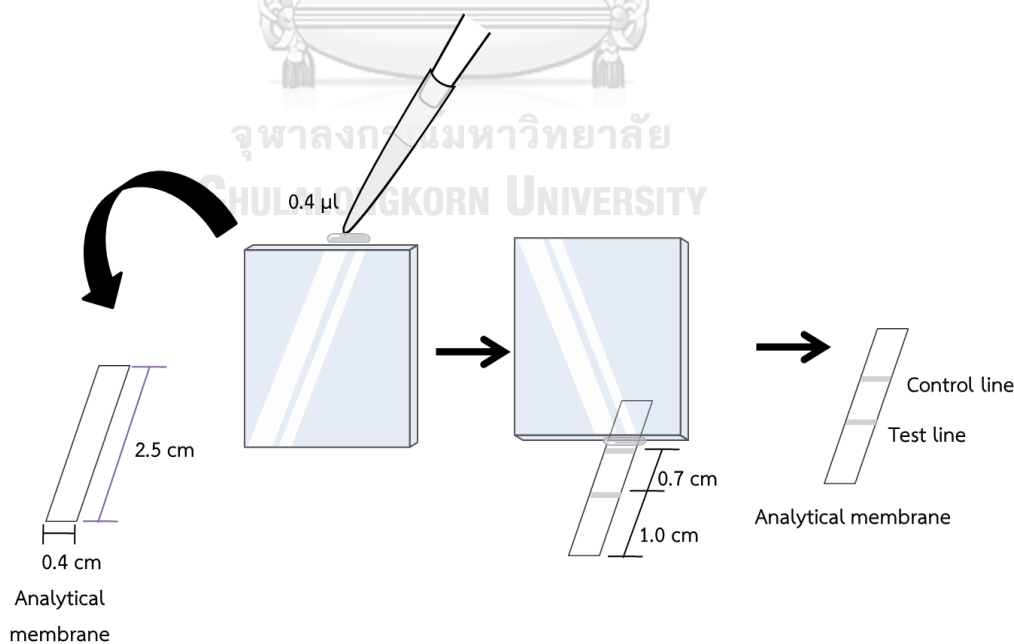


ภาพที่ 3.2 แถบทดสอบที่ประกอบเสร็จแล้วในตลับพลาสติก

3.4.5 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีน

3.4.5.1 ศึกษาผลของบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรน

นำ analytical membrane ได้แก่ AE98fast, AE99 และ CN95 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.3 มาเรียงด้วย goat anti mouse IgG-Fc (IgG-Fc) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ C-line และตรึงเคซีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ T-line โดยวิธีการตรึงสารละลายทั้ง 2 จะใช้ปิเปตหยดสารลงบนสันของกระดาษไลต์และประทับลงไป ดังภาพที่ 3.3 ทำการเปรียบเทียบผลของการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA โดยการเคลือบเมมเบรนก่อนขีดเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ทำการเคลือบเมมเบรนหลังขีดเส้นทดสอบและเส้นควบคุมแล้ว และไม่ทำการเคลือบเมมเบรนด้วยสารละลาย 1% BSA แล้วนำอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำมาหยดบน conjugate pad 2 ไมโครลิตร นำทั้ง 2 ส่วนที่เตรียมเสร็จไปประกอบเป็นแถบทดสอบตามข้อ 3.4.4.5 นำแถบทดสอบไปทดสอบกับเคซีนที่ทำการละลายด้วย 0.01 M phosphate buffer pH 7.4 (PB), 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) และ 0.1% tween-20 ใน PB (PBT) ที่ความเข้มข้น 0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา



ภาพที่ 3.3 การตรึง C-line และ T-line บน Analytical membrane ด้วยกระดาษไลต์

3.4.5.2 หาภาวะที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad

นำเมมเบรนที่เลือกได้จากข้อ 3.4.5.1 มาติดกับส่วนคอนจูเกตที่มีการเจือจางมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำ 1:1 และ 1:2 เท่า แล้วทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา

3.4.5.3 หาภาวะที่เหมาะสมของการเตรียม T-line และ C-line

3.4.5.3.1 หาภาวะที่เหมาะสมของเคซินที่ T-line

นำเมมเบรนที่เลือกได้จากข้อ 3.4.5.1 มาขีดเคซินบน T-line ที่มีการทำการเจือจางด้วย PB ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และตรึง IgG-Fc ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ C-line ใช้ conjugate pad ที่หาภาวะที่เหมาะสมแล้วตาม 3.4.5.2 นำไปประกอบเป็นแถบทดสอบ แล้วทดสอบกับสารละลายเคซินในบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ที่ความเข้มข้น 0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา เลือกใช้ T-line ที่ใช้ปริมาณเคซินน้อยที่สุด แต่ยังคงสามารถเห็นสีที่ปรากฏบน T-line ได้ชัดเจนเมื่อทดสอบกับสารละลายที่ไม่มีเคซิน

3.4.5.3.2 หาภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line

นำเมมเบรนที่เลือกได้จากข้อ 3.4.5.1 มาตรึง IgG-Fc ที่มีการทำการเจือจางด้วย PB ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ลงบน C-line และตรึงเคซินบน T-line ตามความเข้มข้นที่เลือกได้จากข้อ 3.4.5.3.1 ใช้ conjugate pad ที่หาภาวะที่เหมาะสมแล้วตาม 3.4.5.2 นำไปประกอบเป็นแถบทดสอบ แล้วนำไปทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา เลือกใช้ความเข้มข้น IgG-Fc ที่เห็นสีซึ่งปรากฏบน C-line ได้ชัดเจน

3.4.6 การประเมินประสิทธิภาพของแถบทดสอบในการตรวจวัดเคซิน

การหาค่าตัดออก (cut-off value)

ทำการเตรียมแถบทดสอบโดยใช้ภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.5 แล้วนำแถบทดสอบไปตรวจสอบเคซินที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.5.1 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25

และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา และหาค่าคัดออก โดยทำการรายงานค่าเป็นความเข้มข้นของเคซินที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line จางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ C-line

3.4.7 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซินด้วยเครื่องจ่ายสารละลาย (เครื่องฉีด แถบทดสอบ Biodot รุ่น XYZ 3000)

3.4.7.1 หาภาวะที่เหมาะสมของเคซินที่ T-line และภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line

นำ analytical membrane ที่เลือกได้จากข้อ 3.4.5.1 มาติดลง plastic backing card แล้วนำไปฉีดเคซินที่ความเข้มข้น 0.0625-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บน T-line และฉีด IgG-Fc ความเข้มข้น 0.25-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่องฉีดแถบทดสอบ Biodot โดยมีระบบหัวจ่ายแบบลากสัมผัส ใช้อัตราการพ่น 0.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตัดแถบทดสอบมาประกอบกับ conjugate pad ที่หยด MAb-Colloidal gold ปริมาณ 4 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำ sample pad กับ absorbent pad ติดลงบน plastic backing card เสร็จแล้วจึงประกอบเข้ากับตลับพลาสติก นำมาทดสอบกับสารละลาย บัพเฟอร์ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา เลือกใช้แถบทดสอบที่สามารถเห็นสีที่ปรากฏบน T-line ได้ชัดเจนเมื่อทดสอบกับ สารละลายที่ไม่มีเคซิน และเลือกใช้ความเข้มข้น IgG-Fc ที่เห็นสีซึ่งปรากฏบน C-line ได้ชัดเจน

3.4.7.2 การหาค่าคัดออก

ทำการเตรียมแถบทดสอบโดยใช้ภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.7.1 แล้วนำแถบ ทดสอบไปตรวจสอบเคซินที่ละลายในบัพเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.5.1 ที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการทดสอบ ภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา และหาค่าคัดออก โดยทำการรายงานค่าเป็นความเข้มข้น ของเคซินที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line จางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ C-line

3.4.7.3 การประเมินการใช้แถบทดสอบเคซิน ตรวจสอบการปลอมปนของเคซินนม วัวกับตัวอย่างนมอื่นๆ

3.4.7.3.1 ศึกษาผลของเมทริกซ์ (matrix effect) ในตัวอย่างนมอื่นๆ

เจือจางนมแพะ นมกระป๋อง และนมถั่วเหลือง ให้มีระดับการเจือจาง 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1:1,500 (v/v) โดยจะทำการเจือจางในสารละลายบัพเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ

3.4.5.1 หลังจากนั้นปีเปิดสารละลายมาปริมาตร 150 มิลลิลิตร มาทำการทดสอบกับแถบทดสอบที่ได้จากข้อ 3.4.7.1 วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา

3.4.7.3.2 การหาค่าคัดออก

ทำการเตรียมตัวอย่างในนมอื่นๆ ตามระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ

3.4.7.3.1 ทำการเติมเคซีนของนมวัวลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปีเปิดสารละลายปริมาตร 150 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบในข้อ

3.4.7.1 วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา และหาค่าคัดออก โดยการรายงานค่าเป็นความเข้มข้นของเคซีนที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line จางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ C-line

3.4.7.3.3 การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

ทำการเตรียมตัวอย่างในนมอื่นๆ ตามระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ

3.4.7.3.1 ทำการเติมเคซีนของนมวัวลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปีเปิดสารละลายปริมาตร 150 ไมโครลิตร มาทดสอบกับแถบทดสอบในข้อ

3.4.7.1 วิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที อ่านผลด้วยสายตา วิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อประเมินความไว (sensitivity) ค่าการคัดเลือก (selectivity) ค่าความแม่นยำ (accuracy) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) โดยมีค่าคัดออก เท่ากับ ค่าคัดออก ในข้อ 3.4.7.3.2 และช่วงค่าที่ไม่แน่นอน (unreliability region หรือ indicator range) ซึ่งเป็นค่ากำหนด upper และ lower limit ในการกำหนดผลบวกหรือผลลบ เท่ากับ 2σ หรือเท่ากับ $\pm 47\%$ ของค่าคัดออก โดยจะทำการทดสอบในตัวอย่าง 40 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ค่าคัดออก 8 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ 16 ตัวอย่าง และทำการทดสอบ 4 วัน วันละ 10 ตัวอย่าง ก่อนจะนำผลมาคำนวณหาค่า ดังแสดงในตารางที่ 3.1 [50-52]

ตารางที่ 3.1 ดัชนีที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบ

ตัวบ่งชี้	ความหมาย	วิธีคำนวณ Cut-off $\pm 2\sigma$
ค่าความไว	ค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่มีเคซิน แล้วตรวจพบว่ามีเคซินในตัวอย่าง	$tp/(tp+fn)$
ค่าการคัดเลือก	ค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเคซิน แล้วตรวจพบว่าไม่มีเคซินในตัวอย่าง	$tn/(tn+fp)$
ค่าความแม่นยำ	ค่าที่บ่งบอกความสามารถของแถบทดสอบในการอ่านค่าผลบวกและผลลบ	$tp+tn/(tp+tn+fp+fn)$
ค่าทำนายผลบวก	ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นบวก (พบเคซินของนมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่แถบทดสอบตรวจพบเคซินในตัวอย่าง จริงๆ เท่าใด	$tp/(tp+fp)$
ค่าทำนายผลลบ	ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นลบ (ไม่พบเคซินของนมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่แถบทดสอบตรวจไม่พบเคซินในตัวอย่าง จริงๆ เท่าใด	$tn/(tn+fn)$

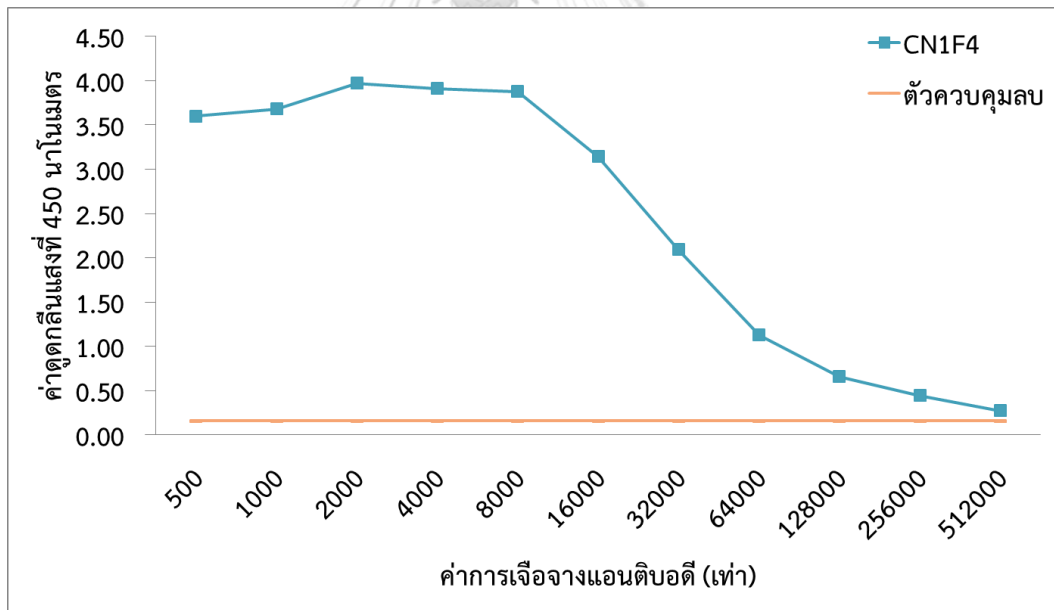
* ความหมายและคำย่อที่ใช้: tp, ผลบวกจริง (เคซิน เท่ากับ $2\sigma + \text{cut-off}$ หรือ เคซิน เท่ากับ cut-off); tn, ผลลบจริง (เคซิน เท่ากับ $\text{cut-off} - 2\sigma$); fn, ผลลบปลอม; fp, ผลบวกปลอม; n, จำนวนตัวอย่าง เท่ากับ 40 ตัวอย่าง

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การตรวจวัดระดับมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

นำมอนอโคลนอลแอนติบอดี มาทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเคซีน โดยทำการเจือจางมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS ระหว่าง 500-512,000 เท่า และมีตัวควบคุมลบ เป็น PBS ที่ไม่มีการเติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีลงไป เพื่อแสดงให้เห็นถึงการไม่เกิดปฏิกิริยาตอบสนองของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับเคซีน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4.1 (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.1) จะพบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบแล้ว มอนอโคลนอลแอนติบอดี มีค่าดูดกลืนแสงสูงกว่า แสดงว่ายังคงมีความสามารถในการตอบสนองต่อเคซีนได้ดี แต่ต้องเลือกช่วงค่าการเจือจางให้เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

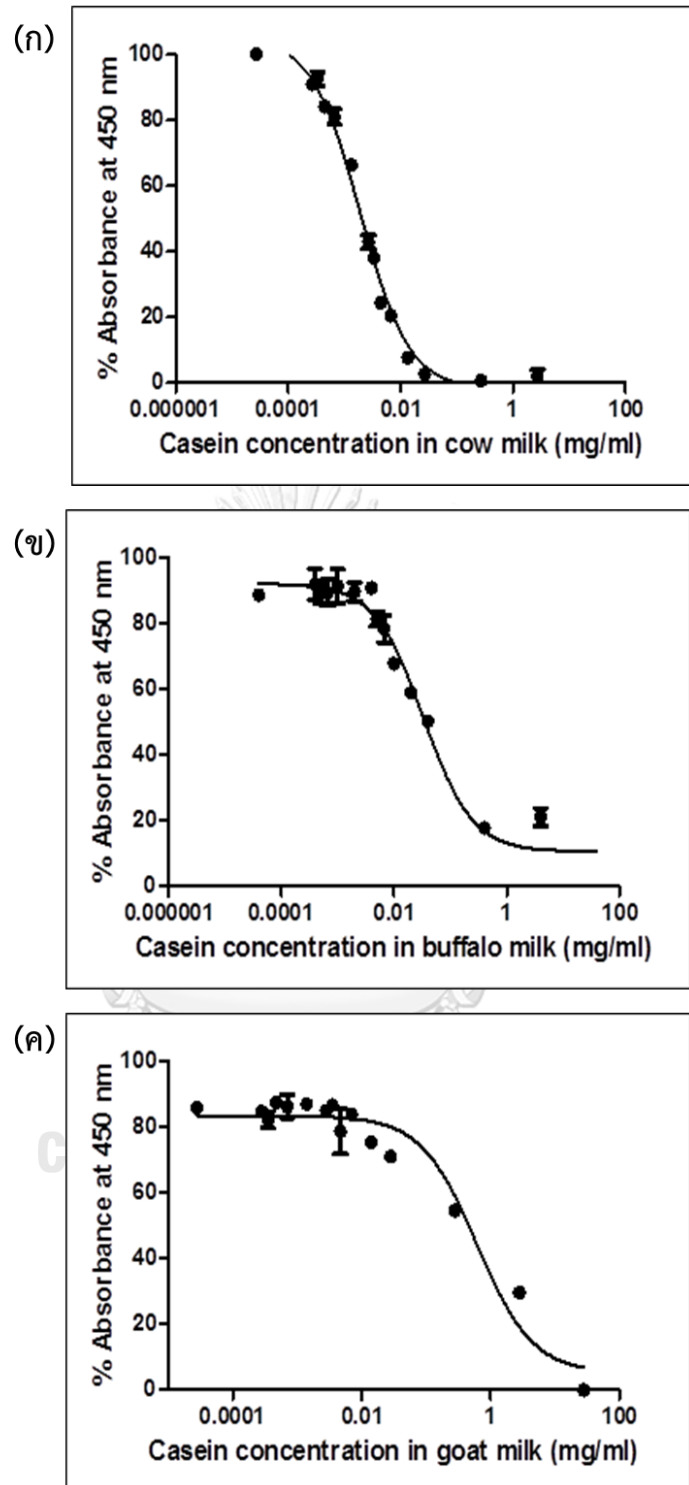


ภาพที่ 4.1 ระดับปฏิกิริยาการตอบสนองของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (CN1F4) ต่อเคซีน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วยเคซีนความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีทุติยภูมิ (GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราการเจือจาง 1:10,000

4.2 การตรวจการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น

ในการตรวจการทำปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี ต่อสารอื่นด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการใช้สารที่ต้องการทดสอบมาทำการแย่งจับกับเคซีนจากนมวัว ในการจับกับแอนติบอดี เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (IC_{50}) แล้วนำค่า IC_{50} นี้ไปเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมวัว แต่เนื่องจากไม่สามารถหาสารเคซีนมาตรฐานที่มาจากนมกระป๋อง และนมแพะได้ จึงใช้นมกระป๋อง และนมแพะในการทดสอบแทน โดยการทำการเจือจางนมที่ระดับต่างๆ แล้วจึงคำนวณเป็นปริมาณเคซีน โดยอาศัย ปริมาณเคซีนในนมทั้ง 2 ชนิด ที่ได้มีผู้เคยรายงานไว้ [53] ซึ่งพบปริมาณเคซีนในนมวัวที่ 2.46-2.80 กรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมนมวัว พบปริมาณเคซีนในนมกระป๋องที่ 4.0 กรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมนมกระป๋อง และพบปริมาณเคซีนในนมแพะที่ 2.81 กรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมนมแพะ เมื่อนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 5 จะได้ภาพ ดังภาพที่ 4.2 (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.2-ก.4)





ภาพที่ 4.2 ค่า IC_{50} จากการใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 5: (ก) เคซีนในนมวัว (ข) เคซีนในนมกระป๋อง และ (ค) เคซีนในนมแพะ

เมื่อหาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมกระป๋อง และนมแพะ ได้ จึงนำมาคำนวณเทียบกับ IC_{50} ของเคซีนจากนมวัว หาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนในนมอื่น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อสารอื่นด้วยวิธี indirect competitive ELISA

สารที่ทำการทดสอบ	IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเกิดปฏิกิริยาข้าม (%)
นมวัว	0.002	100
นมกระป๋อง	0.033	5.7
นมแพะ	0.615	0.3

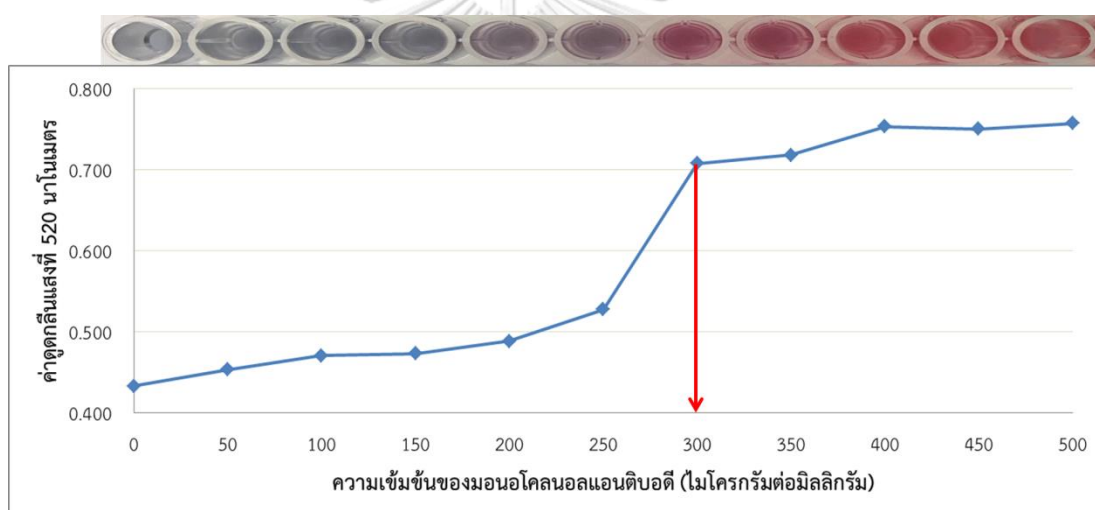
จากตารางจะพบว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีจำเพาะกับโบไวน์เคซีนในนมวัว เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเคซีนจากนมกระป๋อง และเคซีนจากนมแพะ ได้ 5.7% และ 0.3% ตามลำดับ ซึ่งถือว่าการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้น้อย และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับเคซีนจากนมกระป๋องที่พบ 5.7% นั้น หากมีการทำการเจือจางตัวอย่างนมกระป๋อง จะสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ กล่าวได้ว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดี เป็นแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้พัฒนาเป็นแถบทดสอบสำหรับตรวจวัดเคซีนจากนมวัวต่อไป

4.3 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร

4.3.1 การหาความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ

ในการเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีติดกับอนุภาคทองคำนั้น ปริมาณของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมถือว่าเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากปริมาณของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้จะมีผลต่อความเสถียรของอนุภาคทอง รวมไปถึงการส่งผลต่อความไวของแถบทดสอบ ดังนั้นจึงต้องมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จะนำไปเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ โดยทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วผสมเข้ากับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร มีค่าความทึบแสง (optical density; OD) อยู่ที่ 1.168 หลังจากเติม NaCl แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.5) จากภาพที่ 4.3 จะพบว่า หลังจากทำการเติม NaCl ลงไป หากใช้ปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีตั้งแต่ 300

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป สีของสารละลายอนุภาคทองคำยังคงเป็นสีม่วงแดง ไม่มีการจับกันเกิดการตกตะกอนลงมา แต่ถ้าหากใช้ปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีน้อยกว่า 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีของสารละลายอนุภาคทองคำจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีเทา เนื่องจากประจุในสารละลายมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้อนุภาคทองคำที่ไม่ติดกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีเกิดการจับกันแล้วตกตะกอนลงมา และเมื่อนำสารละลายมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจะพบว่าคุณภาพที่เข้มข้นที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร คือ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุด ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด หรือปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยที่สุด ที่ทำให้สีของสารละลายอนุภาคทองคำไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีไป

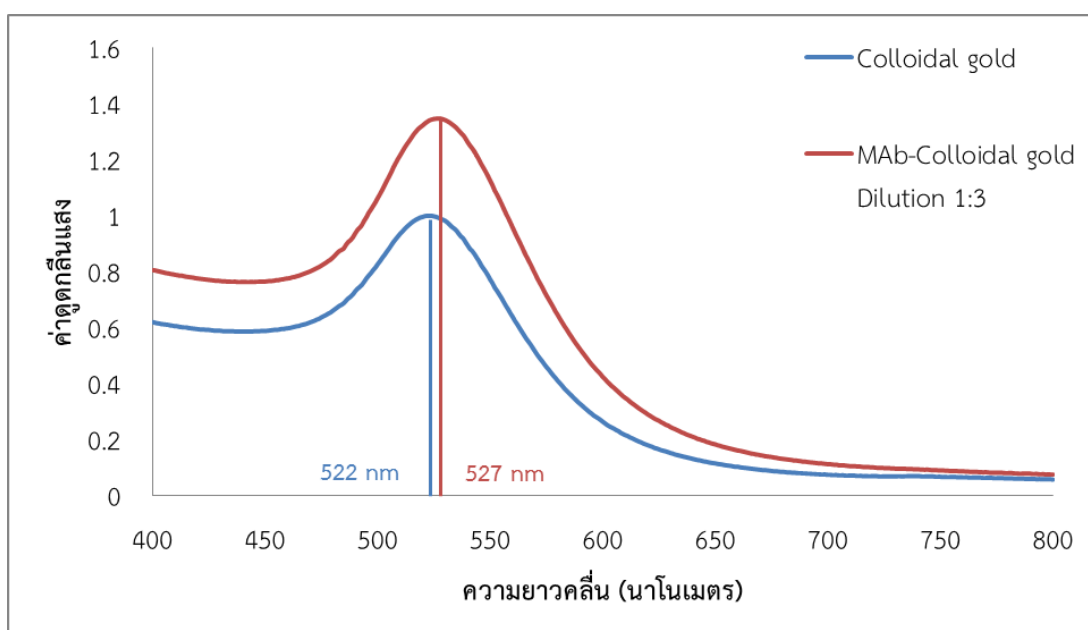


ภาพที่ 4.3 ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร

4.3.2 การเชื่อมมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ

นำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยจะมีอัตราส่วน ปริมาตรมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุภาคทองคำเท่ากับ 1:10 (V/V) และอนุภาคทองคำที่ใช้ในการทดลองมีค่าความทึบแสงอยู่ที่ 1.168 หลังจากนั้นนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร เพื่อหาค่า λ_{\max} ของสารละลายมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ซึ่งถ้ามอนอโคลนอลแอนติบอดี

สามารถเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ค่า λ_{\max} จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับค่า λ_{\max} ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ไม่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ค่า λ_{\max} ของสารละลายอนุภาคทองคำ มีค่าเท่ากับ 522 นาโนเมตร ในขณะที่ค่า λ_{\max} ของสารละลายมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ มีค่าเท่ากับ 527 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.4 แสดงว่าสารละลายมอนอโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับอนุภาคทองคำเรียบร้อยแล้ว สามารถนำไปใช้งานในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมของสารละลายอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร (—) และ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร (—)

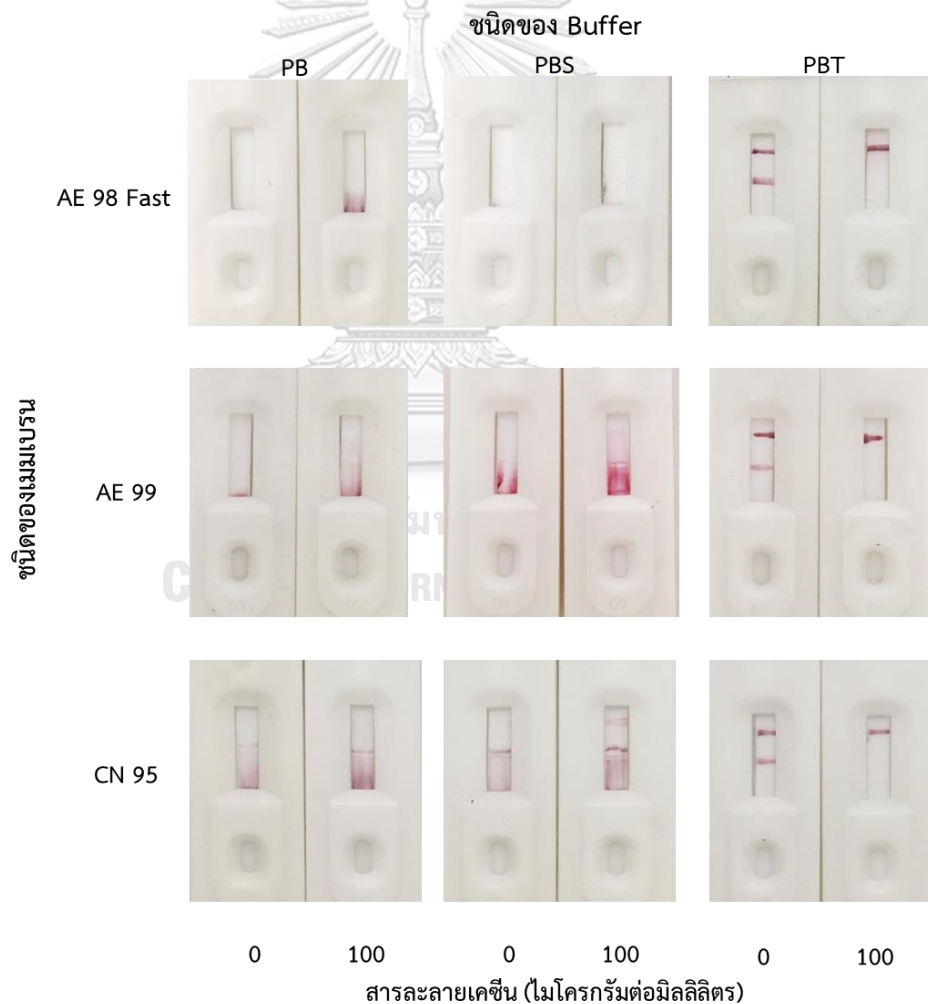
4.4 การเตรียมแถบทดสอบ lateral flow immunochromatographic Assay (LFIA)

ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้รูปแบบในการไหลในแนวระนาบ ในรูปแบบแข่งขัน (competitive assay format) โดยมีวิธีการใส่สารละลายบนแถบทดสอบ 2 วิธี คือ การประทับด้วยขอบของกระดาษสไลด์ และการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Biodot รุ่น XYZ 3000)

4.4.1 การศึกษาผลของบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรน โดยการประทับด้วยขอบของกระดาษสไลด์

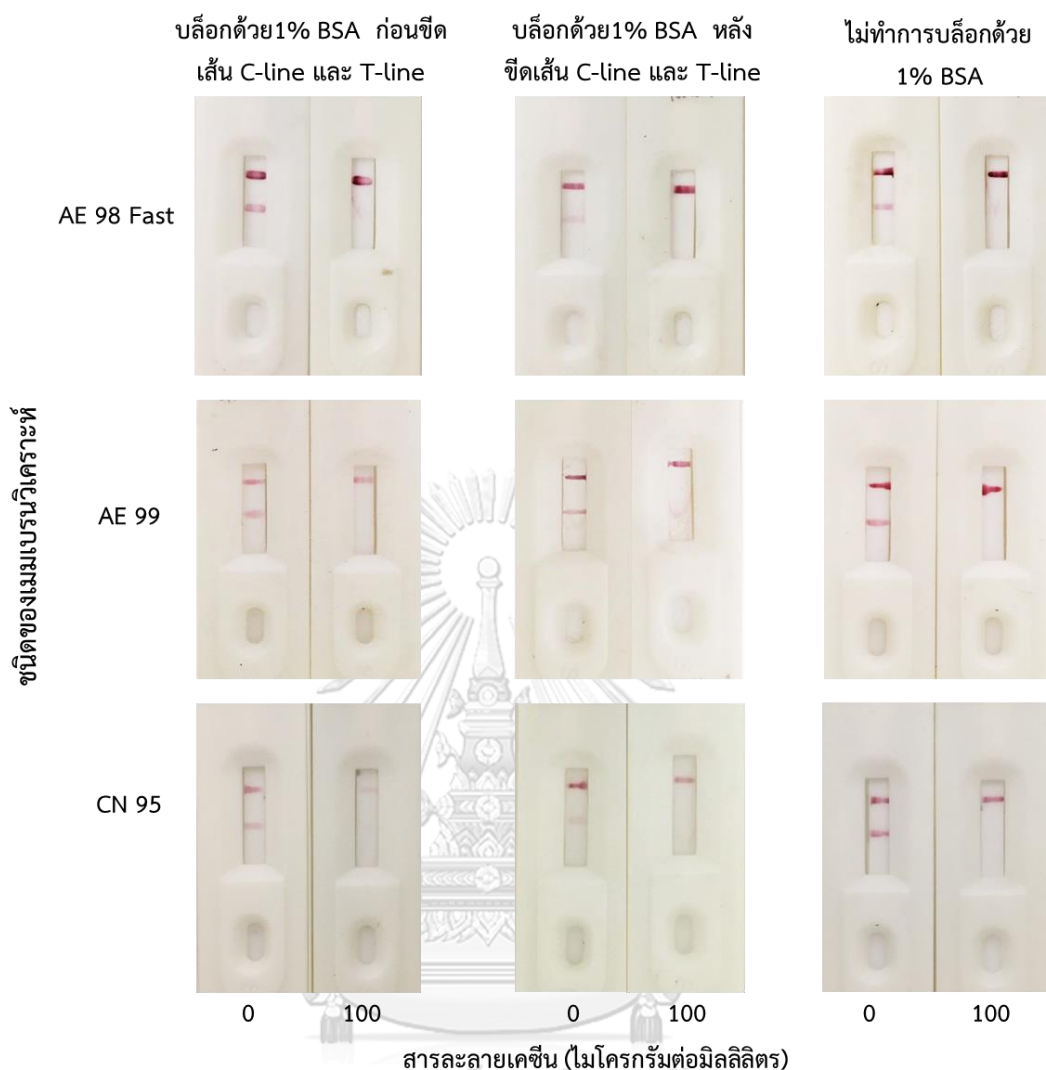
ในการทดสอบนี้ใช้เมมเบรนวิเคราะห์ 3 ชนิด ได้แก่ AE98fast, AE99 และ CN95 มาศึกษาผลของบัฟเฟอร์ โดยให้นำแถบทดสอบไปทดสอบกับเคซีนที่ทำการละลายในบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ได้แก่ PB, PBS และ PBT ทั้งนี้ในการทดสอบจะทำการตรึง IgG-Fc ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ C-line และตรงเคซิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ T-line และนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร นำแถบทดสอบไปทดสอบกับเคซินที่ทำการละลายด้วยบัฟเฟอร์ PB, PBS และ PBT ที่ความเข้มข้น 0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.1) จากภาพที่ 4.5 จะพบว่า เคซินที่ทำการละลายด้วยบัฟเฟอร์ PB และ PBS มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำไม่สามารถไหลผ่านไปยังแถบทดสอบได้ทั่วทั้งแถบทดสอบ ก่อให้เกิดคราบสีม่วงแดงบนผิวของเมมเบรนวิเคราะห์ ส่งผลให้ไม่สามารถอ่านผลการทดสอบได้ ต่างจากการใช้กับเคซินที่ทำการละลายด้วยบัฟเฟอร์ PBT ที่แถบทดสอบ สามารถเห็นเส้นทดสอบและเส้นควบคุมได้อย่างชัดเจน ไม่เกิดคราบสีม่วงแดงทั้งไว้บนผิวของเมมเบรนวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ PBT เป็นบัฟเฟอร์ของงานวิจัยต่อไป



ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างการทดสอบเคซินที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ด้วยแถบทดสอบที่ใช้เมมเบรนวิเคราะห์ชนิดต่างๆ

ส่วนในการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA โดยแบ่งการเคลือบเมมเบรนออกเป็น 2 แบบ คือ การเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรน และการเคลือบเมมเบรนก่อนการตรึงสารบนเมมเบรน เทียบกับการไม่เคลือบเมมเบรน โดยในการที่ทำการเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรนนั้น คาดว่าโปรตีนที่นำมาเคลือบเมมเบรน จะไปเกาะลงบนบริเวณพื้นที่ผิวของเมมเบรนทั้งหมด ส่งผลให้เมื่อนำสารละลายมาทดสอบ ทำให้สารละลายไหลผ่านได้ดีขึ้น สารที่ต้องการทดสอบ หรือแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำไม่ติดลงบนเมมเบรนวิเคราะห์ สามารถไหลไปได้ตลอดทั้งแผ่น ส่วนในการเคลือบเมมเบรนก่อนการตรึงสารบนเมมเบรนนั้น เพื่อทดสอบดูว่าสารที่ตรึงลงบนเมมเบรน จะไม่ถูกเคลือบโดยโปรตีนที่นำมาเคลือบเมมเบรน แต่ตัวโปรตีนที่นำมาเคลือบเมมเบรนก่อนจะลงไปเกาะบนบริเวณพื้นที่ผิวของเมมเบรนทั้งหมด แล้วช่วยให้สารละลายที่นำมาทดสอบไหลผ่านเมมเบรนได้ดีขึ้น สารที่ต้องการทดสอบ หรือแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำไม่สามารถติดลงบนเมมเบรนวิเคราะห์ แล้วจึงทำการเทียบผลกับการไม่เคลือบเมมเบรน โดยในการทดสอบจะทำการตรึง IgG-Fc ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ C-line และตรึงเคซีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ที่บริเวณ T-line และนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร นำแถบทดสอบไปทดสอบกับเคซีนที่ทำการละลายด้วยบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.2) จากภาพที่ 4.6 พบว่าในการเคลือบเมมเบรนวิเคราะห์ 3 ชนิด ด้วยสารละลาย 1% BSA ทั้งก่อนขีดเส้นทดสอบและเส้นควบคุม หลังขีดเส้นทดสอบและเส้นควบคุม และไม่เคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA แถบทดสอบทั้งหมดยังคงสามารถอ่านผลการทดสอบได้ แต่มีแนวโน้มว่าแถบทดสอบที่ไม่ทำการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA สามารถเห็นแถบสีได้ชัดเจนกว่า แสดงว่าการไม่เคลือบเมมเบรนวิเคราะห์ ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการใช้ของสารละลาย ไม่ว่าจะเป็สารละลายเคซีน หรือแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีไม่เคลือบเมมเบรนในการทดลองต่อไป เพื่อไม่ทำให้ระบบยุ่งยาก ซับซ้อนขึ้นไปกว่าเดิม ทั้งนี้จากการศึกษาผลของบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรน จึงตัดสินใจเลือกใช้ CN 95 เป็น เมมเบรนวิเคราะห์ เนื่องจากสามารถอ่านผลการของแถบทดสอบได้ชัดเจน ประกอบกับโรงงานที่ผลิต AE 98 Fast และ AE 99 ยกเลิกการผลิตเมมเบรนวิเคราะห์ ทั้ง 2 ชนิด CN 95 จึงเป็นเมมเบรนวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการทำการแถบทดสอบ โดย CN 95 ที่นำมาใช้ทำแถบทดสอบนั้น ไม่จำเป็นต้องทำการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ PBT เป็นบัฟเฟอร์ในการทดลองต่อไป

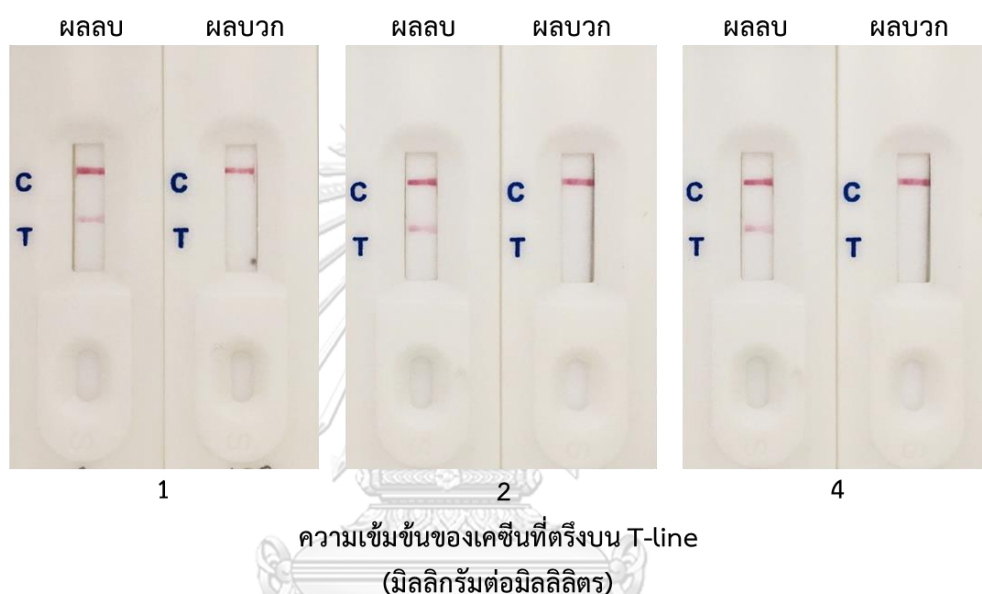


ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างการทดสอบเคซีนด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT เคลือบเมมเบรนก่อน และเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรน และไม่เคลือบเมมเบรน

4.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของเคซีนที่ T-line โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของเคซีนที่ T-line จะทำการตรึงเคซีนที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรงตำแหน่ง T-line โดย C-line ใช้ความเข้มข้นของ IgG-Fc คงที่ ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปทดสอบกับเคซีนที่ทำการละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลองที่แต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.3) จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มข้น

ของเคซินไม่ส่งผลต่อความเข้มสีของ T-line ความเข้มสีของ T-line ยังคงคงที่ (ภาพที่ 4.7) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกเคซิน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมของเคซินที่ T-line เพราะถึงแม้ความเข้มข้นของเคซินจะไม่ส่งผลต่อความเข้มสีของ T-line แต่ปริมาณความเข้มข้นของเคซินที่น้อยกว่าจะส่งผลต่อความไวของแถบทดสอบ ซึ่งในการหาภาวะที่เหมาะสมของเคซินที่ T-line นั้น ควรเลือกความเข้มข้นของเคซินที่ต่ำที่สุด แต่ยังคงสามารถเห็นแถบสีบน T-line ได้ชัดเจน สามารถอ่านผลแถบทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ภายใน 15 นาที

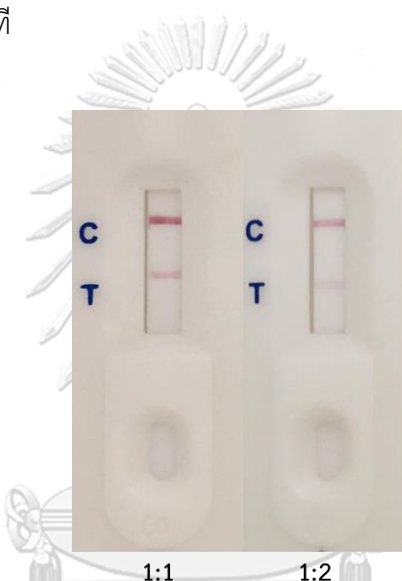


ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างการทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการตรึงเคซินด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

4.4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad

ในการทำแถบทดสอบนั้น ปริมาณของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากปริมาณของสารจะส่งผลถึงความเข้มสี ที่บริเวณ T-line และ C-line และส่งผลถึงค่าความไวของแถบทดสอบ จากการทดลอง 4.4.2 จะได้ว่าความเข้มข้นของ T-line ที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำมาใช้ศึกษาค่าการเจือจางของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ 1:2 และที่ไม่ทำการเจือจาง โดยจะทำการปิเปตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ค่าการเจือจางต่างๆ 4 ไมโครลิตร ลงบน conjugate pad ซึ่งเป็นแผ่นใยแก้ว GF 33 ก่อนจะนำไปประกอบเป็นแถบทดสอบ แล้วทำการทดสอบด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ PBT ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลองที่แต่ละระดับค่าความเจือจาง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.4) จากผลการทดลองที่ได้ดังภาพ 4.8 พบว่าเมื่อมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำเจือจาง ค่าความเข้มข้น T-line และ C-line จะจางลงเช่นกัน เนื่องจากปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่น้อยลง ส่งผลต่อความสามารถในการจับเคซีนบนบริเวณ T-line และ IgG-Fc บน C-line ได้น้อยลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ระดับการเจือจาง 1:2 ความเข้มข้นบริเวณ T-line จางมากจนแทบจะไม่เห็นสีม่วงแดง เพราะมอนอโคลนอลแอนติบอดีมีปริมาณน้อยเกินไป ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad ที่ไม่ทำการเจือจาง โดยพิจารณาจากความเข้มของแถบสีบน T-line ซึ่งยังคงสามารถอ่านผลของแถบทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ภายใน 15 นาที



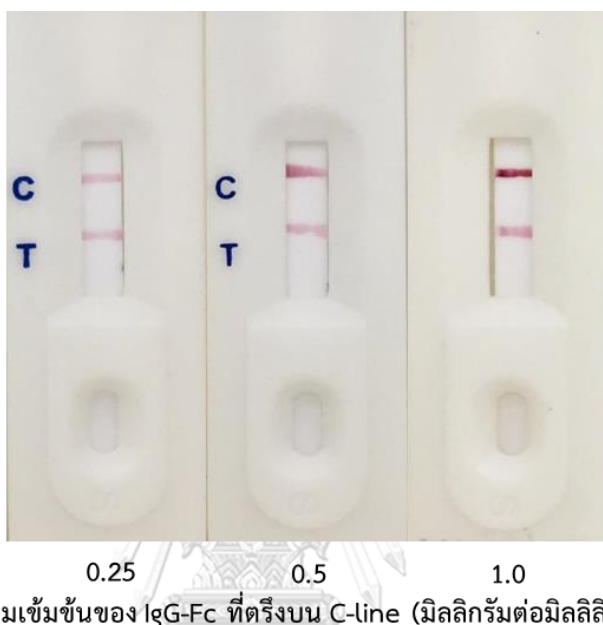
ค่าการเจือจางของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำ

ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างการทดสอบระดับค่าการเจือจางต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad ด้วยแถบทดสอบ

4.4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมของ IgG-Fc ที่ C-line โดยการประทับด้วยขอบของกระดาษสไลด์

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของของ IgG-Fc ที่ C-line จะทำการตรึง IgG-Fc ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรงตำแหน่ง C-line และจากการทดลอง 4.4.2 กับ 4.4.3 จะได้ความเข้มข้นของ T-line ที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ไม่ทำการเจือจางมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลองที่แต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.5) จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ IgG-Fc จะส่งผลต่อ

ความเข้มสีของ C-line ด้วย (ภาพที่ 4.9) ซึ่งในแถบทดสอบนั้น C-line จะทำหน้าที่บ่งบอกว่าแถบทดสอบยังคงสามารถใช้งานได้เป็นปกติ แต่ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับความไวของแถบทดสอบ โดยทั่วไปจะทำการเลือกความเข้มข้นของ IgG-Fc ที่ให้ค่าความเข้มสีของ C-line ใกล้เคียงกับ T-line ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ IgG-Fc ที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการพัฒนาแถบทดสอบต่อไป

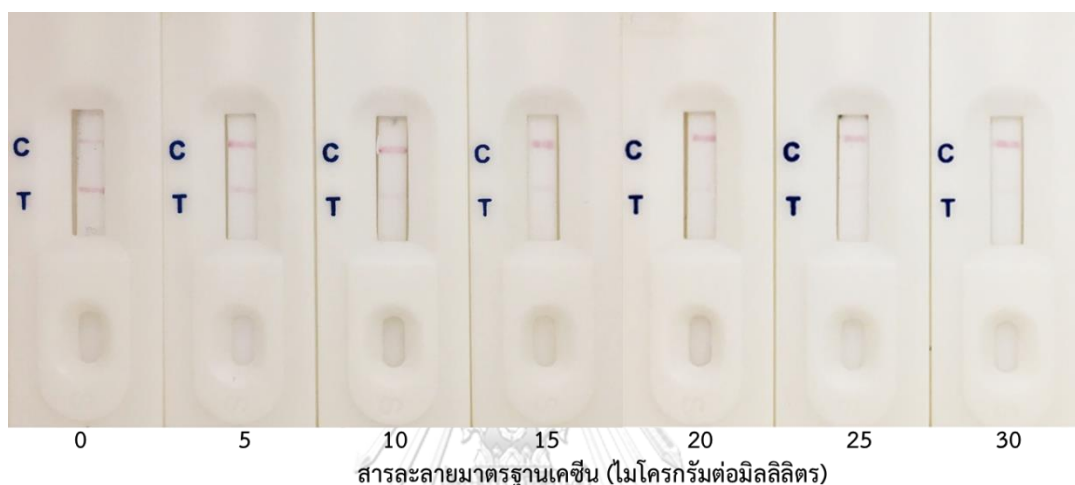


ภาพที่ 4.9 ตัวอย่างการทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ทำการตรึง IgG-Fc ด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

4.4.5 การหาค่าคัตออฟ (cut-off value)

ในการหาค่าคัตออฟจะทำการเตรียมแถบทดสอบตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.4.2-4.4.4 แล้วนำแถบทดสอบที่เตรียมไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐานเคซินในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลองที่แต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.6) ทำการอ่านผลแถบทดสอบด้วยตาเปล่า ภายใน 15 นาที โดยค่าคัตออฟ คือค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้ความเข้มสีของ T-line จางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ C-line เนื่องจากความเข้มข้นของเคซินในสารละลายมาตรฐานเพิ่มมากขึ้น เคซินที่อยู่ในสารละลายจะไปจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำ ที่อยู่บน conjugate pad ทำให้เหลือปริมาณมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำไปจับเคซินบริเวณ T-line ได้น้อยลง ส่งผลให้ความเข้มสีจางลง แต่ถ้ามอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำถูกจับจนหมด ก็จะไม่ปรากฏแถบสีม่วงแดงที่ T-line จากผลการทดลองจะพบว่าเมื่อสารละลายมาตรฐานเคซินเพิ่มมากขึ้น

เป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มข้นของ T-line จะลดลง และที่สารละลายมาตรฐานเคซีน มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบสีที่ T-line จะจางหายไปอย่างสมบูรณ์ ดังภาพที่ 4.10 แสดงว่าแถบทดสอบที่ทำการพัฒนาขึ้นนี้มีค่าคutoffของเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT คือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้ามีเคซีนปนเปื้อนต่ำกว่านี้จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีเคซีนในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไม่มีเคซีนในสารที่นำมาทดสอบ



ภาพที่ 4.10 ตัวอย่างการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคutoffโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

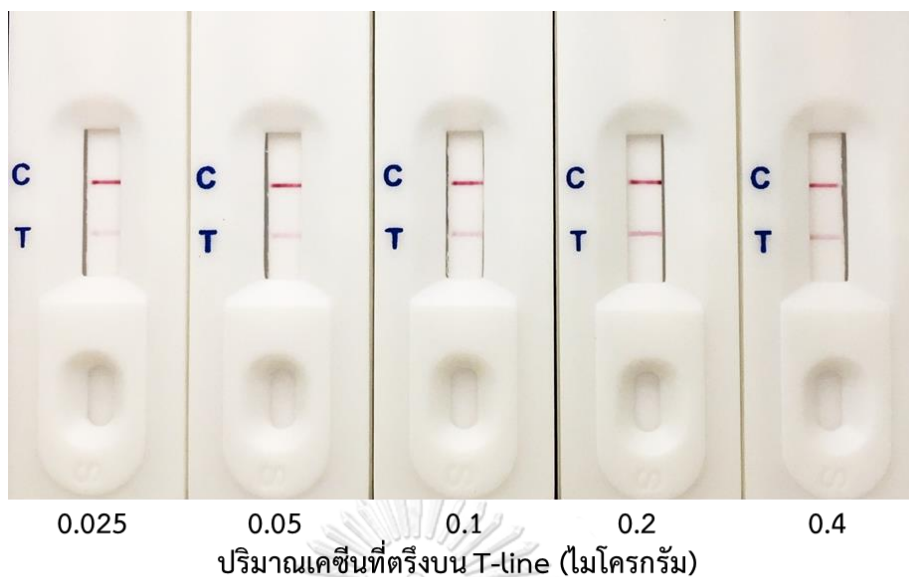
4.4.6 การหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีน ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Biodot รุ่น XYZ 3000) วิทยาลัย

จากการเตรียมแถบทดสอบโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์นั้น จะพบว่าแถบทดสอบที่เตรียมสามารถตรวจสอบเคซีนได้ และมีค่าคutoffอยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เป็นการเตรียมแถบทดสอบสำหรับการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากการเตรียมแถบทดสอบด้วยวิธีนี้ มีการใช้ปริมาณสารน้อยกว่าการใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ แต่สามารถระบุขอบเขตความเข้มข้นของสารที่จะนำมาใช้ในการทำแถบทดสอบ ก่อนที่จะนำไปหาภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบเคซีนด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติได้ นอกจากนี้ข้อมูลบางส่วนที่ได้จากการทำการทดสอบแถบทดสอบโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์ จะถูกนำมาใช้ต่อเนื่องในการเตรียมแถบทดสอบด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ เช่น ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ และวิธีการเคลือบเมมเบรนวิเคราะห์ เป็นต้น ซึ่งในการเตรียมแถบทดสอบ จะใช้เครื่องดูด

จ่ายสารละลายอ็อนโมติ Biodot รุ่น XYZ 3000 สำหรับขีด T-line และ C-line ก่อนจะนำมาตัดให้มีขนาดกว้าง 4 มิลลิเมตร แล้วประกอบเป็นแถบทดสอบต่อไป

4.4.6.1 การหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเคซินที่ T-line ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูจ่ายสารละลายอ็อนโมติ

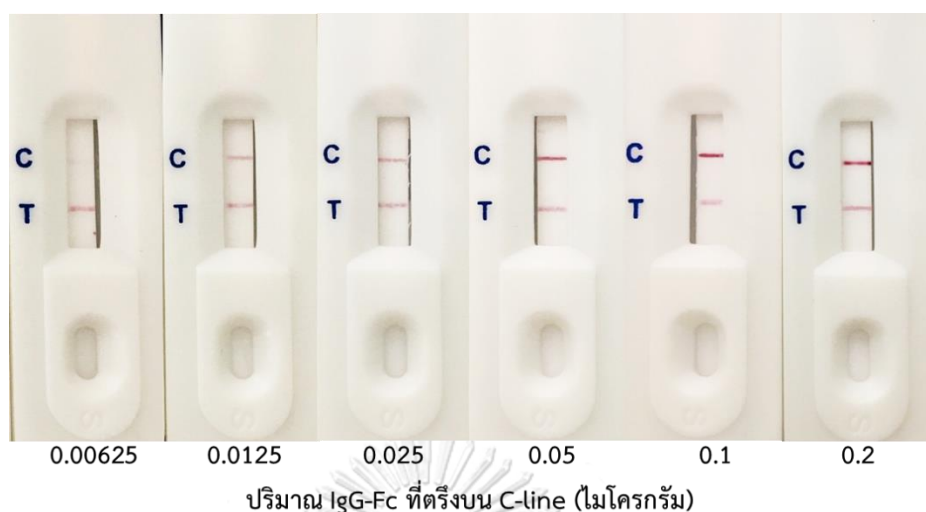
ในการจ่ายสารละลาย T-line ด้วยเครื่องดูจ่ายสารละลายนั้น จะนำ CN95 ที่ไม่ได้ทำการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA มาติดลงบน plastic backing card จ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูจ่ายสารละลายอ็อนโมติให้บริเวณ T-line มีปริมาณเคซินที่ 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 ไมโครกรัม ต่อแถบทดสอบ และบริเวณ C-line มีปริมาณ IgG-Fc ที่ 0.1 ไมโครกรัมต่อแถบทดสอบ หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตัดแถบทดสอบมาประกอบกับ conjugate pad ที่หยดมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ไม่ทำการเจือจาง ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากผลการทดลองพบว่า เมื่อปริมาณเคซินที่ตรึงบน T-line เพิ่มขึ้น ความเข้มสีที่ T-line จะเข้มตามขึ้นไปด้วย ซึ่งจากภาพที่ 4.11 จะแสดงให้เห็นว่าปริมาณเคซินที่เหมาะสมสำหรับตรึงลงบน T-line อยู่ที่ 0.2 ไมโครกรัม โดยทำการพิจารณาจากความเข้มสีที่ T-line ที่สามารถมองเห็นแถบสีได้ชัดเจน ต่างจากปริมาณเคซินที่ 0.025, 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม ที่มีความเข้มสีจางกว่า เนื่องจากมีปริมาณเคซินที่ตรึงอยู่บน T-line น้อยเกินไป ในทางกลับกันที่ปริมาณเคซิน 0.4 ไมโครกรัม สามารถมองเห็นแถบสีที่ T-line ได้ชัดเจนเช่นเดียวกับที่ปริมาณเคซิน 0.2 ไมโครกรัม แต่การเลือกปริมาณเคซินที่น้อยกว่าจะส่งผลต่อความไวของแถบทดสอบที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ T-line ที่มีปริมาณเคซิน 0.2 ไมโครกรัม สำหรับพัฒนาแถบทดสอบต่อไป



ภาพที่ 4.11 การทดสอบเคซีนด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการตรึงปริมาณเคซีนที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่องดูค่าสารละลายอัตโนมัติ

4.4.6.2 การหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ IgG-Fc ที่ C-line ด้วยการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูค่าสารละลายอัตโนมัติ

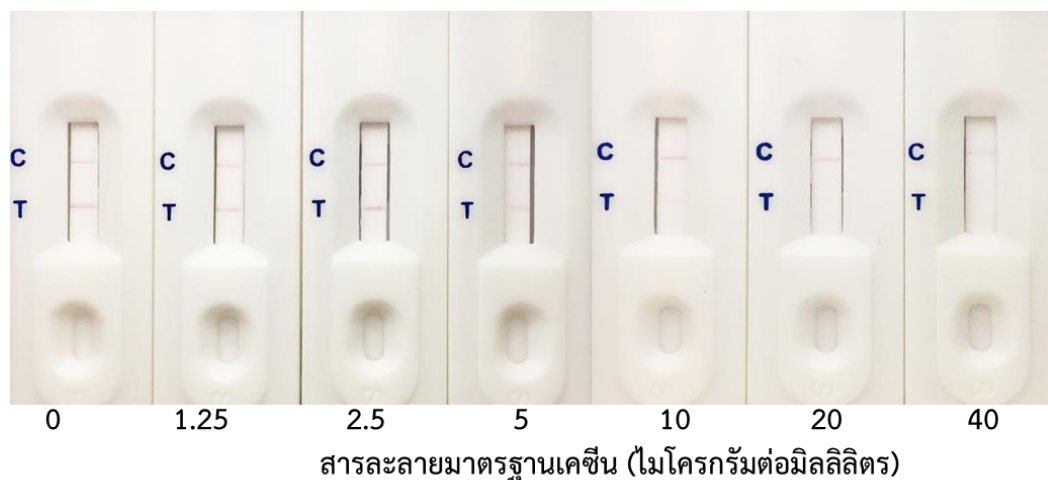
ในการหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ IgG-Fc ที่ C-line จะทำการตรึง IgG-Fc ที่ 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อแถบทดสอบ ตรงตำแหน่ง C-line และจากการทดลอง 4.4.6.1 จะได้ปริมาณเคซีนบน T-line ที่เหมาะสมคือ 0.2 ไมโครกรัมต่อแถบทดสอบ และใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ไม่ทำการเจือจางมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณของ IgG-Fc ที่ตรึงบนแถบทดสอบจะส่งผลต่อความเข้มสีของ C-line ด้วย ซึ่งจากภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าหากมีการตรึงปริมาณของ IgG-Fc ที่ 0.00625 ไมโครกรัม ความเข้มสีบน C-line จะจางจนแถบมองไม่เห็น จึงไม่มีความเหมาะสมที่จะใช้ปริมาณสารดังกล่าวตรึงลงบน C-line เพราะ C-line บนแถบทดสอบจะทำหน้าที่บ่งบอกว่าแถบทดสอบยังคงสามารถใช้งานได้เป็นปกติหรือไม่ และในการทดลองนี้จะเลือกใช้ปริมาณของ IgG-Fc ที่ให้ค่าความเข้มสีของ C-line ใกล้เคียงกับค่าความเข้มสีของ T-line เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับค่าความเข้มสีของ T-line เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของเคซีนปลอมปนแล้วค่าความเข้มสีของ T-line จะจางหายไปเมื่อเทียบกับความเข้มสีของ C-line ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ปริมาณของ IgG-Fc ที่ 0.0125 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการพัฒนาแถบทดสอบต่อไป



ภาพที่ 4.12 การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการตรึงปริมาณ IgG-Fc ที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่องดูจ่ายสารละลายอัตโนมัติ

4.4.6.3 การหาค่าคัดออกของแถบทดสอบที่ทำด้วยเครื่องดูจ่ายสารละลายอัตโนมัติ

จากการศึกษาจะได้ภาวะในการเตรียมแถบทดสอบ คือ ปริมาณเคซินที่ตรึงบน T-line ที่ 0.2 ไมโครกรัม ปริมาณของ IgG-Fc ที่ตรึงบน C-line 0.0125 ไมโครกรัม และใช้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำที่ไม่ทำการเจือจางมาหยดบน conjugate pad 4 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปหาค่าคัดออก โดยการนำแถบทดสอบที่เตรียมไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐานเคซินในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดลองที่แต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.7) ทำการอ่านผลแถบทดสอบด้วยตาเปล่า ภายใน 15 นาที จากภาพที่ 4.13 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของเคซินในสารละลายมาตรฐานเพิ่มมากขึ้นเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มสีบริเวณ T-line จะจางลง เนื่องจากปริมาณเคซินที่อยู่ในสารละลายไปแย่งจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำ ทำให้ไม่เหลือไปจับกับเคซินที่ตรึงไว้ที่ T-line และที่สารละลายมาตรฐานเคซินมีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบสีที่ T-line จะจางหายไปอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าแถบทดสอบที่ทำการพัฒนาขึ้นนี้มีค่าคัดออกอยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้ามีเคซินปนเปื้อนต่ำกว่านี้จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีเคซินในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไม่มีเคซินในสารที่นำมาทดสอบ



ภาพที่ 4.13 ตัวอย่างการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกด้วยเครื่องดูค่าสายสารละลายอัตโนมัติ

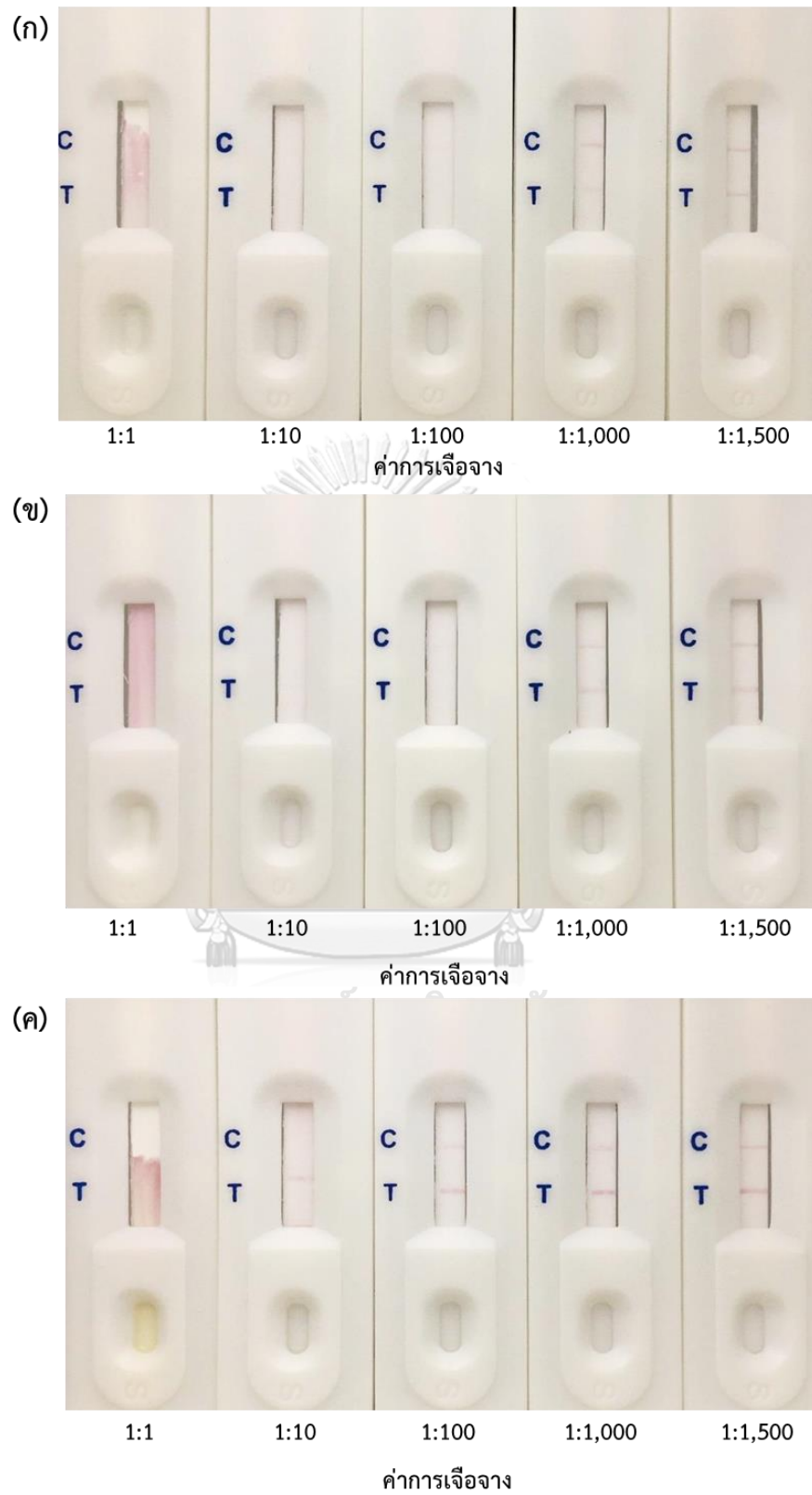
4.5 การประเมินการใช้แถบทดสอบเคซีน ตรวจสอบการปลอมปนของเคซีนนมวัวกับตัวอย่างนมอื่นๆ

4.5.1 การศึกษาผลของเมทริกซ์ (matrix effect) ในตัวอย่างนมอื่นๆ

เมทริกซ์ เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ โดยองค์ประกอบอื่นๆที่อยู่ในตัวอย่าง เช่น ไขมัน แร่ธาตุ หรือสารอื่นๆ อาจส่งผลต่อการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งส่งผลต่อค่าความไว และค่าความเข้มข้นของแถบทดสอบ ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่าง นมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลืองมาประเมินแถบทดสอบ โดยทำการเจือจางตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ให้มีระดับการเจือจาง 1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1:1,500 (v/v) เนื่องจากการเจือจางเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดผลของเมทริกซ์ภายในตัวอย่างได้ หลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบกับแถบทดสอบ จากภาพที่ 4.14 จะแสดงให้เห็นว่า ในตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับการเจือจาง 1:1 ตัวอย่างนมทั้งหมดไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนวิเคราะห์ได้ และเมื่อเพิ่มระดับการเจือจางไปที่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ตัวอย่างนมที่นำมาทดสอบทั้ง 3 ชนิดสามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนวิเคราะห์ได้ แต่เมทริกซ์ที่อยู่ในตัวอย่างได้ส่งผลกระทบต่อค่าความเข้มข้นของแถบทดสอบ ส่งผลให้ไม่สามารถเห็นแถบสีได้อย่างชัดเจน ต่างจากระดับการเจือจางที่ 1:1,500 ที่ตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิดสามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนวิเคราะห์ได้ แม้เมทริกซ์ที่อยู่ในตัวอย่างจะส่งผลกระทบต่อค่าความเข้มข้นของแถบทดสอบ หากแต่ยังคงสามารถเห็นแถบสีบริเวณ T-line และ C-line ได้ ทั้งนี้จากผลการทดลองจะพบว่า การเพิ่มระดับการเจือจาง มีผลต่อการลดเมทริกซ์ในตัวอย่าง แต่การเจือจางตัวอย่าง

หลายๆ เท่า จะส่งผลต่อความไวของแถบทดสอบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ระดับการเจือจาง ตัวอย่างที่1:1,500 ซึ่งเป็นค่าระดับการเจือจางที่ต่ำที่สุด แล้วยังคงอ่านผลของแถบทดสอบได้

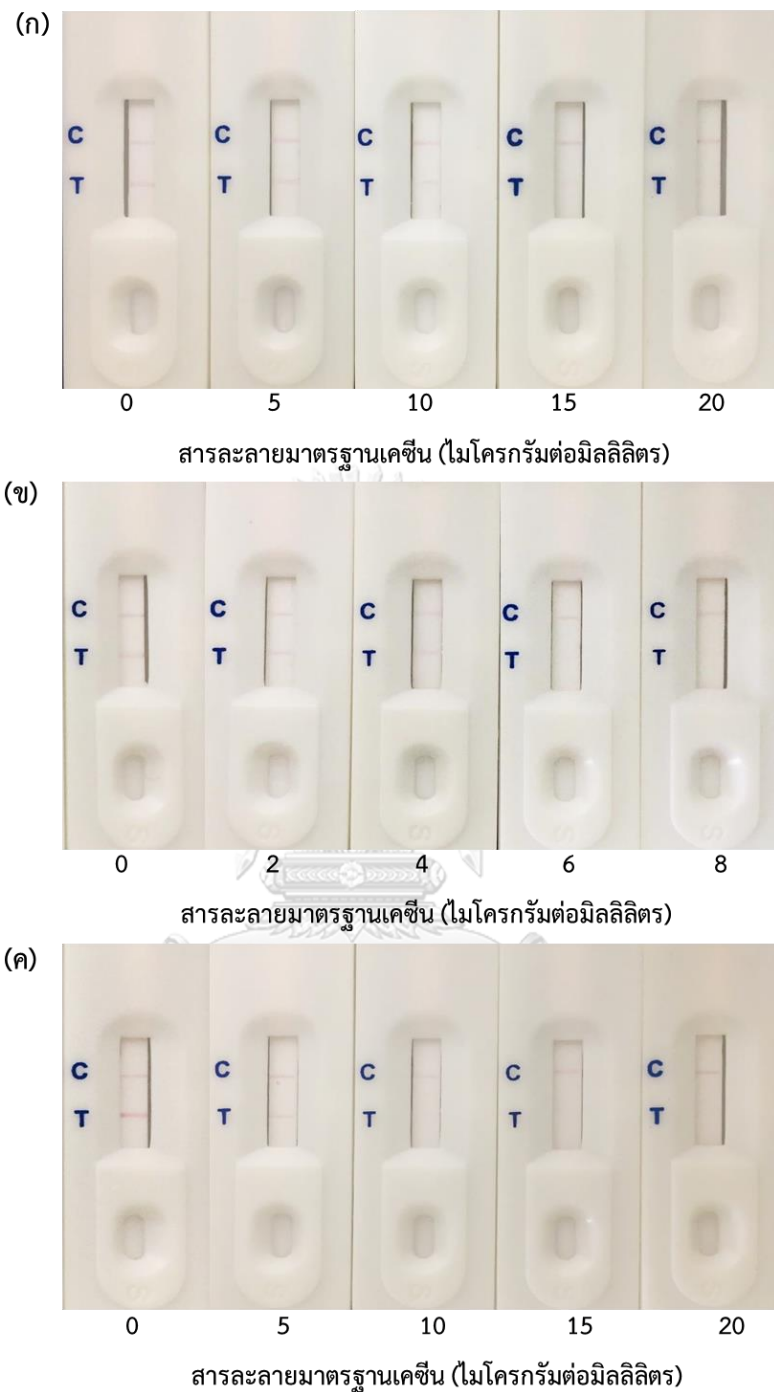




ภาพที่ 4.14 การทดสอบการรบกวนของเมทริกซ์ในตัวอย่างต่างๆ ที่ค่าการเจือจางแตกต่างกันด้วย
แถบทดสอบ: (ก) นมกระป๋อง (ข) นมแพะ และ (ค) นมถั่วเหลือง

4.5.2 การหาค่าตัดออกของแถบทดสอบในตัวอย่างนม

จากการศึกษาผลของเมทริกซ์ ในข้อ 4.5.1 จะทำการเจือจางตัวอย่างที่ 1:1,500 แล้วนำแถบทดสอบมาทดสอบหาค่าตัดออกในตัวอย่างนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลืองที่มีการเติมเคซีนจากนมวัวให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเปิดตัวอย่างนม 150 ไมโครลิตร มาทดลองกับแถบทดสอบ โดยจะทำการทดลองที่แต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ ก.8 – ก.10) ทำการอ่านผลแถบทดสอบด้วยตาเปล่า ภายใน 15 นาที จากภาพที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่า ในทุกตัวอย่างนมที่นำมาทดสอบ เมื่อเพิ่มปริมาณเคซีนให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ความเข้มสีที่บริเวณ T-line จะลดลง เนื่องจากปริมาณเคซีนที่อยู่ในสารละลายจะแย่งจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอยู่กับอนุภาคทองคำ ทำให้ไปจับกับเคซีนที่ตรงไว้ที่ T-line ได้น้อยลง ยิ่งเพิ่มปริมาณเคซีนมากขึ้นจนปริมาณเคซีนที่อยู่ในสารละลายจะแย่งจับกับมอนอโคลนอลที่ติดอยู่กับอนุภาคทองคำจนหมด ไม่เหลือแอนติบอดีไปจับกับเคซีนที่ T-line จะส่งผลให้บริเวณ T-line ไม่ปรากฏแถบสี ในการทดลองนี้ค่าตัดออกเคซีนของวัวที่ละลายด้วยตัวอย่างนมกระป๋องในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT คือ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าตัดออกเคซีนของวัวที่ละลายด้วยตัวอย่างนมแพะในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT อยู่ที่ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าตัดออกเคซีนของวัวที่ละลายด้วยตัวอย่างนมถั่วเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หว่าค่าตัดออกของตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด เป็นค่าที่ได้จากการทดสอบในตัวอย่างนมที่ระดับการเจือจาง 1:1,500 จึงต้องคำนวณกลับเป็นปริมาณเคซีนเริ่มต้นในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ซึ่งจะพบว่าในตัวอย่างนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง มีค่าตัดออกอยู่ที่ 22.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า แม้การเจือจางจะช่วยลดผลของเมทริกซ์ในตัวอย่างนม แต่ส่งผลต่อความไวของแถบทดสอบ ทำให้ค่าความไวของแถบทดสอบในตัวอย่างนมแต่ละชนิดมีค่าไม่เท่ากัน นอกจากนี้มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเคซีนจากนมกระป๋อง และเคซีนจากนมแพะ เท่ากับ 5.7% และ 0.3% ตามลำดับ เมื่อเจือจางที่ 1:1,500 สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ โดยสังเกตได้จากในตัวอย่างนมที่ทำการเจือจาง 1:1,500 แต่ไม่มีการเติมเคซีนของนมวัวลงไป พบว่าสามารถสังเกตเห็นความเข้มของแถบสีบริเวณ T-line ใกล้เคียงกับ C-line ซึ่งไม่น่าก่อให้เกิดผลกระทบต่อค่าตัดออกในตัวอย่างนมต่างๆ ที่ต่ำลง เมื่อเทียบกับค่าตัดออกที่เกิดจากการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ แต่การที่ค่าตัดออกในตัวอย่างนมต่ำลง น่าจะเกิดจากผลของเมทริกซ์ไปบดบังการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี หรือ ผลของเมทริกซ์ที่ไปบดบังสีของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำมากกว่า



ภาพที่ 4.15 ตัวอย่างการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยตัวอย่างนมในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าตัดออก: (ก) นมกระป๋อง (ข) นมแพะ และ (ค) นมถั่วเหลือง

นอกจากนี้จากค่าคัดออกของตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด จะสามารถคำนวณหาการปนเปื้อนของนมวัวที่น้อยที่สุดที่แถบทดสอบสามารถตรวจวัดได้ในนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณการปนเปื้อนของนมวัวที่น้อยที่สุดที่ในตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ที่แถบทดสอบสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้

ตัวบ่งชี้				ผลการทดสอบ ด้วยแถบทดสอบ
นมวัว (ml)	นมกระป๋อง (ml)	นมแพะ (ml)	นมถั่วเหลือง (ml)	
833	167	-	-	บวก
333	-	667	-	บวก
555	-	-	445	บวก

จากตารางพบว่า ในการใช้แถบทดสอบตรวจการปนเปื้อนของนมวัวในนมกระป๋องนั้น หากนมกระป๋องมีปริมาณ 1 ลิตร จะต้องมึนมวัวผสมถึง 833 มิลลิลิตร จึงจะสามารถตรวจพบการปนเปื้อน ในขณะที่นมแพะปริมาณ 1 ลิตร จะต้องมึนมวัวผสมอยู่ 333 มิลลิลิตร จึงจะสามารถตรวจพบการปนเปื้อน และในนมถั่วเหลืองปริมาณ 1 ลิตร จะต้องมึนมวัวผสมอยู่ 555 มิลลิลิตร จึงจะสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ ซึ่งจะพบว่าในตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบนี้ต้องมีการปนเปื้อนของนมวัวอยู่สูง จึงจะตรวจพบการปนเปื้อนของนมวัวลงในตัวอย่างนมชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในนมกระป๋อง ที่ต้องมีนมวัวปนสูงถึง 83% จึงจะตรวจสอบพบว่าการปนเปื้อนของนมวัว จากผลการทดสอบนี้อาจจะกล่าวได้ว่าแถบทดสอบที่ทำการผลิต ควรจะเพิ่มความไวของแถบทดสอบ เพื่อให้สามารถตรวจตัวอย่างที่นำมาทดสอบแล้วได้ค่าคัดออกที่ต่ำลง ยังผลให้สามารถตรวจการปนเปื้อนของนมวัวในตัวอย่างนมอื่นๆ ได้ต่ำกว่าเดิม โดยการเพิ่มความไวของแถบทดสอบนั้น อาจจะทำตามที่มีผู้เชี่ยวชาญ [50] โดยในขั้นตอนของการเชื่อมมอโนโคลนอลแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำ ให้ทำการลดปริมาณมอโนโคลนอลแอนติบอดีลง ทั้งนี้การลดปริมาณมอโนโคลนอลแอนติบอดีจะส่งผลให้บนพื้นที่ผิวของอนุภาคทองคำ มีปริมาณแอนติบอดีอยู่น้อยกว่าเก่า เมื่อนำไปทำแถบทดสอบ ส่งผลให้มีการใช้อนุภาคทองคำในการจับกับเคซินของนมวัวมากขึ้น ทำให้ความไวของแถบทดสอบมากกว่าเดิมได้

4.5.3 การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในการตรวจด้วยแถบทดสอบ

ในการหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในการตรวจของแถบทดสอบ จะทำการเตรียมตัวอย่างนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง ที่ระดับการเจือจาง 1:1,500 แล้วเติมเคซีนของนมวัวลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ค่าคัดออก และ $\pm 2\sigma$ ของค่าคัดออกของนมแต่ละชนิด ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปิเปตสารละลายปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยจะทำการทดสอบในตัวอย่าง 40 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ค่าคัดออก 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบ 16 ตัวอย่าง มาทดสอบกับแถบทดสอบที่จัดเตรียมไว้ ซึ่งจะทำทดสอบ 4 วัน วันละ 10 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ก. ตารางที่ ก.6 – ก.8) หลังจากวิเคราะห์ผลการทดสอบภายในเวลา 15 นาที ด้วยสายตา จากตารางที่ 4.3 พบว่าในตัวอย่างนมกระป๋อง มีค่าคัดออกของนมกระป๋องที่ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับการเจือจาง 1:1,500 พบว่าต้องเติมเคซีนของวัวลงไป ในนมกระป๋องให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 7.95, 15 และ 22.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะไปทำการทดสอบกับแถบทดสอบที่จัดเตรียมไว้ ผลการทดลองที่ได้แถบทดสอบจะมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 93.8% ค่าความแม่นยำ 97.5% ค่าทำนายผลบวก 96% และค่าทำนายผลลบ 100% ส่วนในตัวอย่างนมแพะ มีค่าคัดออกอยู่ที่ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าต้องเติมเคซีนของวัวลงไป ในนมแพะให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 3.18, 6 และ 8.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบทดสอบจะมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 100% ค่าความแม่นยำ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% และในตัวอย่างนมถั่วเหลือง มีค่าคัดออกอยู่ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าต้องเติมเคซีนของวัวลงไป ในนมถั่วเหลืองให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 5.3, 10 และ 14.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบทดสอบจะมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 100% ค่าความแม่นยำ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% ซึ่งจากผลการทดลองค่าความไว จะแสดงค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่มีเคซีน แล้วตรวจพบว่ามีเคซีนในตัวอย่าง ซึ่งในการใช้แถบทดสอบตรวจตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าความไวอยู่ที่ 100% แปลว่าแถบทดสอบมีความไวสูง หากมีเคซีนของวัวปนอยู่ในตัวอย่างนมต่างๆ มากกว่า หรือเท่ากับค่าคัดออก แถบทดสอบจะสามารถตรวจพบเคซีนของวัวที่ปนมาได้ทั้งหมด และไม่เกิดผลลบปลอม (false negative) ขึ้นในการทดสอบ ส่วนค่าการคัดเลือก จะแสดงค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเคซีน แล้วตรวจพบว่ามีเคซีนในตัวอย่าง ซึ่งในนมแพะ กับนมถั่วเหลือง จะพบว่ามีค่าการคัดเลือกที่ 100% แปลว่า แถบทดสอบไม่มีการตรวจผิดพลาด ทุกตัวอย่างที่เป็นผลลบที่นำมาทดสอบให้ผลตรวจเป็นลบทั้งหมด แต่ในตัวอย่างนมกระป๋องที่มีค่าการคัดเลือกที่ 93.8% นั้น พบว่าในการทดสอบได้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ขึ้น 1 แถบทดสอบ จากแถบทดสอบที่ทำ

ไปทดสอบกับตัวอย่างนมกระป๋องที่ต้องให้ค่าเป็นผลลบทั้งหมด 16 แลบทดสอบ เมื่อนำมาคำนวณหา ค่าการคัดเลือก จึงได้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าการนำแลบทดสอบไปตรวจในนมชนิดอื่นๆ ส่วนในค่าความ แมน้ำ เป็นค่าที่บ่งบอกความสามารถของแลบทดสอบในการอ่านค่าผลบวกและผลลบ ซึ่งในนมแพะ กับนมถั่วเหลือง จะพบว่ามีค่าความแมน้ำที่ 100% แปลว่า แลบทดสอบมีความแมน้ำสูง สามารถ ทดลองแล้วให้ผลการทดลองที่แท้จริง แต่ในตัวอย่างนมกระป๋องที่มีค่าความแมน้ำที่ 97.5% นั้น เกิดจาก ในการทดสอบมีผลบวกปลอมขึ้น 1 แลบทดสอบ ส่งผลให้ค่าความแมน้ำต่ำลง ส่วนในค่าการทำนาย ผลบวก คือ ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นบวก (พบเคซินของนมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่ แลบทดสอบตรวจพบเคซินในตัวอย่าง จริงๆ เท่าใด ซึ่งในนมแพะ กับนมถั่วเหลือง จะพบว่ามีค่าการ ทำนายผลบวกที่ 100% แปลว่า หากนำแลบทดสอบแสดงผลการตรวจเป็นบวก ในตัวอย่างนมแพะ กับนมถั่วเหลืองจะมีการปลอมปนเคซิน จากนมวัวลงไป หากผู้บริโภคใดแพ้นมวัว ไม่ควรกินบริโภค ตัวอย่างนมทั้ง 2 ชนิดนี้ ต่างจากแลบทดสอบที่นำไปทดสอบกับตัวอย่างนมกระป๋องที่ให้ค่าการทำนาย ผลบวก 96% หมายความว่า แม้แลบทดสอบจะแสดงผลเป็นบวก แต่มีโอกาสจะเป็นผลบวกจริงๆ แค่ 96% เท่านั้น ตัวอย่างนมกระป๋องที่นำมาทดสอบอาจจะไม่มีการปนเปื้อนของเคซินจากวัวก็ได้ ทั้งนี้ การที่ค่าการทำนายผลบวกของแลบทดสอบในตัวอย่างนมกระป๋องมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างนมชนิดอื่นๆ เกิดจากในการทดสอบมีผลบวกปลอมขึ้น 1 แลบทดสอบ ส่งผลให้ค่าการทำนายผลบวกลดลง ซึ่งการ เกิดผลบวกปลอมจะส่งผลอันตรายน้อยกว่าการเกิดผลลบปลอมในแลบทดสอบ เพราะการเกิดผลบวก ปลอม คือ การที่ไม่มีเคซินของวัวปลอมปนอยู่ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ แต่ทว่าแลบทดสอบสามารถ ตรวจเจอเคซินของวัวได้ เมื่อแลบทดสอบเกิดการตรวจผิดพลาดแบบนี้ ผู้บริโภคจะหลีกเลี่ยงการกิน อาหารชนิดนั้น แต่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสภาพร่างกาย ต่างจากการเกิดผลลบปลอมขึ้น คือ การที่ มีเคซินของวัวปลอมปนในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ แล้วแลบทดสอบไม่สามารถตรวจพบเคซินของวัวได้ เมื่อเป็นเช่นนี้ ผู้บริโภคจะรับประทานเข้าไป แล้วก่อให้เกิดอาการแพ้นมวัว เป็นอันตรายต่อ ผู้บริโภคได้ ส่วนในค่าทำนายผลลบ คือ ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นลบ (ไม่พบเคซินของ นมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่แลบทดสอบตรวจไม่พบเคซินในตัวอย่างจริงๆ เท่าใด ซึ่งในนม กระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง จะพบว่ามีค่าการทำนายผลลบ 100% แสดงว่าแลบทดสอบที่ แสดงผลลบทั้งหมด เป็นผลลบจริงๆ แลบทดสอบที่นำมาทดสอบกับตัวอย่างนมต่างๆ ไม่สามารถ ตรวจพบเคซินของนมวัวในตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้ ทำให้เชื่อได้ว่าแลบทดสอบที่ทำการพัฒนาขึ้น ในงานวิจัยนี้มีความสะดวกต่อการนำไปใช้ทดสอบนอกห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปใช้ตรวจสอบ เบื้องต้นในตัวอย่างนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง ที่ไม่มั่นใจว่ามีการปนเปื้อนของนมวัวได้ แต่ ทว่าในการทดสอบการหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแมน้ำ ค่าทำนายผลบวก และค่า ทำนายผลลบ ในการตรวจด้วยแลบทดสอบ ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจโดยวิธีทางเคมี เมื่อเกิดผลบวกปลอมขึ้นในการทดสอบกับตัวอย่างนมกระป๋อง ทำให้ไม่สามารถยืนยันผลการทดสอบ

ได้ว่า เกิดจากความผิดพลาดจากการเตรียมตัวอย่างที่นำมาทดสอบ หรือแถบทดสอบเกิดความผิดพลาดจริงๆ ซึ่งหากมีการนำตัวอย่างที่ตรวจสอบว่าเป็นผลบวกปลอมไปตรวจด้วยวิธีทางเคมี แล้วให้ผลเป็นลบ คือตรวจไม่พบเคซีนของวัวในตัวอย่าง จะสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ว่า แถบทดสอบที่นำมาใช้ทดสอบ เกิดผลบวกปลอมจริงๆ แต่ถ้าการตรวจด้วยวิธีทางเคมีให้ผลเป็นบวก คือตรวจพบเคซีนของวัวในตัวอย่าง จะหมายความว่า เกิดความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้



ตารางที่ 4.3 การหาค่าความไว ค่าการคัดเลือก ค่าความแม่นยำ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

ตัวบ่งชี้	ความหมาย	นมกระป๋อง	นมแพะ	นมถั่วเหลือง
		Cut-off $\pm 2\sigma$	Cut-off $\pm 2\sigma$	Cut-off $\pm 2\sigma$
		เปอร์เซ็นต์ (%)	เปอร์เซ็นต์ (%)	เปอร์เซ็นต์ (%)
ค่าความไว	ค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่มีเคซีน แล้วตรวจพบว่ามีเคซีนในตัวอย่าง	100%	100%	100%
ค่าการคัดเลือก	ค่าที่ได้จากการนำแถบทดสอบไปตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเคซีน แล้วตรวจพบว่ามีเคซีนในตัวอย่าง	93.8%	100%	100%
ค่าความแม่นยำ	ค่าที่บ่งบอกความสามารถของแถบทดสอบในการอ่านค่าผลบวกและผลลบ	97.5%	100%	100%
ค่าทำนายผลบวก	ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นบวก (พบเคซีนของนมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่แถบทดสอบตรวจพบเคซีนในตัวอย่างจริงๆเท่าใด	96%	100%	100%
ค่าทำนายผลลบ	ค่าที่ได้จากการแสดงผลการตรวจเป็นลบ (ไม่พบเคซีนของนมวัวในตัวอย่าง) แล้วมีโอกาสที่แถบทดสอบตรวจไม่พบเคซีนในตัวอย่างจริงๆเท่าใด	100%	100%	100%

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในการพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว โดยใช้หลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟี รูปแบบการไหลในแนวระนาบ ด้วยหลักการการเกิดปฏิกิริยาแบบแข่งขัน อาศัยการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีแบบจำเพาะ ส่งผลให้เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ติดตามการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจากการติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ ก่อให้เกิดเป็นแถบสีขึ้นมา ซึ่งในงานวิจัยนี้ เคซีนที่ตรึงไว้ที่ T-line จะสามารถจับกับมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดกับอนุภาคทองคำ ก่อให้เกิดแถบสีสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และรายงานผลการตรวจเป็นเชิงคุณภาพ ว่าสามารถตรวจพบเคซีน มากกว่า หรือต่ำกว่าค่าคัดออก ซึ่งมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้ในงานวิจัย คือ CN1F4 ได้ถูกนำมาทำการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเคซีน เมื่อพบว่ายังคงมีประสิทธิภาพในการทำงาน จึงนำไปตรวจหาการทำปฏิกิริยาข้ามของ CN1F4 ต่อเคซีนจากนมกระป๋อง และเคซีนจากนมแพะ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อเคซีนจากนมกระป๋อง และนมแพะ ที่ 5.69% และ 0.31% ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำ CN1F4 มาพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัว โดยในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการใส่สารละลายบนแถบทดสอบ 2 วิธี คือ การประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์ และการจ่ายสารละลายด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Biodot รุ่น XYZ 3000) ซึ่งได้ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ และการเคลือบเมมเบรนใน analytical membrane 3 ชนิด ได้แก่ AE98fast, AE99 และ CN95 พบว่า analytical membrane ที่เหมาะสมในงานวิจัยครั้งนี้คือ CN95 ที่ไม่เคลือบเมมเบรน ด้วยสารละลาย 1% BSA และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ PBT เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการเตรียมตัวอย่างในการทดลอง มี sample pad, conjugate pad และ absorbent pad เป็นแผ่นใยแก้ว standard 17 แผ่นใยแก้ว GF33 กับ cotton linter CF7 100% ตามลำดับ จากการหาภาวะที่เหมาะสมวิธีการเตรียมแถบทดสอบด้วยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์ ได้ทำการตรึงเคซีนที่ T-line และตรึง IgG-Fc ที่ C-line บน CN95 โดยการใช้การประทับด้วยกระจกสไลด์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ด้วยเคซีนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IgG-Fc ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนบน conjugate pad จะตรึงมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ไม่ทำการเจือจาง ปริมาตร 4 ไมโครลิตร หลังจากประกอบแถบทดสอบเสร็จ จะนำไปหาค่าคัดออกด้วยสารละลายมาตรฐานเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พบว่ามีค่าคัดออกอยู่ที่ 20

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้ามีเคซินปนเปื้อนต่ำกว่านี้จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีเคซินในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไม่มีเคซินในสารที่นำมาทดสอบ จากนั้นทำการเตรียมแถบทดสอบด้วยเครื่องดูค่าสารละลายอัตโนมัติ โดยทำการตั้งปริมาณเคซิน 0.2 ไมโครกรัม ที่ T-line และตั้งปริมาณ IgG-Fc 0.0125 ไมโครกรัม ที่ C-line บน CN95 ส่วนบน conjugate pad ใช้มอนอโคลนอล แอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทองคำ ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ไม่ทำการเจือจาง ปริมาตร 4 ไมโครลิตร หลังจากประกอบแถบทดสอบเสร็จ นำไปหาค่าคัดออกด้วยสารละลายมาตรฐานเคซินในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้น 0-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พบว่ามีค่าคัดออกอยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้ามีเคซินปนเปื้อนต่ำกว่านี้จะไม่สามารถบอกได้ว่ามีเคซินในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไม่มีเคซินในสารที่นำมาทดสอบ และเมื่อนำแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซินจากวัวไปตรวจหาเคซินของวัวที่อยู่ในตัวอย่างนมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง พบว่าจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างนมทั้ง 3 ชนิด 1:1,500 เพื่อลดผลของเมทริกซ์ภายในตัวอย่าง ก่อนนำไปทดสอบกับแถบทดสอบที่เตรียมไว้ ซึ่งในนมกระป๋อง มีค่าคัดออก อยู่ที่ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต้องเติมเคซินของวัวลงไป ในนมกระป๋องให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 7.96, 15 และ 22.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบทดสอบมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 93.8% ค่าความแม่นยำ 97.5% ค่าทำนายผลบวก 96% และค่าทำนายผลลบ 100% ส่วนในตัวอย่างนมแพะ มีค่าคัดออกอยู่ที่ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยต้องเติมเคซินของวัวลงไป ในนมแพะให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 3.18, 6 และ 8.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบทดสอบจะมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 100% ค่าความแม่นยำ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% และในตัวอย่างนมถั่วเหลือง มีค่าคัดออกอยู่ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต้องเติมเคซินของวัวลงไป ในนมถั่วเหลืองให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 5.3, 10 และ 14.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แถบทดสอบจะมีค่าความไวอยู่ที่ 100% ค่าการคัดเลือก 100% ค่าความแม่นยำ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้เชื่อได้ว่า แถบทดสอบที่ทำการพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีความสะดวกต่อการนำไปใช้ทดสอบนอกห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปใช้ตรวจสอบเบื้องต้นในตัวอย่าง นมกระป๋อง นมแพะ และนมถั่วเหลือง ที่ไม่มั่นใจว่ามีการปนเปื้อนของนมวัวได้

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ทำการทดสอบในตัวอย่างนมเท่านั้น สามารถนำแถบทดสอบไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เช่น โยเกิร์ต หรือไอศกรีม เป็นต้น นอกจากนี้เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคคุ้นเคยกับชุดทดสอบที่ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาแบบแซนวิช คือ หากผลการทดสอบเป็นบวก เกิดแถบสีขึ้น 2 แถบ หากผลการทดสอบเป็นลบ เกิดแถบสีขึ้น 1 แถบ หากเราสามารถพัฒนาแถบทดสอบให้

เป็นหลักการเกิดปฏิกิริยาแบบแซนวิท แทนรูปแบบการแข่งขัน ก็อาจจะช่วยให้ผู้บริโภคแปลผลได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้หากต้องการพัฒนาแถบทดสอบสำหรับการตรวจวัดเคซีนจากวัวให้เป็นหลักการเกิดปฏิกิริยาแบบแซนวิท จะต้องทำการผลิตพอลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ที่มีความจำเพาะกับเคซีนขึ้นมา เพื่อใช้ในการผลิตแถบทดสอบ



รายการอ้างอิง

- [1] Wal J. M. Cow's milk proteins/allergens. Annals of allergy, asthma & immunology 89(6, Supplement) (2002): 3-10.
- [2] De Kruif C. G., Huppertz T., Urban V. S., and Petukhov A. V. Casein micelles and their internal structure. Advances in Colloid and Interface Science 171-172 (2012): 36-52.
- [3] Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A., and Van Boekel M. A. J. S. Dairy technology: principles of milk properties and processes. CRC Press, 1999.
- [4] Gerberding S. J. and Byers C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. Journal of Chromatography A 808(1) (1998): 141-151.
- [5] Yüksel Z. and Erdem Y. K. Detection of the milk proteins by RP-HPLC. Gıda 7 (2009): 1-7.
- [6] Jira W. and Schwägele F. HPLC-MS/MS-detection of caseins and whey proteins in meat products. Procedia food science 5 (2015): 129-132.
- [7] สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 เรืองน้ำนมโคดิบ [Online]. Available from: http://www.acfs.go.th/standard/download/eng/raw_cow_milk.pdf [5 ตุลาคม 2560]
- [8] Food and agriculture organization of the united nations. Milk and dairy products in human nutrition [Online]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf> [5 ตุลาคม 2560]
- [9] Pavanearle. Milk-the Life [Online]. Available from: <https://pavansmicroscope.wordpress.com/2013/08/26/milk-the-life/> [5 ตุลาคม 2560]
- [10] Hristov P., Mitkov I., Sirakova D., Mehandgiiski I., and Radoslavov G. Measurement of casein micells size in raw dairy cattle milk by dynamic light scattering [Online]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/milk-proteins-from-structure-to-biological-properties-and-health-aspects/measurement-of-casein-micelle-size-in-raw-dairy-cattle-milk-by-dynamic-light-scattering> [5 ตุลาคม 2560]

- [11] Sutermeister E. Casein and its industrial applications. New York: Reinhold Pub. Corp., 1939.
- [12] Slattery C. W. and Evard R. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. Biochimica et biophysica acta (BBA) - protein structure 317(2) (1973): 529-538.
- [13] Horne D. S. Casein micelle structure: models and muddles. Current Opinion in Colloid & Interface Science 11(2-3) (2006): 148-153.
- [14] รศ.พญ.อรุณี เจตศรีสุภาพ. แพ้นมวัว (cow milk allergy) [Online]. Available from: <http://haamor.com/> [7 ตุลาคม 2560]
- [15] Swagerty D. L., Walling A. D., and Klein R. M. Lactose intolerance. American academy of family physicians 65(9) (2002): 1845-1850.
- [16] Lifschitz C. and Szajewska H. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. European journal of pediatrics 174(2) (2015): 141-50.
- [17] POB PAD. แพ้นมวัว รู้ไว้ไม่เสีย [Online]. Available from: <https://www.pobpad.com> [7 ตุลาคม 2560]
- [18] Jungbauer A. and Hahn R. Chapter 22 ion-exchange chromatography. in Methods in enzymology, pp. 349-371: Academic press, 2009.
- [19] Andrews A. T., Taylor M. D., and Owen A. J. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. Journal of Chromatography A 348(Supplement C) (1985): 177-185.
- [20] Aguilar M. I. HPLC of peptides and proteins methods and protocols. Vol. 251: Springer, 2003.
- [21] Bobe G., Beitz D. C., Freeman A. E., and Lindberg G. L. Separation and quantification of bovine milk proteins by RP-HPLC. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998): 458-463.
- [22] ZEN innovation. การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี [Online]. Available from: <http://www.zeninnovation.co.th> [7 ตุลาคม 2560]
- [23] Koczula K. M. and Gallotta A. Lateral flow assays. Essays biochem 60(1) (2016): 111-20.
- [24] เสาวนิตย์ ชอบบุญ. จุลชีววิทยา. สงขลา: โรงพิมพ์เทพการพิมพ์ 2553.

- [25] Kumar S. Antibodies and antigens [Online]. Available from: <http://nptel.ac.in/courses/102103038/1> [8 ตุลาคม 2560]
- [26] Abdel-Ghaffar A. M. Antigens and immunogens [Online]. Available from: http://www.abdoscience.com/2005-2006/4th_biochemistry_special/Lecture%202.pdf [8 ตุลาคม 2560]
- [27] สุวิน ว่องวัจนะ. แอนติเจน (Antigen) [Online]. Available from: http://file.siam2web.com/siam85/pdf/201086_41733.pdf [8 ตุลาคม 2560]
- [28] Encyclopædia Britannica. Antibody [Online]. Available from: <https://www.britannica.com/science/antibody> [8 ตุลาคม 2560]
- [29] Male D., Brostoff J., Roth D. B., and Roitt I. Immunology, ed. 7. Canada: Elsevier Ltd., 2006.
- [30] Molecular Evolution Biotechnology Laboratory-Suranaree University of Technology. Polychonal antibody [Online]. Available from: http://personal.sut.ac.th/montarop/2013%20WBSITE/MY_Lab/Home.html [8 ตุลาคม 2560]
- [31] Bio-siva. Monoclonal antibody production [Online]. Available from: <http://biosiva.50webs.org/mab.htm> [8 ตุลาคม 2560]
- [32] Abcam. A comparison between polyclonal and monoclonal [Online]. Available from: <http://www.abcam.com/protocols/a-comparison-between-polyclonal-and-monoclonal> [8 ตุลาคม 2560]
- [33] Pacific immunology. Polyclonal vs monoclonal antibodies [Online]. Available from: <https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/> [8 ตุลาคม 2560]
- [34] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. Immunochromatographic test, Lateral flow test หรือ Strip test เพื่อการวินิจฉัยโรคในปศุสัตว์ [Online]. Available from: <http://niah.dld.go.th/th/files/newsletter/2559/aug2016.pdf> [8 ตุลาคม 2560]
- [35] Posthuma-Trumpie G. A., Korf J., and Van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay. Analytical and bioanalytical chemistry 393(2) (2009): 569 - 582
- [36] นิตกร เจ๊ะยอเด. การพัฒนาอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจวัดเทตราไซคลินในน้ำผึ้ง. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2559.

- [37] Sajid M., Kawde A. N., and Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. Journal of saudi chemical society 19(6) (2015): 689-705.
- [38] Wong R. C. and Tse H. Y. Lateral flow immunoassay USA: Springer.
- [39] Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., and Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. The journal of physical chemistry B 110 (2006): 15700-15707.
- [40] ทศพล วงศ์ทางประเสริฐ. การพัฒนาแอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ และอิมมูโนโครมาโทกราฟีแก๊สเพื่อตรวจหาสารตกค้างออกซีเตตราไซคลิน. วิทยาศาสตร์สุขภาพ, เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2555.
- [41] Jazayeri M. H., Amani H., Pourfatollah A. A., Pazoki-Toroudi H., and Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and bio-sensing research 9 (2016): 17-22.
- [42] Monaci L., Treguat V., Van Hengel A. J., and Anklam E. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. European food research and technology 223(2) (2006): 149-179.
- [43] Hurley I. P., Coleman R. C., Ireland H. E., and Williams J. H. H. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. International Dairy Journal 16(7) (2006): 805-812.
- [44] Colak H., Aydin A., Nazli B., and Ergun O. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. Food Control 17(11) (2006): 905-908.
- [45] López-Calleja I. M., González I., Fajardo V., Hernández P. E., García T., and Martín R. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International dairy journal 17(1) (2007): 87-93.
- [46] Martín-Hernández C., Muñoz M., Daury C., Weymuth H., Kemmers-Voncken A. E. M., Corbatón V., Toribio T., and Bremer M. G. E. G. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. International dairy journal 19(4) (2009): 205-208.

- [47] Ren Q. R., Zhang H., Guo H. Y., Jiang L., Tian M., and Ren F. Z. Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. Journal of dairy science 97(10) (2014): 6000-6.
- [48] Masiri J., Barrios-Lopez B., Benoit L., Tamayo J., Day J., Nadala C., Sung S. L., and Samadpour M. Development and validation of a lateral flow immunoassay test kit for dual detection of casein and beta-lactoglobulin residues. Journal of food protection 79(3) (2016): 477-83.
- [49] Zhang G. P., Wang X. N., Yang J. F., Yang Y. Y., Xing G. X., Li Q. M., Zhao D., Chai S. J., and Guo J. Q. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of beta-adrenergic agonist clenbuterol residues. Journal of immunological methods 312(1-2) (2006): 27-33.
- [50] Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., Biagioli F., D'Arco G., and Giraudi G. Optimization of a lateral flow immunoassay for the ultrasensitive detection of aflatoxin M1 in milk. Analytica Chimica Acta 772 (2013): 75-80.
- [51] Zhu W., Zeng N., and Wang N. Sensitivity, specificity, accuracy, associated confidence interval and ROC analysis with practical SAS® implementations. Health care and life sciences (2010): 1-9.
- [52] อัจจิมา กาญจนภา. การพัฒนาวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี สำหรับตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2556.
- [53] Barłowska J., Szwajkowska M., Litwińczuk Z., and Król J. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. Comprehensive reviews in food science and food safety 10(6) (2011): 291-302.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อหาระดับปฏิกิริยาการตอบสนองของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีน

ค่าการเจือจางแอนติบอดี (เท่า)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	ตัวควบคุมลบ	CN1F4
500	0.158	3.598
1,000	0.158	3.682
2,000	0.158	3.970
4,000	0.158	3.914
8,000	0.158	3.879
16,000	0.158	3.145
32,000	0.158	2.094
64,000	0.158	1.127
128,000	0.158	0.656
236,000	0.158	0.445
512,000	0.158	0.274

ตารางที่ ก.2 การวิเคราะห์หาค่า IC₅₀ ของเคซีนจากนมวัว ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของสารละลาย โบไวน์เคซีนในนมวัว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
27	0.072	0.092	0.112
2.7	0.182	0.096	0.086
0.27	0.094	0.110	0.107
0.027	0.123	0.147	0.129
0.0135	0.200	0.204	0.213
0.00675	0.388	0.390	0.404
0.0045	0.449	0.463	0.443
0.003375	0.642	0.658	0.653
0.0027	0.679	0.708	0.781
0.00135	1.076	1.048	1.082
0.000675	1.217	1.298	1.334
0.00045	1.299	1.315	1.378
0.0003375	1.397	1.455	1.510
0.00027	1.406	1.405	1.479
0.000027	1.531	1.549	1.608
0	1.362	1.219	1.400
IC ₅₀	0.002		

ตารางที่ ก.3 การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมกระป๋อง ด้วยวิธี indirect competitive

ELISA

ความเข้มข้นของ เคซีนในนมกระป๋อง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
40	0.670	0.666	0.643
4	0.835	0.797	0.771
0.4	0.779	0.782	0.777
0.04	1.003	0.998	0.985
0.02	1.055	1.040	1.064
0.01	1.108	1.111	1.119
0.006667	1.235	1.141	1.173
0.005	1.212	1.223	1.173
0.004	1.243	1.274	1.281
0.002	1.222	1.270	1.282
0.001	1.208	1.274	1.326
0.000667	1.211	1.256	1.301
0.0005	1.216	1.263	1.283
0.0004	1.229	1.255	1.335
0.00004	1.235	1.268	1.252
0	1.362	1.219	1.400
IC_{50}	0.033		

ตารางที่ ก.4 การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของเคซีนจากนมแพะ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ เคซีนในนมแพะ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
28	0.333	0.307	0.343
2.8	0.627	0.625	0.619
0.28	0.863	0.887	0.873
0.028	1.030	1.057	1.029
0.014	1.059	1.081	1.102
0.007	1.152	1.168	1.178
0.004667	0.976	1.186	1.180
0.0035	1.194	1.208	1.179
0.0028	1.173	1.177	1.180
0.0014	1.178	1.206	1.208
0.0007	1.214	1.119	1.236
0.000467	1.221	1.216	1.168
0.00035	1.173	1.174	1.100
0.00028	1.190	1.139	1.196
0.000028	1.180	1.186	1.194
0	1.362	1.219	1.400
IC_{50}	0.615		

ตารางที่ ก.5 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี ในการติดกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร ที่ค่าดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรของอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร
0	0.433
50	0.453
100	0.471
150	0.473
200	0.489
250	0.529
300	0.708
350	0.718
400	0.754
450	0.750
500	0.757

		ชนิดของ Buffer					
		PB		PBS		PBT	
AE 98 Fast	ครั้งที่ 1						
	ครั้งที่ 2						
	ครั้งที่ 3						
AE 99	ครั้งที่ 1						
	ครั้งที่ 2						
	ครั้งที่ 3						
CN 95	ครั้งที่ 1						
	ครั้งที่ 2						
	ครั้งที่ 3						
		0	100	0	100	0	100
สารละลายเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							

ภาพที่ ก.1 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ด้วยแถบทดสอบที่ใช้เมมเบรนวิเคราะห์ชนิดต่างๆ




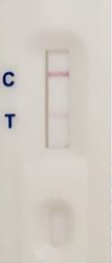


		บล็อกด้วย1% BSA ก่อนขีด เส้น C-line และ T-line	บล็อกด้วย1% BSA หลัง ขีดเส้น C-line และ T-line	ไม่ทำการบล็อกด้วย 1% BSA
AE 98 Fast	ครั้งที่ 1			
	ครั้งที่ 2			
	ครั้งที่ 3			
AE 99	ครั้งที่ 1			
	ครั้งที่ 2			
	ครั้งที่ 3			
CN 95	ครั้งที่ 1			
	ครั้งที่ 2			
	ครั้งที่ 3			

0 100 0 100 0 100
สารละลายเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)




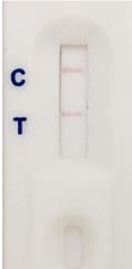
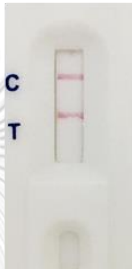
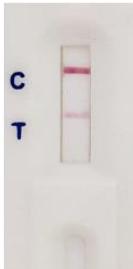

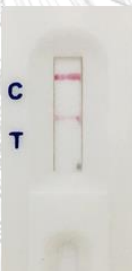
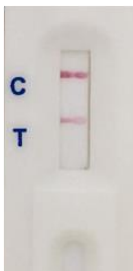
ภาพที่ ก.2 การทดสอบเคซีนด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์มีการเคลือบเมมเบรนด้วย 1% BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT เคลือบเมมเบรนก่อน และเคลือบเมมเบรนหลังการตรึงสารบนเมมเบรน และไม่เคลือบเมมเบรน

ความเข้มข้นของเคซีนที่ตรึงบน T-line (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							
		1		2		4	
		ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
ครั้งที่ 1	C	+	+	+	+	+	+
	T	+	+	+	+	+	+
ครั้งที่ 2	C	+	+	+	+	+	+
	T	+	+	+	+	+	+
ครั้งที่ 3	C	+	+	+	+	+	+
	T	+	+	+	+	+	+

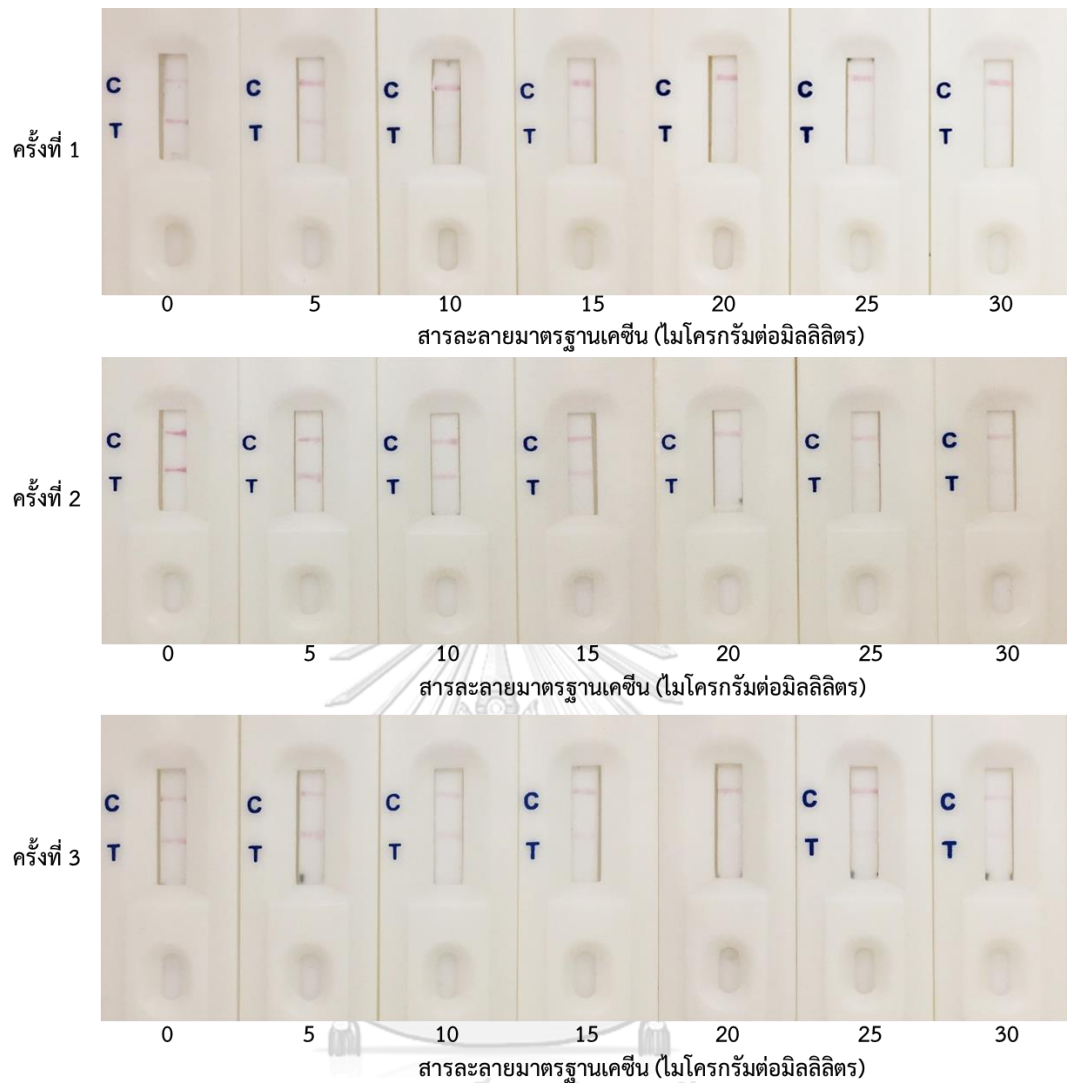
ภาพที่ ก.3 การทดสอบเคซีนด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ มีการตรึงเคซีนด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ระดับการเจือจางของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำ	1:1			
	1:2			

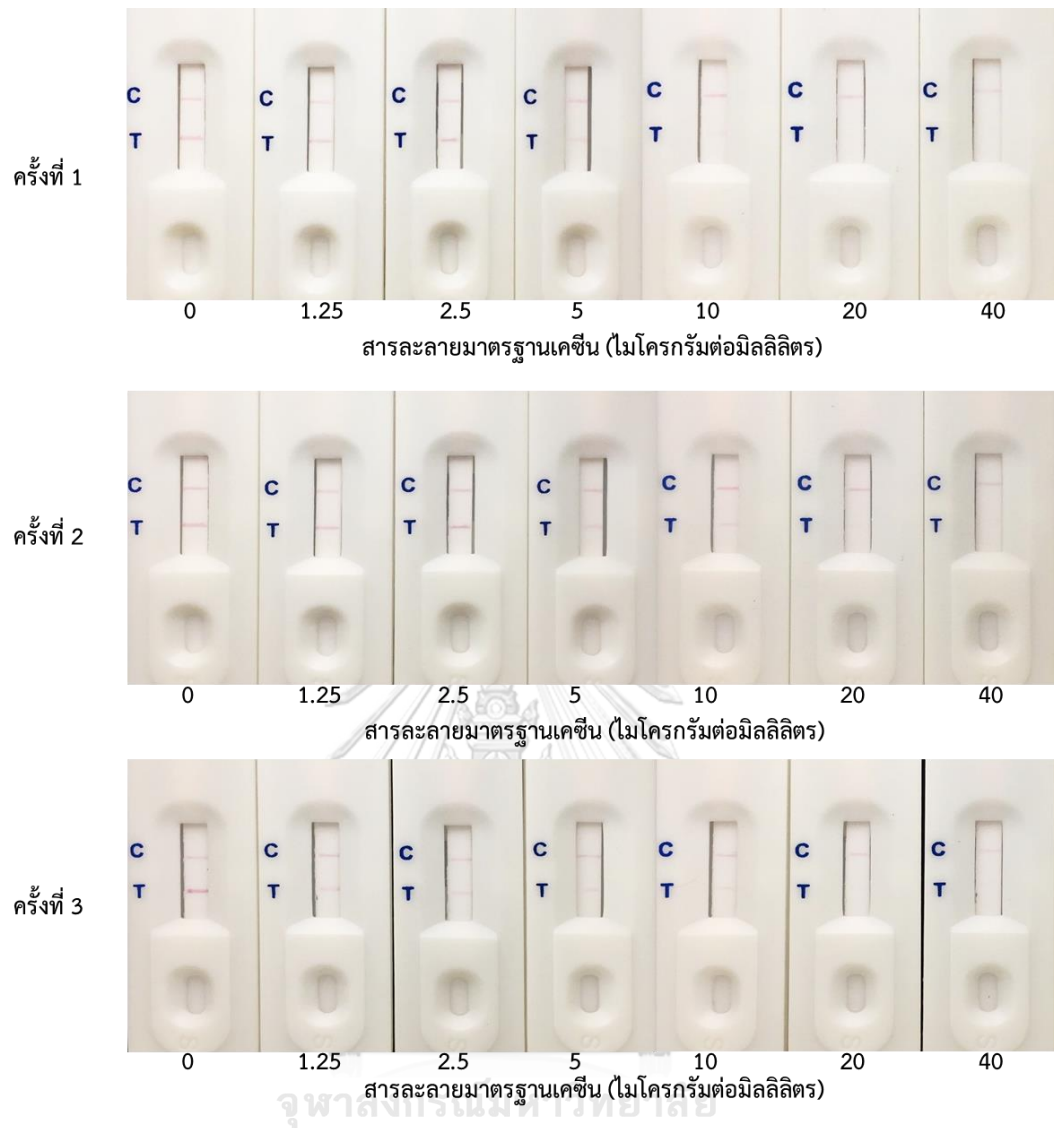
ภาพที่ ก.4 การทดสอบระดับค่าการเจือจางต่างๆ ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ติดอนุภาคทองคำบน conjugate pad ด้วยแถบทดสอบ

ความเข้มข้นของ IgG-Fc ที่ตรึงบน C-line (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.25	0.5	1.0
ครั้งที่ 1			
ครั้งที่ 2			
ครั้งที่ 3			

ภาพที่ ก.5 การทดสอบเคซินด้วยแถบทดสอบ ที่ส่วนเมมเบรนวิเคราะห์ทำการตรึง IgG-Fc ด้วยความเข้มข้นต่างๆ โดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์

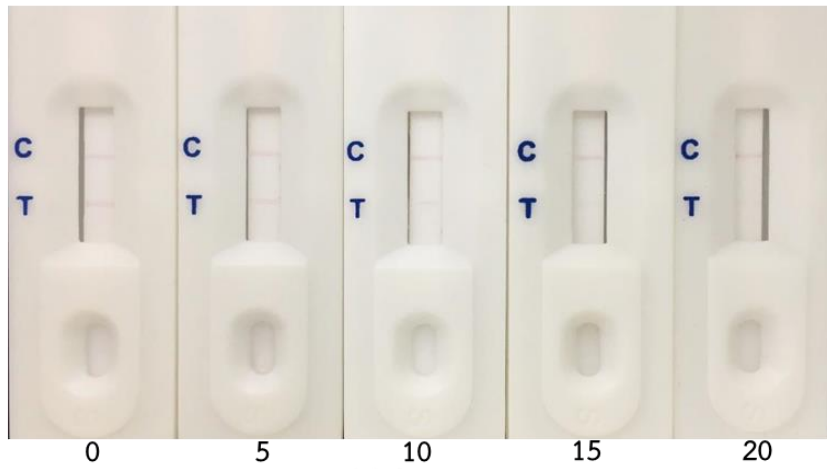


ภาพที่ ก.6 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกโดยการประทับด้วยขอบของกระจกสไลด์



ภาพที่ ก.7 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออกด้วยเครื่องดูค่าสารละลายอัตโนมัติ

ครั้งที่ 1



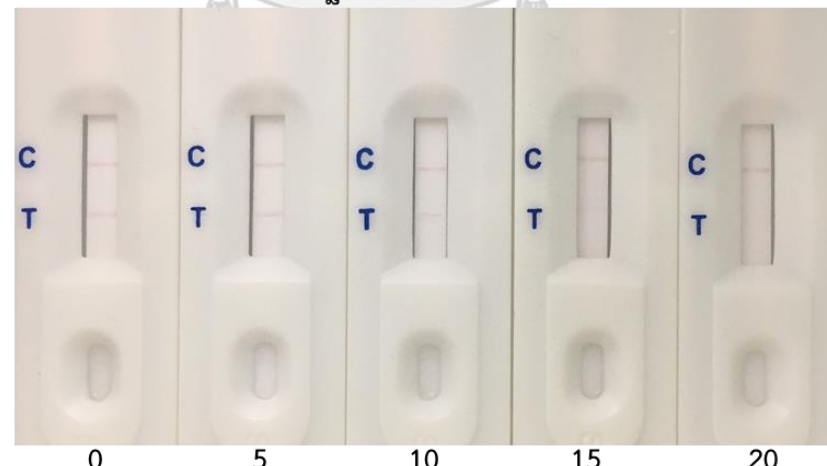
สารละลายมาตรฐานเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ครั้งที่ 2



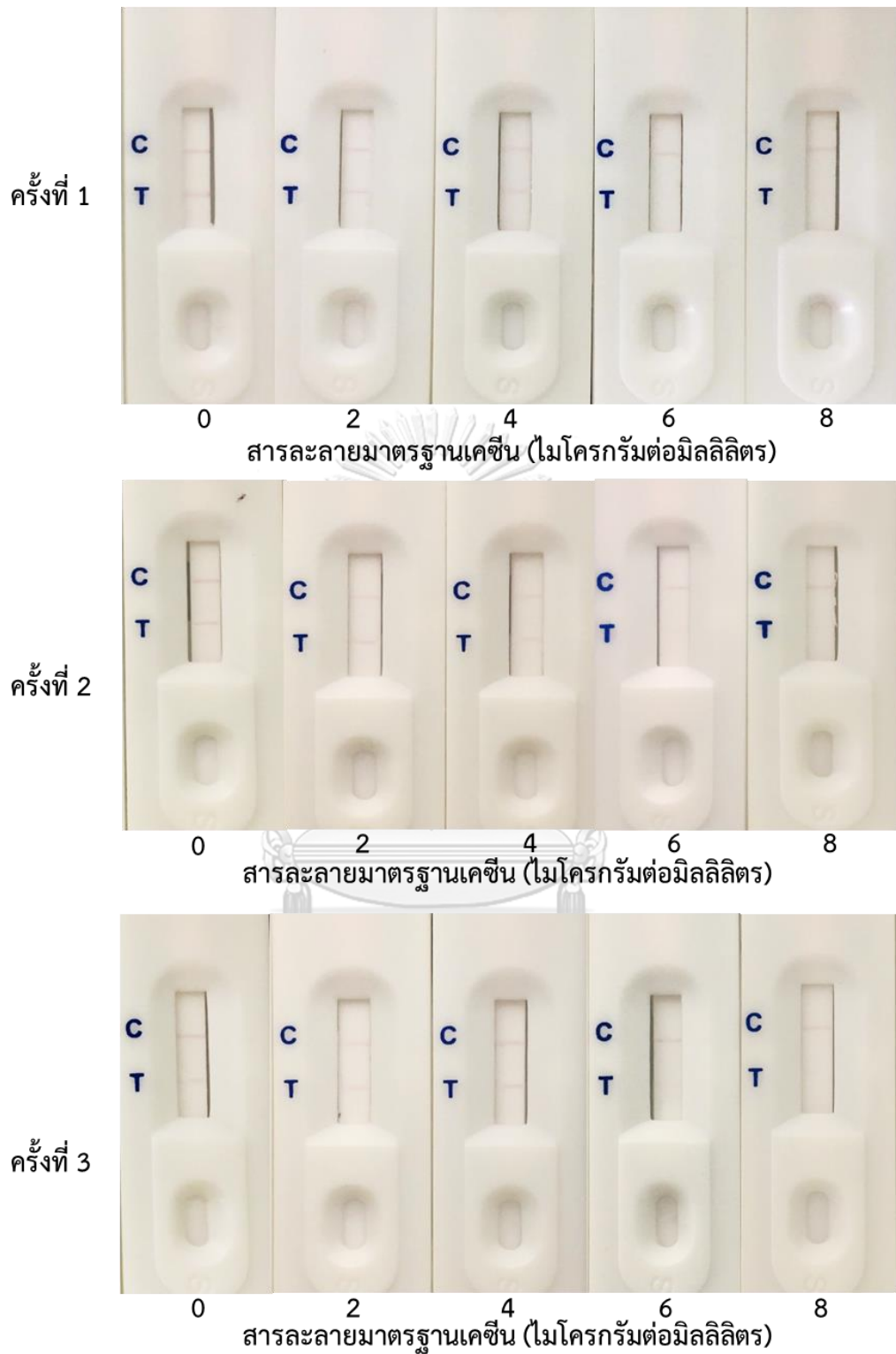
สารละลายมาตรฐานเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ครั้งที่ 3

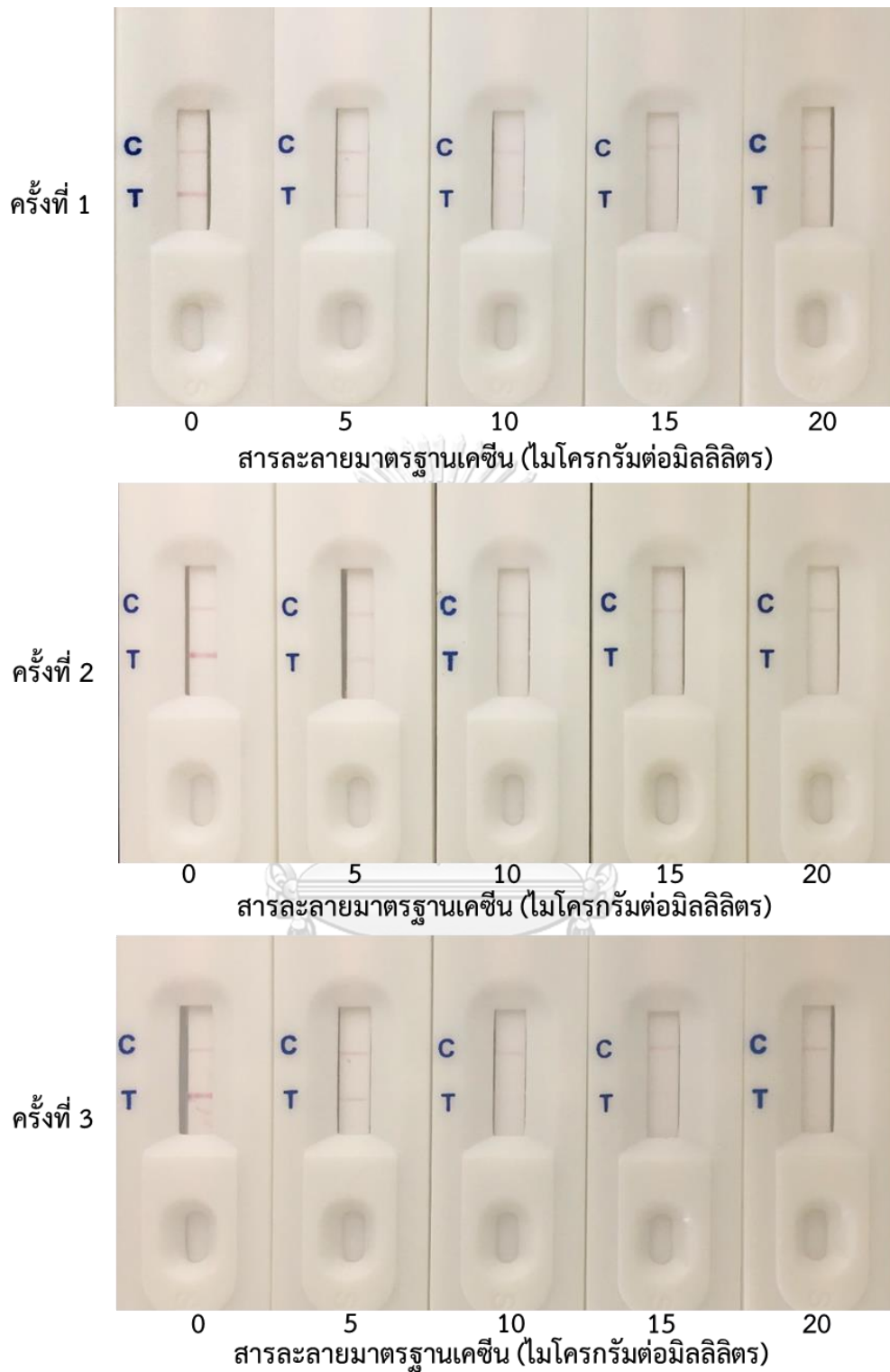


สารละลายมาตรฐานเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาพที่ ก.8 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมกระป๋องในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก

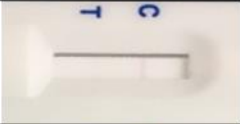
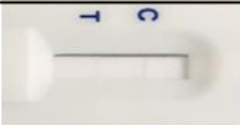
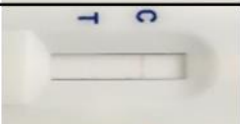
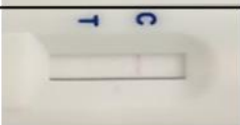
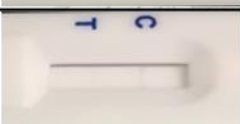
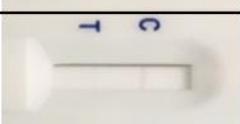
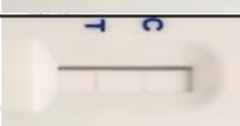
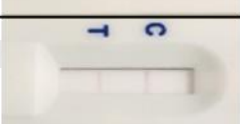
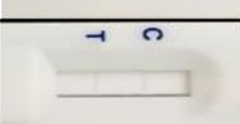
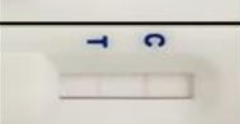


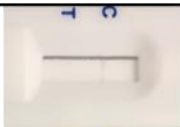
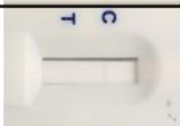
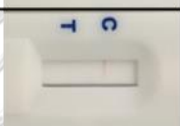

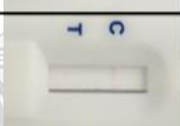
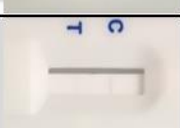
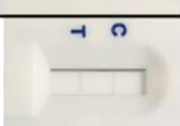
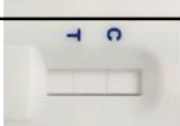
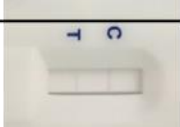
ภาพที่ ก.9 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมแพะในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก


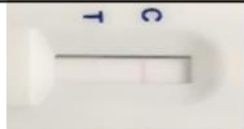
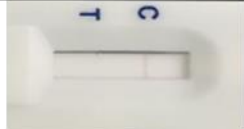
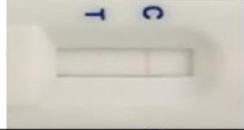
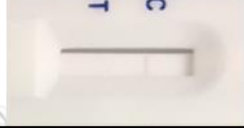
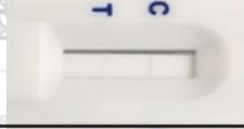
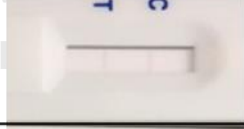
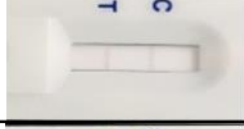
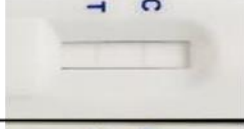
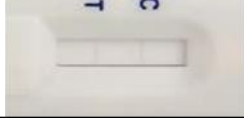


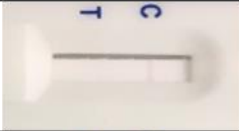


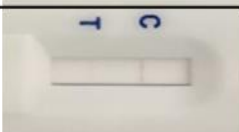
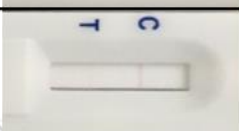
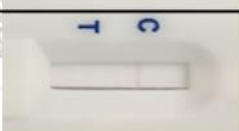
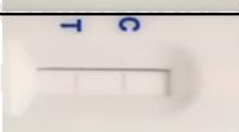
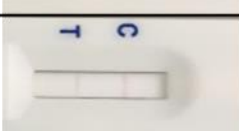
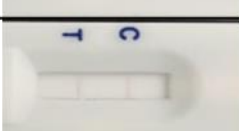
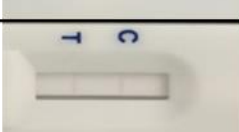
ภาพที่ ก.10 การทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมถั่วเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยแถบทดสอบ เพื่อหาค่าคัดออก

ตารางที่ ก.6 แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมกระป๋องในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบทดสอบ


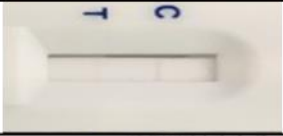
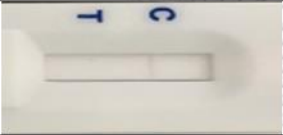

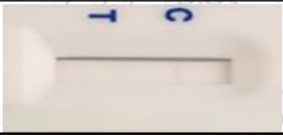
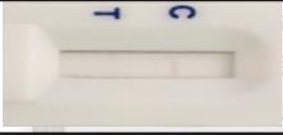
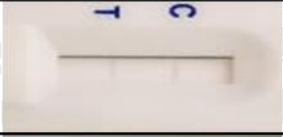
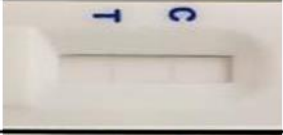
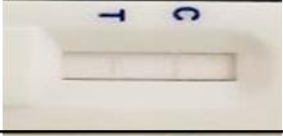
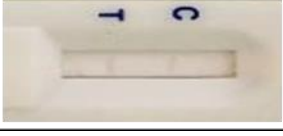
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
1	1		ผลบวก	ผลบวก
1	2		ผลบวก	ผลบวก
1	3		ผลบวก	ผลบวก
1	4		ผลบวก	ผลบวก
1	5		ผลบวก	ผลบวก
1	6		ผลบวก	ผลบวก
1	7		ผลลบ	ผลลบ
1	8		ผลลบ	ผลลบ
1	9		ผลลบ	ผลลบ
1	10		ผลลบ	ผลลบ

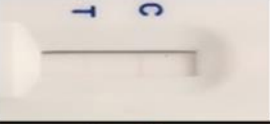
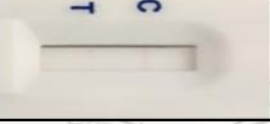
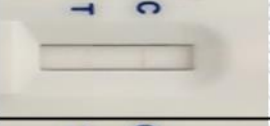
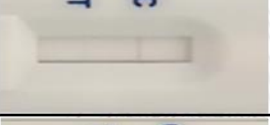
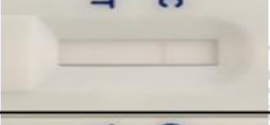
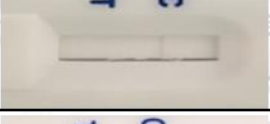
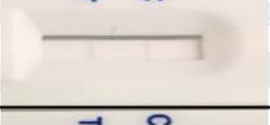
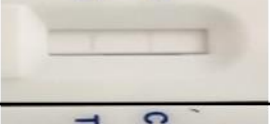
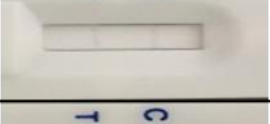
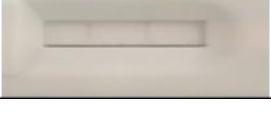
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
2	11		ผลบวก	ผลบวก
2	12		ผลบวก	ผลบวก
2	13		ผลบวก	ผลบวก
2	14		ผลบวก	ผลบวก
2	15		ผลบวก	ผลบวก
2	16		ผลบวก	ผลบวก
2	17		ผลลบ	ผลบวกปลอม
2	18		ผลลบ	ผลลบ
2	19		ผลลบ	ผลลบ
2	20		ผลลบ	ผลลบ

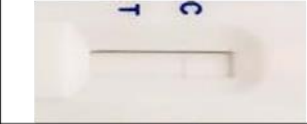
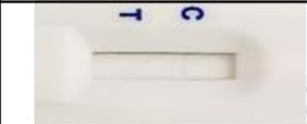
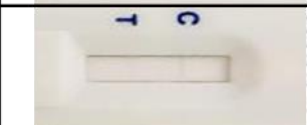
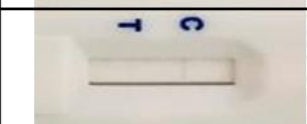
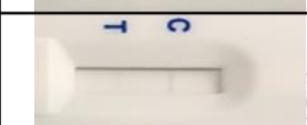
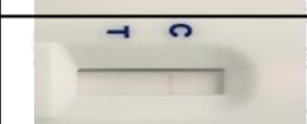
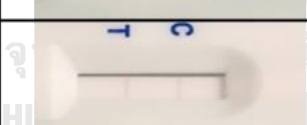
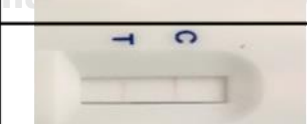
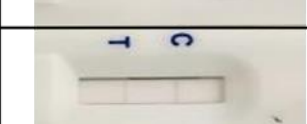
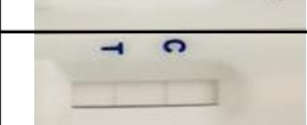
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
3	21		ผลบวก	ผลบวก
3	22		ผลบวก	ผลบวก
3	23		ผลบวก	ผลบวก
3	24		ผลบวก	ผลบวก
3	25		ผลบวก	ผลบวก
3	26		ผลบวก	ผลบวก
3	27		ผลลบ	ผลลบ
3	28		ผลลบ	ผลลบ
3	29		ผลลบ	ผลลบ
3	30		ผลลบ	ผลลบ

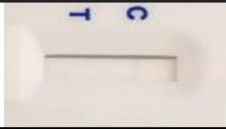
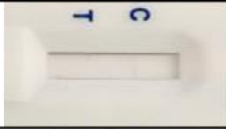
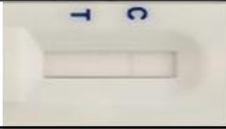
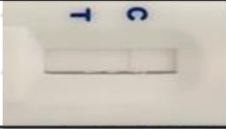
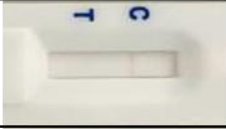
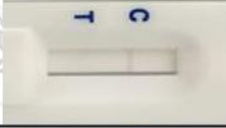
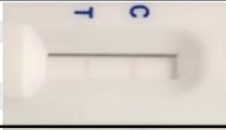
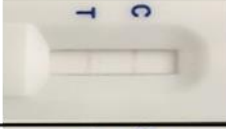
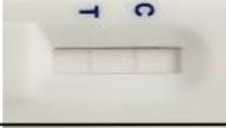
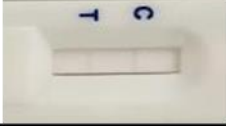
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
4	31		ผลบวก	ผลบวก
4	32		ผลบวก	ผลบวก
4	33		ผลบวก	ผลบวก
4	34		ผลบวก	ผลบวก
4	35		ผลบวก	ผลบวก
4	36		ผลบวก	ผลบวก
4	37		ผลลบ	ผลลบ
4	38		ผลลบ	ผลลบ
4	39		ผลลบ	ผลลบ
4	40		ผลลบ	ผลลบ

ตารางที่ ก.7 แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมแพะในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบ
ทดสอบ

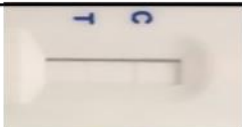
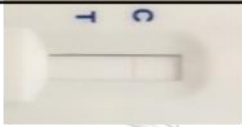
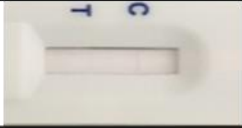
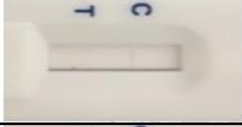
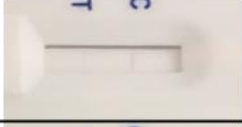
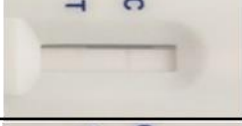
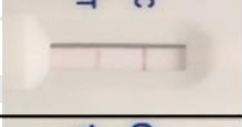
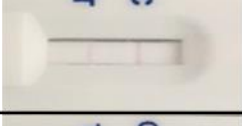
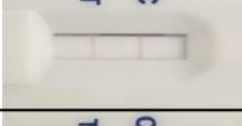

วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
1	1		ผลบวก	ผลบวก
1	2		ผลบวก	ผลบวก
1	3		ผลบวก	ผลบวก
1	4		ผลบวก	ผลบวก
1	5		ผลบวก	ผลบวก
1	6		ผลบวก	ผลบวก
1	7		ผลลบ	ผลลบ
1	8		ผลลบ	ผลลบ
1	9		ผลลบ	ผลลบ
1	10		ผลลบ	ผลลบ

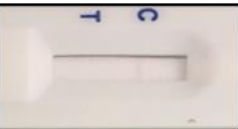
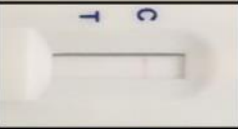
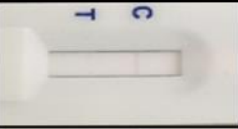
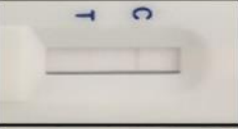
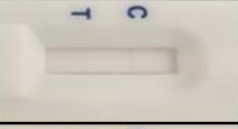
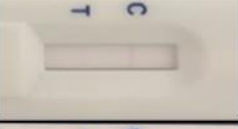
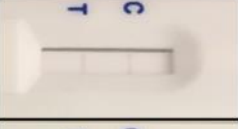
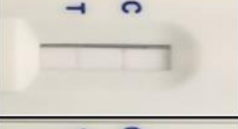
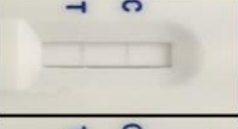
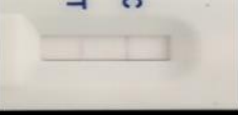
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
2	11		ผลบวก	ผลบวก
2	12		ผลบวก	ผลบวก
2	13		ผลบวก	ผลบวก
2	14		ผลบวก	ผลบวก
2	15		ผลบวก	ผลบวก
2	16		ผลบวก	ผลบวก
2	17		ผลลบ	ผลลบ
2	18		ผลลบ	ผลลบ
2	19		ผลลบ	ผลลบ
2	20		ผลลบ	ผลลบ


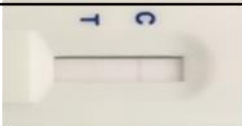
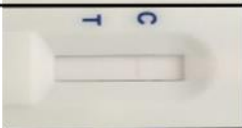
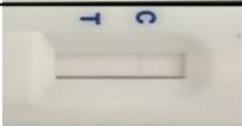

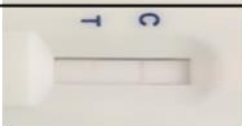
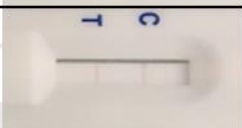
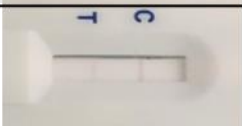
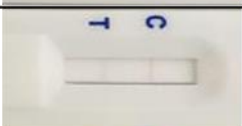
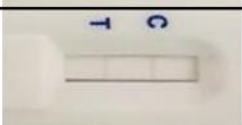
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
3	21		ผลบวก	ผลบวก
3	22		ผลบวก	ผลบวก
3	23		ผลบวก	ผลบวก
3	24		ผลบวก	ผลบวก
3	25		ผลบวก	ผลบวก
3	26		ผลบวก	ผลบวก
3	27		ผลลบ	ผลลบ
3	28		ผลลบ	ผลลบ
3	29		ผลลบ	ผลลบ
3	30		ผลลบ	ผลลบ

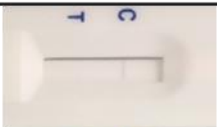
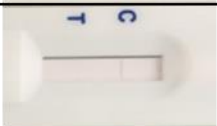
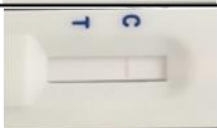
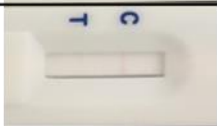
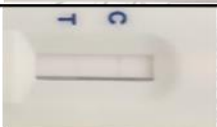
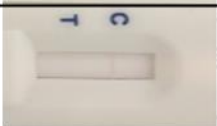
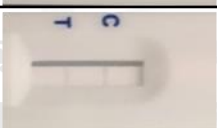
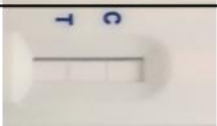
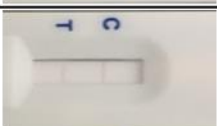
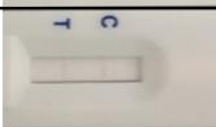
วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
4	31		ผลบวก	ผลบวก
4	32		ผลบวก	ผลบวก
4	33		ผลบวก	ผลบวก
4	34		ผลบวก	ผลบวก
4	35		ผลบวก	ผลบวก
4	36		ผลบวก	ผลบวก
4	37		ผลลบ	ผลลบ
4	38		ผลลบ	ผลลบ
4	39		ผลลบ	ผลลบ
4	40		ผลลบ	ผลลบ

ตารางที่ ก.8 แสดงการทดสอบเคซีนที่ละลายด้วยนมถั่วเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ PBT ด้วยแถบทดสอบ

วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
1	1		ผลบวก	ผลบวก
1	2		ผลบวก	ผลบวก
1	3		ผลบวก	ผลบวก
1	4		ผลบวก	ผลบวก
1	5		ผลบวก	ผลบวก
1	6		ผลบวก	ผลบวก
1	7		ผลลบ	ผลลบ
1	8		ผลลบ	ผลลบ
1	9		ผลลบ	ผลลบ
1	10		ผลลบ	ผลลบ

วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
2	11		ผลบวก	ผลบวก
2	12		ผลบวก	ผลบวก
2	13		ผลบวก	ผลบวก
2	14		ผลบวก	ผลบวก
2	15		ผลบวก	ผลบวก
2	16		ผลบวก	ผลบวก
2	17		ผลลบ	ผลลบ
2	18		ผลลบ	ผลลบ
2	19		ผลลบ	ผลลบ
2	20		ผลลบ	ผลลบ

วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
3	21		ผลบวก	ผลบวก
3	22		ผลบวก	ผลบวก
3	23		ผลบวก	ผลบวก
3	24		ผลบวก	ผลบวก
3	25		ผลบวก	ผลบวก
3	26		ผลบวก	ผลบวก
3	27		ผลลบ	ผลลบ
3	28		ผลลบ	ผลลบ
3	29		ผลลบ	ผลลบ
3	30		ผลลบ	ผลลบ

วันที่	ลำดับที่	ภาพแถบทดสอบ	ผลการทดสอบที่แท้จริง	ผลการทดสอบที่ทดสอบได้
4	31		ผลบวก	ผลบวก
4	32		ผลบวก	ผลบวก
4	33		ผลบวก	ผลบวก
4	34		ผลบวก	ผลบวก
4	35		ผลบวก	ผลบวก
4	36		ผลบวก	ผลบวก
4	37		ผลลบ	ผลลบ
4	38		ผลลบ	ผลลบ
4	39		ผลลบ	ผลลบ
4	40		ผลลบ	ผลลบ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1) 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB stock)

Na₂HPO₄·12H₂O 71.63 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

NaH₂PO₄·H₂O 27.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย Na₂HPO₄ มาไทเทรตด้วยสารละลาย NaH₂PO₄ จนได้ pH 7.4 เก็บเป็น

stock

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

PB stock 1 ลิตร

NaCl 175.2 กรัม

ปรับปริมาตรในน้ำกลั่นให้เป็น 20 ลิตร

3) 0.05% (v/v) tween-20 ใน PBS (PBS-T)

Tween-20 0.5 มิลลิลิตร

PBS 1 ลิตร

4) 5% (v/v) ซีรัมลูกวัว

ซีรัมลูกวัว 5 มิลลิลิตร

PBS 95 มิลลิลิตร

5) 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0

Citric acid 43.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

Potassium citrate 66.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย citric acid มาไทเทรตด้วยสารละลาย potassium citrate จนได้ pH 4.0

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) สับเสตรต TMB

3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) 2.5 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 250 ไมโครลิตร

205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 10 มิลลิลิตร

30% H₂O₂ 3.5 ไมโครลิตร

7) 1 M H₂SO₄ (stop solution)

H ₂ SO ₄	102	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรในน้ำกลั่นให้เป็น	1	ลิตร

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ICA

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

0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB stock)	50	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรในน้ำกลั่นให้เป็น	1	ลิตร

2) 0.1% (v/v) tween-20 ใน PB (PBT)

Tween-20	1	มิลลิลิตร
PB	1	ลิตร

3) 2 mM sodium borate buffer, pH 9.0 (BB)

Sodium tetraborate	0.76	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 1 M HCl		

4) 0.2 M sodium carbonate

Sodium carbonate	2.12	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

5) 10% (w/v) NaCl

NaCl	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

6) 5% (w/v) BSA

BSA	500	มิลลิกรัม
ละลายใน BB, pH 9.0	10	มิลลิลิตร


7) 2% (w/v) sucrose

Sucrose	200	มิลลิกรัม
ละลายใน BB, pH 9.0	10	มิลลิลิตร

8) 1% (w/v) BSA ใน PBT (blocking solution)

BSA	100	มิลลิกรัม
PBT	10	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค




**KESTREL
BIO SCIENCES**

CERTIFICATE OF ANALYSIS

KBS Thailand™
COA-CG1705001

Colloidal Gold, 40 nanometers

Product Name	Colloidal Gold, 40nm
Catalog	KP-05120003
Lot Number	030417-018-6
Volume	500 ML
Peak wave length	522.5
Absorbance	1.168
Storage	2°C - 8°C
Expiration Date	1 year from the date of receipt (May 2018)

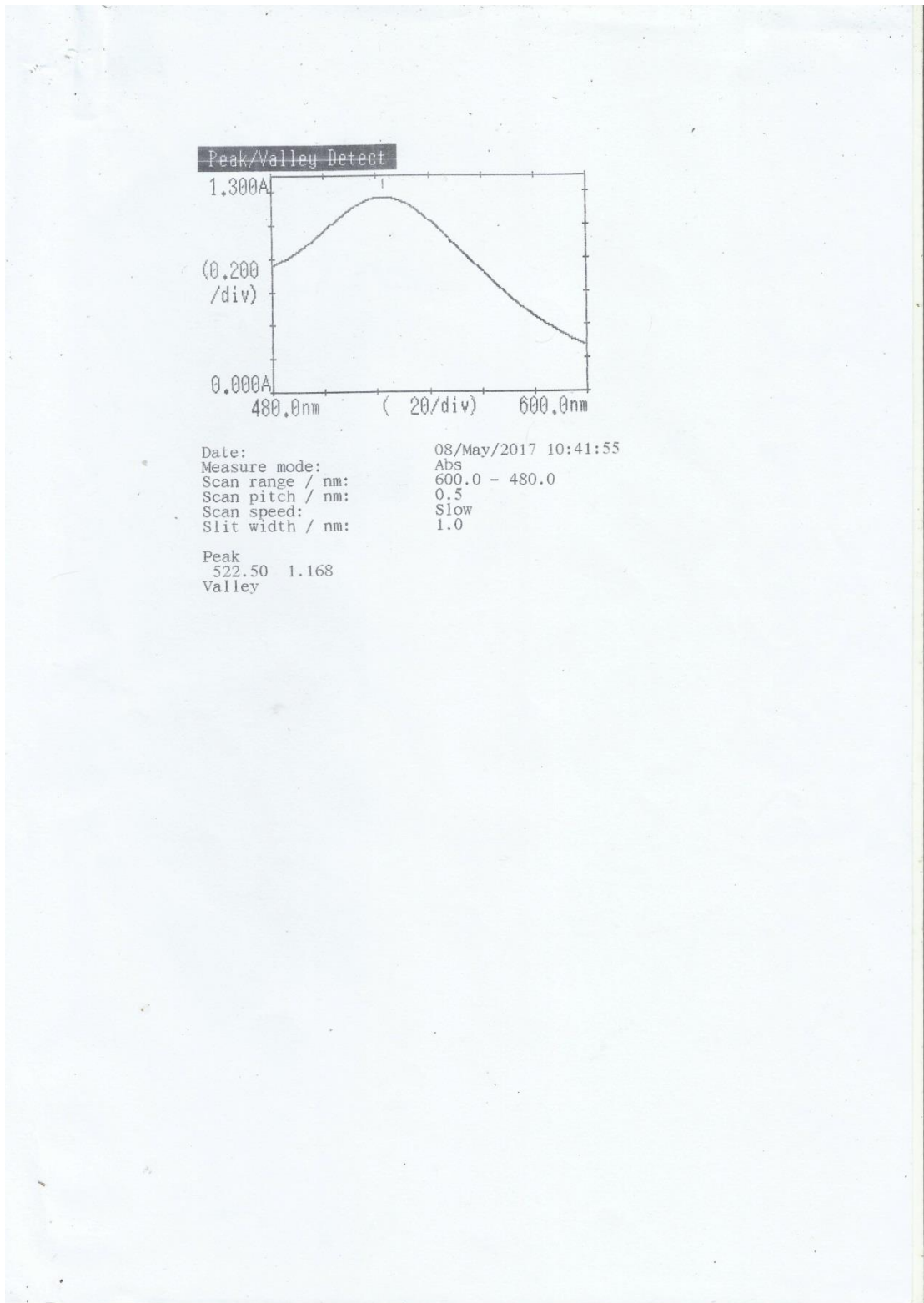


Rinyabhat Patchararajudom (Tah) , GM

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd., Certifies on the date above that this is an accurate record of the analysis of the subject lot and that the data conform to the specifications in effect for this product at the time of analysis.

Kestrel Bio Sciences (Thailand) Co., Ltd.
60/77 Moo 19, Navanakorn Ind., Zone 2
Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120
Mobile: +66 88 661 9156
Email: tah.kbsthailand@gmail.com

ภาพที่ ค.1 ใบรับรองการวิเคราะห์อนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร



ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิภาทรา วงศ์พยัคฆ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อใน หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558 นำเสนอผลงานวิชาการ ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 43 ในหัวข้อเรื่อง Development of test strip for bovine casein detection ณ อาคารจามจุรี 10 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 17-18 ตุลาคม 2560

