

การพัฒนาวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี สำหรับตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ



นางสาวอัจฉิมา กาญจนภา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR SCREENING
DETECTION OF MICROALBUMINURIA

Miss Adjima Kanchanapa



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and

Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี สำหรับตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ
โดย	นางสาวอัจฉิมา กาญจนภา
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรณะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธำรง)

อัจฉิมา กาญจนภา : การพัฒนาวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี สำหรับตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมิน ในปัสสาวะ. (DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR SCREENING DETECTION OF MICROALBUMINURIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 99 หน้า.

โรคไตจากเบาหวานเป็นโรคแทรกซ้อนที่พบบ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเป็นที่ยอมรับว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความไวสูงที่สามารถตรวจพบความผิดปกติของโรคไตจากเบาหวานได้ในระยะแรก ในงานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีในรูปแบบแถบทดสอบ สำหรับตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินในคนมาตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และใช้เป็นส่วนคอนจูเกตในแถบทดสอบ ทำการตรึงซีรั่มอัลบูมินของมนุษย์ (Human serum albumin, HSA) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ และตรึงแอนติบอดีทุติยภูมิต่อแอนติบอดีของหนู ตรงตำแหน่งเส้นควบคุม แถบตรวจนี้ใช้หลักการแบบแย่งจับระหว่างอัลบูมินในปัสสาวะที่ไหลมากับอัลบูมินที่ถูกตรึงบนตำแหน่งเส้นทดสอบในการจับกับแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการเชื่อมต่อระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีและอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรคือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทั้ง HSA ที่ตรึงบริเวณเส้นทดสอบ และแอนติบอดีทุติยภูมิที่ตรึงตรงตำแหน่งเส้นควบคุม คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แถบตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาได้สามารถวัดอัลบูมินในปัสสาวะและรายงานเป็นผลบวกได้เมื่ออัลบูมินมีความเข้มข้นมากกว่า 23.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะกับวิธีอิมมูโนเทอปีเดมิทรี โดยใช้ปัสสาวะจากผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 100 ราย (n=100) ผลการทดลองพบว่าแถบตรวจมีความไว 96 % ความจำเพาะ 100 % ค่าความถูกต้อง 99 % ยิ่งไปกว่านี้ ด้วยวิธีนี้มีค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 98%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา เคมีคลินิก

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5377210937 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: MICROALBUMINURIA / IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY / HUMAN SERUM ALBUMIN / MONOCLONAL ANTIBODY / DIABETIC NEPHROPATHY

ADJIMA KANCHANAPA: DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR SCREENING DETECTION OF MICROALBUMINURIA. ADVISOR: ASST. PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., CO-ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 99 pp.

Diabetic nephropathy is the most common complications in patients with diabetes mellitus. Microalbuminuria has been widely used as an early marker for diabetic nephropathy. In this research, we developed immunochromatographic strip test for screening and detection of microalbuminuria. Monoclonal antibody specific to human serum albumin (HSA) was conjugated with gold nanoparticles and blotted on a conjugated pad. HSA antigen was immobilized on a nitrocellulose membrane at a test line, while the secondary anti-mouse antibody was immobilized at a control line. The assay principle was based on a competition between migrating HSA in urine and the HSA immobilized on the test line for binding with HSA antibody conjugated with colloidal gold particles. Optimal concentrations for conjugation of HSA monoclonal antibody with gold nanoparticles were 40 mg/L for the antibody and 100 mg/L for the gold particles. The optimal concentration for immobilized HSA at the test line and the optimal concentration of the secondary antibody at the control line were both at 1 mg/ml. Cut-off concentration for urinary albumin test in this study was 23.5 mg/L. Results obtained by strip test developed in this study were comparable with results obtained by immunoturbidimetric method used for determination of microalbuminuria in diabetes patients (n=100). The sensitivity, specificity, and accuracy of strip test developed in this study were 96%, 100%, and 99%, respectively. Furthermore, the method gained 100% and 98% positive and negative predictive values, respectively.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and
Molecular Medicine

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา แนะนำและแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ หจก. อีคิวเอ เซ็นเตอร์ สำหรับความอนุเคราะห์สารละลายมาตรฐาน อัลบูมินที่ได้รับควบคุมคุณภาพจากภายนอก สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ บุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมีในงานวิจัย และขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โรงพยาบาลราชวิถี ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อนำมาทดลองในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเงินทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 19 ครั้งที่ 3/2555 และทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ พี่น้อง สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ และสาขาเทคนิคการแพทย์ทุกคน ตลอดจนบุคคลต่างๆที่ไม่สามารถกล่าวได้หมดในที่นี้ ที่คอยให้กำลังใจเมื่อเกิดปัญหาและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จเช่นในวันนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญรูป.....	1
สารบัญตาราง	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 โรคเบาหวาน	6
2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy)	7
2.3 อัลบูมิน (Albumin).....	10
2.4 ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (Microalbuminuria, MAU).....	11
2.4.1 การตรวจ MAU โดยวิธีมาตรฐานสามารถทำได้สองวิธี	12
2.4.1.1 วิธี Immunoturbidimetry	15
2.4.1.2 วิธี Immunonephelometry	15
2.4.1.3 วิธี Radioimmunoassay (RIA)	16
2.4.1.4 วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	16
2.4.1.5 วิธี immunochromatographic assay	17
2.5 กระบวนการทำงานของ Lateral flow	19
2.6 การตรวจคัดกรองโรค (Disease Screening)	20
2.7 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และการนำไปใช้ประโยชน์	22
2.7.1 หลักการเตรียม Colloidal Gold	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	26

3.2 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	27
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	32
3.3.1 การทำโมนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	32
3.3.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่	32
3.3.1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมนโคลนัลแอนติบอดี	33
3.3.1.3 การทำโมนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	33
3.3.1.4 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA) ...	35
3.3.1.5 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	35
3.3.1.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมนโคลนัลแอนติบอดี	36
3.3.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี.....	38
3.3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	38
3.3.2.2 การศึกษาคุณภาพของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้จากการสังเคราะห์. 39	
3.3.2.2.1 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้	
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	39
3.3.2.2.2 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้	
เทคนิค UV-Visible Spectrophotometer	40
3.3.2.3 การศึกษาปริมาณโมนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาค	
ทองคำระดับนาโนเมตร	41
3.3.2.4 การเตรียมชุดตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Immunochromatography	43
3.3.2.5 การหาภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับชุดตรวจคัดกรอง MAU	
แบบเชิงคุณภาพ	46
3.3.2.6 การทดสอบคุณสมบัติ (Characterization) ชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่	
พัฒนาได้	47
3.3.2.6.1 การทดสอบหา cut off ในชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น	47
3.3.2.6.2 การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจคัดกรอง	
MAU	48
3.3.2.7 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ	48
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	49
4.1 การทำโมนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	49

4.1.1 การทำโมนิโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	49
4.1.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)	50
4.1.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง	52
4.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี ..	54
4.2.1 ผลการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	54
4.2.2 คุณภาพของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้	55
4.2.2.1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านหรือ Transmission Electron Microscope (TEM).....	55
4.2.2.2 ผลการศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer	56
4.2.3 ผลการศึกษาปริมาณของโมนิโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	58
4.2.4 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจคัดกรอง MAU แบบเชิงคุณภาพ	59
4.2.4.1 ชนิดของสารที่ใช้ในการ Block เพื่อลดการจับที่ไม่จำเพาะบนผิวของ Nitrocellulose membrane.....	59
4.2.4.2 ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสำหรับชุดทดสอบ	61
4.2.4.3 ปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบ	62
4.2.4.4 ผลการทดสอบความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมบน Nitrocellulose membrane.....	64
4.2.5 คุณสมบัติของชุดตรวจคัดกรองที่พัฒนาได้.....	66
4.2.5.1 ค่า cut off ในชุดตรวจ MAU ที่พัฒนาขึ้น	66
4.2.5.2 ทดสอบหาความแม่นยำ (Precision)	67
4.2.6 ผลการนำแถบตรวจกรองที่พัฒนาได้ไปตรวจในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวาน	71
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาวิจัย	73
รายการอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	99

สารบัญรูป

รูปที่ 2. 1 การดำเนินโรคในระยะเวลาต่างๆ และปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดของโรคไตจากเบาหวาน	9
รูปที่ 2. 2 ปัจจัยการเกิดโรคไตจากเบาหวาน	10
รูปที่ 2. 3 แผนภูมิแสดงการคัดกรองและการวินิจฉัยโรคเบาหวาน	14
รูปที่ 2. 4 แสดงหลักการ particles-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA).....	15
รูปที่ 2. 5 แสดงส่วนประกอบและหลักการของชุดตรวจ Micral test® ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics	18
รูปที่ 2. 6 แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจวิเคราะห์ที่ใช้หลักการ Immunochromatography (26).....	19
รูปที่ 2. 7 แสดงหลักการ Lateral flow immunoassay : (ก) หลักการ Sandwich solid-phase immunoassay, (ข) หลักการ Competitive solid-phase immunoassay.....	20
รูปที่ 2. 8 แสดงขนาดและสีต่างๆ ที่มีสีของ AuNPs	25
รูปที่ 3. 1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยง เซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) (ก). เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร (ข). เลี้ยงใน ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน (spinner flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร.....	32
รูปที่ 3. 2 การทำไมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี (Protein G) คอลัมน์.....	34
รูปที่ 3. 3 หลักการวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	36
รูปที่ 3. 4 ก อุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ข ขั้นตอนการ เตรียมอุปกรณ์ SDS-PAGE.....	37
รูปที่ 3. 5 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	39
รูปที่ 3. 6 แสดงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) ของบริษัท JEOL รุ่น JEM-2100 ที่ใช้ในงานวิจัย ...	40
รูปที่ 3. 7 แสดง UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 600, Thermo scientific)	41
รูปที่ 3. 8 แสดงแรงชนิดต่างๆ ที่จับกันระหว่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับโปรตีน	42
รูปที่ 3. 9 แสดงการอ่านผลตรวจของชุดตรวจ MAU ที่ผลิตขึ้น	44
รูปที่ 3. 10 ภาพแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอัลบูมินกับไมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับ นาโนเมตร โดยใช้หลักการ competitive lateral flow immunochromatography assay	44
รูปที่ 3. 11 แสดงประกอบส่วนของชุดตรวจวิเคราะห์ ลำดับการประกอบและขนาดแต่ละส่วน.....	46
รูปที่ 3. 12 แสดงสารละลาย EQA แบบ Lyophilised Urine ที่มีปริมาณ Human serum albumin ปริมาณความเข้มข้น น้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	47

รูปที่ 4. 1 โครมาโทแกรมจากการทำโมโนโคลนัลแอนติบอดี (โคลน 4/B11/G3/H11/G1) ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสขนาด 1.5x5 เซนติเมตรและทำการล้างคอลัมน์ด้วย glycine hydrochloride pH 2.7 โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	50
รูปที่ 4. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA จากการทดสอบด้วยวิธี BCA.....	51
รูปที่ 4. 3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลด้วยวิธี SDS-PAGE ; M คือ Molecular weight protein markers; Lane 1 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี mAb ก่อนการทำให้บริสุทธิ์; Lane 2 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FCS; Lane 3 คือ FCS; Lane 4 คือ สารละลายโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	53
รูปที่ 4. 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของ Molecular weight protein marker กับค่า Rf บน SDS-PAGE	53
รูปที่ 4. 5 ลักษณะภายนอกของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้.....	55
รูปที่ 4. 6 ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) แสดงรูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นในกำลังขยายที่แตกต่างกัน (ก) 100 นาโนเมตร, (ข) 50 นาโนเมตร และ (ค-ง) 20 นาโนเมตร	56
รูปที่ 4. 7 กราฟแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้.....	57
รูปที่ 4. 8 ผลการศึกษาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	58
รูปที่ 4. 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และผลต่างของการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 520 และ 580 นาโนเมตร.....	59
รูปที่ 4. 10 แสดงคุณภาพของชุดทดสอบ เมื่อใช้สารแต่ละชนิดทำหน้าที่ปกปิดผิวบน nitrocellulose membrane .	61
รูปที่ 4. 11 ผลของปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ตรึงกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี ต่อคุณภาพของชุดทดสอบ.....	62
รูปที่ 4. 12 ผลของปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ใช้หยดลงบน sample pad ต่อความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม	63
รูปที่ 4. 13 แสดงการทดสอบหาปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม ที่ใช้หยดลงบน sample pad : 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 ไมโครลิตร โดยวัดความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมด้วยโปรแกรม Image J.....	64
รูปที่ 4. 14 แสดงการทดสอบหา cut off โดยใช้ MAU EQA ที่มีปริมาณ HSA ความเข้มข้นต่างๆ ชุดตรวจ 1-4 ทดสอบกับสารตัวอย่างมาตรฐานความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Strip 1 และ 2 ขึ้นเส้นสีแดง 1 เส้น เฉพาะที่เส้นควบคุม; Strip 3 และ 4 ขึ้นเส้นสีแดง 2 เส้น ทั้งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม).....	67
รูปที่ 4. 15 แสดงแถบตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ความ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แทนไมโครอัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ.....	68
รูปที่ 4. 16 แสดงชุดตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ	69

รูปที่ 4. 17 แสดงแถบตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between day) จำนวน 20 วัน โดยใช้ความ
0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แทนไมโครอัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ.... 70

รูปที่ 4. 18 แสดงชุดตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between day) จำนวน 20 วัน โดยใช้ความ
เข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ..... 71

รูปที่ ก. 1 แสดงผลของปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ppm
ที่ใช้ตรงกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยทดสอบกับ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 (อัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า
20 มิลลิกรัมต่อลิตร)..... 83



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2. 1	ตารางแสดงปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะแบบต่างๆ โดยแบ่งตามวิธีเก็บตัวอย่างปัสสาวะ	12
ตารางที่ 2. 2	ผลการตรวจในการทดสอบเพื่อการตรวจคัดกรองโรค (Screening test) ในบุคคลที่ป่วยและไม่ป่วย	21
ตารางที่ 2. 3	ประวัติความเป็นมาของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	23
ตารางที่ 2. 4	แสดงการเปรียบเทียบผลจากชนิดต่างๆ ที่มีใช้ในชุดตรวจในปัจจุบัน	24
ตารางที่ 3. 1	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	26
ตารางที่ 3. 2	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	27
ตารางที่ 3. 3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับปริมาณของ Trisodium citrate	41
ตารางที่ 4. 1	ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	51
ตารางที่ 4. 2	ค่า R_p และน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์.....	54
ตารางที่ 4. 3	แสดงผลของปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ใช้หยดลงบน sample pad ต่อความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม.....	63
ตารางที่ 4. 4	แสดงการทดสอบความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรึงตำแหน่งเส้นทดสอบ	65
ตารางที่ 4. 5	แสดงผลแถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี immunoturbidimetry.....	72
ตารางที่ ก. 1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในแต่ละแฟรคชันจาก affinity chromatography ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์	80
ตารางที่ ก. 2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร.....	81
ตารางที่ ก. 3	แสดงการทดสอบหาความแม่นยำของชุดตรวจโรคภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร)	84
ตารางที่ ก. 4	แสดงการทดสอบหาความแม่นยำของชุดตรวจโรคภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ.....	85
ตารางที่ ก. 5	แสดงการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between in day) จำนวน 20 วันโดยใช้ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร).....	86
ตารางที่ ก. 6	แสดงการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between in day) จำนวน 20 วันโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ.....	87
ตารางที่ ก. 7	แสดงการเปรียบเทียบชุดตรวจคัดกรองที่ผลิตกับวิธีอิมมูโนเทอปีโดมิทรีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.	88

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในโรคเรื้อรังที่เป็นกันมากที่สุด พบว่ามีประชากรเป็นโรคเบาหวานเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อันเนื่องมาจากปัจจัยหลายๆ ด้านประกอบกัน เช่น พันธุกรรม การรับประทานอาหารที่ไม่ได้สัดส่วน การดำเนินวิถีชีวิตในปัจจุบันที่ส่งผลให้มีการออกกำลังกายน้อยลง เป็นต้น จากการศึกษาการเกิดโรคเบาหวานทั่วโลกพบว่าในปี ค.ศ. 2000 มีผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลก 2.8 % โดยคิดเป็นจำนวนประชากร 171 พันล้านคน และจะมีอัตราที่เพิ่มสูงขึ้นถึง 4.4 % ในปี ค.ศ. 2030 เพิ่มจำนวนเป็น 366 พันล้านคนในปี ค.ศ. 2030 ซึ่งพบว่าอัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้นนี้ส่วนใหญ่พบในประเทศที่พัฒนาแล้วมากกว่าประเทศที่กำลังพัฒนา พบว่าอายุโดยเฉลี่ยของประชากรในประเทศที่กำลังพัฒนาส่วนใหญ่อยู่ที่ 45-64 ปี และประเทศที่พัฒนาแล้วอายุโดยเฉลี่ยอยู่ที่มากกว่า 65 ปีขึ้นไป โดยพบว่าประชากรเพศหญิงมีอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานมากกว่าเพศชาย และความชุกของโรคเพิ่มขึ้นตามอายุที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม มีการคาดการณ์ว่าจะพบผู้ป่วยโรคเบาหวานในอัตราที่สูงขึ้น

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังเกิดขึ้นจากการเสียสมดุลของการใช้น้ำตาลในเลือด โดยฮอร์โมนอินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ถูกสร้างขึ้นที่ตับอ่อน มีหน้าที่คอยช่วยให้ร่างกายเผาผลาญน้ำตาลมาใช้เป็นพลังงาน เมื่อร่างกายสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้น้อยหรือไม่สร้างเลยจึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเบาหวานขึ้น ชนิดของโรคเบาหวาน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ เบาหวานชนิดที่ 1 เกิดจากการที่ตับอ่อนไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินให้เพียงพอ เนื่องจากเบตาเซลล์ (beta cells) ของตับอ่อนถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จึงต้องได้รับอินซูลินด้วยการฉีดหรือใช้เครื่องปั๊มอินซูลินและเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นเบาหวานที่พบเป็นส่วนใหญ่ เกิดจากการที่ตับอ่อนยังสามารถสร้างอินซูลินได้แต่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย หรือเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ผู้ป่วยต้องมีการควบคุมอาหาร การใช้ยาชนิดกินหรือใช้อินซูลินชนิดฉีด โดยโรคเบาหวานทั้ง 2 ชนิดจะส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น จนส่งผลให้เป็นอันตรายต่อกระบวนการต่างๆ ของร่างกาย ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา เช่น เกิดจากความผิดปกติของหลอดเลือด ส่งผลต่อการไหลเวียนของเลือด ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวานที่พบมากที่สุด ได้แก่ โรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นที่ตา (diabetic retinopathy), โรคแทรกซ้อนในระบบประสาท (diabetic neuropathy), ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease, ESRD) หรือเป็นโรคไตจากเบาหวาน (diabetic nephropathy) รวมถึงการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) (1, 2) เป็นต้น โดยพบว่าโรคแทรกซ้อนที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยเบาหวาน คือ การเป็นโรคไตจากเบาหวาน (3)

โรคไตที่เกิดจากโรคเบาหวาน พบในผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 1 โดยมีอัตราเฉลี่ยร้อยละ 30-45 และพบในผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 อัตราเฉลี่ยร้อยละ 20 ซึ่งในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่

2 ตัวบ่งชี้ที่จะสามารถบ่งบอกถึงภาวะแทรกซ้อนที่จะเกิดขึ้นกับไตในผู้ป่วยเบาหวานได้ในระยะแรกคือ การตรวจพบโปรตีนอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะ ซึ่งในระยะแรกเริ่มของโรคจะมีปริมาณโปรตีนอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะในปริมาณน้อยๆ ในช่วงประมาณ 30-300 มิลลิกรัม โดยเรียกภาวะดังกล่าวว่า ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย หรือภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria, MAU) ซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นภาวะเริ่มแรกของโรคและยังอยู่ในระยะสามารถรักษาให้หายได้ โปรตีนชนิดอัลบูมินเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากตับ และมีปริมาณมากในเลือด ทำหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่างในเลือดให้อยู่ในระดับสมดุล เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารเช่น ยา กรดไขมันอิสระ ฮอร์โมน เป็นต้น การมีอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะสามารถใช้เป็นแสดงประสิทธิภาพการทำงานของไตได้ โดยในการทำงานของไตจะอาศัย glomerular basement membrane (GMB) ซึ่งมีลักษณะคล้ายตาข่าย และทำงานร่วมกับ heparan sulfate ซึ่งเป็นประจุลบ เพื่อทำหน้าที่คัดกรองโมเลกุลตามขนาดและประจุ ดังนั้นในคนปกติ อัลบูมินซึ่งมีประจุลบจะไม่สามารถรั่วออกมาในปัสสาวะได้ โดยในคนปกติสามารถมีอัลบูมินในปัสสาวะได้ไม่เกิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเกิดพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่ไต จะส่งผลให้คุณสมบัติการคัดกรองสารของไตประสิทธิภาพลดลง โดยเริ่มต้นจากการลดลงของสาร heparan sulfate ซึ่งเป็นสารที่มีประจุลบ ทำให้การกีดขวางโดยการใช้ประจุผลักรกกันเองลดน้อยลง ส่งผลให้อัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติเล็กน้อย ในปริมาณ 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน (30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร) เรียกว่า ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ซึ่งถ้าหากมีการตรวจพบโปรตีนอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะในปริมาณน้อยๆ ในช่วงดังกล่าว แต่ออกมาในปริมาณที่มากกว่าค่าปกติ ซึ่งคนปกติอัลบูมินในปัสสาวะควรตรวจพบน้อยกว่า 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไตที่ผิดปกติได้ในระยะแรกได้ ซึ่งการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ มีประโยชน์อย่างมากในผู้ป่วยเบาหวาน เมื่อตรวจพบความผิดปกติ สามารถหาทางป้องกันหรือช่วยในการรักษาโรคแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นได้ในระยะแรก เช่น การควบคุมความดันโลหิต การควบคุมน้ำตาลในเลือด และการจำกัดการรับประทานโปรตีน สามารถช่วยให้โรคไตที่เกิดจากโรคเบาหวานในระยะแรกสามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้ โดยหากผู้ป่วยที่ตรวจพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ แล้วไม่รักษา และทิ้งระยะเวลาไว้ ผู้ป่วยก็จะผ่านจากภาวะไมโครอัลบูมินูเรียเข้าสู่ภาวะแมโครอัลบูมินูเรีย (macroalbuminuria) คือมีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะวันละมากกว่า 300 มิลลิกรัม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างของ GMB ส่งผลให้มีการขยายตัวของช่องตาข่ายจากเดิมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นาโนเมตร ให้ใหญ่ขึ้น โดยระยะนี้อาจมีความผิดปกติอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น มีปริมาณยูเรียไนโตรเจนในเลือด (Blood Urea Nitrogen) เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณครีเอตินิน (creatinine) ในเลือดสูงกว่าค่าปกติ สุดท้ายโรคจะพัฒนาขึ้นจนกระทั่งเข้าสู่ภาวะไตวายในที่สุด และเป็นระยะที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นภาวะที่มีการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะ เพิ่มมากขึ้นกว่าในคนปกติ ในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง จะพบอัลบูมินปริมาณ 30-300 มิลลิกรัมหรือ

ปัสสาวะที่เก็บช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง ตรวจพบอัลบูมินปริมาณ 20-200 ไมโครกรัมต่อนาที หรือ ปริมาณ 30-300 ไมโครกรัมของอัลบูมินต่อ 1 มิลลิกรัมของปริมาณครีเอตินิน (urine albumin/creatinine ratio) โดยใช้ปัสสาวะแบบสุ่มเก็บ (random spot urine) ตามคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานของสหรัฐอเมริกา (4) ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ควรได้รับการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะทุกปี ในรายที่ดำเนินโรคตั้งแต่ปีที่ 5 เป็นต้นไป และผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ควรได้รับการตรวจนับตั้งแต่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน ต่อเนื่องทุกปี เพื่อสามารถติดตามการเสื่อมของไตอย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจที่ใช้แถบจุ่มปัสสาวะ (urine dipstick) ชนิดธรรมดา ที่ใช้กันทั่วไปใน ห้องปฏิบัติการการแพทย์ เป็นชนิดที่ใช้ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมในปัสสาวะ จึงไม่จำเพาะ ต่ออัลบูมิน โดยมีความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ค่อนข้างต่ำ ไม่เพียงพอ สำหรับการตรวจความผิดปกติของไตในระยะแรก (5) การตรวจจะให้ผลบวกและมีการ เปลี่ยนแปลงของสีและสังเกตได้ด้วยตาเปล่าเมื่อมีปริมาณอัลบูมินมากกว่า 300 มิลลิกรัมใน ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง. หรือ มากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมครีเอตินินขึ้นไป ซึ่งเป็นระยะที่ไต มีความเสียหายมากแล้ว ทั้งนี้การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ จำเป็นต้องใช้แถบที่ผลิตมา จำเพาะ เช่น microalbuminuria strip ซึ่งเป็นการวัดเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) มีความไวและความจำเพาะที่ยอมรับได้ ประมาณร้อยละ 90 เช่น Micral II ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics เป็นต้น โดยเป็นแถบตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่อาศัยปฏิกิริยาเคมี แล้วเกิดสี จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จับอยู่บนแอนติบอดี ปริมาณอัลบูมินที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้มากในห้องปฏิบัติการการแพทย์ (6)

นอกจากนี้ วิธีการอื่นๆ สำหรับตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่เป็นการตรวจเชิงปริมาณ เช่น immunoturbidimetry, immunonephelometry, radioimmunoassay (RIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (7-11) สามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่มีราคาแพง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ใน ห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่เท่านั้น ไม่สามารถพกพาออกใช้ในภาคสนามหรือในโรงพยาบาลระดับ ชุมชนบางแห่งได้ จึงทำให้ประชาชนผู้อยู่ในท้องถิ่นห่างไกลไม่สามารถเข้ารับการรับการรักษาได้ อย่างเท่าเทียม แม้ว่าวิธีดังกล่าวนี้จะมีราคาถูก โดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 4-6 เหรียญสหรัฐ ต่อ การทดสอบ (12) ในทางกลับกันก็ยังมีราคาสูงอยู่เมื่อนำมาใช้ในประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากต้องมีการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศ ทำให้การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจึง ยังมีข้อจำกัด ไม่สามารถใช้ตรวจวัดในผู้ป่วยเบาหวานที่มีความเสี่ยงทุกรายได้

ในงานวิจัยนี้ จึงได้เสนอวิธีการตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการอิมมูโนโคร มาโทกราฟี ในงานวิจัยนี้ได้นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินในคน ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ประสบ ความสำเร็จในการผลิตแอนติบอดีดังกล่าวมาใช้ ทำให้ลดการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศ

ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นการผลิตชุดตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะใช้เองภายในประเทศ จะสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมาก ทำให้สามารถผลิตแถบทดสอบ ได้ปริมาณมาก สามารถรองรับจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่มีจำนวนมากในประเทศได้เพียงพอ ในงานวิจัยนี้ การตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะใช้หลักการการแข่งขันแย่งจับ ระหว่างอัลบูมินในปัสสาวะกับอัลบูมินที่ตรึงอยู่บนชุดตรวจ ตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ (test line) โดยมีการใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีการตรึงโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมิน สามารถทราบผลการทดสอบได้จากสีของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า การผลิตแถบนี้เพื่อใช้ตรวจกรองในผู้ป่วยเบาหวานเป็นมาตรการป้องกันการเกิดโรคไตจากโรคเบาหวาน เนื่องจากแถบนี้สามารถแพร่หลายเข้าถึงกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานในทุกกลุ่ม จึงช่วยการป้องกันการเกิดโรคไตจากโรคเบาหวานได้ตั้งแต่ระยะแรก ช่วยลดความสูญเสียที่สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งด้านสุขภาพและด้านค่าใช้จ่ายที่จะเกิดจากการรักษาผู้ป่วยโรคไต ซึ่งนับว่าเป็นภาระของประเทศที่จะช่วยเหลือค่าใช้จ่ายในการรักษา เช่นการฟอกเลือดหรือการปลูกถ่ายไต นอกจากนี้การผลิตแถบคัดกรองไมโครอัลบูมินได้เอง จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าชุดน้ำยาตรวจคัดกรองระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ นับว่าเป็นการช่วยในการรักษาบุคลากรค่าทางเศรษฐกิจของประเทศอีกทางหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษา ออกแบบ และพัฒนาแถบตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธี Immunochromatography ที่มีการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินในคน ที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพแถบตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาได้กับตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวานจริง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้คือเป็นการพัฒนาแถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยวิธี Immunochromatography ที่ใช้หลักการแย่งจับระหว่างอัลบูมินในปัสสาวะและอัลบูมินที่ตรึงบนแถบตรวจ โดยแย่งจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่ใช้ในงานวิจัยเป็นชนิดที่ผลิตได้เองในห้องปฏิบัติการ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายให้แถบตรวจสามารถคัดกรองผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ที่ค่า cut off มากกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิจัยคือ ปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 100 ราย และใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บ

แบบสุ่ม และเปรียบเทียบผลกับวิธีอิมมูโนเทอปีไดมิทรี ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติใน
ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน เป็นโรคเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งสามารถเกิดเป็นโรคเรื้อรัง สาเหตุเกิดจากตับอ่อนไม่สามารถสร้างฮอร์โมนอินซูลินได้หรืออาจเกิดจากร่างกายไม่สามารถตอบสนองกับฮอร์โมนอินซูลินได้เหมือนคนปกติ ส่งผลให้ร่างกายของผู้ป่วยเบาหวานมีปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งถ้าผู้ป่วยไม่สามารถที่จะควบคุมความผิดปกติได้ จะส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนขึ้น เช่น โรคไตที่เกิดจากเบาหวาน (diabetic nephropathy), โรคจอประสาทตาเสื่อม (diabetic retinopathy), โรคระบบประสาทเสื่อม (diabetic neuropathy) และโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) เป็นต้น (1-3) อุบัติการณ์โรคเบาหวานในประเทศไทยพบประมาณร้อยละ 9.6 ของประชากรผู้ใหญ่อายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป เป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทย ที่ก่อให้เกิดอัตราเจ็บป่วยและอัตราเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น โดยผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 95 พบเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 โดยจำนวนน้อยพบว่าเป็นผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และมักจะพบในเด็กหรือวัยรุ่น

เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวานในผู้ใหญ่ (13)

1. ระดับกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมงแต่ไม่มากกว่า 16 ชั่วโมง (fasting plasma glucose) มากกว่าหรือเท่ากับ 126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร อย่างน้อย 2 ครั้ง
2. ระดับกลูโคสในพลาสมาเมื่อเวลาใดก็ได้ (random plasma glucose) มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ร่วมกับมีอาการของโรคเบาหวาน ได้แก่ ปัสสาวะมาก ดื่มน้ำมาก น้ำหนักตัวลดลงโดยไม่ทราบสาเหตุ
3. ระดับกลูโคสในพลาสมาที่ 2 ชั่วโมง หลังการดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรอย่างน้อย 2 ครั้ง

ทั้งนี้หากว่าผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลสูงไม่มากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แต่แพทย์ยังสงสัยว่าผู้ป่วยอาจเป็นโรคเบาหวานได้ ควรทำการตรวจซ้ำโดยวิธีใดวิธีหนึ่ง ในวันอื่นอีกครั้ง

2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy)

โรคไตจากเบาหวานเป็นภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่สำคัญของผู้ป่วยโรคเบาหวาน พบได้ประมาณร้อยละ 30-50 ของผู้ป่วยเบาหวาน จากการสำรวจในประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ร้อยละ 18.7-43.5 และภาวะ overt nephropathy ร้อยละ 1.6-5.1 นอกจากนี้โรคไตจากเบาหวานเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย คือพบประมาณร้อยละ 30.1 ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาทดแทนไตในประเทศไทย โดยลักษณะทางคลินิกของโรคไตจากเบาหวานสามารถตรวจพบได้ดังนี้(14)

1. ภาวะโปรตีนชนิดอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะ (albuminuria) ซึ่งในระยะแรกมีปริมาณเล็กน้อยหรือระยะที่เรียกว่าไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) คือมี urine albumin excretion rate (UAE) 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน ระยะนี้ถ้าทิ้งไว้ไม่ได้รับการรักษาปริมาณโปรตีนชนิดอัลบูมินอาจตรวจพบในปัสสาวะได้มากขึ้น (macroalbuminuria หรือ overt proteinuria) คือมี UAE มากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน โดยไม่ได้มีสาเหตุจากโรคอื่น
2. อาการความดันโลหิตสูง (วินิจฉัยโดยมีความดันโลหิตสูงกว่า 140/90 มิลลิเมตรปรอท เมื่อยังไม่ได้รับการรักษา หรือความดันโลหิตสูงกว่า 130/80 มิลลิเมตรปรอท เมื่อได้รับการรักษาแล้ว)
3. การทำงานของไต (glomerular filtration rate; GER) พบว่าในระยะแรกการทำงานของไตจะปกติหรือสูงกว่าปกติ ต่อมาจะเริ่มเสื่อม และเสื่อมมากขึ้นจนเกิดโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายในที่สุด

ระยะต่างๆ ของโรคไตจากเบาหวานและการดำเนินของโรค

Normoalbuminuria หมายถึง ภาวะที่ผู้ป่วยเบาหวานมีค่า Albumin/ creatinine ratio (ACR) < 30 mg/g creatinine จากการตรวจตัวอย่างปัสสาวะถ่ายครั้งเดียว หากตรวจด้วยแถบจุ่มพิเศษสำหรับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะให้ผลลบ

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (**microalbuminuria, MAU**) หมายถึง เป็นระยะเริ่มแรกของโรคไตจากเบาหวานที่ตรวจไม่พบโปรตีนชนิดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยแถบตรวจปัสสาวะ (urine dipstick) ทั่วไป แต่จะตรวจพบได้ด้วยแถบตรวจจำเพาะสำหรับอัลบูมินปริมาณน้อย (microalbuminuria dipstick) หรือวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้ 20-200 ไมโครกรัมต่อนาทีหรือ 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างน้อย 2 ใน 3 ครั้ง ภายในระยะเวลา 6 เดือน โดยไม่มีสาเหตุอื่น

Macroalbuminuria, overt proteinuria หรือ overt nephropathy หมายถึง เป็นระยะของโรคไตจากเบาหวานที่ตรวจพบโปรตีนชนิดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยแถบตรวจปัสสาวะ (urine dipstick) ได้ตั้งแต่ระดับเล็กน้อย (trace) ขึ้นไป หรือวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะได้มากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อนาทีหรือ 300 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างน้อย 2 ใน 3 ครั้ง ภายในระยะเวลา 6 เดือน โดยไม่มีสาเหตุอื่น

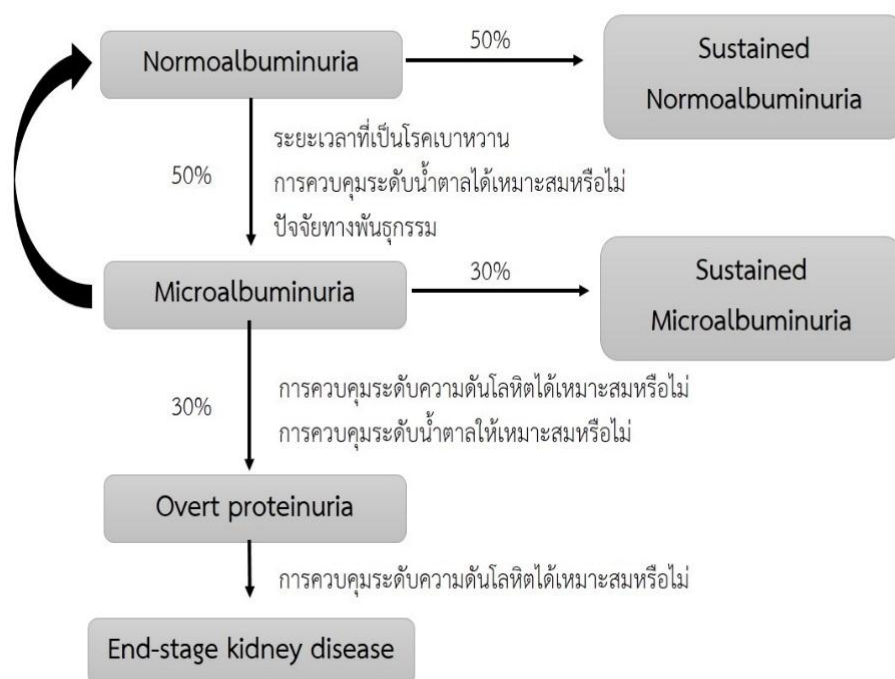
โรคไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease) หมายถึง ภาวะที่ไตมีความบกพร่องในการกำจัดของเสีย โดยค่า glomerular filtration rate (GFR) หรือค่าการขจัดครีเอตินิน (creatinine clearance) ต่ำกว่า 60 มิลลิลิตรต่อนาทีหรือมีความผิดปกติทางพยาธิสภาพ หรือโครงสร้างของไต ถึงแม้ว่า GFR ปกติ เช่น ตรวจพบโปรตีนรั่วทางปัสสาวะเกินปกติ, พบเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะเกินปกติ เป็นต้น และความผิดปกติที่กล่าวมาข้างต้นต้องเป็นอย่างเรื้อรัง คือ เป็นติดต่อกันนานเกิน 3 เดือน

ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (End-stage kidney disease) หมายถึง โรคไตเรื้อรังที่มีการทำงานของไตต่ำมาก คือ ค่า creatinine clearance ต่ำกว่า 10-15 มิลลิลิตรต่อนาที ผู้ป่วยมักจะมีอาการหรือภาวะแทรกซ้อนของการที่มีของเสียคั่งในร่างกาย และส่วนใหญ่จำเป็นต้องประคับประคองชีวิตด้วยการรักษาทดแทนการทำงานของไต ได้แก่ การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) การล้างไตด้วยน้ำยาทางช่องท้อง (continuous ambulatory peritoneal dialysis, CAPD) หรือ การปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) เป็นต้น

ผู้ป่วยเบาหวานไม่ได้เกิดโรคไตจากเบาหวานทุกราย เมื่อติดตามการดำเนินโรคของผู้ป่วยเบาหวานเป็นระยะเวลานาน พบว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จะสามารถตรวจพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้ ซึ่งมักจะพบหลังจากวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานมานาน 5-10 ปี หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมผู้ป่วยกลุ่มนี้ถึงร้อยละ 80 จะมีอัลบูมินในปัสสาวะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะและไม่ได้ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ประมาณ 1 ใน 3 จะมีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เข้าสู่ระยะ macroalbuminuria ต่อไป ประมาณ 1 ใน 3 อาจมีปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะลดลงจนเป็นปกติ ผู้ป่วยที่เข้าสู่ระยะ macroalbuminuria จะมีการเสื่อมหน้าที่ของไตลงไปเรื่อยๆ และพัฒนาเข้าสู่การเป็นไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายในที่สุด โดยประมาณว่าร้อยละ 20 ของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จะมีโรคไตจากเบาหวานและเข้าสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายภายในระยะเวลา 20 ปีหลังจากวินิจฉัย (รูปที่ 2.1)

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีธรรมชาติการดำเนินโรคของโรคไตแตกต่างกัน พบว่ามีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งตรวจพบภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ และอาจพบภาวะอัลบูมินรั่วออกมามากในปัสสาวะแล้ว ตั้งแต่เริ่มวินิจฉัย ซึ่งอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยมีโรคเบาหวานมาเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีอาการหรือไม่เคยได้รับการตรวจวินิจฉัยมาก่อน หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมผู้ป่วย

เบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีไมโครอัลบูมินในปัสสาวะร้อยละ 20-40 จะเข้าสู่ระยะ macroalbuminuria แต่เมื่อเวลาผ่านไป 20 ปี พบว่ามีผู้ป่วยประมาณร้อยละ 20 พัฒนาไปเป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ถึงแม้ว่าอัตราการลดลงของหน้าที่ไตในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ไม่แตกต่างไปจากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 แต่ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีอายุมากกว่าและมีอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองมากกว่า อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนมีไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายได้

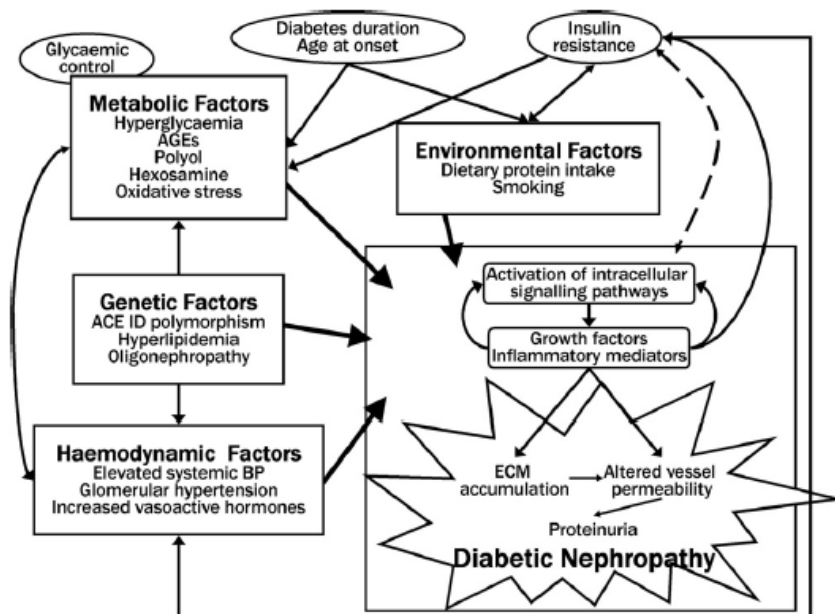


รูปที่ 2. 1 การดำเนินโรคในระยะต่างๆ และปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดของโรคไตจากเบาหวาน (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง (14))

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตจากเบาหวาน

มีเหตุปัจจัยหลายด้านที่เกี่ยวข้อง ภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยเบาหวาน เป็นปัจจัยที่สำคัญในการก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังจากโรคเบาหวาน นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญอื่นๆ ที่พบวก่อให้เกิดโรคไตจากเบาหวาน ได้แก่ ปัจจัยทาง Hemodynamic คือภาวะความดันโลหิตและความดันภายใน glomerulus สูง ปัจจัยทางพันธุกรรมมีประวัติครอบครัวของโรคไตจากเบาหวานหรือไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายหรือความดันโลหิตสูง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง การควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี การรับประทานโปรตีนสูงและการสูบบุหรี่ เป็นต้น ปัจจัยต่างๆ กระตุ้นเซลล์ภายในไตโดยผ่านกระบวนการ signaling pathways

ตลอดจน growth factors และ cytokines ต่างๆ ก่อให้เกิดภาวะ proteinuria และโรคไตจากเบาหวาน (รูปที่ 2.2) (15)



รูปที่ 2. 2 ปัจจัยการเกิดโรคไตจากเบาหวาน (16)

การตรวจคัดกรองเพื่อการวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวาน

การตรวจคัดกรองเพื่อการวินิจฉัยโรคไตในระยะแรกและเพื่อประโยชน์สำหรับวางแผนการรักษาสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน มีการตรวจที่เป็นหลักอยู่ 2 อย่าง คือการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะหรือที่เรียกว่า ภาวะไมโครอัลบูมินูเรียและการตรวจวัดการทำงานของไต

2.3 อัลบูมิน (Albumin)

อัลบูมิน (Albumin) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในร่างกาย มีลักษณะเป็นก้อนกลม สร้างขึ้นที่ตับ โดยมีอัตราการสร้างประมาณ 10 กรัมต่อวัน ถูกปล่อยออกมาไหลเวียนในกระแสเลือดหน้าที่ของอัลบูมิน คือ ใช้เป็นโปรตีนช่วยขนส่ง และเป็นคลังเก็บลิแกนด์ชนิดต่างๆ เช่น บิรูบีน กรดไขมันชนิดต่างๆ อัลบูมินยังสามารถจับกับฮอร์โมนหลายชนิดเช่น ไทรอกซิน คอร์ติซอล นอกจากนี้ความเข้มข้นของอัลบูมินในพลาสมามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมความดันของเส้นเลือด เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ควบคุม สมดุลน้ำภายในและภายนอกเส้นเลือด ดังนั้นถ้ามีปริมาณอัลบูมินในเลือดน้อยเกินไปจะทำให้น้ำที่อยู่ในหลอดเลือดออกไปอยู่บริเวณอื่นๆ นอกหลอดเลือด น้ำจะสะสมใต้ผิวหนัง ภายในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอาการบวม น้ำ นอกจากนี้ปริมาณอัลบูมินในซีรัม จะสามารถใช้ประเมินภาวะการทำงานของตับ ใช้ประเมินพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากตับว่ามีความรุนแรงเพียงใด และสามารถใช้ในการติดตามผลการรักษา ถ้าพบว่าปริมาณอัลบู

มินในเลือดลดลงแสดงว่า หน้าที่ในการสร้างและการทำงานของตับลดลงด้วย นอกจากนี้อัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (66 kDa) ในภาวะปกติจะไม่ตรวจพบอัลบูมินในปัสสาวะ หรือพบได้ในปริมาณน้อยกว่า 1% ของปริมาณอัลบูมินในร่างกาย ความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ไต จะตรวจพบ MAU ซึ่งอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะในปริมาณน้อยๆ แต่มากกว่าระดับปกติและมีความสำคัญทางคลินิก

กลไกการเกิด albuminuria

การตรวจพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเกิดจากการที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติทำให้เกิดการสะสม Glycated proteins กระตุ้นให้สร้าง Angiotensin II (ANG II) มากขึ้นส่งผลให้เกิดความดันโลหิตสูงขึ้น ผนังหลอดเลือดที่ glomerular capillary wall มีลักษณะเป็น anionic macromolecules มีกลไกในการยับยั้งการรั่วของอัลบูมินออกจากปัสสาวะ โดยใช้คุณสมบัติของขนาดและประจุเพื่อกีดขวางไม่ให้อัลบูมินเล็ดลอดออกไปได้ แต่จากการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะ MAU พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของรูขนาดใหญ่ จึงลดคุณสมบัติในการกีดขวางโดยขนาดลง นอกจากนี้ยังลดลงของสาร heparan sulfate ซึ่งเป็นประจุลบที่สำคัญในการกีดขวางโดยใช้ประจุทำให้เกิดการผลักรวมประจุลบด้วยกันอย่าง เช่น อัลบูมิน ส่งผลให้เกิดการหลุดลอดของอัลบูมินในปัสสาวะจำนวนมาก (17)

2.4 ภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (Microalbuminuria, MAU)

MAU คือ ภาวะที่มีการขับโปรตีนชนิดอัลบูมินขับออกจากปัสสาวะในปริมาณระหว่าง 30-300 มิลลิกรัมภายในเวลา 24 ชม.(24 hour collection) หรือเก็บปัสสาวะแบบสุ่มเก็บครั้งเดียว (spot collection) ปริมาณ 30-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมครีอาตินีน หรือเก็บปัสสาวะเป็นช่วงเวลา (Time collection) ปริมาณ 20-200ไมโครกรัมต่อนาที (11) และจะต้องพบ 2 ใน 3 ครั้งของปัสสาวะที่เก็บต่างเวลากันภายในระยะเวลา 3-6 เดือน (18) เนื่องจากการขับปริมาณอัลบูมินมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จากตารางที่ 2.1 ตารางแสดงปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะแบบต่างๆ โดยแบ่งตามวิธีเก็บตัวอย่างปัสสาวะซึ่งค่าปกติของ albumin excretion rate (AER) จะอยู่ในช่วง 0-29 mg ต่อวันนอกจากนี้ผู้ที่รับการตรวจจะต้องไม่มีภาวะดังต่อไปนี้ ออกกำลังกายใน 24 ชั่วโมง, ไข้ (fever), หัวใจวาย(heart failure), ตับแข็ง (cirrhosis), โรค systemic lupus erythematosus (SLE) และความดันโลหิตสูง (high blood pressure) (19, 20)

ตารางที่ 2. 1 ตารางแสดงปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะแบบต่างๆ โดยแบ่งตามวิธีเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (4)

สภาวะ	เก็บปัสสาวะแบบสุ่ม ตรวจครั้งเดียว (spot urine) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinine)	เก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง (24-h urine) (mg/day)	เก็บปัสสาวะเป็น ช่วงเวลา (timed urine) ($\mu\text{g}/\text{minute}$)
Normoalbuminuria	น้อยกว่า 30	น้อยกว่า 30	น้อยกว่า 20
Microalbuminuria	30-300	30-300	20-200
Macroalbuminuria	มากกว่า 300	มากกว่า 300	มากกว่า 200

2.4.1 การตรวจ MAU โดยวิธีมาตรฐานสามารถทำได้สองวิธี

1. การตรวจวัดเชิงปริมาณ (quantitative) เพื่อหาปริมาณ microalbuminuria ในปัสสาวะ

1.1 การตรวจจากปัสสาวะที่สุ่มตรวจครั้งเดียว (spot urine) เพื่อหาสัดส่วนปริมาณอัลบูมินต่อปริมาณครีอาตินีน ในปัสสาวะ (urine albumin/creatinine concentration ratio) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด

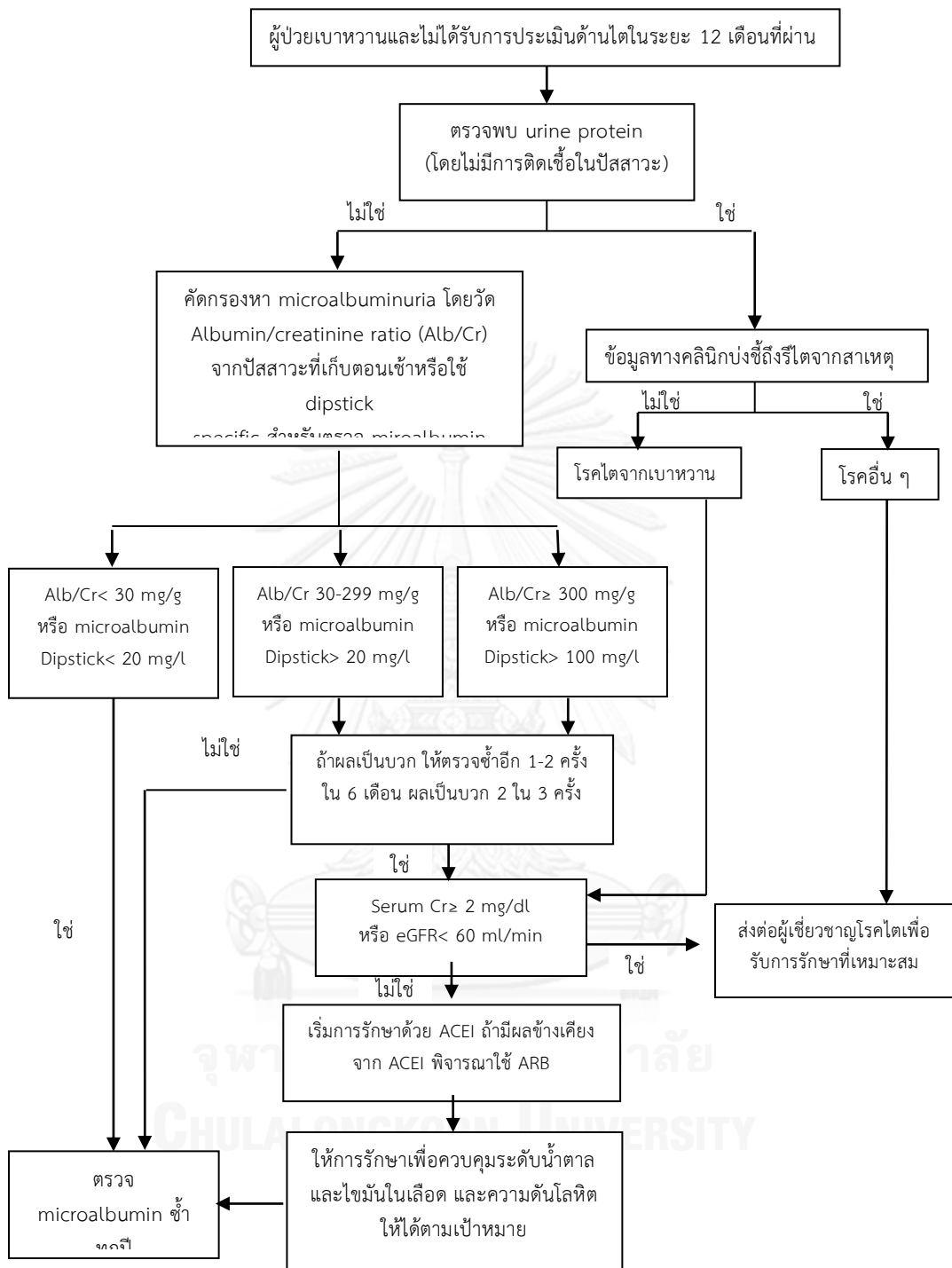
1.2 การตรวจจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเพื่อหาปริมาณอัลบูมินทั้งหมดที่ถูกขับออกไปทางปัสสาวะในช่วง 1 วัน

1.3 การตรวจจากปัสสาวะที่เก็บในช่วงเวลาเฉพาะ (timed collection) แต่ไม่ครบ 24 ชั่วโมง เช่น เก็บในระยะเวลา 4 ชั่วโมงหรือเก็บข้ามคืน เพื่อคำนวณหาอัตราการขับอัลบูมินที่ออกไปทางปัสสาวะต่อ 1 หน่วยเวลา (albumin excretion rate)

2. การตรวจวัดเชิงคุณภาพ (qualitative) เพื่อหา microalbuminuria

การหาปริมาณ MAU ด้วยวิธีใช้แถบสีจุ่ม (microalbuminuria strip test) ซึ่งเป็นการวัดเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) จะมีความไวร้อยละ 95 และความจำเพาะร้อยละ 93 จึงได้มีการจัดทำหลักการแนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน พ.ศ. 2555 เพื่อเป็นแนวทางการตรวจคัดกรองและการวินิจฉัยโรคไตจากเบาหวานดังรูปที่ 2.3 โดยผู้ป่วยที่จะอยู่ในเกณฑ์จะต้องเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานและเป็นผู้ที่ไม่ได้รับการตรวจประเมินไตในระยะ 12 เดือนที่ผ่านมา จะใช้วิธีการตรวจ Urine protein หรือตรวจหาภาวะ macroalbuminuria ใช้ชุดตรวจ (dipstick

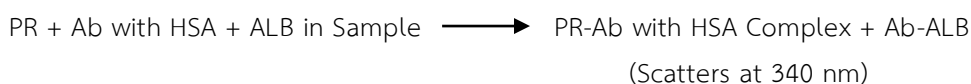
ราคา 50 บาท ตามกรมบัญชีกลาง) ในกรณีที่ผู้ป่วยมีค่า urine protein ด้วยแถบสีตั้งแต่ trace ขึ้นไป จำเป็นต้องซักประวัติผู้ป่วยเพิ่มเติมเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีภาวะอื่นนอกจากโรคไตจากเบาหวาน โดยภาวะอื่นๆ เช่น มีไข้ ออกกำลังกายหักโหม การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น และการตรวจค่า urine protein ด้วยแถบสีเป็นลบ ควรตรวจหาวัดเชิงปริมาณเพื่อคำนวณหา urine albumin/creatinine ration (ACR) ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับในปัจจุบัน ค่า ACR ≥ 300 มิลลิกรัมต่อกรัมในการเก็บปัสสาวะแบบสุ่ม ตรวจครั้งเดียว (spot urine) หรือ ≥ 300 มิลลิกรัมต่อวัน ในการเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมง แสดงว่า ผู้ป่วยเป็นโรคไตที่เกิดจากเบาหวาน หรืออาจเกิดโรคไตที่มาจากสาเหตุอื่นๆ ในกรณีผลตรวจเป็นลบ โดยการเก็บปัสสาวะแบบสุ่ม ตรวจครั้งเดียว (spot urine) เพื่อตรวจหาค่า albumin creatinine ratio (Alb/Cr) < 30 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือมีปริมาณ MAU < 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชุดตรวจ MAU (ราคา 270 บาทราคาตามกรมบัญชีกลาง) แสดงว่าผู้ป่วยไม่มีภาวะ MAUแต่อย่างไรก็ตามควรทำการตรวจ MAU ซ้ำทุกปี ในกรณีตรวจหาค่า Albumin creatinine ratio (Alb/Cr) ≥ 30 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือมีปริมาณ MAU ≥ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชุดตรวจ MAU แสดงว่าผู้ป่วยมีภาวะ microalbuminuria หรือมีภาวะ macroalbuminuria แล้ว แต่อย่างไรก็ตามควรทำการตรวจซ้ำอีก 1-2 ครั้งในระยะเวลา 6 เดือน ถ้าผลเป็นบวกให้ทำการตรวจการประเมินอัตราการกรองของไต (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) และทำการรักษาต่อไป ตามคำแนะนำของสมาคมแพทย์โรคเบาหวานของสหรัฐอเมริกา ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ทุกรายควรได้รับการตรวจคัดกรองหาอัลบูมินหรือโปรตีนในปัสสาวะอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมานานกว่า 5 ปี หรือเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น สำหรับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ควรได้รับการตรวจทันทีที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักมีการดำเนินของโรคเบาหวานเป็นเวลานานแล้วกว่าจะมีการตรวจพบ ทำให้มีโอกาสเป็นโรคไตจากเบาหวานได้ ตั้งแต่ครั้งแรกที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน และควรตรวจใหม่ทุกปี เพื่อเป็นการตรวจกรองและหาทางรักษาได้ทัน



รูปที่ 2. 3 แผนภูมิแสดงการคัดกรองและการวินิจฉัยโรคเบาหวาน (14)

2.4.1.1 วิธี Immunoturbidimetry

การหาปริมาณของอัลบูมินในปัสสาวะ โดยใช้หลักการ Immunoturbidimetric เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณอัลบูมินโดยดูความขุ่นที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่างอัลบูมินในปัสสาวะกับแอนติบอดีต่ออัลบูมิน เกิด antigen-antibody complex วัดความขุ่น จากการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของอัลบูมิน วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เพราะเป็นวิธีที่สามารถวัดได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธี Immunoturbidimetric คือ ความสามารถในการตรวจค่าต่ำสุดอยู่ในช่วงสูง 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร (9) จึงมีการพัฒนาวิธี particles-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) ดังรูปที่ 2.4 โดยอาศัยการแย่งจับกันระหว่าง อัลบูมินในสิ่งตัวอย่างและอัลบูมินที่ตรึงอยู่บนพื้นผิว latex particles จับกับแอนติบอดีต่ออัลบูมิน ตกตะกอนวัดค่าอัลบูมินจากความขุ่นที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 340 และ 700 นาโนเมตร ปริมาณของอัลบูมินจะแปรผกผันกับการดูดกลืนแสง ความสามารถในการตรวจค่าต่ำสุดอยู่ในช่วง 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (11)



รูปที่ 2.4 แสดงหลักการ particles-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA)

2.4.1.2 วิธี Immunonephelometry

การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้หลักการ immunonephelometry หลักการคือวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยการจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมิน เกิด antigen-antibody complex สามารถปริมาณอัลบูมินได้จากความขุ่นที่เกิดขึ้นโดยการวัดการกระจายของแสงจากเครื่อง spectrometric ซึ่งตัวตรวจวัดจะเอียงทำมุมกับแหล่งกำเนิดแสง ความสามารถในการตรวจค่าต่ำสุดอยู่ในช่วง 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (7) จากการศึกษาของ Rui Liu ในการทดสอบเปรียบเทียบวิธีการหาปริมาณไมโครอัลบูมิน ดังนี้ immunonephelometry (INA), immunoturbidimetry (ITA), colloidal gold, radioimmunoassay (RIA) และ chemiluminescence immunoassay (CLIA) วิธีที่ได้รับการยอมรับว่าเหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินมากที่สุดคือ immunonephelometry (INA) โดยพบว่าวิธี immunonephelometry (INA) มีค่าความเป็นเส้นตรงคือ 1 ในช่วงปริมาณอัลบูมิน 2-250 มิลลิกรัมต่อลิตร (10) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ottavo Giampietro และคณะ กล่าวว่า immunonephelometry (INA) เป็นวิธีมีความถูกต้องและความไวใกล้เคียง radioimmunoassay (RIA) และยังเป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็วในการใช้งานมากกว่า

radioimmunoassay (RIA) เมื่อเทียบกับปริมาณตัวอย่างเท่ากันเนื่องจากเป็นเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (9)

2.4.1.3 วิธี Radioimmunoassay (RIA)

วิธี RIA เป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณ MAU โดยการติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี เช่น ¹²⁵I อัลบูมินซึ่งจะแย่งจับ MAU ต่อมาใช้ anti-immunoglobulin antibody ในปริมาณที่ทราบ ปริมาณของอัลบูมินที่ติดฉลากจะจับกับแอนติบอดีเป็นอัตราผกผันกับปริมาณของอัลบูมินในปัสสาวะ แม้ว่าวิธีของ RIA จะเป็นวิธีที่มีความไวสูงโดยสามารถตรวจวัดปริมาณ MUA ได้ถึงระดับไมโครกรัมจากการศึกษาของ Wayne D. Comper และคณะสามารถตรวจวัดค่าต่ำสุดคือ 16 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่า RIA เป็นวิธีการตรวจ MUA ได้ไวที่สุด แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของ RIA คือเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้มีราคาแพง กัมมันตภาพรังสีที่ใช้อาจมีอันตรายต่อผู้วิจัย จึงจำเป็นต้องได้รับอนุญาต และการทำลายสารหลังจากการใช้งานจะต้องมีการควบคุมเป็นอย่างดี (21)

2.4.1.4 วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีตรึงอยู่บนพื้นผิวของ microplate สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้จากแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งจะติดฉลากไว้ทำให้สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ จากการเปลี่ยนสีหรือสามารถวัดความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลงได้จากเครื่อง ELISA reader สามารถวัดช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.2-12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (22) การตรวจวัด MUA ด้วยหลักการ ELISA มีหลายหลักการขึ้นอย่างกับสารหรือสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจ ดังนี้

Indirect competitive ELISA วิธีการนี้จะตรึงอัลบูมินลงใน ELISA plate ต่อมาเติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจซึ่งจะมีอัลบูมินอยู่ และเติมแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิลงไป ซึ่งจะมี ความจำเพาะกับอัลบูมิน โดยจะเกิดการแข่งขันแย่งกันจับระหว่างอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจกับอัลบูมินที่ตรึงที่ ELISA plate หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase และเติมสารตั้งต้น ความเข้มสีที่เกิดจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ นอกจากนั้นหลักการดังกล่าวมีการตรึงแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุม ซึ่งจะ เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออัลบูมิน ต่อจากนั้นเติมอัลบูมินกับอัลบูมินที่ทราบความเข้มข้นที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ใส่ลงไปพร้อมกัน เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์และวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยปฏิกิริยาที่วัดได้จะแปรผกผันกับปริมาณอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ (22, 23)

Indirect sandwich ELISA หลักการคือ การตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินไว้ที่ plate ELISA หลังจากนั้นเติมอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ อัลบูมินจะเข้าไปจับกับแอนติบอดีที่ตรึงที่ plate ELISA หลังจากนั้นทำการเติมแอนติบอดีที่มีการติดฉลากลงไป แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเข้าไปจับกับอัลบูมิน เติมสารตั้งต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ค่าที่ได้จะเป็นค่าที่แปรผันตามปริมาณอัลบูมิน (24)

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย มีความจำเพาะสูงจากการเลือกใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีความบริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีที่ต้องอาศัยเครื่องมือในการตรวจวัด ทำให้ไม่สามารถใช้ในโรงพยาบาลตามชนบท อีกทั้งยังใช้เวลานานเนื่องจากวิธีดังกล่าวมีหลายขั้นตอน

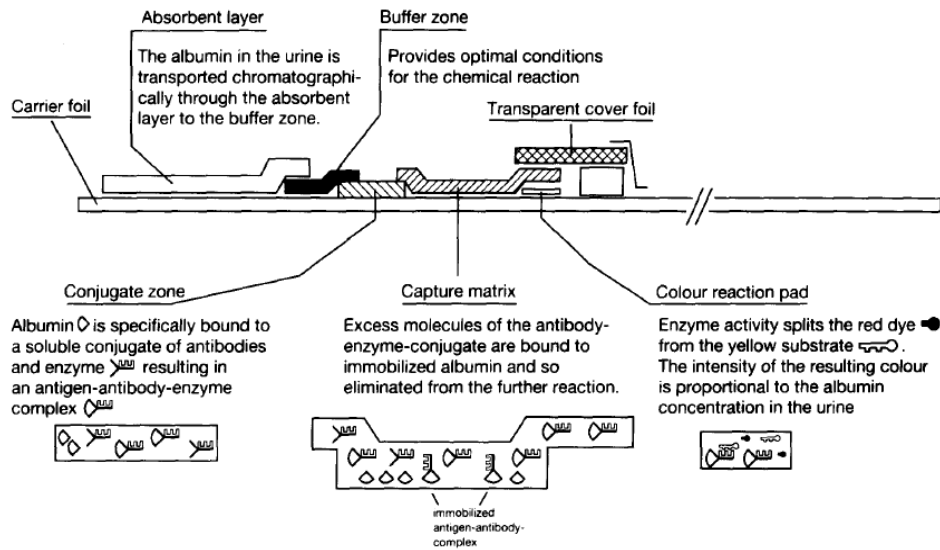
2.4.1.5 วิธี immunochromatographic assay

ปัจจุบันเนื่องปริมาณผู้ป่วยโรคเบาหวานจากโรคไตปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการผลิตชุดตรวจวัดต่างๆ เพื่ออำนวยความสะดวกต่อการรักษาและการป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนที่จะเกิดขึ้นได้อย่างทันถ่วงที เช่น

Clinitek microalbumin reagent strips เป็นชุดการตรวจแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) เป็นการตรวจทั้ง MAU และครีอาตินิน วัดปริมาณใช้การจับกันของอัลบูมิน จากการจับกับสี sulfonephthalein เกิดการเปลี่ยนสีตั้งแต่สีเขียวอ่อนจนถึงสีน้ำเงินขึ้นอยู่กับปริมาณอัลบูมินในสิ่งส่งตรวจ วัดปริมาณครีอาตินินจากการจับกับ copper sulfate ได้เป็น creatinine-sulfate complex เกิดการเปลี่ยนสีม่วงจนถึงสีน้ำตาล ตามความเข้มข้นของครีอาตินินที่เพิ่มขึ้น ค่าความถูกต้องของอัลบูมินร้อยละ 96 และครีอาตินินร้อยละ 93.3 (25)

Micral test® ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics ใช้หลักการตรวจ semi-quantitative ตรวจหา MAU ที่อาศัยปฏิกิริยาเคมี แล้วเกิดสีจากเอนไซม์ที่จับอยู่บนแอนติบอดีปริมาณอัลบูมินที่สามารถบอกได้คือ 0, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนประกอบของ Micral test ประกอบด้วย ดังรูปที่ 2.5 แสดงส่วนประกอบและหลักการของชุดตรวจ Micral test® ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics โดยชุดตรวจสอบนี้มีส่วนประกอบดังนี้

- Absorbent layer คือส่วนที่รองรับตัวอย่างปัสสาวะที่หยดลงมาทดสอบ Buffer zone เป็นส่วนที่มีการตรึงบัฟเฟอร์เพื่อให้ปัสสาวะมีภาวะเหมาะสมเหมาะกับการทำปฏิกิริยาเคมีในขั้นต่อไป
- Conjugate zone เป็นส่วนที่บรรจุแอนติบอดีที่มีการตรึงเอนไซม์ (antibody-enzyme-conjugate) โดยอัลบูมินจะจับกันอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีที่มีการตรึงไว้กับเอนไซม์เกิดเป็น antigen-antibody-enzyme complex
- Capture matrix เป็นที่รองรับส่วนที่เหลือแอนติบอดีที่มีการตรึงเอนไซม์ (antibody-enzyme-conjugate) และจะมีการจับกันของอัลบูมินกับแอนติบอดีที่มีการตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้น เพื่อรอทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป
- Color reaction pad เป็นส่วนที่มีการตรึงสารตั้งต้นของเอนไซม์ (สีเหลือง) ทำปฏิกิริยาแล้วเกิดสารสีแดงขึ้น ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณ MAU

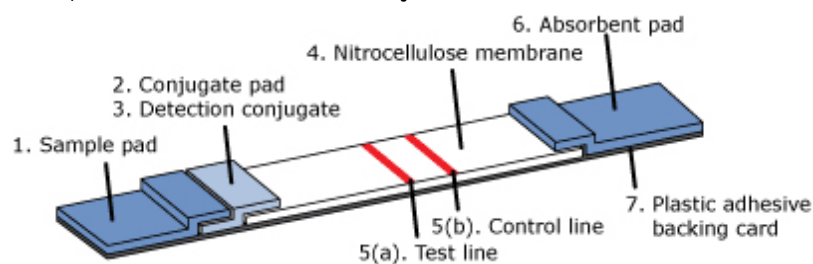


รูปที่ 2. 5 แสดงส่วนประกอบและหลักการของชุดตรวจ Micral test® ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics (6)

วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องในการตรวจวัด สามารถนำไปใช้ตรวจภาคสนามได้ใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 10 นาทีต่อการทดสอบ มีความไวร้อยละ 90 และความจำเพาะร้อยละ 87 ถึงอย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีราคาสูงอยู่เมื่อนำมาใช้ในประเทศกำลังพัฒนาทำให้การใช้ไม่แพร่หลายมีเฉพาะโรงพยาบาลขนาดใหญ่เท่านั้น (6)

วิธี Immunochromatography assay เป็นวิธีการตรวจที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์มาก ให้ผลตรวจที่รวดเร็ว อายุการใช้งานของชุดตรวจได้นาน (ประมาณ 6 เดือน-1ปี) หรือที่เรียกการตรวจแบบนี้ว่า rapid test ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีอย่างจำเพาะ เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ วัตถุประสงค์จากการติดฉลากด้วย อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เกิดสีแดงขึ้นซึ่งสามารถตรวจวัดได้ นอกจากนี้การรายงานผลการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative) และกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) ซึ่งการตรวจที่ได้ถือว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการตรวจเพื่อติดตามผล เช่นการตรวจน้ำตาลกลูโคสในเลือดซึ่งจะตรวจในผู้ป่วยเบาหวาน หรือการตรวจคัดกรองเช่น การตั้งครรภ์ การตรวจโรคมาลาเรีย เป็นต้น

ส่วนประกอบของชุดตรวจวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยมีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ (26, 27)



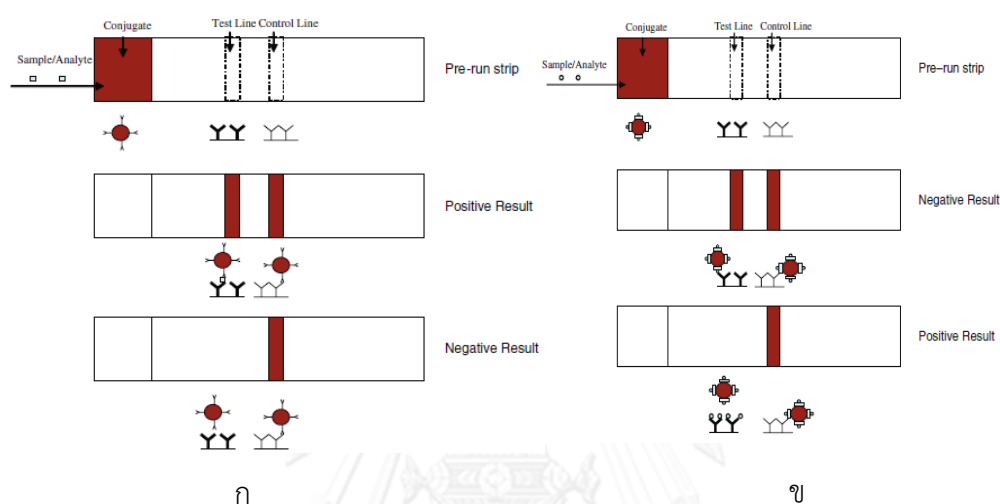
รูปที่ 2. 6 แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจวิเคราะห์ที่ใช้หลักการ Immunochromatography (26)

1. Sample pad ผลิตขึ้นจาก cellulose หรือ glass fiber เป็นส่วนที่รองรับสิ่งส่งตรวจ ช่วยในการปรับภาวะของความเป็นกรดต่างได้ หรือใช้ในการกรองสิ่งส่งตรวจเช่น แยกเลือดระหว่างเม็ดเลือดกับซีรัม หรือแยกแอนติบอดีที่ไม่ต้องการออกไป นอกจากนี้สามารถลดการจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่างสารในสิ่งส่งตรวจกับพื้นผิวชุดการตรวจจากการใส่บัฟเฟอร์บางชนิด
2. Conjugate pad หรือ Detection conjugate ใช้วัสดุที่ไม่มีการดูดกลืนเช่น fiberglass, polyester ช่วยในการปรับภาวะของความเป็นกรดต่าง เพิ่มความคงตัวของปฏิกิริยาบริเวณที่บรรจุตัวติดฉลาก เช่น Gold, Silver และ Florescent
3. Nitrocellulose membrane มีความสามารถในการตรึงโปรตีนโดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง Nitrate esters กับพันธะเปปไทด์ของโปรตีน กระดาษจะใช้อาศัยแรง capillary ในการนำพาสิ่งส่งตรวจบนกระดาษและมีเส้นทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line)
4. เส้นทดสอบ บริเวณที่มีการตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีขึ้นอยู่กับหลักการที่ใช้ในการตรวจ บริเวณนี้จะแสดงผลการตรวจว่าให้ผลบวกหรือผลลบ
5. เส้นควบคุม บริเวณที่มีการตรึงหุติยภูมิแอนติบอดี เส้นนี้จะช่วยยืนยันประสิทธิภาพของชุดการตรวจว่าสามารถใช้ได้จริง
6. Absorbent pad เป็นบริเวณที่ใช้อรับสารที่เหลือจากการตรวจแล้วโดยใช้แรง capillary ช่วยลดความชื้นของพื้นหลังและลดโอกาสการเกิดผลบวกปลอมได้

2.5 กระบวนการทำงานของ Lateral flow

เมื่อหยดสิ่งส่งตรวจเช่น ปัสสาวะและซีรัมลงบน sample pad ซึ่งมีบัฟเฟอร์บรรจุอยู่ บัฟเฟอร์จะทำหน้าที่ในการปรับสภาพของสิ่งส่งตรวจให้มีภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด เช่น บัฟเฟอร์ใช้สำหรับเจือจางสิ่งส่งตรวจ บัฟเฟอร์ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ (Lysis buffer) เป็นต้น ชุดตรวจที่ใช้หลักการ Sandwich solid-phase immunoassay ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ก แอนติเจนที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจสามารถจับกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีการตรึงแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้นอยู่บนผิว เกิดการจับกันเป็นสารเชิงซ้อน และไหลไปจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะที่ถูกตรึงบริเวณเส้นทดสอบ ทำให้เกิดเป็นเส้นสีแดง อ่านผลเป็นบวก (positive) ในทางตรงกันข้ามกรณีไม่มีเส้นสีแดงปรากฏที่เส้นทดสอบ หมายถึง ไม่มีแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ทำให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงแอนติบอดีอยู่บนผิวไหลผ่าน ไม่มีการจับกันอย่างจำเพาะ อ่านผลเป็นลบ (negative) ส่วนชุดตรวจที่ใช้หลักการ Competitive solid-phase immunoassay นั้น

อ่านผลตรงกันข้ามกับหลักการ Sandwich solid-phase immunoassay ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ข แอนติเจนที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจ เกิดการแข่งขันกันระหว่างแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจและแอนติเจนตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร กันจับแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนเส้นทดสอบ การเคลื่อนที่ของสารบนกระดาษเกิดจากแรง Capillary action ส่วนบริเวณเส้นควบคุมจะใช้ควบคุมคุณภาพของชุดตรวจ โดยจะต้องเห็นเส้นขึ้นเสมอจึงจะสามารถอ่านผลได้ (27)



รูปที่ 2.7 แสดงหลักการ Lateral flow immunoassay (27) : (ก) หลักการ Sandwich solid-phase immunoassay, (ข) หลักการ Competitive solid-phase immunoassay

2.6 การตรวจคัดกรองโรค (Disease Screening)

การตรวจคัดกรองโรค หมายถึง การตรวจคัดกรองโรคที่ยังไม่ได้ปรากฏให้เห็น โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการหรือการทดสอบอื่นๆ ทำให้สามารถแยกผู้ป่วยหรือผู้ที่มีสิ่งผิดปกติในร่างกายได้ เกณฑ์ในการประเมินผลการทดสอบเพื่อตรวจคัดกรองโรค (screening tests) จะต้องเป็นวิธีการทดสอบที่ง่าย สามารถทำได้รวดเร็ว ราคาถูก ใช้ปริมาณของสิ่งส่งตรวจปริมาณน้อย สามารถทำได้กับกลุ่มคนจำนวนมาก ไม่มีอันตรายกับผู้ถูกทดสอบ

คำดัชนีที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบ

ในการตรวจคัดกรองโรคจะได้ผลการทดสอบใหญ่ๆ เป็นสองพวก คือ

1. ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative) คาดว่าจะไม่มีโรคเกิดขึ้น
2. ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive) คาดว่าจะมีโรคเกิดขึ้น จำเป็นต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยต่อ เพื่อการรักษา

โดยการทดสอบชุดตรวจคัดกรองจะทำการตรวจเทียบกับวิธีตรวจวินิจฉัยมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแล้ว โดยจะสามารถแยกผลการทดสอบเป็นลบและผลการทดสอบเป็นบวกได้ดังนี้

1. ผลการทดสอบเป็นลบจริง (True negative) หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบในบุคคลที่ไม่เป็นโรค
2. ผลการทดสอบเป็นลบเทียม (False negative) หมายถึงผลการทดสอบเป็นลบในบุคคลที่เป็นโรค
3. ผลการทดสอบเป็นบวกจริง (True positive) หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวกในบุคคลที่เป็นโรค
4. ผลการทดสอบเป็นบวกเทียม (False positive) หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวกในบุคคลที่ไม่เป็นโรค

ตารางที่ 2. 2 ผลการตรวจในการทดสอบเพื่อการตรวจคัดกรองโรค (Screening test) ในบุคคลที่ป่วยและไม่ป่วย

การทดสอบ (Screening test)	Reference test (Gold standard)		รวม (total)
	Disease +	Disease -	
ผลบวก (positive)	ผลบวกจริง (True positive) แทนค่า a	ผลบวกเทียม (False positive) แทนค่า b	All positive tests a+b
ผลลบ (negative)	ผลลบเทียม (False negative) แทนค่า c	ผลลบจริง (True negative) แทนค่า d	All negative tests c+d
รวม (total)	All disease persons a+c	All non-disease persons a+d	All tested persons a+b+c+d

ดัชนีที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบ ประกอบด้วย

1. ความไวของการทดสอบ (Sensitivity) หมายถึง ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจได้ผลบวกจากการทดสอบ

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{\text{All disease persons}} \times 100 = \frac{a}{a+c} \times 100\%$$

2. ความจำเพาะของการทดสอบ (Specificity) หมายถึง ร้อยละของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นโรคและตรวจได้ถูกต้องจากการทดสอบว่าเป็นผลลบ

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True negative}}{\text{All non-disease persons}} \times 100 = \frac{d}{b+d} \times 100\%$$

3. ค่าพยากรณ์บวก (Predictive value positive) หมายถึง ร้อยละของการทดสอบที่ได้ผลบวกแล้วมีโอกาสเป็นโรค

$$\text{Predictive value positive} = \frac{\text{True positive}}{\text{All positive tests}} \times 100 = \frac{a}{a+b} \times 100\%$$

4. ค่าพยากรณ์ลบ (Predictive value Negative) หมายถึง ร้อยละของการทดสอบที่ได้ผลลบแล้วมีโอกาสไม่เป็นโรค

$$\text{Predictive value Negative} = \frac{\text{True negative}}{\text{All negative tests}} \times 100 = \frac{d}{c+d} \times 100\%$$

2.7 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และการนำไปใช้ประโยชน์ (อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร, AuNPs) (27-30)

อนุภาคของโลหะในระดับนาโนเมตรที่มีความเสถียรสูงและสามารถนำไป ใช้เป็นเครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensor) และเป็นเครื่องมือตรวจวัดในระดับโมเลกุลได้ (molecular sensor) การสังเคราะห์ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ในรูปคอลลอยด์นั้นสามารถทำได้ทั้งในสารละลายอินทรีย์และน้ำ โดยอาศัยสารช่วยทำให้เสถียรหรือ มักจะเป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลเล็กๆ หรืออาจจะเป็นสายพอลิเมอร์ ตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประวัติความเป็นมาของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (27)

ปี	เหตุการณ์	อ้างอิง
1857	การค้นพบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	(31)
1871	การศึกษาการสังเคราะห์และการศึกษาคุณสมบัติของ Colloidal gold โดยใช้ White phosphorus ในปฏิกิริยารีดักชัน	(31)
1981	การศึกษาการสังเคราะห์และการศึกษาคุณสมบัติของ Colloidal gold โดยใช้ sodium citrate ในปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่สามารถควบคุมลักษณะรูปร่างและขนาดได้อย่างแน่นอน	(32)
1981	การศึกษาการตรึงแอนติบอดีบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค	(33)
1984	การศึกษาการใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ใน western blots และ dot blots	(34)

จนกระทั่งในปัจจุบันมีการใช้ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ติดฉลากเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคโดยใช้หลักการ Lateral Flow Immunoassay หรือ strip test นอกจากนี้ ยังมีฉลากชนิดอื่นที่นำมาใช้ในชุดตรวจ เช่น Silver nanoparticles, Carbon nanoparticles, Latex, Dye และ Enzyme เป็นต้น ดังตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบฉลากชนิดต่างๆที่มีใช้ในชุดตรวจในปัจจุบัน (31)

ตารางที่ 2. 4 แสดงการเปรียบเทียบผลากชนิดต่างๆ ที่มีใช้ในชุดตรวจในปัจจุบัน (31)

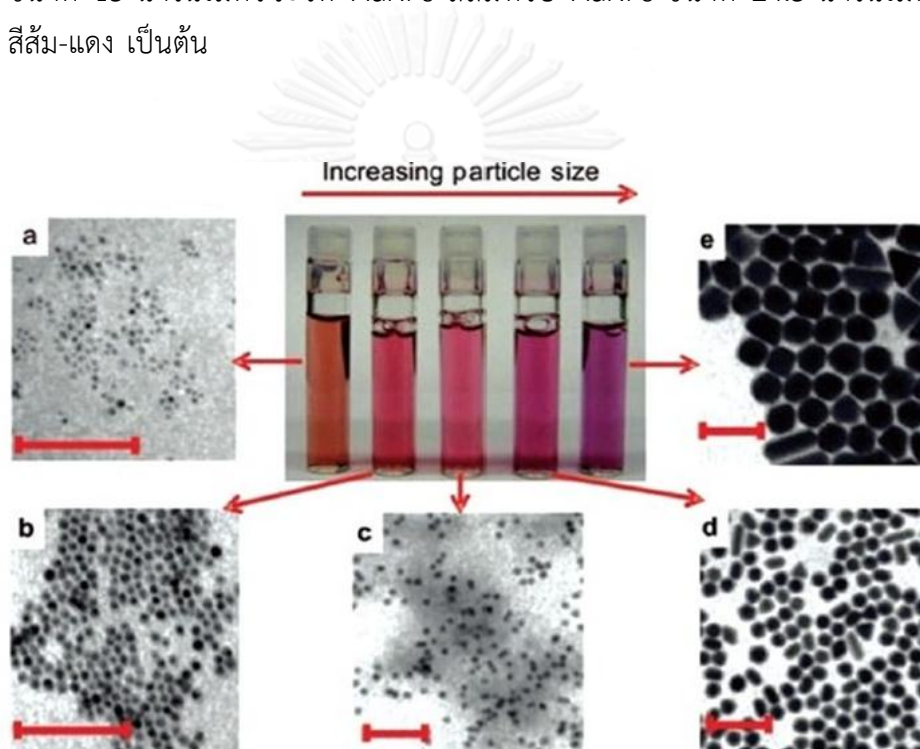
Feature	Gold	Silver	Carbon	Latex	Dye	Enzyme
Visibility	***	*	***	***	***	***
Sensitivity	***	*	**	**	**	***
Stability	***	***	**	**	**	*
Colors	*	—	*	***	***	**
Reproducibility	***	***	*	*	*	**
Scale-up	***	***	**	*	*	*
One step	***	***	***	***	***	—
Multianalyte detection	***	***	**	**	**	**
Clean result	***	***	*	**	*	*
Ease of preparation	***	***	**	***	**	**
Ease of use	***	***	**	***	**	*
Adaptability	**	**	**	**	**	***
Low cost	***	***	***	***	***	**
* Limited application						
**Acceptable for some applications						
***Outstanding and applicable to most tests						

จะเห็นว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นผลากชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการวินิจฉัยและติดตามโรคเช่น ความสามารถที่จะมองเห็นได้ง่าย เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีสีเฉพาะตัว, ความไว, ความคงตัว, ความสามารถในการวัดให้ได้ผลใกล้เคียงกันทุกครั้ง, ความสามารถที่จะตรวจวัดได้หลายการวิเคราะห์พร้อมๆกัน และขั้นตอนในการเตรียมง่าย ดังนั้นจากคุณสมบัติดังกล่าวมานี้ทางผู้วิจัยจึงนำโมโนโคลนัลต่ออัลบูมินมาติดกับผลาก อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

2.7.1 หลักการการเตรียม Colloidal Gold (28-30)

วิธีการของ Turkevich เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคิดค้นตั้งแต่ปี 1951 หลักการเตรียม AuNPs เกิดจากกระบวนการรีดักชันโดยการเติม reducing agent ลงในสารตั้งต้น chloroauric acid หรือ HAuCl_4 เมื่อทำปฏิกิริยากัน ส่งผลให้อิออนของ Au^{3+} ถูกรีดิวกลายเป็น

อะตอมของ Au ผลของการสังเคราะห์ AuNPs จะได้ขนาด 20 นาโนเมตร ต่อมาในปี 1973 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Frens ได้นำวิธีของ Turkevich มาพัฒนา สามารถควบคุมการสังเคราะห์ให้ได้ขนาดที่ต้องการได้ จากอัตราส่วนระหว่าง reducing และ stabilizing ซึ่งในที่นี้คือ อัตราส่วนระหว่าง trisodium citrate และ chloroauric acid ดังตารางที่ แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง trisodium citrate และ chloroauric มีผลต่อขนาด ซึ่งขนาดมีผลต่อสีของ AuNPs ที่แสดงออกมา ดังรูปที่ 2.8 แสดง AuNPs ขนาดต่างๆ ที่มีสีของ AuNPs แสดงออกแตกต่างกัน เช่น AuNPs ขนาด 15 นาโนเมตรจะให้ AuNPs สีส้มหรือ AuNPs ขนาด 24.5 นาโนเมตรจะให้ AuNPs สีส้ม-แดง เป็นต้น



รูปที่ 2. 8 แสดงขนาดและสีต่างๆ ที่มีสีของ AuNPs

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3. 1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1	เครื่องปั่นเหวี่ยง	บริษัท Hettich Zentrifugen (Germany)
2	เครื่องผสมด้วยแรงหมุน	บริษัท Scientific Industries, Inc. (USA)
3	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	บริษัท BIO-TEK Instrument Inc. (USA)
4	เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง	บริษัท Metter Toledo (USA)
5	เครื่องอ่าน microplate	บริษัท Titertek multiskan (Finland)
6	ตู้ดูดควัน	บริษัท Thermo Electron Corporation (USA)
7	ตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Thermo Electron Corporation (USA)
8	ตู้ปลอดเชื้อ	บริษัท International Electron Corporation (USA)
9	ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	บริษัท ธเนศพัฒนา (Thailand)
10	ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)	บริษัท Udono-Rll memmert (Japan)
11	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	บริษัท Memmert (Germany)
15	กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	บริษัท Nikon (Japan)
16	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	บริษัท JEOL รุ่น JEM-2100 (Japan)
17	เครื่องปั๊มอากาศ	บริษัท Iwaki (Japan)
18	ชุดอิเล็กโทรโพรเรซิส	บริษัท Bio-Rad (USA)

ลำดับ	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
19	Serological pipette	บริษัท HBG (Germany)
20	Pipette aids	บริษัท Gilson (France)
21	ขวดแก้วขนาดต่างๆ	บริษัท Boro (Germany)
22	ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc (Denmark)
23	ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน	บริษัท Nunc (Denmark)
24	96- well ELISA plate	บริษัท Nunc (Denmark)
25	96-well, 48-well cell culture plate	บริษัท Corning Incorporated (USA)
26	จานเลี้ยงเซลล์	บริษัท Corning Incorporated (USA)
27	หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	บริษัท Axygen (USA)
28	หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	บริษัท CLP (USA)
29	หลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube)	บริษัท Nunc (Denmark)

3.2 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3. 2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
1	Acetic acid	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
2	Acrylamide gel	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Bio-Rad (USA)
3	Ammoniumpersulfate	ใช้ในการเตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Bio-Rad (USA)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
4	BCA TM protein assay kit	ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน	บริษัท Pierce (USA)
5	Bovine serum albumin (BSA)	<ul style="list-style-type: none"> ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ใช้ในหลอด non specific บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และบนแผ่นชุดตรวจ 	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
6	Calibrator	สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาไมโครอัลบูมิน	บริษัท Randox (United Kingdom)
7	Citric acid	ใช้ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck (Germany)
8	Coomassie brilliant blue G	ย้อมเจล SDS-PAGE	บริษัท Pierce (USA)
9	D - glucose	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
10	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	ใช้ในการเตรียมอาหารเก็บเซลล์แช่แข็ง	บริษัท Fluke (Switzerland)
11	di-Sodium hydrogenphosphate (Na ₂ HPO ₄)	ใช้ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck (Germany)
12	Fetal calf serum	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Ivitromax (USA)
13	Glycine	ใช้ในการเตรียมสารละลาย running buffer	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
14	Human serum albumin (HSA)	ใช้ในการเตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
15	Hydrochloric acid (HCl)	เตรียม Tris buffer	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
16	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	เป็นสับสเตรทในวิธี ELISA	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
17	Hydrogentetrachloroaurate (III) trihydrate solution (HAuCl ₄ 3H ₂ O)	สารตั้งต้นการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
18	L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
19	Methanol	เตรียมสีย้อมเจล	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
20	O-phenylenediamine (OPD)	เป็นสับสเตรทในวิธี ELISA	บริษัท BDH (England)
21	Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ใช้ในการทำ ELISA เทคนิค	บริษัท Abkem Iberia L.S.(Spain)
22	Polyethylene glycol (PEG)	ใช้ในการหลอมรวมเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
23	Protein G sepharose	ใช้ทำให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
24	Protein. Standard	ใช้ในเทียบน้ำหนักมวลโมเลกุลในการทำ SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
25	RPMI 1640 medium	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
26	Skim milk	ใช้ในการทำ ELISA เทคนิค	บริษัท Anline (Thailand)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
27	Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ใช้ในการตรึงบน nitrocellulose membrane ตำแหน่ง control line	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
28	Sodium azide (NaN_3)	ใช้เป็นวัตถุกันเสีย	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
29	Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	ใช้ในการเตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
30	Sodium carbonate (Na_2CO_3)	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยง เซลล์	บริษัท Merck (Germany)
31	Sodium citrate	สารตั้งต้นการสังเคราะห์ อนุภาคทองคำระดับนาโน เมตร	บริษัท Merck (Germany)
32	Sodium chloride (NaCl)	ใช้ในการหาปริมาณที่ เหมาะสมของแอนติบอดีกับ อนุภาคทองคำระดับนาโน เมตร	บริษัท Merck (Germany)
33	Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	ใช้ในการเตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
34	Sodium dodecyl sulphate (SDS)	ใช้ในการเตรียมเจลใน เทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
35	Sodium pyruvate	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยง เซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
36	Suluric acid	ใช้ในการหยุดปฏิกิริยาของ เอนไซม์	บริษัท Merck (Germany)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
37	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	ใช้ในการเตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Pierce (USA)
38	Thymidine	ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
39	Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trizma base)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
40	Tween 20	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
41	กระดาษชนิด Glass fiber grade 8964	ใช้ในการเตรียม Conjugate pad	บริษัท Ahlstrom (Finland)
42	กระดาษชนิด Nitrocellulose grade AE 99	ใช้ในการเตรียม Detection pad	บริษัท Whatman
43	กระดาษชนิด 100% pure cellulose fiber grade 642	ใช้ในการเตรียม Absorbent Pad	บริษัท Ahlstrom (Finland)
44	กระดาษที่รองรับส่วนประกอบต่างๆ (Backing card)	ใช้ในการประกอบส่วนต่างๆ ของชุดตรวจ	บริษัท Whatman

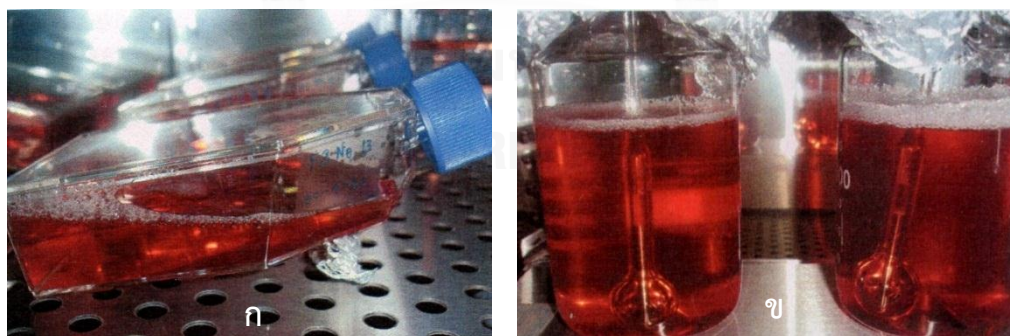
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ การทำโมนิโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และการพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

3.3.1 การทำโมนิโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่

นำเซลล์ไฮบริโดมาโมนิโคลนัลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ที่เก็บในไนโตรเจนเหลวออกมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มละลายให้ได้ลักษณะเป็นสารแขวนลอย นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีลักษณะแขวนลอยใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เซลล์ไฮบริโดมาจะตกตะกอน เทส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็ก หลังจากนั้นส่องกล้องดูสภาพลักษณะและจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา และนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไฮบริโดมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาแบ่งเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร 2 ขวด ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3. 1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) (ก). เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร (ข). เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน (spinner flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร

3.3.1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี

เพื่อให้ได้โมโนโคลนัลแอนติบอดีในปริมาณมาก ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นย้ายลงในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกววน (spinner flask) โดยใช้อัตราเร็วในการปั่นกววน 20 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงนาน 7-10 วัน โดยเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผสม 10% (v/v) FCS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงจะมีการผลิตแอนติบอดีต่อ human serum albumin (HSA) ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 22 เพื่อที่จะเก็บเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปทำการแยกโมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

3.3.1.3 การทำโมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนนี้เป็นการทำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้บริสุทธิ์ ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค affinity column chromatography ที่มีการใช้โปรตีนจี (Protein G) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์โปรตีนจีเซฟารอส (G-Sepharose column) ขนาด 5 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับสภาพคอลัมน์ให้อยู่ในสภาวะสมดุลก่อนทำการใส่ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีลงในคอลัมน์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีจับกับโปรตีนจีที่อยู่ในคอลัมน์ และตามด้วยการใช้ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ล้างโปรตีนชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการให้ออกจากคอลัมน์ จากนั้นใช้ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine hydrochloride buffer) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เซโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ติดอยู่บนคอลัมน์ โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์โดยเก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละหลอดที่เก็บได้บรรจุทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris hydrochloride buffer) pH 9.0 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตร เพื่อปรับความเป็นกรดต่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีอยู่ ให้มี pH เป็น 7.0 จากนั้นทำการล้างคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และเก็บคอลัมน์ให้อยู่ในบัฟเฟอร์เดิม จากนั้นนำสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การตรวจสอบหาแอนติบอดีในแต่ละหลอด ใช้วิธี indirect ELISA โดยทำการเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย HSA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วย Washing

buffer (0.05% Tween 20 in PBS) 3-5 ครั้ง เติม Blocking solution (5% w/v skim milk ใน PBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย fraction ที่ 1,3,5,7,8,9,15,18,21,24 และ 27 ที่ได้เจือจางในอัตราส่วน 1:10000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติม secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีเปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราการเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติมสารตั้งต้นของแอนติบอดีเปอร์ออกซิเดส ซึ่งประกอบด้วย OPD (O-phenylenediamine) และ H_2O_2 ที่ละลายใน 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 (ภาคผนวก ข) หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนโครมาโทแกรม เพื่อเลือกนำสารละลายจากหลอดที่มีปริมาณโปรตีนสูง มารวมกันก่อนนำไปไตอะไลซิสแยกเกลือออกด้วย PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



คอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนัล

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 3. 2 การทำโมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี (Protein G) คอลัมน์

3.3.1.4 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bicinchoninic acid assay (BCA)

การหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการทำโมโนโคลนัลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ทำให้ทราบถึงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เตรียมได้ ในการวิจัยนี้ใช้วิธี Bicinchoninic acid assay (BCA) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยอาศัยหลักการการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ริติวซ์ cupric ion (Cu^{2+}) ให้ได้ผลิตภัณฑ์ cuprous ion (Cu^+) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะได้สารละลายสีฟ้า หลังจากนั้นเมื่อเติมสารละลาย bicinchoninic acid ลงไป โดย bicinchoninic acid ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, มวลโมเลกุล $344.32 \text{ g mol}^{-1}$) จำนวน 2 โมเลกุลจะทำปฏิกิริยากับ cuprous ion (Cu^+) จำนวน 1 โมเลกุล เกิดสารละลายสีม่วงขึ้น โดยสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณโปรตีนในสิ่งตัวอย่าง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร และเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาไปควบคู่กัน ใช้ bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยก่อนการทดลอง เจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานด้วย PBS

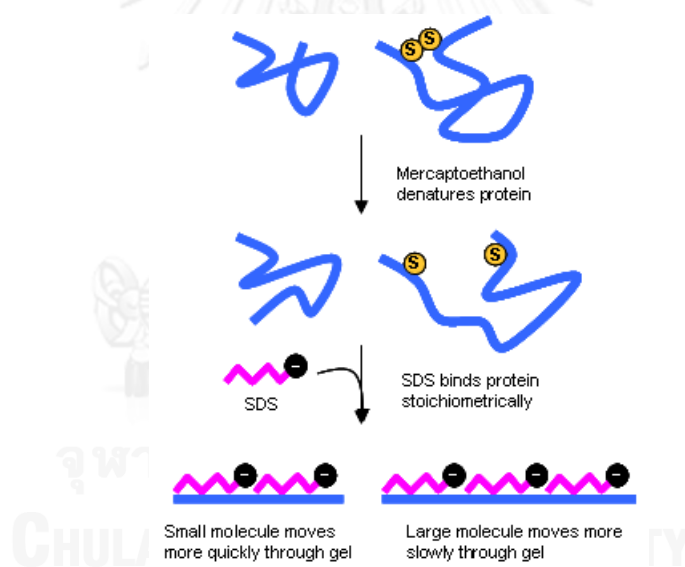
การทดลองมีวิธีการดังนี้ เตรียม working reagent โดยการผสม Reagent A ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), กรดไบชินโคนิค (bicinchoninic acid) และโซเดียมทาร์เตรทในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ (sodium tartrate in 0.1 M sodium hydroxide) กับ Reagent B ซึ่งประกอบด้วย คิวพริกซัลเฟต (cupric sulfate) ในอัตราส่วน 50:1 (V/V) จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและสารตัวอย่างลงใน ELISA plate หลุมละ 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม working reagent หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 30 วินาทีและนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้น นำ ELISA plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง ELISA reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของโปรตีนชนิด bovine serum albumin (BSA) มาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง

3.3.1.5 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากวิธีของ Johnstone และ Thrope (35) เป็นวิธีการหาปริมาณแอนติบอดีหลังจากทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์แล้ว โดยนำสารละลายที่มีแอนติบอดีที่ผ่านการไดอะไลซิส (Dialysis) แล้ว ไปทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วมาคำนวณกับค่า extinction coefficient ของสารละลายแอนติบอดีชนิด Immunoglobulin G (มีค่าเท่ากับ 1.35) เพื่อคำนวณหาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

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

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้ ใช้วิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดย sodium dodecyl sulfate (SDS) จะทำหน้าที่เป็น detergent ที่มีประจุลบ เมื่อสิ่งตัวอย่างอยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง SDS จะเข้าไปจับกับพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ส่งผลให้โปรตีนมีประจุเป็นลบทั้งหมด และเมื่อให้สนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุไฟฟ้าเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก โดยการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางด้านน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว ผลการเคลื่อนที่ของสายพอลิเปปไทด์ จะสามารถเห็นแถบพอลิเปปไทด์ได้เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และสามารถทราบน้ำหนักโมเลกุลของสายพอลิเปปไทด์ของสารตัวอย่างได้จากการเทียบค่าระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว



รูปที่ 3.3 หลักการวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (36)

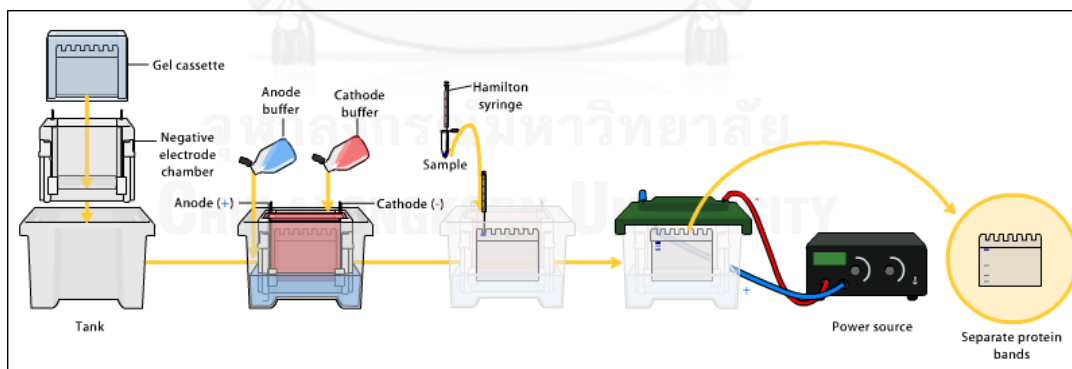
สำหรับการทำ SDS-PAGE อุปกรณ์ที่ใช้ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ก และ 3.4 ข โดยทำการประกอบแผ่นประกบเจลเข้ากับขาตั้งแผ่นประกบเจล จากนั้นเตรียมสารละลาย 12% separating gel (ดูภาคผนวก ข) เติมลงในแผ่นประกบเจลประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของแผ่นประกบเจล แล้วเติม Milli Q water ลงไปให้เต็มแผ่นประกบเจล เพื่อช่วยในการปรับพื้นผิวหน้าของเจลให้เรียบ รอให้เจ

ลแห้งประมาณ 30-45 นาที หลังจากนั้นเท Milli Q water ออก โดยต้องซับน้ำออกให้หมด แล้วเติม 5% stacking gel (ดูภาคผนวก ข) ลงในแผ่นประกบเจลเป็นชั้นถัดมา จนกระทั่งเต็มแผ่นประกบเจล นำหัวขนาดความหนา 0.75 มิลลิเมตร 10 ช่อง ใส่ที่ด้านบนสุดของแผ่นประกบเจล เพื่อให้เก็บช่องในการลงสารละลายตัวอย่าง รอให้เจลแข็งตัวอีกครั้ง จึงดึงหรือออก ต่อมานำแผ่นประกบเจลที่เตรียมเจลพร้อมแล้วใส่ลงในถัง เท running buffer (ดูภาคผนวก ข) ลงใน tank จนเกือบเต็ม

ก



ข



รูปที่ 3.4 ก อุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ข ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์ SDS-PAGE (37)

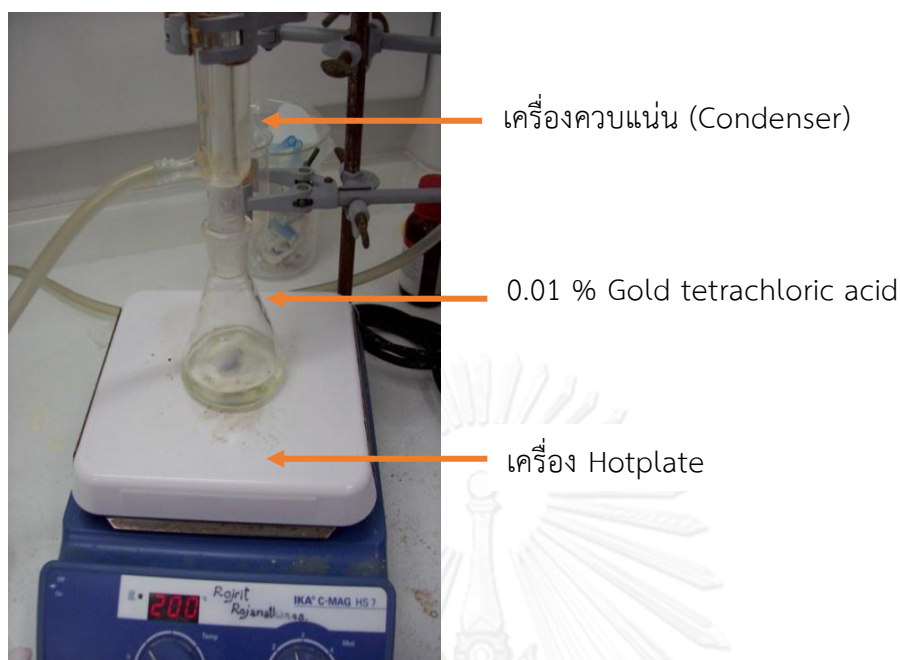
การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โปรตีนที่นำมาทดสอบควรมีปริมาณ ประมาณ 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาตรไม่เกิน 20 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยผสมสารละลาย

ตัวอย่างกับ sample buffer (ดูภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ต่อมานำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายดังกล่าวลงในช่องของแผ่นเจล ซึ่งช่องแรกจะเติมตัวบ่งชี้มวลโมเลกุลและต่อกระแสไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์นาน 30 นาที หรือรอจนกระทั่งมีการเคลื่อนที่ของแถบผ่านส่วนของ stacking gel จึงค่อยเพิ่มกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หรือจนกระทั่งแถบมีการเคลื่อนมาจนกระทั่งส่วนล่างสุดของเจล จากนั้นนำไปย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue G (ดูภาคผนวก ข) นาน 15 นาที และล้างเจลที่ย้อมด้วย destaining solution (ดูภาคผนวก ข) จนเห็นลักษณะเป็นแถบสีน้ำเงินบนเจล หลังจากนั้นเก็บเจลด้วยกระดาษเซลโลเฟน

3.3.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

3.3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อาศัยปฏิกิริยารีดักชันของ Gold tetrachloric acid (HAuCl_4) โดยสารรีดิวเซอร์และสเตบิลิเซอร์ที่ใช้คือ trisodium citrate เพื่อป้องกันการจับกันแล้วตกตะกอน วิธีและอุปกรณ์ที่ใช้ดังแสดงในรูปที่ 3.5 เริ่มจากทำการต้ม 0.01 % Gold tetrachloric acid solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ใส่เครื่องควบแน่น (condenser) โดยจะทำหน้าที่ควบแน่นน้ำที่มีการระเหยออกเป็นไอ เพื่อป้องกันไม่ให้ปริมาณของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์เปลี่ยนแปลง และผสมให้เข้ากันตลอดเวลา โดยใช้เครื่องกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็ก เพื่อให้ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเท่าๆ กัน เมื่อสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเดือด เติม 1% sodium citrate ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สังเกตได้ว่าสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะเปลี่ยนจากสีเทา เป็นสีม่วง และได้สารละลายสีแดงสดในที่สุด ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้เวลาประมาณ 2 นาที หลังจากที่ยีสของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรคงที่แล้ว ทำการต้มต่อไปอีก 15 นาที ในอุณหภูมิเดิม หลังจากนั้นเติม 0.05% Sodium azide 1 มิลลิลิตร เพื่อทำหน้าที่รักษาสภาพของสารละลายให้เก็บได้นาน หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากันต่อโดยใช้เครื่องกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็กในอุณหภูมิห้องและที่มืดเป็นเวลาข้ามคืน เก็บสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ ที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดจนกว่าจะใช้งาน (38)



รูปที่ 3. 5 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

3.3.2.2 การศึกษาคุณภาพของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้จากการสังเคราะห์

3.3.2.2.1 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) ที่ใช้ในงานวิจัย เป็นเครื่องมือของบริษัท JEOL รุ่น JEM-2100 ดังแสดงในรูปที่ 3.6 เป็นกล้องจุลทรรศน์ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างชนิดบาง โดยอาศัยอนุภาคอิเล็กตรอนวิ่งผ่านสิ่งตัวอย่างที่เตรียมขึ้น โดยภาพที่เกิดขึ้นจากกล้องจะวัดจากการทะลุผ่านของอิเล็กตรอนผ่านสิ่งตัวอย่าง ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก หลักการกล้อง TEM ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนจะทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ผลิตจะถูกเร่งผ่านสนามไฟฟ้า และผ่านเลนส์เพื่อรวมอิเล็กตรอนให้เกิดเป็นลำอิเล็กตรอน และจะเคลื่อนที่ผ่านสิ่งตัวอย่าง อิเล็กตรอนจะเกิดการกระเจิงแสงขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนผ่านตัวอย่าง โดยที่อิเล็กตรอนที่ผ่านตัวอย่างไปจะถูกปรับโดยโฟกัสที่เลนส์ใกล้วัตถุ ซึ่งจะทำหน้าที่ในการขยายภาพ ไปสู่จอร์รับภาพ ภาพ TEM สามารถบอกลักษณะรูปร่างและขนาดของวัตถุหรือลักษณะการจัดเรียงตัวของระนาบผลึก ลักษณะภาพเป็นแบบ bright field image ตัวอย่างที่ศึกษาจะต้องมีลักษณะแบนและบาง ในงานวิจัยนี้จะเตรียมสารละลายอนุทองคำระดับนาโนให้อยู่ในรูปฟิล์มบางในระดับไมโครเมตร

(ประมาณ 50-100 ไมโครเมตร) เพื่อให้อิเล็กตรอนจาก TEM สามารถทะลุผ่านได้ เริ่มต้นจากหยดสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร หยดลงบน Grid และทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน (overnight) หลังจากนั้นตัดออกเป็นฟิล์มบางๆ ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า microtoming โดยการเลือนด้วยกระจกหรือเพชร ควบคุมระยะเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพื่อให้ได้ความหนาที่ต้องการ แผ่นฟิล์มจะลอยอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ตะแกรงขนาดเล็กที่เรียกว่า Copper grid ซ้อนขึ้นมาจากและทำการเคลือบผิวก่อนนำเข้าสู่เครื่อง TEM โดยการทดลองนี้ได้ใช้เครื่อง TEM จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3. 6 แสดงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) ของบริษัท JEOL รุ่น JEM-2100 ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.2.2 การศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometer

ในการทดลองนี้ ได้ใช้ Spectrophotometer รุ่น Evolution 600, Thermo scientific ดังแสดงในรูปที่ 3.7 ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของการเติม 1 % Trisodium citrate ดังตารางที่ 4.1 โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ 1 % Trisodium citrate ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ในสารตั้งต้น 0.01 % Gold tetrachloric acid solution 100 มิลลิลิตร นำสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ ใส่ในคิวเวทท์ (cuvettes) ชนิดควอตซ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยการ Scan spectrum ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร เพื่อดูค่าการดูดกลืนที่สูงที่สุดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

ตารางที่ 3. 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับปริมาณของ Trisodium citrate (39)

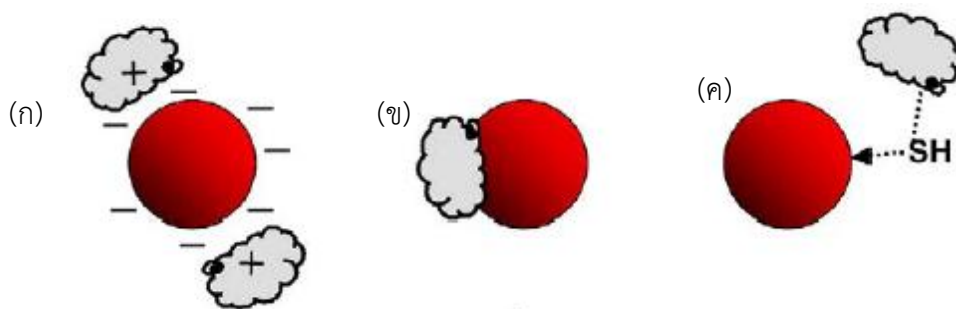
Properties	Volumes (ml) of 1% (w/v) Trisodium citrate					
	0.1	0.25	0.5	1	1.5	2
Color	Blue-grey	Violet	Purple	Red	Orange-red	Orange
Absorption peak (nm)	220	240	535	525	522	518
Diameter (nm)	147	97.5	71.5	41	24.5	15



รูปที่ 3. 7 แสดง UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 600, Thermo scientific) (40)

3.3.2.3 การศึกษาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

การตรึงโมโนโคลนัลแอนติบอดีบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อาศัยพันธะชนิด non-covalent ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ ionic interaction เป็นแรงระหว่างประจุลบของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และประจุบวกบนโปรตีน (รูปที่ 3.8 ก) แรง hydrophobic เป็นแรงระหว่างโปรตีนกับพื้นผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (รูปที่ 3.8 ข) และ Dative Bond เป็นแรงระหว่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร กับอิเล็กตรอนของไนโตรเจนและซัลเฟอร์ของโปรตีน (รูปที่ 3.8 ค) เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำการสังเคราะห์ได้ จะมีลักษณะประจุเป็นลบโดยรอบ ทำให้มีประสิทธิภาพในการตรึงกับโปรตีนซึ่งเป็นประจุบวก



รูปที่ 3. 8 แสดงแรงชนิดต่างๆ ที่จับกันระหว่างอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับโปรตีน (41)

การศึกษาปริมาณของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ในงานวิจัยนี้ใช้การเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงระหว่าง 520 และ 580 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่ออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีในปริมาณที่เหมาะสม แล้วมีการใส่ 10% โซเดียมคลอไรด์ เพื่อให้จับบริเวณผิวบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เหลือ ถ้าในกรณีที่ใช้ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีเหมาะสม จะสามารถจับบนผิวอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้หมด ทำให้ไม่เหลือช่องว่างให้โซเดียมคลอไรด์เข้ามาจับได้อีก ทำให้ไม่เกิดการตกตะกอนเกิดเป็นสารละลายสีแดง ซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ 520 นาโนเมตร ในทางกลับกันถ้าปริมาณของโมโนโคลนัลแอนติบอดีมีปริมาณน้อยเกินไปยังไม่พอเหมาะกับปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร จะส่งผลให้เหลือช่องว่างบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เมื่อใส่โซเดียมคลอไรด์ลงไปในการตกตะกอน เกิดการตกตะกอน เป็นสารละลายสีม่วง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 580 นาโนเมตร ดังนั้นการเลือกปริมาณความเข้มข้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสม จะเลือกกระดกการเจือจางสุดท้ายหรือความเข้มข้นของแอนติบอดีต่ำสุดที่ทำให้สีของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรยังไม่เปลี่ยนแปลงจากแดงเป็นม่วง (42, 43)

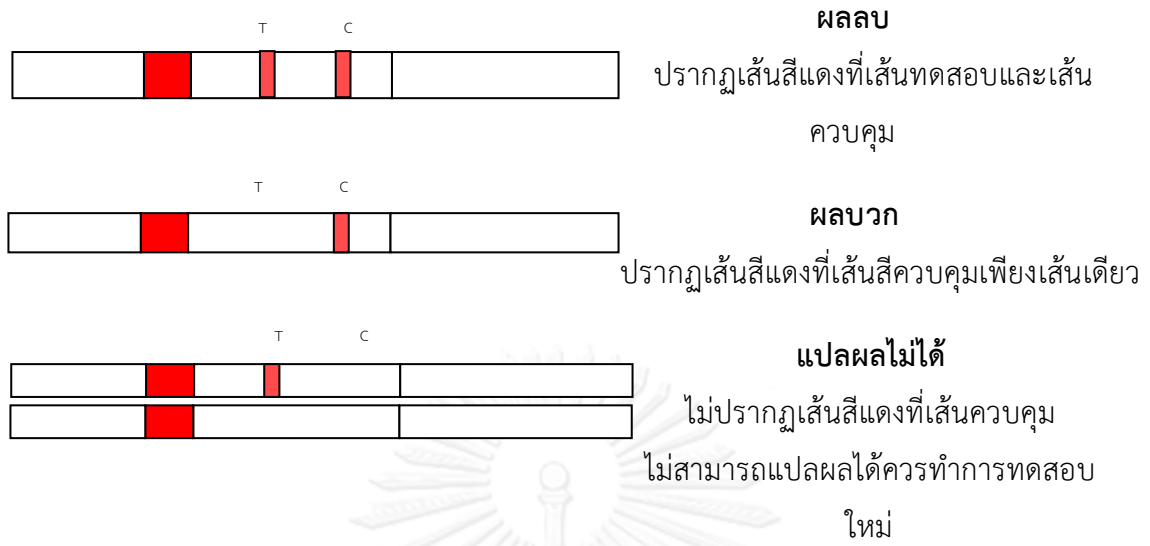
การทดลอง มีขั้นตอนดังนี้ นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ มาปรับสภาพความเป็นกรดต่างให้ได้ pH 8.5 ด้วยสารละลาย 0.01 M โพแทสเซียมคาร์บอเนต จากนั้นเติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลา เติม 10 % โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและบ่มต่อ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น นำสารละลายแต่ละหลอด มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 นาโนเมตร เลือกความเข้มข้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสม คือ ปริมาณสุดท้ายที่ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากแดงเป็นม่วง ซึ่งพิจารณาจากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่สองความยาวคลื่น

เมื่อทราบปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการตรึงแล้ว ดูดสารละลายแอนติบอดีปริมาณ 10 ไมโครลิตร นำมาผสมกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรปริมาตร 1

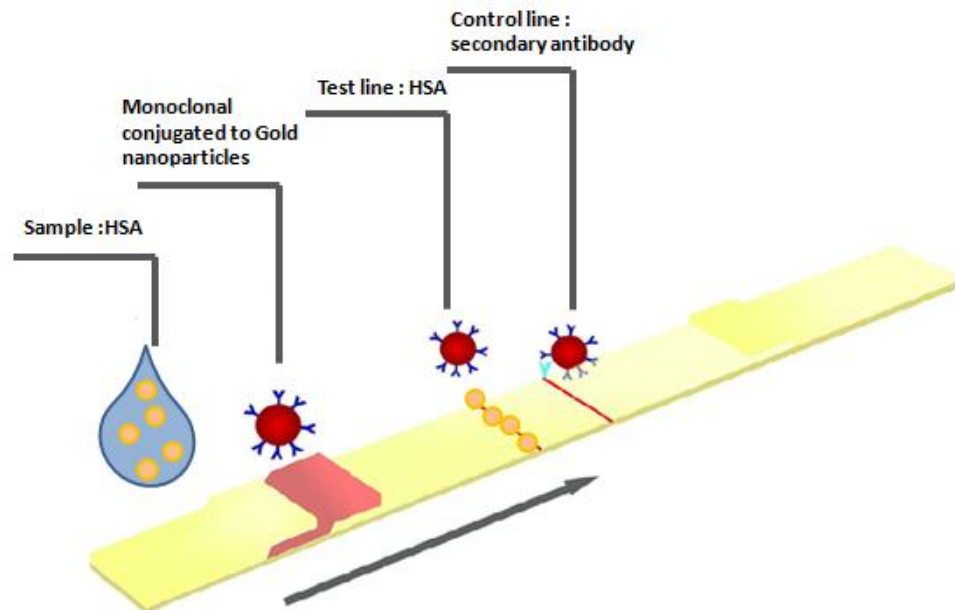
มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติม 10% BSA ที่อยู่ใน 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปปั่น 14,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดน้ำส่วนใสด้านบนออก ล้างตะกอนด้วย 1 % BSA ใน 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แล้วนำไปปั่นล้างอีกครั้ง โดยปั่นส่วนใสด้านบนทิ้งอีกรอบ จากนั้นละลายตะกอน (resuspend) ด้วย 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 ที่มีส่วนผสมของ 1% BSA, 20% sucrose และ 0.05% sodium azide เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด จนกว่าจะใช้งาน

3.3.2.4 การเตรียมชุดตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Immunochromatography

ในงานวิจัยนี้ ในการตรวจคัดกรองระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ได้พัฒนาวิธี Immunochromatography ที่ใช้หลักการ Competitive method ซึ่งเป็นการแย่งจับกันระหว่างอัลบูมินในปัสสาวะกับ อัลบูมินที่ตรึงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ โดยอัลบูมินจากสองแหล่งจะแย่งกันจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ไหลมาจากบริเวณ Conjugate pad ถ้าในปัสสาวะมีปริมาณอัลบูมินมากพอที่จะจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้หมด ส่งผลให้ตำแหน่งจับกับแอนติเจน (antigen binding sites) ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไม่เหลือสำหรับมาจับอัลบูมินที่ตรึงตรงเส้นทดสอบ (test line) และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะไหลผ่านไปยัง Absorbent Pad ดังนั้นจึงไม่เกิดเป็นเส้นสีแดงตรงเส้นทดสอบ ส่วนที่ตำแหน่งเส้นควบคุม (control line) ได้มีการตรึงแอนติบอดีต่อโมโนโคลนัลแอนติบอดี (Rabbit Anti-Mouse IgG) ที่อยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ดังนั้นจึงปรากฏสีแดงที่เส้นควบคุมเสมอเมื่อทำการทดสอบแล้วปรากฏเส้นเดียวที่เส้นควบคุม สามารถแปลผลว่า ผลบวก แสดงถึงในตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาทดสอบมีอัลบูมินความเข้มข้นมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (มากกว่าค่า cut-off) ในทางกลับกัน ถ้าในปัสสาวะไม่มีอัลบูมินหรือมีน้อยกว่าค่า cut-off ดังนั้นโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เมื่อไหลผ่านไปยังเส้นทดสอบ ก็สามารถจับกับ HSA ที่ตรึงอยู่บนเส้นทดสอบได้ ทำให้ปรากฏเส้นสีแดงให้เห็น ซึ่งบนชุดตรวจแบบนี้จะปรากฏสีทั้งเส้นทดสอบ และเส้นควบคุม แปลผลเบื้องต้นได้ว่าผู้ป่วยรายนี้มีระดับไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 3.9 แสดงการอ่านผลตรวจของชุดตรวจ MAU และรูปที่ 3.10 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง HSA กับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้หลักการ competitive lateral flow immunochromatography assay



รูปที่ 3. 9 แสดงการอ่านผลตรวจของชุดตรวจ MAU ที่ผลิตขึ้น

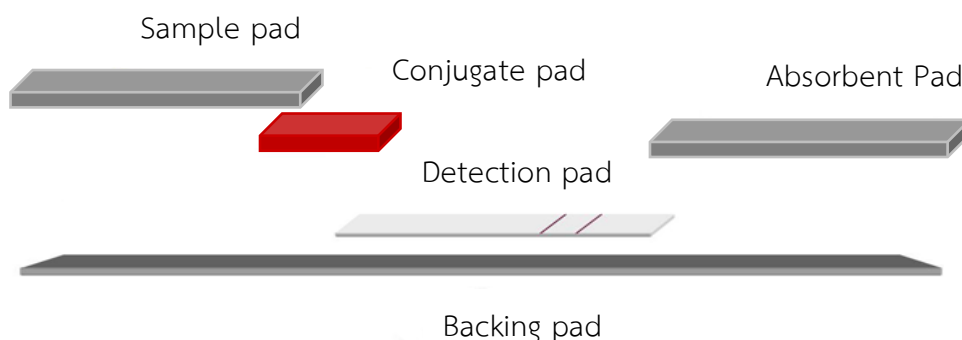


รูปที่ 3. 10 ภาพแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอัลบูมินกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้หลักการ competitive lateral flow immunochromatography assay

ส่วนประกอบของชุดทดสอบ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีดังนี้

Sample pad	เป็นส่วนที่ใช้รองรับสิ่งตัวอย่าง กระดาษที่ใช้ คือ Glass fiber ขนาดที่ใช้คือ 0.4*2 เซนติเมตร
Conjugate pad	เป็นส่วนที่รองรับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร แล้วซึมซับอยู่บน Glass fiber ขนาด 0.4*1 เซนติเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนการนำมาประกอบชุดตรวจ โดยสามารถเก็บชิ้นส่วนนี้ไว้ในในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
Detection pad	มีขนาด 0.4*2.5 เซนติเมตร ชิ้นส่วนนี้ประกอบด้วย 2 เส้น คือเส้นทดสอบและเส้นควบคุม
Capture line (test line)	เส้นแสดงผลการตรวจ ตรึงด้วย HSA ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ใน 0.01 โมลต่อลิตร Phosphate buffer, pH 7.4
Control line	เส้นควบคุมคุณภาพของชุดตรวจวิเคราะห์ ตรึงด้วยทิวินอิมมูโนแอนติบอดี สามารถจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ใน 0.01 โมลต่อลิตร Phosphate buffer, pH 7.4 ทั้งสองเส้นตรึงห่าง จากกัน 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำมา block ด้วย 1% BSA ใน 0.01 โมลต่อลิตร Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนการนำมาประกอบชุดตรวจ โดยสามารถเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
Absorbent Pad	ส่วนท้ายสุดทำให้เกิดแรง capillary force และใช้ในการรองรับส่วนของ Gold conjugate ที่เหลือ กระดาษที่ใช้คือ 100% pure cellulose fiber ขนาด 0.4*3 เซนติเมตร เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการประกอบส่วนของชุดตรวจวิเคราะห์บน backing pad โดยเริ่มจาก nitrocellulose membrane ตรงกลาง conjugate pad และ absorbent pad ติดคนละด้านของ nitrocellulose membrane โดยจะติดให้ซ้อนกันประมาณ 2 มิลลิเมตร และ sample pad จะติดให้ซ้อน conjugate pad อีกชั้นหนึ่ง ดังรูปที่ 3.11



รูปที่ 3. 11 แสดงประกอบส่วนของชุดตรวจวิเคราะห์ ลำดับการประกอบและขนาดแต่ละส่วน

3.3.2.5 การหาภาวะที่เหมาะสม (optimization) สำหรับชุดตรวจคัดกรอง MAU แบบเชิงคุณภาพ

3.3.2.5.1 การทดสอบชนิดของสารที่ใช้ในการ Block เพื่อลด non-specific binding บนผิวของ Nitrocellulose membrane สารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ BSA, Casein และ PEG ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1, 2 และ 3 %

3.3.2.5.2 การทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ใช้ตรงกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยสังเกตจากความเข้มของสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่เกิดขึ้น โดยความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ทดสอบ มีความเข้มข้นระหว่าง 100 ถึง 1200 ppm และทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะ blot อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ลงบน conjugate pad เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

3.3.2.5.3 การทดสอบหาปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม ที่จะใช้หยดลงบน sample pad เนื่องจากปริมาณสิ่งส่งตรวจมีผลต่อการอ่านผลการตรวจวัดได้ ในกรณีที่ปริมาณปัสสาวะมาก สิ่งส่งตรวจไหลผ่านโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เกิดผลลบปลอมได้

3.3.2.5.4 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HSA และทุติยภูมิแอนติบอดี ต่อโมโนโคลนัลอัลบูมินลงบนเส้นทดสอบและเส้นควบคุมตามลำดับ ซึ่งจะมีผลต่อความเข้มของสีเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

3.3.2.6 การทดสอบคุณสมบัติ (Characterization) ชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่พัฒนาได้

3.3.2.6.1 การทดสอบหา cut off ในชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น โดยทดสอบกับสารละลายมาตรฐานที่ได้รับควบคุมคุณภาพจากภายนอก (External Quality Assessment) ของ หก. อีคิวเอ เซ็นเตอร์ โดยได้รับความอนุเคราะห์สารละลายมาตรฐาน MAU EQA ดังกล่าวจาก รองศาสตราจารย์อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ ลักษณะของสาร EQA เป็นแบบ Lyophilised Urine ที่รายงานปริมาณ Human serum albumin ในช่วงน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 3.12 โดยนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร Phosphate buffer, pH 7.4 และทดสอบกับชุดตรวจ MAU ในงานวิจัยนี้ ค่า cut off ของชุดตรวจคัดกรองภาวะ MAU ที่ต้องการคือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสิ่งตัวอย่างมีอัลบูมินความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรจะรายงานผลการตรวจเป็น ผลบวก ซึ่งบนชุดตรวจในตำแหน่งเส้นทดสอบจะไม่ปรากฏเส้นสีแดงให้เห็น และถ้าสิ่งตัวอย่างมีระดับไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะรายงานผลการตรวจเป็น ผลลบ ซึ่งในตำแหน่ง เส้นทดสอบ จะปรากฏเส้นสีแดงให้เห็น



รูปที่ 3. 12 แสดงสารละลาย EQA แบบ Lyophilised Urine ที่มีปริมาณ Human serum albumin ปริมาณความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.2.6.2 การทดสอบความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่ผลิตขึ้น โดยนำชุดตรวจคัดกรองดังกล่าวมาทดสอบกับ สารละลายมาตรฐาน MAU EQA โดยใช้ความเข้มข้นของไมโครอัลบูมิน 2 ระดับ คือ negative (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ Positive (ไมโครอัลบูมินมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อที่จะได้เห็นทั้งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม โดยแต่ละความเข้มข้นทดสอบจำนวน 20 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มสีของทั้งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ทั้ง 20 ครั้ง โดยการถ่ายรูปเส้นสีแดงที่ปรากฏและใช้โปรแกรม ImageJ วิเคราะห์ความเข้มของสีและคำนวณค่าความแปรปรวน (%CV) โดยได้ทำการตรวจสอบทั้ง ภายใน 1 วัน (within day) และการตรวจระหว่างวัน (between day)

3.3.2.7 การเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่พัฒนาขึ้น ใช้ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม จากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคเบาหวานจำนวน 100 คน ($n = 100$) ที่มีระดับ MAU ต่างๆ กัน โดยใช้ปัสสาวะเหลือจากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลราชวิถี ทั้งนี้การใช้ตัวอย่างปัสสาวะดังกล่าวได้ผ่านการรับรองการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน จากโรงพยาบาลราชวิถี (รหัสโครงการวิจัยที่ 55113 ใบรับรองที่ 100/2555) และจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสโครงการวิจัยที่ 071/55 ใบรับรองที่ 094/2555)

นำปัสสาวะจากผู้ป่วยเบาหวานมาทดสอบโดยใช้ชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่พัฒนาและนำผลการตรวจวัดมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่ตรวจโดยใช้วิธีอิมมูโนเทอปีไดมิทรี ในห้องปฏิบัติการการแพทย์ทั่วไป ที่ใช้ เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ รุ่น INTREGA 800 วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้สูตรดังนี้

- Sensitivity = $TP/TP+FN$
- Specificity = $TN/TN+FP$
- Accuracy = $TP+TN/TP+TN+FP+FN$
- Positive predictive value = $TP/TP+FP$
- Negative predictive value = $TN / TN + FN$

หมายเหตุ : True positive (TP): ผลบวกจริง, False positive (FP): ผลลบปลอม,

True negative (TN): ผลลบจริง, False negative (FN) : ผลลบปลอม

บทที่ 4

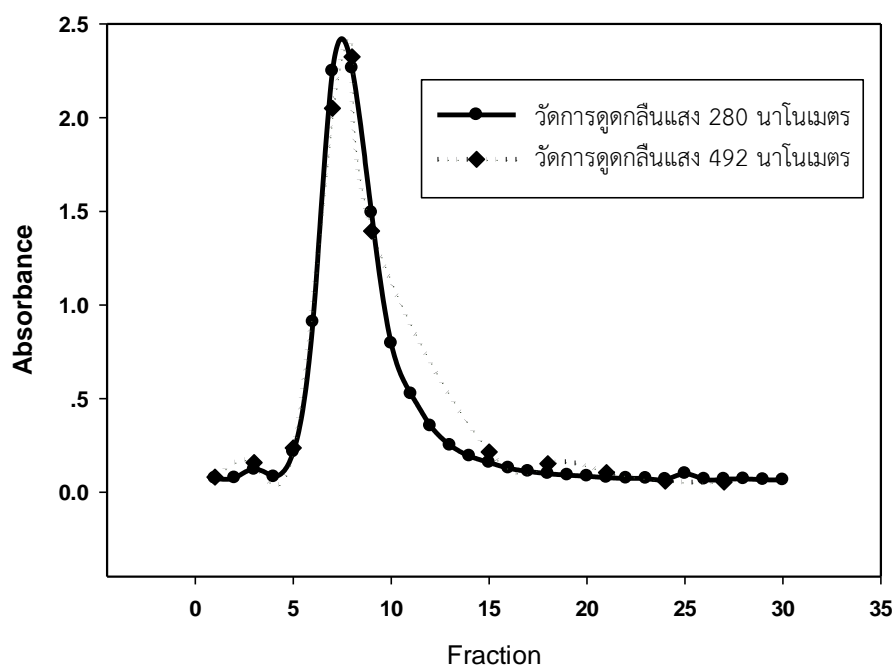
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.1.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 มาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 500 มิลลิลิตรจำนวน 2 ขวด เมื่อทำการเลี้ยงจนได้แอนติบอดีสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณมากแล้ว จึงนำแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยในสภาวะ pH 7.0 โปรตีนจีเซฟาโรสซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์จะทำหน้าที่ยึดจับกับ Fc region ของแอนติบอดีและสามารถแยกแอนติบอดีออกจากโปรตีนจีได้โดยการใช้กรด ในการทดลองนี้ ได้ใช้ glycine hydrochloride buffer pH 2.7 จะให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่อยู่ในคอลัมน์หลุดออกมา จากนั้นนำสารละลายที่เก็บได้แต่ละแฟรคชันไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบแอนติบอดีในแต่ละแฟรคชันด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ระดับการเจือจางเท่ากับ 1:10000

ผลการทดลองพบว่า ในแฟรคชันที่ 6 -10 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ตารางที่ ก.1 ภาคผนวก ก) แสดงถึงมีปริมาณโปรตีนชะออกมาในแฟรคชันดังกล่าว และสอดคล้องกับผลจากการทดลองด้วยวิธี indirect ELISA ที่พบว่ามีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ในแฟรคชันที่ 6-10

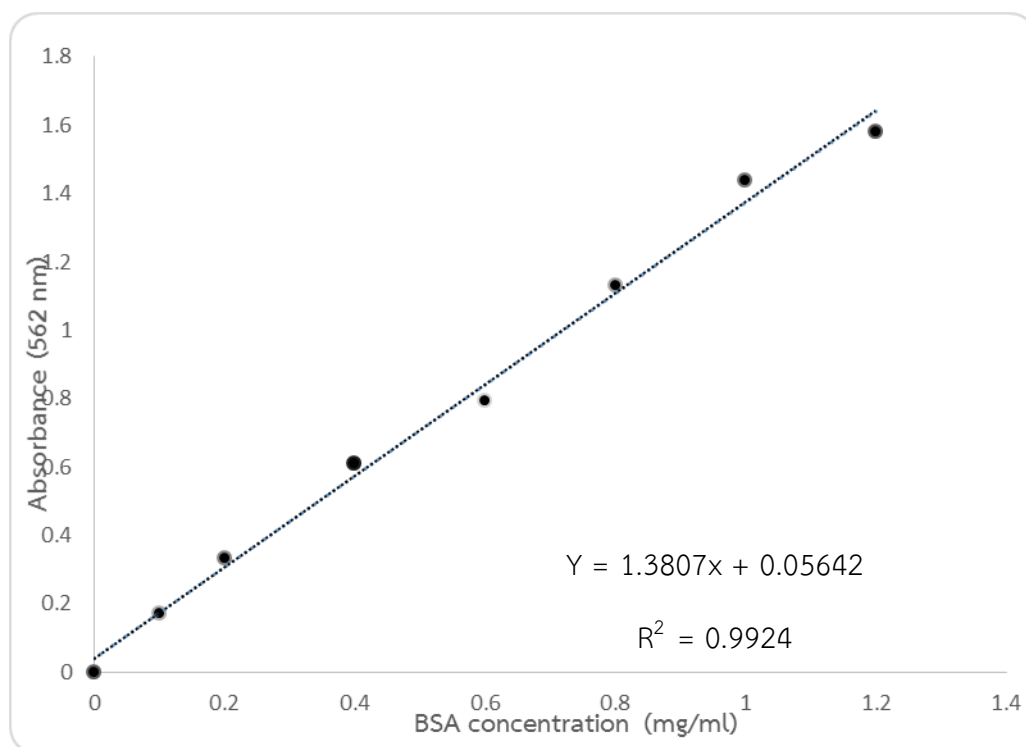


รูปที่ 4. 1 โครมาโทแกรมจากการทำโมโนโคลนัลแอนติบอดี (โคลน 4/B11/G3/H11/G1) ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสขนาด 1.5x5 เซนติเมตรและทำการล้างคอลัมน์ด้วย glycine hydrochloride pH 2.7 โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที

4.1.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)

ในการทดลองนี้ใช้วิธี Bichoninic acid assay (BCA) สำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน กราฟมาตรฐานสำหรับใช้หาความเข้มข้นของโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.1 พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ของโคลน 4/B11/G3/H11/G11 มีปริมาณโปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ได้ค่า 3.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 3.38 กรัม และหลังการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity chromatography ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโมโนโคลนัลแอนติบอดีมีค่า 2.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนใน

อาหารเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นลดลงเมื่อมีการทำให้บริสุทธิ์ แสดงว่าคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสสามารถจับโมโนโคลนัลแอนติบอดีได้และชะโปรตีนอื่นๆ ออกไปได้



รูปที่ 4. 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA จากการทดสอบด้วยวิธี BCA

ตารางที่ 4. 1 ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

โคลน	ก่อนทำให้บริสุทธิ์			หลังทำให้บริสุทธิ์		
	ปริมาตร (ml)	ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)	ปริมาตร (ml)	ความเข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)
4/B11/G3/H11/G11	1000	3.38	3376.33	19.5	2.12	42.69

4.1.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

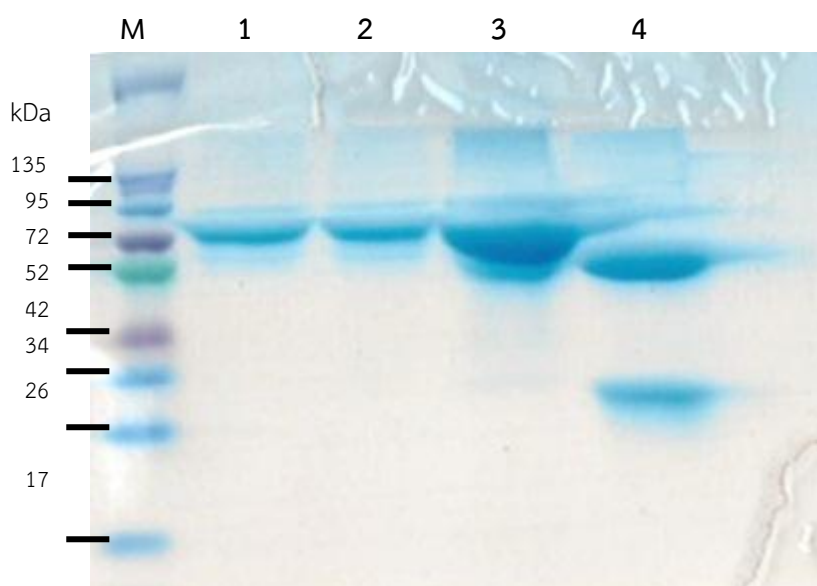
ปริมาณแอนติบอดีหลังจากทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์แล้วและผ่านการไดอะไลซิส (Dialysis) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ 2.86 นาโนเมตร และค่า extinction coefficient ของสารละลายแอนติบอดีชนิด Immunoglobulin G (มีค่าเท่ากับ 1.35) เพื่อคำนวณหา ค่าปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} &= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{Extinction coefficient ของ IgG}} \\ &= \frac{2.86}{1.35} \\ &= 2.12 \end{aligned}$$

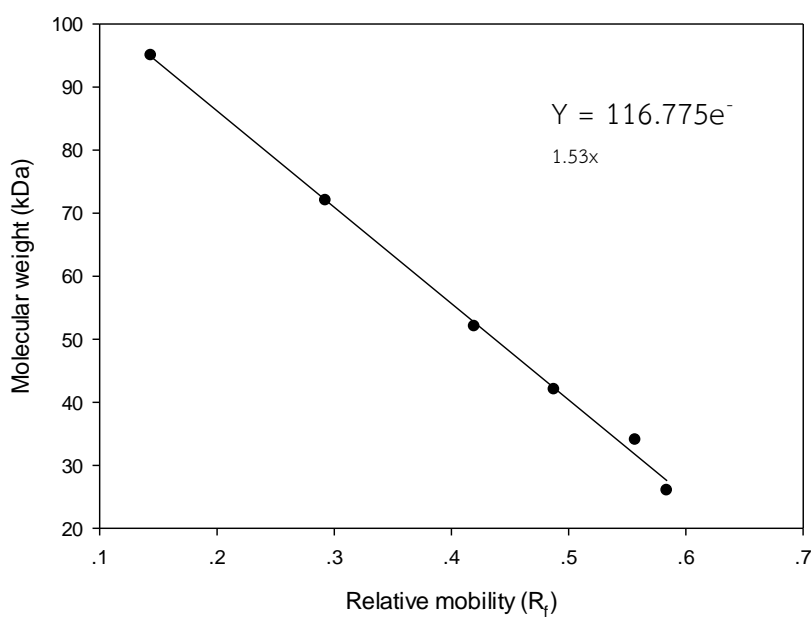
ดังนั้นปริมาณแอนติบอดีหลังจากทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์แล้วมีความเข้มข้น 2.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.4 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนัลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยวิธี SDS-PAGE ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 โดยการหาน้ำหนักของ แลปโมเลกุลโปรตีน เทียบกับค่า relative mobility (R_f) ของแลปโปรตีนที่ต้องการหาน้ำหนักโมเลกุล เปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว พบว่า Lane 1 ซึ่งเป็นอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดี (mAb) ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ มีโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลัก และเป็นสัดส่วนมากเมื่อเทียบกับปริมาณของโมโนโคลนัลในสารละลายอื่นๆ ดังนั้นผล SDS-PAGE จึงยังมองไม่เห็นแลปโปรตีนของโมโนโคลนัลแอนติบอดี ส่วน Lane 2 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FCS จะเห็นแถบหนึ่งแถบของอาหารเลี้ยงเซลล์ Lane 3 คือ โปรตีนจากซีรัมวัว (FCS) เพียงอย่างเดียว จะมีความเข้มข้นของโปรตีนจากซีรัมวัวมากเกิดแถบที่มีความหนา Lane 4 คือ สารละลายโมโน โคลนัลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะเห็นเฉพาะแถบโปรตีนแอนติบอดี ซึ่งแยกเป็นแถบโปรตีน สายสั้น (Light chain) และแถบโปรตีนสายยาว (Heavy chain) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29 และ 54 กิโลดัลตัน ตามลำดับ แต่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนจากซีรัมวัว (FCS) เมื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนัล แอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (Lane 1)



รูปที่ 4. 3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลด้วยวิธี SDS-PAGE ; M คือ Molecular weight protein markers; Lane 1 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี mAb ก่อนการทำให้บริสุทธิ์; Lane 2 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FCS; Lane 3 คือ FCS; Lane 4 คือ สารละลายโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว



รูปที่ 4. 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของ Molecular weight protein marker กับค่า R_f บน SDS-PAGE

ตารางที่ 4. 2 ค่า R_f และน้ำหนักโมเลกุลของโมนโคลนัลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility (R_f)
135	0.14
95	0.29
72	0.42
52	0.49
42	0.56
34	0.58
26	0.68
17	0.90
Heavy chain 50	0.47
Light chain 25	0.66

ในงานวิจัยของ Poonam Rajak และคณะ (44) ได้ศึกษาการผลิตโมนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมิน โดยศึกษาคุณสมบัติของโมนโคลนัลที่ผลิตขึ้นเมื่อหลังการทำให้บริสุทธิ์ โดยการหามวลโมเลกุลของโมนโคลนัลแอนติบอดีพบว่ามีความของ Heavy chain 50 kDa และ Light chain 25 kDa เปรียบเทียบกับโมนโคลนัลแอนติบอดีที่ในงานวิจัยนี้ได้ทำให้บริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมนโคลนัลแอนติบอดีพบว่ามีความของสาย Heavy chain ประมาณ 50 kDa และขนาดของสาย Light chain ประมาณ 25 kDa

4.2 การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

4.2.1 ผลการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

ในงานวิจัยนี้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ใช้ปฏิกิริยารีดักชันของ Gold tetrachloric acid (HAuCl_4) โดยสารรีดิวเซอร์และสเตบิไลเซอร์ที่ใช้คือ trisodium citrate เพื่อป้องกันการจับกันแล้วตกตะกอน ผลการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 24 นาโนเมตร โดยลักษณะภายนอกเป็นสารละลายสีแดง แสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4. 5 ลักษณะภายนอกของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้

4.2.2 คุณภาพของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

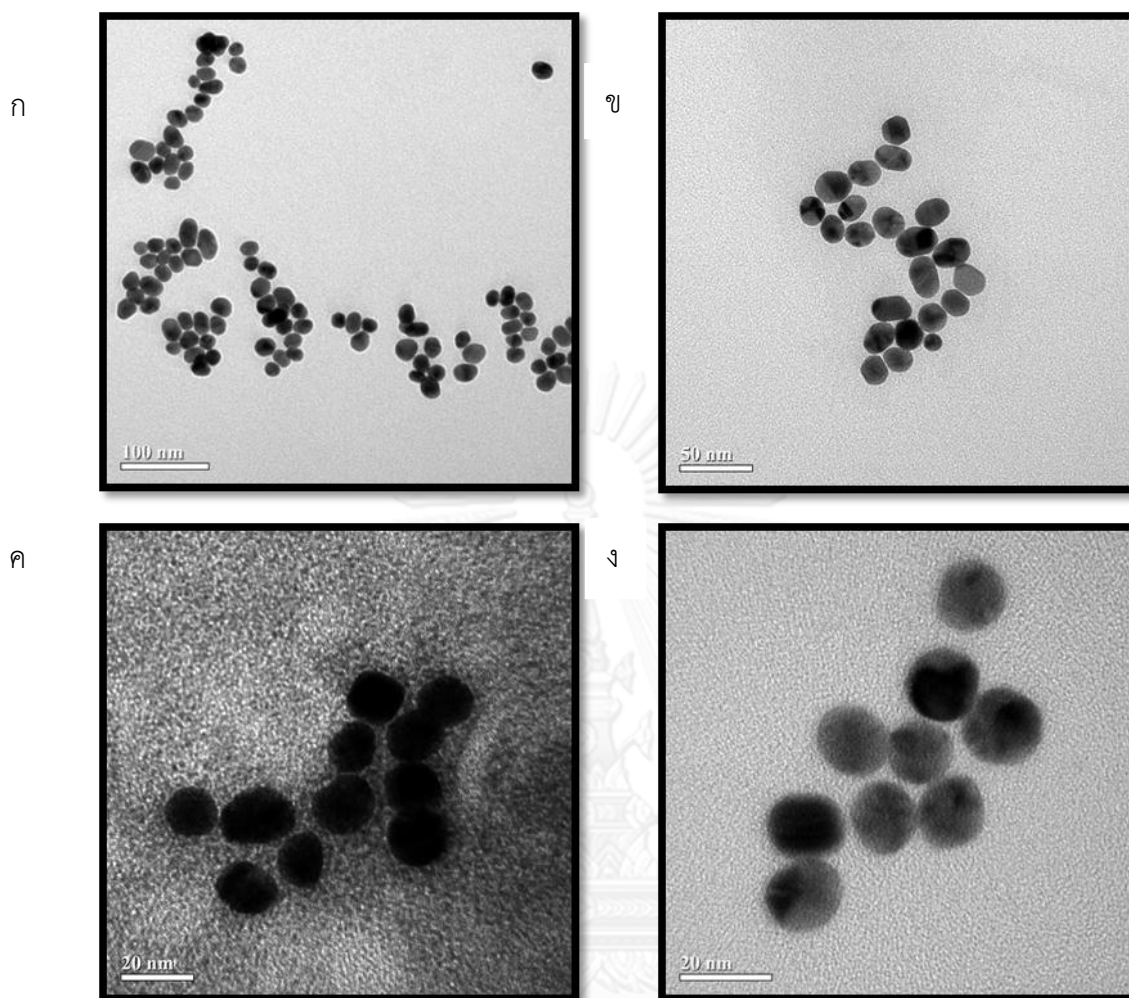
4.2.2.1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน หรือ *Transmission Electron Microscope (TEM)* จากภาพของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร รูปที่ 4.6 (ง) สามารถคำนวณขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้ดังนี้ วัดขนาดภาพของวัตถุที่สนใจจากรูปตัวอย่างวัดได้ 1 เซนติเมตร, วัดขนาดภาพของ scale bar ในหน่วยเดียวกัน 1 เซนติเมตรและตัวเลขที่ปรากฏเหนือ scale bar 20 นาโนเมตรแล้วนำมาคำนวณตามสูตร

ขนาดวัตถุจริง = $\frac{\text{ขนาดของวัตถุที่สนใจ (ซม.)} \times \text{ตัวเลขเหนือ scale bar (นาโนเมตร)}}{\text{ขนาดของ Scale bar (เซนติเมตร)}}$

ขนาดของ Scale bar (เซนติเมตร)

ขนาดวัตถุจริง = $\frac{1.2 \text{ เซนติเมตร} \times 20 \text{ นาโนเมตร}}{1 \text{ เซนติเมตร}} = 24 \text{ นาโนเมตร}$

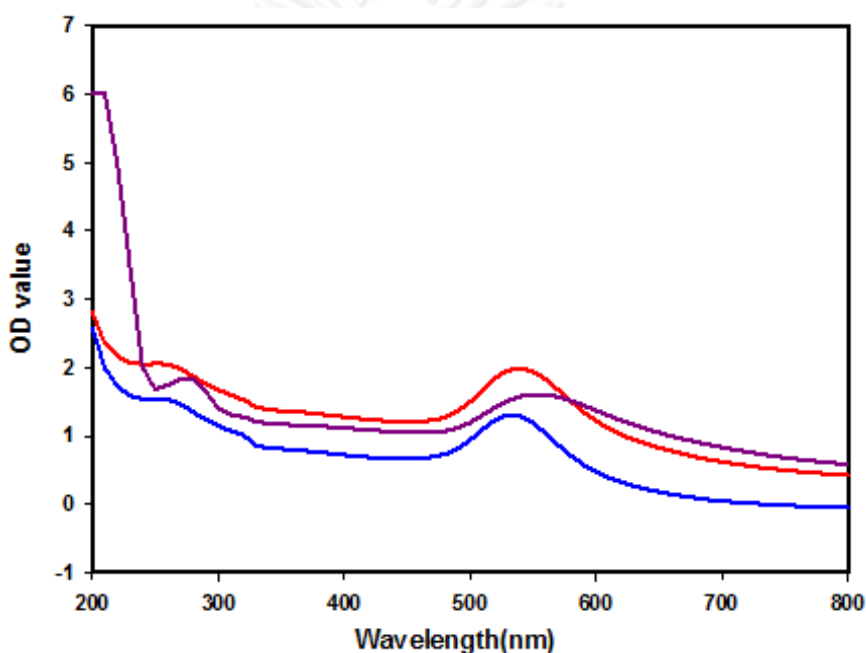
ดังนั้นรูปร่างและขนาดของ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้คือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีลักษณะทรงกลมขนาดประมาณ 24 นาโนเมตร



รูปที่ 4. 6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) แสดงรูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นในกำลังขยายที่แตกต่างกัน (ก) 100 นาโนเมตร, (ข) 50 นาโนเมตร และ (ค-ง) 20 นาโนเมตร

4.4.2.2 ผลการศึกษาขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของการเติม 1 % Trisodium citrate (45) งานวิจัยนี้ได้ใช้ 1 % Trisodium citrate ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ในสารตั้งต้น 0.01 % Gold tetrachloric acid solution 100 มิลลิลิตร ดังนั้นขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 24 นาโนเมตร และมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 522 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำสารละลายอนุภาคทองคำมาสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสงพบว่า อนุภาคทองคำระดับนาโน

เมตรเมตรมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 522 นาโนเมตร ส่วนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงโมโนโคลนัลแอนติบอดีมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ยาวขึ้น เป็น 540 นาโนเมตร และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีและจับกับทุติยภูมิแอนติบอดีชนิด IgG มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 580 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และภาคผนวก ก.2 เส้นสเปกตรัมการดูดแสงของเส้นสีน้ำเงินคือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยเมื่อมาเปรียบเทียบกับชุดตรวจ MAU ที่ผลิตขึ้นนั้นคือส่วนของ conjugate pad เมื่อทำการทดสอบชุดตรวจ MAU โมโนโคลนัลแอนติบอดีบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะเข้าไปจับกับทุติยภูมิแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนเส้นควบคุม เส้นลักษณะเป็นเส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (เส้นสีม่วง)

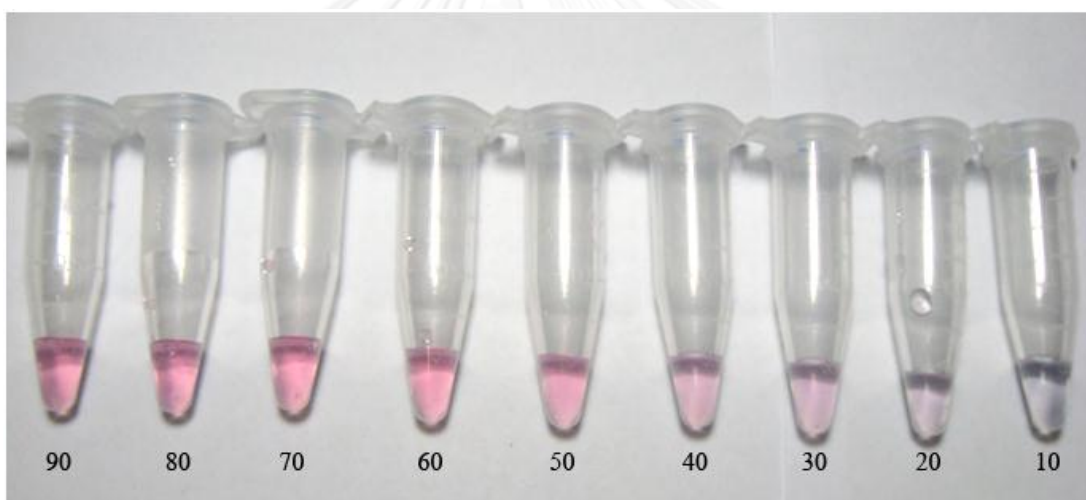


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

- แทนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
- แทนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี
- แทนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีและจับกับทุติยภูมิแอนติบอดี (IgG)

4.2.3 ผลการศึกษาปริมาณของโมนโคไนล์แอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

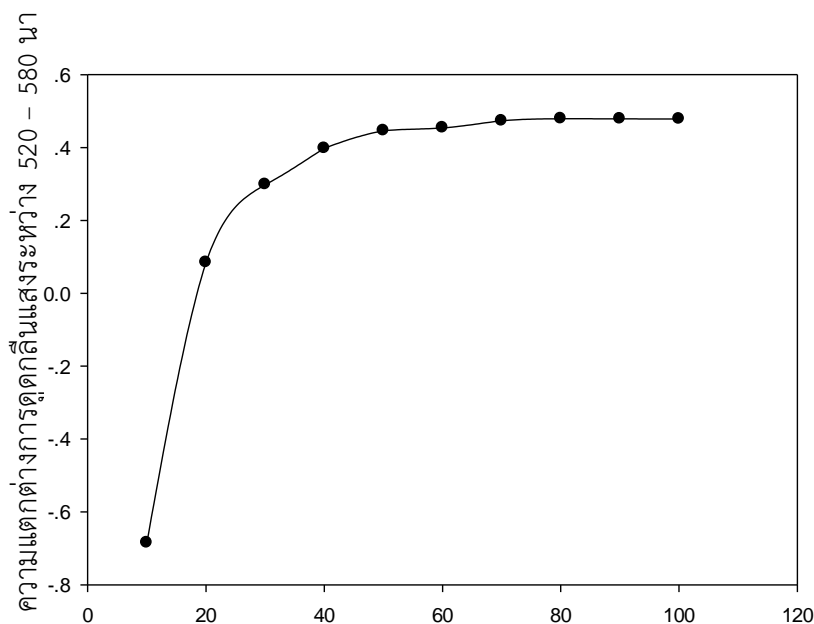
การหาปริมาณของโมนโคไนล์แอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เลือจากความเข้มข้นสุดท้ายที่ทำให้สีของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ยังไม่เปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีม่วงเมื่อมีการเติม 10 % โซเดียมคลอไรด์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.8 เห็นได้ว่าเมื่อใช้แอนติบอดีตั้งแต่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไป และหลังมีการเติม 10 % โซเดียมคลอไรด์แล้ว สีของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นสีแดง แสดงถึงอนุภาคทองคำดังกล่าวไม่มีการตกตะกอน และที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีน้อยกว่า 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สีของสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นสีม่วงแสดงถึงมีพื้นที่หลงเหลือบนอนุภาคเนื่องจากมีปริมาณของโมนโคไนล์แอนติบอดีที่น้อยเกินไป ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในงานวิจัยนี้คือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร



ปริมาณโมนโคไนล์แอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

รูปที่ 4. 8 ผลการศึกษาปริมาณโมนโคไนล์แอนติบอดีที่เหมาะสมที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

เมื่อพิจารณาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 580 นาโนเมตร พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มากที่สุดที่ใช้ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร แล้วผลของค่าการดูดกลืนแสงแทบไม่เปลี่ยนแปลง คือตั้งแต่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไป ดังแสดงในรูปที่ 4.9 แสดงว่า ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พื้นที่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ถูกตรึงด้วยโมนโคไนล์แอนติบอดีทั้งหมด เมื่อมีการเติม 10 % โซเดียมคลอไรด์แล้ว และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.8



ปริมาณความเข้มข้นโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโน (มิลลิกรัมต่อ

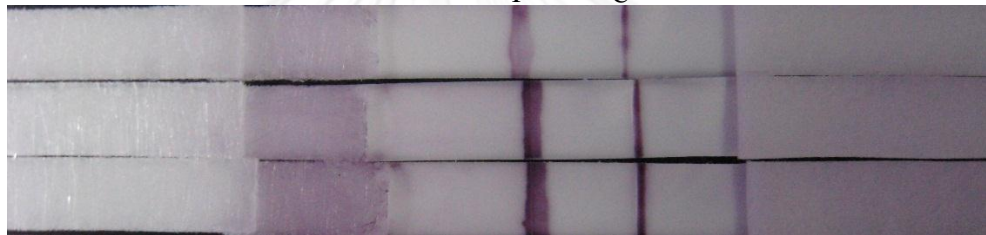
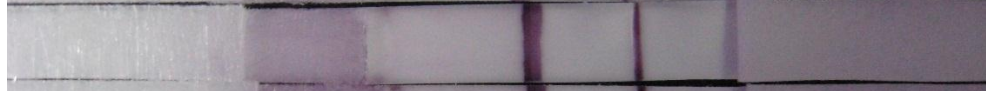
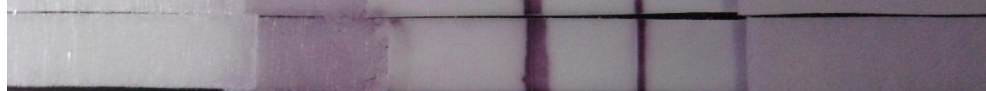
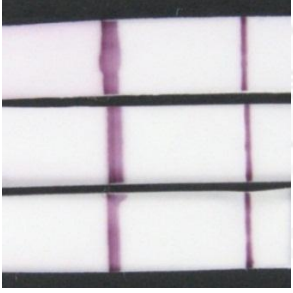
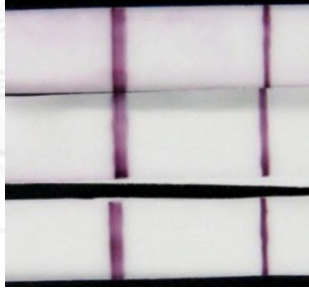
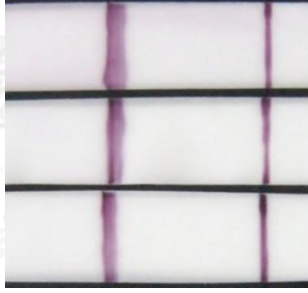

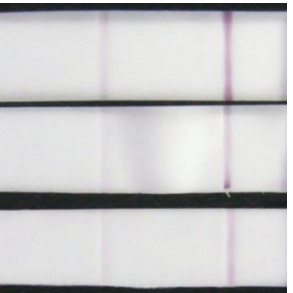
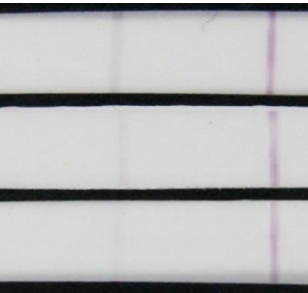
รูปที่ 4. 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 520 และ 580 นาโนเมตร

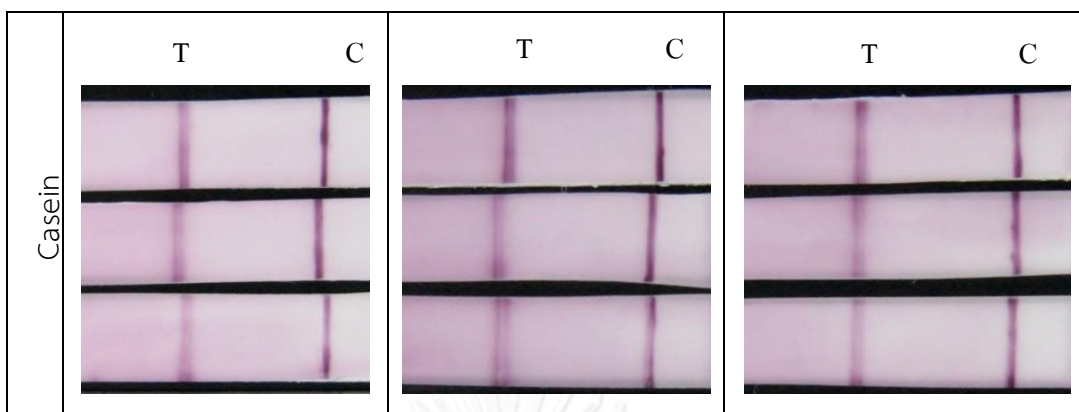
4.2.4 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับชุดตรวจคัดกรอง MAU แบบเชิงคุณภาพ

4.2.4.1 ชนิดของสารที่ใช้ในการ Block เพื่อลดการจับที่ไม่จำเพาะบนผิวของ Nitrocellulose membrane

ในการทดลองนี้ สารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ BSA, Polyethylene glycol (PEG) และ Casein ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1, 2 และ 3 % และแถบตรวจคัดกรองที่ไม่ได้ Block พื้นผิว โดยได้ทดลองในสภาวะของแถบตรวจคัดกรองเหมือนกันและทำการทดสอบโดยใช้ Phosphate buffer, pH 7.4 แทนสิ่งส่งตรวจที่มีความเข้มข้น HAS 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าแถบตรวจที่ไม่ได้ Block บนผิวของ Nitrocellulose พบว่าการไหลของสิ่งตัวอย่างได้ดี แต่พบว่ามีเกิด Background สีชมพูบนผิวของ membrane ซึ่งมีผลต่อการอ่านผลการทดสอบได้ เมื่อใช้ PEG เป็นสาร Block บนผิวของ Nitrocellulose membrane พบว่าทุกความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้ทดสอบ มีผลรบกวนการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เนื่องจาก PEG มีลักษณะโครงสร้างขนาดใหญ่เมื่อใช้ในการ Block จึงขัดขวางการไหลของสิ่งส่งตรวจ เมื่อใช้ Casein เป็นสาร Block บนผิวของ Nitrocellulose membrane พบว่า Casein ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการไหลของสิ่งส่งตรวจผ่านแถบตรวจคัดกรองนี้ โดยใช้

เวลานานกว่า 20 นาที ซึ่งโดยปกติใช้เวลาในการไหลผ่านของสิ่งตัวอย่างผ่านชุดตรวจคัดกรองประมาณ 3-5 นาที และการใช้ casein ทำให้เกิด Background สีชมพูบนผิวของ membrane ซึ่งมีผลต่อการอ่านผลการทดสอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ BSA ความเข้มข้นต่างๆ ทำหน้าที่ block ผิวของ Nitrocellulose membrane พบว่าเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่เกิดขึ้น มีความคมชัดของเส้นเท่ากัน แต่ใช้เวลาในการทดสอบแตกต่างกัน และสัมพันธ์ตามความเข้มข้นของ BSA ที่ใช้ โดยความเข้มข้น 1% BSA ใช้เวลาน้อยที่สุด ดังนั้นในการทดสอบหาชนิดของสารที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการ Block บนผิวของ Nitrocellulose membrane ในงานวิจัยนี้คือ 1% BSA

		ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการ Block บนผิวของ Nitrocellulose membrane		
		1%	2%	3%
Non-block		T C		
				
				
				
BSA		T C	T C	T C
				
PEG		T C	T C	T C
				

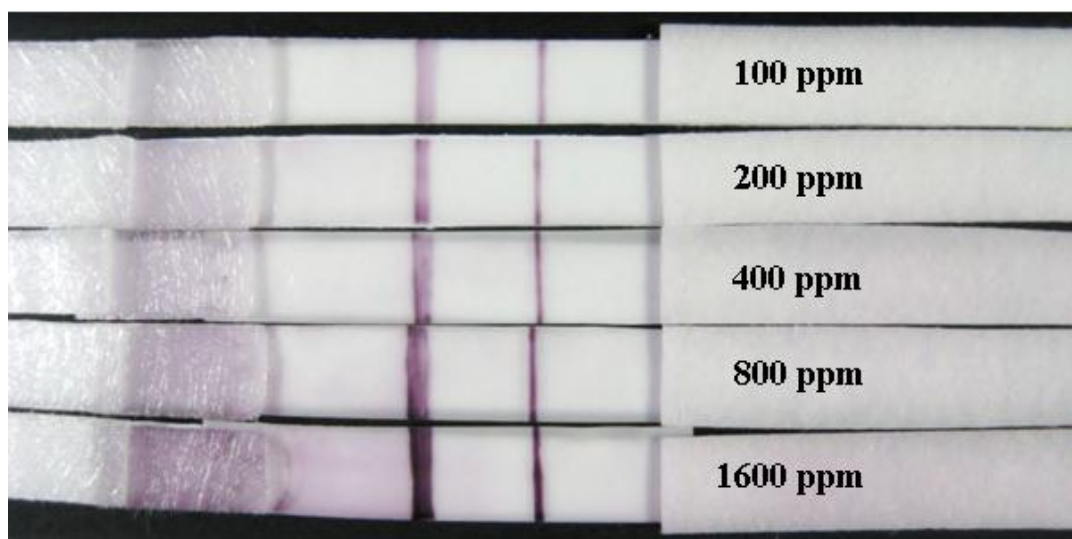


รูปที่ 4. 10 แสดงคุณภาพของชุดทดสอบ เมื่อใช้สารแต่ละชนิดทำหน้าที่ปกปิดผิวบน nitrocellulose membrane

4.2.4.2 ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสำหรับชุดทดสอบ

การทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรึงโมโนโคลนัลแอนติบอดี สังเกตจากความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่เกิดขึ้นโดยความเข้มข้นโดยความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้น 100, 200, 400, 800 และ 1600 ppm ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 โดยได้ทดสอบกับ Phosphate buffer, pH 7.4 (HSA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยสังเกตจากความเข้มของสีเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่เกิดขึ้น เมื่อใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 400, 800 และ 1600 ppm พบว่า ที่บริเวณพื้นผิวของแผ่น detection pad มีสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนหลงเหลือเมื่อสิ้นปฏิกิริยา หรือมี Background สูง ส่วนที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ไม่พบสารละลายอนุภาคทองคำระดับนาโนหลงเหลืออยู่บนพื้นผิว detection pad หรือมี Background ต่ำ และความเข้มของสีเส้นทดสอบและเส้นควบคุมที่มีความชัดเจนเมื่อมองด้วยตาเปล่า อย่างไรก็ตามเมื่ออ่านค่าความเข้มสีเส้นทดสอบและเส้นควบคุมด้วยโปรแกรม Image J และวิเคราะห์ค่า Peak area พบว่าเมื่อใช้อนุภาคทองคำระดับนาโน 100 และ 200 ppm ให้ความเข้มสี ที่เส้นทดสอบและเส้นควบคุมใกล้เคียงกัน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุน ชุดตรวจสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้คือ 100 ppm โดยใน Preliminary results ได้ทำการทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ppm พบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรระหว่าง 12.5 -50 ppm ไม่เหมาะสม มีปริมาณน้อยเกินไป ไม่สามารถอ่านผลการทดสอบความเข้มสีของเส้นทดสอบได้ ดังแสดงในรูปที่ ก.1 ภาคผนวก ก

T C



รูปที่ 4. 11 ผลของปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ตรงกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อคุณภาพของชุดทดสอบ

4.2.4.3 ปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมสำหรับชุดทดสอบ

การทดสอบหาปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม โดยได้ทดลองใช้สิ่งส่งตรวจปริมาตรต่างๆ หยดลงบน sample pad ตั้งแต่ 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 ไมโครลิตร โดยใช้ Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 100-110 ไมโครลิตร เนื่องจากจากการวัดความเข้มข้นที่บริเวณเส้นทดสอบมีค่าสูง แสดงถึงการจับกันระหว่างอัลบูมินที่ตรงตรงตำแหน่งเส้นทดสอบกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ได้อย่างเหมาะสม กรณีใช้สิ่งส่งตรวจปริมาตร 50-90 ไมโครลิตร พบว่าเป็นปริมาณที่น้อยเกินไป ส่งผลให้การจับกันระหว่าง HSA ตรึงอยู่บนเส้นทดสอบกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี ตรึงอยู่บนอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้ไม่เหมาะสม มีอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีเหลืออยู่ทำให้การอ่านค่าความเข้มข้นที่เส้นทดสอบได้ค่าต่ำ ปริมาณของสิ่งส่งตรวจ 120 ไมโครลิตร พบว่าเมื่อหยดสิ่งส่งตรวจปริมาณของสิ่งส่งตรวจล้นจาก sample pad จนมาถึงบริเวณ detection pad ส่งผลให้ความเข้มข้นที่เส้นทดสอบได้ค่าความเข้มข้นต่ำ เนื่องการไหลของสิ่งตัวอย่างล้นผ่านบริเวณ conjugate pad ทำให้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีการตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับ HSA ที่ตรึงอยู่บนเส้นทดสอบ ดังรูปที่ 4.12

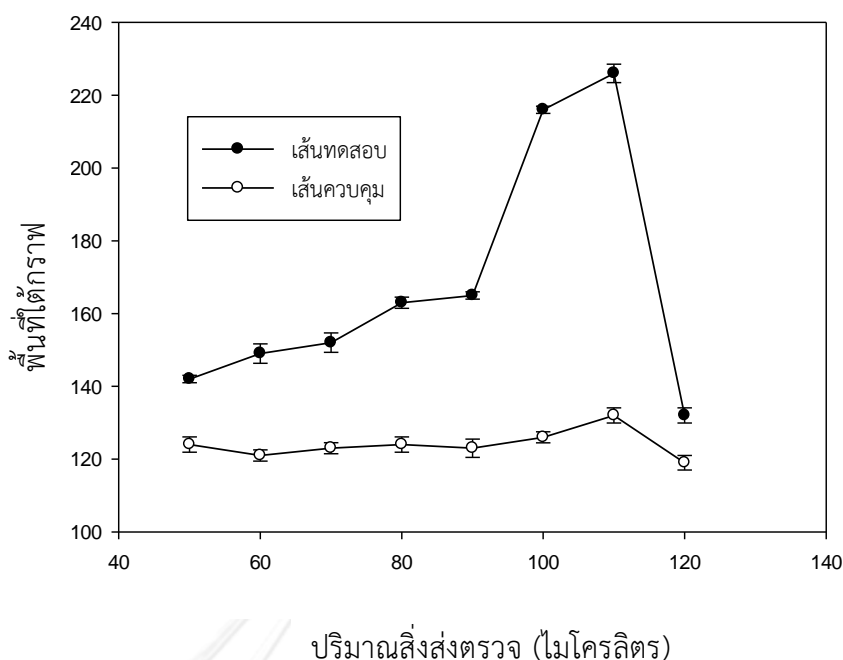


รูปที่ 4. 12 ผลของปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ใช้หยดลงบน sample pad ต่อความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

เมื่ออ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J ทดสอบหาพื้นที่ใต้กราฟบริเวณเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังกราฟรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.3 โดยความเข้มสีเส้นทดสอบ จะมีความเข้มสีสูงที่สุดที่ปริมาณสิ่งส่งตรวจ 110 ไมโครลิตร ดังนั้นปริมาณของส่งตรวจที่เหมาะสม โดยจะหยดสิ่งส่งตรวจลงบน sample pad คือ 110 ไมโครลิตร

ตารางที่ 4. 3 แสดงผลของปริมาณสิ่งส่งตรวจที่ใช้หยดลงบน sample pad ต่อความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม

ปริมาณสิ่งส่งตรวจ (ไมโครลิตร)	Intensity of peak area	
	แถบทดสอบ	แถบควบคุม
50	142	124
60	149	121
70	152	123
80	163	124
90	165	123
100	216	126
110	226	132
120	134	119




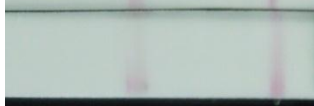
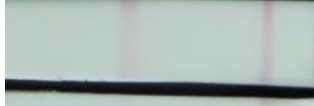

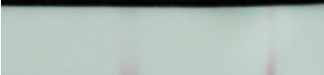
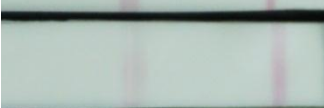
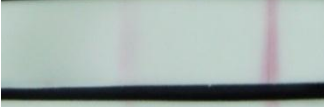

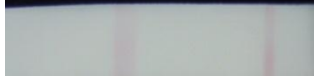
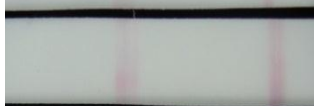


รูปที่ 4. 13 แสดงการทดสอบหาปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม ที่ใช้หยดลงบน sample pad : 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 ไมโครลิตร โดยวัดความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมด้วยโปรแกรม Image J

4.2.4.4 ผลการทดสอบความเข้มของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมบน

Nitrocellulose membrane

การทดสอบความเข้มของเส้นทดสอบ ได้ทดลองทดสอบโดยตรึงอัลบูมินความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ โดยที่เส้นควบคุมใช้ความเข้มข้นของทุติยภูมิแอนติบอดี คงที่ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า เมื่อวัดความเข้มสีของทั้งเส้นทดสอบและเส้นควบคุมจากการหาพื้นที่ได้กราฟด้วยโปรแกรม Image J พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อตรึงเส้นทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของอัลบูมินเพิ่มขึ้น พบว่ามีปัญหาเกี่ยวกับการไหลของส่งส่งตรวจช้าลง ทำให้ใช้เวลาเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 3-5 นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ใช้ตรึงในปริมาณที่ต่ำเพื่อจะได้มีความรวดเร็วในการทดสอบ ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ความเข้มข้นของ HSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรึงตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4. 4 แสดงการทดสอบความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรงตำแหน่งเส้นทดสอบ

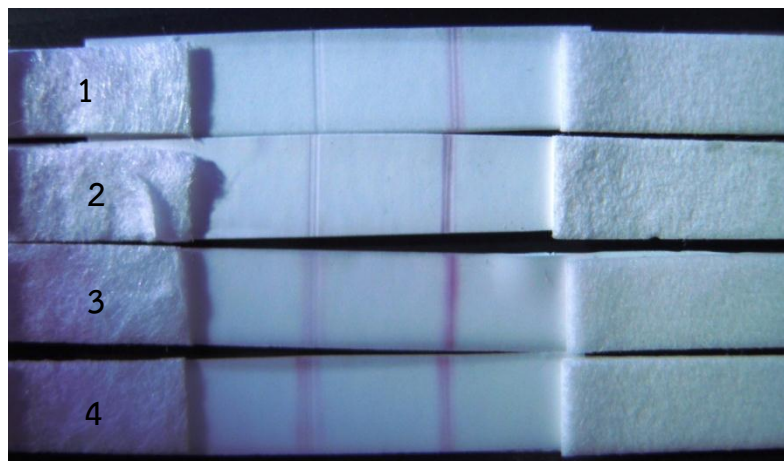
ความเข้มข้น (mg/ml)	ภาพแถบตรวจ	เส้นทดสอบ	เส้นควบคุม	เวลาที่ใช้ ทดสอบ โดยประมาณ (นาที)
	T C			
0.5		178	215	2
1		174	214	3
2		178	217	6
4		171	196	8
0.5		174	254	2
1		173	244	3
2		172	234	6
4		169	194	8
0.5		170	222	2
1		172	225	3
2		176	222	6
4		172	228	8

4.2.5 คุณสมบัติของชุดตรวจคัดกรองที่พัฒนาได้

4.2.5.1 ค่า cut off ในชุดตรวจ MAU ที่พัฒนาขึ้น

การทดสอบหาค่า cut off ของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น ได้รับความอนุเคราะห์อัลบูมินมาตรฐาน จากบริษัท External Quality Assessment Program in Serum Clinical Chemistry ที่มีปริมาณ HSA ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ น้อยกว่า 20, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากงานวิจัยนี้ ค่า Cut off ของแถบตรวจกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่ต้องการคือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นถ้าสิ่งตัวอย่างมีปริมาณไมโครอัลบูมินน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะรายงานผลการตรวจเป็นลบ โดยเส้นสีแดงจะปรากฏให้เห็นในตำแหน่งเส้นทดสอบ ถ้าในตัวอย่างมีระดับไมโครอัลบูมินมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร รายงานผลเป็นบวก โดยจะไม่ปรากฏเส้นสีแดงบนตำแหน่งเส้นทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนานี้ สามารถตรวจวัดอัลบูมินความเข้มข้นต่ำสุดได้ในช่วง 20-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ โดยถ้าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่ขึ้นเส้นสีแดงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ และถ้าความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เส้นสีแดงจะปรากฏให้เห็นในตำแหน่งเส้นทดสอบด้วย อย่างไรก็ตาม ควรจะต้องมีการทดสอบกับสารละลายอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้น 20.1-49.9 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อจะได้ทราบค่า cut off ที่แท้จริง แต่ในงานวิจัยนี้เนื่องจากไม่สามารถจัดหาสารละลายอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้นดังกล่าวได้ จากผลการตรวจสิ่งตัวอย่างปัสสาวะจริงจำนวน 100 ราย พบว่ามี 7 ตัวอย่าง มีความเข้มข้นอัลบูมินอยู่ในช่วงระหว่าง 21-49 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อวิเคราะห์โดยแถบทดสอบที่พัฒนาในงานวิจัยนี้เป็นผลลบปลอมจำนวน 1 ราย (ค่าอัลบูมิน 29.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตารางที่ ก.7 ตัวอย่างที่ 2 ตามลำดับ) และเป็นผลบวกจริง 6 ราย (ค่าอัลบูมิน 29.5, 29.4, 25.5, 23.5, 36.5 และ 48.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตารางที่ ก.7 ตัวอย่างที่ 7, 76, 81, 87, 90 และ 95 ตามลำดับ) ดังนั้นแถบตรวจไมโครอัลบูมินที่พัฒนาสามารถวัดค่าผลบวกได้จนถึงอัลบูมิน 23.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

T C



รูปที่ 4. 14 แสดงการทดสอบหา cut off โดยใช้ MAU EQA ที่มีปริมาณ HSA ความเข้มข้นต่างๆ ชุดตรวจ 1-4 ทดสอบกับสารตัวอย่างมาตรฐานความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Strip 1 และ 2 ขึ้นเส้นสีแดง 1 เส้น เฉพาะที่เส้นควบคุม; Strip 3 และ 4 ขึ้นเส้นสีแดง 2 เส้น ทั้งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม)

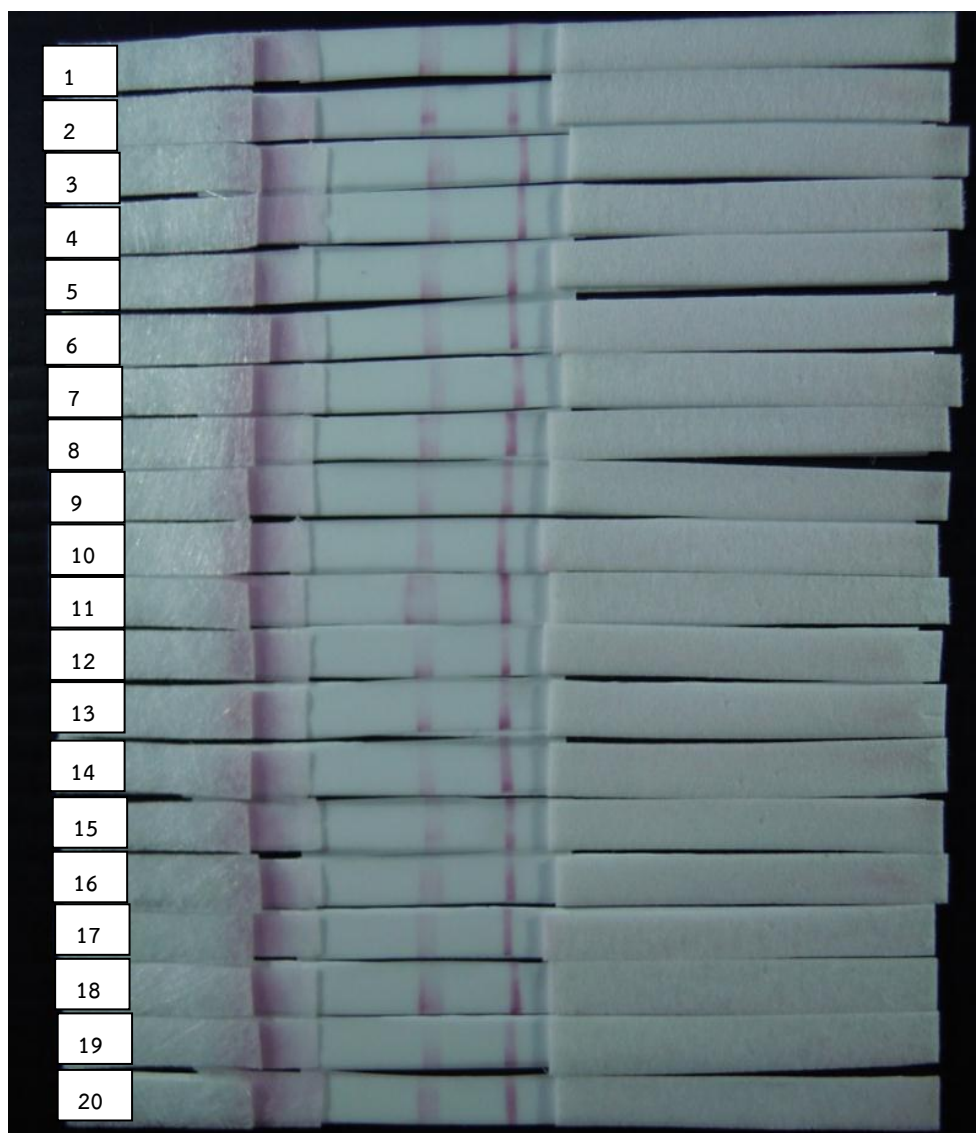
4.2.5.2 ทดสอบหาความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำของชุดตรวจคัดกรอง MAU ที่ผลิตขึ้น ศึกษาโดยนำมาทดสอบกับ สารละลายอัลบูมินมาตรฐาน (MAU EQA) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 2 ระดับ คือ คือ negative ใช้ 0.01M Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ Positive (ไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยการทดสอบทั้งภายใน 1 วัน (Within day) จำนวน 20 ครั้งและทดสอบระหว่างวัน (Between day) เป็นเวลา 20 วัน

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 การทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day precision) จำนวน 20 ครั้ง เมื่อใช้ MAU EQA ความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดความเข้มสีบนเส้นทดสอบและเส้นควบคุมโดยใช้โปรแกรม image J ผลที่ได้ค่าความแปรปรวน (%CV) 1.8 และ 3.9% สำหรับความเข้มสีของเส้นทดสอบและเส้นควบคุมตามลำดับ (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.3)

แถบตรวจที่

T C



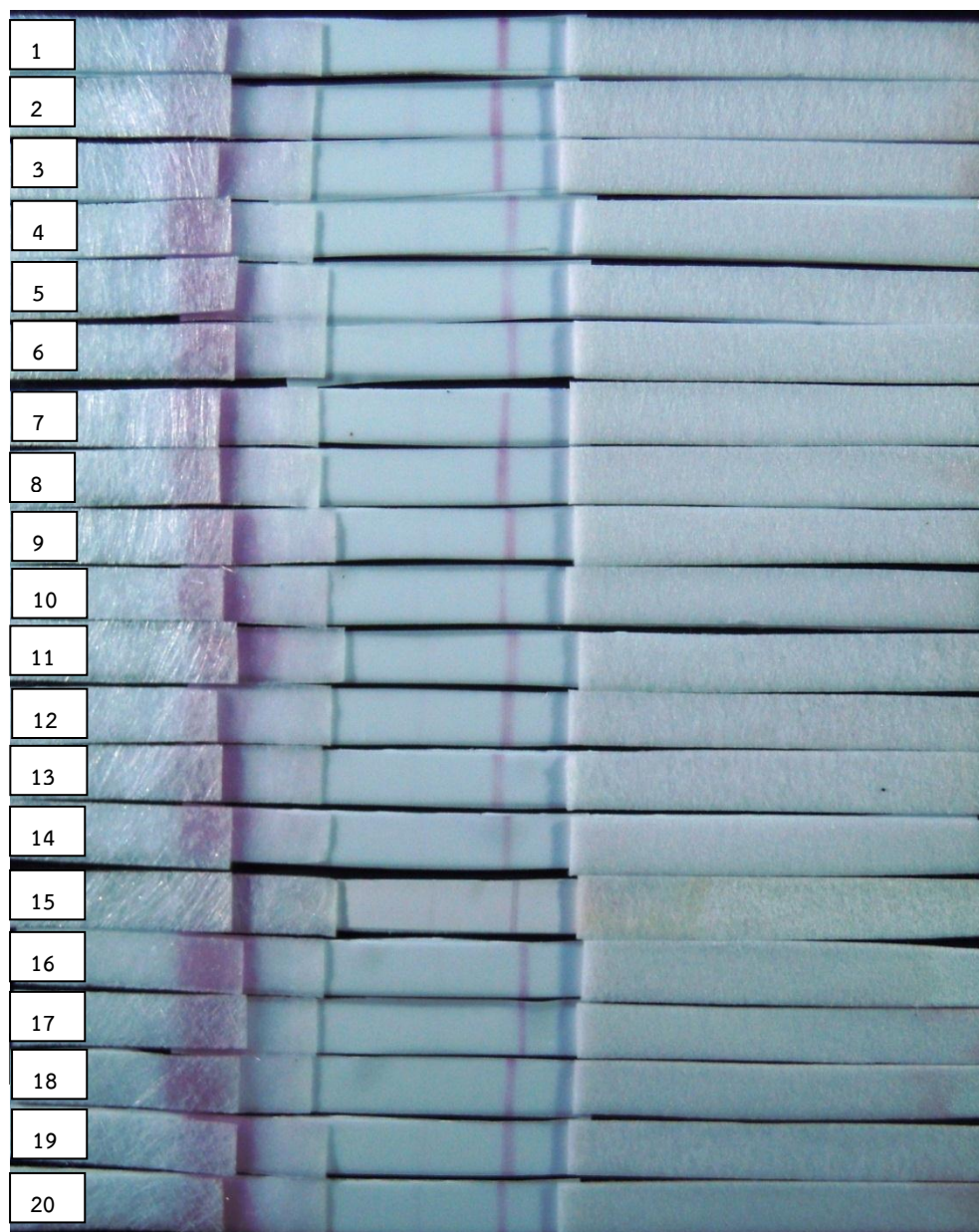
รูปที่ 4. 15 แสดงแถบตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ ความ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แทนไมโครอัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ

จากการทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day) จำนวน 20 ครั้งโดยใช้ MAU (รูปที่ 4.16) EQA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดความเข้มสีเส้นควบคุมโดยใช้ โปรแกรม image J ค่าที่ได้ตามตารางที่ 4.7 ผลที่ได้ค่าความแปรปรวน (%CV) ของเส้นควบคุมคือ 4.7% (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.4

)

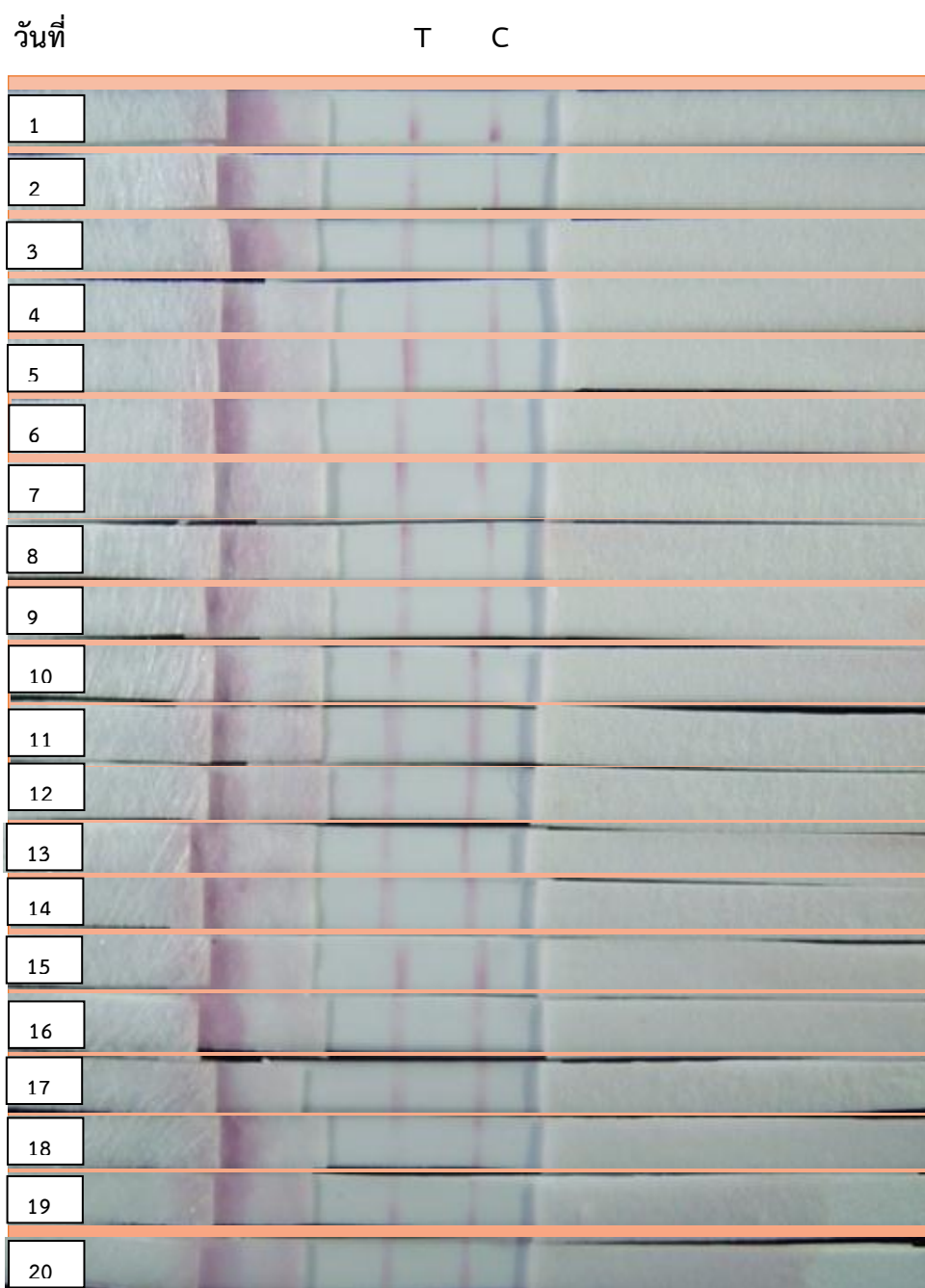
แถบตรวจที่

T C



รูปที่ 4. 16 แสดงชุดตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ

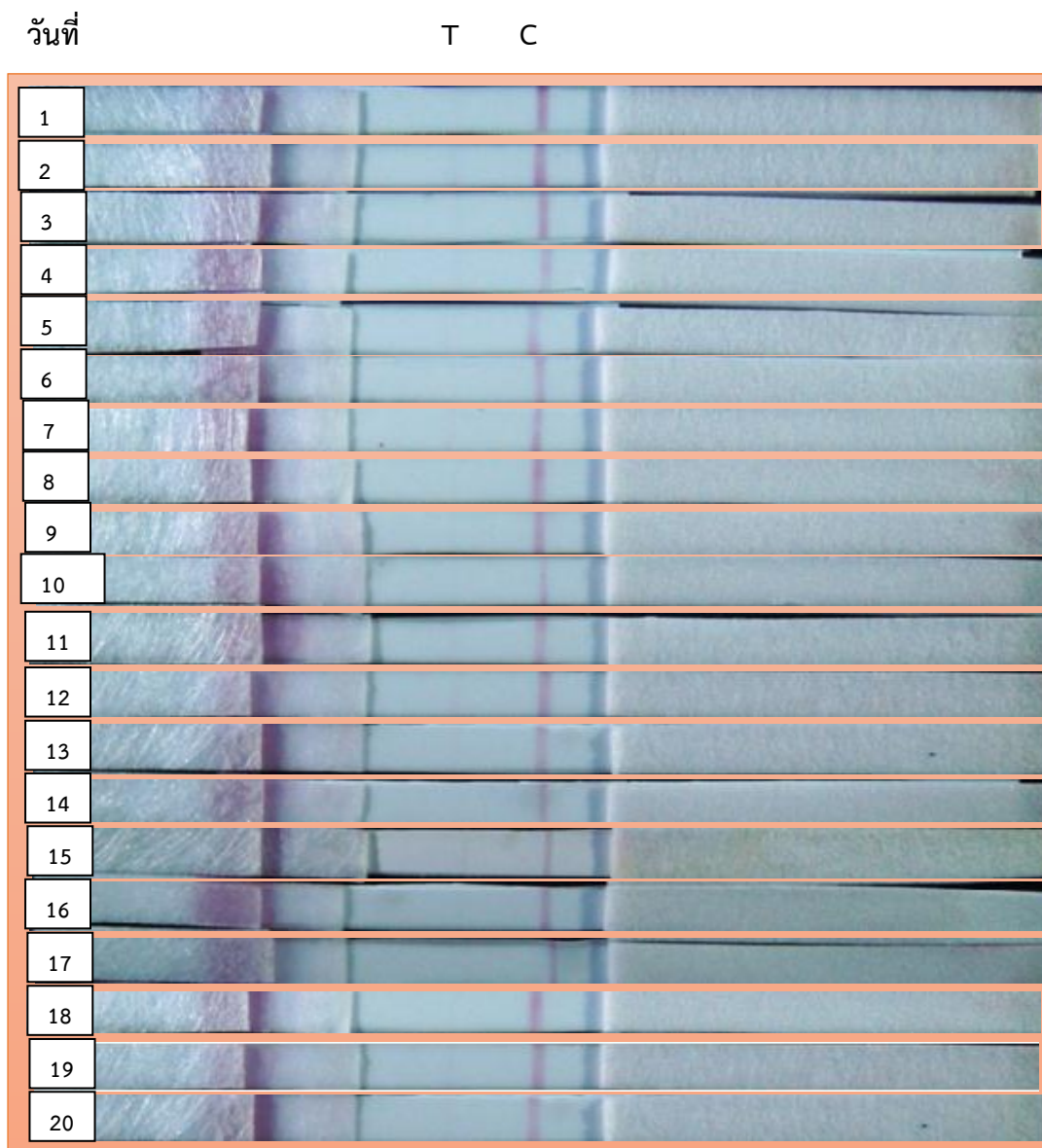
จากการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between in day) จำนวน 20 วันโดยใช้ MAU (รูปที่ 4.17) EQA ความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดความเข้มสีเส้นทดสอบและเส้นควบคุมโดยใช้โปรแกรม image J ผลที่ได้ค่าความแปรปรวน (%CV) 2.7% และ 7.2 % ตามลำดับ (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.5)



รูปที่ 4. 17 แสดงแถบตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between day) จำนวน 20 วัน โดยใช้ความ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 แทนไมโครอัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ

จากการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between day) จำนวน 20 วันโดยใช้ MAU (รูปที่ 4.18) EQA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดความเข้มสีเส้นทดสอบและเส้น

ควบคุมโดยใช้โปรแกรม image J ผลที่ได้ค่าความแปรปรวน (%CV) 3.8% (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.6)



รูปที่ 4. 18 แสดงชุดตรวจ MAU ทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between day) จำนวน 20 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ

4.2.6 ผลการนำแถบตรวจกรองที่พัฒนาได้ไปตรวจในปัสสาวะผู้ป่วยเบาหวาน

ได้มีการประเมินประสิทธิภาพของแถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้น กับวิธีอิมมูโนเทอปีไดเมทรี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไป โดยใช้เป็นวิธี

อ้างอิงสำหรับงานวิจัยนี้ โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 100 ราย (n = 100) ที่มีระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะแตกต่างกัน โดยใช้ปัสสาวะเหลือจากการตรวจในห้องปฏิบัติการ และทำการตรวจโดยใช้ชุดตรวจกรองนี้ภายในวันเดียวกัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ ก.8 (ภาคผนวก ก) พบว่าค่าความไวของชุดตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในงานวิจัยนี้เป็น 96% มีความจำเพาะ 100 % และมีความถูกต้อง 99 % ค่าทำนายผลบวก 100% ค่าทำนายผลลบ 98% ตามตารางที่ 4.5 ในขณะที่ชุดตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของ Micral test® ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics ใช้หลักการ semi-quantitative มีความไว 90% และความจำเพาะ 87% (6) นอกจากนี้ในงานวิจัยการพัฒนาชุดตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะของ Kobra Omidfar และคณะ มีความไว 92% และความจำเพาะ 83% ค่าทำนายผลบวก 100% ค่าทำนายผลลบ 83% (38) ดังนั้นชุดตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ถือว่ามีที่น่าเชื่อถือ สามารถใช้งานง่าย สะดวก เหมาะสมที่จะนำตรวจในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีอุปกรณ์หรือห้องปฏิบัติการเช่นในชนบทของประเทศกำลังพัฒนาสามารถใช้ตรวจคัดกรองเบื้องต้นในผู้ที่ เป็นเบาหวานก่อนใช้วิธีการยืนยันอื่นๆต่อไป

ตารางที่ 4. 5 แสดงผลแถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธี immunoturbidimetry

		Immunoturbidimetric method	
		ผลบวก (ราย)	ผลลบ (ราย)
Developed MAU test strip	ผลบวก (ราย)	30 (TP)	0 (FP)
	ผลลบ (ราย)	1 (FN)	69 (TN)

หมายเหตุ : True positive (TP): ผลบวกจริง, False positive (FP): ผลลบปลอม,

True negative (TN): ผลลบจริง, False negative (FN): ผลลบปลอม

ความไว (Sensitivity) = $TP/TP+FN = (30/30+1) \times 100 = 96\%$

ความจำเพาะ (Specificity) = $TN/TN+FP = (69/69+0) \times 100 = 100\%$

ความถูกต้อง (Accuracy) = $TP+TN/TP+TN+FP+FN = (30+69/30+69+0+1) \times 100 = 99\%$

ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) = $TP/TP+FP = (30/30+0) \times 100 = 100\%$

ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) = $TN / TN + FN = (69/69+1) \times 100 = 98\%$

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอการผลิตแถบตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยใช้หลักการอิมมูโนโครมาโทกราฟีแบบแย่งจับ เป็นวิธีการตรวจหาอัลบูมินในปัสสาวะ โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีอย่างจำเพาะ เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ วัดปฏิกิริยาได้จากการติดฉลากด้วย Gold nanoparticles เกิดเป็นเส้นสีแดงขึ้น ในงานวิจัยนี้ ใช้หลักการแย่งจับ (Competitive method) คือ อัลบูมินในปัสสาวะกับอัลบูมินที่ตรึงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบจะแย่งจับกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ตรึงบนผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยรายงานผลการตรวจในเชิงคุณภาพ (qualitative assay) ว่ามีระดับไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างสูงหรือต่ำกว่าค่า cut-off

ในงานวิจัยนี้ได้นำเซลล์ไฮบริโดมาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ human serum albumin โคลน 4/B11/G3/H11/G11 ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่ และทำให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้คอลัมน์โพรตีนจี (Protein G) โมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 3.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังทำให้บริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 2.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนสายยาว (heavy chain) และสายสั้น (light chain) ประมาณ 50 และ 25 กิโลดัลตัน ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE

โมโนโคลนัลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ได้นำมาใช้ในแถบตรวจ โดยตรงกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้จากการสังเคราะห์ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เมื่อถ่ายภาพจากกล้อง TEM ได้รูปร่างทรงกลม ขนาดประมาณ 24 นาโนเมตร และเมื่อศึกษาขนาดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ขนาดที่ได้ประมาณ 24.5 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้นี้ ซึ่งมีรูปร่างทรงกลมแต่ยังมีขนาดไม่สม่ำเสมอ อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่จำเป็นต้องมีการกวนสารละลายด้วยความเร็วคงที่ ตลอดระยะเวลาในการสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ขนาดที่สม่ำเสมอ

แถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ประกอบด้วย 4 ส่วน ดังนี้ sample pad, conjugate pad, detection pad และ adsorbent pad โดยส่วนที่แสดงผลการทดสอบคือ ส่วน detection pad ประกอบด้วยเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ซึ่งต้องเป็นเส้นที่มีความคมชัดและรูปร่างที่แน่นอน เมื่อทดสอบความความแม่นยำให้ค่าความแปรปรวนในช่วง 1.8-7.2% ซึ่งมีค่าค่อนข้างกว้าง อาจเนื่องมาจาก ในการวิจัยนี้ ไม่ได้ทำการขีดเส้นทดสอบและเส้นควบคุมด้วยเครื่องจักรอัตโนมัติ แต่ได้ขีดเส้นทั้งสองด้วย ปลายของpipett tip ขนาด 1 μ l ด้วยมือ จึงทำให้ขนาดของเส้นยัง

ไม่คมชัดและแม่นยำในการขีดแต่ละครั้ง ทำให้มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยนี้สามารถต่อยอดเชิงพาณิชย์ในอนาคตได้ โดยใช้เครื่องมือสร้างเส้นทดสอบและเส้นควบคุมแบบอัตโนมัติ เช่น การใช้เครื่องพ่นสาร เช่น Airjet AJQ 3000 dispenser หรือ Biojet BJQ 3000 ซึ่งสามารถช่วยในการกำหนดปริมาณในการพ่นสารลงบน membrane ในระดับไมโครลิตรได้อย่างแม่นยำ ก็จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของแถบทดสอบนี้ ทำให้มีความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์มากขึ้น

การทดสอบหาค่า cut off ของแถบทดสอบที่พัฒนาขึ้น ได้ใช้อัลบูมินมาตรฐาน ที่มีปริมาณ human serum albumin ความเข้มข้น 0, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากงานวิจัยนี้ ค่า cut off ของแถบตรวจกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่ต้องการคือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้าสิ่งตัวอย่างมีปริมาณไมโครอัลบูมิน น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 $\mu\text{g/ml}$ จะรายงานผลการตรวจเป็นลบ (negative) โดยเส้นสีแดงจะปรากฏให้เห็นในตำแหน่งเส้นทดสอบ (test line) ถ้าในตัวอย่างมีระดับไมโครอัลบูมินมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็นบวก (positive) โดยจะไม่ปรากฏเส้นสีแดงบนตำแหน่งเส้นทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีที่พัฒนานี้ สามารถใช้ตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะที่มีความเข้มข้นต่ำสุดได้ในช่วง 20-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ โดยถ้าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่ขึ้นเส้นสีแดงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ และถ้าความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นสีแดงจะปรากฏให้เห็นในตำแหน่งเส้นทดสอบด้วย ค่า Cut off ที่แท้จริงของแถบทดสอบนี้ จะต้องมีการทดสอบกับสารละลายอัลบูมินมาตรฐานความเข้มข้นอื่นๆ ต่อไป โดยเมื่อพิจารณาจากผลการตรวจด้วยแถบตรวจในงานวิจัยนี้กับผลการตรวจที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ค่า Cut off ของแถบทดสอบนี้ประมาณ 23.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้น เมื่อได้ประเมินประสิทธิภาพผลการตรวจเทียบกับ กับวิธีอิมมูโนเทอปีไดมิทรี ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไป โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 100 ราย พบว่ามีความไว 96% มีความจำเพาะ 100 % และมีความถูกต้อง 99 % ค่าทำนายผลบวก 100% ค่าทำนายผลลบ 98% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจเชิงกึ่งปริมาณ (semi quantitative) ที่เป็นที่ยอมรับในห้องปฏิบัติการ เช่น Micral-test ผลิตโดยบริษัท Roche Diagnostics ซึ่งมีความไว 90.1% มีความจำเพาะ 87.2 % ค่าทำนายผลบวก 82% ค่าทำนายผลลบ 93% จะเห็นได้ว่าวิธีที่นำเสนอมีความไวและความจำเพาะที่ดีกว่า แสดงให้เห็นว่าแถบตรวจกรองที่พัฒนาในงานวิจัยนี้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ต่อไป

แถบตรวจคัดกรองไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟีในงานวิจัยนี้ มีข้อดีคือใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่สามารถผลิตได้เองในกลุ่มผู้วิจัย ทำให้ลดต้นทุนค่าใช้จ่ายใน

การผลิตแถบทดสอบได้อย่างมาก เนื่องจากไม่จำเป็นต้องนำเข้าแอนติบอดีต่ออัลบูมินซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้งานง่าย ใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจน้อย ผลการตรวจที่ได้รวดเร็ว เป็นที่ยอมรับได้ มีความไว ความจำเพาะ และความคงตัวสูง จึงมีศักยภาพนำไปใช้ตรวจกรองในผู้ป่วยเบาหวานจำนวนมากได้ ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความจำเป็นต้องเข้ารับการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเป็นประจำอย่างน้อย 1 ครั้งต่อปี เพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นทางไตได้ในระยะแรก ซึ่งการตรวจพบการบ่งชี้ของการทำงานของไตในระยะเริ่มแรกนั้น ย่อมส่งผลดีต่อการรักษาพยาธิสภาพของไตให้กลับสู่ภาวะปกติได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

1. Hillege HL, Janssen W, Bak A, Diercks G, Grobbee D, Crijns H, et al. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *Journal of Internal Medicine*. 2001;249(6):519-26.
2. Sarafidis PA, Bakris GL. Microalbuminuria and chronic kidney disease as risk factors for cardiovascular disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(9):2366-74.
3. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*. 2005;28(1):164-76.
4. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*. 2002;48(3):436-72.
5. de Jong PE, Gansevoort RT. Focus on microalbuminuria to improve cardiac and renal protection. *Nephron Clinical Practice*. 2009;111(3):c204-c11.
6. Hasslacher C. Clinical significance of microalbuminuria and evaluation of the Micral-Test. *Clinical Biochemistry*. 1993;26(4):283-7.
7. Busby DE, Bakris GL. Comparison of commonly used assays for the detection of microalbuminuria. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2004;6(s11):8-12.
8. Comper WD, Jerums G, Osicka TM. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(2):105-11.
9. Giampietro O, Penno G, Clerico A, Cruschelli L, Lucchetti A, Nannipieri M, et al. Which method for quantifying “microalbuminuria” in diabetics? *Acta Diabetologica*. 1992;28(3-4):239-45.
10. Liu R, Li G, Cui XF, Zhang DL, Yang QH, Mu XY, et al. Methodological evaluation and comparison of five urinary albumin measurements. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2011;25(5):324-9.
11. Roberts WL, Calcote CB, Cook CB, Gordon DL, Moore ML, Moore S, et al. Comparison of four commercial urinary albumin (microalbumin) methods: implications for detecting diabetic nephropathy using random urine specimens. *Clinica Chimica Acta*. 1998;273(1):21-33.
12. Toto RD. Microalbuminuria: definition, detection, and clinical significance. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2004;6(s11):2-7.

13. สำนักพัฒนาวิชาการแพทย์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเวชปฏิบัติการคัดกรองและการดูแลรักษาจอประสาทตามืดปกติจากเบาหวานและแนวทางการวินิจฉัยการป้องกันและรักษาโรคไตจากเบาหวาน. 2548.
14. สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน. 2554.
15. วุฒิศักดิ์ โอภาสเจริญสุข. โรคไตจากเบาหวาน. โรคไต กลไก พยาธิสรีรวิทยา การรักษา / บรรณาธิการ สมชาย เอี่ยมอ่อง 2550. p. 1013-74.
16. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME, editors. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology*; 2007: Elsevier.
17. Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiology*. 2007;106(2):p26-p31.
18. Contois JH, Hartigan C, Rao LV, Snyder LM, Thompson MJ. Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin. *Clinica Chimica Acta*. 2006;367(1):150-5.
19. Derhaschnig U, Kittler H, Woisetschlager C, Bur A, Herkner H, Hirschl MM. Microalbumin measurement alone or calculation of the albumin/creatinine ratio for the screening of hypertension patients *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2002;17(1):81-5.
20. Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G. Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria. *Kidney International*. 2003;63(6):2254-61.
21. Giampietro O, Miccoli R, Clerico A, di Palma L, Bertolotto A, Anichini R, et al. Urinary albumin excretion in normal subjects and in diabetic patients measured by a radioimmunoassay: methodological and clinical aspects. *Clinical Biochemistry*. 1988;21(1):63-8.
22. Ng L, Teng L, Ng M, Sazali B, Khalid B. Microalbuminuria measurements by two in-house ELISA methods. *Malaysian Journal Of Pathology*. 2000;22(2):73-8.
23. Torffvit O, Wieslander J. A simplified enzyme-linked immunosorbent assay for urinary albumin. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 1986;46(6):545-8.
24. Wu T-L, Chang P-Y, Li C-C, Tsao K-C, Sun C-F, Wu JT. Microplate ELISA for urine microalbumin: reference values and results in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2005;35(2):149-54.

25. Rumley A. Urine dipstick testing: comparison of results obtained by visual reading and with the Bayer CLINITEK 50. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2000;37(2):220-1.
26. Lateral-flow: test components. [cited online]; Available from: <http://www.rapid-diagnostics.org/tech-lateral-components.htm>. (2014,February 25).
27. Raphael C.Wong HYT. *Lateral Flow Immunoassay*. Springer.
28. Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*. 2004;104(1):293-346.
29. Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008;391(3):943-50.
30. Kim D-J, Kim K-S. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron*. 2011;42(3):207-27.
31. Chandler J, Gurmin T, Robinson N. The place of gold in rapid tests. *IVD Technology*. 2000;6(2):37-49.
32. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*. 1973;241(105):20-2.
33. Leuvering JH, Thal PJ, Van der Waart M, Schuurs AH. A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin. *Journal of Immunological Methods*. 1981;45(2):183-94.
34. Brada D, Roth J. "Golden blot"—Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes. *Analytical Biochemistry*. 1984;142(1):79-83.
35. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
36. การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis of protein). [updated Online]; Available from: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=20. (2014,February 25).
37. Polyacrylamide gel electrophoresis. [updated 4 February 2014]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis. (2014,February 25).

38. Omidfar K, Kia S, Kashanian S, Paknejad M, Besharatie A, Kashanian S, et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;160(3):843-55.
39. Zhang G, Guo J, Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests. *Methods Molclar Biology*. 2009;504:169-83.
40. Evolution™ 300 UV-Vis Spectrophotometer [updated online; cited online]; Available from: <http://www.thermoscientific.com/en/product/evolution-300-uv-vis-spectrophotometer-1.html>. (2014,February 25).
41. Thobhani S, Attree S, Boyd R, Kumarswami N, Noble J, Szymanski M, et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *Journal of Immunological Methods*. 2010;356(1):60-9.
42. Wang S, Zhang C, Zhang Y. Lateral flow colloidal gold—based immunoassay for pesticide. *Methods Mo1 Bio1: Biosensors and Biodetection*. 2009;504:237-52.
43. Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, Zhou J, Chu F. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;99(2):185-94.
44. Rajak P, Vijayalakshmi M, Jayaprakash N. Production and characterization of monoclonal antibodies (mAbs) against human serum albumin (HSA) for the development of an immunoaffinity system with oriented anti-HSA mAbs as immobilized ligand. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;78:154-60.
45. Zhang G, Guo J, Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests. *Biosensors and Biodetection: Springer*; 2009. p. 169-83.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

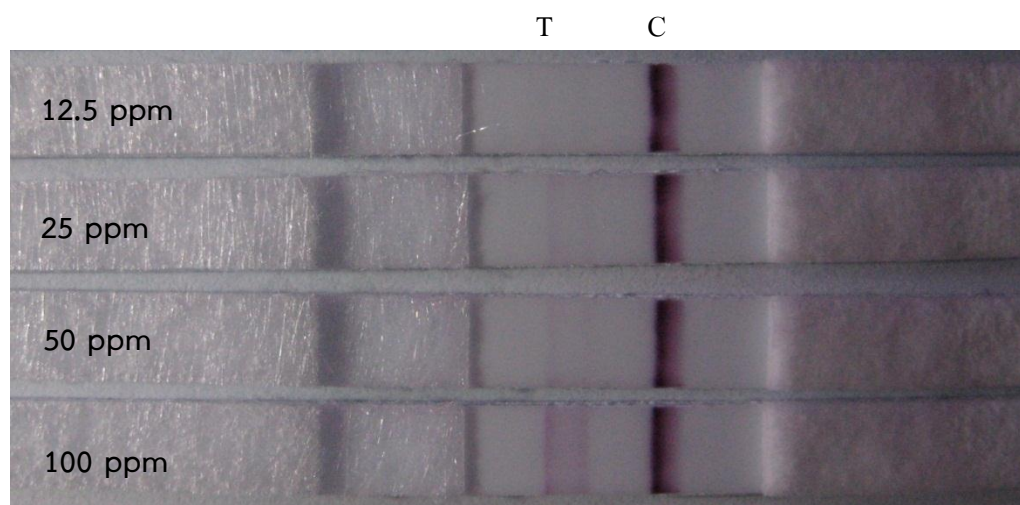
ตารางที่ ก. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในแต่ละแฟรคชันจาก affinity chromatography ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

Fraction (1:10000)	ELISA		Fraction (1:10000)	ELISA	
	A280	A492		A280	A492
1	0.074	0.085	16	0.128	-
2	0.076	-	17	0.111	-
3	0.121	0.105	18	0.099	0.157
4	0.082	-	19	0.091	-
5	0.215	0.22	20	0.085	-
6	0.909	-	21	0.078	0.09
7	2.248	2.12	22	0.074	-
8	2.265	2.44	23	0.073	-
9	1.493	1.35	24	0.068	0.053
10	0.794	-	25	0.099	-
11	0.525	-	26	0.069	-
12	0.353	-	27	0.069	0.052
13	0.25	-	28	0.071	-
14	0.192	-	29	0.067	-
15	0.158	0.253	30	0.065	-

ตารางที่ ก. 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร

ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง		
	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี และจับกับหุติยภูมิแอนติบอดี (IgG)
200	2.586	2.817	6.000
210	1.990	2.352	6.000
220	1.718	2.164	4.969
230	1.583	2.072	3.461
240	1.541	2.046	1.995
250	1.544	2.056	1.684
260	1.533	2.052	1.743
270	1.466	1.987	1.831
280	1.350	1.871	1.832
290	1.239	1.762	1.646
300	1.148	1.673	1.409
310	1.074	1.594	1.314
320	1.014	1.527	1.273
330	0.854	1.426	1.211
340	0.818	1.384	1.180
350	0.809	1.366	1.169
360	0.796	1.356	1.162
370	0.780	1.339	1.154
380	0.762	1.320	1.144
390	0.742	1.299	1.130
400	0.722	1.276	1.116
410	0.703	1.255	1.101
420	0.685	1.235	1.084
430	0.674	1.221	1.073
440	0.667	1.212	1.063
450	0.665	1.207	1.054
460	0.671	1.211	1.051
470	0.691	1.229	1.054
480	0.733	1.271	1.072
490	0.815	1.356	1.116
500	0.941	1.496	1.195
510	1.198	1.675	1.305

ความยาวคลื่น (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง		
	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี	อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตรึงด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี และจับกับหุติยภูมิแอนติบอดี (IgG)
520	1.349	1.845	1.417
530	1.304	1.958	1.512
540	1.286	1.988	1.515
550	1.189	1.940	1.525
560	1.039	1.827	1.557
570	0.869	1.673	1.572
580	0.711	1.508	1.618
590	0.579	1.353	1.548
600	0.473	1.220	1.472
610	0.390	1.111	1.296
620	0.323	1.020	1.225
630	0.268	0.946	1.160
640	0.223	0.882	1.102
650	0.182	0.825	1.048
660	0.148	0.777	0.998
670	0.117	0.731	0.951
680	0.090	0.691	0.908
690	0.067	0.654	0.869
700	0.047	0.622	0.832
710	0.033	0.592	0.799
720	0.018	0.566	0.766
730	0.006	0.541	0.737
740	-0.006	0.519	0.709
750	-0.016	0.499	0.683
760	-0.024	0.481	0.659
770	-0.032	0.465	0.637
780	-0.039	0.451	0.616
790	-0.044	0.439	0.598
800	-0.048	0.429	0.581



รูปที่ ก. 1 แสดงผลของปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ppm ที่ใช้ตรึงกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี โดยทดสอบกับ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 (อัลบูมินความเข้มข้นน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ ก. 3 แสดงการทดสอบหาความแม่นยำของชุดตรวจโรคมภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ชุดตรวจที่	ความเข้มสีของเส้นทดสอบ	ความเข้มสีของเส้นควบคุม
1	173.8	210.7
2	171.8	213.8
3	177.1	219.1
4	177.6	219.1
5	176.3	215.6
6	180.8	223.6
7	178.6	211.3
8	177.9	224.0
9	174.3	223.9
10	175.3	220.7
11	179.1	201.8
12	170.6	208.6
13	178.1	237.3
14	172.2	235.0
15	179.2	229.9
16	170.9	221.5
17	170.6	225.8
18	175.2	219.2
19	173.2	215.9
20	177.5	219.6
Mean	175.5	219.8
SD	3.2	8.6
CV	1.8	3.9

ตารางที่ ก. 4 แสดงการทดสอบหาความแม่นยำของชุดตรวจโรคภายใน 1 วัน (Within day) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ

ชุดตรวจที่	ความเข้มสีของเส้นทดสอบ	ความเข้มสีของเส้นควบคุม
1	-	232.5
2	-	241.6
3	-	218
4	-	221
5	-	247
6	-	215.6
7	-	231.1
8	-	223.3
9	-	242.1
10	-	224.3
11	-	235.4
12	-	218.9
13	-	239.3
14	-	244.4
15	-	234.6
16	-	224.7
17	-	223.9
18	-	216.8
19	-	245
20	-	237.8
Mean	-	229.2
SD	-	10.9
CV	-	4.7

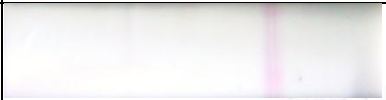
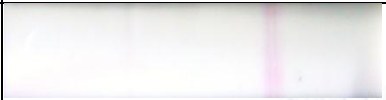


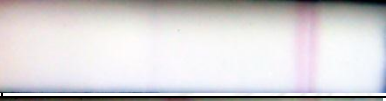
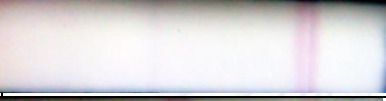






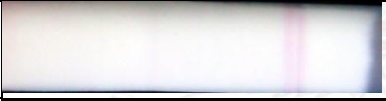
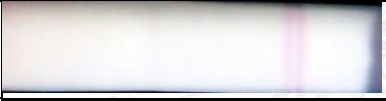


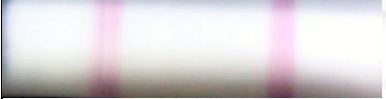
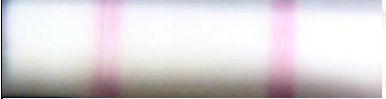
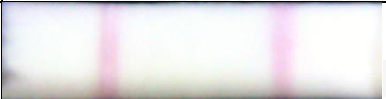
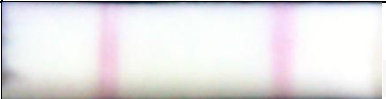
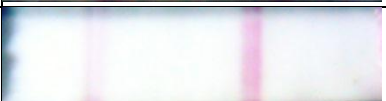
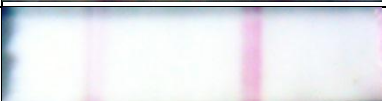
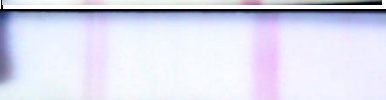
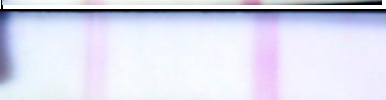
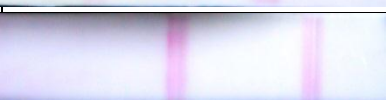
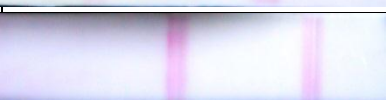
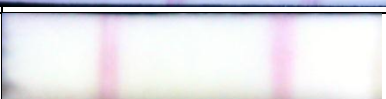
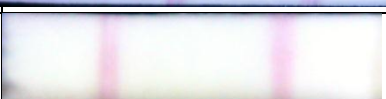
ตารางที่ ก. 5 แสดงการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between in day) จำนวน 20 วัน โดย 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4 เป็นสิ่งส่งตรวจ (ไมโครอัลบูมินน้อยกว่า 20 มิลลิกรัม ต่อลิตร)


















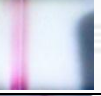

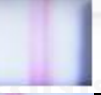

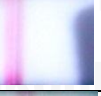


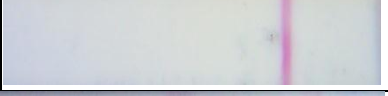
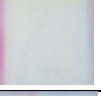




ชุดตรวจวันที่	ความเข้มสีของเส้นทดสอบ	ความเข้มสีของเส้นควบคุม
1	176.4	246.3
2	174.8	259.6
3	176.1	238.0
4	172.2	231.0
5	174.1	225.8
6	175.2	233.0
7	175.9	241.1
8	175.9	243.7
9	170.8	231.2
10	175.3	230.1
11	165.2	245.4
12	167.0	251.9
13	174.6	253.7
14	171.8	244.4
15	167.4	246.1
16	163.5	244.0
17	168.7	233.9
18	165.9	246.6
19	168.4	245.4
20	163.0	247.4
Mean	171.1	241.9
SD	4.6	8.8
CV	2.7	7.2




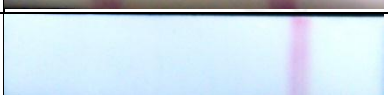
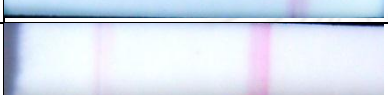



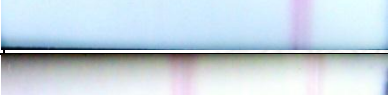






ตารางที่ ก. 6 แสดงการทดสอบหาความแม่นยำระหว่างวัน (Between in day) จำนวน 20 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไมโครอัลบูมิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสิ่งส่งตรวจ













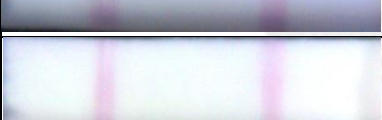
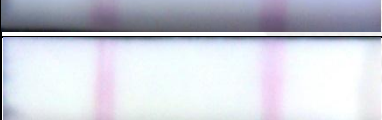
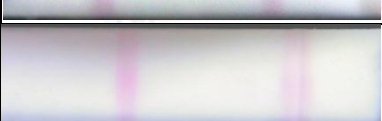
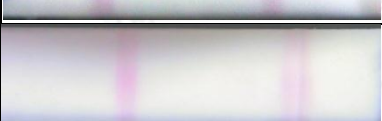
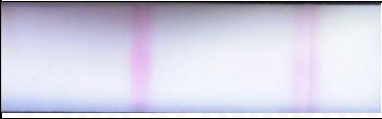
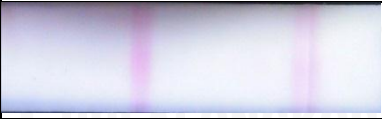






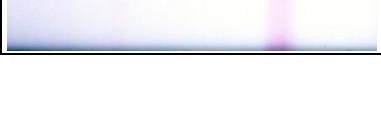
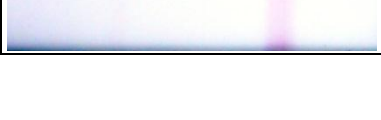


ชุดตรวจวันที่	ความเข้มข้นของเส้นทดสอบ	ความเข้มข้นของเส้นควบคุม
1	-	245.7
2	-	248.9
3	-	228.0
4	-	231.0
5	-	241.0
6	-	231.6
7	-	232.1
8	-	232.6
9	-	240.0
10	-	225.0
11	-	232.2
12	-	228.9
13	-	239.3
14	-	231.1
15	-	244.2
16	-	233.9
17	-	227.9
18	-	216.8
19	-	255.0
20	-	236.8
Mean	-	235.1
SD	-	8.9
CV	-	3.8








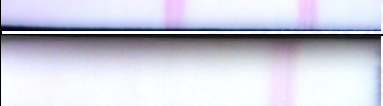



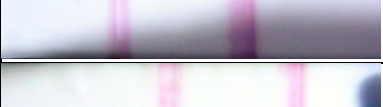




ตารางที่ ก. 7 แสดงการเปรียบเทียบชุดตรวจคัดกรองที่ผลิตกับวิธีอิมมูโนเทอปีไคมิทรีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ











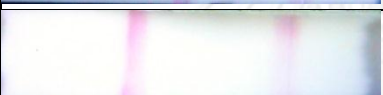
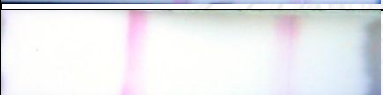
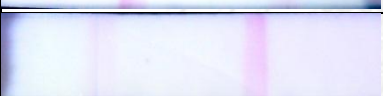
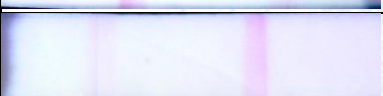


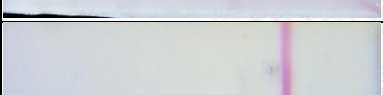
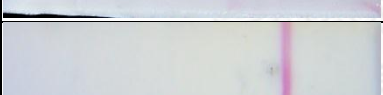
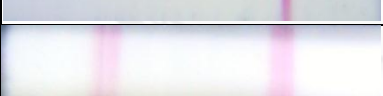
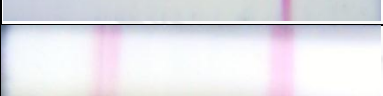
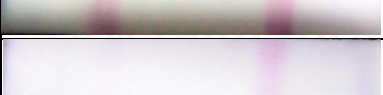
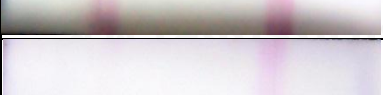


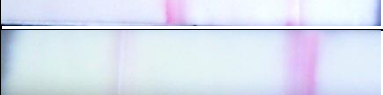
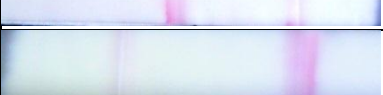
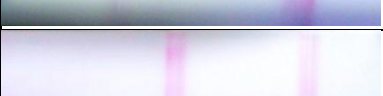
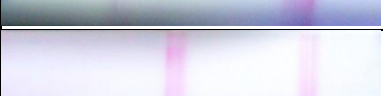
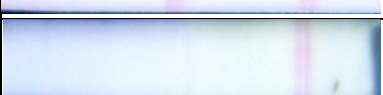
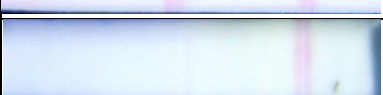
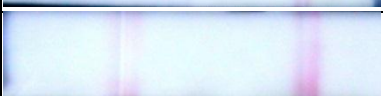
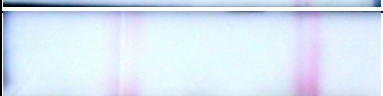
ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนเทอปีไคมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
1			88.2	Positive
2			29.1	Negative *
3			224	Positive
4			1.3	Negative
5			1.7	Negative
6			2.2	Negative
7			29.5	positive
8			329.4	Positive
9			1.6	Negative
10			1.0	Negative
11			17.0	Negative
12			13.6	Negative
13			1.6	Negative
14			11.6	Negative

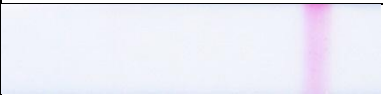
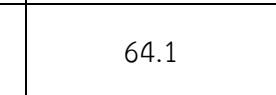

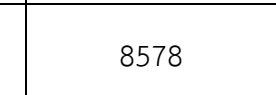
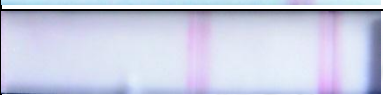
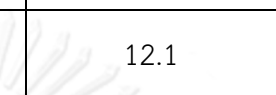
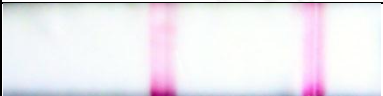
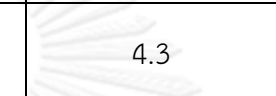
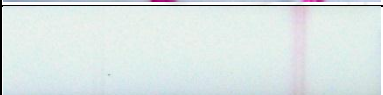
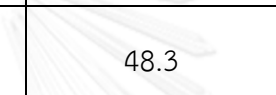

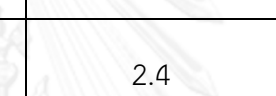



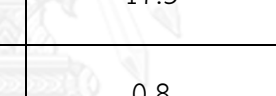



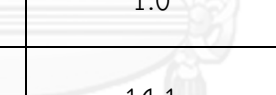
ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนเทอปีโดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
15			1.2	Negative
16			261.2	Positive
17			10.6	Negative
18			1.5	Negative
19			6.0	Negative
20			5.1	Negative
21			13.9	Negative
22			1.7	Negative
23			9.9	Negative
24			0.9	Negative
25			4.1	Negative
26			277.1	Positive
27			57.9	Positive
28			9.5	Negative
29			1.7	Negative

ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนโทปโดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
30			1.9	Negative
31			1.6	Negative
32			2.8	Negative
33			415.3	Positive
34			10.7	Negative
35			4.6	Negative
36			3.3	Negative
37			181.6	Positive
38			11.1	Negative
39			0.8	Negative
40			4.1	Negative
41			8.8	Negative
42			2.0	Negative
43			368	Positive
44			15.9	Negative

ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนโทปี้โดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
45			12.4	Negative
46			11.3	Negative
47			0.9	Negative
48			4.1	Negative
49			4.4	Negative
50			3.2	Negative
51			2.9	Negative
52			3.9	Negative
53			1.1	Negative
54			1.3	Negative
55			0.9	Negative
56			1.0	Negative
57			5.5	Negative
58			237.8	Positive

ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนเทอปีโดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
59			0.6	Negative
60			1.4	Negative
61			3.9	Negative
62			2.0	Negative
63			93.5	Positive
64			1.5	Negative
65			88.2	Positive
66			6.6	Negative
67			130.2	Positive
68			599.8	Positive
69			101.8	Positive
70			2.8	Negative
71			14.0	Negative
72			3.5	Negative
73			100.0	Positive
74			1.4	Negative

ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนโทปี้โดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
75			181.7	Positive
76			29.4	Positive
77			13.4	Negative
78			239.1	Positive
79			6.1	Negative
80			1.9	Negative
81			25.5	Positive
82			54.9	Positive
83			357	Negative
84			3.2	Negative
85			149.6	Positive
86			18.2	Negative
87			23.5	Positive
88			9.9	Negative
89			70.2	Positive
90			26.5	Negative

ลำดับที่	ภาพชุดตรวจคัดกรอง		ผลที่ได้จาก วิธีอิมมูโนโทปโดมิทรี หน่วย mg/l	ผลที่อ่านได้จาก ชุดตรวจคัดกรอง MAU
	T	C		
91			64.1	Positive
92			8578	Positive
93			12.1	Negative
94			4.3	Negative
95			48.3	Positive
96			2.4	Negative
97			17.3	Negative
98			0.8	Negative
99			1.0	Negative
100			14.1	Negative

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
* หมายถึง อ่านผลเป็น False Negative

ภาคผนวก ข

1. สารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 (Stock reagent)

NaH₂PO₄ 27.3 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

Na₂HPO₄ 71.63 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4

2) 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 1 L

NaCl 175.2 g

Distilled water 18 L

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

Tween 20 500 µl

PBS 1000 ml

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย 5 g

PBS 100 ml

หมายเหตุ เตรียมใหม่ก่อนการใช้งาน

5) 0.15 M Phosphate Citrate buffer pH 5.0

Na₂HPO₄ 11.9 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

Citric acid 7 g

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่ 4 °C

6) Substrate OPD

O-phenylene diamine 40 mg

0.15 M Phosphate citrate buffer 100 ml

30% H₂O₂ 0.04 ml

7) 2.5 M H₂SO₄ (stopping reagent)

H₂SO₄ (96%) 256 ml

Distilled water 744 ml

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน เนื่องจากเมื่อผสมกรดกับน้ำ จะมีความร้อนเกิดขึ้น จึงควรนำขวดไปแช่น้ำจนกว่าจะหายร้อน

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	g
NaHCO ₃	2	g
L-glutamin	0.1	g
Glucose	2	g
Pyruvic acid	0.11	g
Distilled water	1	L

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย Millipore 0.22 μ m แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 ml เก็บไว้ที่ 4 °C

3. สารละลายสำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1) 4 M NaCl

NaCl	233.76	g
Distilled water	1	L

2) 0.1 M Phosphate buffer, pH 8

NaH ₂ PO ₄	13.8	g	ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml
Na ₂ HPO ₄	25.8	g	ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 8 นำไปกรองด้วย Millipore 0.22 μ m

3) 1 M Tris HCL buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121	g
-----------------------------------	-----	---

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml

Hydrochloric acid (HCL)	1	M
-------------------------	---	---

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 9 นำไปกรองด้วย Millipore 0.22 μ m

4. สารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค SDS-PAGE

1) 12% Separatine gel

Milli Q water	1.6	ml
30% acrylamide mix	2.0	ml
1.5 M Tris pH 8.8	1.3	ml
10% SDS	50	μ l
10% ammonium persulfate	50	μ l
TEMED	2	μ l
2) 5% Stacking gel ปริมาตร 3 มิลลิลิตร		
Milli Q water	2.1	ml
30% acrylamide mix	500	μ l
1.0 M Tris pH 6.8	380	μ l
10% SDS	30	μ l
10% ammonium persulfate	30	μ l
TEMED	3	μ l
3) Running buffer (1X) ปริมาตร 1 ลิตร		
25 mM Tris	3.03	g
192 mM Glycine	14.42	g
0.1% SDS	1	g
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	ml
4) Coomassie brilliant blue G		
สี Coomassie brilliant blue G	0.1	g
100% Methanol	50	ml
Milli Q water	40	ml
Acetic acid	10	ml
5) Destain Solution		
100% Methanol	50	ml
Milli Q water	810	ml
Acetic acid	70	ml

5. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
 - 1) 0.01 % Gold tetrachloric acid solution
 - 2) 1% sodium citrate
6. การศึกษาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับตรึงบนอนุภาคทองคำระดับนาโน
 - 1) 10% BSA ที่อยู่ใน 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4
 - 2) 1 % BSA ใน 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4
 - 3) Resuspended solution
 - 0.01 M Phosphate buffer, pH 7.4
 - 1% BSA
 - 20% sucrose
 - 0.05% sodium azide

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อัจจิมา กาญจนานา เกิดเมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิก และอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 โดยได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 19 ครั้งที่ 3/2555 และทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY