รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

Production of monoclonal antibody against oxytetracycline for developing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

นายอณุมาศ บัวเขียว

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ปีงบประมาณ 2557 เพื่อให้โครงการวิจัยสำเร็จตามเป้าหมาย

ขอขอบคุณ นางสาววิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง นิสิตปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการดำเนินการวิจัยนี้สำเร็จไปตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ คณะผู้ร่วมวิจัยทุกคนและบุคคลากรของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในงานวิจัยครั้งนี้ให้ประสบความสำเร็จ

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ออกซีเตตราซัยคลิน (OTC) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน ที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ในวงกว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิดออกซีเตตรา-ซัยคลินนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการเลี้ยงสัตว์เพื่อช่วยป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ เนื่อง จากการตกค้างของยาปฏิชีวนะระดับต่ำ ๆ ในผลิตภัณฑ์สัตว์เป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ การตรวจหายาตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารจึงมีความสำคัญ ทำให้หลายประเทศได้มีการกำหนดค่าความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มากที่สุดที่สามารถตกค้างได้ (MRLs) ในกล้ามเนื้อสัตว์ที่ระดับ 200 μg/kg งานวิจัยจึงมีเป้าหมายที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลินสำหรับพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ ELISA โดยทำการเชื่อมติด OTC กับอัลบูมินจากซีรัมของวัว (BSA) เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจนสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย จำนวน 10 ตัว ซึ่งถูกกระตุ้นและให้ระดับแอนติบอดีในซีรัมตั้งแต่ 1:16,000 ถึง 1:128,000 จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา NSI ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC จำนวน 3 โคลน คือ 2-4F, 7-3G และ11-11A ทำการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยการหา ไอโซไทป์ ความไว และความจำเพาะ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A มีไอโซไทป์ เป็น IgG_1, IgG_{2a} และ IgG_1 ตามลำดับ ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงในรูปของค่าความเข้มข้นที่เกิดการยับยั้งที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 0.19 ± 0.04, 0.56 ± 0.10 และ 2.66 ± 1.16 μg/ml ตามลำดับและในรูปของค่าขีดจำกัดในการวัด (LOD) เท่ากับ 0.08 ± 0.03, 0.20 ± 0.18 และ 0.96 ± 1.21 μg/ml ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F ให้เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเตตราซัยคลินทุกตัว ในช่วง 27 ถึง 275 % ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-3G เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ TC, DC และ RTC ในช่วง 2 ถึง 41 % ส่วน 11-11A เกิดปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับสาร DC เท่ากับ 19 % นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มเตตราซัยคลินทุกตัวที่ทำการทดสอบ

Abstract

Oxytetracycline (OTC) is a broad-spectrum antibiotic in tetracycline family, which inhibits the growth of various gram positive and gram negative bacteria. OTC is widely used in aquaculture and also in livestock for prevention and treatment of diseases. Since the presence of low levels of residues in food product led to the problem of drug resistance of pathogens in human, it is essential to detect its residue in the food products. Therefore, many countries set the maximum residues limit (MRLs) for oxytetracycline in muscle at 200 µg/kg. The aim of this work was to generate monoclonal antibody against OTC for developing ELISA test kit. OTC was conjugated to bovine serum albumin (BSA), as an immunogen. Ten BALB/c mice were immunized and gave antiserum titers ranging from 1:16,000 to 1:128,000. Cell fusions of splenocytes and myeloma NSI were performed yielding 3 monoclones, 2-4F, 7-3G and 11-11A which produce monoclonal antibody against OTC. Isotyping, sensitivity and cross reactivity of these clones were characterized. The isotype of these clones were IgG_1, IgG_{2a} and IgG_1 respectively. The sensitivity of these clones were found in terms of 50% of inhibitory concentration (IC_{50}) at 0.19 $\pm$ 0.04, 0.56 $\pm$ 0.10 and 2.66 $\pm$ 1.16 µg/ml respectively and in term of limit of detection (LOD) at 0.08 $\pm$ 0.03, 0.20 $\pm$ 0.18 and 0.96 $\pm$ 1.21 µg/ml respectively. Monoclonal antibody 2-4F shows %cross reactivity, in the range of 27 to 275 %, to other antibiotics in TC group whereas MAb 7-3G shows %cross reactivity in the range of 2 to 41%, to TC, DC and RTC and 11-11A showed cross reacted to only DC at 19 %. Moreover, these three monoclonal antibodies showed no cross reactivity to all other tested compounds in other groups.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิดและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	4
2.1.1 ออกซีเตตราซัยคลิน	4
2.1.2 การใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย	5
2.1.3 มาตรฐานยาสัตว์ตกค้างกลุ่ม TCs	7
2.1.4 แอนติเจนและแอนติบอดี	9
2.1.4.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)	9
2.1.4.2 แอนติบอดี (Antibody, Ab)	11
2.1.5 การผลิตแอนติบอดี (Antibody Production)	13
2.1.5.1 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี	13
2.1.5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้หลักการ somatic hybridization	14
2.1.5.3 ความแตกต่างระหว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	22
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	24

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 27

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 27

3.4.1.1 การเตรียม OTC เชื่อมกับ BSA หรือ Ovallbumin (OVA) โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich 27

3.4.1.2 การวัดปริมาณแอนติบอดี 28

3.4.1.3 การคำนวณอัตราส่วนโมเลกุลของ OTC ที่เชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF-MS 29

3.4.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย OTC-BSA 29

3.4.3 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC 30

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา 30

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม 30

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Cell fusion) 30

3.4.3.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ OTC 31

3.4.3.5 แยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution 32

3.4.3.6 เก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว 32

3.4.3.7 นำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง 32

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ 33

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป 33

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 33

3.4.4.3 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC 34

บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปราย 35

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง 35

4.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูในการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC 36

4.2.1 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น 36

4.2.2 ความสามารถในการจับของแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ 38

4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC 39

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 42

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 42

4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC ในรูป 42

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 51

บรรณานุกรม 54

ภาคผนวก 57

ประวัติคณะผู้วิจัย 62

สารบัญตาราง

		หน้า
2.1	มาตรฐานปริมาณสูงสุดของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร (MRLs)	8
2.2	มาตรฐานปริมาณของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในสัตว์น้ำ (MRLs)	9
2.3	คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี	18
3.1	สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.2	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	22
3.3	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	24
4.1	ระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA	37
4.2	การทดสอบความสามารถในการจับกับ OTC ในรูปอิสระ จากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA โดยวิธี Indirect competitive ELISA	39
4.3	ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 10 ครั้ง ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ OTC-BSA	41
4.4	ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA	42
4.5	ความสัมพันธ์ของความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A กับค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบวิธี Indirect ELISA	43
5.1	สรุปการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A	52

สารบัญภาพ

		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน	5
2.2	epitope หรือ antigenic determinant บนแอนติเจน แอนติเจนนี้มี epitope ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะของแต่ละ epitope จึงมีแอนติบอดี 3 แบบต่อแอนติเจนนี้	10
2.3	นำแฮปเทน (dinitropheno, DNP) ยึดติดกับ carrier เช่น Bovine serum albumin (BSA) ฉีดให้กับกระต่าย และตรวจแอนติบอดีที่กระต่ายสร้างขึ้น จะพบแอนติบอดี anti-BSA, anti-DNP และ anti-DNP/BSA	11
2.4	โครงสร้างของแอนติบอดี	12
2.5	โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์	13
2.6	แอนติเจนที่ประกอบด้วย epitope 4 แบบ หากผลิตแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดี จะได้ซีรัมที่มีความจำเพาะต่อ epitope ทั้ง 4 แบบ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะได้แอนติบอดีจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ บนแอนติเจน	14
2.7	ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง	16
2.8	แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ De Novo และ Salvage pathway	17
4.1	โครมาโตรแกรมของมวลโมเลกุลของ OTC-BSA เมื่อเทียบกับ BSA โดยวิธี MALDI-TOF-MS	36
4.2	ตัวอย่างระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 4 ตัว จาก 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม เทียบกับ ซีรัมของหนูตัวที่ 1 ที่ใช้แอนติเจน OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม โดยใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:1,000 ถึง 1:1,024,000	38
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F	44
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน11-11A 45

4.6 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A 46

4.7 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect competitive ต่อสารในกลุ่ม TCs 49

4.8 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7-3G โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs 49

4.9 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs 50

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
A	absorbance
ADI	acceptable daily intake
AGP	antibiotic growth promoter
Ab	antibody
Ag	antigen
Avg	average
BCA	bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
C	constant region
CDR	complementarity determining region
Conc.	concentration
CTC	chlortetracycline
CTC-HCl	chlortetracycline hydrochloride
Da	dalton
DC	doxycycline
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FIA	Freund's incomplete adjuvant
g	gram
GAM-HRP	goat-anti-mouse IgG (H + L)- peroxidase
H	heavy chain
HAT	hypoxanthine, aminopterin and thymidine
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase

คำย่อ	ความหมาย
IC_{50}	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
K	kilo
kD	kilo dalton
l	liter
L	light chain
LC-MS	liquid chromatography/ mass spectrometry
LOD	limit of detection
m	milli
M	molar (mol/l)
MAb	monoclonal antibody
MHC	major histocompatibility complex
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MRLs	maximum residue limits
MW	molecular weight
N	normal
n	nano
OPD	o-phenylenediamine
OTC	oxytetracycline
OTC-HCl	oxytetracycline hydrochloride
OVA	ovalbumin
PAb	polyclonal antibody
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline ที่มี 0.05% Tween 20
PEG	polyethylene glycol
ppb	part per billion
ppm	part per million

คำย่อ	ความหมาย
RIA	radio immunoassay
RTC	rolitetracycline
SD	standard deviation
TC	tetracycline
TC-HCl	tetracycline hydrochloride
TCs	tetracyclines
T_C	cytotoxic T cell
T_H	helper T cell
TK	thymidine kinase
UV	ultraviolet
V_H	variable region of heavy chain
V_L	variable region of light chain
v	volume
w	weight
μ	micro
%	percent

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกอาหารทั้งในรูปสด กึ่งแปรรูป และแปรรูปที่สำคัญของโลก โดยในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา ผู้บริโภคมีความห่วงใยดูแลสุขภาพมากขึ้น ทำให้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้บริโภคต้องการอาหารที่มีคุณภาพและปลอดภัยมากขึ้น ความไม่ปลอดภัยในอาหารหรือการปนเปื้อนในอาหาร สามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่กระบวนการปลูกพืชหรือการเลี้ยงสัตว์ การเก็บเกี่ยว การแปรรูป การเก็บรักษาและการขนส่ง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ จากการใช้ยาปฏิชีวนะและฮอร์โมน จากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งถ้าไม่มีการใช้หรือควบคุมดูแลที่ดี ก็จะนำไปสู่ปัญหาสารตกค้างในอาหารคนและอาหารสัตว์ ที่จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ปัญหาสารหรือยาปฏิชีวนะ(antibiotic) ตกค้างในอาหาร เนื่องมาจากกระบวนการเลี้ยงสัตว์ เพื่อการรักษาโรคหรือป้องกันโรค หรือเพื่อเร่งการเจริญเติบโต เป็นปัญหาหนึ่ง ซึ่งถ้ามีการตรวจพบสารตกค้างเกินกว่ามาตรฐานที่ตั้งไว้ นั่นแสดงว่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่ได้มาตรฐานความปลอดภัย ส่งผลต่อผู้บริโภคได้ รวมถึงการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หยุดชะงัก และจะมีผลโดยตรงต่อรายได้และความเชื่อมั่นในสินค้าของประเทศที่ลดลง ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงต้องมีการตรวจคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้มาตรฐานสากล

ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline-OTC) เป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน (tetracyclines) สารในกลุ่มนี้ตัวหนึ่งเป็นที่รู้จักกันมานานและนิยมใช้อย่างกว้างขวาง ได้รับอนุญาตให้ใช้ในกระบวนการเลี้ยงสัตว์บก สัตว์น้ำอนุญาตให้ใช้เฉพาะอออกซีเตตราซัยคลิน โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของไทย ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectum) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย (กมลชัย, 2547) อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะต้องทราบวิธีใช้อย่างถูกต้องและต้องไม่ให้เหลือตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์เกินกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ว่าปลอดภัยและสามารถนำมาบริโภคได้ ซึ่งเรียกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) เช่น ในเนื้อกุ้งค่า MRL ของออกซีเตตราซัยคลิน กำหนดไว้ที่ 0.2 ppm สำหรับประเทศญี่ปุ่น และ 2 ppm สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา (กรมประมง, 2558) และประเทศไทยโดยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) ได้กำหนดไว้ที่ 0.2 ppm ดังนั้นการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างของอาหารเพื่อการบริโภค จึงเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง โดยการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้าง

สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ เช่น วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) (Castellari และคณะ, 2009; Chertet และคณะ, 2003; Wang และคณะ, 2008) , liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) หรือ LC-MS-MS (Koesukwiwat และคณะ, 2007; Lykkeberg และคณะ, 2004) โดยเทคนิคเหล่านี้จะให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงแต่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และอาศัยบุคคลากรที่มีความชำนาญ ใช้เวลานาน ส่วนการวิเคราะห์หาสารตกค้างโดยเทคนิคทางอิมมูโน (immuno assay) คือ Enzyme Linked Immonosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการติดตามหาสารตกค้างผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ โดยอาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่ประหยัด รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถหาสารตกค้างปริมาณน้อยได้ การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างมีความจำเพาะ ได้ผลรวดเร็ว ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ราคาถูก จึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างที่มีมาก เพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างเบื้องต้น (screening test) (Zhang และคณะ 2007; Le และคณะ, 2011) ในปัจจุบันยังไม่มีชุดตรวจสอบ ELISA ที่จำเพาะต่อออกซีเตตราซัยคลิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวัตถุประสงค์ที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน สำหรับการสร้างแอนติบอดีในรูปโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ในปริมาณจำกัดและมีคุณภาพสม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากการผลิตในรูปแบบของโพลีโคลนอลแอนติบอดี ถึงแม้จะมีขั้นตอนการผลิตง่าย ไม่ยุ่งยาก แต่อาจมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นกับสัตว์ทดลอง จากนั้นจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลินที่ผลิตได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบออกซีเตตราซัยคลินต้นแบบ โดยวิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู
3. ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน

4. ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน

5. ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบได้ต่อไป

บทที่ 2

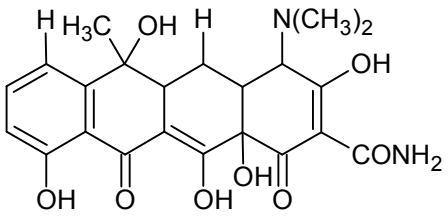
แนวคิดและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

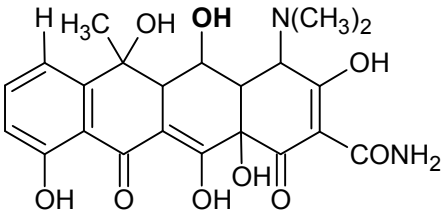
2.1.1 ออกซีเตตราซัยคลิน

OTC เป็นยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus, Staphylococcus, Anthracoids, Pasteurella, Brucella, Corynebacteria, กลุ่ม coliforms และ Salmonella (ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์, 2535) ยาในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจากเชื้อราในตระกูล *Streptomyces* ยาตัวแรกที่ค้นพบคือ คลอเตตราซัยคลิน (Chlortetracycline; CTC) ค้นพบในปี 1948 โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* ต่อมาก็มีการค้นพบยา Oxytetracycline โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตยากลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดึงเอาอะตอมของ คลอรีนอะตอมออกจาก CTC ยาที่ผลิตได้ใหม่นี้ เรียกว่า เตตราซัยคลิน (Tetracycline; TC) เหมือนชื่อกลุ่มยา

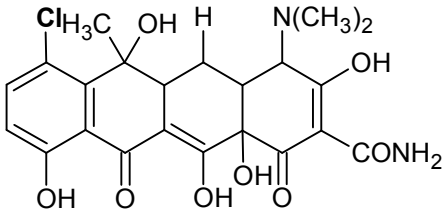
ปัจจุบันนี้ได้มีการผลิตยาในกลุ่มนี้ขึ้นมาใช้อีกหลายตัวได้แก่ ด็อกซีซัยคลิน(Doxycycline; DC) ดีมีคลอซัยคลิน (Demeclocycline) เมธาซัยคลิน (Methacycline) และโรลิเตตราซัยคลิน (Rolitetracycline) (กมลชัย ตรงวาณิชนาม, 2547) สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน แสดงดังภาพที่ 2.1



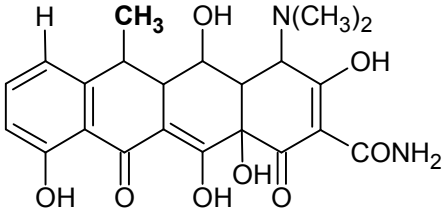
Tetracycline



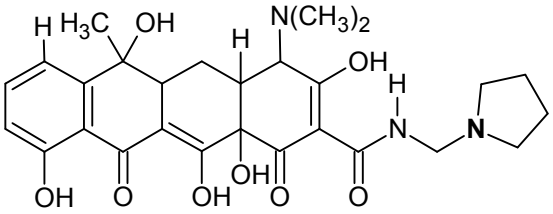
Oxytetracycline



Chlortetracycline



Doxycycline



Rolitetracycline

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน

ที่มา : กมลชัย ตรงวาณิชนาม, 2547

2.1.2 การใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ ในประเทศไทย

การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรค เป็นปัจจัยหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ทุกชนิด เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย ซึ่งได้รับการพัฒนาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา จนเป็นระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาหนาแน่น (Intensive culture) มีการใช้ยาปฏิชีวนะในกระบวนการเลี้ยงทั้งวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรค รักษาโรค และการจัดการคุณภาพดินและน้ำ จนเมื่อปี พ.ศ. 2545 ปัญหาการ

ตกค้างของยาปฏิชีวนะในกุ้งส่งออก ทำให้เกิดคำถามถึงการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลแบบหนาแน่น คือ การเกิดโรคระบาด ทำให้เกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและรักษาโรค การใช้ยาปฏิชีวนะโดยขาดการควบคุมและความเข้าใจในการใช้ยาอย่างถูกต้องทำให้เป็นปัญหาต่อเนื่องอย่างมากมาย รวมถึงการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งทะเลไทยมากที่สุดในปัจจุบัน

ยาต้านจุลชีพ หรือ ยาปฏิชีวนะ เป็นยาที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย รายงานการศึกษาการเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนาหนาแน่น แสดงให้เห็นว่าเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดโรคในกุ้ง เช่น เชื้อโปรโตซัว เช่น *Zoothamnium sp., Epistylis sp., Acineta sp., Thelonania sp.* เชื้อแบคทีเรีย เช่น *Vibrio sp.* และ Filamentous bacteria เป็นต้น สามารถพบได้ในบ่อที่มีการเลี้ยงแบบหนาแน่น ดังนั้นการเกิดโรคในกุ้งจากเชื้อโรคที่มีอยู่แล้วในบ่อ (Opportunistic pathogens) จึงอาจเกิดได้ตลอดเวลาในระหว่างการเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อกุ้งได้รับความเครียด อันเนื่องมาจากคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือ การจัดการที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันโรค โดยการแช่กุ้งวัยอนุบาลในยาอย่างต่อเนื่องในบ่อดิน ซึ่งสภาวะการเกิดโรคต่าง ๆ มักเกิดขึ้นในขบวนการเพาะเลี้ยงทั้งในบ่อฟัก (hatchery) และการเลี้ยงในบ่อดิน

การศึกษาการใช้ยาและสารเคมีในฟาร์มกุ้ง พบว่ายาตัวอย่างที่ได้รับการสุ่มตรวจตามท้อง ตลาดไม่มีประสิทธิภาพตามที่อ้างไว้บนฉลากสำหรับการรักษาและป้องกันแบคทีเรียในสัตว์น้ำ ยาไม่มีการขึ้นทะเบียนตำรับยาตามกฎหมาย ยาดังกล่าวจึงขาดการรับรองคุณภาพและเอกสารกำกับยาไม่ถูกต้อง ทำให้เกษตรกรมีการใช้ยาผิดวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค โดยยาที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน ออกโซลินิกแอซิด คลอแรมฟินิคอล และ ฟูราโซลิโดน เป็นต้น (เจนนุช ว่องธวัชชัย, 2547)

สารในกลุ่มเตตราซัยคลิน เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างและมีราคาถูกทำให้เกษตรกรใช้ในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อเป็นสารป้องกันการติดเชื้อและรักษาโรคในสัตว์เพราะเมื่อสัตว์เกิดอาการป่วยหรือล้มตายจะทำให้เกิดการขาดทุน นอกจากนี้ได้มีการใช้งานสารในกลุ่มนี้ในการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งใน ค.ศ. 1940 นักวิทยาศาสตร์พบว่ายาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น เตตราซัยคลิน สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ได้ (Antibiotic growth promoter; AGP) ในปี ค.ศ. 1953 องค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา หรือ USFDA ได้รับรองให้ออกซีเตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ (Animal feed additive) หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1969 Swann Committee แห่งสหราชอาณาจักร ค้นพบสารพันธุกรรมที่ต้านฤทธิ์ยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินในสัตว์เลี้ยงที่ได้รับสารเร่งการ

เจริญเติบโต และ ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* สหราชอาณาจักร จึงประกาศห้ามใช้ออกซีเตตราซัยคลิน และคลอเตตราซัยคลิน เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 และ เมื่อปี ค.ศ. 2006 สหภาพยุโรปได้ประกาศห้ามใช้ออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินผสมในอาหารสัตว์เช่นกัน

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้ใช้อย่างถูกกฎหมาย โดยเป็นยาที่ CODEX รับรองให้ใช้ในการผลิตสัตว์น้ำและสัตว์บกเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ในปี พ.ศ. 2538 ญี่ปุ่นตรวจพบออกซีเตตราซัยคลินและกรดออกโซลินิก (Oxolinic acid) ในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งในระดับเกินที่กฎหมายกำหนด จึงต้องเผาทำลายสินค้าเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นกรมประมงจึงได้กำหนดให้มีการตรวจปริมาณออกซีเตตราซัยคลินและกรดออกโซลินิกตกค้าง ในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งก่อนส่งออก ไม่ให้เกินจากที่กฎหมายของประเทศคู่ค้ากำหนดตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา (อมรชัย เลิศเจริญ, 2545)

2.1.3 มาตรฐานสารตกค้างออกซีเตตราซัยคลิน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์และคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) ได้จัดทำข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร (Safety requirements for agricultural commodity and food) โดยอ้างอิงมาตรฐานและหลักเกณฑ์ที่ประกาศโดยองค์กรมาตรฐานระหว่างประเทศ เช่น โครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (Joint FAO/WHO Food Standard Programme; Codex) ได้กำหนดมาตรฐานปริมาณของสารที่มากที่สุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ (Maximun residue limits; MRLs) ในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดที่มีอยู่ในมาตรฐานระหว่างประเทศ เพื่อเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงคุณภาพมาตรฐานสินค้าเกษตรให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดและได้มาตรฐานสากล นำมาเป็นข้อตกลงในการเจรจาทางการค้า เพื่อให้มีคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 มาตรฐานปริมาณสูงสุดของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร (MRLs)

CHLORTETRACYCLINE/OXYTETRACYCLINE/TETRACYCLINE (antimicrobial agent)

JECFA Evaluation: 45 (1995); 47 (1996); 50 (1998); 58 (2002)

Acceptable Daily Intake: 0-30 µg/kg body weight (50th JECFA, 1998). Group ADI for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline.

Residue Definition: Parent drugs, singly or in combination.

Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	200	26th (2003)	
Cattle	Liver	600	26th (2003)	
Cattle	Kidney	1200	26th (2003)	
Cattle	Milk (µg/l)	100	26th (2003)	
Fish	Muscle	200	26th (2003)	Applies only to oxytetracycline.
Giant prawn (*Paeneus monodon*)	Muscle	200	26th (2003)	Applies only to oxytetracycline.
Pig	Muscle	200	26th (2003)	
Pig	Liver	600	26th (2003)	
Pig	Kidney	1200	26th (2003)	
Poultry	Muscle	200	26th (2003)	
Poultry	Liver	600	26th (2003)	
Poultry	Kidney	1200	26th (2003)	
Poultry	Eggs	400	26th (2003)	
Sheep	Muscle	200	26th (2003)	
Sheep	Liver	600	26th (2003)	
Sheep	Kidney	1200	26th (2003)	
Sheep	Milk (µg/l)	100	26th (2003)	

ที่มา : www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2012.pdf

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารให้ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์ แต่การใช้สารปฏิชีวนะในลักษณะดังกล่าว ก็จำเป็นจะต้องมีระยะหยุดยา ก่อนจับสัตว์น้ำขาย กองการตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง ได้กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี (Chemical Reference Criteria for Fishery Products) ของสารออกซีเตตราซัยคลิน ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำของประเทศต่าง ๆ ไว้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 มาตรฐานปริมาณของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในสัตว์น้ำ (MRLs)

Product	MRLs (μg/ml)								
	Codex	EU	U.S.	Japan	China	Canada	Korea	Thailand	Australia New Zealand
Fish, Shrimp, Oysters	0.2	0.1	-	0.2	-	-	0.2	0.2	-
Salmon, Lobster	-	-	2.0	-	-	0.2	-	-	0.2
Others	-	-	2.0	-	0.2	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่มีข้อมูล

ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี กรมประมง, 2552

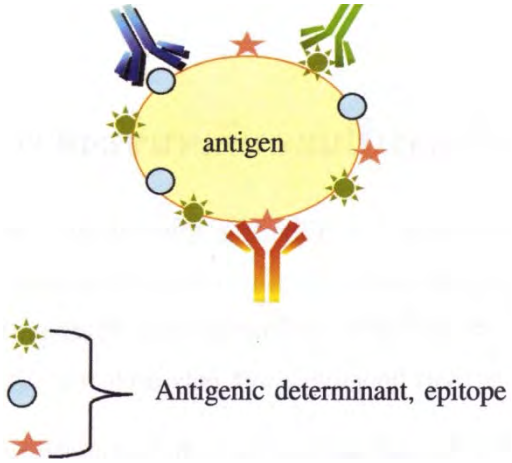
2.1.4 *แอนติเจนและแอนติบอดี*

2.1.4.1 แอนติเจน (Antigen, Ag)

โดยทั่วไปแอนติเจน หมายถึง สิ่งแปลกปลอมที่แตกต่างจากร่างกาย (non-self) และร่างกายเกิดการตอบสนองต่อสิ่งนั้น ตัวอย่างของแอนติเจนเช่น จุลชีพ หรือองค์ประกอบของจุลชีพ โปรตีน สารเคมี ไกลโคโปรตีน และอนุภาคไวรัส เป็นต้น แอนติเจนที่สมบูรณ์จะมีคุณสมบัติสำคัญ 2 ประการ คือ ความสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน เรียกว่า immunogenicity กล่าวคือสารนั้นจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte อย่างจำเพาะที่เรียกว่า sensitized T lymphocyte ในคุณสมบัตินี้จึงมักใช้คำว่า immunogen แทนแอนติเจนด้วย คุณสมบัติที่สองคือ

ความสามารถของสารที่จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้น เช่น ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี และหรือ sentitized T lymphocyte เรียกว่ามี specific reactivity การที่สารทำปฏิกิริยาจำเพาะดังกล่าวนิยมใช้คำว่า แอนติเจน

แอนติเจนเป็นสารต่างๆ ที่จะมีโครงสร้างจำเพาะใน 1 โมเลกุลจะมีส่วนที่จำเพาะหรือหน่วยย่อยๆ ที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีหนึ่งๆ หน่วยย่อยๆบนโมเลกุลของแอนติบอดีนี้ เรียกว่า epitope หรือ antigenic determinant โดยทั่วไปแล้ว epitope จะปรากฏอยู่ด้านนอกของโมเลกุล ดังนั้นแอนติเจน 1 โมเลกุลอาจทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติบอดีหลายชนิดขึ้นอยู่กับจำนวน epitope ที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของแอนติเจนหนึ่งๆ (ภาพที่ 2.2) (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)

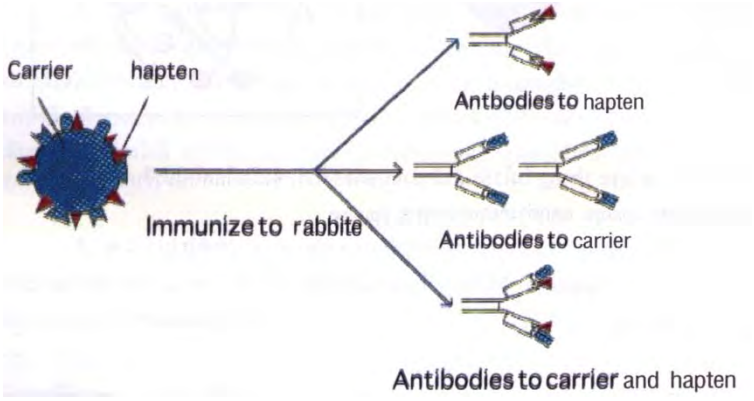


ภาพที่ 2.2 epitope หรือ antigenic determinant บนแอนติเจน แอนติเจนนี้มี epitope ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะของแต่ละ epitope จึงมีแอนติบอดี 3 แบบต่อแอนติเจนนี้ (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)

แฮปเทน (Hapten)

Hapten หมายถึง สารที่มีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลน้อยไม่สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานได้ แต่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ นั่นคือมีคุณสมบัติ specific reactivity แต่ขาดคุณสมบัติ immunogenicity ตัวอย่างเช่น ยาและฮอร์โมน อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้หากนำไปรวมกับสารอื่นๆที่ทำหน้าที่เป็น carrier ก็จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันหรือกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ carrier ที่ใช้มักเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ทำหน้าที่เสมือนเป็นแอนติเจนโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มี hapten เหล่านั้นเป็นองค์ประกอบคล้ายกับเป็น epitope หนึ่งๆ บนโมเลกุลของแอนติเจน จากการศึกษาสารที่เป็น hapten เมื่อฉีดให้กับสัตว์ทดลองพบว่าการให้ hapten เพียงลำพัง ไม่มีการตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดีขณะที่เมื่อ

ให้ hapten ผสมกับ carrier จะสามารถตรวจพบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ hapten ได้ ร่วมกับแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ carrier และแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับทั้ง hapten และ carrier ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 นำแฮปเทน (dinitropheno, DNP) ยึดติดกับ carrier เช่น Bovine serum albumin (BSA) ฉีดให้กับกระต่าย และตรวจแอนติบอดีที่กระต่ายสร้างขึ้น จะพบแอนติบอดี anti-BSA, anti-DNP และ anti-DNP/BSA (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)

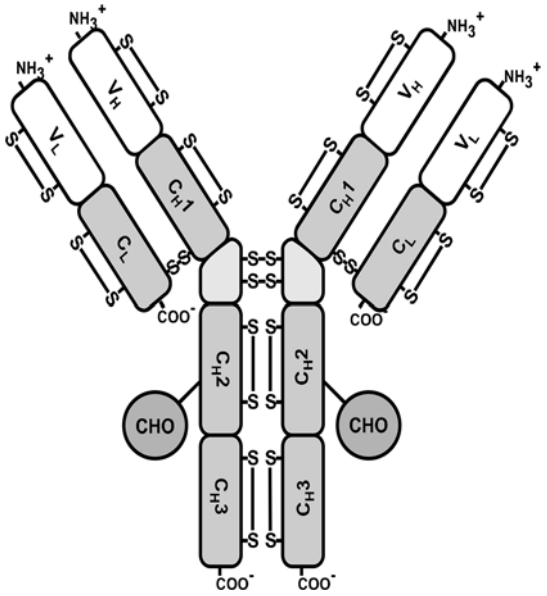
2.1.4.2 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจนที่เรียกว่าอิพิโทป (epitope) สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู้กระแสเลือดจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity)

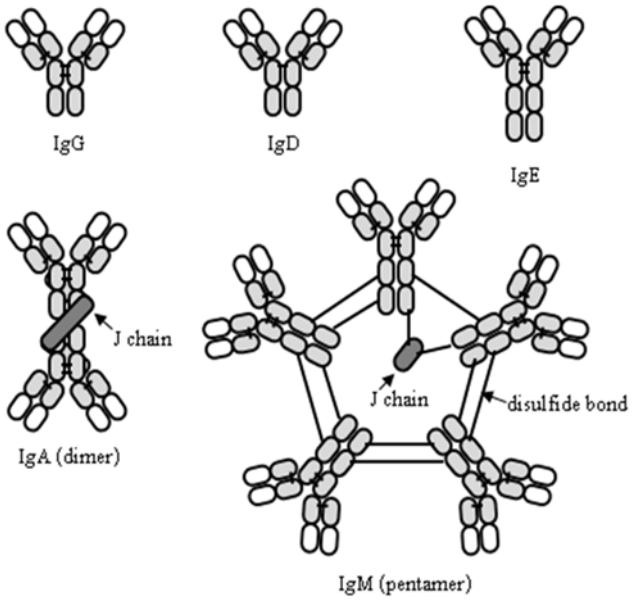
โครงสร้างของแอนติบอดี (ภาพที่ 2.4) มีโครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (L chain) และโปรตีนสายยาว (H chain) ที่กรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (N terminal) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 100-110 หน่วยที่มีความแปรปรวนมากเรียกว่าบริเวณแปรปรวน (variable region; V) โดยจะแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิดซึ่งจะเป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณคงที่ (constant region; C) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน ซึ่งในสายสั้นมี 2 ชนิดเป็น κ หรือ λ สายยาวเป็นชนิด μ, γ, α, δ หรือ ε โครงสร้างทุติยภูมิของแอนติบอดีเกิดจากการพับทบกันไปมาของสายเพปไทด์แบบ β-pleated sheet เสถียรภาพของโครงสร้างนี้เกิดจากพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายที่เชื่อมระหว่างสายเพปไทด์ที่พับไปมา ซึ่งสายเพปไทด์ม้วนทับเป็นโครงสร้างตติยภูมิอัดแน่นเป็นก้อน (globular domain) และส่วนของโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนต่างๆของสายสั้นและสายยาวอย่างละ 2 สาย

รวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิซึ่งประกอบกันเป็นบริเวณที่จับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ และแสดงปฏิกิริยาทางชีวภาพได้

ไอโซไทป์ (isotype) หรือคลาส (class) ของ Ig ชนิดต่างๆ ได้แก่ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE เกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาวบริเวณคงที่ ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้าง (ภาพปที่ 2.5) และบทบาทการทำงานแตกต่างกันไป โดยบทบาทการทำงานของแต่ละไอโซไทป์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างส่วนของโปรตีนสายยาวกับองค์ประกอบต่างๆของโปรตีนในซีรัมหรือตัวรับบนผิวเซลล์ ในหนูเมาส์ (mouse) โปรตีนสายยาวชนิด γ สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) ได้แก่ γ_1, γ_{2a}, γ_{2b} และ γ_3 เกิดเป็นไอโซไทป์ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b} และ IgG_3 ตามลำดับ ซึ่งจะแตกต่างกันตรงขนาดของข้อพับ จำนวน และตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในสายระหว่างโปรตีนสายยาว (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างโดยทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

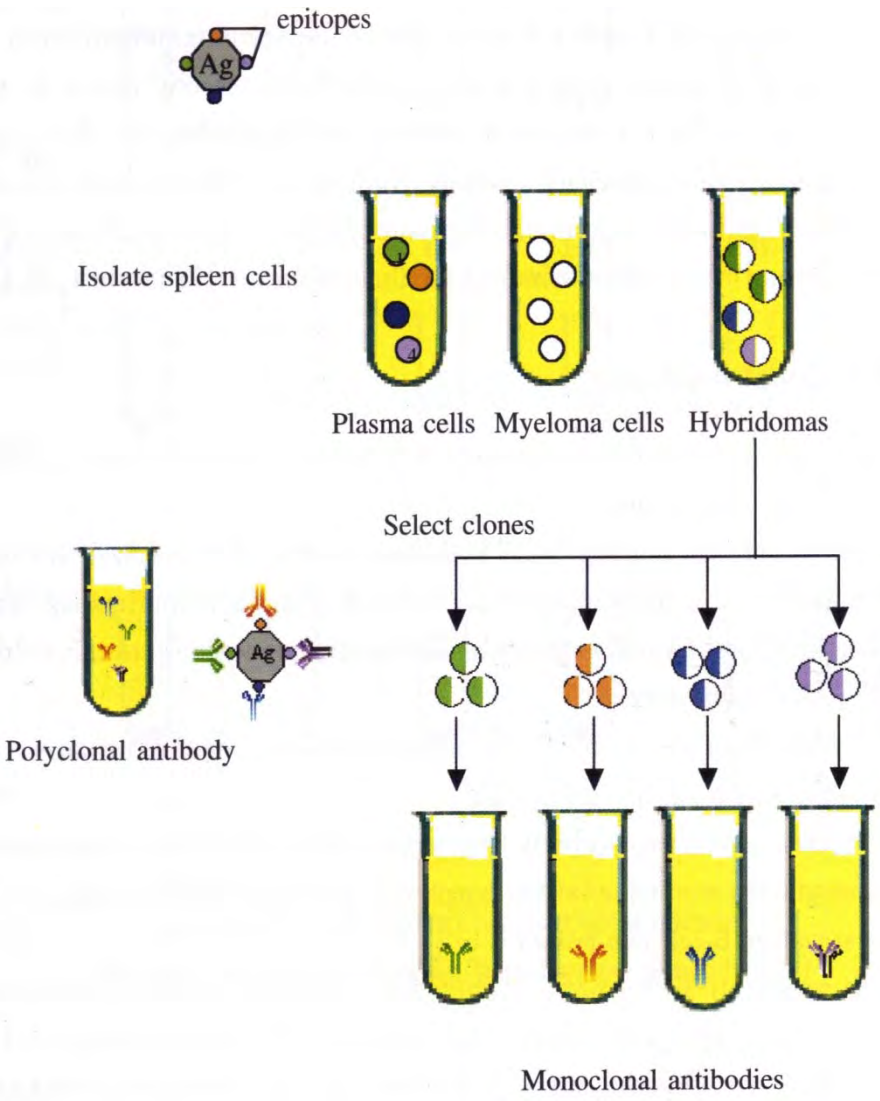
2.1.5 การผลิตแอนติบอดี (Antibody Production)

การผลิตแอนติบอดี ในสิ่งมีชีวิตจะเริ่มจากการที่ร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่เรียกว่า แอนติเจน จากนั้นกระบวนการทางภูมิคุ้มกันของร่างกายจะทำการตอบสนองต่อแอนติเจนนั้น กล่าวคือ แอนติเจนจะกระตุ้น B-cell ที่จำเพาะต่อแต่ละ epitope บนแอนติเจนพร้อมกันหลายๆ เซลล์หรือหลายๆโคลน (clone) แอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากหลายโคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อหลากหลาย epitope จะเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) (รูปที่ 2.7) อย่างไรก็ตามการสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในงานวิจัยหรืออื่นๆ สามารถสร้างและคัดเลือกแอนติบอดีที่สร้างจากโคลนเดียวหรือจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ ของแอนติเจน ซึ่งจะทำให้แอนติเจนนั้นมีความจำเพาะสูง เรียกแอนติบอดีนี้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

2.1.5.1 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีหมายถึงแอนติบอดีที่ผลิตจาก บี-เซลล์ หลายๆโคลน ซึ่งตอบสนองต่อแอนติเจนหลากหลาย epitope ทำให้แอนติบอดีผสมกันอยู่หลายชนิดที่จะจับแอนติเจนได้หลาย epitope การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน X อาจผลิตในสัตว์ทดลอง เช่น กระต่าย ม้า และแกะ โดยแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายจะเรียกว่า rabbit anti-x antibody แอนติบอดีที่ผลิตจากม้าเรียกว่า horse anti-x antibody เป็นต้น ขั้นตอนการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากเตรียมแอนติเจนตามต้องการ จากนั้นฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองที่ต้องการและรอเวลาการสร้างแอนติบอดี จากนั้นฉีด

กระตุ้นซ้ำ เพื่อให้สร้างแอนติบอดีปริมาณมากทำการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง และปั่นเก็บแยกซีรัมเก็บไว้ใช้งานต่อไป (ภาพที่ 2.6) (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)



ภาพที่ 2.6 แอนติเจนที่ประกอบด้วย epitope 4 แบบ หากผลิตแบบพอลิโคลนอลแอนติบอดี จะได้ซีรัมที่มีความจำเพาะต่อ epitope ทั้ง 4 แบบ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะได้แอนติบอดีจำเพาะต่อ epitope หนึ่งๆ บนแอนติเจน (กฤษณา จรรยาพูน, 2552)

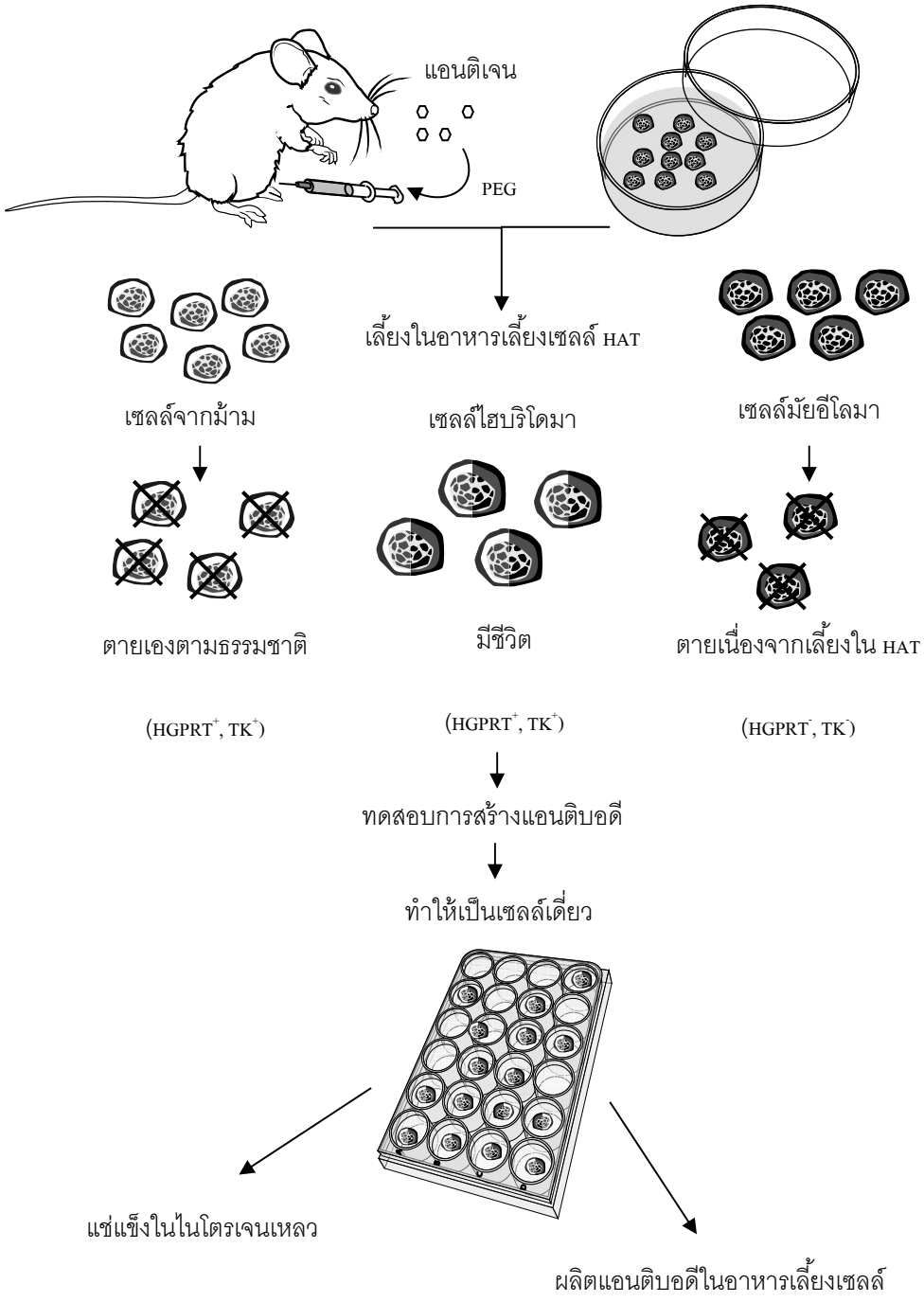
2.1.5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้หลักการ somatic hybridization

การใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากพอลิโคลนอลแอนติบอดีทำได้ยากมาก แต่ในปี ค.ศ.1975 George Kohler และ Cesar Milestein หาแนวทางในการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ ซึ่งได้กลายเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญทางภูมิคุ้มกัน จากการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมารวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือมัยอีโลมาเซลล์ (myeloma cell)

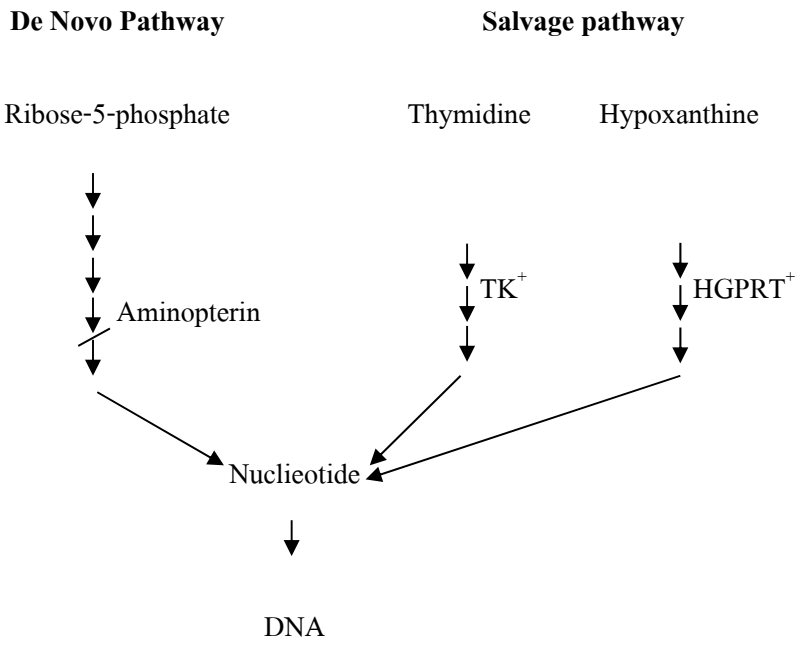
กลายเป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งมีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัดของเซลล์มะเร็งสามารถสร้างแอนติบอดีได้ ทำให้สามารถผลิตโคลนของไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้จำนวนมากและไม่จำกัดปริมาณ เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและใช้ในงานต่างๆได้อย่างกว้างขวาง ทำให้ Kohler และ Milestein ได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ.1984 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจาก นำบี-เซลล์จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาโดยการใช้โพลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) (ภาพที่ 2.7) ในทางปฏิบัติไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง ไม่หลอมรวมกัน และไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกให้มีเพียงแค่เซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ โดยการใช้เซลล์มัยอีมาที่ถูกทำให้มีความบกพร่องของเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) ที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน Salvage pathway (ภาพที่ 2.8) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งมี hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ผสมอยู่ aminopterin จะไปขัดขวาง de novo pathway ซึ่งเป็นอีกกระบวนการพื้นฐานในการสร้างนิวคลีโอไทด์ ส่วน hypoxanthine และ t thymidine ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้ Salvage pathway ดังนั้นเซลล์มัยอีโลมาที่ไม่หลอมรวมหรือหลอมรวมกันเองที่ขาดเอนไซม์ HGPRT และ TK จะตายในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เพราะไม่สามารถใช้ Salvage pathway ในการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ จึงมีเพียงเซลล์ที่เป็นไฮบริโดมาเท่านั้นที่มีชีวิตรอด ส่วนบี-เซลล์หรือเซลล์อื่นที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะสั้นๆและจะตายไปเอง เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาแล้วจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง ไฮบริโดมาจำนวนมากผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนอื่นๆที่ไม่ต้องการจึงจำเป็นต้องคัดออก วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไป ได้แก่ ELISA และ immunoassay ต่างๆ

หลังจากสามารถพิสูจน์ทราบว่าได้ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะที่ต้องการแล้ว จำเป็นต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวจริง และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาณที่ต้องการต่อไป



ภาพที่ 2.7 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง



ภาพที่ 2.8 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ De Novo และ Salvage pathway (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.1.5.3 ความแตกต่างระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว พอลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) หลาย ๆ ชนิดรวมกัน เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำการกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบีเซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทป เป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีที่จำเพาะกับแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ในซีรัม เรียกว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดี แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมบางครั้งอาจลดประสิทธิภาพ หรือ ก่อให้เกิดปัญหาในการใช้นอกร่างกาย เช่น ในการวินิจฉัย การรักษา รวมถึงในงานวิจัยต่าง ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี กับแอนติเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในซีรัมมีอยู่หลายชนิด การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากโคลนต้นกำเนิดเพียงโคลนเดียวของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนแอนติเจน จะสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด จะแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	พอลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำ ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่น ๆ ได้	ความจำเพาะสูง เนื่องจากจำเพาะกับอิพิโทปเดียวของแอนติเจน
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อิพิโทปเดียวของแอนติเจน
ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 μg/ml
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	เมื่อเลี้ยงในถึงปฏิกรณ์แบบปั่นกวน ปริมาณไม่จำกัด
ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ได้	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้น จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอิพิโทปเดียว จึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะเวลาเริ่มต้น
ข้อดี	ต้นทุนต่ำ	มีความจำเพาะสูง
	ง่ายต่อการผลิต	ผลิตได้ไม่จำกัด
	ใช้เวลาในการผลิตน้อย	แอนติบอดีที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ
ข้อเสีย	คุณภาพแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจหาสารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลินนิยมตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณโดยใช้วิธีทางเคมี เช่น HPLC และ LC-MS-MS ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความแม่นยำสูง เพื่อจะให้การตรวจมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์มากขึ้น โดยในปี 2003 Cherlet และ Baere ได้พัฒนาวิธีการตรวจ OTC และ 4-epiOTC ในเนื้อลูกวัว โดยใช้เทคนิค HPLC positive electrospray ionization mass spectrometry เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ โดยใช้ solid phase extraction ในการทำความสะอาด polymeric reverse phase column เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS-MS โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ตัว และใช้อุณหภูมิ 60ºC ในการวิเคราะห์ โดยวิธีนี้ได้ทำการตรวจยืนยัน ค่าปริมาณสารตกค้างที่มากที่สุดที่ยอมให้พบได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (MRLs) ที่ EU กำหนดในเนื้อสัตว์ (100 ppb) ตับ (400 ppb) และ ไต (600 ppb) พบว่าสามารถให้ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัด (LOD) OTC และ 4-epiOTC ได้ ที่ 0.8-48.2 ppb ตามลำดับ

ต่อมาในปี 2008 Maia และ Rath ได้พัฒนาการใช้ HPLC โดยมี fluorescence detector เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ในการตรวจหาปริมาณ OTC ตกค้างในมะเขือเทศ โดยการใช้ liquid – liquid extraction และ solid phase extraction ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ ร่วมกับการใช้ Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) C18 column โดยใช้ตัวเคลื่อนที่ซึ่งมีส่วนประกอบของ MeOH : $CaCl_2$ EDTA และ $C_2H_3NaO_2$ ในอัตราส่วน 70:30 (w/v) การตรวจวิเคราะห์พบว่าให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบเชิงปริมาณ (LOQ) ที่ระดับต่ำกว่า 250 ppb ซึ่งเป็นค่า MRL สำหรับ OTC ของประเทศบราซิล

ในปี 2005 Anderson และคณะ ได้ใช้เทคนิค LC-MS-MS ในการตรวจหาสารในกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างในกุ้งและน้ำนม โดยใช้ คอลัมน์ปีน polar end capped C8 column ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น organic acid acetonitrile และ ตัวตรวจวัดสัญญาณ UV และ mass spectrometry โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 nm ซึ่งสามารถตรวจวัดสารในกลุ่มเตตราซัยคลินในเชิงปริมาณในกุ้งและน้ำนม ได้ในระดับ 25-400 ng/g และ 50-300 ng/g ตามลำดับ

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน ตกค้างโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาได้เริ่มมีการตรวจวิเคราะห์ในปี 1981 โดย Faraj และคณะ ซึ่งได้มีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC เพื่อใช้ในการตรวจหา TC โดยใช้เทคนิค Radioimmuno assay (RIA) ซึ่งได้เชื่อม TC-HCl กับ โปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich แล้วฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย หลังจากที่ได้

พอลีโคลนอลแอนติบอดีแล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับเตตราซัยคลินโดยใช้ [^{3}H]TC เป็นตัวแข่งขัน พบว่าวิธี RIA สามารถให้ค่า LOD และให้ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้การยับยั้งลดลง 50% (inhibition concentration; IC_{50}) ที่ 1 และ 7 นาโนกรัมตามลำดับ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารภายในกลุ่ม เช่นคลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลิน ที่ 39 และ 10 % ตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจสอบเตตราซัยคลินในพลาสมาและปัสสาวะของสุนัข พบว่าให้ % recovery ในช่วง 90-95%

หลังจากนั้นในปี 2007 Navarro และ คณะ ได้ตรวจหาสารตกค้างในกลุ่ม TC ในน้ำผึ้ง โดยพัฒนาการสังเคราะห์ hapten และความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ สำหรับใช้ในเทคนิค immunoassay การผลิต hapten มีพื้นฐานมาจากการสร้าง อนุพันธ์ของ carboxamino และ diazo โดยที่โครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม TCs และส่วนแขนของสารยังคงอยู่ เพื่อทำให้มีหมู่ทำปฏิกิริยาเหมาะสมต่อการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ โดยปฏิกิริยา mannich หลังจากฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะถูกนำมาทดสอบกับ TC และปรับปรุงปัจจัยที่ใช้ในเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (PBS-T 10 mmol/L, pH 7.5, 0.01% Tween 20 และเวลาในการทำปฏิกิริยา 45 นาที) ซึ่งตรวจพบสารได้ต่ำที่สุด 0.4 ppb และมีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ RTC OTC และ CTC 91, 30 และ 14% ตามลำดับ ให้ค่า % recovery ในช่วง 79-108% ในปีเดียวกัน Zhang และ คณะ ได้พัฒนาวิธีตรวจหา TC ในน้ำนม โดยได้ทำการผลิต polyclonal antibody โดยใช้อิมมูโนเจน 3 ชนิดซึ่งมีวิธีการเชื่อมกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน มาฉีดกระตุ้นในกระต่าย หลังจากที่ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมา ได้ทำการทดสอบความสามารถทำปฏิกิริยากับ TC โดยใช้วิธี homologous ELISA และ heterologous ELISA ซึ่งพบว่าการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี heterologous ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า ซึ่งสามารถให้ค่า IC_{50} ที่ 3.92 ppb ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่ม เช่น CTC และ OTC ที่ 112 และ <2 % ตามลำดับ และให้ค่า % recovery ในช่วง 74-116 % โดยมีค่า intra และ inter coefficient < 14.5 และ < 25.0 ตามลำดับ

นอกจากนั้น Jeon และ Kim (2008) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ TC เพื่อตรวจหาสารตกค้าง TC ในน้ำนมด้วยเทคนิค biotin-avidin mediated competitive ELISA โดยใช้พอลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ที่ได้จากแกะเป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ใช้ anti-sheep IgG ที่ได้จากกระต่ายเป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ และใช้ horseradish peroxidase-conjugated avidin เป็นตัวตรวจวัดพบว่าให้ค่า LOD และ LOQ ที่ระดับ 0.048 และ 0.48 ppb ตามลำดับ โดยไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs อย่างมีนัยสำคัญ (CTC 13.7% และ OTC 10.0% ตามลำดับ) และมี % recovery ที่ 90%

ปี 2008 Zhao และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์หา CTC ในเนื้อสัตว์สำหรับบริโภค โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CTC จากกระต่าย ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าตรวจวัด OTC ได้ในช่วง 0.1-312.5 ppb และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.0±6.0 ppb เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี HPLC และชุดตรวจสอบสำเร็จรูป พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไว รวดเร็ว ประหยัดและน่าเชื่อถือ สำหรับการ screening CTC ในตัวอย่างทดสอบ y

ต่อมาในปี 2009 Le และคณะ การพัฒนาการตรวจหา doxycycline โดยวิธี indirect ELISA ในตัวอย่างเนื้อและตับไก่ โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.74 ppb และ LOD เท่ากับ 1.96 ppb เกิดปฏิกิริยาข้ามน้อยกับ OTC (10.71%) TC (4.10%) และ CTC (1.89%) ให้ค่า % recovery ในสำหรับตัวอย่างตับและเนื้อไก่ ในช่วง 80.19-89.41 % และ 83.98-94.74% ตามลำดับ และโดยมีค่า intra coefficient ในสำหรับตัวอย่างตับและเนื้อไก่ ในช่วง 5.75 % และ 7.53% ตามลำดับ มีค่า inter coefficient ในสำหรับตัวอย่างตับและเนื้อไก่ ในช่วง 5.92 % และ 7.21% ตามลำดับ นอกจากนี้ Le และคณะ ในปี 2011 ได้พัฒนาวิธีตรวจหา CTC โดยวิธร ELISA และ Immunochromatograph พบว่าวิธี ELISA ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.66 ppb วิธี immunochromatography มีค่า LOD เท่ากับ 0.12 ppb

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนู Mouse สายพันธ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์มัยอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NS-I)	ATCC No: TIB 18

3 .2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เข็มฉีดยาขนาด18G และ 21G	Nipro, Thailand
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (vortex)	Sientific Industries, Inc., USA
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	BIO-TEK Instrument, Inc., USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Metter Toledo, USA
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเซลล์	Corning Incorporated, USA
จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Corning Incorporated, USA
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation, USA
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co.,Ltd., Thailand
ทิป (tip) ขนาด 0.01, 0.2 และ 1 มิลลิลิตร	Axygen, USA
ปั๊มลม	Iwaki, Japan
ปิเปตแก้ว	HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII Memmert, Japan
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (cryotube)	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Aminopterine	Sigma-Aldrich, USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
BCA™ protein assay kit	Pierce, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	Fluka, China
Citric acid	Merck, Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Diethyl ether	Merck, Germany

สารเคมี	แหล่งที่มา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka, Switzerland
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Germany
Doxycycline (DC)	Sigma-Aldrich, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Fetal calf serum (FCS)	Invitromax, USA
Formaldehyde	Sigma-Aldrich, USA
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	T.P. drug laboratories (1969) Co.,Ltd., Thailand
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
Isotyping kit	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	BDH, England
2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)	Fluka, China

สารเคมี	แหล่งที่มา
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, USA
O-phenylenediamine (OPD)	Abkem Iberia L.S., Spain
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline hydrochloride (OTC)	Fluka, China
Penicillin G	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol (PEG, MW	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
Rolitetracycline (RTC)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Salbotamol	Sigma-Aldrich, USA
Skim milk	Anline, Thailamd
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Carlo Erba, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Germany

สารเคมี	แหล่งที่มา
Tetracycline hydrochloride (TC)	Sigma-Aldrich, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Riedel-de Haën, UK

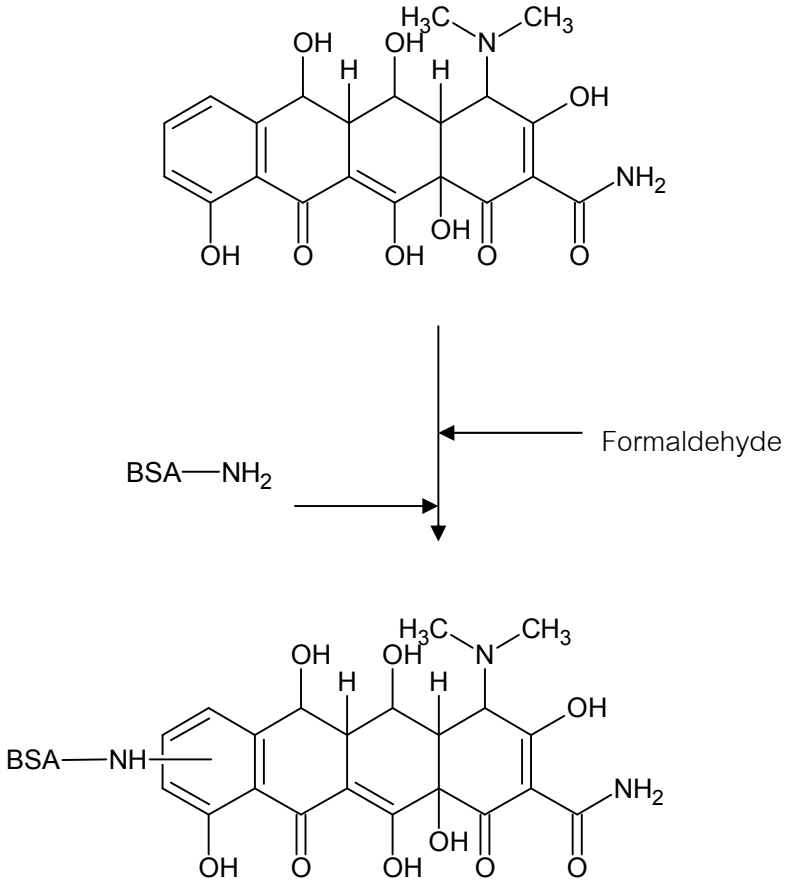
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.4.1.1 การเตรียม OTC เชื่อมกับ BSA หรือ Ovallbumin (OVA) โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich

เตรียม BSA หรือ OVA เชื่อมกับ OTC โดยผสม BSA หรือ OVA 10 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร เติม OTC 4 มิลลิกรัม ที่ละลายใน 30% เอทานอล 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมสารละลายโซเดียม อะซิเตทบัฟเฟอร์ (3 M pH 5.5) 0.2 มิลลิลิตร และสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 7.5% (v/v) 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำไดอะไลซีส (dialysis) ในสารละลายโซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) pH 7.4 โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน หลังจากทำไดอะไลซีส ในบัฟเฟอร์ นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนรวม โดยใช้ BCA™ ดังรายละเอียดข้อ 3.4.1.2 (Faraj และคณะ, 1980) ขั้นตอนการเตรียม OTC-OVA แสดงในภาพที่ 3.1

นำแอนติเจนและโปรตีนพาหะไปวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยวิธี Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) และคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติด



ภาพที่ 3.1 แสดงการเชื่อมติดของ OTC กับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich

ที่มา : Faraj และคณะ, 1980

3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี bicinchoninic acid protein assay (BCA) โดยใช้ BCA™ protein assay kit (บริษัท Pierce, USA) โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเตรียมสารตัวอย่าง ด้วย PBS เพื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยผสมสารละลาย A โซเดียมไฮดรอก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดไบคาร์บอนิค และโซเดียมทาเทรตอยู่ และสารละลาย B คูปลิกซัลเฟต เข้มข้น 4% ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย A และ B ที่ผสมเข้ากันแล้ว หลุมละ 200 ไมโครลิตร

แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 562 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำข้อมูลระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างมาสร้างกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณกลับไปเป็นปริมาณโปรตีน

3.4.1.3 การคำนวณอัตราส่วนโมเลกุลของ OTC ที่เชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF-MS

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี (MALDI-TOF-MS) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อหามวลโมเลกุลของสารหลังเชื่อมติดและโปรตีนพาหะ คำนวณอัตราส่วนการเชื่อมติดของโมเลกุล OTC ต่อโปรตีนพาหะ BSA และ OVA โดยคำนวณจาก

$$\text{อัตราส่วนการเชื่อมติด} = \frac{\text{มวลโมเลกุลหลังการเชื่อมติด - มวลโมเลกุลก่อนเชื่อมติด}}{\text{มวลโมเลกุลของ OTC}}$$

3.4.2. การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย OTC-BSA

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย OTC ที่เชื่อมติดกับ BSA โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสมกับ Freund’s complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ฉีดเข้าภายในช่องท้องหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ 100 ไมโครกรัมต่อตัว และฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยผสมกับ Freund’s incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) หลังการกระตุ้นครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน เก็บเลือดจากหางของหนูทดลอง เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ OTC ในรูปอิสระ ได้หรือไม่โดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ที่เตรียมได้จากวิธีเดียวกับการเตรียม OTC-BSA ในข้อ 3.4.1.1 แต่เปลี่ยนโปรตีนพาหะจาก BSA เป็น OVA มาเคลือบบนจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA เลือกหนูทดลองที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดและสามารถจับกับ OTC อิสระได้ไปทำการหลอมรวมเซลล์ ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน ฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อตัว โดยไม่ผสม Freund’s adjuvant

3.4.3. การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์นำเซลล์มัยอีโลมา NSI เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (Fetal calf serum: FCS) ความเข้มข้น 10% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (log phase) ในวันหลอมรวมเซลล์นับเซลล์ที่มีชีวิตให้มีจำนวนมากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มีเจนตามัยซิน (gentamycin) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามที่เตรียมไว้

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

เตรียมได้จากการนำหนูทดลองที่ให้ค่าระดับแอนติบอดีต่อ OTC ที่สูง (ข้อ 3.4.2) ทำการสลบหนูโดยใช้ไดเอทิลอีเธอร์(diethylether) เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัมไว้ใช้ต่อไป ทำการเปิดช่องท้องนำม้ามออกมาโดยวิธีปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบา ๆ ให้ละเอียด เมื่อได้เซลล์ม้ามแล้วนำไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มีเจนตามัยซิน เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมไว้

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Cell fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูจากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์มัยอีโลมาจากข้อ 3.4.3.1 ในอัตราส่วน 1:2 ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์ไม่เกาะตัวเป็นก้อน หลังจากนั้น หยดโพลีเอทีลีนไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์บางลง จึงทำให้เกิดการหลอมรวมเซลล์ ลงไปพร้อมกับหมุนหลอดทดลองและเคาะเบาๆ โดยควบคุมการหยด PEG 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนตามัยซินความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นและลงเพื่อเจือจาง PEG หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก นำเซลล์ที่ได้เติมลงใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปิเปตเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโตประมาณ 25% ของพื้นที่หลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมไปทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC หรือไม่โดยวิธี Indirect ELISA

3.4.3.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ OTC

3.4.3.4.1 การคัดเลือกเซลล์โดยวิธี Indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย OTC-OVA (เตรียมได้โดยวิธีเดียวกันกับการเตรียม OTC-BSA ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS ที่มี Tween 20 (PBS-T) เข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) เข้มข้น 5% (v/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase (GAM-HRP) เชื่อมติดอยู่ ที่ความเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับเสตรตที่มีโอฟีนิลลีนไดเอมีน (O-phenylenediamine, OPD) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ละลายใน 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟต ซิเตรต บัฟเฟอร์ (Phosphate citrate buffer) pH 5.0 หลุมละ 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ OTC ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยปิเปต

สารละลาย OTC ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานหลุม ELISA ที่เคลือบด้วย OTC-OVA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนยและล้างด้วย

PBS-T แล้ว จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือซีรัมหนู จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกในขั้นตอนแรก (ข้อ 3.4.3.4.1) ลงไปผสมกับสารละลาย OTC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี Indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติม OTC ในรูปอิสระให้การดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า หลุมที่ไม่มีการเติม OTC นั่นจะแสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสาร OTC ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

3.4.3.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมามาจากต้นกำเนิด เซลล์เพียงเซลล์เดียว นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระจาการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเป็นโคโลนีเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ มาตรวจหาว่าเซลล์ยังคงมีแอนติบอดีต่อ OTC หรือไม่ ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC จึงทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

โดยนำเซลล์ไฮบริมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงต่อในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10%(v/v) ให้อยู่ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด (log phase) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งที่มีไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้น 10% (v/v) ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นจึงย้ายลงไปไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจาการเก็บในไนโตรเจนเหลวมาแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันทีเมื่อน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในหลอดละลายหมดแล้ว ให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยง

เซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v)

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการเตรียมแอนติบอดี ที่จำเพาะกับไอโซไทป์ชนิดต่าง ๆ คือ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM จาก Isotyping kit มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:1,000 เท่าใน PBS เติม ลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำจาน มาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไทป์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ (โดยที่แอนติบอดีทุติยภูมิมีความจำเพาะกับส่วน Fab (HRP-Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนู ที่เจือจาง 1:2,000 ใน PBS บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายในฟอสเฟตซิเตรต บัฟเฟอร์ pH 5.0 ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1 M หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50% (50% of inhibition concentration; IC_{50}) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาทำการเติมลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.001-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม

หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม Graph pad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่า ล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD

โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นที่ B_0-3SD เมื่อ B และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มีการเติมแอนติเจนและไม่เติม แอนติเจน ตามลำดับ และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

ความจำเพาะของแอนติบอดีจะรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยจะทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้กับสารอื่นๆ ทั้งในกลุ่ม และนอกกลุ่ม TCs โดยการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ซึ่งได้จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และเติมลงไปผสมกับสาร OTC และ ตัวแข่งขันที่ต้องการทดสอบซึ่งเป็นสารในกลุ่ม TCs จำนวน 4 ชนิด คือ TC, CTC, DC และ RTC รวมถึงสารนอกกลุ่ม TCs จำนวน 9 ชนิด คือ Norfloxacin, Penicilin G, Avermectin, Streptomycin, Sulfaquinoxaline, AMOZ, Clenbuterol, Chloramphenicol, Metronidazole ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.001- 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สาร OTC - OVA ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่าล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยั้บยั้งที่ 50 % (50% of inhibition concentration; IC_{50}) หาได้จากการนำค่าที่ 50% B/B_0 มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของ OTC}}{IC_{50} \text{ ของ ตัวแข่งขันอื่น}} \times 100$$

บทที่ 4

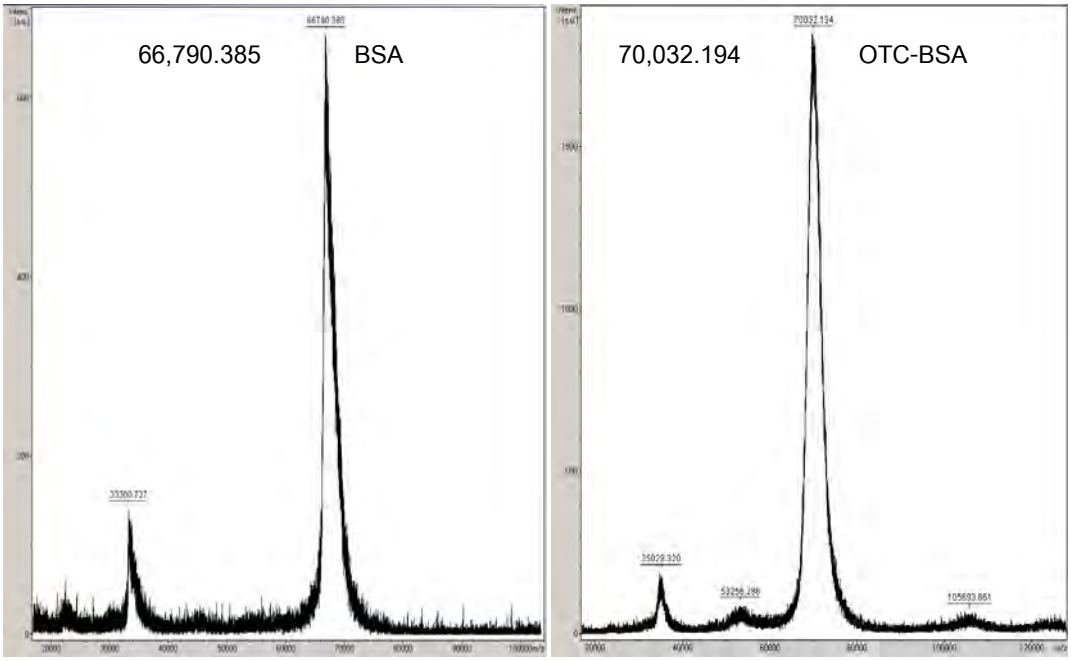
ผลการดำเนินการวิจัยและอภิปราย

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline, OTC) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่เรียกว่าแฮปเทน (hapten) ไม่เหมาะในการใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดี ดังนั้นจึงต้องทำการเชื่อมติด OTC เข้ากับโปรตีนพาหะ ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ก่อนนำไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

จากการเตรียมแอนติเจนที่จะใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง โดยทำการเชื่อมต่อ OTC กับโปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งจะมีการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้มีการควบแน่นระหว่างหมู่อะมิโนของ BSA กับวงฟีนอลของ OTC (Faraj และ คณะ, 1980) นำ OTC-BSA วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำการเชื่อมติดที่ความเจือจางต่างๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร พบว่า OTC-BSA ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 3.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการหาอัตราส่วนโมเลกุลของ OTC ที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะBSA 1 โมเลกุล โดยการหามวลโมเลกุลที่เปลี่ยนไปของ BSA โดยเทคนิค MALDI-TOF-MS แสดงในภาพที่ 4.2 จากโครมาโตรแกรมที่ได้พบว่า โปรตีนพาหะ BSA มีมวล 66,790.385 ดาลตัน และโปรตีนหลังการเชื่อมติด (OTC-BSA) มีมวล 70,032.194 ดาลตัน มีมวลโมเลกุลมากขึ้น 3,241.809 ดาลตัน ซึ่งเมื่อคิดเทียบกับมวลโมเลกุลของ OTC-HCl (มวลโมเลกุล 460 ดาลตัน) พบว่ามีอัตราส่วนที่เชื่อมติดกับ BSA 1 โมเลกุล 1 เท่ากับ 7 โมเลกุลของ OTC



ภาพที่ 4.1 โครมาโตรแกรมของมวลโมเลกุลของ OTC-BSA เมื่อเทียบกับ BSA โดยวิธี MALDI-TOF-MS

4.2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูในการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC

จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองจำนวนทั้งหมด 10 ตัว ด้วยแอนติเจน OTC-BSA ที่เตรียมได้ โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันจำนวน 4 ครั้งก่อนเจาะเลือด หลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 4 ประมาณ 1 สัปดาห์ เจาะเลือดนำซีรัมจากหนูทดลองทั้งหมด มาหาระดับแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect ELISA และทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC โดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยเลือกหนูทดลองที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด และสามารถจับกับ OTC ในรูปอิสระได้ เพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

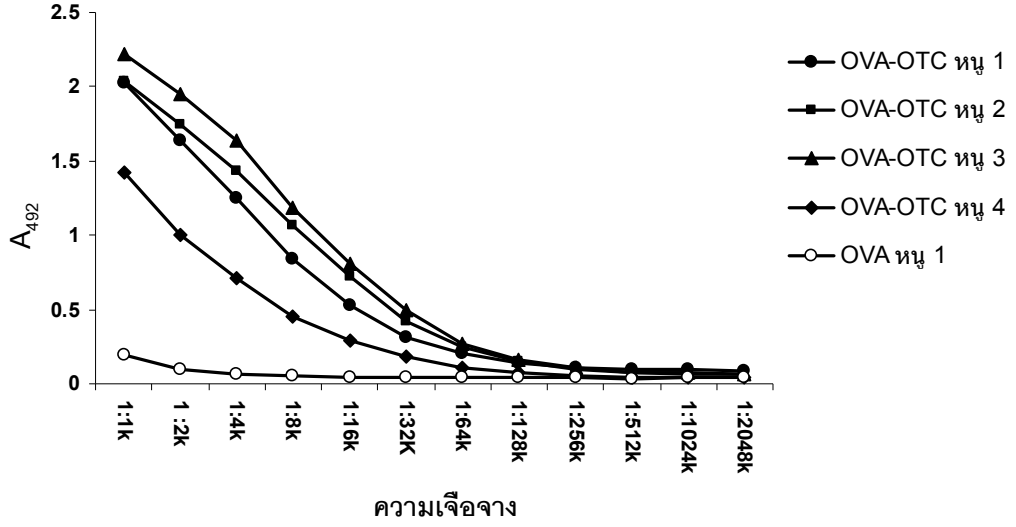
4.2.1 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

จากการหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA ได้ผลดังภาพที่ 4.2 โดยเลือกระดับแอนติบอดีที่ความเจือจาง ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 0.1 พบว่าหนูทั้ง 10 ตัว สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC-BSA ได้ พบว่าหนูทั้ง 10 ตัวให้ระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:16,000 – 1:128,000 โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีต่ำที่สุด คือ หนูตัวที่ 8 ให้ระดับแอนติบอดี 1:16,000 ส่วนหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด คือ หนูตัวที่ 3 และ 7 โดยให้ระดับแอนติบอดี 1:128,000 ดังตารางที่ 4.1

จากภาพที่ 4.2 จะพบว่าลักษณะของกราฟของหนูตัวที่ 1-4 ที่ใช้ OTC-OVA เคลือบที่ก้นหลุมมีค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผกผันกับค่าความเจือจางของซีรัม ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟของหนูตัวที่ 1 ที่ใช้ OVA เคลือบที่ก้นหลุม จะพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงต่ำเท่ากันตลอดทุกความเจือจาง นั่นแสดงให้เห็นว่า ซีรัมมีการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC-OVA แต่ไม่จับกับโปรตีนพาหะ OVA ซึ่งหนูตัวอื่น ๆ ก็ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน

ตารางที่ 4.1 ระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA

หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดี
1	1:64,000
2	1:64,000
3	1:128,000
4	1:32,000
5	1:128,000
6	1:64,000
7	1:128,000
8	1:16,000
9	1:32,000
10	1:64,000



ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 4 ตัว จาก 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม เทียบกับ ซีรัมของหนูตัวที่ 1 ที่ใช้แอนติเจน OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุม โดยใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:1,000 ถึง 1:1,024,000

4.2.2 ความสามารถในการจับของแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ

จากการทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีในซีรัมกับ OTC ในรูปอิสระ โดยวิธี Indirect competitive ELISA พบว่าซีรัมจากหนูทั้ง 10 ตัวสามารถทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรในหลุมที่มี OTC ลดลงเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่มี OTC นั่นแสดงให้เห็นว่าซีรัมจากหนูทั้ง 10 ตัวสามารถจับกับ OTC ในรูปอิสระได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยากับ OTC ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 19-52 % ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการจับกับ OTC ในรูปอิสระ จากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA โดยวิธี Indirect competitive ELISA

หนูตัวที่	ระดับความเจือจางในซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร		
		ไม่มี OTC	OTC (50 µg/ml)	% A_{492} ที่ลดลงเมื่อเติม OTC
1	1:2,000	1.004	0.722	28.09
2	1:2,000	1.318	0.678	48.56
3	1:2,000	1.530	0.989	35.36
4	1:1,000	0.749	0.422	43.66
5	1:2,000	0.454	0.366	19.38
6	1:2,000	1.043	0.578	44.58
7	1:4,000	0.724	0.308	57.46
8	1:4,000	0.538	0.268	50.19
9	1:4,000	0.890	0.508	42.92
10	1:4,000	0.578	0.278	51.90

4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA กับเซลล์มัยอีโลมา (NSI) จากหนูทั้งหมด 10 ตัว หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์เป็นระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับพบว่าเซลล์ไฮบริโดมา เริ่มมีการเจริญเติบโตภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT โดยจะเห็นเซลล์ขนาดเล็ก ลักษณะกลมใสเริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีภายในหลุม

หลังจากที่มีการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาเซลล์ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาเจริญขึ้น มาคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ โดยวิธี Indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 492 nm มากกว่า หรือเท่ากับ 0.7) มาทำการทดสอบต่อไปเพื่อดูว่าเซลล์ไฮบริโดมาสามารถผลิตแอนติบอดีที่ต่อ OTC ในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี Indirect competitive ELISA ให้ผลดังตารางที่ 4.3

ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 10 ครั้ง ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC อิสระทั้งหมด 3 หลุม นำทั้ง 3 หลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ มาจากเซลล์เริ่มต้นเพียงเซลล์เดียวและยังคงสร้างแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ โดยตั้งชื่อโคลนที่ได้ คือ 2-4F, 7-3G และ 11-11A หลังจากนั้นเพิ่มจำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดใหญ่แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ไว้เพื่อศึกษาลักษณสมบัติ ต่อไป

อย่างไรก็ตามจากผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 10 ครั้ง จะพบว่าจากจำนวนหลุมตั้งต้น 1152 หลุม จะพบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ ตั้งแต่ 41.66-100% แสดงให้เห็นว่า การหลอมรวมเซลล์มีประสิทธิภาพ แต่เซลล์ไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระมีจำนวนน้อย ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการคัดเลือกเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ OTC ในรูปอิสระ เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ส่วนใหญ่เมื่อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ จะสูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป ซึ่งจะเห็นได้จากเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบอีกครั้งโดยวิธี Indirect ELISA แล้วให้ผลการทดลองเป็นลบ ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ยังคงผลิตแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระเพียงแค่ 3 โคลน

ตารางที่ 4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 10 ครั้ง ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ OTC-BSA

ครั้งที่	ระดับแอนติบอดี	จำนวนหลุมตั้งต้น	จำนวนหลุมที่เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดี	จำนวนหลุมที่แอนติบอดีจับกับ OTC	รหัสโคลนที่ได้
1	1:64,000	1152	768	18	0	-
2	1:64,000	1152	1152	72	0	-
3	1:128,000	1152	768	8	0	-
4	1:32,000	1152	1152	82	1	7-3G
5	1:128,000	1152	716	5	0	-
6	1:64,000	1152	784	4	0	-
7	1:128,000	1152	960	9	0	-
8	1:16,000	1152	480	2	0	-
9	1:32,000	1152	960	7	1	2-4F
10	1:64,000	1152	960	15	1	11-11A

4.4 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีมาตรฐาน IgG_3 เป็นตัวควบคุม พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F และโคลน 11-11A มีไอโซไทป์ IgG_1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 7-3G มีไอโซไทป์ IgG_{2a} ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดี	ไอโซไทป์
2-4F	IgG_1
7-3G	IgG_{2a}
11-11A	IgG_1

4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ

จากการหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect ELISA โดยเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับ 1.00 พบว่าได้ความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ11-11A ที่เหมาะสม คือ 1: 256 , 1:32 และ 1:128 ตามลำดับ โดยใช้แอนติเจน OTC-OVA 20 µg/ml ในการเคลือบก้นหลุมดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A กับค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบวิธี Indirect ELISA

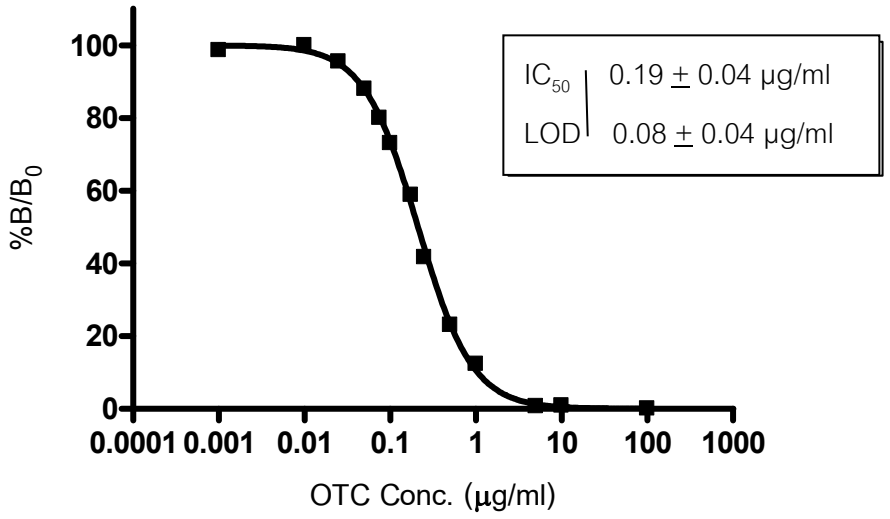
ความเจือจาง	A_{492}		
	2-4F	7-3G	11-11A
1:2	1.797	0.773	1.819
1:4	1.707	1.018	1.809
1:8	1.714	1.138	1.788
1:16	1.727	1.202	1.937
1:32	1.721	**1.026**	1.817
1:64	1.636	0.854	1.658
1:128	1.477	0.577	**1.238**
1:256	**1.267**	0.450	0.879

ทำการหาค่า IC_{50} และ LOD โดยใช้ความเจือจางที่เหมาะสมของแต่ละโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำมาคำนวณผลโดยใช้โปรแกรม Graph pad prism 4 ได้ผลดังภาพที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 พบว่าทั้ง 3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ 2-4F, 7-3G และ 11-11A ให้ค่า IC_{50} เฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.19 ± 0.04, 0.56 ± 0.10 และ 2.66 ± 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) ตามลำดับ และให้ค่า LOD เฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.08 ± 0.03, 0.20 ± 0.18 และ 0.96 ± 1.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm)

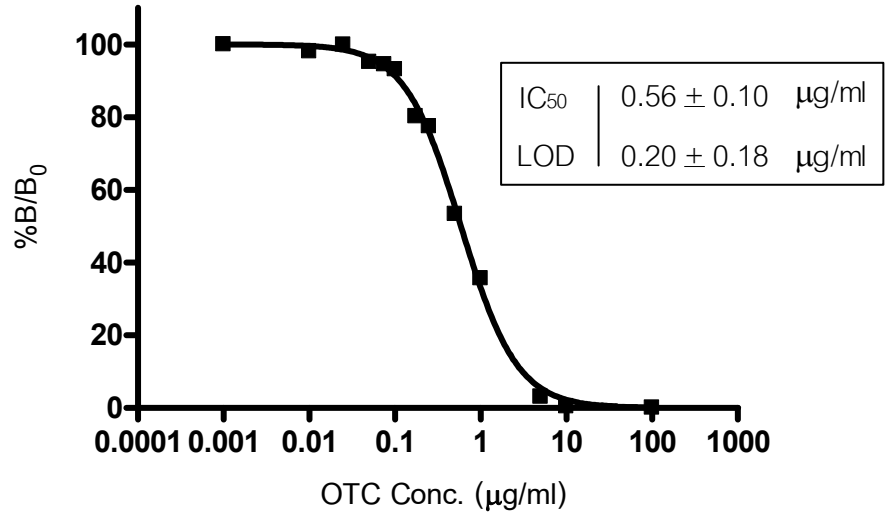
ซึ่งจะเห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความไวต่อ OTC ต่างกัน โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวมากที่สุด คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F รองลงมาคือ 7-3G และ 11-11A ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

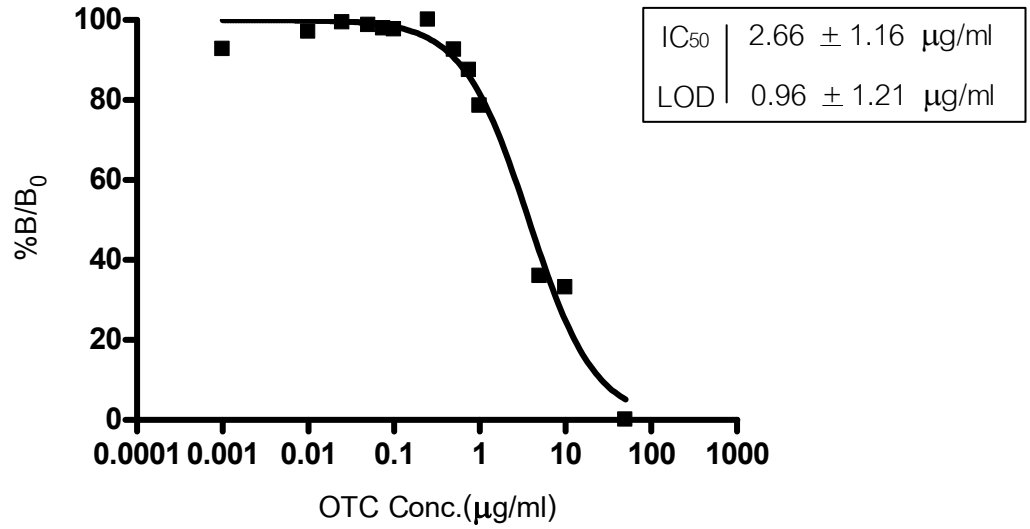
Clone	Avg. $IC_{50} \pm$ SD (µg/ml)	Avg. LOD $\pm$ SD (µg/ml)
2-4F	0.19 ± 0.04	0.08 ± 0.03
7-3G	0.56 ± 0.10	0.20 ± 0.18
11-11A	2.66 ± 1.16	0.96 ± 1.21



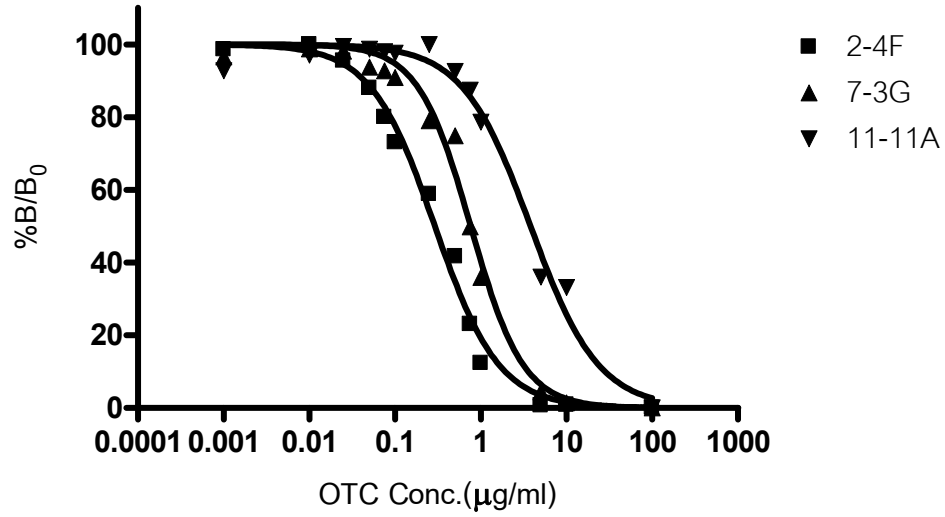
ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน11-11A



ภาพที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A

4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลนโดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ตัวแข่งขันเป็นสารในกลุ่ม TCs คือ TC, CTC, RTC และ DC และสารนอกกลุ่ม TCs จำนวน 9 ตัว นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 เพื่อหา IC_{50} ของแต่ละสาร ได้ผลดังภาพที่ 4.7 , 4.8 และ 4.9 และตารางที่ 4.7

ผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มทั้ง 4 ชนิด โดยเรียงลำดับการเกิดปฏิกิริยาข้ามจากมากไปน้อยได้ คือ RTC, TC, DC และ CTC มีค่าเฉลี่ยการเกิดปฏิกิริยาข้ามเท่ากับ 275, 54, 29 และ 27 % ตามลำดับ

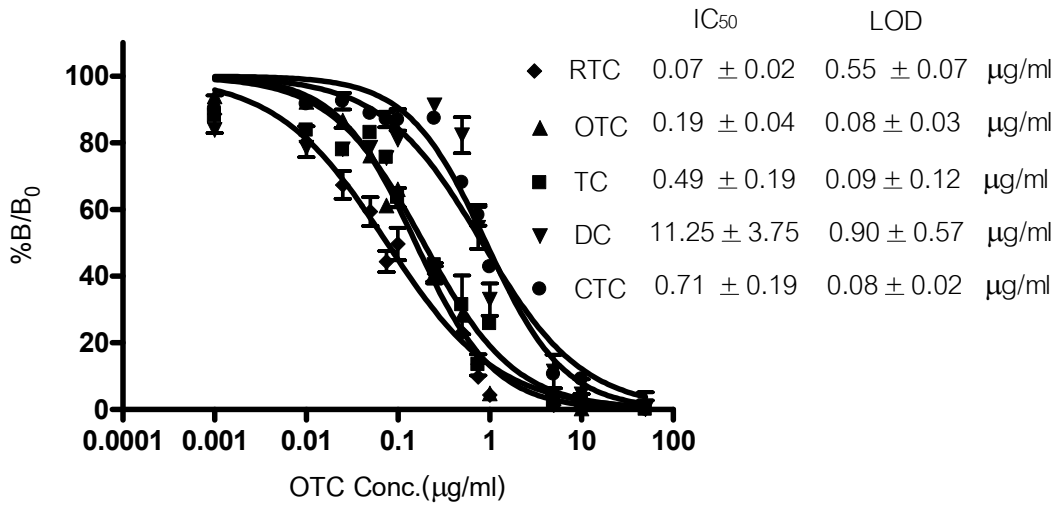
ผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโคลน 7-3G พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับกับสารในกลุ่ม 3 ชนิดคือ TC, DC และ RTC โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดปฏิกิริยาข้ามเท่ากับ 2, 41 และ 5% ตามลำดับ ส่วน CTC เกิดปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.6% ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-11A มีปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับ DC เพียงชนิดเดียวโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเฉลี่ยเท่ากับ 19% และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ TC, CTC

และ RTC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3% แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากทั้ง 3 โคลน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่นำมาทดสอบทุกชนิด

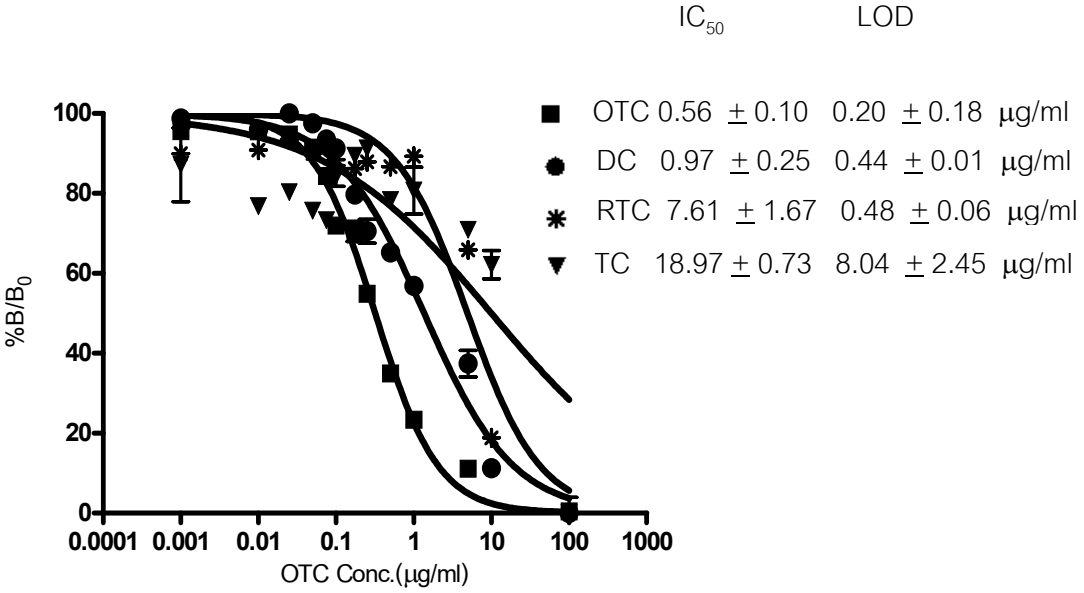
จากการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 3 โคลนไม่ทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่ม TCs นั่นคือแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะกับสารภายในกลุ่ม TCs ค่อนข้างสูงทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากมีโครงสร้างของโมแลกุลใกล้เคียงกัน หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Navarro และ Morais (2007) พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย TC ให้ค่าการเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่ม TCs ทุกตัวเช่นเดียวกันโดยสารที่เกิดปฏิกิริยาข้ามมากที่สุด คือ RTC ที่ 91% รองลงมาคือ OTC และ CTC ที่ 30 และ 14% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} เฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเฉลี่ยของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A ต่อสารในกลุ่ม TCs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี Indirect competitive ELISA

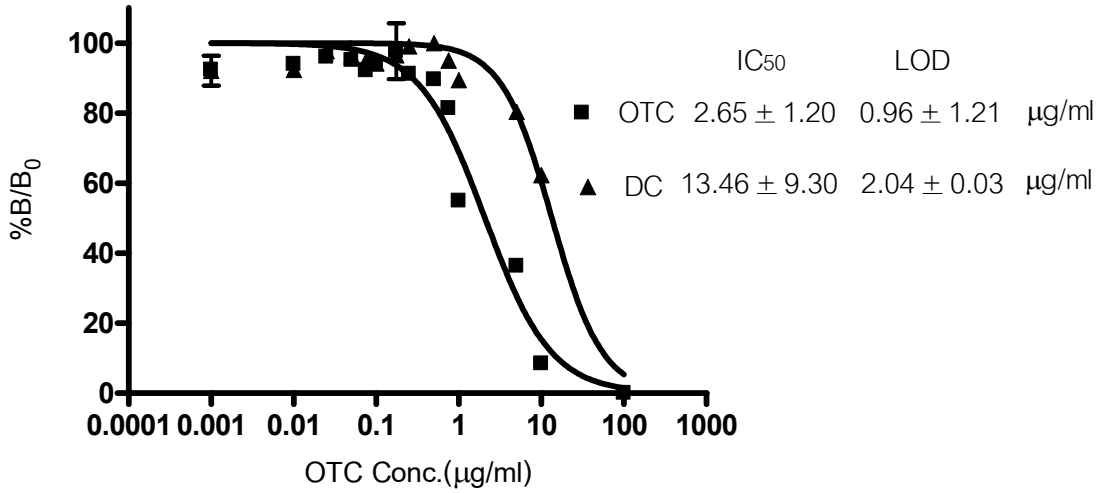
Compounds	2-4F		7-3G		11-11A	
	Avg. $IC_{50} \pm SD$ (µg/ml)	Avg. CR (%)	Avg. $IC_{50} \pm SD$ (µg/ml)	Avg. CR (%)	Avg. $IC_{50} \pm SD$ (µg/ml)	Avg. CR (%)
Oxytetracycline	0.19 ± 0.04	100	0.56 ± 0.10	100	2.66 ± 1.16	100
Tetracyclines						
TC	0.41 ± 0.19	54	18.97 ± 0.73	2	> 100	< 3
CTC	0.71 ± 0.19	29	>100	< 0.6	> 100	< 3
DC	11.25 ± 3.75	27	0.97 ± 0.51	41	13.46 ± 9.30	19
RTC	0.07 ± 0.02	275	7.61 ± 1.67	5	> 100	< 3
Other antibiotics						
Norfloxacin	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Penicilin G	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Avermectin	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Streptomycin	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Sulfaquinoxaline	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
AMOZ	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Metronidazole	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Chloramphenicol	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3
Clenbuterol	> 100	< 0.2	> 100	< 0.6	> 100	< 3



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect competitive ต่อสารในกลุ่ม TCs



ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7-3G โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs



ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง โดยเชื่อม OTC เข้ากับโปรตีนพาหะ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich ได้เป็น OTC-BSA จากการเปรียบเทียบมวล OTC-BSA ซึ่ง มีมวลโมเลกุล 70,032.194 กับโปรตีนพาหะ BSA ซึ่งมีมวลโมเลกุล 66,790.385 พบว่ามีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น สามารถคำนวณได้ว่าโปรตีน BSA แต่ละโมเลกุลจะมีการเชื่อมติดของ OTC 7 โมเลกุล จากนั้นทำฉีดกระตุ้นหนูทั้ง 10 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการฉีดกระตุ้นกลุ่มละ 3-4 ตัว OTC-BSA พบว่าซีรัมของหนูทดลองมีระดับแอนติเจนในช่วง 1:16,000 – 1:128,000 และสามารถผลิตแอนติบอดีที่จับกับ OTC ในรูปอิสระได้ทุกตัว ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ Indirect competitive ELISA ลดลง โดยมีค่า % การจับอยู่ในช่วง 19 - 52% นำหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีที่สูง มาทำการหลอมรวมเซลล์ หลังจากการหลอมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมา NSI โดยใช้ PEG เป็นสารช่วยในการหลอมรวมเซลล์ พบว่าสามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC จำนวน 3 โคลน คือ โคลน 2-4F, 7-3G และ 11-11A ซึ่งมาจากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 4, 9 และ 10 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อผลิตแอนติบอดี นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาศึกษาลักษณะเบื้องต้น ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน โดยวิธี Indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 2-4F และ 11-11A มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a}หลังจากนั้นนำมาทดสอบความไวต่อ OTC ในรูปอิสระและการเกิดปฏิกิริยาข้าม โดยใช้วิธี Indirect competitive ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 2-4F มีความไวต่อ OTC ในรูปอิสระมากที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงมาตรฐานเท่ากับ 0.19 ± 0.04 และ 0.08 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs จากมากไปน้อยดังนี้คือ RTC, TC, DC และ CTC โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม 275, 54, 29 และ 27%ตามลำดับ ส่วนแอนติบอดีจากโคลน 7-3G มีความไวรองลงมาโดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงมาตรฐานเท่ากับเท่ากับ 0.56 ± 0.10 และ 0.20 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs 3 ชนิด โดยเรียงลำดับการเกิดปฏิกิริยาข้ามจากมากไปน้อย คือ DC, RTC และ TC โดยมีเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม 41, 5 และ 2 % ตามลำดับ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-11A มีความไวน้อยที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} และ LOD เฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงมาตรฐานเท่ากับ 2.66 ± 1.16 และ 0.96 ± 1.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม

TCs เพียงชนิดเดียวคือ DC โดยมีเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม 19% แต่อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 3 โคลนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม TCs โดย%การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนนอลสามารถบอกความชอบในการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร ซึ่งหากมีค่า %การทำปฏิกิริยาข้ามที่สูงหมายถึงสามารถจับกับสารชนิดนั้นได้ดี ตัวอย่างเช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F สามารถจับกับสารในกลุ่ม TCs ที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด โดยจับกับ RTC ได้ดีที่สุด ซึ่งดูได้จาก % การเกิดปฏิกิริยาข้ามซึ่งเท่ากับ 275% ซึ่งมากกว่า %การเกิดปฏิกิริยาข้ามของ OTC ที่เท่ากับ 100%

จากการผลงานวิจัยนี้พบว่าแอนติบอดีจากโคลน 2-4F เป็นโคลนที่มีความไวมากที่สุด ซึ่งความไวที่ได้สามารถตรวจวัดสาร OTC ในรูปอิสระได้ต่ำกว่าค่าปริมาณยาตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ ที่ประกาศโดยกระทรวงสาธารณสุข คือ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ppm) ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 2-4F มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารในกลุ่ม TCs ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาในอนาคตต่อไปได้

ตารางที่ 5.1 สรุปการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A

ลักษณะสมบัติ	โมโนโคลนอลแอนติบอดี		
	2-4F	7-3G	11-11A
ไอโซไทป์	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_1
IC_{50} (µg/ml)	0.19 ± 0.04	0.56 ± 0.10	2.66 ± 1.16
LOD (µg/ml)	0.08 ± 0.03	0.20 ± 0.18	0.96 ± 1.21
เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%)			
OTC	100	100	100
TC	54	2	< 3
CTC	29	< 0.6	19
DC	27	41	< 3
RTC	275	5	< 3

ข้อเสนอแนะ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F มีความไวมากที่สุด โดยให้ค่า LOD ต่ำกว่าค่า MRLs ที่กำหนด ถึงแม้ว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิด ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F มาใช้พัฒนาชุดตรวจสอบออกซีเตตราซัยคลินต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

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

กองนโยบายมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร. สินค้าเกษตรและอาหารของญี่ปุ่น 2547. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ [Online] แหล่งที่มา:

http://www.acfs.go.th/datakm/standard/standard.html.

กรมประมง. 2558. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี. กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2547. การใช้ยาและสารเคมีในฟาร์มกุ้ง. สัตวแพทยสภา. แหล่งที่มา:

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สาธารณสุข, กระทรวง. 2550. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ.2550. เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา : http://www.qmaker.com/fda/ new/images/ cms/ top_upload/1189586378_303.pdf

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2545. ปัญหายาตกค้างในกุ้งกุลาดำ. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ, 1: 3-7

ภาษาอังกฤษ

Anderson, W.C., Roybal, J.E., and Gonzales, S.A. 2005. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. Analytica Chemica Acta 529: 145-150.

Castellari, M., Gratacos, M., and Garcia-Regueiro, J.A. 2009. Detection of tetracycline and oxytetracycline residues in pig and calf hair by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216: 8096-8100

Cherlet, M., Baere, S.D., and Backer, P.D. 2003. Quantitative analysis of oxytetracycline and its 4-epimer in calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. The Analyst 128: 871-878.

Codex Alimentarius Commision. 2012. Maximun residue limits for veterinary drugs in Foods. [Online] Available from : www. Codexalomentarias.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2012.pdf [2014, November 19]

Faraj, B.A., and Ali, F.M. 1981. Development and application of radioimmunoassay for tetracycline. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 217: 10-14.

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

Kaale, E., Chambuso, M., and Kitwala, J. 2008. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. Food Chemistry 107: 1289-1293.

Koesukwiwat U, Jayanta S, and Leepipatpiboon N . 2007. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. Journal of Chromatography. A 1140:147-56.

Le, T., Yu, H., Guo, Y., Ngom, B., Shen, Yaan., and Bi, D. 2009. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of doxycycline residue in animal edible tissues. Food and Agricultural Immunology 20: 111-124.

Le, T., Yi, S.H., Zhao, Z.W., and Wei, W. 2011. Rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for the detection of chlortetracycline residues in edible animal tisses. Food Additives and Contaminants 28: 1516-1523.

Lykkeberg, A.K., Sorensen, B.H., and Cornett, C. 2004. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 34: 325-332.

Maia, P.P., and Rath, S. 2008. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using Fluorescence detection. Food Chemistry 109: 212-218.

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

Wang, L., Yang, H., and Zhang, C. 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. Analytica Chemica Acta 619: 54-58.

Zhang, Y., Lu, S., and Liu, W. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. Agricultural and Food Chemistry 55: 211-218.

Zhao, C.B., Peng, D.P., Wang, Y.L., Huang, L.L., Chen, D.M., Tao, Y.F. and Yuan, Z.H. 2008. Preparation and validation of the polyclonal antibodies for detection of chlortetracycline residues. Food and Agricultural Immunology 22: 163-174.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมติด OTC เข้ากับโปรตีนพาหะ BSA

1) 7.5% (v/v) formaldehyde

37% (v/v)	18.91	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	81.09	มิลลิลิตร

2) 3M Sodium acetate pH 5.5

Sodium acetate	246.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 5.5

2. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดสอบโดยเทคนิค ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

Na_2HPO_4	27.60	กรัม
NaH_2PO_4	71.63	กรัม

แต่ละสารละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วปรับ pH ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4

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

PB Stock	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1	ลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS เตรียมใหม่ก่อนใช้

5) 0.15 M Phosphate citrate buffer, pH 5.0

Na_2PO_4	9.5	กรัม
Citric acid	7.3	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย 3 N HCl ให้ได้ pH 5.0

6) Substrate solution OPD

O-phenylenediamine	40	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

7) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน (หลังจากเทกรดลงไปในน้ำกลั่นอาจเกิดความร้อน ควรนำขวดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง)

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) Stock 100X HAT

Hypoxanthine	0.1361	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	0.0018	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	0.0388	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> Aminopterin อาจละลายได้ยากที่อุณหภูมิห้อง ควรนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียสจนกว่าจะละลาย

2) 100X HT

Hypoxanthine	0.1361	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidine	0.0388	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamine	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม

Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) 50% PEG (Polyethylene glycol)

นำ PEG 5 กรัมมาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด หลอดละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนหลอมรวมเซลล์ นำหลอดมาอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง (Freezing medium)

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางนันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Nanthika Khongchareonporn (Panchan)

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-6399-00091-73-5

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

   สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทร. 02-2188076-8 โทรสาร 02-2533543

   E-mail : nanthika.k@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วท.บ.ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2539

ปริญญาโท วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2542

ปริญญาเอก วท.ด.เทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2547

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Immunology: Monoclonal Antibody Production, Immunoassay

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. โครงการ สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2549-2550

สถานภาพในงานวิจัย หัวหน้าโครงการ

2. โครงการ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

แหล่งทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2553

สถานภาพในงานวิจัย หัวหน้าโครงการ

3.โครงการ การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555

สถานภาพในงานวิจัย หัวหน้าโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

พอจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร, วิชชุดา ประสาทแก้ว และปภาศิริ บาร์เนท. (2557). การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไซโตโครม P4501A (CYP1A) ในปลากะพง (Lates calcarifer Bloch) ที่ได้รับสารเบนโซ(เอ)ไพรีน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19(2). (Accepted).

Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. 2011. Nutitional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Aimal Feed Science*. 169: 265-269

Khamjing W, **Khongchareonporn** N and Rengpipat S. 2011.Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially-contaminated pork. *Microbiology and Immunology*. 55: 605-615.

Panchan N, Sithigorngul P, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia.* 31: 29-35.

Panchan N, Bendena WG, Browser P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkuru P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn *(Penaeus monodon*). Peptide. 24(10):1563-1570.

Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon)*. Peptide. 23: 1934-1952

Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the eyestalk of the giant tiger prawn *(Penaeus monodon)*. Peptide. 23: 1895-1906.

Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn *(Macrobachium rosenbergi)i* Peptide. 22 : 191-197.

Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn *(Macrobrachium rosenbergii*). Comp Biochem Physiol B. 124 : 73-80.

Proceeding

Phakham T, Khongchareonporn N, Noitang S, Karnchanatat A, Sermsuvitwong K, and Sooksai S. 2014. Effect of gene copy number on recombinant insulin expression in Pichia pastoris GS115. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3,Bangkok, Thailand.

Kaewsalabnil S, Leethochavalit S, Watanachote, Komolis K and Khongchareonporn N. 2014. International Conference on Food and Applied Bioscience. 6-7 Feb, Chiang Mai, Thailand.

Mungmee P, Komolpis K, Palaga T, Buakeaw A and Khongchareonporn. The 24th Annual Meeting of the Thai Sociiety for Biotechnology "Renewable Energy and Global Care. 29-30 November,2012. Ubon Ratchthani University. Thailand

Sangkaew O, Khongchareonporn N and Rengpipat. The 24th Annual Meeting of the Thai Sociiety for Biotechnology "Renewable Energy and Global Care. 29-30 November,2012. Ubon Ratchthani University. Thailand

Noiprapai K, Khongchareonporn N and Rengpipat S. 2012. Production of monoclonal antibodies against Vibrio parahaemolyticus. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand

Nuntanidvorakul P, Komolpis K and Khongchareonporn N. Production an characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Khongarsa K, Khongchareonporn N, and Komolpis K. Development of ractopamine test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. 1st ASEAN PlusThree Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand

Kanchanabanca C, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.

Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against *Yersinia enterocolitica*. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.

Kongkavitoon P, Khongchareonporn N and Komolpis K. Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008 : Biotechnology for Global Care". October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138

Saneewong S, Khongchareonporn N and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008 : Biotechnology for Global Care". October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129

Poster

Barnette, P., Panutrakul, S., Nanthanawat, P., **Khongcharoenporn, N**., Mokkongpai, P., Srivilas, P., Cholumpai, V., Thanomsit, C. and Wiwekwin, N. 2013. Determination of PAHs, mercury and biomarkers of exposure in feral fishes and cultivated green mussel (*Perna viridis*) from the iIndustrial coast of Map Ta Phut, Gulf of Thailand. 7thInternational Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology. 17-21 June 2013. Hong Kong. Oral presentation

Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจออกซีเตตราซัยคลินด้วยวิธี ELISA ปีที่ 1 งบประมาณแผ่นดิน ปี 2557-2558

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Songchan Puthong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 32001 01339 43 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย (ชำนาญการ)

ระดับตำแหน่ง ชำนาญการพิเศษ

ประเภทตำแหน่ง เชี่ยวชาญเฉพาะ

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ที่ทำงาน โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หมายเลขโทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2188076

โทรสาร 02-2533543

โทรศัพท์มือถือ 089-0052661

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) songchan.p@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา (สาขาวิชา)	ชื่อสถาบัน (ประเทศ)	ปี พ.ศ.
วท.บ. (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยบูรพา	พ.ศ. 2529
วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2540

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง
- การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (anti-hepatoma, anti- α-fetoprotein (AFP), anti-carcinoembryonic antigen (CEA))

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน(อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

7.3.1 ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ:

1) Manaspong, C., Wongphanit, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Sooksai, S., and Komolpis, K. (2013). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. Journal of Microbiological Biotechnology. 23(1) : 69-75.

2) Stewart, P., Boonsiri, P., **Puthong, S.**, and Rojpibulstit P. (2013). Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. BMC Complementary & Alternative Medicine. 13 : 60.

3) Chadseesuwan, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2013). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 1-Aminohydantoin Detection. Journal of AOAC International. 96(3) : 680 – 686.

4) Khunsap, S., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.**, Know, O., Chulasugandha, P., and Boonchang, S. (2013). The effects of Cryptelytrops albolabris, Calloselasma rhodostoma and Daboia siamensis venoms on human cancer cells. Asian Journal of Biological and Life Sciences. 2(1) : 50 – 53.

5) Graisuwan, W., Wairachai, O., Ananthanawat, C., **Puthong, S.**, Soogarun, S., Kaitkamjornwong, S., and Voravee P.Hoven. (2012). Multilayer film assembled from charged derivatives of chitosan : Physical characteristics and biological responses. Journal of Colloid and Interface Science. 376 : 177 – 188.

6) Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and Chanchao, C. (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complementary and Alternative Medicine. 12 : 27.

7) **Puthong, S.**, Gamnarai, P., Roitrakul, S., Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Rojpibulstit P. (2011). Hep88 mAb Induced Ultrastructural Alteration Through Apoptosis Like Program Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. Journal of the Medical Association of Thailand. 94(12) : 109 - 116.

8) Sangthong, S., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.**, Chandchawan, S., and Muangsin, N. (2011). Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.

9) Tantithanagorngul, W., Sujitwanit, A., Piluk, J., Tolieng, V., Petsom, A., Sangvanich, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Thamchaipenet, A., and Pinphanichakarn, P. (2011). Screening for brine shrimp larvicidal activity of *Streptomyces* isolated from soil and anti-tumor activity of the active isolates. Australian Journal of Basic and Applied sciences. 5(7) : 15-22.

10) Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, and Chanchao, C. (2011). *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. BMC Complementary and Alternative Medicine. 11 : 37.

11) Karnchanatat, A., Tiengburanatam, N., Boonmee, A., **Puthong, S.**, and Sangvanich, P. (2011). Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* valeton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. Preparative Biochemistry & Biotechnology. 41 : 1-17.

12) Kheeree, N., Sangvanich, P., **Puthong, S.**, and Kanchanatat, A. (2010). Antifungal and antiproliferative activity of lectin from the Rhizomes of Curcuma amarissima Roscoe. Appl Biochem Biotechnol. 162 : 912-925.

13) Komolphis, K., Udomcheokmongkol, C., **Puthong, S.**, and Palaga, T. (2010). Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 16 : 567-571.

7.3.2 ผลงานวิจัยนำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ:

1) Chadseesuwan, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production of monoclonal antibodies against 1-aminohydantoin. Proceedings of 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3 ,2011 ,Hong Kong.

7.3.3 ผลงานวิจัยนำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ:

1) Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochan, S., Gamnarai, P., Kangsadalampai, S., Roytrakul, S., and Rojpibulstit, P. (2011). Proteomic study of tumor antigen recognized by Hep88 mAb: A novel harmful mAb to hepatocellular carcinoma. Proceeding in The 3rd Biochemistry and Molecular biology (BMB) conference "From Basic to Translational Research for a Better Life". April 6-8 ,2011 ,The Empress Convention Centre ,Chiang Mai ,Thailand.

2) Rojpibulstit, P., Manochantr, S., Gamnarai, P., **Puthong, S.**, Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Roitrakul, S. (2010). Ultracellular alterations of the hepatocellular carcinoma cell line induced by Hep-88 mAb : A novel harmful mAb. Proceedings of the Austration Society for Biochemistry and molecular biology. 42 : 248.

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอณุมาศ บัวเขียว

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Anumart Buakeaw

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 38099 00658 39 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ที่ทำงาน โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หมายเลขโทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2188076

โทรสาร 02-2533543

โทรศัพท์มือถือ 089-8724917

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) anumart.b@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา (สาขาวิชา)	ชื่อสถาบัน (ประเทศ)	ปี พ.ศ.
วท.บ. (ชีวเคมี)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2541
วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง
- การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

เรื่อง การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน(อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

7.3.1 ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ:

1) Puthong, P., Rojpibulstit, P., and **Buakeaw, A.** (2009). Cytotoxic effect of Hep 88 mAb : A novel monoclonal antibody against hepatocellular carcinoma. Thammasat Int. J. Se. Tech. 14(1): 95-104.

2) Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from Salacia verrucosa. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.

3) Mungmee, C., Sithigool, S., **Buakeaw, A.**, and Suttrisi, R. (2013). A new biphenyl and other constituents from the wood of Garcinia schomburgkiana. Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters, DOI:10.1080/14786419.2013.796469.

4) Somwong, P., Suttisri, R. and **Buakeaw, A.** (2013). New sesquiterpenes and phenolic compound from *Ficus foveolata*. Fitoterapia. 85 : 1 – 7.

5) Wongtangprasert, T., Natakuathung, W., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 15(2) : 165 – 172.

7.3.2 ผลงานวิจัยนำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ:

1) Sangdokmai, A., Pimpitak, U.**, Buakeaw, A.**, Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M_1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

7.3.3 ผลงานวิจัยนำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ:

1) Khongarsa, K., Khongchareonporn, N., Komolpis, K., and **Buakeaw, A.** (2012). 1st ASEAN PLUS THREE GRADUATE RESEARCH CONGRESS. 1 – 2 March 2012 Chaing Mai ,Thailand.

2) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., Pimpitak, U., and **Buakeaw, A.** Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ นายกิตตินันท์ โกมลภิส
Mr. Kittinan Komolpis

2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับA5
4. หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์,
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 0-2218-8078 โทรสาร: 0-2253-3543

E-mail: kittinan.k@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีพ.ศ.ที่ได้รับ
University of Michigan	Doctor of Philosophy	Chemical Engineering	2545
University of Michigan	Master of Engineering	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีวเคมี	2532

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ (การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี การวิเคราะห์ด้วย ELISA และแถบทดสอบ)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจสารตกค้างในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค” โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023 งบประมาณปี พ.ศ.2556-2557)

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.2.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนท์แอสเสย์ งบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2557-2558

7.2.2 การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์ โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ งบประมาณปี พ.ศ.2556-2557

7.2.3 การพัฒนาชุดตรวจสอบสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนนด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนท์แอสเสย์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ พฤศจิกายน 2550 – พฤษภาคม 2552

7.2.4 การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลนบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซินและเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic assay ภายใต้แผนงานวิจัยแบบบูรณาการทางด้านยา และเคมีภัณฑ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2548-2550

7.2.5 การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส งบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2548-2549

7.2.6 การพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) งบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2546

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Boonsombuti A, **Komolpis K**, Luengnaruemitchai A and Wongkasemjit S. 2014. Enhancement of ABE fermentation through regulation of ammonium acetate and D-xylose uptake from acid-pretreated corncobs. Annals of Microbiology 64: 431-439

Chadseesuwan, U., Puthong, S., Gajanandana, O., Palaga, T. and **Komolpis, K.** 2013 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. Journal of AOAC International 96: 1-8

Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S. and **Komolpis, K**. 2013. A Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 69-75

Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16: 567-571

Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K**., Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K**. and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 14: 202-206

Komolpis K., Srivannavit, O. and Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. Biotechnology Progress, 18:641-646.

Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (Glycine max). Biotechnology Progress; 17:421-430.

Wu E., **Komolpis K**., Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from Indigofera tinctoria while attaining biological integrity. Biotechnology Techniques, 13:567-569.

Komolpis K., Kaufman P.B., Wang H.Y. 1998. Chemical permeabilization and in situ removal of daidzein from biologically viable soybean (Glycine max) seeds. Biotec. Techniques, 12:697-700.

7.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

Sathitsemakul J, Puthong S, Patarakul K, Palaga T and **Komolpis K.** Production and characterization of monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* Serovar *Manilae.* International Conference on Food and Applied Bioscience. February 6-7, 2014. Chiang Mai, Thailand.

Kaewsalabnil S, Leethochavalit S, Watanachote J, **Komolpis K** and **Khongchareonporn** N. Production and characterization of monoclonal antibodies against Perkinsus olseni in undulated surf clams Paphia undulata

Nuntanidvorakul P, **Komolpis K** and Khongchareonporn N. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Chapanont Y, **Komolpis K** and Rengpipat S. Production of monoclonal antibodies against Salmonelle Typhimurium. The 23rd Annual Meeting of the Thai Soceity of Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.

Sangdokmai A, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T and **Komolpis K**. Production and characterization of monoclonal antibody against aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology (IPCBEE), Singapore

Wongtangprasert T, Palaga T, **Komopis K** and Khongchareonporn N.

Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.

Tesvichian S, **Komolpis K**, Khongchareonporn N, Puthong S, Piampitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.

Khongchareonporn N, **Komolpis K** and Puthong S. Production and characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1st CMU Graduate Research conference . 27th November 2009. Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

Kanchanabanca C, **Komolpis, K.,** Khongchareonporn, N. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.

Kongkavitoon, P., Khongchareonporn, N., **Komolpis., K.** Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138

Saneewong, S., Khongchareonporn, N., **Komolpis, K.** Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008 : Biotechnology for Global Care". October 14th-17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129

Kaewviset, S., **Komolpis, K.,** Palaga, T. Development of progesterone test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185

Womgphanit P., **Komolpis, K.**, Palaga, T. Development of enrofloxacin detecting test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. The 12th Biological Science Graduate Congress. 17-19 December 2007. Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Malaysia. P:196

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนท์แอสเสย์ งบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2557-2558

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Umaporn Pimpitak

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 91 1

3.ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

4.หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543

E-mail tikchula@gmail.com

5.ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล	ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542

6.สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี การพัฒนาชุดตรวจแบบ ELISA การพัฒนาชุดตรวจโดยใช้หลักการ Immunochromatographic strip assay

7. ผลงานวิจัย

7.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1) **Pimpitak, U**., Puthong, S., Komolphis, K., Petsom, A., and Palaga, T. (2009).Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimps samples. Food Chemistry.116: 785-791.

7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1) Sangdokmai, A., **Pimpitak, U**., Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011).Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

2) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U**., and Buakeaw, A. Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

7.3 โครงการวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.3.1 การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจสารฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร (แหล่งทุน–โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติคลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง(Project954-1023)สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

7.3.2 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์” (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน)

7.4 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

7.4.1 โครงการ การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโค (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน)