

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับตรวจเคซีนจากวัว

Development of enzyme-linked immunosorbent assay

for detecting bovine casein

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

สัญญาเลขที่ GB-B_CU_61_07_61_01

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นางทรงจันทร์ ภูทอง (หัวหน้าโครงการ)

รองศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

นายอนุมาศ บัวเขียว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงโดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช
ปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ GB-B_CU_61_07_61_01

ขอขอบคุณ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกระดี จังหวัดปทุมธานี ที่
กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมวัวสดที่ใช้ในการทดสอบ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและ
วิศวกรรมพันธุศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐรา ทองจุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต รอง
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บุคลากรทุกๆ ท่านจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ได้ให้การ
ช่วยเหลือและดำเนินการต่างๆ ให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

น้ำนมวัวเป็นอาหารหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งสำหรับทั้งเด็กและผู้ใหญ่ อย่างไรก็ตามมีการพบว่า มีเด็กบางคนไม่สามารถบริโภคน้ำนมวัวได้เนื่องจากมีอาการแพ้ ซึ่งมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการแพ้เคซีน (casein, CN) ที่พบมากถึง 80% ของโปรตีนในน้ำนม ดังนั้นผู้บริโภคกลุ่มนี้ต้องหลีกเลี่ยงการบริโภคน้ำนมวัวหรืออาหารที่มีน้ำนมวัวเป็นส่วนผสม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะสร้างมอนอโคลนที่สามารถผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อเคซีนจากวัว ที่มีลักษณะสมบัติเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เตรียมชุดตรวจเคซีน โดยได้ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองและเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธีการหลอมรวมเซลล์ที่ใช้กันทั่วไป พบว่าสามารถเตรียม MAb ได้ทั้งสิ้น 60 มอนอโคลน จากเซลล์หลุมต้นกำเนิด 13 หลุม จากการศึกษาลักษณะสมบัติพบว่า MAb มีไอโซไทป์เป็น IgG₁ 46 โคลน IgG_{2a} 5 โคลน และ IgM 9 โคลน แยกเป็นกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่มตามความจำเพาะในการจับกับเคซีนชนิดต่างๆ ได้แก่ CN, α -CN, β -CN, κ -CN รวมทั้งแลกโตโกลบูลินและโอวัลบูมิน จึงได้ทำการคัดเลือก MAb มา 10 ตัว ที่จับ CN ได้แต่ไม่จับกับแลกโตโกลบูลินและโอวัลบูมิน ไปศึกษาความจำเพาะของ MAb ต่ออิพิโทปที่ต่างกัน บนโมเลกุลของ CN พบว่ามี MAb 8 ตัวที่อาจจับกับ CN ที่อิพิโทปต่างกัน ได้แก่ CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 นำ MAb ทั้ง 8 ตัวมาทดสอบความไวในการตรวจเคซีนจากวัวด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งที่ 50% (IC₅₀) อยู่ในช่วง 6.1 – 21.5 นาโนกรัมต่อมิลลิตร โดย MAb CN1F4 มีความไวสูงสุดซึ่งมีค่าขีดจำกัดในการตรวจและ IC₅₀ เท่ากับ 2.46 ± 0.01 และ 17.01 ± 4.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือก MAb CN1F4 สำหรับการศึกษาดังกล่าวต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Cow milk is an important source of foods for both children and adults. However, it has been found that some children are allergic to cow milk. This allergy is mainly caused by casein (CN) which can be found up to 80% of the total milk proteins. Therefore, these consumers must avoid cow milk and foods containing cow milk and drink other types of milk. However, due to the low price of cow milk, it can be mixed with other types of milk. Therefore, a simple method is required for cow milk detection. Currently, the most widely used screening test is antibody based method in the form of strip test or lateral flow immunoassay because it is easy to use, convenient and inexpensive. Of the research, the objective was to generate monoclones which produce monoclonal antibody (MAb) that is specific to cow casein and is suitable for detection purpose. Mice were immunized and conventional cell fusion between splenocytes and myeloma cells was performed to generate hybridoma cells which were screened to obtain 60 monoclones from thirteen originated clones. Among the 60 MAbs, 46 MAbs were found to be IgG₁ isotype while 5 MAbs and 9 MAbs were found to be IgG_{2a} and IgM isotype, respectively. The MAbs were categorized into 7 groups depending on the ability to bind with different types of CNs such as mixed form of CN, α -CN, β -CN, κ -CN and with lactoglobulin as well as with ovalbumin. Ten MAbs were selected for further study because they bound with CNs and did not bind with lactoglobulin and ovalbumin. Binding ability of the MAbs on different sites or epitopes of CN was studied. Eight MAbs such as CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 were found to bind at different epitopes. Sensitivity of the selected MAbs was studied using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. The 50% inhibition concentration (IC₅₀) was found to be in a range of 6.1 – 21.5 ng/ml. The most sensitive Mab was CN1F4 of which the limit of detection (LOD) and IC₅₀ were $2.46 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ and $17.01 \pm 4.29 \mu\text{g/mL}$, respectively. As a results, MAb CN1F4 was chosen for further studies.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ญ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	1
1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	5
2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	5
2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	5
2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	6
2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไม่ซีให้สร้างแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัว	8
2.5 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี indirect ELISA	8
2.6 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	8
2.7 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	9
2.8 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution	10
2.9 ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี	10
2.10 การวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA	10
2.11 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี	11
2.12 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยโปรตีนจีเซฟาโรส	11
2.13 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)	12
2.14 ทดสอบความไวและการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี	12

	หน้า
2.15 การหาสถานะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	13
2.16 การหาสถานะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA	13
2.16.1 การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน	13
2.16.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน โดยวิธี direct ELISA	13
2.16.3 คัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA	14
2.17 การประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	14
2.17.1 การหาค่าความแม่นยำ	14
2.17.2 การหาค่าความถูกต้อง	14
2.18 การตรวจหาปริมาณเคซีนในตัวอย่างน้ำนมวัว	14
2.18.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมวัว	14
2.18.2 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมโดยวิธี indirect competitive ELISA	15
2.18.3 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมด้วยชุดตรวจทางการค้า	15
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	16
3.1 การกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัว	16
3.2 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	17
3.3 ศึกษาไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี	20
3.4 การทดสอบการจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีน	22
3.5 การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่ออีพิโทปต่างๆ ของเคซีน	24
3.6 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส	26
3.7 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี	26
3.8 การหาสถานะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	28
3.8.1 การคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตัวที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	28
3.8.2 การทดสอบความไวของแอนติบอดีในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	28

	หน้า
3.8.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานเคซีนในชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	29
3.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA	30
3.9.1 การทดสอบแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอดีนโดยวิธี ELISA	30
3.9.2 คัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA	31
3.10 การประเมินประสิทธิภาพการตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA	36
3.10.1 การหาความแม่นยำ	36
3.10.2 การหาความถูกต้อง	36
3.11 การตรวจหาปริมาณเคซีนในตัวอย่างน้ำนมวัว	37
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	40
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก 1	45
ภาคผนวก 2	46
ประวัติคณะผู้วิจัย	49

สารบัญตาราง (List of tables)

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูหลังฉีดกระตุ้นด้วยโบทูลินัม	16
ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการหลอมรวมเซลล์หนูที่กระตุ้นด้วยโบทูลินัม	17
ตารางที่ 3.3 มอนอโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1	17
ตารางที่ 3.4 มอนอโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2	18
ตารางที่ 3.5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 3	18
ตารางที่ 3.6 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA	20
ตารางที่ 3.7 การจำแนกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามชนิดของไอโซไทป์	22
ตารางที่ 3.8 การจำแนกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามชนิดของเคซีนจากวัวที่แอนติบอดีจับได้	23
ตารางที่ 3.9 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของอีพิโทปที่จับด้วย MAbs ต่อเคซีนจากวัว	24
ตารางที่ 3.10 ค่า Additive index ของค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์การจับกับเคซีนจากวัว	25
ตารางที่ 3.11 ปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหลังทำบริสุทธิ์	26
ตารางที่ 3.12 ความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกคัดเลือก	26
ตารางที่ 3.13 ค่า EC ₅₀ และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแต่ละไอโซไทป์ของโบทูลินัมด้วยเทคนิค indirect ELISA	27
ตารางที่ 3.14 การทดสอบความสามารถของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการจับเคซีนในรูปสารละลายโดยวิธี indirect competitive ELISA	28
ตารางที่ 3.15 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานเคซีน ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA	29
ตารางที่ 3.16 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อโอบิตินโดยวิธี ELISA	31
ตารางที่ 3.17 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสม	31
ตารางที่ 3.18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทดสอบเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA	33
ตารางที่ 3.19 ค่าการดูดกลืนแสงและค่า IC ₅₀ เมื่อทดสอบโดยวิธี sandwich ELISA	34
ตารางที่ 3.20 ค่า %CV และ %recovery วิเคราะห์แบบ intra-variation assay	37
ตารางที่ 3.21 ค่า %CV และ %recovery วิเคราะห์แบบ inter-variation assay	37
ตารางที่ 3.22 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมวัว	38

ตารางที่ 3.23 การตรวจวัดปริมาณเคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆที่เติมในน้ำนมถั่วเหลือง

สารบัญรูป (List of figures)

	หน้า
รูปที่ 1 การทดสอบความไวของแอนติบอดี CN1F4 โดยวิธี indirect competitive ELISA	29
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานเคซีนทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA	30
รูปที่ 3 การตรวจวัดเคซีนด้วยแอนติบอดี CN10F4 ที่เชื่อมต่อกับไบโอติน โดยวิธี sandwich ELISA	35
รูปที่ 4 การตรวจวัดเคซีนด้วยแอนติบอดี CN11F4 ที่เชื่อมต่อกับไบโอตินโดยวิธี sandwich ELISA	35

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

Ab	Antibody
α -CN	Alpha casein
α -La	Alpha lactalbumin
β -Lg	Beta lactoglobulin
β -CN	Beta casein
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
CN	Casein
CR	Cross reactivity
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Da	Dalton
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EC50	50% of effective concentration
FCA	Freund's complete adjuvant
FBS	Fetal bovine serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobulin
κ -CN	Kappa casein
LOD	Limit of detection

M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline ที่มี 0.05% tween
PEG	Polyethylene glycol
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เคซีน เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีปริมาณมากในน้ำนม ซึ่งพบมากถึง 80% ของโปรตีนทั้งหมด ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำน้ำนมมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารหลายๆ ประเภท แต่พบว่าผู้แพ้อาหารเคซีนที่อยู่ในนมอยู่เป็นจำนวนมากไม่น้อย โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กทารก ทำให้บุคคลเหล่านี้จำเป็นต้องหลีกเลี่ยงนมและผลิตภัณฑ์นมหรืออาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบอยู่ โดยอาการแพ้ที่พบจะมีอาการแตกต่างกันออกไปตามแต่ละบุคคล อาการที่พบเช่น เกิดอาการบวมของลิ้น ปาก ใบหน้า ผื่นคัน น้ำมูกไหล ไอ ระคายเคืองที่ตา เป็นต้น แต่ในบางรายที่พบอาการหนัก เช่น แน่นหน้าอก หายใจไม่ออก และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นผู้ที่แพ้เคซีนนี้จึงต้องระมัดระวังไม่รับประทานอาหารที่มีนมเป็นส่วนผสม แต่อย่างไรก็ตามอาหารหลายชนิดไม่ได้มีการแจ้งส่วนผสมดังกล่าวไว้ จึงต้องมีการตรวจหาเคซีนในอาหารดังกล่าว ในปัจจุบันมีการวัดเคซีนในอาหารด้วยวิธีทางเคมี ซึ่งวิธีเหล่านี้จะมีต้นทุนในการวิเคราะห์ที่สูง เพราะเครื่องมือมีราคาแพง และไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งมีความเหมาะสมในการตรวจคัดกรอง เพราะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นกว่า และมีต้นทุนในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าวิธีทางเคมี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโบไวน์เคซีนและนำแอนติบอดีมาพัฒนาการตรวจเคซีนจากวัวด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโบไวน์เคซีน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง
- 1.3.2 เตรียมและคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่สร้างมอนอโคลนอลแอนติบอดี
- 1.3.3 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

นมเป็นอาหารที่มีความจำเป็นแก่มนุษย์ แต่ในบางรายนั้นกลับพบว่านมทำให้เกิดอาการแพ้ได้ นมก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้ในบางคน เนื่องมาจากเกิดการแพ้โปรตีนบางชนิดที่อยู่ในนม โปรตีนในน้ำนมที่ทำให้เกิดการแพ้นั้น ได้แก่ อัลฟา แลตตัลบูมิน (alpha-lactalbumin) บีตา แล็กโทโกลบูลิน (beta-lactoglobulin) และเคซีน อาการแพ้ที่พบจะมีอาการที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ละการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล อาการที่พบ เช่น เกิดอาการบวมของลิ้น ปาก ใบหน้า ผื่นคัน น้ำมูกไหล ไอ ระคายเคืองที่ตา เป็นต้น แต่ในบางรายที่พบอาการหนัก เช่น แน่นหน้าอก หายใจไม่ออก และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นผู้ที่แพ้ต่อสารดังกล่าวจึงต้องหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่มีการใช้นมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสามารถดูได้จากฉลากแสดงส่วนประกอบของอาหาร แต่ในอาหารหลายชนิดนั้นไม่ได้มีการแสดงฉลากไว้และไม่สามารถบ่งบอกได้ด้วยตาเปล่า จึงมีความจำเป็นต้องทำการตรวจสอบสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเคซีนซึ่งมีสารหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจวัดเคซีน ด้วยวิธีทางเคมีที่เป็นมาตรฐานได้แก่ reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายในการตรวจที่สูง จึงไม่

เหมาะสมกับการตรวจคัดกรองคัดกรองจำนวนมากและไม่สามารถพัฒนาการตรวจให้ออกสู่ภาคสนาม สำหรับใช้โดยผู้บริโภคโดยตรงได้ ต้องทำการตรวจภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงต้องมีการพัฒนาการตรวจที่เหมาะสมมากขึ้น โดยวิธีการที่มีรายงานการวิจัยต่างๆ สนับสนุนว่าเหมาะแก่การตรวจคัดกรองนั้นจะเป็นวิธีทางอิมมูโนวิทยา เช่น เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนและใช้ในการพัฒนาการตรวจต่อเคซีนด้วยวิธี ELISA

1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

น้ำนมวัวประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ น้ำนมจึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของมนุษย์ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำน้ำนมมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารหลายๆ ประเภท ทั้งของคาวและของหวาน อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำนมทำให้เกิดอาการแพ้ในผู้บริโภคบางรายได้ โดยเฉพาะในเด็กทารก อาการแพ้ที่พบจะมีอาการที่แตกต่างกันออกไปตามแต่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล อาการที่พบ เช่น เกิดอาการบวมของลิ้น ปาก ใบหน้า ผื่นคัน น้ำมูกไหล ไอ ระคายเคืองที่ตา เป็นต้น แต่ในบางรายที่พบอาการหนัก เช่น แน่นหน้าอก หายใจไม่ออก และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Benlounes และคณะ, 1999) และยังพบอีกด้วยว่าภูมิแพ้ที่เกิดขึ้นนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ โดยการแพ้น้ำนมนี้มีสาเหตุจากเกิดการแพ้โปรตีนบางชนิดที่อยู่ในนม ซึ่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ในนมจะสามารถคงอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารได้นาน จึงทำให้เกิดภูมิแพ้ได้หลังจากที่รับประทานนมไป (Høst และ Samuelsson, 1988) โปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ ได้แก่ อัลฟา แลตตัลบูมิน (alpha-lactalbumin) บีตา แล็กโทโกลบูลิน (beta-lactoglobulin) และเคซีน (casein) (Bleumink และ Young, 1968; Docena และคณะ, 1996) โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำนมคือเคซีน โดยจะมีอยู่มากถึง 80% ของโปรตีนในน้ำนมทั้งหมด มีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่นรส โดยปกติเคซีนจะอยู่ในรูปของไมเซลล์ ซึ่งเป็นการรวมตัวกันของโปรตีนกับแคลเซียมฟอสเฟตกระจายแบบคอลลอยด์ในนมวัว เคซีนไมเซลล์มีลักษณะเป็นประจุลบ ภายในประกอบด้วยแคลเซียมฟอสเฟต และโปรตีนอื่นๆ อีกเล็กน้อย เคซีนไมเซลล์ประกอบด้วยเคซีน 4 ไอโซไทป์ คือ แอลฟา₁ เคซีน, แอลฟา₂ เคซีน, บีตา-เคซีน และ แคปปา-เคซีน (de Kruif และคณะ, 2012) ดังนั้นผู้บริโภคที่แพ้น้ำนมวัวที่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ จึงต้องระมัดระวังที่ต้องหลีกเลี่ยงการบริโภคน้ำนมวัว หรือไม่บริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของโปรตีนจากน้ำนมวัวที่ก่อให้เกิดการแพ้ อยู่ในปัจจุบันได้มีการผลิตน้ำนมจากสัตว์ชนิดอื่นและนมวัวที่ได้มีการสกัดเอาโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ ออก แต่อย่างไรก็ตามอาหารเหล่านี้จะมีต้นทุนในการผลิตสูง จึงอาจมีการปลอมปนด้วยน้ำนมวัว (Angusta et al, 1996) จึงได้มีการพัฒนาการตรวจโดยอาศัยการจับจดจำและจับของแอนติบอดีต่อสารที่จำเพาะในน้ำนมแต่ละชนิด (Moatsou and Anifantakis, 2003) นอกจากนี้อาหารที่มีการแปรรูปไปจนผู้บริโภคไม่สามารถทราบได้ว่ามีโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ปนอยู่หรือไม่ จึงได้มีการพัฒนาการตรวจสำหรับตรวจวัดหาเคซีน โดยในการวิเคราะห์ทางอาหารนั้น การตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (ELISA) เป็นวิธีที่นิยมมาใช้กันมากวิธีหนึ่งเพราะมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน ไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาสูง (Giovannacci et al, 2004) เช่น การพัฒนา indirect competitive ELISA สำหรับการตรวจหาการปนเปื้อนของนมวัวในน้ำนมแพะ แกะ และควาย (Hurley et al, 2004) การพัฒนา sandwich ELISA ในการตรวจการปนเปื้อนของนมแพะในน้ำนมและชีสที่ทำด้วยน้ำนมแพะ (Rodriguez et al, 1994) แอนติบอดีที่นำมาใช้ในการตรวจมีทั้งที่เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) และมอนอโคลนอลแอนติบอดี (MAb) Rodriguez และคณะ (1990) ได้ทำการพัฒนา indirect ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวัดน้ำนมวัวที่

ปนเปื้อนในช่วง 1-50% ในน้ำนมผสมระหว่างน้ำนมวัวกับน้ำนมแกะและในชีสที่ทำมาจากนมผสม โดยโพลีโคลนอล แอนติบอดีที่ใช้นี้มาจากการกระตุ้นกระต่ายด้วยเคซีนของวัว ในอีกงานวิจัยหนึ่งได้ทำการสร้าง PAb ในไก่และกระต่ายโดยใช้แกมมาเคซีนจากวัวในการกระตุ้น โดย indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการวัดการปนของน้ำนมวัวที่ 0.1% ที่ปนอยู่ในชีสที่ทำมาจากน้ำนมแพะและแกะ และยังพบว่าการให้ความร้อนแก่น้ำนมวัวไม่มีการตรวจ นอกจากการใช้เคซีนในการกระตุ้นเพื่อเตรียม PAb แล้ว ยังได้มีการใช้เปปไทด์สังเคราะห์ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนตรงกับลำดับบางส่วนของเคซีน ก็พบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจได้เช่นเดียวกัน (Bitri et al, 1993; Rolland et al, 1993; Pizzano, Nicoli, Addeo, 1997) อย่างไรก็ตาม PAb เป็นแอนติบอดีที่ประกอบด้วย MAbs หลายชนิดมารวมกันจึงมีความจำเพาะต่อตำแหน่งในการจับหรืออิพิโทปต่างๆ กัน ทำให้ต้องมีการทำให้บริสุทธิ์และป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะของแอนติบอดีก่อนที่จะนำมาใช้งานเพื่อให้ได้การตรวจที่มีความจำเพาะ (Ausube et al, 1999) นอกจากนี้ในการผลิต PAb จะขึ้นกับการกระตุ้นและสัตว์ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีที่จะส่งผลกระทบต่อความสม่ำเสมอของลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่จะผลิตใช้ในระยะเวลา (Anguita et al, 1996) ซึ่งปัญหานี้จะแก้ไขได้โดยการใช้ MAbs ในการตรวจเพราะ MAbs จะมีความจำเพาะสูงมากกว่าและมีความเหมือนเดิมมากกว่า เพราะถูกสร้างมาจากกลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เดียวที่เตรียมมาจากเทคโนโลยีการหลอมรวมเซลล์ (Köhler and Milstein, 1975) Oudshoorn, Hiemstra, Hessing (1994) ได้ทำการเตรียม MAbs โดยการกระตุ้นหนูทดลองเบต้าเคซีนและทำการหลอมรวมเซลล์ สามารถเตรียม MAbs ได้ 3 แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเบต้าเคซีน นอกจากเบต้าเคซีนแล้วยังได้มีการสร้างแอนติบอดีต่อ แคปป้าเคซีน (Feng, Cunningham-Rundles, 1989) แอลฟา_{s1} เคซีน (Kuzmanoff et al, 1991) แอลฟา_{s2} เคซีน (Leung et al, 1991) อีกด้วย MAbs ต่อเบต้าเคซีนได้ถูกนำมาใช้ในการเตรียม indirect ELISA สำหรับตรวจการปนของน้ำนมวัวในน้ำนมแพะและแกะทั้งตัวอย่างที่เป็นน้ำนมดิบ นมพาสเจอร์ไรซ์และนมสเตอริลไรซ์ (Anguita et al, 1995) แลพ MAbs นี้ยังได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจที่อยู่ในรูปแบบของ immunostick ELISA (Anguita et al, 1996)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้มอโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาการทดสอบเคซีนด้วยหลักการทางอิมมิวโนวิทยา เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ แถบทดสอบแบบ lateral flow immunoassay

1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ระยะเวลา			
	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือน 1-6	เดือน 7-12	เดือน 1-6	เดือน 7-12
กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไม่ซีให้สร้างแอนติบอดีต่อเคซีน จากวัว	●√			
เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	●√	●√		
คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัว		●√		
ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี		●√		
ทดสอบความไวของแอนติบอดี		●√	●√	
ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี			●√	
ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดเคซีนจากวัวด้วย ELISA			●√	●√
เขียนรายงาน	●√	●√	●√	●√
นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ				●√
เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์				●

หมายเหตุ ● หมายถึงจะดำเนินการ และ √ หมายถึงได้ดำเนินการแล้ว

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์ มัยอิโลมา P3X 63AG8	ATCC: TIB-9

2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระดาษกรอง	บริษัท Whatman, Germany
กระบอกฉีดยาขนาด 1, 5 มิลลิลิตร	บริษัท Nipro, Japan
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)	บริษัท Nikon, Japan
ขวดแก้วขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร	บริษัท Boro, Germany
เข็มขนาด 18G และ 21G	บริษัท นิโปร, Thailand
เครื่องกวนสาร (stirrer)	บริษัท เบคไทย, Thailand
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)	บริษัท Udono-Rll memmert, Japan
เครื่องปั๊ม (pump)	บริษัท Iwaki, Japan
เครื่องผสมสาร (vortex)	บริษัท Scientific Industries, Inc., USA
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	บริษัท Metter Toledo, USA
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	บริษัท Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องให้ความร้อน (hot plate)	บริษัท หริกุล กรู๊ป จำกัด, Thailand
เครื่อง Microplate reader	บริษัท SynergyMx, USA
เครื่อง Microplate reader	บริษัท Titerlek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	บริษัท Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเล็ก ใหญ่	บริษัท Corning Incorporated, USA
จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-, 24-, 96- หลุม	บริษัท Corning Incorporated, USA
ตัวกรองสารขนาดเล็ก	บริษัท Merck Millipore, USA
ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	บริษัท ธเนสพัฒนา, Thailand

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
ตู้ปั๊มเซลล์แบบแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Thermo Electron Corporation, USA
ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส	บริษัท Mitsubishi Electric, Japan
ตู้อบแห้ง (oven)	บริษัท เบคไทย, Thailand
ตู้ laminar	บริษัท International Scientific Supply, Thailand
ถังไนโตรเจนเหลว	บริษัท Harsco Corporation, USA
ถุงมือยางธรรมชาติ	บริษัท ด็อกเตอร์ ปู จำกัด, Thailand
ถุง dialysis	บริษัท CelluSep, USA
ปิเกอร์ขนาด 50-500 มิลลิลิตร	บริษัท Boro, Germany
ปิเปตแก้ว	บริษัท HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	บริษัท Gilson, France
มีดจาะเล็ดหนุ	บริษัท FEATHER Safety Razor, Japan
ไมโครปิเปต	บริษัท Eppendorf Co., Ltd., Thailand
ไมโครปิเปตชนิดมัลติชาแนล	บริษัท PZ HTL S. A., Poland
หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง	บริษัท Nunc, Denmark
หลอดเก็บเลือด eppendorf	บริษัท Axygen, USA
หลอดทดลองขนาด 15, 50 มิลลิลิตร	บริษัท CLP, USA
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	บริษัท Memmert, Germany
เครื่อง purify โปรตีน AKTA Start	บริษัท GE Healthcare Life Sciences, UK

2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Albumin from chicken egg white (A7642)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Alpha-casein from bovine milk (C6780)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Alpha-lactalbumin from bovine milk (L6010)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Beta-casein from bovine milk (C6905)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Beta-lactoglobulin from bovine milk (L3908)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
BCA TM protein assay kit	บริษัท Pierce, USA
Biotinamidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Bovine serum albumin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Casein (c3400)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Casein hydrolysate for microbiology (22090FLUKA)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Casein sodium salt from bovine milk (C8654)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Citric acid	บริษัท Merck, Germany
D-glucose	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	บริษัท Fluke, Switzerland
Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	บริษัท Merck, Germany
Enzyme-linked immunosorbent assay kit (for casein alpha)	MyBioSource.com
Ethanol	บริษัท Merck, Germany
Fetal calf serum	บริษัท Invitromax, USA
Freund's complete adjuvant	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Gentamicin	บริษัท T. P. drug laboratories, Thailand
Goat anti-mouse IgG- HRP; GAM- HRP	บริษัท Jackson Immuno, USA
Hitrap TM protein G HP column	บริษัท GE Healthcare, Sweden
holo-Transferrin human (T0665)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	บริษัท Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Immunoglobulin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Insulin from bovine pancreas (I6634)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Isoflurane	บริษัท Aesica Queenborough Limited, UK
Isotyping kit	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Kappa-casein from bovine milk (C0406)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
O-phenylenediamine dihydrochloride	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Protein G sepharose	บริษัท GE Healthcare, UK
Pyruvic acid	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	บริษัท Biochrom AG, Germany
Skim milk	บริษัท Anline, Thailand
Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	บริษัท Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	บริษัท Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	บริษัท Carlo Erba, USA
Sodium pyruvate	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Streptavidine horseradish peroxidase (HRP) conjugate	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	บริษัท Merck, Germany

Thymidine

บริษัท Sigma-Aldrich, USA

Tween 20

บริษัท Sigma-Aldrich, USA

2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไม่ซีให้สร้างแอนติบอดีต่อเคซินจากวัว

ทำการฉีดกระตุ้นหนูไม่ซีสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยการฉีดเคซินจากวัวเข้าภายในช่องท้องหนู โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสม Freund's complete adjuvant (FCA) กับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาณแอนติเจนที่ฉีด 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) และฉีดกระตุ้นซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน หลังจากฉีดกระตุ้น 3-4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับเคซินได้หรือไม่ เจาะเลือดจากหางหนู ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,700 xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใส หรือซีรัมออกมาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อได้ค่าไตเตอร์ที่สูงพอแล้ว ทำการกระตุ้นหนูครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนของโบว์นเคซินก่อนนำไปหลอมรวมเซลล์ในวันที่ 4 หลังการกระตุ้น

2.5 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยโบว์นเคซินความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 ที่มี 0.05% (v/v) tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง บล็อก กันหลุมด้วย 5% (v/v) fetal calf serum (FBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (ซีรัมหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) ที่ทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:500-1:512,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิจากแพะที่มีความจำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมต่อกับฮอสเตรดดิซเปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG- HRP; GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนเจือจาง 1: 10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออกด้วย PBS-T เติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 1.25 mM 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) และ 0.034% H₂O₂ ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1.0 M กรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.6 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

นำเซลล์มัยอีโลมา P3-X63Ag8 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% (v/v) FBS ทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซโพเนนเชียลประมาณ 4-5 วัน ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในการหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตในจำนวนที่มากกว่า 10⁷ เซลล์ และนำเซลล์มัยอีโลมาไปบ่มล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง

แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มเข้าอีก 10 มิลลิลิตร จะได้เซลล์มัยอีโลมาสำหรับหลอมรวมกับเซลล์ม้าที่เตรียมไว้

ซิงโพลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3000 กิโลดาลตัน ปริมาตร 5 มิลลิกรัม นำไป autoclave เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ ทำให้ละลายด้วยการอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส สังเกตให้ PEG ละลายจนหมด แต่ให้สารละลายอุ่นๆ แล้วจึงเติม RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ 50% (w/v) PEG แบ่งใส่หลอดหลอดละ 1 มิลลิลิตร ปฏิบัติการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำมาใช้ให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้อควรระวัง ต้องละลาย PEG ไม่ให้ตกตะกอน และไม่ร้อนเกินไปเมื่อทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ทำการสลบหนูตัวด้วยไอโซฟลูเรน (isoflurane) ทำการเจาะเลือดจากหัวใจเพื่อเก็บซีรัม เพื่อเตรียมไว้เป็นซีรัมในการใช้เป็นตัวควบคุมบวกด้วยวิธี indirect ELISA ทำความสะอาดบริเวณส่วนท้องด้วย 70% (v/v) เอทานอล จากนั้นทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามออกมา ใช้กรรไกรตัดส่วนของไขมันที่ติดมาบริเวณรอบม้าม แล้วจึงตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ ใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด แล้วนำเซลล์ม้าที่ได้ไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที 1-2 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเพื่อนำเซลล์ม้าไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมไว้

นำเซลล์ม้ามาผสมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา อัตราส่วนความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1: 2 โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 380xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเขย่าเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วค่อยๆ เติมหาละลาย 50% PEG ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงไปในตะกอนเซลล์ 1 มิลลิลิตร ภายใน 1 นาที และเขย่าหลอดเบาๆ นาน 1 นาที ล้าง PEG ออกด้วย RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 380xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้าง PEG ออกจากเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin, and Thymidine medium) ที่มี 20% (v/v) FBS ลงไป นำไปเพาะเลี้ยงบนจานชนิด 96 หลุมหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังการหลอมรวมเซลล์ พยายามอย่าเคลื่อนย้ายเซลล์ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ ให้สังเกตเซลล์ในแต่ละหลุมว่าเมื่อผ่านไป 10-14 วัน เซลล์มัยอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตาย ต้องสังเกตและติดตามเซลล์ไฮบริโดมาพร้อมกับการเปลี่ยนอาหาร จะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 2 อาทิตย์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT แล้วดูอาหารเก่าออกประมาณครึ่งหลุมเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ใหม่ลงไป เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่หลุมจะดูน้ำเลี้ยงเซลล์ประมาณ 100 ไมโครลิตร มาตรวจหาการจับกันของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของโบไวน์เคซีนโดยวิธี ในข้อ 2.5 จะทำการเปลี่ยนอาหารให้เซลล์มีชีวิตอยู่ในอาหาร HT ประมาณ 2 อาทิตย์ แล้วจึงเปลี่ยนมาใช้ RPMI 1640 ที่มี 20% (v/v) FBS และเปลี่ยนเป็น 10% (v/v) FBS ตามลำดับ

2.7 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ตามวิธีในข้อ 2.5

2.8 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโบรินเคซินที่ได้จากการคัดเลือกโดยวิธี indirect ELISA มาทำให้เป็นโคลนเดี่ยว โดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม ถ้ายังไม่ได้โคลนเดี่ยว จะทำซ้ำ 3-4 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่าได้เป็นมอนอโคลน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเป็นโคลนเดี่ยวในหลุมประมาณ 25% ของพื้นกันหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาว่าเซลล์ยังคงมีแอนติบอดีต่อโบรินเคซินหรือไม่ด้วยวิธี indirect ELISA ถ้าเซลล์ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีต่อ โบรินเคซิน จึงทำการขยายเซลล์เพิ่มจำนวน แล้วนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ทดสอบต่อไป

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 10% (v/v) FBS รอให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซิโพนเนนเชียล นำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 25% (v/v) FBS และ 10% (v/v) DMSO ในขณะที่เย็นประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสติกเจอร์บิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ก่อนย้ายไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ในการนำเซลล์ที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลวออกมาใช้ทำได้โดยนำ cryotube ที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเซลล์แขวนลอยละลายจนมีลักษณะคล้ายวุ้น จึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380xg เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 20% (v/v) FBS แล้วค่อยเปลี่ยนเป็น 10% (v/v) FBS เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตดี

2.9 ตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

นำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Isotyping kit โดยทำการเตรียมแอนติบอดี ที่จำเพาะกับไอโซไทป์ชนิดต่าง ๆ คือ IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM จาก isotyping kit มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:6,000 เท่าใน PBS เติมลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไทป์ 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 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1M H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.10 การวิเคราะห์ความจำเพาะต่ออีพิโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA

การทดสอบความจำเพาะต่ออีพิโทปของมอนอโคลนอลแอนติบอดี จะใช้หลักการของ Burdon R. H. และ van Knippenberg P. H. (1984) [74] โดยทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ทำ

การเคลือบหลุมจานทดสอบ ELISA ด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เนื่องจากเป็นช่วงแอนติเจนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นได้จากการที่ผสมแอนติบอดี 2 ตัว ซึ่งมีอีพิโทปแตกต่างกัน) เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางความเข้มข้นแต่ละมอนอโคลนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด นั่นคือ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดีก็ไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่อยู่บนพื้นผิวทั้งหมดแล้ว ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมแต่ละโคลน ถูกนำมาหาความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค indirect ELISA และจำแนกระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่เติมแอนติบอดีตัวที่ 1 (A_1) ที่เจือจาง X เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงของการเติมแอนติบอดีผสมของตัวที่ 1 กับตัวที่ 2 (A_{1+2}) ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร แต่ความเข้มข้นผสมของแอนติบอดีตัวที่ 1 ยังคงเป็น X เท่าอยู่ โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของ A_1 และ A_2 ที่ให้ค่ามากที่สุด มาเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ A_{1+2} หากผลค่าการดูดกลืนแสงคงที่ แสดงว่ามอนอโคลนตัวที่ 1 และ 2 มีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน หากผลค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น แสดงว่ามอนอโคลนตัวที่ 1 และ 2 มีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่แตกต่างกันที่จะทำการเปรียบเทียบมอนอโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวที่อยู่ในกลุ่มความจำเพาะต่อสารเดียวกันและจัดกลุ่มแอนติบอดีตามความจำเพาะต่ออีพิโทป หากค่าการดูดกลืนแสงของ A_{1+2} เพิ่มขึ้นจะถูกนำมาคำนวณค่า Additive index (AI) ดังสูตร

$$AI = \left[\frac{2A_{1+2}}{(A_1 + A_2)} - 1 \right] \times 100$$

โดยค่า A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่มีการเติม MAb ตัวที่ 1 เท่านั้น, A_2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่มีการเติม MAb ตัวที่ 2 เท่านั้น, A_{1+2} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่มีการเติม MAb ผสมระหว่าง MAb ตัวที่ 1 กับ MAb ตัวที่ 2

2.11 การผลิตมอนอโคลนอลแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกคุณลักษณะที่ต้องการออกจาก -170 องศาเซลเซียส ตามขั้นตอนการนำเซลล์กลับมาเลี้ยงใหม่ (ข้อ 2.8) เลี้ยงเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 8 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ให้เจริญอยู่ในช่วง log phase ทำการขยายจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้จำนวน 10 เพลท เพื่อทำการเลี้ยงขยายลงในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มี RPMI 1640 และ 10% (v/v) FBS อยู่ 800 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์โดยเขย่าขวดตลอดเวลาที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 (อาจใช้ spinner flask ในการเลี้ยงเซลล์ได้) สังเกตสีอาหารเลี้ยงเซลล์ และการมีชีวิตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากอาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเหลือง และจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตายไปมากกว่า 60% ให้นำขวดอาหารที่มีเซลล์นี้กรองผ่านเมมเบรนเพื่อแยกเซลล์ออก และเก็บส่วนใสที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

2.12 การทำมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยโปรตีนจีเซฟาโรส

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนผ่านคอลัมน์ affinity chromatography ที่มีโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แขนงลอยใน 2.0 mM sodium phosphate

buffer ที่ pH 7.0 แพ็คอยู่ในคอลัมน์ แล้วปรับอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที ผ่านอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีมอนอโคลนอลแอนติบอดีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 2.0 mM sodium phosphate buffer ที่ pH 7.0 เก็บ 2 fraction (ส่วนของ flow through) ก่อนชะด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M glycine-HCl ที่ pH 2.7 เก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร โดยที่รอกันหลอดด้วย 1M tris-HCl ที่ pH 9.0 เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของแอนติบอดีให้เป็นกลาง (ควรทดสอบปริมาตรของ 1M tris-HCl ที่ pH 9.0 ที่ใช้สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง) นำสารละลายแอนติบอดีแต่ละ fraction ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร นำสารละลายแอนติบอดีที่เก็บรวมจาก fraction ไปเข้าสู่ขั้นตอนการ dialysis ด้วยถุงขนาดโมเลกุล 12,000 ถึง 14,000 ดาลตัน แขนงลอยอยู่ใน PBS buffer ที่ pH 7.4 เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้งต่อวัน จำนวน 2 วัน หลังจากนั้นวัดปริมาตรสารละลายแอนติบอดีที่ได้และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.13 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)

เตรียมกราฟมาตรฐาน BCA ด้วยอัลบูมินที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางความเข้มข้นของสารละลายแอนติบอดีที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ เติมตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานลงในจานทดสอบ ELISA 96-หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร ใช้ชุด BCA Protein Assay kits สำหรับทำการทดสอบด้วยการเตรียมรีเอเจนต์ A (ประกอบด้วยโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดไบคาร์บอเนต และโซเดียมทาเทรตใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์) และรีเอเจนต์ B (ประกอบด้วย สารละลายที่มี 4% คูปลิกซัลเฟต) ผสมรีเอเจนต์ทั้งสองให้เข้ากันในอัตราส่วน 50:1 (v/v) แล้วเติมลงในหลุมที่มีสารละลายแอนติบอดีอยู่หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ทำการเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน และคำนวณค่าออกมาในรูปความเข้มข้นของโปรตีน และโปรตีนที่ได้ทั้งหมด

2.14 ทดสอบความไวและการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี

ความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของโโบไวน์เคซีน หรือสารทดสอบที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 50% (50% of effective concentration; EC50) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เคลือบโโบไวน์เคซีนและสารที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ MAb กันหลุม ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม และทำตามขั้นตอนของ indirect ELISA ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 5 โดยแกน Y เป็นค่า % Absorbance และแกน X เป็นค่าล็อกกาติทิมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ และคำนวณค่า LOD โดยคำนวณจากความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่ได้มีการเคลือบกันหลุมด้วยเคซีนบวก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n= 20) และปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%CR) เกิดจากการนำค่า EC50 ของแอนติบอดีต่อโโบไวน์เคซีน และ EC50 ของแอนติบอดีต่อสารทดสอบอื่นๆ มาคำนวณได้จากสูตร

$$\%CR = \frac{EC50 \text{ ของเคซิน}}{EC50 \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

2.15 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA

ทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสามารถจับกับเคซิน เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการเคลือบเคซินความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บนจานชนิด 96 หลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม 5% FBS ในสารละลาย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมเคซินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมมอนอโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ GAM-HRP เจือจางด้วย PBS ในอัตราเจือจาง 1:1000 ปริมาตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออกด้วย PBS-T จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

เมื่อทำการคัดเลือกแอนติบอดีโคลนที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA ได้แล้ว จึงทำการทดสอบหาความไวในการตรวจหาสารเคซินในรูปสารละลายและหาปริมาณเคซินที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยแปรความเข้มข้นเคซินที่ทดสอบตั้งแต่ 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.16 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซินโดยวิธี sandwich ELISA

ในการเตรียมชุดตรวจหาปริมาณเคซินโดยวิธี sandwich ELISA ต้องใช้แอนติบอดี 2 ชนิดในการทดสอบ โดยทำการเคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติบอดีตัวแรกและใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเป็นตัวตรวจหา จากนั้นจึงทำการคัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสม

2.16.1 การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน

การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอตินโดยเตรียมแอนติบอดีเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ carbonate buffer pH 8.4 โดยการ dialysis ไว้ข้ามคืน เตรียม biotinamidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (AH-BNHS) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน DMF จากนั้นผสม AH-BNHS กับแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:10 w/w กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ dialysis ในสารละลาย PBS

2.16.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินโดยวิธี direct ELISA

ทำการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุมด้วยเคซินเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 – 16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม 5% FBS ในสารละลาย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติม streptavidin-

HRP เจือจาง 1:5000 ในสารละลาย PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้าง 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรท TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.16.3 คัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA

ทำการเคลือบจาน 96 หลุมด้วยแอนติบอดีแต่ละตัวที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 – 16 ชั่วโมง ล้างจานหลุมด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติม 5% FBS ใน PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างจานหลุม 3 ครั้ง เติมเคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจานหลุม 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างจานหลุม 3 ครั้ง เติมสาร streptavidin-HRP เจือจาง 1:5000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ล้างจานหลุม 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรท OPD ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

คัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่มีความสามารถในการจับเคซีนได้ดีโดยเมื่อเติมเคซีนจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง (ให้ผลบวก) และจะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ต่ำเมื่อไม่เติมเคซีน (ให้ผลลบ) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ให้ผลบวกหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ให้ผลลบ (P/N) เลือกคู่ที่ค่า P/N มีค่าสูง ในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA จากนั้นทำการทดสอบความไวในการตรวจหาเคซีนและสร้างกราฟมาตรฐานเคซีนของชุดทดสอบ

2.17 การประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA

2.17.1 การหาค่าความแม่นยำ

ทำการวิเคราะห์หาค่า % coefficient of variation ทั้งแบบ intra-variation assay และ inter-variation assay ของการตรวจวัด

2.17.2 การหาค่าความถูกต้อง

นำตัวอย่างน้ำนมถั่วเหลืองทางการค้าซึ่งไม่ผสมน้ำนมวัวมาเติมเคซีนที่ทราบความเข้มข้นแล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย indirect competitive ELISA หาค่า % recovery โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้และความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป

2.18 การตรวจหาปริมาณเคซีนในตัวอย่างน้ำนมวัว

นำตัวอย่างน้ำนมวัวมาตรวจหาปริมาณเคซีนด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบโดยวิธี indirect competitive ELISA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

2.18.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมวัว

นำตัวอย่างน้ำนมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 ×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนไขมัน นำตัวอย่างน้ำนมหลังปั่นเหวี่ยงมาเจือจางใน PBS ที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำไปตรวจหาเคซีนด้วยชุดทดสอบ

2.18.2 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมโดยวิธี indirect competitive ELISA

นำตัวอย่างน้ำนมวัวมาตรวจหาปริมาณเคซีนด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามหัวข้อ 2.15 โดยมีกราฟมาตรฐานเคซีนที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณเคซีนในน้ำนมวัวเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคซีน

2.18.3 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมด้วยชุดตรวจทางการค้า

นำตัวอย่างน้ำนมวัวที่เตรียมได้มาทดสอบด้วยชุดตรวจ Bovine Casein Alpha (CSN1) ELISA kit โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ตามวิธีการของคู่มือการใช้งาน ดังต่อไปนี้

เติมตัวอย่างน้ำนมหรือสารเคซีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในจานหลุมของชุดตรวจที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคซีนอัลฟา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอาสารละลายทิ้ง (ไม่ต้องล้าง) เติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคซีนอัลฟาที่เชื่อมต่อกับไปโอติน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจานหลุมด้วย wash solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม Avidin-HRP ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างจานหลุม จำนวน 5 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรท ปริมาตร 90 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณเคซีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัว

ทำการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ BALB/c 3 ตัว โดยตัวที่ 1 ฉีดกระตุ้นด้วยโบไวน์เคซีน (casein, catalog no. C3400, Sigma-Aldrich) ส่วนตัวที่ 2 และ 3 ฉีดกระตุ้นด้วยโบไวน์เคซีน (casein sodium salt from bovine milk, catalog no. C8654, Sigma-Aldrich) จำนวน 6 ครั้ง เก็บซีรัมเพื่อทดสอบค่าไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA (ดังแสดงตารางที่ 3.1) จากการทดลองพบว่า หนูตัวที่ 1 มีการตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีที่ระดับไตเตอร์ 1:4,000 ซึ่งต่ำกว่าการตอบสนองของหนูตัวที่ 2 และ 3 ซึ่งมีระดับไตเตอร์ที่ 1:256,000 และ 1:32,000 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากตัวแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นมีความแตกต่างกัน โดยเคซีนที่ใช้ฉีดกระตุ้นตัวที่ 2 และ 3 นั้นอยู่ในรูปของเกลือซึ่งมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่าเคซีนที่ใช้ฉีดกระตุ้นหนูตัวที่ 1 จึงอาจมีผลทำให้ปริมาณของแอนติเจนที่แท้จริงที่ระบบภูมิคุ้มกันของหนูจะตรวจพบนั้นแตกต่างกัน แม้ว่าจะฉีดกระตุ้นด้วยปริมาณสารที่เท่ากัน นอกจากนี้อาจมีปัจจัยเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของตัวหนูทดลองเองที่มีระดับการทำงานที่แตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 3.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย indirect ELISA เพื่อหาระดับไตเตอร์ของหนูหลังฉีดกระตุ้นด้วยโบไวน์เคซีน

ค่าการเจือจางซีรัม (1:1000X)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ซีรัมควบคุม
0.5	0.512	4.746	4.034	0.105
1	0.264	4.812	2.496	0.088
2	0.197	4.627	1.572	0.078
4	0.125	4.668	0.724	0.069
8	0.112	3.991	0.364	0.068
16	0.090	2.584	0.212	0.071
32	0.087	1.274	0.179	0.069
64	0.086	0.619	0.103	0.064
128	0.090	0.298	0.088	0.061
256	0.096	0.145	0.082	0.062
512	0.102	0.107	0.079	0.071
1024	0.121	0.099	0.086	0.080

หมายเหตุ ตัวเข้ม หมายถึงระดับการสร้างแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว

3.2 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

ทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองกับเซลล์มัยอีโลมาแล้วกระจายเซลล์เลี้ยงลงในอาหาร HAT medium ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 10-14 วัน ส่องดูเซลล์ภายใต้กล้อง พบว่า ในการหลอมรวมเซลล์จากหนูตัวที่ 1 และ 2 เซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตรอดทุกหลุม (1056 หลุม) ส่วนในการหลอมรวมเซลล์จากหนูตัวที่ 3 เซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตรอด 648 หลุมจากที่เลี้ยงทั้งหมด 864 หลุม เมื่อสังเกตได้ว่าเซลล์ในหลุมที่มีชีวิตรอด มีเซลล์อยู่ในหลุมประมาณ 25% ของหลุม นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาไปทดสอบความสามารถในการสร้างแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า มีหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมาสามารถสร้างแอนติบอดีได้เพียง 14, 191 และ 172 หลุม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) ทั้งนี้เนื่องจากการหลอมรวมเซลล์นั้นเป็นไปแบบสุ่ม เฉพาะเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์มัยอีโลมาเท่านั้นที่มีชีวิตรอดจากการเลี้ยงใน HAT medium ส่วนเซลล์ที่เกิดจากการผสมกันเองระหว่างเซลล์มัยอีโลมาหรือเซลล์ม้ามด้วยกันเองจะตายไป และเซลล์ไฮบริโดมาที่รอดมานั้นก็อาจเกิดจากเซลล์ม้ามที่ไม่ได้ผลิตแอนติบอดีต่อเคซิน นอกจากนี้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีก็อาจเจริญได้ไม่ดีเท่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่ได้สร้างแอนติบอดี จึงทำให้ถูกเบียดเบียนการเจริญและตายไป และอีกเหตุผลหนึ่งคือความไม่เสถียรของรหัสพันธุกรรมในการหลอมรวมเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดีได้

หลังจากทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ มาเลี้ยงใน RPMI1640 ทำการเจือจางจำนวนเซลล์เพื่อลงเลี้ยงในหลุมด้วยเทคนิค limiting dilution จำนวน 3-4 รอบเพื่อให้มีเซลล์ต้นกำเนิดเพียง 1 เซลล์ในแต่ละหลุมที่ทำการเลี้ยง เมื่อมีเซลล์อยู่ในหลุมประมาณ 25% ของหลุม ทำการทดสอบการสร้างแอนติบอดีพบว่า สามารถเตรียมมอนอโคลนต้นกำเนิดได้จำนวน 1, 7 และ 5 โคลนตามลำดับ โดยแต่ละโคลนต้นกำเนิดสามารถคัดแยกเลี้ยงได้เป็นมอนอโคลนจำนวน 7, 20 และ 33 โคลน ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 3.3 – 3.5)

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพการหลอมรวมเซลล์หนูที่กระตุ้นด้วยโบไวน์เคซิน

หนูตัวที่	จำนวนตั้งต้น	จำนวนเซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตรอด		เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อโบไวน์เคซิน		จำนวนโคลนต้นกำเนิดที่ได้	
	(หลุม)	(หลุม)	(%)	(หลุม)	(%)	(โคลน)	(%)
1	1056	1056	100	14	1	1	7
2	1056	1056	100	191	18	7	4
3	864	648	75	172	20	5	3

ตารางที่ 3.3 มอนอโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรจากการทำ indirect ELISA
CN1F1	10/6B/6G/2A/6E	2.974
CN2F1	10/6B/6G/7A/11B	3.139
CN3F1	10/6B/6G/7A/8G	2.900
CN4F1	10/6B/1E/8G/9H	3.088

CN5F1	10/6B/6G/2A/5B	2.918
CN6F1	10/6B/1E/8G/8E	3.045
CN7F1	10/6B/6G/2A/2B	2.806
ตัวควบคุมลบ		0.129

ตารางที่ 3.4 มอนอโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN1F4	2/6H/4F/11B/7G	4.709
CN2F4	8/1F/2C/11E/2E	3.832
CN3F4	8/1F/2C/11E/2G	3.920
CN4F4	8/1F/2C/12D/10A	2.784
CN5F4	8/1F/2C/12D/12G	3.899
CN6F4	3/4H/6A/3C/2C	2.593
CN7F4	3/4H/6A/3C/6A	3.931
CN8F4	5/3F/3C/9F/11B	2.774
CN9F4	5/3F/3C/9F/12F	2.876
CN10F4	8/4E/11C/11H/2C/5H	3.977
CN11F4	8/4E/11C/11H/2C/6C	3.812
CN12F4	10/4G/2A/10G/9D	4.263
CN13F4	10/4G/2A/10G/12G	4.503
CN14F4	11/4B/2D/2C/8D	1.279
CN15F4	11/4B/2E/11E/3A	1.123
CN16F4	4/7H/6B/4D/9F/8C	1.809
CN17F4	4/7H/6B/4D/9G/12B	3.252
CN18F4	11/4B/2E/8F/11G	1.975
CN19F4	11/4B/2F/5F/1F	3.419
CN20F4	3/2G/6G/12B	2.246
ตัวควบคุมลบ		0.102

ตารางที่ 3.5 มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 3

รหัสโคลน	โคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA
CN1F5	35/4A/7H/8F	2.949
CN2F5	35/4A/7H/9A	3.819

CN3F5	35/4A/7H/9B	3.639
CN4F5	35/4A/7H/9D	1.554
CN5F5	35/4A/7H/10D	2.736
CN6F5	35/4A/7H/12F	3.791
CN7F5	35/4A/10A/3B	2.862
CN8F5	35/4A/10A/3D	3.668
CN9F5	35/4A/10A/4C	3.926
CN10F5	35/4A/10A/4D	3.635
CN11F5	35/4A/10A/4H	3.583
CN12F5	35/4A/10A/5B	3.635
CN13F5	81/1B/10D/2B	3.424
CN14F5	81/1B/10D/3A	2.575
CN15F5	81/1B/10D/4A	1.585
CN16F5	81/1B/10D/4E	2.051
CN17F5	81/1B/10D/5G	2.043
CN18F5	81/1B/10D/6F	2.130
CN19F5	81/1B/10D/7F	2.579
CN20F5	81/1B/10D/9A	3.714
CN21F5	81/1B/8C/9E	2.815
CN22F5	81/1B/8C/11G/8E	3.259
CN23F5	73/10A/10H/4A/8E	3.066
CN24F5	73/10A/10H/4A/8H	4.638
CN25F5	73/10A/10H/4A/10G	4.527
CN26F5	169/1A/8D/6D/9B	1.547
CN27F5	169/1A/10H/8G/5G	1.757
CN28F5	169/1A/10H/9C/10H	2.608
CN29F5	169/1A/10H/8G/12E	2.922
CN30F5	152/5A/2H/9D/1B	1.689
CN31F5	152/5A/2H/9D/1E	3.466
CN32F5	152/5A/2H/9D/2G	1.960
CN33F5	152/5A/2H/9D/10H	0.763
ตัวควบคุมลบ		0.152

จากการที่ได้จำนวนมอนอโคลนจำนวนมาก จึงต้องทำการคัดเลือกมอนอโคลนที่ได้ โดยทำการศึกษา ลักษณะสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดี เพื่อแยกและจัดกลุ่มแอนติบอดีจากมอนอโคลนที่มีลักษณะสมบัติ จำเพาะและมีความเหมือนกันเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานได้อย่างเหมาะสม

3.3 ศึกษาไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจสอบไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี มีส่วนช่วยในการทำให้ทราบว่าแอนติบอดีนั้นเป็นมอนอแอนติบอดีแล้วหรือไม่ หากพบผลการตรวจสอบบวกมากกว่า 1 ไอโซไทป์แสดงว่าในหลุมที่ทำการเลี้ยงเซลล์นั้นมีเซลล์มากกว่า 1 ชนิดที่สร้างแอนติบอดีที่แตกต่างกัน และยังให้ข้อมูลในการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีด้วยเทคนิค affinity chromatography ด้วยโปรตีนจี หรือโปรตีนเอ เนื่องจาก MAb แต่ละชนิดมีความสามารถในการจับได้แตกต่างกันในโปรตีนจีหรือโปรตีนเอ จึงถูกชะออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ผลการตรวจสอบพบว่า แอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์แตกต่างกันจากการหลอมรวมเซลล์ในแต่ละครั้ง โดยแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 1 จะมีไอโซไทป์เป็น IgM ทั้งหมด ส่วนแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 จะได้แอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ 3 ชนิด คือ IgG₁, IgG_{2a} และ IgM และแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 3 จะมีไอโซไทป์เป็น IgG₁ และ IgG_{2a} (ตารางที่ 3.6) โดยสามารถจำแนกกลุ่มแอนติบอดีตามไอโซไทป์ IgG₁ IgG_{2a} และ IgM ได้จำนวน 46, 5 และ 9 โคลน ตามลำดับ (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.6 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA

Clone	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
CN1F1	0.336	0.631	0.228	0.264	3.695	0.319
CN2F1	0.196	0.596	0.190	0.214	3.776	0.314
CN3F1	0.345	0.591	0.242	0.249	3.434	0.289
CN4F1	0.335	0.584	0.216	0.248	3.617	0.329
CN5F1	0.364	0.678	0.295	0.289	3.744	0.344
CN6F1	0.220	0.650	0.238	0.257	3.648	0.355
CN7F1	0.317	0.639	0.206	0.236	3.478	0.281
CN1F4	0.100	0.537	0.098	0.135	0.254	0.085
CN2F4	0.544	0.091	0.103	0.094	0.107	0.129
CN3F4	0.479	0.105	0.109	0.112	0.118	0.124
CN4F4	0.106	0.460	0.100	0.116	0.092	0.094
CN5F4	0.820	0.330	0.090	0.118	0.260	0.078
CN6F4	0.108	0.094	0.100	0.095	0.532	0.176
CN7F4	0.126	0.126	0.093	0.097	1.395	0.149
CN8F4	0.794	0.103	0.118	0.108	0.160	0.114
CN9F4	0.779	0.108	0.088	0.117	0.138	0.108
CN10F4	0.472	0.080	0.088	0.084	0.101	0.108

*หมายเหตุ ตัวเข้ม หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้บอกไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

Clone	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
CN11F4	0.208	0.076	0.094	0.077	0.100	0.099
CN12F4	0.708	0.067	0.074	0.075	0.068	0.076
CN13F4	0.344	0.065	0.066	0.082	0.071	0.077
CN14F4	0.668	0.060	0.064	0.064	0.075	0.078
CN15F4	0.396	0.061	0.068	0.070	0.071	0.082
CN16F4	0.367	0.070	0.098	0.081	0.106	0.151
CN17F4	0.209	0.070	0.077	0.096	0.083	0.105
CN18F4	0.575	0.071	0.073	0.068	0.077	0.082
CN19F4	0.609	0.078	0.087	0.080	0.082	0.098
CN20F4	0.371	0.074	0.081	0.083	0.090	0.103
CN1F5	2.999	0.275	0.155	0.138	0.397	0.230
CN2F5	3.088	0.260	0.128	0.119	0.319	0.113
CN3F5	2.948	0.275	0.139	0.149	0.344	0.130
CN4F5	2.901	0.202	0.128	0.123	0.270	0.106
CN5F5	2.997	0.232	0.131	0.121	0.291	0.095
CN6F5	2.957	0.206	0.115	0.101	0.340	0.104
CN7F5	3.040	0.236	0.113	0.093	0.307	0.107
CN8F5	3.033	0.420	0.143	0.161	0.514	0.106
CN9F5	3.264	0.445	0.265	0.154	0.510	0.215
CN10F5	3.207	0.369	0.217	0.157	0.461	0.297
CN11F5	3.120	0.518	0.163	0.160	0.695	0.165
CN12F5	3.054	0.321	0.134	0.118	0.342	0.121
CN13F5	2.802	0.191	0.114	0.098	0.183	0.105
CN14F5	2.527	0.157	0.105	0.090	0.162	0.115
CN15F5	2.462	0.172	0.091	0.114	0.174	0.108
CN16F5	2.552	0.221	0.214	0.120	0.193	0.115
CN17F5	2.515	0.201	0.119	0.100	0.157	0.102
CN18F5	2.353	0.130	0.083	0.079	0.126	0.097
CN19F5	2.373	0.132	0.078	0.074	0.141	0.082
CN20F5	2.383	0.134	0.076	0.080	0.122	0.076
CN21F5	2.313	0.128	0.073	0.065	0.118	0.074
CN22F5	2.158	0.111	0.062	0.068	0.120	0.101
CN23F5	0.105	0.396	0.082	0.081	0.131	0.084

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

CN24F5	0.098	0.421	0.099	0.087	0.141	0.095
CN25F5	0.096	0.341	0.077	0.090	0.124	0.091
CN26F5	2.385	0.294	0.083	0.099	0.102	0.078
CN27F5	2.416	0.175	0.059	0.115	0.088	0.119
CN28F5	2.418	0.193	0.086	0.102	0.202	0.093
CN29F5	2.422	0.199	0.076	0.103	0.175	0.159
CN30F5	1.599	0.137	0.072	0.064	0.134	0.068
CN31F5	1.512	0.123	0.066	0.064	0.127	0.068
CN32F5	1.308	0.010	0.059	0.063	0.116	0.063
CN33F5	1.307	0.090	0.053	0.058	0.108	0.060

*หมายเหตุ ตัวเข้ม หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้บอกไอโซไทป์ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ตารางที่ 3.7 การจำแนกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามชนิดของไอโซไทป์

มอนอโคลนอลแอนติบอดี	ไอโซไทป์				
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgM	IgA
CN1F1 ถึง CN7F1	-	-	-	7	-
CN1F4 และ CN4F4	-	2	-	-	-
CN2F4, CN3F4, CN5F4 และ CN8F4 ถึง CN20F4	16	-	-	-	-
CN6F4 และ CN7F4	-	-	-	2	-
CN1F5 ถึง CN22F5 และ CN26F5 ถึง CN26F5	30	-	-	-	-
CN23F5 ถึง CN25F5	-	3	-	-	-
รวม	46	5	-	9	-

3.4 การทดสอบความสามารถของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีน

ทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเคซีนชนิดต่างๆ จากวัวและโปรตีนอื่นด้วย indirect ELISA โดยการเคลือบหลุมด้วยโพรไวน์เคซีน (CN), แอลฟา_s เคซีน (α_s -CN), บีตา เคซีน (β -CN), แคปตา เคซีน (κ -CN), บีตา แล็กโทโกลบูลิน (β -Lg) อัลฟา แลตต์ลูมิน (α -la), แอลบูมิน (BSA), ทรานเฟอริน (transferrin), อินซูลิน (insulin) และ โอวัลบูมิน (OVA) จากผลการทดสอบสามารถแบ่งกลุ่มของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแตกต่างกันได้ 7 กลุ่ม ตามความสามารถในการจับกับสารที่ทดสอบดังสรุปในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 การจำแนกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตามชนิดของเคซีนจากวัวที่แอนติบอดีจับได้

กลุ่มที่	สารที่ทำปฏิกิริยากับ MAb	มอนอโคลนอลแอนติบอดี		
I	CN, α_s -CN	-	CN1F4	-
II	β -CN, κ -CN	-	-	CN21F5, CN22F5, CN30F5, CN31F5, CN32F5, CN33F5
III	CN, α_s -CN, β -CN	-	CN2F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN16F4, CN17F4	CN23F5, CN24F5, CN25F5
IV	CN, α_s -CN, β -CN, κ -CN	-	CN12F4, CN13F4, CN20F4	CN1F5, CN2F5, CN3F5, CN4F5, CN5F5, CN6F5, CN7F5, CN8F5, CN9F5, CN10F5 ถึง CN20F5, CN26F5, CN27F5, CN28F5, CN29F5
V	CN, α_s -CN, β -CN, β -Lg	-	CN6F4, CN7F4	-
VI	CN, α_s -CN, β -CN, κ -CN, OVA	CN4F1	-	-
VII	จับสารทดสอบทุกตัว	-	CN14F4, CN15F4, CN18F4, CN19F4	-

MAb กลุ่มที่ I เป็นแอนติบอดีกลุ่มที่มีความสามารถจับกับ CN และ α_s -CN ซึ่ง MAb ในกลุ่มนี้มีเพียง 1 โคลนได้แก่ CN1F4 MAb กลุ่มที่ II เป็นแอนติบอดีที่จับได้กับ β -CN และ κ -CN ซึ่งมีอยู่จำนวน 6 โคลนคือ CN21F5, CN22F5, CN30F5, CN31F5, CN32F5 และ CN33F5 ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ของหนูตัวที่ 2 ในกลุ่มที่ III จำนวน 10 โคลน เป็น MAb ที่สามารถจับได้กับ CN, α_s -CN และ β -CN กลุ่มที่ IV จำนวน 27 โคลน เป็น MAb ที่จับกับเคซีนทุกชนิด กลุ่มที่ V จำนวน 2 โคลน คือ CN6F4 และ CN7F4 เป็น MAb ที่จับกับ CN, α_s -CN, β -CN และ β -Lg กลุ่มที่ VI เป็นซึ่ง MAb ที่จับกับเคซีนทุกชนิดและโอวัลบูมิน ในกลุ่มนี้มีเพียง 1 โคลน ได้แก่ CN4F1 และกลุ่มสุดท้ายกลุ่มที่ VII เป็น MAb ที่จำเพาะกับสารทุกตัวที่ทดสอบ มีจำนวน 4 โคลน ได้แก่ CN14F4, CN15F4, CN18F4 และ CN19F4 จะเห็นได้ว่า MAb กลุ่ม V, VI และ VII ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวัด เนื่องจากสามารถจับกับโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่เคซีนได้ ส่วนเคซีนในกลุ่ม II ไม่สามารถจับกับ α_s -CN ซึ่งเป็นเคซีนที่พบมากถึง 50% ในน้ำนมวัว จึงไม่เหมาะแก่การนำไปใช้งานต่อเช่นกัน

ดังนั้นจึงเหลือเฉพาะ MAb ในกลุ่มที่ I, III และ IV ที่จะถูกนำไปศึกษาต่อ อย่างไรก็ตามได้พบว่า โคลน CN4F4, CN8F4 และ CN9F4 สูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดี จึงไม่นำไปศึกษาต่อเช่นกัน

3.5 การวิเคราะห์ความจำเพาะของแอนติบอดีต่ออีพิโทปต่างๆ ของเคซีน

เนื่องจากเคซีนเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ จึงอาจมีตำแหน่งให้แอนติบอดีจดจำและจับได้หลายตำแหน่ง จึงได้ทำการตรวจสอบว่ามีแอนติบอดีคู่ใดบ้างที่สามารถจับกับเคซีนบนอีพิโทปที่แตกต่างกัน โดยการทำให้ indirect ELISA ด้วยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ระหว่างการเติม MAb เพียงชนิดเดียวกับการเติมผสมลงไปพร้อมกัน 2 ชนิด ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการผสมแอนติบอดีสูงกว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการเติมแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดแยกกันแสดงว่า แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดอาจจับเคซีนที่ต่างอีพิโทปกัน

ตารางที่ 3.9 ค่าการดูดกลืนแสงจากการวิเคราะห์ความจำเพาะของอีพิโทปที่จับด้วย MAb ต่อเคซีนจากวัว

MAbs	กลุ่มที่ I	กลุ่มที่ III						กลุ่มที่ IV		
	1 CN1F4	2 CN3F4	3 CN5F4	4 CN10F4	5 CN11F4	6 CN16F4	7 CN17F4	8 CN12F4	9 CN13F4	10 CN20F4
1 CN1F4	2.047	2.583	2.547	2.031	2.703	2.731	2.469	1.756	1.470	2.842
2 CN3F4		1.872	1.815	2.053	2.178	2.201	2.280	1.619	1.796	3.368
3 CN5F4			1.946	1.896	2.092	2.323	2.123	2.296	1.892	2.707
4 CN10F4				1.471	1.889	2.157	1.672	1.382	1.344	2.516
5 CN11F4					1.607	1.981	1.776	1.703	1.711	2.870
6 CN16F4						2.176	1.928	1.963	1.998	2.531
7 CN17F4							1.994	1.466	1.358	2.198
8 CN12F4								0.722	0.727	2.476
9 CN13F4									0.711	2.846
10 CN20F4										1.856

* หมายเหตุ ส่วนสีเทา หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตั้งแต่ประมาณ 0.100

เมื่อแปลงค่าการดูดกลืนแสงโดยคิดเป็น % Additive index (AI) (แสดงสมการในวิธีทดลอง) จะได้ค่า ดังแสดงในตาราง 3.10 โดยจะคิดเฉพาะเมื่อค่าการดูดกลืนแสงจากการใช้แอนติบอดีผสมสูงกว่าการใช้ แอนติบอดีเพียงตัวเดียวเท่านั้น

ตารางที่ 3.10 ค่า Additive index ของค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์การจับกับเคซีนจากวัว

MAbs	กลุ่มที่ I	กลุ่มที่ III						กลุ่มที่ IV		
	1 CN1F4	2 CN3F4	3 CN5F4	4 CN10F4	5 CN11F4	6 CN16F4	7 CN17F4	8 CN12F4	9 CN13F4	10 CN20F4
1 CN1F4	-	32	28	15	48	29	22	-	-	46
2 CN3F4		-	-	23	25	9	18	-	-	81
3 CN5F4			-	-	18	13	8	72	-	42
4 CN10F4				-	23	-	-	-	-	51
5 CN11F4					-	-	-	46	48	66
6 CN16F4						-	-	-	-	26
7 CN17F4							-	-	-	14
8 CN12F4								-	-	92
9 CN13F4									-	122
10 CN20F4										-

จากค่า Additive index (AI) ชี้ให้เห็นว่า MAb จากมอนอโคลน CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 จำนวน 8 โคลน มีแนวโน้มที่จะจับกับเคซีนของวัวที่ตำแหน่ง หรืออิพิโทปแตกต่างกัน การที่ได้ MAb ที่มีอิพิโทปแตกต่างกันนั้นมีประโยชน์ในการที่จะนำไปใช้ในการตรวจที่ อาศัยหลักการ sandwich คือใช้ MAb 2 ตัวในการจับกับเคซีนในการตรวจวัด

3.6 การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส

จากการศึกษาคุณสมบัติของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ คัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโวกซ์เคซินและจับกับอิพิโทปที่แตกต่างกัน โดยทำการคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 มาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส เก็บส่วนแอนติบอดีบริสุทธิ์มาทำการ dialysis ใน PBS และตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA ได้ผลดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.11 ปริมาณโปรตีนของมอนอโคลนอลแอนติบอดีหลังทำบริสุทธิ์

โคลน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน	
		ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	รวม (มิลลิกรัม)
CN1F4	18	1.78	32.04
CN3F4	14	2.12	29.72
CN5F4	14	2.38	33.32
CN10F4	15	2.95	44.30
CN11F4	15	2.91	43.67
CN12F4	14	2.61	36.58
CN16F4	11	2.47	27.12
CN20F4	13.5	2.13	28.76

3.7 การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดี

ค่าความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีจะแสดงค่าในรูป EC50 คือ ค่าความเข้มข้นของเคซินที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 50% และค่า LOD คือความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยในการวิเคราะห์จะใช้ความเข้มข้นของ MAb ที่ 8.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในการทำ indirect ELISA และแอนติเจนที่ใช้จะแปรความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 - 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3.12 ความไวของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกคัดเลือก

มอนอโคลนอลแอนติบอดี	EC50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
CN1F4	0.09	8.3
CN3F4	0.76	15.4

CN5F4	0.46	18.0
CN10F4	0.86	18.2
CN11F4	0.83	21.5
CN12F4	0.75	15.8
CN16F4	0.28	19.2
CN20F4	0.14	6.1

ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดี แสดงดังตารางที่ 3.12 ซึ่งให้เห็นว่าความไวของ MAb ในรูปของค่า EC50 จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.09 ถึง 0.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในรูปของค่า LOD ในช่วง 6.1 ถึง 21.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการเปรียบเทียบค่าความไวกับค่าความไวของชุดตรวจทางการค้า เช่น บริษัท Neogen ที่มีค่า LOD อยู่ในช่วง 2.5 ถึง 15 ppm จะเห็นว่า MAb CN1F4 และ CN20F4 มีค่าความไวอยู่ในช่วงค่า LOD ของชุดตรวจ ดังนั้น MAb จากทั้ง 2 โคลนนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานต่อ อย่างไรก็ตาม MAb จากโคลนอื่นก็ให้ค่า LOD สูงกว่าเล็กน้อยจึงมีโอกาสนำไปใช้งานได้ แต่ต้องเพิ่มค่าความไวหรือลดค่า LOD ในการตรวจ เช่นการตรวจในรูปแบบของ sandwich ELISA ซึ่งจะให้ค่าความไวเพิ่มขึ้น 2-5 เท่า เมื่อเทียบกับรูปแบบ indirect ELISA (Sino Biological Inc. website search on 22 March 2018)

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนจากวัวในแต่ละไอโซไทป์เคซีนทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 3.13

ตารางที่ 3.13 ค่า EC50 และเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อแต่ละ ไอโซไทป์ของโบไวน์เคซีนด้วยเทคนิค indirect ELISA

MAb จากมอนอโคลน	โบไวน์เคซีน		แอลฟาส เคซีน		บีตา เคซีน		แคปปา เคซีน	
	EC50	% CR	EC50	% CR	EC50	% CR	EC50	% CR
CN1F4	0.09	100	0.05	190	-	-	-	-
CN3F4	0.76	100	4.34	17	7.60	10	-	-
CN5F4	0.46	100	0.65	71	7.62	6	-	-
CN10F4	0.86	100	5.52	16	5.19	17	-	-
CN11F4	0.83	100	10.18	8	9.81	9	-	-
CN12F4	0.76	100	2.87	26	2.68	28	0.16	476
CN16F4	0.28	100	0.63	45	0.83	34	-	-
CN20F4	0.14	100	2.24	6	0.13	105	0.02	770

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb พบว่าแอนติบอดีจากมอนอโคลน CN1F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อแอลฟาส เคซีนมากที่สุด แอนติบอดีจากมอนอโคลน CN12F4 และ CN20F4 เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อทุกไอโซไทป์ของเคซีน และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแคปปา เคซีนมากที่สุด อย่างไรก็ตาม มอนอโคลนอลแอนติบอดี

ทั้งหมดนี้สามารถถูกนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบได้ โดยการเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบโบทัวนเคซินต่อไป

3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA

3.8.1 การคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีตัวที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA

เมื่อนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ทั้ง 8 โคลน มาทดสอบการจับกับเคซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี indirect competitive ELISA แอนติบอดีที่จับกับเคซินในรูปสารละลายได้จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดีที่ไม่ได้เติมเคซิน พบว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดี CN1F4 มีความสามารถจับกับเคซินที่เติมลงไปได้ดีที่สุด คือสามารถจับเคซินในรูปสารละลายได้ 85 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือมอนอโคลนอลแอนติบอดี CN20F4 สามารถจับได้ 79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลนอื่นมีความสามารถในการจับกับเคซินได้ประมาณ 40 – 65 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3.14

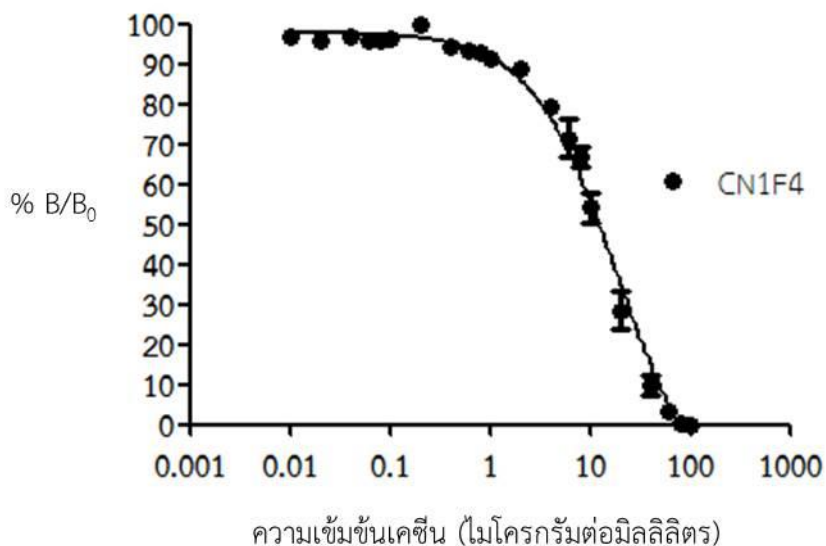
ตารางที่ 3.14 การทดสอบความสามารถของมอนอโคลนอลแอนติบอดีในการจับเคซินในรูปสารละลายโดยวิธี indirect competitive ELISA

แอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		เปอร์เซ็นต์การจับกับเคซิน
	แอนติบอดี + PBS	แอนติบอดี + เคซิน	
CN1F4	0.88 ± 0.01	0.13 ± 0.01	85
CN3F4	1.03 ± 0.03	0.45 ± 0.02	57
CN5F4	1.15 ± 0.01	0.55 ± 0.04	53
CN10F4	0.77 ± 0.02	0.34 ± 0.01	55
CN11F4	1.25 ± 0.02	0.53 ± 0.04	57
CN12F4	1.17 ± 0.03	0.69 ± 0.09	41
CN16F4	0.95 ± 0.03	0.33 ± 0.01	65
CN20F4	1.04 ± 0.02	0.21 ± 0.01	79

3.8.2 การทดสอบความไวของแอนติบอดีในการเตรียมชุดตรวจเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA

จากการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเคซินในรูปสารละลาย แอนติบอดี CN1F4 และ CN20F4 มีความสามารถในการจับเคซินในรูปสารละลายได้ดีจึงทำการทดสอบความไวในการจับกับเคซิน ทดสอบตามหัวข้อ 2.15 โดยแปรความเข้มข้นของเคซินที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคำนวณค่า LOD และค่า IC₅₀ ได้ผลดังกราฟรูปที่ 1 จากผลการทดสอบแอนติบอดี CN1F4 มีความสามารถในการจับกับเคซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ดีกว่า CN20F4 โดยแอนติบอดี CN1F4 วัดค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดใกล้เคียงศูนย์แสดงว่าแอนติบอดีสามารถจับกับเคซินได้ดี สำหรับแอนติบอดี CN20F4 มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 แสดงว่าแอนติบอดี CN20F4 จับกับเคซินได้ไม่ดี เมื่อทดสอบความไวของแอนติบอดี CN1F4 พบว่ามีค่า LOD และ IC₅₀ เท่ากับ 2.46±0.01

และ 17.01 ± 4.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกโคลน CN1F4 ในการเตรียมชุดตรวจสอบเคซีนโดยใช้เทคนิค indirect competitive ELISA



รูปที่ 1 การทดสอบความไวของแอนติบอดี CN1F4 โดยวิธี indirect competitive ELISA

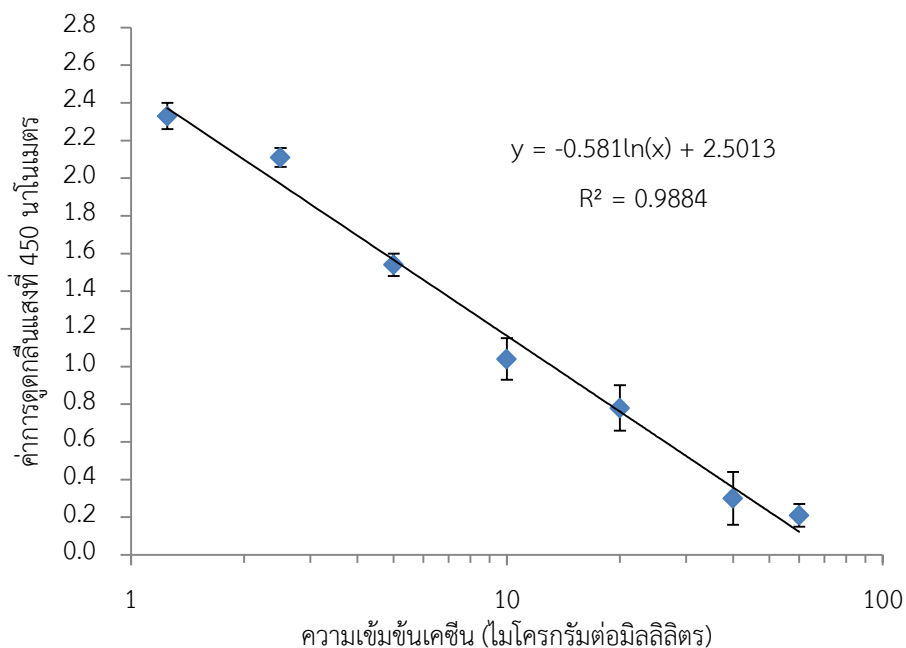
3.8.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานเคซีนในชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA

จากผลการทดสอบความไวของแอนติบอดี CN1F4 โดยการเคลือบหลุมด้วยเคซีนที่เข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบกับแอนติบอดี CN1F4 เจือจาง 1:16000 สามารถจับกับเคซีนในรูปสารละลายเคซีน ได้กราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเคซีนเท่ากับ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับตรวจหาปริมาณเคซีนในตัวอย่างโดยวิธี indirect competitive ELISA ดังตารางที่ 3.15 และกราฟรูปที่ 2

ตารางที่ 3.15 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานเคซีน ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นเคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
0	2.61 ± 0.04	2.55 ± 0.04	2.72 ± 0.06	2.66 ± 0.07	2.64 ± 0.07
1.25	2.40 ± 0.06	2.28 ± 0.06	2.30 ± 0.05	2.33 ± 0.06	2.33 ± 0.05
2.5	2.19 ± 0.07	2.05 ± 0.07	2.10 ± 0.07	2.10 ± 0.08	2.11 ± 0.06
5	1.70 ± 0.06	1.48 ± 0.10	1.49 ± 0.08	1.48 ± 0.13	1.54 ± 0.11
10	1.22 ± 0.07	0.95 ± 0.10	1.02 ± 0.08	0.98 ± 0.11	1.04 ± 0.12
20	0.98 ± 0.06	0.69 ± 0.08	0.80 ± 0.06	0.67 ± 0.08	0.78 ± 0.14

40	0.39 ± 0.07	0.25 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.06
60	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.02



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานเคซีนทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

3.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA

การทดสอบโดยวิธี sandwich ELISA ต้องใช้แอนติบอดี 2 ตัว โดยเคลือบแอนติบอดีตัวแรกบนจานหลุมและแอนติบอดีตัวที่ 2 เชื่อมต่อกับไบโอติน ทำการเชื่อมต่อมอนอโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 ตัวกับไบโอติน ได้แก่ มอนอโคลนอลแอนติบอดี CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 ตามหัวข้อ 2.16.1 จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินในการจับกับเคซีน

3.9.1 การทดสอบแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินโดยวิธี ELISA

จากการนำมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ และทดสอบการทำปฏิกิริยากับเคซีนที่เคลือบบนจาน 96 หลุม โดยวิธี direct ELISA ตามหัวข้อ 2.16.2 พบว่าเมื่อทำการเจือจางแอนติบอดีที่เชื่อมต่อบิโอดินที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 และ 1:16000 เท่า แอนติบอดีทุกตัวยังมีประสิทธิภาพการจับกับเคซีนได้ดี โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ประมาณ 1.00 แอนติบอดี CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN12F4 มีค่าการเจือจางที่ 1:1000 เท่า แอนติบอดี CN10F4 และ CN11F4 เจือจางที่ 1:16000 เท่า แอนติบอดี CN16F4 และ CN20F4 เจือจางที่ 1:2000 และ 1:4000 เท่า ตามลำดับดังตารางที่ 3.16 จากนั้นจึงนำแอนติบอดีทั้ง 8 ตัวไปทำการทดสอบแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสมในการทดสอบโดยวิธี sandwich ELISA

ตารางที่ 3.16 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไปโอดีโนโดยวิธี ELISA

แอนติบอดี เจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					
	1:500	1:1,000	1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000
CN1F4	2.06±0.74	1.05±0.29	0.58±0.23	0.35±0.05	0.21±0.03	0.16±0.02
CN3F4	2.46±0.79	1.27±0.28	0.62±0.15	0.34±0.07	0.22±0.03	0.15±0.02
CN5F4	1.96±0.51	0.98±0.26	0.55±0.10	0.28±0.05	0.19±0.03	0.14±0.01
CN10F4	4.03±0.11	4.19±0.00	4.11±0.05	4.00±0.20	2.54±0.43	1.38±0.21
CN11F4	3.80±0.26	4.16±0.12	4.03±0.05	3.97±0.11	2.66±0.35	1.49±0.20
CN12F4	2.20±0.06	1.14±0.09	0.74±0.08	0.44±0.07	0.81±0.87	0.38±0.32
CN16F4	3.34±0.40	1.85±0.12	1.06±0.18	0.54±0.06	0.32±0.01	0.20±0.01
CN20F4	4.14±0.06	3.70±0.21	2.11±0.19	1.18±0.06	0.59±0.04	0.34±0.02

3.9.2 คัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี sandwich ELISA

เมื่อทำการเคลือบแอนติบอดีตัวที่ 1 แต่ละตัวลงบนจานหลุม จากนั้นเติมเคซีนความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลุมที่ให้ผลบวก) เปรียบเทียบกับหลุมที่เติม PBS (หลุมที่ให้ผลลบ) แล้วจึงทำปฏิกิริยาด้วยแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไปโอดีโนแต่ละตัว ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.16.3 ได้ผลดังตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคัดเลือกแอนติบอดีคู่ที่เหมาะสม

Ab ที่เชื่อมต่อไปโอดีโน Ab เคลือบหลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CN1F4-B			CN3F4-B		
	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N
CN1F4	0.60	0.63	0.94	0.58	0.58	0.99
CN3F4	0.64	0.66	0.97	0.61	0.68	0.91
CN5F4	0.60	0.68	0.88	0.62	0.73	0.85
CN10F4	0.63	0.70	0.90	0.65	0.78	0.84
CN11F4	0.63	0.73	0.86	0.68	0.80	0.85
CN12F4	0.66	0.68	0.96	0.67	0.65	1.04
CN16F4	0.55	0.69	0.80	0.56	0.64	0.88
CN20F4	0.75	0.67	1.12	0.69	0.68	1.02

Ab ที่เชื่อมต่อไปโอดีโน Ab เคลือบหลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CN5F4-B			CN10F4-B		
	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N
CN1F4	1.68	0.91	1.85	0.76	0.20	3.80

CN3F4	1.40	1.05	1.33	0.42	0.19	2.19
CN5F4	1.35	1.10	1.23	0.40	0.20	1.97
CN10F4	1.41	1.19	1.18	0.36	0.20	1.81
CN11F4	1.52	1.21	1.26	0.38	0.20	1.90
CN12F4	1.76	0.95	1.86	0.78	0.19	4.09
CN16F4	1.61	0.89	1.82	0.68	0.18	3.78
CN20F4	1.75	0.91	1.92	0.72	0.21	3.51

Ab ที่เชื่อมต่อกับไปโอติน Ab เคลือบหลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CN11F4-B			CN12F4-B		
	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N
CN1F4	0.81	0.22	3.75	0.71	0.78	0.91
CN3F4	0.54	0.23	2.40	0.78	0.94	0.83
CN5F4	0.51	0.22	2.37	0.79	0.95	0.84
CN10F4	0.47	0.20	2.33	0.80	0.99	0.81
CN11F4	0.45	0.22	2.07	0.82	1.02	0.80
CN12F4	0.92	0.21	4.50	0.80	0.82	0.98
CN16F4	0.77	0.20	3.76	0.63	0.73	0.87
CN20F4	0.80	0.22	3.69	0.88	0.80	1.10

Ab ที่เชื่อมต่อกับไปโอติน Ab เคลือบหลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CN16F4-B			CN20F4-B		
	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N	เคซีน (P)	PBS (N)	P/N
CN1F4	0.26	0.25	1.03	0.56	0.40	1.41
CN3F4	0.27	0.31	0.89	0.60	0.43	1.39
CN5F4	0.27	0.31	0.89	0.61	0.44	1.39
CN10F4	0.27	0.33	0.82	0.69	0.45	1.53
CN11F4	0.27	0.35	0.77	0.64	0.46	1.40
CN12F4	0.28	0.26	1.07	0.63	0.41	1.52
CN16F4	0.23	0.29	0.78	0.48	0.43	1.13
CN20F4	0.28	0.24	1.15	0.69	0.41	1.67

แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไปโอตินที่สามารถจับกับเคซีนได้ดี ได้แก่ CN10F4-B และ CN11F4-B คือมีค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาสูงเมื่อเติมเคซีนและค่าต่ำเมื่อไม่มีเคซีน และจับคู่กับแอนติบอดีที่เคลือบหลุม ได้แก่ CN12F4 และ CN20F4 ซึ่งเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาหลุมที่เติมเคซีนซึ่งให้ผลบวก (P) หารด้วยค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่เติมเคซีนซึ่งให้ผลลบ (N) มีค่าสูง

จากนั้นทำการทดสอบเปรียบเทียบการเคลือบหลุมด้วย CN12F4, CN20F4 และไม่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดี เติมเคซินที่ความเข้มข้น 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินได้แก่ CN10F4-B เปรียบเทียบกับ CN11F4-B ทดสอบโดยวิธี sandwich ELISA พบว่า หลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดีผลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันกับหลุมที่ไม่เคลือบแอนติบอดีบนจานหลุม แสดงว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินก็สามารถจับกับเคซินและลงไปติดกับหลุมได้ ดังตารางที่ 3.18

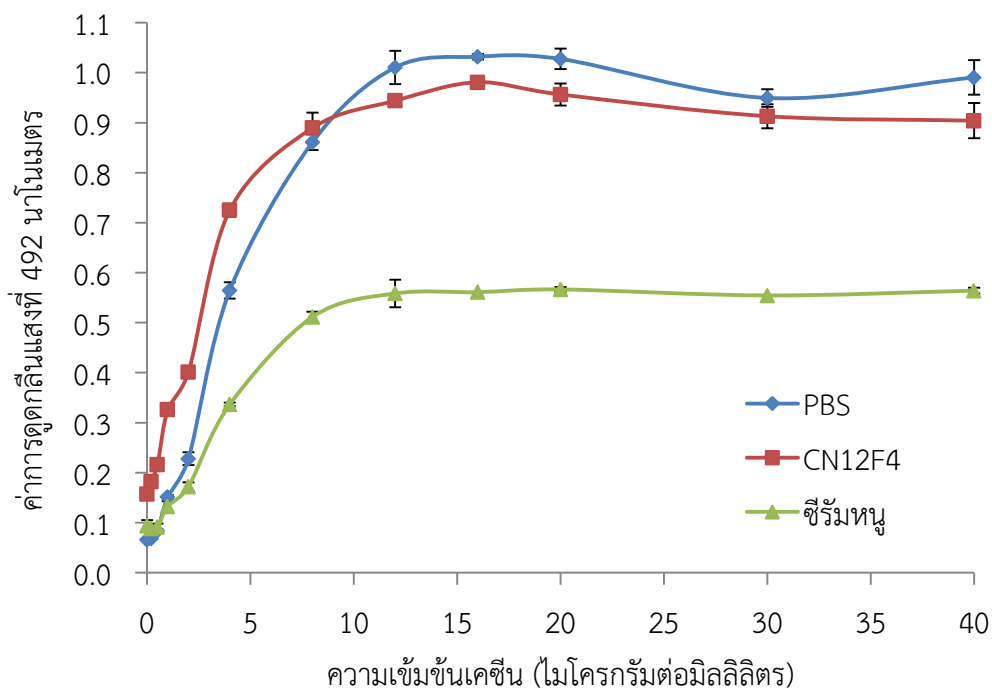
ตารางที่ 3.18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทดสอบเคซินโดยวิธี sandwich ELISA

Ab ที่เชื่อมต่อกับไบโอติน เคซินเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	CN10F4-B			CN11F4-B		
	เคลือบหลุมด้วย			เคลือบหลุมด้วย		
	CN12F4	CN20F4	PBS	CN12F4	CN20F4	PBS
0	0.20±0.01	0.17±0.00	0.08±0.01	0.34±0.01	0.28±0.00	0.08±0.00
0.31	0.20±0.00	0.18±0.00	0.07±0.00	0.34±0.00	0.31±0.02	0.08±0.00
0.62	0.21±0.01	0.20±0.00	0.08±0.01	0.34±0.01	0.33±0.01	0.08±0.00
1.25	0.23±0.00	0.27±0.00	0.08±0.01	0.39±0.01	0.40±0.02	0.10±0.00
2.5	0.29±0.01	0.42±0.01	0.13±0.01	0.49±0.02	0.55±0.04	0.20±0.00
5	0.49±0.02	0.65±0.00	0.30±0.01	0.81±0.03	0.80±0.05	0.53±0.01
10	0.90±0.02	1.01±0.02	0.71±0.02	1.31±0.02	1.25±0.04	0.96±0.00
20	1.49±0.02	1.64±0.01	1.41±0.05	1.91±0.04	1.75±0.00	1.63±0.01

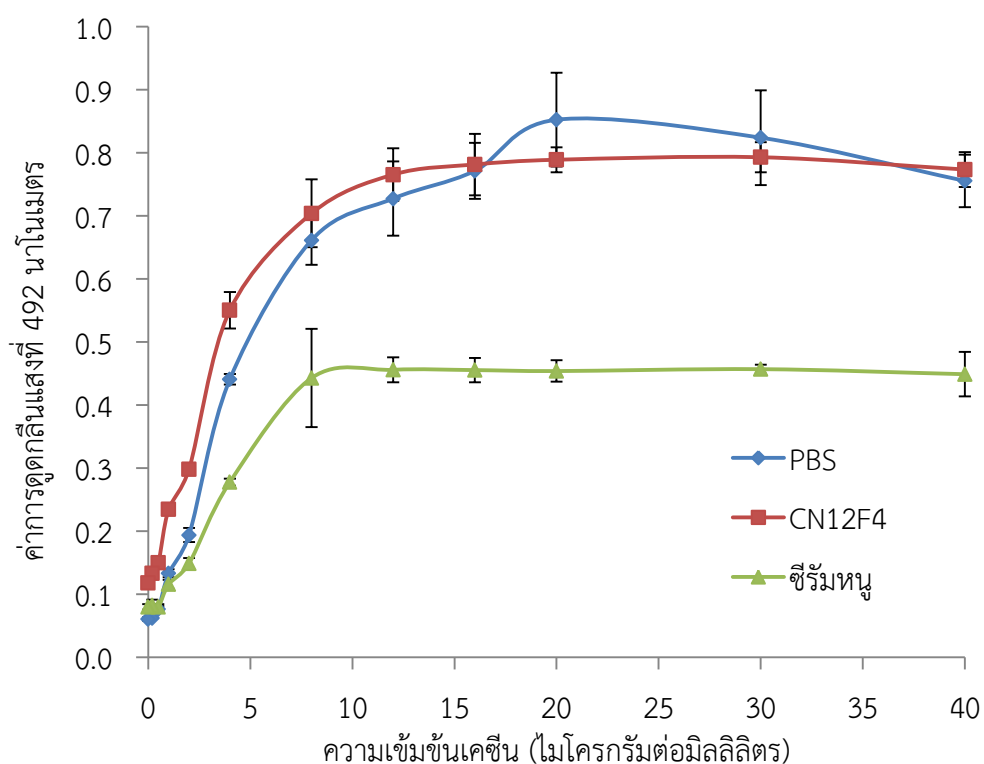
การทดสอบเคซินโดยวิธี sandwich ELISA เนื่องจากการเคลือบหลุมด้วย CN12F4 และ CN20F4 ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน จึงทำการคัดเลือกแอนติบอดีที่เคลือบหลุมด้วย CN12F4 เปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่เคลือบแอนติบอดีและเคลือบหลุมด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีจากซีรัมหนู ทดสอบเคซินที่ความเข้มข้น 40, 30, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.2 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน CN10F4-B และ CN11F4-B เจือจาง 1:1000 เพื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจหาปริมาณเคซิน จากการทดลองพบว่า เมื่อเคลือบหลุมด้วยแอนติบอดี CN12F4 สามารถตรวจหาเคซินได้ดีกว่าการเคลือบหลุมด้วยพอลิโคลนอลจากซีรัมหนู แต่ให้ผลการทดสอบคล้ายกับหลุมที่ไม่เคลือบด้วยแอนติบอดีคือ มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูง เมื่อเติมเคซินปริมาณมากและค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเติมปริมาณเคซินน้อย จึงเห็นได้ว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินสามารถจับเคซินและจับที่หลุมได้โดยไม่ต้องเคลือบแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุมและหลุมที่ไม่เติมเคซินจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ แสดงว่าค่าที่ได้ไม่ได้เกิดจากผลบวกที่ผิด และเมื่อเปรียบเทียบแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน CN10F4-B กับ CN11F4-B พบว่าได้ผลคล้ายคลึงกัน จากผลการทดลองที่ได้เมื่อนำมาคำนวณค่าความไวในการตรวจเคซินโดยคำนวณค่า IC_{50} พบว่าเมื่อเคลือบหลุมด้วย CN12F4 และทดสอบกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน CN10F4-B ให้ค่าความไวสูงสุดคือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.19 และกราฟรูปที่ 3 และ 4 แสดงการตรวจวัดปริมาณเคซินโดยวิธี sandwich ELISA

ตารางที่ 3.19 ค่าการดูดกลืนแสงและค่า IC₅₀ เมื่อทดสอบโดยวิธี sandwich ELISA

ความเข้มข้น เคซีน (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	CN10F4-B			CN11F4-B		
	เคลือบหลุมด้วย			เคลือบหลุมด้วย		
	PBS	CN12F4	ซีรัมหนู	PBS	CN12F4	ซีรัมหนู
0	0.07±0.00	0.16±0.01	0.09±0.01	0.06±0.00	0.12±0.01	0.08±0.00
0.2	0.07±0.00	0.18±0.01	0.09±0.01	0.06±0.00	0.13±0.01	0.08±0.01
0.5	0.08±0.00	0.22±0.00	0.09±0.01	0.08±0.00	0.15±0.01	0.08±0.00
1	0.15±0.00	0.33±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.24±0.00	0.12±0.01
2	0.23±0.01	0.40±0.01	0.17±0.01	0.19±0.01	0.30±0.01	0.15±0.01
4	0.56±0.02	0.73±0.01	0.34±0.00	0.44±0.01	0.55±0.03	0.28±0.01
8	0.86±0.02	0.89±0.03	0.51±0.01	0.66±0.04	0.70±0.05	0.44±0.08
12	1.01±0.03	0.94±0.01	0.56±0.03	0.73±0.06	0.77±0.04	0.46±0.02
16	1.03±0.01	0.98±0.00	0.56±0.00	0.77±0.04	0.78±0.05	0.46±0.02
20	1.03±0.02	0.96±0.02	0.57±0.00	0.85±0.07	0.79±0.02	0.45±0.02
30	0.95±0.02	0.91±0.02	0.55±0.00	0.82±0.07	0.79±0.02	0.46±0.01
40	0.99±0.03	0.90±0.04	0.56±0.01	0.76±0.04	0.77±0.03	0.45±0.04
IC ₅₀ (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	3.79	2.38	3.81	4.27	3.05	3.54



รูปที่ 3 การตรวจวัดเคซินด้วยแอนติบอดี CN10F4 ที่เชื่อมต่อกับไบโอติน โดยวิธี sandwich ELISA



รูปที่ 4 การตรวจวัดเคซินด้วยแอนติบอดี CN11F4 ที่เชื่อมต่อกับไบโอตินโดยวิธี sandwich ELISA

ในการทดลองนี้การเตรียมชุดตรวจสอบเคซินทดสอบด้วยวิธี sandwich ELISA จึงไม่เหมาะสม เนื่องจากในการตรวจหาปริมาณเคซินโดยวิธี sandwich ELISA นี้ หลุมที่ไม่เคลือบด้วยแอนติบอดีก็สามารถตรวจหาเคซินได้ ดังนั้นในการตรวจหาปริมาณเคซินในน้ำนมจึงเลือกตรวจเคซินในน้ำนมวัวโดยวิธี indirect competitive ELISA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

3.10 การประเมินประสิทธิภาพการตรวจเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA

การเตรียมชุดตรวจหาปริมาณเคซินด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการเคลือบจานหลุมด้วยเคซินเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม 5 เปอร์เซ็นต์ FBS ละลายใน PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ล้างจานหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายเคซินที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลาย PBS และน้ำนมถั่วเหลือง ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติม goat anti mouse IgG-HRP เจือจางที่ 1:10000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุม 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.10.1 การหาความแม่นยำ

จากผลการทดสอบความแม่นยำโดยคำนวณหาปริมาณเคซินที่เติมลงในน้ำนมถั่วเหลืองทางการค้าที่ไม่ผสมน้ำนมวัวที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยเติมสาร 3 ครั้ง และทดสอบ 3 วัน แต่ละครั้งทำการทดสอบ 12 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเคซินเทียบกับกราฟมาตรฐานเคซินที่ละลายใน PBS จากนั้นคำนวณหาค่า % coefficient of variation (% CV) ทั้งแบบ intra-variation assay และ inter-variation assay ได้ผลดังตารางที่ 3.20 และ 3.21 ค่า % CV มีค่าน้อยแสดงว่ามีความแม่นยำสูง มาตรฐานการวิเคราะห์ค่า % CV ต้องมีค่าน้อยกว่า 5% จากผลการทดสอบค่า % CV ที่มีค่าต่ำกว่า 5% ที่ความเข้มข้นเคซิน 2.5 – 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.10.2 การหาค่าความถูกต้อง

จากการทดสอบหาปริมาณเคซินที่เติมลงในน้ำนมถั่วเหลืองทางการค้าที่ไม่ผสมน้ำนมวัวโดยวิธี indirect competitive ELISA ทดสอบปริมาณเคซินที่เติมลงไปที่มีความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบทั้งแบบ intra-variation assay และ inter-variation assay คำนวณหาค่า % recovery โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นเคซินที่วิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นเคซินที่เติมลงไป ได้ผลดังตารางที่ 3.20 และ 3.21 โดยเติมเคซินที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจหาปริมาณเคซินได้ความเข้มข้น 1.81 ± 0.12 , 4.11 ± 0.12 , 7.49 ± 0.09 , 11.35 ± 0.07 และ 15.54 ± 0.04 ตามลำดับ และมีค่า % recovery 144.8, 164.5, 149.8, 113.5 และ 77.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ใกล้เคียงกับที่เติมลงไปมากที่สุดคือความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3.20 ค่า % CV และ % recovery วิเคราะห์แบบ intra-variation assay

การทดสอบ	fortified conc. (µg/ml)	N (n)	mean±sd (µg/ml)	CV (%)	recovery (%)
วันที่ 1	1.25	3 (36)	2.16±0.13	10.21	172.6
	2.5	3 (36)	4.71±0.11	4.47	188.3
	5	3 (36)	8.76±0.09	1.80	175.2
	10	3 (36)	12.21±0.06	0.56	122.1
	20	3 (36)	16.06±0.03	0.16	80.3
วันที่ 2	1.25	3 (36)	1.41±0.12	9.33	113.2
	2.5	3 (36)	3.44±0.13	5.27	137.6
	5	3 (36)	6.93±0.11	2.17	138.5
	10	3 (36)	11.38±0.08	0.80	113.8
	20	3 (36)	16.01±0.05	0.26	80.0
วันที่ 3	1.25	3 (36)	1.86±0.10	8.25	148.7
	2.5	3 (36)	4.19±0.12	4.65	167.4
	5	3 (36)	6.78±0.08	1.65	135.5
	10	3 (36)	10.46±0.07	0.65	104.6
	20	3 (36)	14.57±0.04	0.20	72.8

ตารางที่ 3.21 ค่า % CV และ % recovery วิเคราะห์แบบ inter-variation assay

fortified conc. (µg/ml)	N	mean±sd (µg/ml)	CV (%)	recovery (%)
1.25	3	1.81±0.12	9.26	144.8
2.5	3	4.11±0.12	4.80	164.5
5	3	7.49±0.09	1.88	149.8
10	3	11.35±0.07	0.67	113.5
20	3	15.54±0.04	0.20	77.7

3.11 การตรวจหาปริมาณเคซีนในตัวอย่างน้ำนมวัว

การตรวจหาปริมาณเคซีนในน้ำนมวัวตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอลฟาเคซีน ทำการทดสอบโดยเคลือบหลุมจาน 96 หลุมด้วยเคซีนเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 – 14 ชั่วโมง ล้างจานหลุม 3 ครั้ง ทำการบล็อกส่วนที่เหลือบนหลุมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ FBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากล้างจาน 96 หลุม เติมเคซีนมาตรฐาน

ฐาน, ตัวอย่างน้ำมันเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และเติมแอนติบอดี CN1F4 เจือจางที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าจนหลุมเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากล้างจาน 96 หลุม เติม goat anti mouse IgG-HRP เจือจางที่ 1:10000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจาน 96 หลุม จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณเคซีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคซีนจากการทดสอบหาเคซีนในน้ำมันที่ใช้บริโภคในท้องตลาด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมันวัวขาดมันเนยพาสเจอร์ไรส์, น้ำมันวัวพาสเจอร์ไรส์กลั่นสตอเบอร์รี่และรสช็อคโกแลต และตัวอย่างน้ำมันวัวสดจากกรมปศุสัตว์ จำนวน 7 ตัวอย่าง เปรียบเทียบปริมาณเคซีนที่ตรวจได้จากชุดตรวจทางการค้าตามวิธีในหัวข้อ 2.17.4 โดยมีกราฟมาตรฐานชุดตรวจตั้งภาคผนวกที่ 1 จากผลการทดสอบหาปริมาณเคซีน ด้วยชุดตรวจต้นแบบวิธี indirect competitive ELISA พบว่าน้ำมันบริโภคมีปริมาณเคซีนประมาณ 50 – 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันวัวสดมีปริมาณเคซีน 15 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการตรวจวัดเคซีนด้วยชุดตรวจทางการค้า น้ำมันบริโภคมีปริมาณเคซีนประมาณ 30 – 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันวัวสดมีปริมาณเคซีน 0.3 – 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.22

ตารางที่ 3.22 การตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำมันวัว

ตัวอย่างน้ำมัน	ปริมาณเคซีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	ชุดตรวจต้นแบบ	ชุดตรวจทางการค้า
1. น้ำมันบริโภคขาดมันเนย	51.1	37.5
2. น้ำมันบริโภคลั่นสตอเบอร์รี่	63.3	36.8
3. น้ำมันบริโภครสช็อคโกแลต	62.4	32.1
4. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 1	32.8	0.5
5. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 2	15.6	0.3
6. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 3	27.9	0.6
7. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 4	29.0	0.6
8. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 5	38.7	0.6
9. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 6	49.4	0.5
10. น้ำมันวัวสด ตัวที่ 7	34.8	0.5

เมื่อทำการตรวจหาปริมาณเคซีนที่เติมลงในน้ำมันถั่วเหลืองโดยเติมเคซีนที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10, และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยชุดตรวจต้นแบบเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้าได้ผลดังตารางที่ 3.23 พบว่า ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจพบเคซีนได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณเคซีนที่เติมลงไป แต่เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจทางการค้าด้วยจะตรวจหาปริมาณเคซีนที่ได้น้อยกว่าที่เติมลงไปประมาณ 5 – 10 เท่า

ตารางที่ 3.23 การตรวจวัดปริมาณเคซีนที่ความเข้มข้นต่างๆที่เติมในน้ำนมถั่วเหลือง

เคซีนในน้ำนมถั่วเหลืองเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเคซีนที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	ชุดตรวจต้นแบบ	ชุดตรวจทางการค้า
1.25	1.81 ± 0.18	0.39
2.5	4.11 ± 0.12	0.46
5	7.49 ± 0.09	0.70
10	11.35 ± 0.07	1.26
20	15.54 ± 0.04	1.96

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ BALB/c 1 ตัว ด้วยโบไวน์เคซีน (casein, catalog no. C3400, Sigma-Aldrich) และ 2 ตัว ด้วยโบไวน์เคซีน (casein sodium salt from bovine milk, catalog no. C8654, Sigma-Aldrich) แล้วนำเซลล์ม้ามจากหนูทั้ง 3 ตัวมาหลอมรวมเซลล์มัยอีโลมา สามารถสร้างมอนอโคลนต้นกำเนิดได้ 1, 7 และ 5 โคลน ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกเป็นมอนอโคลนได้ 7, 20 และ 33 มอนอโคลน ตามลำดับ จากการนำมอนอโคลนที่ได้ทั้งหมดมาหาไอโซไทป์ พบว่าเป็น IgG₁ 46 โคลน IgG_{2a} 5 โคลน และ IgM 9 โคลน จากนั้นได้ทำการทดสอบการจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อเคซีนชนิดต่างๆ ได้แก่ CN, α_5 -CN, β -CN, κ -CN ต่อแลกโตโกลบูลินและโอวัลบูมิน สามารถจำแนกมอนอโคลนอลแอนติบอดีได้เป็น 7 กลุ่มตามลักษณะการจับ จึงได้คัดเลือกเฉพาะมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับ CN, α_5 -CN, β -CN, κ -CN แต่ไม่จับกับแลกโตโกลบูลินและโอวัลบูมินไปศึกษาต่อว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้มีความจำเพาะต่ออีพิโทปต่างกันอย่างไร ทำให้สามารถคัดเลือกมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่อาจจับที่อีพิโทปต่างกันได้ 8 ตัว ได้แก่ CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 และ CN20F4 ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ นำมาเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography และตรวจหาปริมาณโปรตีนที่ได้มีความเข้มข้น 1.78, 2.12, 2.38, 2.95, 2.91, 2.61, 2.47 และ 2.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้ แอนติบอดี CN1F4 เป็นแอนติบอดีชนิด IgG_{2a} ส่วนแอนติบอดีอีก 7 ตัวเป็นชนิด IgG₁ จากการศึกษาความไวของแอนติบอดีในการจับกับเคซีนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดี CN1F4 มีความไวสูงสุด คือมีค่า LOD และ EC50 เท่ากับ 8.3 และ 90 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการจับเฉพาะกับโบไวน์เคซีน ไอโซไทป์แอลฟาเคซีน แอนติบอดี CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4 และ CN16F4 สามารถจับกับโบไวน์เคซีน ไอโซไทป์แอลฟาเคซีนและบีตาเคซีน ส่วน CN12F4 และ CN20F4 จับได้กับโบไวน์เคซีน ไอโซไทป์แอลฟาเคซีน บีตาเคซีนและแคปปาเคซีน

ในการตรวจวัดปริมาณเคซีนในน้ำนมวัวสามารถตรวจได้โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งแอนติบอดีที่ได้ต้องมีความสามารถจับกับเคซีนในรูปสารละลายจึงสามารถตรวจวัดปริมาณเคซีนได้ ส่วนการตรวจโดยวิธี sandwich ELISA ต้องใช้แอนติบอดี 2 ตัวที่มีอีพิโทปต่างกัน โดยจะใช้แอนติบอดีตัวแรกเคลือบไว้ที่หลุมก่อน จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมต่อกับไปโอดินหรือเอนไซม์

จากผลการทดสอบหาแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจโดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า แอนติบอดีที่สามารถจับกับเคซีนได้ดีที่สุดคือ CN1F4 รองลงมาได้แก่ CN20F4 และ CN16F4 โดยเปอร์เซ็นต์การจับกับเคซีนมีค่าเท่ากับ 85, 79 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแอนติบอดี CN1F4 สามารถจับกับเคซีนได้สมบูรณ์ที่สุดเมื่อทดสอบกับเคซีนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าต่ำใกล้ศูนย์คือ ประมาณ 0.1 ส่วนแอนติบอดีตัวอื่นๆมีค่าสูงจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบด้วยวิธีนี้ การเตรียมชุดตรวจเคซีนโดยวิธี indirect competitive ELISA โดยการเคลือบหลุมด้วยเคซีนเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บล็อกหลุมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ FBS เติมเคซีนมาตรฐานความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5, 10, และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดี CN1F4 เข้มข้น 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการตรวจวัดปริมาณเคซีน ดังนั้นจึงจะใช้สภาวะดังกล่าวนี้ในการเตรียมชุดตรวจเคซีนซึ่งแอนติบอดี CN1F4 มีความไวในการตรวจคือ มีค่า LOD และ IC₅₀ เท่ากับ 2.46 ± 0.01 และ 17.01 ± 4.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเตรียมชุดตรวจเคซินโดยวิธี sandwich ELISA เมื่อทำการเชื่อมต่อแอนติบอดีทั้ง 8 ตัวกับไบโอดีน และเคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีทั้ง 8 ตัว โดยสลับกันเป็นคู่ๆ ทดสอบกับเคซินที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร (หลุมบวก) เปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่ใส่เคซิน (หลุมลบ) คัดเลือกคู่แอนติบอดีที่ให้ค่าบวกสูงและให้ค่า ลบต่ำ เมื่อคำนวณอัตราส่วนหลุมบวกหารหลุมลบที่ได้ค่าสูง จึงคัดเลือกแอนติบอดี CN12F4 เป็นตัวเคลือบ หลุมและเลือก CN10F4-B ที่เชื่อมต่อกับไบโอดีนเป็นชุดตรวจเคซิน จากนั้นทำการเปรียบเทียบหลุมที่เคลือบ ด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดี CN12F4, ซีรัมหนูซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดีกับหลุมที่ไม่ เคลือบแอนติบอดี ทดสอบกับเคซินที่ความเข้มข้น 0 – 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า หลุมที่เคลือบและไม่ เคลือบแอนติบอดีสามารถตรวจวัดเคซินได้ โดยหลุมที่ไม่เคลือบแอนติบอดีสามารถจับกับเคซินได้ใกล้เคียงกับ หลุมที่เคลือบด้วยมอนอโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอดีนสามารถ ตรวจวัดปริมาณเคซินได้โดยไม่ต้องเคลือบแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุมก่อน

จากการทดลองเปรียบเทียบวิธีการตรวจเคซินโดยวิธี indirect competitive ELISA กับวิธี sandwich ELISA ได้ทำการเลือกวิธี indirect competitive ELISA เป็นชุดตรวจสอบต้นแบบในการตรวจหา ปริมาณเคซิน เนื่องจากการหาปริมาณเคซินด้วยวิธี sandwich ELISA ยังไม่เหมาะสม จากนั้นได้ทำการ ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยการเติมเคซินที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 ใน น้ำนมถั่วเหลืองทางการค้าที่ไม่มีน้ำมันวัว ตรวจหาปริมาณเคซินที่เติมลงไปด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ ทำการ วิเคราะห์หาค่า % recovery และ % CV ทำการวิเคราะห์ทั้งแบบ intra-variation assay และ inter- variation assay ได้ค่าเคซินในตัวอย่างน้ำมันถั่วเหลืองเท่ากับ 1.81 ± 0.12 , 4.11 ± 0.12 , 7.49 ± 0.09 , 11.35 ± 0.07 และ 15.54 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า % recovery เท่ากับ 144.8, 164.5, 149.8, 113.5 และ 77.7 ตามลำดับ และมีค่า % CV เท่ากับ 9.26, 4.80, 1.88, 0.67 และ 0.20 ตามลำดับ ค่าเคซินที่ให้ผลใกล้เคียงกับที่เติมลงไปมากที่สุดคือ ค่าความเข้มข้นที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะมี ค่า % CV ต่ำกว่า 5% และ % recovery ต่ำกว่า 120% ในการทดสอบนี้ไม่ได้มีการเจือจางตัวอย่าง ดังนั้น สารอื่นๆในน้ำมันถั่วเหลืองอาจรบกวนปฏิกิริยาได้บ้างเล็กน้อย แต่ในการตรวจหาเคซินในตัวอย่างต้องมีการ เจือจางจึงทำให้ไม่เกิดปัญหาในการทดสอบ

จากนั้นทำการตรวจปริมาณเคซินในน้ำมันบริโภาคและน้ำมันวัวสดโดยวิธี indirect competitive ELISA ชุดต้นแบบ ในการตรวจหาต้องเจือจางตัวอย่างน้ำมัน 2000 - 4000 เท่า เนื่องจากในน้ำมันมีปริมาณเค ซินสูงประมาณ 80% ของโปรตีนในน้ำมันหรือประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตรวจวัดเคซินใน น้ำมันบริโภาคชนิดไม่มีไขมัน, รสสตอร์เบอร์รี่ และรสช็อกโกแลต มีปริมาณเคซินเท่ากับ 51.1, 63.3 และ 62.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ในน้ำมันบริโภาคมีปริมาณเคซินค่อนข้างสูงเนื่องจากในกระบวนการผลิตอาจ ทำให้น้ำมันมีความเข้มข้นขึ้น) และจากการทดสอบน้ำมันวัวสดจำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณเคซินอยู่ ในช่วง 15 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำมันวัวแต่ละตัวจะมีปริมาณเคซินที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการตรวจวัดเคซินในน้ำมันตัวอย่างด้วยชุดตรวจทางการค้า พบว่าปริมาณเคซินที่ตรวจได้มี ค่าต่ำกว่าตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบ คือปริมาณเคซินในน้ำมันบริโภาคชนิดไม่มีไขมัน, รสสตอร์เบอร์รี่ และรส ช็อกโกแลตมีเคซิน 37.5, 36.8 และ 32.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณเคซินในน้ำมันวัวสดมี อยู่ประมาณ 0.3 – 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากชุดตรวจทางการค้ามีความจำเพาะต่อแอลฟาเคซินจึง ตรวจเคซินได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าการตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบ ซึ่งชุดตรวจทางการค้านี้สามารถตรวจพบเคซิน ในน้ำมันอยู่ในช่วง 0.0356 – 0.468 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกราฟมาตรฐานเคซินที่ความเข้มข้น 15.6 – 1000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการตรวจเคซินในน้ำมันตัวอย่างต้องทำการเจือจาง $10^6 - 10^8$ เท่า จึงจะ สามารถตรวจปริมาณเคซินให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานได้ ขณะที่ชุดตรวจเคซินต้นแบบที่เตรียมได้มีกราฟ

มาตรฐานอยู่ในช่วง 1.25 – 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเจือจางน้ำนมที่ทำการทดสอบจึงอยู่ในช่วง 2000 – 4000 เท่า

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเคซีนและสามารถเตรียมเป็นชุดตรวจเคซีนต้นแบบได้ด้วยวิธี indirect competitive ELISA มอนอโคลนอลแอนติบอดีนี้ยังสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นแถบทดสอบตรวจเคซีนได้

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท. 45) เมื่อวันที่ 7 – 9 ตุลาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ภายใต้หัวข้อ “ต้นกล้านวัตกรรมสู่การพัฒนาที่ยั่งยืน (Seeding Innovation for Sustainable Development)” ดังภาพผนวกที่ 2

บรรณานุกรม

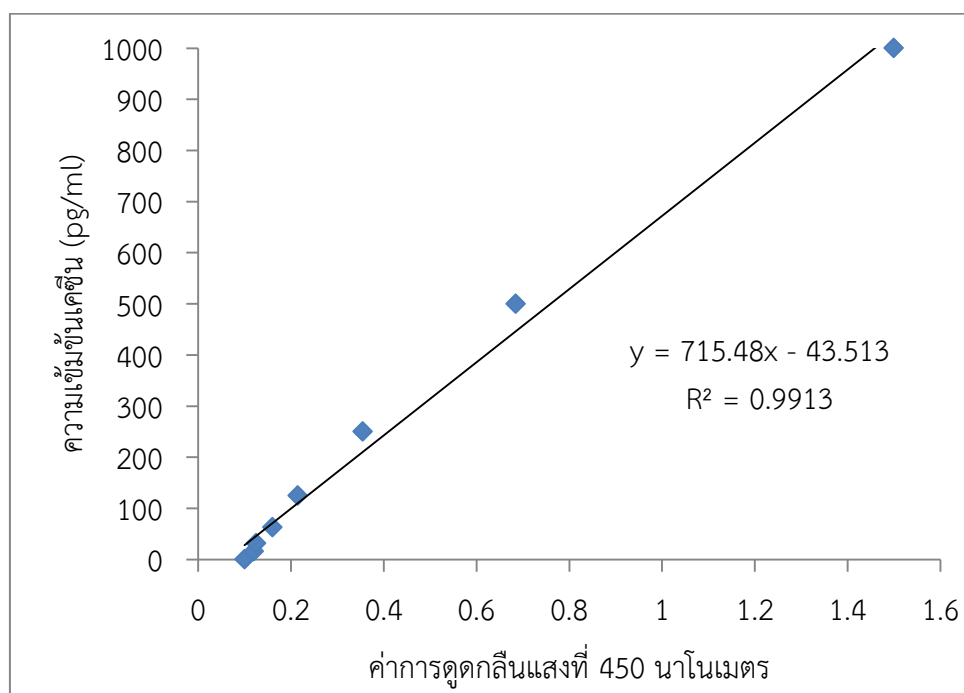
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1999. Immunology. In Short Protocols in Molecular Biology, 4th edn. Ch 11, pp 1–13. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Anguita G., Martin R., Garcia T, Morales P, Haza AI, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez PE. 1995. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine b-casein. *Journal of Dairy Research* 62, 655–659.
- Anguita G, Martín R, Garcia T, Morales P, Haza AI, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez PE. 1996. Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Food Protection* 59, 436-437.
- Anguita G., Martin R., Garcia T, Morales P, Haza AI, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez PE. 1997. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Food Protection* 60, 64–66.
- Bartłowska J, Szwajkowska M, Litwińczuk Z., and Król J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 291-302.
- Benlounes N, Candalha C, Matarazzo P, Dupont C, Heyman M. 1999. The time-course of milk antigen-induced TNF- α secretion differs according to the clinical symptoms in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, 863-869.
- Bitri L, Rolland MP, Besançon P. 1993. Immunological detection of bovine caseinomacropeptide in ovine and caprine dairy products. *Milchwissenschaft* 48, 367–370.
- Bleumink E, Young E. 1989. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *International Archives of Allergy and Immunology* 34,521-543.
- De Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov AV. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 171, 36-52.
- Docena G, Fernandez R, Chirido F., Fossati C. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51, 412-416.
- Feng ZK, Cunningham-Rundles C. 1989. Production of a monoclonal antibody to bovine a-casein. *Hybridoma* 8, 223-230.
- Giovannacci I, Guizard C, Carlier M, Duval V, Martin JL, Demeulemester C. 2004. Species identification of meat products by ELISA. *International of Food Science and Technology* 39, 863-867.

- Høst A., Samuelsson EG. 1998. Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. *Allergy* 43,113-118.
- Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams JH. 2004. Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 873-878.
- Köhler G, Millstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 195-197.
- Kuzmanoff KM, Andresen JW, Beattie CW. 1990. Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine κ -casein. *Journal of Dairy Science* 73, 2741-2748.
- Kuzmanoff KM, Andresen JW, Beattie CW. 1991. Isolation and characterization of monoclonal antibodies monospecific for bovine α -casein and β -casein. *Journal of Dairy Science* 74, 803-810.
- Leung CT, Kuzmanoff KM, Beattie CW. 1991. Isolation and characterization of monoclonal antibody directed against bovine α_{s2} casein. *Journal of Dairy Science*, 74, 2872-2878.
- Moatsou G, Anifantakis E. 2003. Recent development in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *International Journal of Dairy Technology* 56, 133-138
- Neogen Corporation. Veratox for Casein. Available from: <http://www.neogen.com/> . (search 22 March 2018)
- Pizzano R, Nicolai MA, Addeo F. 1997. Antigenicity of the 139–149 α_1 -casein region in different species revealed by ELISA and immunoblotting using antipeptide antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2807–2813.
- Richter W, Krause I, Graf C, Sperrer I, Schwarzer C, Klostermeyer H. 1997. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ -caseins. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung* 204, 21–26.
- Rodríguez E, Martín R, García T, Hernández PE, Sanz B. 1990. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Dairy Research* 57 197–205.
- Rodriguez E, Martin R, Garcia T, Hernandez PE, Sanz B. 1994. Sandwich ELISA for detection of goat's milk in ewe's milk and cheese. *Food and Agricultural Immunology* 6, 105-111.
- Rolland MP, Bitri L, Besançon P. 1993. Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α_{s1} -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *Journal of Dairy Research* 60, 413–420.
- Sino Biological Inc. Sandwich ELISA, Highly Sensitive. 2018. [search 22 March 2018]; Available from: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>

ภาคผนวก 1

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทดสอบ ELISA ของชุดตรวจเคซีนทางการค้า

ความเข้มข้นเคซีน (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.10	0.10	0.10
15.625	0.12	0.12	0.12
31.25	0.12	0.13	0.13
62.5	0.16	0.16	0.16
125	0.22	0.21	0.22
250	0.36	0.35	0.36
500	0.68	0.69	0.69
1000	1.53	1.47	1.50

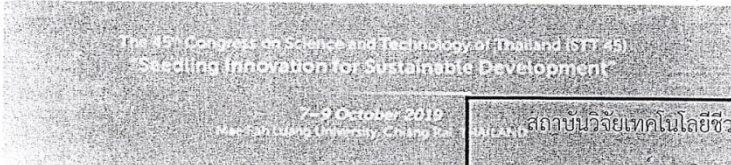


กราฟมาตรฐานของชุดตรวจเคซีนทางการค้า

ภาคผนวก 2



การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท 45)



สภามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวาภา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เลขรับที่: 0743/2562
วันที่: 12 มิถุนายน 2562 เวลา 16:05

ที่ วทท 45 / 001 / 2562

4 มิถุนายน 2562

เรื่อง: ขอเชิญเข้าร่วมงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท 45)

เรียน: ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวาภาและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้วยสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้กำหนดให้มีการจัดประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท 45) ระหว่างวันที่ 7 - 9 ตุลาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ภายใต้หัวข้อ "ต้นกล้านวัตกรรมสู่การพัฒนาที่ยั่งยืน" (Seedling Innovation for Sustainable Development) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้อาจารย์ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ นักวิชาการ นิสิต นักศึกษา รวมถึงผู้สนใจทั้งภายในและต่างประเทศ ได้มีโอกาสนำเสนอผลงานวิจัย และเข้าร่วมประชุมเพื่อรับฟังข้อมูลใหม่ๆ และแลกเปลี่ยนความคิดเห็นร่วมกับนักวิทยาศาสตร์ทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ โดยได้รับพระมหากรุณาธิคุณจาก สมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จเป็นองค์ประธานเปิดงาน ในวันที่ 7 ตุลาคม 2562 เวลา 9.00 น. ณ หอประชุมสมเด็จพระย่า มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งที่จะทำให้การประชุมวิชาการ วทท 45 ประสบความสำเร็จ คณะกรรมการดำเนินงานฯ จึงขอความอนุเคราะห์ประชาสัมพันธ์ และเผยแพร่เอกสารเชิญชวนเข้าร่วมงานการประชุมวิชาการ วทท 45 มาถึงท่านและบุคลากรในหน่วยงานของท่าน เพื่อจักได้เป็นสื่อกลางในการร่วมพัฒนาวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยต่อไป ทั้งนี้สามารถดูข้อมูลเพิ่มเติมได้จากเว็บไซต์ของการประชุมวิชาการ วทท 45 <http://www.scisoc.or.th/stt> หรือติดต่อที่ฝ่ายเลขานุการการประชุมวิชาการฯ (คุณฤติมล แสงธรรม / คุณศิรดา อารมณีนันท์) ได้ที่เบอร์โทรศัพท์ดังระบุไว้ด้านล่าง หรือที่ E-mail address : stt@scisoc.or.th

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาให้ความอนุเคราะห์ในการประชาสัมพันธ์การประชุมวิชาการฯ วทท 45 ในโอกาสนี้

ด้วย จักขอบพระคุณยิ่ง
เรียน รองผู้อำนวยการสถาบันฯ

(รศ.ดร.ณัฐฐา ทองจุล)

เพื่อโปรดพิจารณา

13 มิถุนายน 2562 15:39

ฝ่ายเลขานุการการจัดการประชุมวิชาการ วทท 45

โทร 02-2527987, 02-2185245

โทรสาร 02-252-4516

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ)

ประธานจัดการประชุมวิชาการ วทท 45

ประชาสัมพันธ์ฝ่ายวิจัย

ณัฐฐา ทองจุล

13 มิถุนายน 2562 เวลา 16:03

หมายเหตุ : การประชุมมีการเสนอผลงานได้ทั้งแบบส่งเฉพาะบทคัดย่อ หรือแบบส่งผลงานฉบับเต็มในลักษณะ Proceedings โดยผลงานฉบับเต็มจะออกในงานประชุม และสามารถใช้บริการการศึกษาในระดับปริญญาโทได้ตามข้อกำหนดและคุณภาพตามเกณฑ์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา



Production of a monoclonal antibody against casein for preparation of the ELISA test kits



Songchan Puthong^{1*}, Anumart Buakeaw¹, Nanthika Kongchareonporn^{1,2}, Kittinan Komolpis^{1,2} and Umaporn Pimpitak¹

¹Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²Food Risk Hub, Research Unit of Chulalongkorn University, Bangkok 10330

*e-mail: songchan.p@chula.ac.th

Abstract

Casein is a major milk protein (about 80% of the total proteins) found as colloidal particles called casein micelles. Milk casein composes of alpha 51-casein (α_1 -CN), alpha 52-casein (α_2 -CN), beta-casein (β -CN) and kappa-casein (κ -CN). Because cow milk is an important source of proteins, it has been used for daily consumption as well as raw material in several cooking recipes. Unfortunately, some consumers are allergic to casein. The symptoms are individually varied from mild to severe such as rash, running nose, swelling of tongue and lips, eye irritation, difficult to breath and death. These consumers must avoid casein-containing foods which sometimes cannot be noticed from the food appearance or ingredient label. Therefore, rapid and simple detection method of casein is necessary. Test strip is considered to be the most widely used screening detection method due to its easy to use and low cost. This method requires an antibody specific to casein. Consequently, in this research, monoclonal antibodies (mAbs) raised against cow casein were produced. Mice immunization, hybridoma cell preparation and screening were performed to obtain eight monoclones (CN1F4, CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4, CN12F4, CN16F4 and CN20F4). MAbs from these clones were produced, purified and tested for their ability to bind to cow casein by an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that mAb CN1F4 was the most sensitive mAb obtained with the inhibition concentration (IC_{50}) value of $17.01 \pm 4.29 \mu\text{g/ml}$ and limit of detection (LOD) value of $2.46 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ indicating that mAb CN1F4 was a good candidate for further development of an indirect competitive ELISA and lateral flow immunoassay.

Results and Discussion

Binding abilities of monoclonal antibodies with different types of bovine casein were studied by an indirect ELISA. The obtained mAbs could be divided into three groups based on the cross-reactivity. MAb CN1F4 bound only with alpha casein while mAbs CN3F4, CN5F4, CN10F4, CN11F4 and CN16F4 bound with both alpha casein and beta casein and mAbs CN12F4 and CN20F4 bound with all of casein isotypes (Table 1). An indirect competitive ELISA was performed to screen for a promising mAb which was found to be mAb CN1F4 based on the % competition value. In addition, sensitivity of mAb CN1F4 was quantified in term of limit of detection (LOD) and 50% inhibition concentration (IC_{50}) values as 2.46 ± 0.01 and $17.01 \pm 4.29 \mu\text{g/ml}$, respectively. Furthermore, the detection range was in the range of 1.25 - 60 $\mu\text{g/ml}$.

Table 1 EC₅₀ values and percentage of cross reaction of monoclonal antibodies to bovine casein isotypes.

mAbs	bovine casein		alpha casein		beta casein		kappa casein	
	EC50	%CR	EC50	%CR	EC50	%CR	EC50	%CR
CN1F4	0.09	100	0.05	190	-	-	-	-
CN3F4	0.76	100	4.34	17	7.60	10	-	-
CN5F4	0.46	100	0.65	71	7.62	6	-	-
CN10F4	0.86	100	9.52	16	5.19	17	-	-
CN11F4	0.83	100	10.18	8	9.81	9	-	-
CN12F4	0.76	100	2.87	26	2.68	28	0.16	476
CN16F4	0.28	100	0.63	45	0.83	34	-	-
CN20F4	0.14	100	2.24	6	0.13	105	0.02	770

Table 2 Casein binding ability of monoclonal antibodies by indirect competitive ELISA

mAbs	Indirect competitive ELISA (A_{450})		% competition value
	PBS	caseins	
CN1F4	0.88 ± 0.01	0.13 ± 0.01	85
CN3F4	1.03 ± 0.03	0.45 ± 0.02	57
CN5F4	1.15 ± 0.01	0.55 ± 0.04	53
CN10F4	0.77 ± 0.02	0.34 ± 0.01	55
CN11F4	1.25 ± 0.02	0.53 ± 0.04	57
CN12F4	1.17 ± 0.03	0.69 ± 0.09	41
CN16F4	0.95 ± 0.03	0.33 ± 0.01	65
CN20F4	1.04 ± 0.02	0.21 ± 0.01	79

Objective

To produce monoclonal antibodies against bovine casein

Methodology

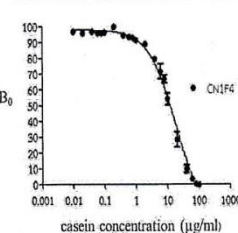
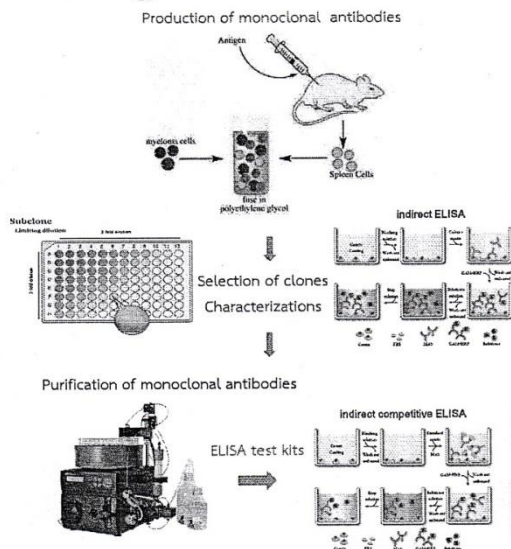


Figure 1 Sensitivity of mAb CN1F4 by indirect competitive ELISA.

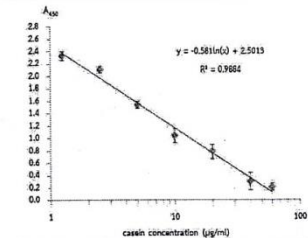


Figure 2 Standard curve of casein by indirect competitive ELISA.

Conclusions

Monoclonal antibodies raised against bovine casein were produced. Mab CN1F4 showed promising abilities suitable for an application in casein detection.

Acknowledgements

This research was supported by Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University.



การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 (วทท 45)

The 45th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 45)
"Seedling Innovation for Sustainable Development"

7-9 October 2019
Mae Fah Luang University, Chiang Rai, THAILAND

To whom it may concern

This is to certify that Mrs. Songchan Puthong from The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering,

The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Thailand

attended and presented their work at the 45th Congress on Science and Technology of Thailand.

Presentation Title : Production of monoclonal antibody against casein for preparation

ELISA test kits

(Poster presentation)

The 45th Congress on Science and Technology of Thailand (STT45) is jointly organized by the Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King, under the theme "Seedling Innovation for Sustainable Development" at Mae Fah Luang University, Chiang Rai, during 7-9 October, 2019.



Associate Professor Saiwarun Chaiwanichsiri, Ph.D.

Chairperson STT 45

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางทรงจันทร์ ภูทอง
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Songchan Puthong
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0
4. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย (ชำนาญการพิเศษ)
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
E-mail songchan.p@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา
 - พ.ศ. 2540 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - พ.ศ. 2529 วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
8. ผลงานวิจัย
 - 8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -
 - 8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - 8.2.1 การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โปรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (พ.ศ. 2556)
 - 8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
 - 8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
 - 1) Komenek, S., Luesakul, U., Ekgasit, S., Vilaivan, T., Praphairaksit, N., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2016). Nanogold-gallate chitosan-targeted pulmonary delivery for treatment of lung cancer. American Association of Pharmaceutical Scientists. 1 – 12.
 - 2) Netchareonsirisuk, P., **Puthong, S.**, Dubas, S., Palaga, T. and Komolpis, K. (2016) Effect of capping agents on the cytotoxicity of silver nanoparticles in human normal and cancer skin cell lines. Journal of Nanoparticle Research. 18(322) : 1 – 11.
 - 3) Luesakul, U., Komenek, S., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2016). Shape-controlled synthesis of cubic-like selenium nanoparticles via the self-assembly method. Carbohydrate Polymers. 153 : 435 – 444.
 - 4) Chadseesuwana, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Palaga, T. and Komolpis, K. (2016). Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its

application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1 – 8.

5) Khunsap, S., Khoo, O., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.** and Boonchang, S. (2016). Anticancer properties of phospholipase A₂ from *Daboia siamensis* venom on human skin melanoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 22(7) : 1 – 8.

6) Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpibulstit, P. (2016). mRNA expression of *Bax*, *Bcl-2*, *p53*, *Cathepsin B*, *Caspase-3* and *Caspase-9* in the HepG2 cell line following introduction by a novel monoclonal Ab Hep88 mAb: Cross-talk for paraptosis and apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17(2) : 703 – 712.

7) Buakeaw, A., **Puthong, S.**, Kongkaviton, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02) : 175 – 186.

8) Nugitrangson, P., **Puthong, S.**, Iempridee, T., Pimtong, W., Pornpakakul, S. and Chanchao, C. (2016). *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. *Experimental Biology and Medicine*. 241(2) : 166 – 176.

9) Buahom, S., **Puthong, S.**, Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and Chanchao, C. (2015). Cardanol isolated from Thai apis mellifera propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23(55) : 1 – 11.

10) Kustiawan, M.P., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Palaga, T., Arung, T.E. and Chanchao, C. (2015). Propolis from the stingless bee *Trigona incise* from East Kalimantan, Indonesia, induces *in vitro* cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(15) : 6581 – 6589.

11) Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpibulstit, P. (2015). Hep88 mAb-mediated paraptosis-like apoptosis in HepG2 cells via downstream upregulation and activation of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(5) : 1771 – 1779.

12) Sathitsemakul, J., **Puthong, S.**, Patarakul, K., Palaga, T. and Komolpis, K. (2015). Production and characterization of monoclonal antibodies against leptospira interrogans serovar sanilae. *Food and Applied Bioscience Journal*. 3(3) : 239 – 246.

13) Nuanyai, T., Chailap, B., **Puthong, S.** and Buakeaw, A. (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang*. 2 : 1 – 12.

14) Rojpibulstit, P., Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochantr, S., Gamnarai, P., Jitrapakdee, S. and Roytrakul, S. (2014). Hep88 mAb-initiated paraptosis-like PCD pathway in hepatocellular carcinoma cell line through the binding of mortalin (HSPA9) and alpha-enolase. *Cancer Cell International*. 14(69) : 1 – 10.

15) Srisurichan, S., **Puthong, S.** and Pornpakakul, S. (2014). Pregnane-type steroidal glycosides from *Gymnema griffithii* Craib. *Phytochemistry*. 106 : 197 – 206.

16) Kustiawan, M.P., **Puthong, S.**, Arung, T.E. and Chanchao, C. (2014). *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(7) : 549 – 556.

17) Luesakul, U., Palaga, T., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2014). Synthesis, cytotoxicity, DNA binding and topoisomerase II inhibition of cassiarin A derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 24(13) : 2845 – 2850.

18) Sangthong, S., Sangphech, N., Palaga, T., Ngamrojanavanich, N., **Puthong, S.**, Vilaivan, T. and Muangsin, N. (2014). Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 77 : 334 – 342.

19) 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.

20) 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) : 1-11.

21) Chadseesuan, 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.

22) 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.

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

24) 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) : 1-17.

25) **Puthong, S.**, Gamnarai, P., Roittrakul, S., Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Rojpbulsthit 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.

26) 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. 21 : 4813 – 4818.

27) 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.

28) 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) : 1-8.

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

30) Kheeree, N., Sangvanich, P., **Puthong, S.**, and Kanchanatat, A. (2010). Antifungal and antiproliferative activity of lectin from the Rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. Applied Biochemistry Biotechnology. 162 : 912-925.

31) 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.

8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1) Chaicharoenpong C., **Puthong S.** and Ishikawa T. *Synthesis of derivatives of naphthoquinone monooxime and their cytotoxic activity*. Poster Presentation at the 32th Congress on Science and Technology of Thailand, 10-12 October 2006, Queen sirikit national convention center, Bangkok, Thailand, Abstract p. 177.

2) Chadseesuwana, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolphis, 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.

3) 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.

4) Rojpibulstit, P., Manochantr, S., Gamnarai, P., **Puthong, S.**, Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Roittrakul, 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.

8.4 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

8.4.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาออร์ฟล็อกซาซินและเอ็นโรฟล็อกซาซิน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.4.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบเทอรอล ซัลบูทามอล และซิลพาเทอรอลในปัสสาวะสุกร (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.4.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนตกค้างโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) นายกิตตินันท์ โกมลภิส
2. ชื่อ-นามสกุล (อังกฤษ) Mr. Kittinan Komolpis
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0
4. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ A3
5. หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-218-8078 (ทำงาน) 089-664-6266 (มือถือ)
โทรสาร 02-253-3543 e-mail: kittinan.k@chula.ac.th

6. 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	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมี	2532

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคโนโลยีชีวภาพ (การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี การวิเคราะห์ด้วย ELISA และแถบทดสอบ)

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารตกค้างในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค” โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023)

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

8.2.1 การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์ โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ

8.2.2 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหานอร์ฟล็อกซาซินและเอ็นโรฟล็อกซาซิน ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.2.3 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลนบูเทอรอล ซัลบูตามอล และซิลฟาเทอรอลในปัสสาวะสุกร ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. 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 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
2. Wongtangprasert T, Natakathung W, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T, **Komolpis K** and Kongchareonporn 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 and Biotechnology)* 15: 165-172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
3. Umarphorn Chadseesuwana, 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 (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project-954-31023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
4. 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 (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
5. **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
6. 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 (แหล่งทุน – สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)
7. Damrongsakkul S., Ratanathampan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14: 202-206
8. **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.

9. 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.

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

11. **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.

8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1. 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.

2. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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

7. 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

8. Kaewwiset, 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

9. 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

8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

8.4.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหานอร์ฟล็อกซาซินและเอ็นโรฟล็อกซาซิน (หัวหน้าโครงการ) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.4.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบเทอรอล ซัลบูทามอล และซิลพาเทอรอลในปัสสาวะสุกร (หัวหน้าโครงการ) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.4.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนตกค้างโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562

- 2) Puthong, S., Komolpis, K., Buakeaw, A., Khongchareonporn, N., Palaga, T. and **Pimpitak, U.** (2015). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting progesterone in milk. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.
- 3) Puthong, S., Buakeaw, A., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., and **Pimpitak, U.** (2015). Production of monoclonal antibody against 3-amino-2-oxazolidinone. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.
- 4) 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.
- 5) 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.

8.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

8.3.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหานอร์ฟล็อกซาซินและเอ็นโรฟล็อกซาซิน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.3.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบอนุเทอรอล ซัลบูทามอล และซิลิคาเทอรอลในปัสสาวะสุกร (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.3.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีนตกค้างโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอนุมาศ บัวเขียว
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Anumart Buakeaw
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3
4. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
E-mail anumart.b@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2541 วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี

8. ผลงานวิจัย

8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

8.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม ได้รับ
ทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1) Puthong, P., Rojpiulstitt, 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 Suttisri, 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., Natakathung, 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.

6) Nuanyai, T., Chailap, B., Puthong, S. and **Buakeaw, A.** (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang*. 2 : 1 – 12.

7) **Buakeaw, A.**, Puthong, S., Kongkaviton, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02) : 175 – 186.

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

3) 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.

4) Buakeaw, A., Puthong, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., and Pimpitak, U. (2015). Production of monoclonal antibody against semicarbazide. The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.

8.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

8.3.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาอนุฟลูออโรสซินและเอ็นโรฟลูออโรสซิน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.3.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบ เทอรอล ซัลบูทามอล และซิลิคาเทอรอลในปัสสาวะสุกร (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (หัวหน้าโครงการ) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.3.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบโรคโตพามีนตกค้างโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562