การพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาว พรพิมล พันธุ์ธีรานุรักษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ISBN 974-14-3421-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF CHLORAMPHENICOL TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE

Miss Pornpimon Punteeranurak

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-3421-9

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์
โดย	นางสาว พรพิมล พันธุ์ธีรานุรักษ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรพิมล พันธุ์ธีรานุรักษ์ : การพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์. (DEVELOPMENT OF CHLORAMPHENICOL TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส, ทรงจันทร์ ภู่ทอง 77 หน้า. ISBN 974-14-3421-9.

คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาการติดเชื้อในสัตว์ การใช้คลอแรมเฟนิคอลอย่างไม่ถูกต้องอาจส่งผลให้เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีการห้ามใช้คลอแรมเฟนิคอลในสัตว์ที่นำมาเป็นอาหาร ดังนั้นการตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างในอาหารจึงเป็นสิ่งจำเป็น

ในการวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลต้นแบบโดยวิธี indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจน (คลอแรมเฟนิคอลเชื่อมกับโปรตีน BSA) สำหรับเคลือบจานชนิด 96 หลุมและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล คือ 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในช่วง 0.3 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรถึง 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของ intra-assay และ inter-assay อยู่ในช่วง 2.5-16.4% และ 3.5-22.9% ตามลำดับ นอกจากนั้นค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การค้นพบคลอแรมเฟนิคอลที่เติมลงไปในสารละลายบัฟเฟอร์และเนื้อกุ้งบดที่ความเข้มข้นต่างๆ เท่ากับ 106 และ 97 ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวัดด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายที่ใช้ในการวิจัยนี้และวิธี LC-MS-MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา....2549....

ลายมือชื่อนิสิต.....พรพิมล พันธุ์ธีรานุรักษ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ธนาภัทร ปาลกะ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672518323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: CHLORAMPHENICOL / TEST KIT / MONOCLONAL ANTIBODY / ELISA

PORNPIMON PUNTEERANURAK : DEVELOPMENT OF CHLORAMPHENICOL TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph. D. THESIS COADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph. D., SONGCHAN PUTHONG, M. Sc., 77 pp. ISBN. 974-14-3421-9.

Chloramphenicol (CAP) is an antibiotic substance widely used to treat bacterial infection in animal. Misuse of chloramphenicol may result in residues in meat or products from animals which directly affect consumer health. From this reason, the use of chloramphenicol in food producing animals is forbidden in many countries. Therefore, the detection of chloramphenicol residue in food is necessary.

In this research, test kit prototype for chloramphenicol detection by using indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed. The optimal concentration of coating antigen (CAP-BSA) on the microtiter plate and monoclonal antibodies specific for chloramphenicol was 0.1 ug/ml and 1 ug/ml, respectively. The developed test kit could quantitatively measure chloramphenicol in the range of 0.3–20 ng/ml. The percentages of coefficient variation (%CV) of intra-assay and inter-assay were between 2.5-16.4% and 3.5-22.9%, respectively. In addition, the average of %recovery of spiked chloramphenicol in buffer and ground shrimp at several concentrations were 106% and 97%, respectively, which were comparable to the values quantified by the commercial test kit used in this research and LC-MS-MS method.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : ....Biotechnology...

Academic Year : ...2006...

Student's Signature : ...Pornpimon Punteeranurak

Advisor's Signature : .....Tanapat Palaga.....

Co-advisor's Signature : .....K. Komolpis.....

Co-advisor's Signature : .....Songchan Puthong.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส และนางทรงจันทร์ ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็น และ คำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ และผู้บริหารของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านสำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันอาหารแห่งชาติที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนักวิจัย เจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ เพื่อนๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งคุณสมชาย ยั่งยืน เจ้าหน้าที่จากสถาบันอาหารแห่งชาติที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในทุก ๆ เรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาผู้ให้กำเนิด พี่ชาย น้องชาย ทุกคนในครอบครัว และ คุณโชติชวาล วงศ์มหาศิริ ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……ฌ
สารบัญรูป……ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ……ฐ

บทที่

1 บทนำ……1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……2
1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย……3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……3
2 ปริทรรศน์วรรณกรรม……4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี……4
2.1.1 คลอแรมเฟนิคอล……4
2.1.1.1 คุณสมบัติทางเคมี……4
2.1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์……5
2.1.1.3 ผลข้างเคียงจากการใช้คลอแรมเฟนิคอล……6
2.1.2 การตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล……7
2.1.3 หลักการตรวจวิเคราะห์ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน……7
2.1.4 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบคลอแรมแฟนิคอล……12
2.1.3.1 แอนติบอดี……12
2.1.3.2 แอนติเจน……14
2.1.3.3 ระบบการตรวจวัด……14
2.1.3.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง……15
2.1.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ……15

บทที่ หน้า

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……15
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย……17
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย……...17
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……18
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..19
4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย……..31
4.1 การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA……...……...31
4.2 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล……35
4.3 การตรวจหาไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้……35
4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....…...38
4.5 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อตำแหน่งบนโมเลกุล
คลอแรมเฟนิคอลเพื่อเลือกรูปแบบของชุดตรวจสอบ……...42
4.6 การทดสอบความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ……...45
4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ...……47
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ…..……..60
รายการอ้างอิง……..62
ภาคผนวก……66
ภาคผนวก ก……...67
ภาคผนวก ข……...72
ภาคผนวก ค……...73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……...77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย……17

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……..18

4.1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนหลังการเชื่อม CAP กับ BSA...……...……31

4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ Indirect ELISA ของไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล……..36

4.3 การตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยชุดตรวจสอบ Isotyping kit ของบริษัท Sigma……...…37

4.4 ปริมาณโปรตีนหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต……38

4.5 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ affinity column chromatography …..……....42

4.6 การทดสอบ Indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆหลังจากทำให้เข้มข้นโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต……43

4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีผสม……...45

4.8 การทดสอบ indirect competitive ELISA ของแอนติบอดีโคลนที่ 79……46

4.9 ผลการทำ indirect ELISA เมื่อเคลือบแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ……47

4.10 ผลการทำ Indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ……..……48

4.11 การทำ Indirect ELISA จากการทดสอบหาความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลและคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต……49

4.12 ผลของอุณหภูมิในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและ แอนติบอดีทุติยภูมิต่อการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี indirect competitive ELISA.....……51

4.13 ผลของ Tween 20 ต่อความไวของการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี ELISA……...52

4.14 ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ค่า %B/B_0 และค่าความเบี่ยงเบนที่ได้จากการทำ Indirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ ……53

ตารางที่ หน้า

4.15 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี Indirect competitive ELISA เพื่อใช้หาค่า LOD ของชุดตรวจสอบต้นแบบ……..55
4.16 ค่าความแม่นยำ (intra- assay, inter-assay) ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ...……..……56
4.17 ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่วิเคราะห์ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ เมื่อมีการเติมคลอแรมเฟนิคอลลงไปใน PBS…….58
4.18 ค่า % Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=6)…...…….58
4.19 ค่า % Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย (n=2)……..……...58
4.20 ค่า %Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยวิธี LC-MS-MS…59
ก.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA……..67
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA สำหรับหาค่า intra-assay……..68
ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 1 สำหรับหาค่า inter-assay……69
ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 2 สำหรับหาค่า inter-assay……69
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 3 สำหรับหาค่า inter-assay……70
ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 4 สำหรับหาค่า inter-assay……70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของคลอแรมเฟนิคอล……4

2.2 การขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย……5

2.3 หลักการของ Homogeneous enzyme immunoassay……8

2.4 หลักการของ Competitive ELISA ที่ใช้แอนติเจนเป็นตัวติดฉลากด้วยเอนไซม์……..9

2.5 หลักการของ Competitive ELISA ที่ใช้แอนติบอดีเป็นตัวติดฉลากด้วยเอนไซม์……...10

2.6 หลักการของ Sandwich ELISA……..11

2.7 หลักการของ Indirect ELISA……12

4.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อโดยวิธี MALDI-TOF MS…33

4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA หลังการเชื่อมต่อโดยวิธี MALDI-TOF MS….34

4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ 29 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography 39

4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ 45 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography 40

4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ 52 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography 40

4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ 79 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography…...41

4.7 การทดสอบ Indirect competitive ELISA สำหรับหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม……43

4.8 กราฟหาค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3G305 ต่อคลอแรมเฟนิคอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03……50

4.9 กราฟหาค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3G305 ต่อคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03……50

4.10 กราฟหาช่วงความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่เหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03……53

4.11 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี Indirect competitive ELISA……54

รูปที่ หน้า

4.12 กราฟเส้นตรงที่นำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี Indirect competitive ELISA……...……..……...55
ก.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA……..67
ก.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล…….71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	percent
Ab	antibody
A_{max}	maximum absorbance
A_{min}	minimum absorbance
BSA	bovine serum albumin
CAP	chloramphenicol
CAP-BSA	chloramphenicol conjugated bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme linked-immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
g	gram
H_2O_2	hydrogen peroxide
H_2SO_4	sulfuric acid
HRP	horseradish peroxidase
IC_{50}	inhibitory concentration 50%
Ig	immunoglobulin
KLH	keyhole limpet hemocyanin
L	litre
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
M	molar
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
ml	millilitre
MRLs	maximum residue limits
N	normal
ng	nanogram
O.D.	optical density

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

OPD	*o*-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with 0.05%Tween20
ppb	part per billion
ppm	part per million
ug	microgram
ul	microlitre
v	volume
w	weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol, CAP) เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาสัตว์เพราะราคาถูก แต่เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ (World Health Organization, 1988) และสามารถตกค้างอยู่ในสัตว์ที่ถูกนำมาบริโภคได้ ดังนั้นคลอแรมเฟนิคอลจึงถูกระงับการใช้ในสัตว์ที่จะนำมาทำเป็นอาหารสำหรับบริโภค (EEC, 1994) ในปัจจุบันประเทศต่างๆ ทั้งในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดมาตรฐานที่เข้มงวดมากขึ้นเกี่ยวกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่สามารถตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ ยกตัวอย่างในกรณีของกุ้งแช่แข็ง ปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างอยู่จะต้องมีปริมาณไม่เกิน 0.3 ppb สำหรับสหภาพยุโรป และ 1.0 ppb สำหรับสหรัฐอเมริกา ดังนั้นผู้ผลิตอาหารแช่แข็งส่งออกต่างๆ จึงต้องทำการตรวจวัดหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างอยู่ก่อนที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์

ในการตรวจวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลสามารถกระทำได้หลายวิธีเช่น Thin-layer chromatography, Liquid chromatography และ Gas chromatography ซึ่งสามารถตรวจคลอแรมเฟนิคอลที่มีปริมาณต่ำในนมได้ถึง 4, 2 และ 1 μg/L ตามลำดับ แต่เนื่องจากวิธีเหล่านี้ต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์ และต้องอาศัยผู้ชำนาญการ จึงได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้รวดเร็วและสะดวกขึ้นโดยอาศัยหลักการทางด้านอิมมูโนวิทยา เช่น เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ ซึ่งสามารถตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลได้ภายใน 2 ชั่วโมง (Cazemier *et al*., 1996; Mamenta *et al*., 1996) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์สำหรับใช้ตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลที่อาจตกค้างอยู่ในอาหาร มีชื่อทางการค้าคือ Quick Card® ซึ่งสามารถตรวจหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้ในช่วง 5-10 μg/L (Gaudin and Maris, 2001) แต่เนื่องจากการปรับข้อกำหนดมาตรฐานที่เข้มงวดขึ้นอย่างมาก ทำให้มีหลายบริษัท เช่น EURO-DIAGNOSTICA B.V. ของประเทศเนเธอร์แลนด์ได้พัฒนาและปรับปรุงชุดตรวจสอบขึ้นมา ซึ่งสามารถตรวจหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลได้ต่ำสุดถึง 0.02 ng/ml โดยใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 2-6 ชั่วโมง

วิธีตรวจสอบหาคลอแรมเฟนิคอล (CAP) โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยเริ่มจากการเตรียมแอนติบอดีที่สามารถจดจำ CAP ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งทำได้โดยการฉีดแอนติเจน คือ CAP succinate ที่เชื่อมต่อกับ bovine serum albumin (BSA) เข้าในกระต่ายตามเวลาและปริมาณที่กำหนด หลังจากการฉีดกระตุ้นซ้ำก็จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดมาทดสอบหาพอลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ CAP โดยอาศัยความจำเพาะในการจับระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีกับ CAP ที่ถูกติดฉลากไว้ด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) หลังจากการทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้สามารถคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความสามารถตามที่ต้องการได้ ด้วยวิธีพอสังเขปดังกล่าว แอนติบอดีที่เตรียมขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบหา CAP ในปัสสาวะของวัว ปัสสาวะของหมู และนม ในปริมาณที่ต่ำสุดได้ 0.8, 1.4 และ 0.4 μg/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณต่ำสุดเหล่านี้สามารถทำให้ต่ำลงได้อีกประมาณ 10 เท่า โดยทำการสกัดสิ่งเจือปนออกจากตัวอย่างก่อนทำการตรวจสอบ (Cazemier *et al*., 1996) นอกจากวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ดังกล่าว ยังได้มีการใช้การจดจำอย่างจำเพาะระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีกับ CAP มาใช้ตรวจสอบหา CAP โดยวิธีวัดการเปลี่ยนแปลงของ surface plasmon resonance (Guadin and Maris, 2001) อย่างไรก็ตามในการเตรียมพอลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับใช้ในการตรวจวัดมักมีปัญหาเกี่ยวกับความไม่สม่ำเสมอของปริมาณและคุณภาพของพอลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน ดังนั้นจึงนิยมที่จะเตรียมแอนติบอดีในรูปของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเตรียมโดยการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมาหลอมกับเซลล์ไมอีโลมาของหนูเพื่อให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความสม่ำเสมอในความจำเพาะต่อแอนติเจน (Johnstone and Thorpe, 1987; Bogard *et al*., 1989)

จากการพิจารณาข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาชุดตรวจสอบดังกล่าวข้างต้น กอปรกับประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นผู้ผลิตอาหารแช่แข็งส่งออกรายสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกกุ้งแช่แข็ง ทำให้ในแต่ละปีผู้ผลิตกุ้งแช่แข็งส่งออกหรือหน่วยงานบริการรับวิเคราะห์ ต้องทำการสั่งซื้อชุดตรวจสอบจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก โดยมีราคาประมาณ 15,000 บาทต่อชุด ดังนั้นถ้าสามารถผลิตชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลที่มีประสิทธิภาพขึ้นเองได้ภายในประเทศ นอกจากจะเป็นการลดการนำเข้าและเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันการส่งออกกุ้งแช่แข็งอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบที่สามารถตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลได้โดยใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
2. การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA
3. การคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล
4. การตรวจหาไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้
5. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
6. การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล
7. การทดสอบความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ
8. การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ
9. การสกัดตัวอย่างกุ้งเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล
10. วิเคราะห์ สรุปผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบที่สามารถตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลได้โดยใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

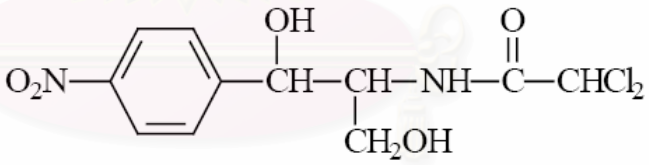
ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 คลอแรมเฟนิคอล

2.1.1.1 คุณสมบัติทางเคมี

คลอแรมเฟนิคอล มีชื่อทางเคมีว่า D(−)-*threo*-2,2-Dichloro-*N*-[β-hydroxy-α-(hydroxymethyl)-β-(4-nitrophenyl) ethyl] acetamide เป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดได้จากเชื้อ *Streptomycese venezuelae* จากตัวอย่างดินในประเทศเวเนซูเอล่า ค้นพบในปี 1947 (Bartz, 1948) ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางเคมี คลอแรมเฟนิคอลมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อนมากนัก ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของคลอแรมเฟนิคอล

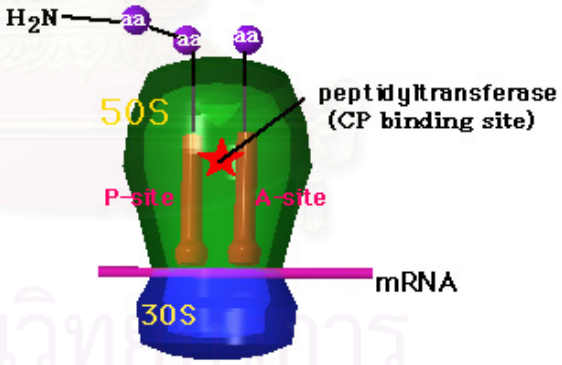
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คลอแรมเฟนิคอลเป็นสารไม่มีสีและไม่ค่อยละลายน้ำ สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคทั้งในคนและสัตว์ได้ ดังนั้นถ้าคลอแรมเฟนิคอลอยู่ในรูปของยาฉีดจะต้องถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของซัคซิเนตเอสเทอร์ที่ละลายน้ำได้ ถ้าอยู่ในรูปของยากินจะอยู่ในรูปของคลอแรมเฟนิคอลอิสระหรือในรูปของเอสเทอร์ที่เรียกว่าคลอแรมเฟนิคอลพาลมิเตต ซึ่งยาในรูปเอสเทอร์จะทำปฏิกิริยากับน้ำและไลเปสได้เป็นตัวยาคลอแรมเฟนิคอลอิสระและจะถูกดูดซึมในลำไส้ คลอแรมเฟนิคอลแพร่กระจายอย่างรวดเร็วตามเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย รวมถึงของเหลวต่างๆในร่างกาย ทั้งสมองและไขสันหลังและสู่ทารกในครรภ์ได้ คลอแรมเฟนิคอลคงอยู่ในร่างกาย

ได้นาน เนื่องจากคลอแรมเฟนิคอลไปยับยั้งระบบการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 ที่อยู่ในตับ ตับจะทำหน้าที่เปลี่ยนสารนี้ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้หรือ Chloramphenicol glucuronide โดยขบวนการ glucuronide formation ดังนั้นความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลในเลือดจะขึ้นอยู่กับภาวะในการทำหน้าที่ของตับ และร่างกายจะขับถ่ายคลอแรมเฟนิคอลออกทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ และส่วนน้อยขับถ่ายออกทางน้ำดีและอุจจาระ (สุวรรณา, 1998; อมรชัย, 2002)

2.1.1.2 กลไกการออกฤทธิ์

คลอแรมเฟนิคอลออกฤทธิ์ยับยั้งได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียพวกแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Streptococci* เป็นต้น โดยมีกลไกการยับยั้งดังรูปที่ 2.2 คลอแรมเฟนิคอลจะกระจายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียและเข้าไปจับกับไรโบโซม 50S ของแบคทีเรียทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างไรโบโซม 50S กับ aminoacyl-tRNA ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ peptidyl transferase กับกรดอะมิโนจาก tRNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่เจริญเติบโต



รูปที่ 2.2 การขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย

นอกจากนี้คลอแรมเฟนิคอลสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรียของเซลล์สัตว์ชั้นสูงหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากว่าไรโบโซมในไมโทคอนเดรียของสัตว์ชั้นสูงมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับไรโบโซมของแบคทีเรีย และเซลล์ที่สร้างเม็ดเลือดแดงในสัตว์ชั้นสูงจะมีความไวต่อคลอแรมเฟนิคอลมากเป็นพิเศษ (สุวรรณา, 1998; อมรชัย, 2002)

2.1.1.3 ผลข้างเคียงจากการใช้คลอแรมเฟนิคอล

เนื่องจากคลอแรมเฟนิคอลมีราคาถูก จึงนิยมใช้ในการรักษาโรคในสัตว์ที่ติดเชื้อจากการทำปศุสัตว์และการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อบริโภค ซึ่งก่อให้เกิดการตกค้างของสารนี้อยู่ในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ที่เป็นอาหารเพื่อบริโภค เมื่อผู้บริโภครับประทานเนื้อสัตว์ที่มีสารตกค้างเข้าไปอาจทำให้เชื้อโรคในคนดื้อยาและทำให้ไม่สามารถใช้ยานี้รักษาโรคต่อไปอีก นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดผลข้างเคียงของการใช้คลอแรมเฟนิคอลคือจะไปกดการทำงานของไขกระดูกจึงทำให้เกิดโรคโลหิตจาง อาจมีเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าปกติและเกล็ดเลือดลดลง และยังเป็นสาเหตุของโรคเลือดไหลไม่หยุดเพราะเกล็ดเลือดเปราะบางทำให้ประสาทตาพิการ อันตรายจากคลอแรมเฟนิคอลยังส่งผลถึงทารกแรกเกิดโดยทำให้เกิดอาการเกรย์ซินโดรม คลื่นไส้อาเจียน จุกเสียดแน่นอึดอัดในท้อง การหายใจผิดปกติ ตัวเย็น ถ่ายอุจจาระมีสีเขียว ผิวหนังมีสีเทา ระบบหมุนเวียนโลหิตล้มเหลวจนอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (สุวรรณา, 1998; ลิลา, 2002)

จากการใช้คลอแรมเฟนิคอลมีงานวิจัยที่ศึกษาด้านการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ พบว่าแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาคลอแรมเฟนิคอลในระดับที่สูงขึ้นทุกปี ถ้าหากมีผู้นำคลอแรมเฟนิคอลไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งจะทำให้เกิดการตกค้างในดินและน้ำ ทำให้เชื้อโรคในสิ่งแวดล้อมดื้อยามากขึ้นจนไม่สามารถควบคุมโรคกุ้งได้อีกต่อไป ดังนั้นองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (The United State Food and Drug Administration; USFDA) และหน่วยงานประเมินการใช้ยาของยุโรป (The European Medicines Agency; EMEA) ระงับการนำคลอแรมเฟนิคอลมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์ที่ผลิตเพื่อเป็นอาหารของมนุษย์ (EEC, 1994) เนื่องจากเป็นยาที่สงวนไว้สำหรับมนุษย์ ซึ่งออกฤทธิ์ได้กว้างขวางใช้รักษาโรคติดเชื้อภายนอก โรคผิวหนังบางชนิด

ในปัจจุบันประเทศต่างๆ ทั้งในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดมาตรฐานที่เข้มงวดมากขึ้นเกี่ยวกับปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่สามารถตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งที่นำเข้าจากประเทศต่างๆ โดยมีการกำหนดค่า MRLs (maximum residue limits) เพื่อเป็นหลักให้ยึดถือในการปฏิบัติให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและช่วยให้การดำเนินธุรกิจเป็นไปได้อย่างราบรื่น โดยมีมาตรฐานที่กำหนดขึ้นมาเป็นเครื่องช่วยในการตัดสินใจ เช่น ในสำหรับสหภาพยุโรป ได้กำหนดค่า MRLs ของคลอแรมเฟนิคอลตกค้างในอาหารเท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (2003/181/EC, 2003; Official Journal of the European Union, 2003)

2.1.2 การตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอล

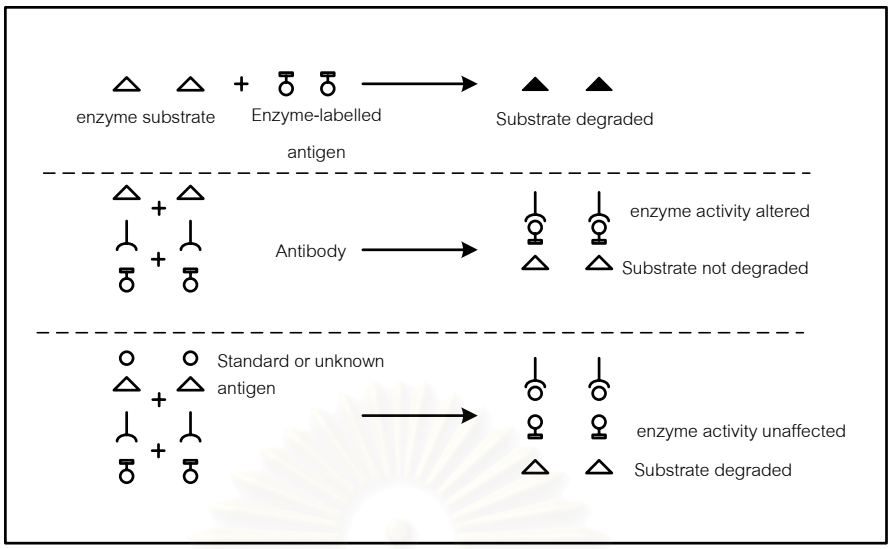
ในการตรวจวิเคราะห์หาคลอแรมเฟนิคอลสามารถกระทำได้หลายวิธีเช่น Thin layer chromatography (TC), Liquid chromatography (LC), High performance Liquid chromatography (HPLC), Gas chromatography (GC) วิธีการเหล่านี้ต้องอาศัยผู้ชำนาญการใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและใช้เวลานานในการวิเคราะห์ตัวอย่าง จึงได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายไม่แพง สะดวกขึ้นโดยอาศัยหลักการทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยอาศัยหลักการการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เพื่อทำการทดสอบเบื้องต้นก่อนที่จะยืนยันปริมาณที่แน่นอนโดยวิธีที่อาศัยหลักการทางด้านโครมาโทกราฟี

2.1.3 หลักการตรวจวิเคราะห์ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน

หลักการทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล 2 ชนิด คือ แอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีลักษณะสำคัญ 2 อย่าง คือ ความจำเพาะ (Specificity) และ สัมพรรคภาพในการจับ (Affinity) ซึ่งการจับกันนี้อาจก่อให้เกิดผลที่สามารถทำให้มองเห็นได้ เช่น เกิดเป็นตะกอนหรือมีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนเกิดขึ้น หรือบางในกรณีจำเป็นต้องมีการติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารบางอย่างก่อน เช่น เอนไซม์ สารเรืองแสง เป็นต้น จึงจะทำให้ทราบว่ามีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้น แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการติดตามปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยมีการติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนด้วยเอนไซม์หรือที่เรียกว่า Enzyme Immunoassay (EIA) ซึ่ง EIA ยังสามารถแบ่งออกตามหลักการและวิธีการได้เป็น 2 แบบ คือ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2542)

1. Homogeneous enzyme immunoassay

ในการทดสอบไม่ต้องทำการแยกแอนติเจนส่วนที่จับอยู่กับแอนติบอดีออกจากแอนติเจนหรือแอนติบอดีอิสระก็สามารถตรวจปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งหลักการของ Homogeneous EIA นี้แสดงได้ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 หลักการของ Homogeneous enzyme immunoassay

จากรูปที่ 2.3 เมื่อให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะทำให้การทำหน้าที่ของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่ถ้าหากในปฏิกิริยานั้นมีแอนติเจนที่จำเพาะจากสิ่งส่งตรวจอยู่ด้วย จะทำให้แอนติบอดีนั้นทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ติดฉลากลดลง ส่งผลให้การทำหน้าที่ของเอนไซม์ลดลงไปและสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมซับสเตรตของเอนไซม์ลงไป ซึ่งหน้าที่ของเอนไซม์เป็นปฏิภาคผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ

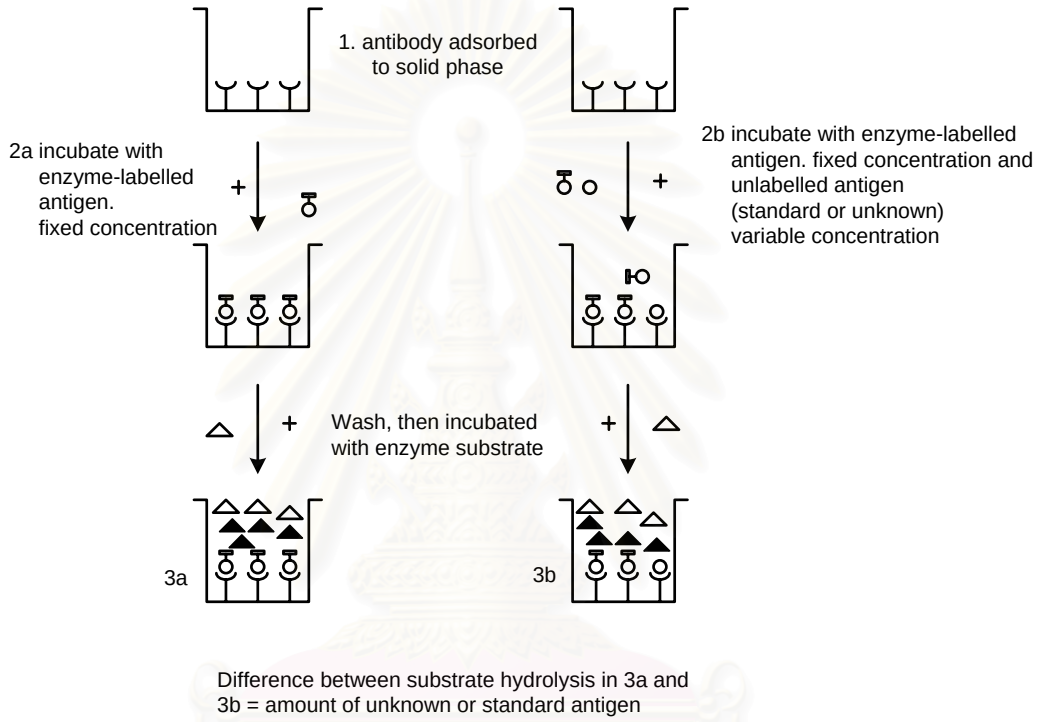
2. Heterogeneous enzyme immunoassay

ในการทดสอบต้องทำการแยกแอนติเจนที่จับอยู่กับแอนติบอดีออกจากแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่อยู่เป็นอิสระ ส่วนใหญ่ Heterogeneous enzyme immunoassay จะเป็นแบบ solid phase assay ซึ่งแบบนี้จะเรียกว่า Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ได้แก่

2.1 competitive ELISA

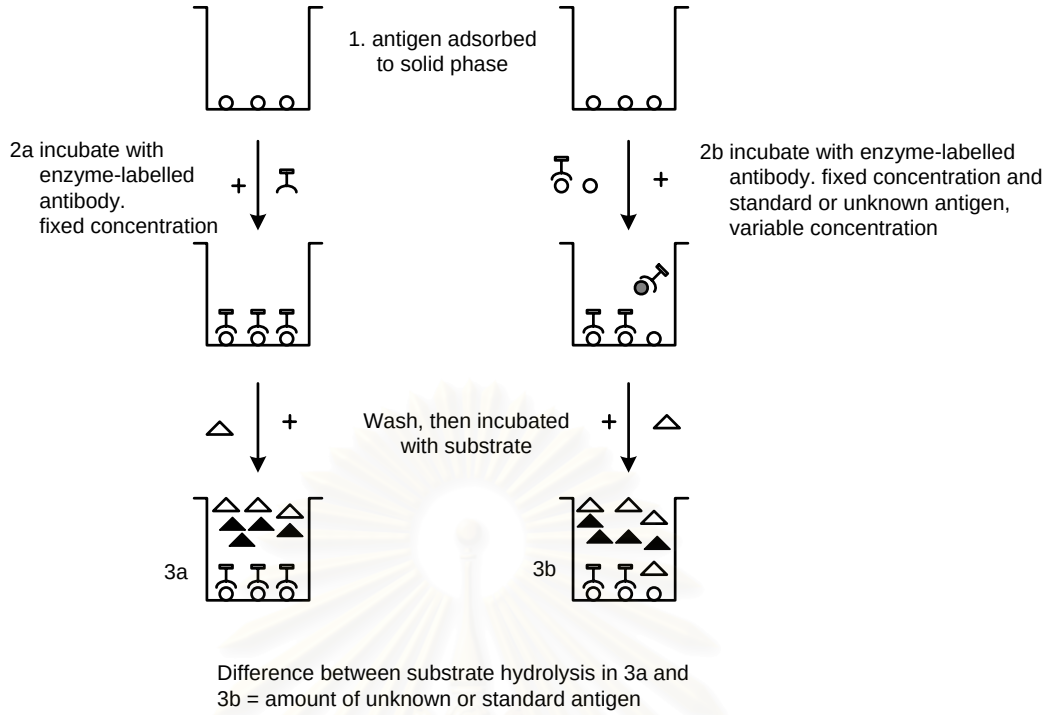
วิธีนี้สามารถใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ได้ ในกรณีที่ติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ วิธีการทดสอบดังรูปที่ 2.4 คือ ให้เคลือบพื้นผิววัสดุแข็งด้วยแอนติบอดี และให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบแย่งกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ถ้าแอนติเจนที่ทดสอบมีมากจะสามารถแย่งจับกับแอนติบอดีได้มาก ทำให้มีแอนติเจนติดฉลากจับอยู่กับแอนติบอดีบนพื้นผิววัสดุน้อย ในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ติดฉลากกับแอนติบอดีนี้

ไม่มีผลทำให้หน้าที่ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากมีการล้างเอาแอนติเจนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีบนพื้นผิววัสดุแข็งนั้นออกไปแล้ว จากนั้นเมื่อมีการเติมซับสเตรตของเอนไซม์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตเป็นปฏิภาคผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่นำมาทดสอบ ซึ่งในการทดสอบเพื่อหาปริมาณของแอนติเจนด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตของเอนไซม์กับแอนติเจนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการอ่านค่าของปริมาณแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ



รูปที่ 2.4 หลักการของ Competitive ELISA ที่ใช้แอนติเจนเป็นตัวติดฉลากด้วยเอนไซม์

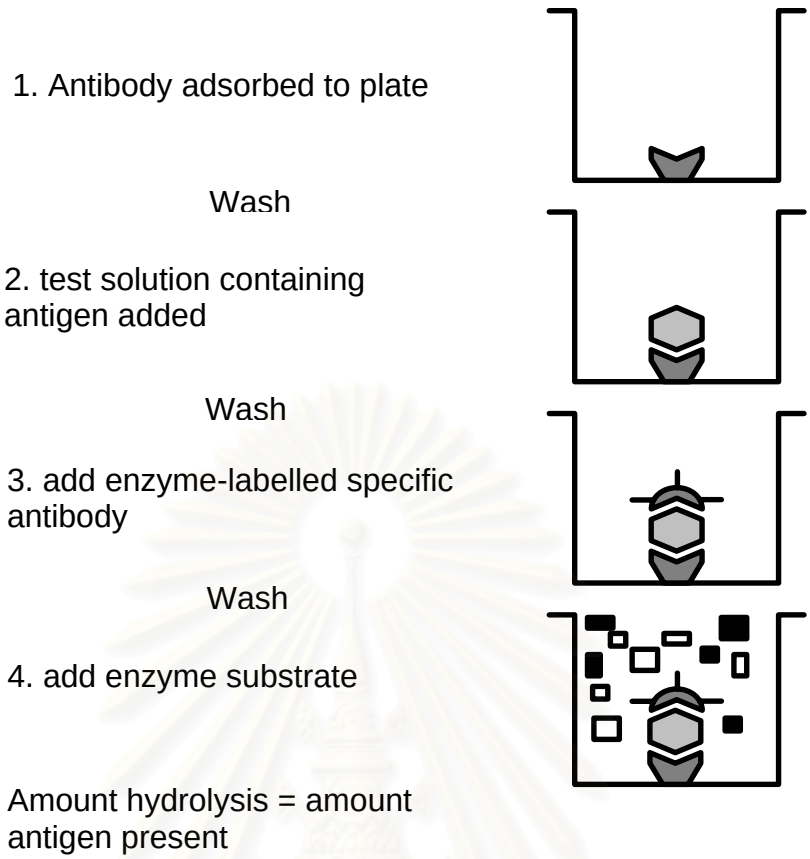
ส่วนในกรณีที่ใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ หลักการทดสอบดังรูปที่ 2.5 คือ ให้เคลือบผิววัสดุแข็งด้วยแอนติเจนและให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบแย่งกับแอนติเจนที่เคลือบผิวในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ทำการเติมลงไปในการทำปฏิกิริยา ถ้าแอนติเจนที่ต้องการทดสอบมากจะขัดขวางการจับของแอนติบอดีติดฉลากกับแอนติเจนที่เคลือบผิวมาก เป็นผลให้มีแอนติบอดีติดฉลากจับกับแอนติเจนที่เคลือบผิวน้อย ส่งผลให้ในปฏิกิริยามีเอนไซม์น้อย และเมื่อทำการเติมซับสเตรตของเอนไซม์ลงไป การเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตจะเป็นปฏิภาคผกผันกับปริมาณของแอนติเจนที่นำมาทดสอบ



รูปที่ 2.5 หลักการของ Competitive ELISA ที่ใช้แอนติบอดีเป็นตัวติดฉลากด้วยเอนไซม์

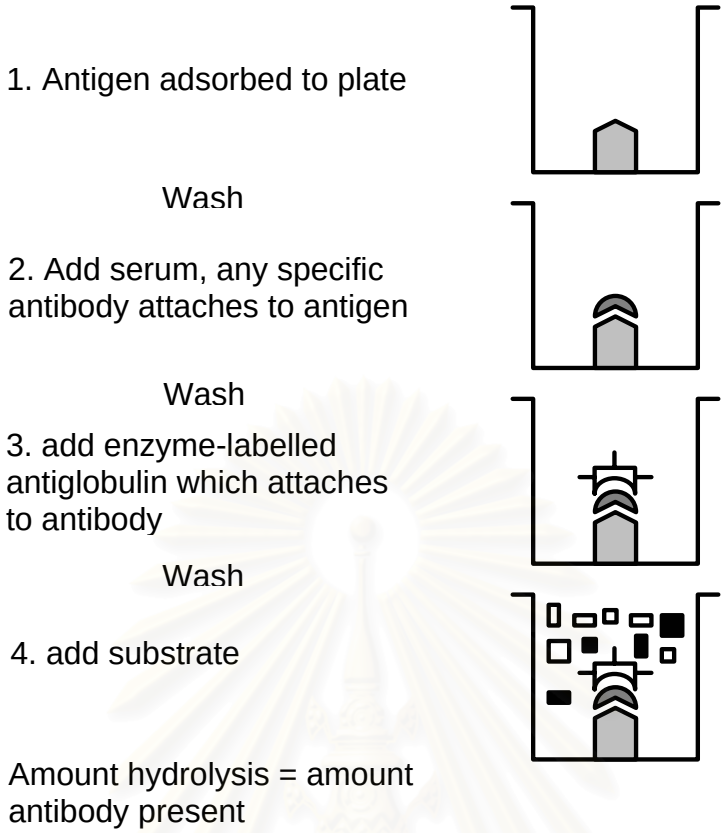
2.2 Non-competitive ELISA

วิธีนี้สามารถหาปริมาณแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ ในกรณีต้องการตรวจหาแอนติเจน มีหลักการดังรูปที่ 2.6 คือ ให้เคลือบผิววัสดุแข็งด้วยแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบและเติมแอนติเจนที่ต้องการทดสอบเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบผิว เมื่อทำการล้างแอนติเจนที่ต้องการทดสอบที่ไม่ถูกจับด้วยแอนติบอดีที่เคลือบผิวก็จะถูกชะออกไป เหลือเพียงแอนติเจนที่ต้องการทดสอบที่ถูกจับด้วยแอนติบอดีที่เคลือบผิว และเมื่อทำการเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการทดสอบและติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปจับกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบนั้น ถ้าแอนติเจนที่ต้องการทดสอบมีมาก แอนติบอดีตัวที่สองนี้ก็จะจับกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบได้มากเช่นเดียวกัน ดังนั้นก็จะมีเอนไซม์ติดอยู่กับผิวเคลือบบนวัสดุแข็งมากเช่นเดียวกัน หลังจากล้างแยกแอนติบอดีติดฉลากส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมซับสเตรตของเอนไซม์ลงไป การเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตจะเป็นปฏิภาคผันแปรกับปริมาณของแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ โดยที่วิธีนี้แอนติเจนที่ใช้จะต้องมี Binding site มากพอที่จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ใช้ในการเคลือบผิววัสดุและแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าแอนติบอดีทั้งสองตัวจะต้องมีความสามารถในการจับกับ binding site บนแอนติเจนที่นำมาทดสอบได้ต่างกัน วิธีการนี้ใช้แอนติบอดี 2 ตัวจับกับแอนติเจน 1 ตัว โดยการประกบคู่ จึงอาจเรียกวิธีการนี้ว่า Sandwich ELISA



รูปที่ 2.6 หลักการของ Sandwich ELISA (Voller, 1978)

ส่วนในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดี มีหลักการดังรูปที่ 2.7 คือ ให้เคลือบผิววัสดุแข็งด้วยแอนติเจนแล้วทำการเติมแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบลงไป จากนั้นทำการเติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ หรือที่เรียกว่า Anti-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปในปฏิกิริยา Anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จะไปจับกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบนั้น เมื่อทำการล้าง Anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก เมื่อทำการเติมซับสเตรตของเอนไซม์ลงไป การเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตจะเป็นปฏิภาคผันแปรกับปริมาณของแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ



รูปที่ 2.7 หลักการของ Indirect ELISA (Voller, 1978)

2.1.4 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยอาศัยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน

2.1.4.1 แอนติบอดี

ชุดตรวจสอบส่วนใหญ่นิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากว่ามีความจำเพาะมากกว่า และสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้การผลิตชุดตรวจสอบได้ ซึ่งความแตกต่างระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแบ่งได้เป็น 4 ประการ คือ

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

การผลิตพอลีโคลนอลแอนติบอดีมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า แต่การผลิตแต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและส่วนประกอบของแอนติบอดีจะแตกต่างทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ดังนั้นจะต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุกครั้ง

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเอพิโทปชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นเอพิโทปที่จำเพาะหรือเอพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามก็ได้ ส่วนพอลีโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลายๆชนิดที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อเอพิโทปของตัวเอง ซึ่งทำให้พอลีโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อหลายเอพิโทปบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้ามระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะพบว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3. สัมพรรคภาพของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพเป็นคุณสมบัติจำเพาะภายในของแอนติบอดีแต่ละชนิด คุณสมบัตินี้จะถูกกำหนดโดยส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนหรือที่เรียกว่าส่วน variable region ของอิมมูโนโกลบูลิน ในระหว่างการเกิดพัฒนาการของ B lymphocyte จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่างๆกัน ซึ่งจะทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพต่างกัน โดยที่สัมพรรคภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนแปลงสัมพรรคภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมโดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนอิมมูโนโกลบูลิน ส่วนพอลีโคลนอลแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพที่เป็นผลเฉลี่ยของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลีโคลนอลแอนติบอดี

4. Effector function

Effector function เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด เช่น ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ เป็นต้น คุณสมบัตินี้จะแตกต่างกันในแต่ละไอโซไทป์และซับคลาสของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆและจะกำหนดคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีคุณสมบัติชีวภาพในด้านต่างๆ แตกต่างกันไป ส่วนพอลีโคลนอลแอนติบอดีจะมีความสามารถในด้าน effector function ดีมากน้อยเท่าใดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลีโคลนอลแอนติบอดี

2.1.4.2 แอนติเจน

คุณสมบัติของแอนติเจนที่ใช้สำหรับชุดตรวจสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน คือ ความจำเพาะของแอนติเจน ความครอบคลุม ความบริสุทธิ์ ความคงรูปโครงสร้างของแอนติเจน และความสามารถในการผลิตปริมาณมาก ในชุดตรวจสอบที่ใช้แอนติเจนขนาดเล็กมักต้องทำการเชื่อมต่อเข้ากับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า ในลักษณะของ hapten carrier conjugate

2.1.4.3 ระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา

ส่วนใหญ่มักจะวัดสีที่เกิดขึ้นโดยอ่านค่าเป็นการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical Density; O.D.) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะมากหรือน้อย ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์และซับสเตรต

2.1.4.3.1 เอนไซม์

เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish Peroxidase (HRP) และ Alkaline Phosphatase (AP) โดยส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เชื่อมเข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด

2.1.4.3.2 ซับสเตรต

ซับสเตรต แต่ละชนิดจะอ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และการใช้ซับสเตรตขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจวัดด้วย เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ Horseradish peroxidase ซับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 415 นาโนเมตร, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร และ OPD (*o*-phenylenediamine) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร ส่วนเอนไซม์ Alkaline Phosphatase (AP) ซับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ PNP (*p*-nitrophenyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร, PMP (phenolphthalein monophosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร และ 1NP (1-napthyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

นอกจากนี้อาจใช้ระบบของ biotin-streptavidin ในการเพิ่มความแรงของสัญญาณทำให้ชุดตรวจสอบมีความไวสูงขึ้นทำให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้

2.1.4.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง (Solid phase)

รูปแบบของ Solid phase ที่เป็นมาตรฐานคือ จานชนิด 96 หลุม หรือ microtitre plate หรือ 96 well-plate ซึ่งอาจอยู่ในรูปเพลทอันเดียวกันที่มี 96 หลุมหรืออยู่ในรูปที่สามารถหักแบ่งเป็นแถบๆ (Strip) แถบละ 8 หลุมจำนวน 12 แถบ หรือแถบละ 16 หลุม จำนวน 6 แถบ

2.1.5 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ข้อมูลที่แสดงถึงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยวิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. ความไว (Sensitivity) บ่งบอกความสามารถที่จะตรวจพบสารในปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ด้วยชุดตรวจสอบนั้น
2. ความแม่นยำ (Precision) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลเหมือนกันเมื่อทดสอบหลายๆ ครั้ง
3. ความถูกต้อง (Accuracy) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gwendolyn และคณะ (1984) ได้นำแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายโดยการฉีดกระตุ้นด้วย CAP-KLH มาตรวจสอบหาปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี competitive enzyme-linked immunoassay ซึ่งให้ความไวและความแม่นยำในการวัดที่ดี มีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลสูง ประหยัด และสามารถวิเคราะห์ผลได้ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งในปฏิกิริยามีการแข่งขันระหว่างคลอแรมเฟนิคอลอิสระในตัวอย่างกับคลอแรมเฟนิคอลที่เคลือบบนจานชนิด 96 หลุม ในการที่จะมาจับกับแอนติบอดีที่ได้จากกระต่าย ซึ่งแอนติบอดีที่ไม่ได้จับกับคลอแรมเฟนิคอลอิสระจะถูกวัดโดยการใช้ Goat anti-rabbit immunoglobulin G ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์สราดิชเปอร์ออกซิเดสที่มีขายในท้องตลาดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยที่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนผกผันกับค่าความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ วิธีการนี้สามารถตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลที่ปริมาณต่ำสุด (Limit of detection; LOD) เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Cazemier และคณะ (1996) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลและกลูคูโรไนด์ (glucuronide) ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ของคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่าง ปัสสาวะ เนื้อเยื่อ นม และ ไข่ โดยวิธีการ Enzyme Immunoassay จากวิธีการตรวจสอบนี้ ตัวอย่างที่เป็นปัสสาวะและนมพร่องมันเนยสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียม (เพียงทำให้เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์เท่านั้น) ซึ่งส่งผลให้สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลต่ำสุดที่ 0.8 μg/L ในปัสสาวะวัว 1.4 μg/L ในปัสสาวะหมูและ 0.4 μg/L ในนม และหากนำนมมากลั่นด้วยเอทิลอะซีเตตจะสามารถตรวจสอบความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลต่ำสุดได้มากขึ้นอีกอย่างน้อย 10 เท่าสำหรับในเนื้อเยื่อและไข่ หลังจากการสกัดตัวอย่างด้วยเอทิลอะซีเตตจะนำไปทำให้สะอาดมากขึ้นด้วยการใช้ไอโซออกเทน (Isooctane) หรือไตรคลอโรมีเทน (Trichloromethane) ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลต่ำสุดที่ 0.05-0.1 μg/kg

Bogusz และคณะ (2004) ได้ทำการทดลองเพื่อตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลและกลูคูโรไนด์ (glucuronide) ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ของคลอแรมเฟนิคอลในอาหาร โดยใช้วิธี liquid chromatography-electrospay negative ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS) ซึ่งในการทดลองใช้น้ำผึ้งและเนื้อเป็นตัวอย่างและใช้ chlorempheniсol-D5 เป็น internal standard มีการใช้กระบวนการแยกด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ column RP 18 ขนาด 123 mm x 3 mm และ acetonitrile-ammonium formate 10 mM ที่ pH 3.0 และตั้งอัตราการไหลที่ 0.3 มิลลิลิตรต่อ พีคของคลอแรมเฟนิคอลถูกชะออกมาหลังจากผ่านไป 5 นาที จากช่วงเวลาในการชะสารทั้งหมด 7 นาที ค่า LOD มีค่าประมาณ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัมในเนื้อ และ 0.05 นาโนกรัมต่อกรัมในน้ำผึ้ง ซึ่งวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ถึง 30 ตัวอย่างต่อวัน

Shen และคณะ (2005) ได้พัฒนากระบวนการตรวจหาปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างในอาหารทะเล เนื้อ และน้ำผึ้ง โดยใช้หลายกระบวนการร่วมกันในการตรวจหาคลอแรมเฟนิคอลตกค้างซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลที่มีในตัวอย่าง อีกทั้งมีการหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระบวนการ extraction clean-up derivatization และการวิเคราะห์ โดยหลังจากผ่านการคัดกรอง (screen) ด้วยวิธี ELISA แล้วตัวอย่างจะได้รับการกลั่นด้วย Phosphoric buffer solution, pH 6.88 และเอทิลอะซีเตตก่อนที่จะนำไปตรวจหาปริมาณด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography Mass Spectrometry Electronic Ionization (GC-MS-EI) ด้วยวิธีการเหล่านี้ทำให้สามารถตรวจหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ตกค้างได้ในระดับ 0.1 - 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัท
ขวดแก้ว	Boro
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE minor 35
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
จานชนิด 96 หลุม	Nunc
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambridge
ปั๊มลม	Iwaki
ปิเปตต์แก้ว 10 มิลลิลิตร	HBG
ปิเปตต์อัตโนมัติ	Socorex
ภาชนะเลี้ยงเซลล์ 250 มิลลิลิตร	Nunc
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII
หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
Ammonium chloride	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Ammonium sulphate	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Bovine serum albumin	Sigma	สหรัฐอเมริกา
CAP-BSA conjugate	Biogenesis	อังกฤษ
Chloramphenicol test kit	Euro-Diagnostica	เนเธอร์แลนด์
Chloramphenicol	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Chloramphenicol succinate	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Citric acid	Merck	เยอรมัน
Copper sulphate	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
D-glucose	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Disodium hydrogenphosphate	Carlo erba	สหรัฐอเมริกา
EDC (1-ethyl-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Fetal bovine serum	Invitromex	เยอรมัน
HRP-rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Hydrogen peroxide	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Isotyping kit	Sigma	สหรัฐอเมริกา
L-glutamine	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Methanol	กรมสรรพสามิต	ไทย
Mouse anti-CAP	US Biological	อเมริกา
Non-fat dry milk	Mission	ไทย
O-phenylenediamine	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain specific)	Zymed	สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศผู้ผลิต
Potassium dihydrogenphosphate	Merck	เยอรมัน
Pyruvic acid	Sigma	สหรัฐอเมริกา
RPMI 1640 medium	Invitromex	เยอรมัน
Sodium bicarbonate	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Sodium carbonate	Merck	เยอรมัน
Sodium chloride	Merck	เยอรมัน
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	สหรัฐอเมริกา
Sodium hydroxide	Merck	เยอรมัน
Sulfuric acid	Merck	เยอรมัน
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Merck	เยอรมัน
Trisodium citrate	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
Tween 20	Sigma	สหรัฐอเมริกา

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA

3.3.1.1 การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA

ทำการเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลเข้ากับ BSA โดยวิธีคาร์โบดิอิไมด์ ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ นำโปรตีน BSA 5 มิลลิกรัมมาละลายใน 0.1 M Phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต 1.78 มิลลิกรัม ลงไป เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นเติม EDC 1.5 มิลลิกรัม ปั่นกวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปไดแอไลซ์ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง (Shan และคณะ, 2002)

3.3.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนของ CAP-BSA โดยวิธี Lowry

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA หลังจากการเชื่อมกับคลอแรมเฟนิคอล (CAP-BSA) ด้วยวิธี Lowry โดยเตรียมสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง CAP-BSA ที่ความเจือจาง 5 และ 10 เท่า โดยทำการเจือจางด้วย PBS โดยให้สารแต่ละตัวมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Reagent C ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และทำการเติม Reagent D ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.3.1.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อและหลังการเชื่อมต่อ

หาน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อและหลังการเชื่อมต่อ โดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) ซึ่งมีหลักการคือ ดูว่าน้ำหนักโมเลกุลของ BSA หลังการเชื่อมต่อเพิ่มขึ้นหรือไม่ ถ้าน้ำหนักโมเลกุลของ BSA หลังการเชื่อมต่อเพิ่มขึ้น แสดงว่า คลอแรมเฟนิคอลเชื่อมติดกับ BSA ซึ่งการหาน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ทำโดยการส่งวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

3.3.2 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล

คัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลที่ได้จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิธี Indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 well-plate) ด้วยแอนติเจน หลุมละ 100 ไมโครลิตร สำหรับการทดสอบนี้ใช้แอนติเจน 2 ชนิด คือ CAP-BSA และ BSA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงไฮบริโดมาที่มีแอนติบอดีหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Rabbit anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:2000 ใน 1% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไป

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร หลังจากทำ Indirect ELISA ถ้าไฮบริโดมาในหลุมใดให้ค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CAP-BSA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย BSA ต่ำ ก็จะเลือกไฮบริโดมานั้นมาทำการศึกษาไอโซไทป์ต่อไป

3.3.3 การตรวจหาไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบ isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการเตรียม Isotyping specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในจานชนิด 96 หลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HPR-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

3.3.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.4.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำไฮบริโดมาที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงไฮบริโดมาจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเหลืองซึ่งจะมีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีสูง จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.3.4.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เพื่อนำแอนติบอดีไปทดสอบหาความจำเพาะต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 90 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 110 มิลลิลิตร จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ปั่นกวนต่อไปเป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนตะกอนมาล้างด้วย 45% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และละลายส่วนตะกอนด้วย 0.01 M Tris-HCl, pH 8.1 โดยใช้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปไดแอไลซ์ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS เป็นจำนวน 5 ครั้ง

3.3.4.2.1 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้เป็นโปรตีนผสมหรือโปรตีนที่ไม่ทราบค่าคงตัว (Extinction coefficient) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร จึงนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

ความเข้มข้นของโปรตีน = (1.55 x O.D. 280)-(0.77 x O.D. 260)

หมายเหตุ หน่วยที่ได้เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Johnson และ Thorpe, 1987)

3.3.4.3 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ affinity column chromatography

โปรตีนเอ เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus.* ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยากับแอนติบอดีโดยมีสัมพรรคภาพสูงที่ค่า pH 8.0 เมื่อค่า pH ต่ำลง อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน เอ กับแอนติบอดีจะต่ำลง ทำให้สามารถแยกแอนติบอดีออกจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ได้ โดยมีวิธีการ คือ นำโปรตีน เอ 1.5 กรัม มาทำให้พองตัวโดยแช่ใน PBS 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมลงในคอลัมน์ จากนั้นปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 ให้เท่ากับ pH 8.1 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ affinity column chromatography โดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างคอลัมน์โดยการเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ แล้วทำการชะแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ IgG1 ออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ affinity column chromatography โดยการเติม 0.1 M citrate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ (ถ้าแอนติบอดีมีไอโซไทป์เป็น IgG2b จะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1 M citrate buffer, pH 3.5) พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองที่มี 1 M Tris, pH 9.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร และปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ (Hudson และ Hay, 1980) หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงมารวมกันก่อนนำไปไดแอไลซ์ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง

3.3.4.3.1 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography เป็นแอนติบอดีที่ทราบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิดใดซึ่งในแต่ละชนิดนั้นจะมีค่าคงตัว (Extinction coefficient) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{ค่า extinction coefficient ที่ 280 นาโนเมตร}} \times 10 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

หมายเหตุ : ค่า extinction coefficient ของ IgG เท่ากับ 13.6 (Johnson และ Thorpe, 1987)

3.3.5 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล

รูปแบบของชุดตรวจสอบเป็นแบบ Sandwich ELISA ต้องใช้แอนติบอดี 2 ตัวที่มีความจำเพาะต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลที่ต่างกัน ถ้าเป็นแบบ indirect competitive ELISA หรือ competitive ELISA ใช้แอนติบอดีเพียง 1 ตัว ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบหาความจำเพาะต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลของไฮบริโดมาโคลนต่างๆ ที่ทำการคัดเลือก (โคลนที่ 29, 45, 52 และ 79) ซึ่งมีวิธีการทดสอบตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.3.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการนำไปหาความจำเพาะต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล ด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วย CAP-BSA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้เข้มข้นโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใน PBS ให้มีความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2

3.3.5.2 ทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี indirect ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนต่างๆที่คัดเลือกได้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.2 โดยเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมกันแทนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรมาเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสม ถ้าทดสอบแล้วพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เท่าเดิมหรือใกล้เคียงกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสม แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีคู่นั้นจำเพาะกับเอพิโทปบนโมเลกุล

คลอแรมเฟนิคอลเดียวกัน ถ้าทดสอบแล้วพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสม แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีคู่นั้นจำเพาะกับเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลต่างกัน (ดัดแปลงจาก Campbell, 1984)

3.3.6 การทดสอบความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกนั้นได้จากการฉีดกระตุ้นด้วยคลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับ BSA และในการทำ indirect ELISA นั้นไม่สามารถเคลือบคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระได้โดยตรงจึงจำเป็นต้องใช้คลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับแบบจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ จึงใช้หลักการแย่งจับในการทำ indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เตรียมคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 79 โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2 โดยทำการเติมแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลแทนอาหารเลี้ยงเซลล์ หากแอนติบอดีสามารถจับแบบจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระจะพบว่าแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงจะต่ำกว่าแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นน้อยกว่า

3.3.7 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.7.1 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วย CAP-BSA ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแอนติบอดีด้วย PBS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2

3.3.7.2 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect ELISA

ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วย CAP-BSA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแอนติบอดีด้วย PBS ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2

3.3.7.3 ทดสอบหาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ

ทำการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA เหมือนขั้นตอนที่ 3.3.6 แต่เตรียมคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 0, 0.000625, 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำคลอแรมเฟนิคอลแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับแอนติบอดีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} (inhibition concentration 50) ซึ่งเป็นค่าที่บอกปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบ indirect competitive ELISA ลดลงเหลือ 50% เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล โดยค่า IC_{50} นี้หาได้จากการสร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล และ ค่า $\%B/B_0$ (หรือ % Binding) เป็นแกน Y จากนั้นหาตำแหน่งของความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่ให้ค่า $\%B/B_0$ เท่ากับ 50% จากกราฟนั้น เมื่อ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Indirect competitive ELISA ที่มีคลอแรมเฟนิคอลในความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Indirect competitive ELISA ที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล (ดัดแปลงจาก Connolly และคณะ, 2002) ซึ่งการหาค่า IC_{50} จะใช้โปรแกรม Graphpad Prism 4.03

3.3.7.4 ทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอน 3.3.7.3 แต่ใช้คลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตแทนคลอแรมเฟนิคอล จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} และคำนวณหาปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนของค่า IC_{50} ของคลอแรมเฟนิคอลต่อค่า IC_{50} ของคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต

$$\text{ปฏิกิริยาข้าม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ค่า } IC_{50} \text{ ของคลอแรมเฟนิคอล}}{\text{ค่า} IC_{50} \text{ ของคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต}} \times 100$$

3.3.7.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 3.3.7.3 แต่ทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้บ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่ศึกษา คือ 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์ คือ อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรสูงสุดต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรต่ำสุดให้ค่าสูง (A_{max} ต่อ A_{min} สูง) ให้ค่า IC_{50} ต่ำ (ดัดแปลงจาก Jae Koo Lee และคณะ, 2001) และคำนึงถึงความสะดวกในการใช้งาน

3.3.7.6 ศึกษาผลกระทบของการล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween20 และไม่มี

ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 3.3.7.3 แต่ทำการล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 เปรียบเทียบกับการล้างที่ไม่มี 0.05% Tween 20 ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกใช้ตัวล้างที่มีหรือไม่มี Tween 20 ในการล้างจานชนิด 96 หลุม คือ ให้ background ต่ำ ให้ค่า IC_{50} ต่ำและมีอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรสูงสุดต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรต่ำสุดให้ค่าสูง (A_{max} ต่อ A_{min} สูง)

3.3.7.7 สร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี Indirect competitive ELISA

ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน (CAP-BSA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร (20 ซ้ำ) นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

(25-28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:10,000 ใน 1% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า $\%B/B_0$ เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลในลักษณะที่เป็นเส้นตรง

3.3.7.8 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

3.3.7.8.1 หาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

จากการทดลองในขั้นตอน 3.3.7.7 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง โดยที่ความไวของชุดตรวจสอบจะรายงานเป็นค่า LOD หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of detection; LOD) และค่า LOQ (Limit of quantitation; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง ซึ่งค่า LOD และ LOQ หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของคลอแรมเฟนิคอลเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือค่าความไวของชุดตรวจสอบ

$$LOD = B_0 - 3SD$$

$$LOQ = B_0 - 10SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.3.7.8.2 หาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ (ธารารัชต์, 2545)

3.3.7.8.2.1 Intra assay หรือ Within-assay

จากการทดลองในขั้นตอน 3.3.7.7 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Intra-assay ของชุดตรวจสอบโดยทำการหาค่า Mean SD และ %CV ของ 20 ซ้ำนั้น

โดยที่ Mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรโดยวิธี Indirect competitive ELISA เมื่อมีคลอแรมเฟนิคอลและไม่มีคลอแรมเฟนิคอล

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

%CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งคำนวณได้จาก

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

3.3.7.8.2.2 Inter assay หรือ Between-assay

ทำการทดลองเหมือนในขั้นตอน 3.3.7.7 แต่ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน 4 ครั้งที่เวลาต่างกันโดยที่แต่ละครั้งทำ 5 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 20 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าค่า Mean SD และ %CV ของทั้ง 20 ซ้ำนั้น

3.3.7.8.3 หาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

3.3.7.8.3.1 การหาค่า %Recovery

นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีการเติมคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.2, 3 และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนำตัวอย่างกุ้งที่มีการเติมคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2, 5.33 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากการสกัดตามขั้นตอน 3.3.8 มาทำการหาค่า %Recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

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

3.3.8 การสกัดสารตัวอย่างกุ้งเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล

นำกุ้งมาบดให้ละเอียดแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 6 กรัม จำนวน 4 หลอด จากนั้นทำการเติมคลอแรมเฟนิคอลในแต่ละหลอดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2, 5.33 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเติมเอทิลอะซีเตท 12 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใส 8 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองจำนวน 2 หลอดหลอดละ 4 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA และ LC-MS-MS จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยไนโตรเจนที่ 50 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแห้ง โดยนำหลอดที่จะนำไปทดสอบด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายโดยวิธี ELISA มาละลายด้วย 1 มิลลิลิตร ไอโซออกเทนที่ผสมกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 โดยปริมาตร และ 1 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ PBS (วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล) ส่วนอีกหลอดที่จะนำไปทดสอบด้วยวิธี LC-MS-MS ละลายด้วย 1 มิลลิลิตร 75% เมทานอลและ 1 มิลลิลิตร เฮกเซน (ดัดแปลงจากคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลเพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS-MS) เขย่า 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดที่ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA มาดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ถ้าชั้นบนเป็นอิมัลชัน ให้นำไปอุ่นในเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยใช้น้ำ (water bath) ที่ 80 องศาเซลเซียส จนชั้นบนใส และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3-5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนไปทดสอบด้วยวิธี ELISA ส่วนหลอดที่นำไปทดสอบด้วยวิธี LC-MS-MS มาดูดส่วนใสชั้นล่างใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี LC-MS-MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA

4.1.1 การวัดปริมาณโปรตีนของ CAP-BSA โดยวิธี Lowry

เมื่อทำการเชื่อม CAP-BSA แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่าดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (รูปผนวกที่ ก.1) จากผลการทดลองพบว่า คลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมกับ BSA ที่ความเจือจาง 1:5 และ 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 1.758 และ 0.828 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (รูปผนวกที่ ก.1) และคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนของ CAP-BSAได้เท่ากับ 4.18 และ 3.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของ CAP-BSA ได้เท่ากับ 4.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

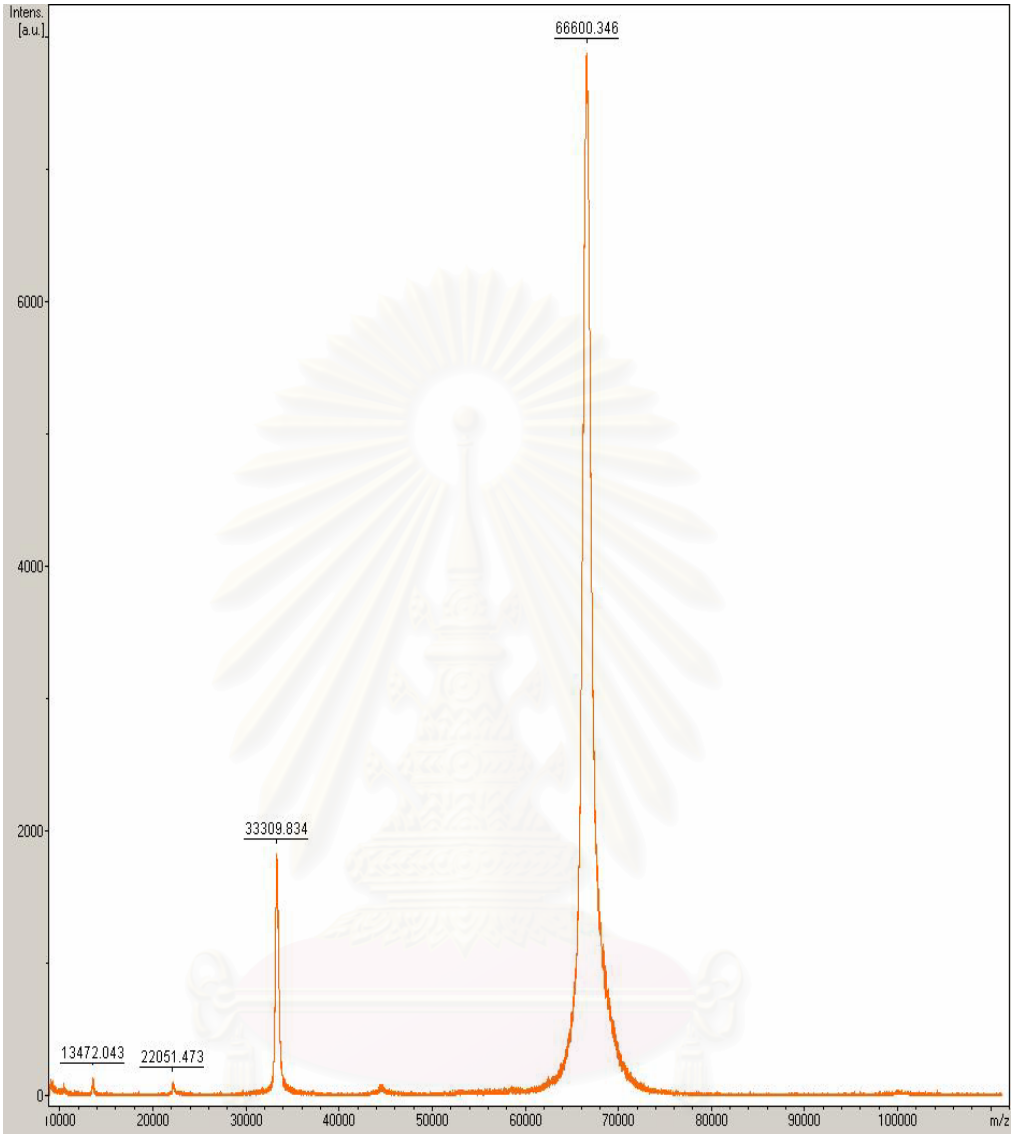
ตารางที่ 4.1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนหลังการเชื่อม CAP-BSA

ความเจือจาง (เท่า)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
5	1.758	4.18
10	0.828	3.94
ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย		4.06

4.1.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อและหลังการเชื่อมต่อ

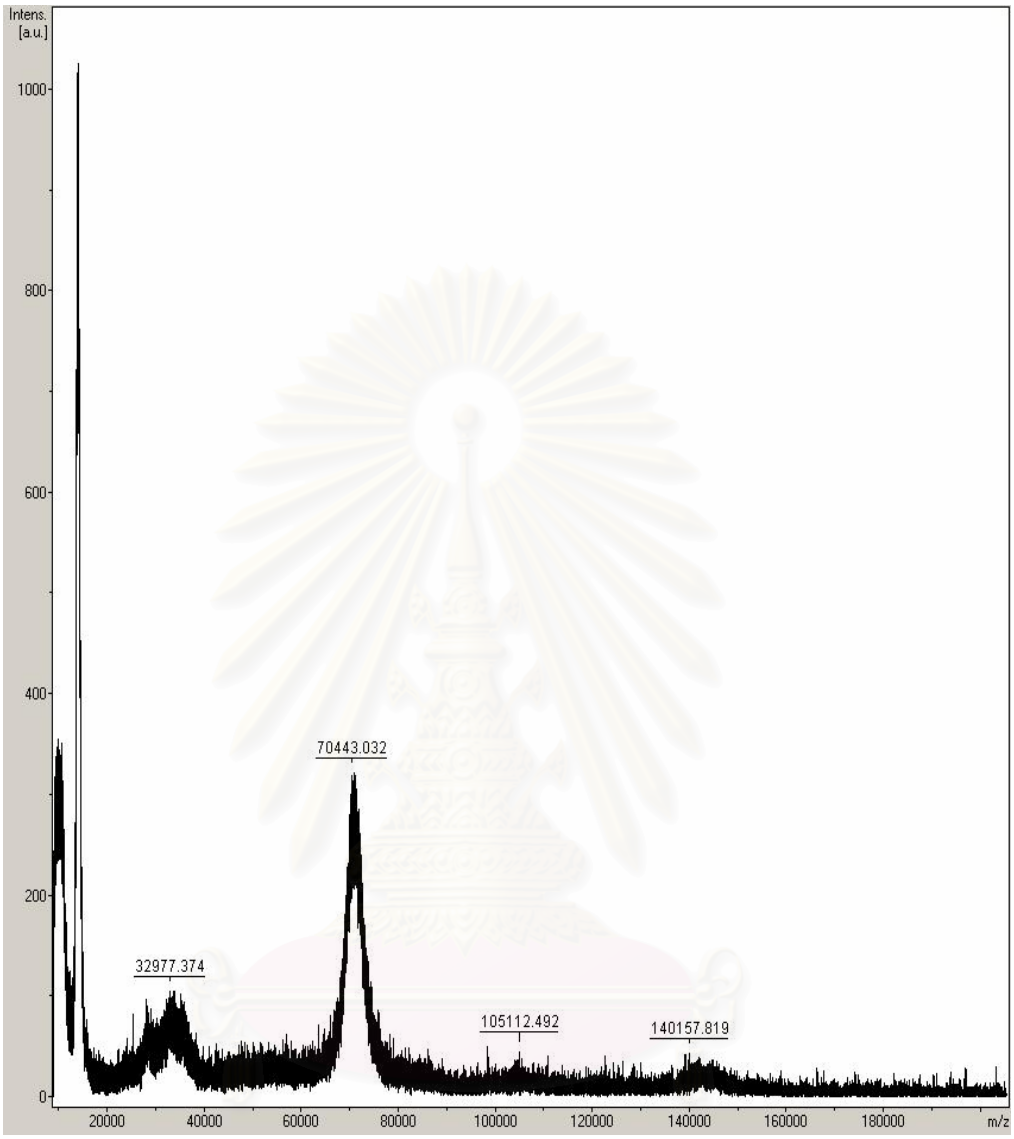
วิธีหนึ่งในการตรวจสอบผลของการเชื่อมต่อคลอแรมเฟนิคอลเข้ากับ BSA คือการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารเชื่อมต่อที่ได้ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ไม่ได้ทำการเชื่อม ซึ่งสามารถวัดได้โดยอาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS ผลการวิเคราะห์ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อมีค่าเท่ากับ 66,600 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของ BSA หลังการเชื่อมต่อมีค่าเท่ากับ 70,443 ดาลตัน (รูปที่ 4.1 และ 4.2) แสดงว่า คลอแรมเฟนิคอลเชื่อมติดกับ BSA จริง นอกจากนี้สามารถคำนวณหาอัตราส่วนโมลของคลอแรมเฟนิคอลต่อ BSA ได้ เมื่อทราบน้ำหนักโมเลกุลของคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตซึ่งมีค่าเท่ากับ 445.2 ดาลตัน ดังนั้นจึงคิดเป็นอัตราส่วนโมลของคลอแรมเฟนิคอลต่อ BSA เท่ากับ 8.6 ต่อ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อนการเชื่อมต่อ โดยวิธี MALDI-TOF MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA หลังการเชื่อมต่อ โดยวิธี MALDI-TOF MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ได้ทำการหลอมรวมไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งมีทั้งหมด 97 โคลน โดยที่โคลนทั้งหมดมาจากเซลล์ต้นแบบเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกให้เหลือเพียง 8 โคลนเพื่อนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป โดยคัดเลือกจากวิธี indirect ELISA ซึ่งพิจารณาจากการที่ไฮบริโดมาสามารถสร้างแอนติบอดีที่จับกับสารคลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับ BSA (CAP-BSA) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรสูง แต่ไม่จับกับ BSA ซึ่งเป็นโปรตีนพาหะ พบว่าโคลนที่คัดเลือกได้ได้แก่ โคลนที่ 27, 29, 45, 52, 59,79, 90 และ 97 ซึ่งมีรหัสไฮบริโดมาคือ 1/1C/9E12F/7G/3A, 1/1C/8A/3G/6E/12A, 1/1C/6G/4B/3F/12C, 1/1C/4B/3E/3E/6C, 1/1C/11E/9H/11D/11H, 1/1C/5D/12D/6C/6G, 1/1C/5D/8B/11B/1A, 1/1C/5A/8C/6E/4D ตามลำดับ ผลแสดงดังตารางที่ 4.2 จึงทำการเลือกไฮบริโดมานั้นมาทำการศึกษาไอโซไทป์

4.3 การตรวจหาไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

ผลการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไฮบริโดมาโคลนที่ 27, 59, 90 และ 97 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของ Immunoglobulin isotype IgG1 กับ IgG2b ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากโคลนเหล่านี้อาจเป็นพอลีโคลนซึ่งผลิตพอลีโคลนอลแอนติบอดี ส่วนโคลนที่ 29, 45 และ 52 มีไอโซไทป์เป็น IgG1 และโคลนที่ 79 มีไอโซไทป์เป็น IgG2b ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.3 ดังนั้นจึงเลือกโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 ไปศึกษาขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ Indirect ELISA ของไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล

โคลนที่	รหัสเซลล์	ค่าการดูดกลืนแสงที่492 นาโนเมตร ชนิดแอนติเจน (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		CAP-BSA	BSA
27	1/1C/9E12F/7G/3A	1.701	0.103
29	1/1C/8A/3G/6E/12A	1.322	0.065
45	1/1C/6G/4B/3F/12C	1.264	0.075
52	1/1C/4B/3E/3E/6C	1.555	0.060
59	1/1C/11E/9H/11D/11H	1.537	0.061
79	1/1C/5D/12D/6C/6G	2.905	0.098
90	1/1C/5D/8B/11B/1A	1.234	0.067
97	1/1C/5A/8C/6E/4D	1.227	0.066
C+	-	3.196	0.122
C-	-	0.060	0.157

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA

C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 การตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยชุดตรวจสอบ Isotyping kit ของบริษัท Sigma

โคลนที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร						ผลไอโซไทป์
	Immunoglobulin isotype						
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	
27	**0.586**	0.103	**0.553**	0.102	0.054	0.124	-
29	**0.571**	0.173	0.149	0.106	0.059	0.122	IgG1
45	**0.540**	0.125	0.284	0.087	0.047	0.109	IgG1
52	**0.562**	0.118	0.181	0.124	0.056	0.126	IgG1
59	**0.543**	0.099	**0.342**	0.094	0.051	0.134	-
79	0.162	0.146	**1.584**	0.095	0.047	0.126	IgG2b
90	**0.542**	0.101	**0.323**	0.092	0.053	0.127	-
97	**0.512**	0.105	**0.308**	0.089	0.081	0.107	-
ตัวควบคุมบวก (Standard IgG3)	0.154	0.313	0.471	**1.577**	0.130	0.367	IgG3
ตัวควบคุมลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์)	0.105	0.087	0.144	0.127	0.089	0.115	-

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 97 ใช้อัตราเจือจาง 1:2 เท่า

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 27, 45, 59 และ 90 ใช้อัตราเจือจาง 1:5 เท่า

โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 52 และ 79 ใช้อัตราเจือจาง 1: 10 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.4.1 ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และหาปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

จากการนำโคลนต่างๆ ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเหลือง จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้เป็นโปรตีนผสมหรือโปรตีนที่ไม่ทราบค่าคงที่ (extinction coefficient) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ดังนั้นการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีแต่ละโคลนจะใช้สูตร

ความเข้มข้นของโปรตีน = (1.55 x O.D. 280)-(0.77 x O.D. 260)

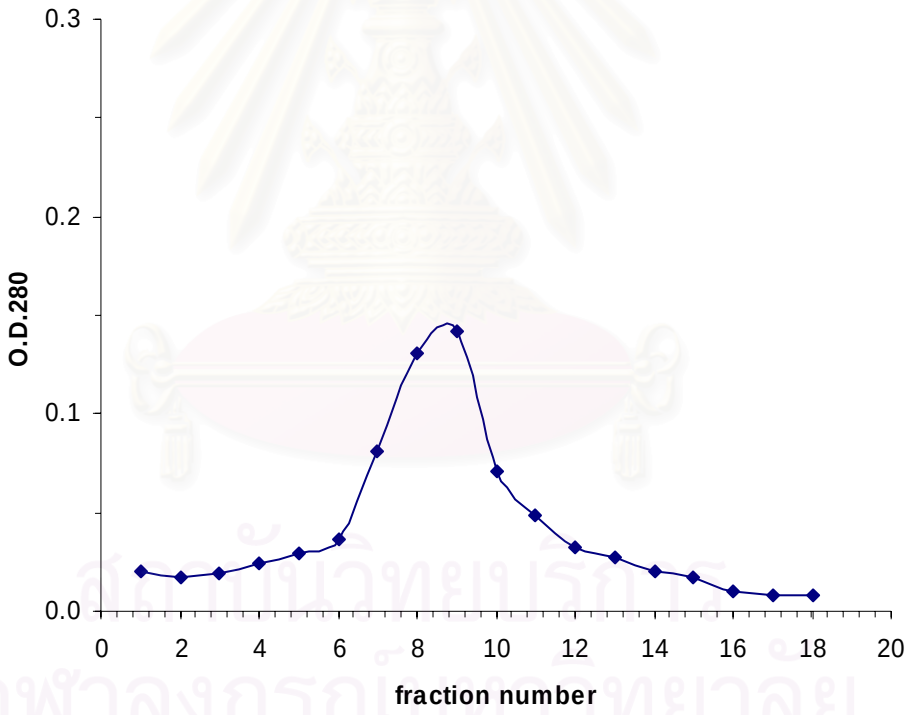
โดยผลการคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.520, 0.573, 0.585 และ 0.359 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากมีการเจือจางแอนติบอดีของโคลนที่ 29, 45 และ 52 เป็น 10 เท่า ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่แท้จริงของโคลนที่ 29, 45 และ 52 เท่ากับ 5.198, 5.734 และ 5.847 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนแอนติบอดีโคลนที่ 79 มีการเจือจาง 20 เท่า ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่แท้จริงเท่ากับ 7.173 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

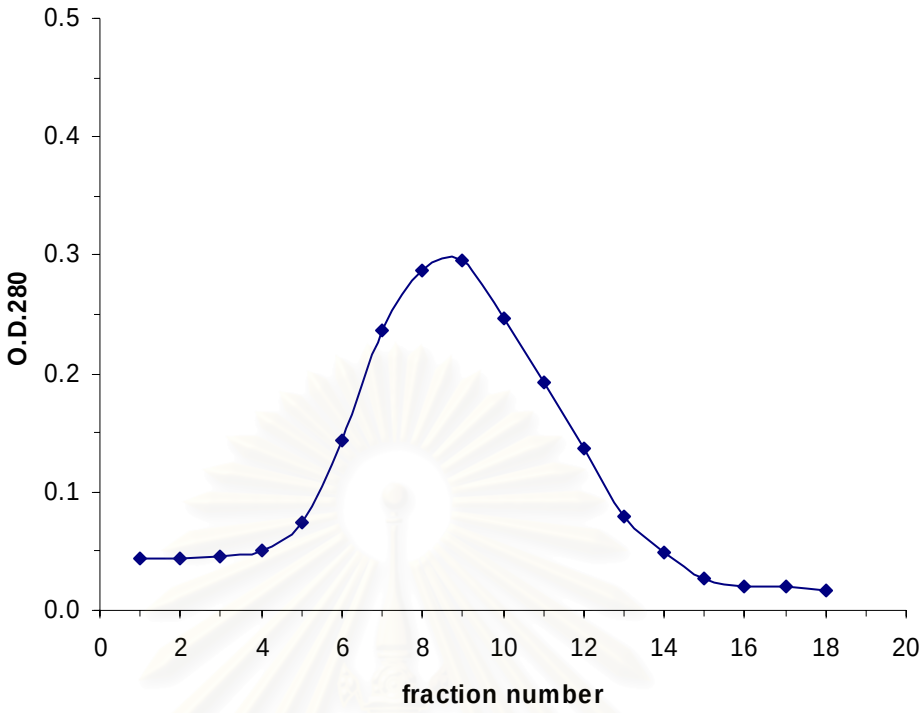
หมายเลขโคลน	การเจือจาง (เท่า)	O.D. 280	O.D.260	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)	ความเข้มข้นของโปรตีนที่แท้จริง (mg/ml)
29	10	0.701	0.736	0.520	5.198
45	10	0.744	0.753	0.573	5.734
52	10	0.799	0.849	0.585	5.847
79	20	0.445	0.430	0.359	7.173

4.4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ affinity column chromatography

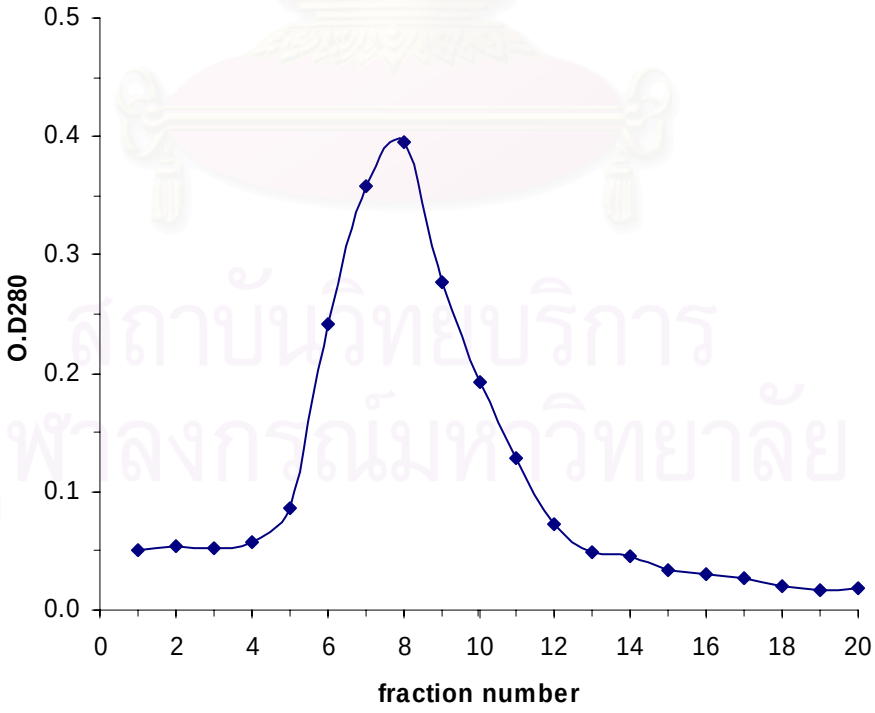
นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้โปรตีน เอ affinity column chromatography ซึ่งแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพสูงต่อโปรตีน เอ ที่ pH 8.0 โดยที่โปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับโปรตีน เอ แต่ที่ค่า pH ต่ำลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีน เอ จะลดลง ซึ่งที่ค่า pH 6 นั้นแอนติบอดีของโคลนที่ 29, 45 และ 52 ที่มีไอโซไทป์ IgG1 จะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ จึงสามารถแยกแอนติบอดีไอโซไทป์ IgG1 ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ ส่วนแอนติบอดีของโคลนที่ 79 ที่มีไอโซไทป์ IgG2b จะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ ที่ค่า pH 3.5 จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนที่ 29, 45 , 52 และ 79 ให้บริสุทธิ์ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3-4.6 ตามลำดับ จากนั้นจะนำแฟรคชันที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรสูงมารวมกัน และนำไปทำให้เข้มข้นด้วยการไดแอไลซ์ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง



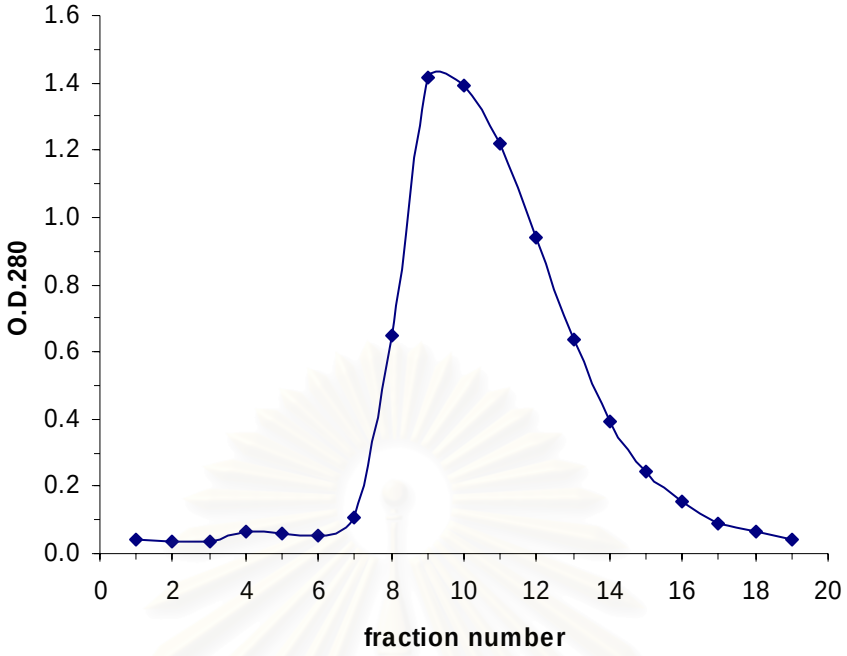
รูปที่ 4.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 45 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography



รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 52 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 79 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography

4.4.3 การวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง

จากการนำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีน เอ affinity column chromatography มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เพื่อหาความความเข้มข้นของแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ พบว่า ค่าดูดกลืนแสงของโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 เท่ากับ 0.732, 0.792, 0.773 และ 1.083 ตามลำดับ เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้เป็นโปรตีนชนิดอิมมูโนโกลบูลินจีซึ่งทราบค่าคงที่ (extinction coefficient) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรโดยมีค่าคงที่เท่ากับ 13.6 ดังนั้นการคำนวณหาปริมาณโปรตีนจะใช้สูตรการคำนวณดังนี้ (Johnson และ Thorpe, 1987)

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{ค่า Extinction coefficient ที่ 280 นาโนเมตร}} \times 10 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

โดยผลการคำนวณหาความเข้มข้นของแอนติบอดีแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 มีความเข้มข้นของแอนติบอดีเท่ากับ 0.538, 0.582, 0.575 และ 0.796 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ affinity column chromatography

หมายเลขโคลน	O.D. 280	ความเข้มข้นของโปรตีนที่หาได้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
29	0.732	0.538
45	0.792	0.582
52	0.773	0.575
79	1.083	0.796

4.5 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล

4.5.1 หาความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสม ด้วยวิธี indirect ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นมากเมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA จะทำให้เกิดสัญญาณรบกวน และ เป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดี จึงต้องหาความความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งเลือกจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่ต่ำที่สุดก่อนที่ค่าการดูดกลืนแสงจะคงที่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็นกราฟรูปที่ 4.7 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 45, 52 และ 79 เท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคลนที่ 29 เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

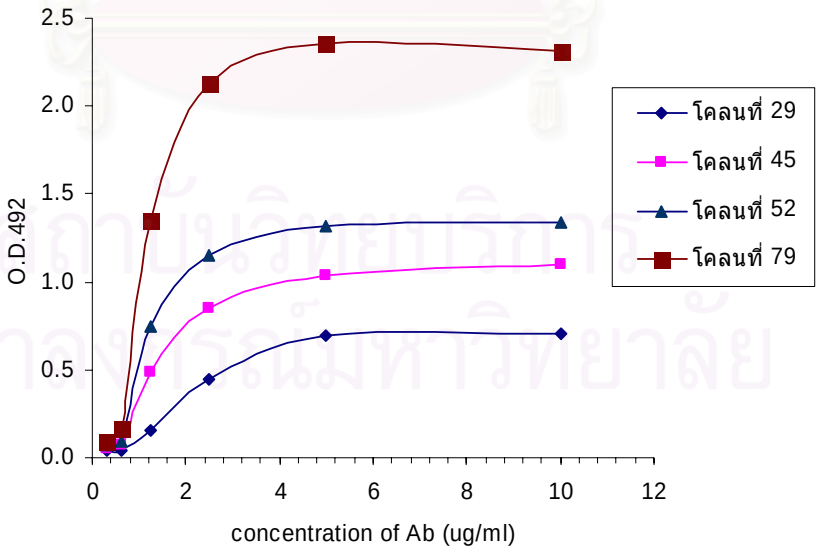
ตารางที่ 4.6 การทดสอบ Indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากทำให้เข้มข้นโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	โคลนที่			
	29	45	52	79
10	**0.709**	1.098	1.333	2.311
5	0.691	**1.034**	**1.321**	**2.350**
2.5	0.450	0.847	1.156	2.131
1.25	0.155	0.487	0.751	1.345
0.625	0.043	0.072	0.090	0.169
0.3125	0.041	0.053	0.074	0.096
C+	2.588			
C-	0.050			

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA

C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละโคลน



รูปที่ 4.7 การทดสอบ indirect ELISA สำหรับหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม

4.5.2 การทดสอบหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอพิโทปบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอล โดยวิธี indirect ELISA

จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนต่างๆที่คัดเลือกได้ ได้แก่ โคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผสมในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.2 โดยเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมแทนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสม ถ้าทดสอบแล้วพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เท่าเดิม แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีคู่นั้นจำเพาะกับตำแหน่งบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลเดียวกัน ถ้าทดสอบแล้วพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีคู่นั้นจำเพาะกับตำแหน่งบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลต่างกัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าเมื่อผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลนที่ 29 กับ 45, 29 กับ 52, 29 กับ 79, 45 กับ 52, 45 กับ 79 และ 52 กับ 79 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ใกล้เคียงหรือเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 25 ,45, 52 และ 79 ที่ไม่ได้ผสม แสดงว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 จำเพาะกับตำแหน่งบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลเดียวกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบเป็นแบบ Sandwich ELISA ได้ จึงเลือกการพัฒนาชุดตรวจสอบเป็นแบบแข่งขัน (competitive ELISA) โดยใช้หลักการของ indirect competitive ELISA คือมีการแข่งขันระหว่างคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระและคลอแรมเฟนิคอลที่เคลือบอยู่ที่ผิวในการจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอล และมีการติดตามปฏิกิริยาโดยใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีที่จำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีผสม

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร			
	หมายเลขโคลน			
หมายเลขโคลน	29	45	52	79
29	0.632	0.704	0.681	1.329
45	–	0.697	0.647	1.140
52	–	–	0.654	1.165
79	–	–	–	1.202
C+	1.579			
C-	0.054			

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA

C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

4.6 การทดสอบความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือกนั้น คัดเลือกมาจากการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA ซึ่งในการทำ indirect ELISA ไม่สามารถเคลือบคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระบนจานชนิด 96 หลุมได้โดยตรงจะต้องใช้คลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับแบบจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ จึงต้องใช้หลักการแย่งจับโดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เตรียมสารคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับแอนติบอดีโดยผสมในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2 โดยทำการเติมแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลแทนอาหารเลี้ยงเซลล์ หากแอนติบอดีสามารถจับแบบจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ จะพบว่าแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลที่ความเข้มข้นต่ำ จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโคลนที่ 79 ต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระสูงถึง 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่า โคลนที่ 79 ไม่มีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ ผลการทดสอบดัง

ตารางที่ 4.8 ส่วนโคลนอื่นๆที่คัดเลือกมาเมื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าผลการทดลองที่ได้ให้ผลในลักษณะเช่นเดียวกัน แสดงว่า แอนติบอดีที่คัดเลือกมาไม่มีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ ดังนั้นแอนติบอดีที่คัดเลือกมานั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้พัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลต้นแบบได้ จึงจำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมจากโคลน 3G305 ซึ่งมีไอโซไทป์ IgG2b จากบริษัท US Biological เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

ตารางที่ 4.8 การทดสอบ indirect competitive ELISA ของแอนติบอดีโคลนที่ 79

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร
0	1.196
0.5	1.158
1	1.176
2	1.380
4	1.132
8	1.109
16	1.271
32	1.121
64	1.227
128	1.184
256	1.102
512	1.277
C+	1.601
C-	0.046

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA

C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.7.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบจานชนิด 96 หลุม

ผลการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้สำหรับเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยวิธี indirect ELISA แสดงในตารางที่ 4.9 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้เคลือบจานชนิด 96 หลุม เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.8-1.2

ตารางที่ 4.9 ผลการทำ indirect ELISA เมื่อเคลือบแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของแอนติเจน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร		
	โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3G305 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	C+	C-
0.001	0.088	0.848	0.071
0.01	0.154	1.273	0.095
0.1	**1.211**	3.096	0.047
1	2.000	2.852	0.066
10	2.704	2.946	0.118

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA
C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน
ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าที่ให้ผลของการทดสอบที่เหมาะสม

4.7.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดี

การเลือกค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมนั้นจะเลือกที่ความเข้มข้นของแอนติบอดีน้อยที่สุดที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทำ Indirect ELISA มีค่าสูงจนถึงระดับอิ่มตัวในการทำ ELISA ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.10 ผลการทำ Indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร
0.01	0.869
0.1	0.934
1	**2.096**
2	2.525
C+	3.049
C-	0.050

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA
C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน
ค่าที่แสดงโดยตัวอักษรทึบ คือ ค่าที่ให้ผลของการทดสอบที่เหมาะสม

4.7.3 การทดสอบความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระและการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทำ indirect ELISA ไม่สามารถเคลือบคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระบนจานชนิด 96 หลุมได้โดยตรงจะต้องใช้คลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับแบบจำเพาะกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ จึงต้องใช้หลักการแย่งจับโดยวิธี indirect competitive ELISA จากผลการทดลองดังตารางที่ 4.11 พบว่า ในการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลอิสระสูงขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรลดลง เนื่องจากคลอแรมเฟนิคอลอิสระไปจับกับแอนติบอดีทำให้มีปริมาณของแอนติบอดีที่เหลือไปจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนจานชนิด 96 หลุมลดลง แสดงว่า แอนติบอดี 3G305 สามารถจับกับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระได้ เมื่อคำนวณเป็นค่า 50% inhibition concentration (IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 4.03 ได้เท่ากับ 9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.8

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับที่ไม่ใส่คลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต เมื่อหาค่า IC_{50} โดยหาจากโปรแกรม Graphpad Prism 4.03 ได้เท่ากับ 21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.9 และเมื่อคิดเป็น

เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามได้เท่ากับ 42.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามกับคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต

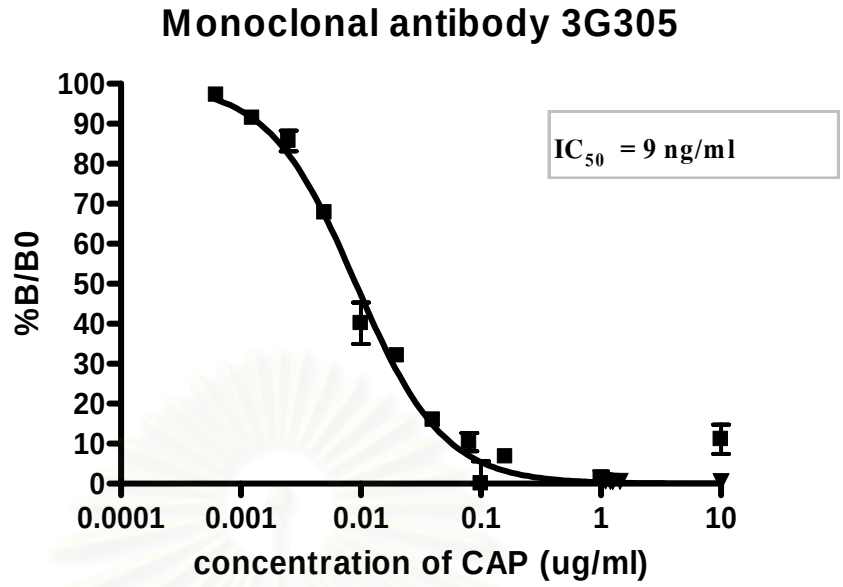
จากการทดสอบความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระและการทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต เมื่อใช้ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลหรือคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรลดลงจนถึงระดับ background ได้ อาจเป็นเพราะว่าสภาวะของการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสมเช่น อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่ม ตัวล้างที่ใช้ในการล้างจานชนิด 96 หลุม เป็นต้น ดังนั้นเมื่อนำแอนติบอดีไปใช้ในชุดตรวจสอบต้นแบบควรจะมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

ตารางที่ 4.11 การทำ Indirect ELISA จากการทดสอบหาความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลและคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต

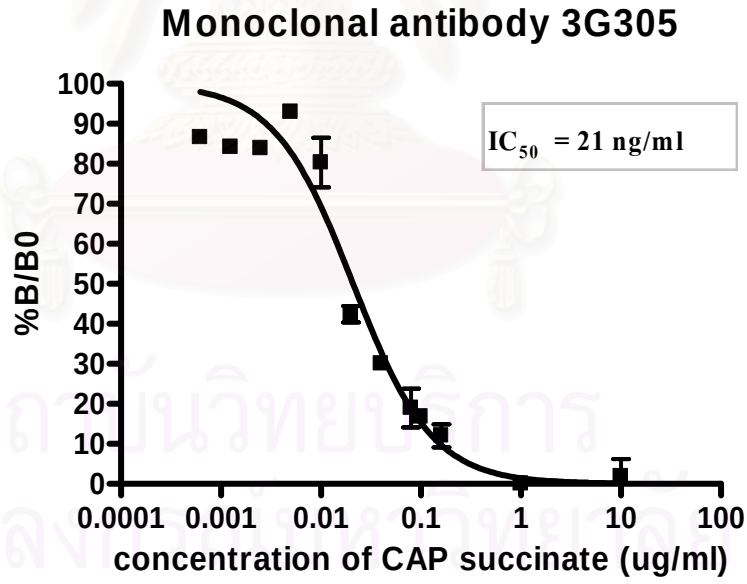
ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร	
	คลอแรมเฟนิคอล	คลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนต
0	1.425	
0.000625	1.399	1.320
0.00125	1.350	1.301
0.0025	1.300	1.298
0.005	1.143	1.370
0.01	0.900	1.270
0.02	0.830	0.972
0.04	0.688	0.875
0.08	0.640	0.788
0.1	0.549	0.771
0.16	0.608	0.734
1	0.561	0.639
10	0.646	0.654
C+	2.615	
C-	0.228	

หมายเหตุ C+ คือ ซีรัมหนูหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วย CAP-BSA

C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน



รูปที่ 4.8 กราฟหาค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3G305 ต่อคลอแรมเฟนิคอลด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปที่ 4.9 กราฟหาค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3G305 ต่อคลอแรมเฟนิคอลซัคซิเนตด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03

4.7.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์ คือ พิจารณาจากอัตราส่วนระหว่าง A_{max} ต่อ A_{min} สูง และอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นจะให้ค่า IC_{50} ต่ำ (Jae Koo Lee และคณะ, 2001) จากตารางที่ 4.12 พบว่าการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) จะทำให้มีอัตราส่วนระหว่าง A_{max} ต่อ A_{min} สูง และให้ค่า IC_{50} ต่ำ ดังนั้นในการพัฒนาชุดตรวจสอบจะใช้อุณหภูมิห้องในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์

ตารางที่ 4.12 ผลของอุณหภูมิในการบ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอลและ แอนติบอดีทุติยภูมิ ต่อการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี indirect competitive ELISA

อุณหภูมิของการบ่ม*	A_{max} (A)	IC_{50} (ng/ml) (B)	A_{min} (C)	A/C
37,37	2.523	19.41	0.100	25.2
37,RT	2.368	16.31	0.071	33.4
RT,RT	2.585	16.75	0.066	39.2
RT,37	2.729	19.48	0.090	30.3

หมายเหตุ * อุณหภูมิตัวแรก คือ อุณหภูมิที่ใช้บ่มแอนติบอดีที่ผสมกับคลอแรมเฟนิคอล
* อุณหภูมิตัวที่สอง คือ อุณหภูมิที่ใช้บ่มแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมกับเอนไซม์
RT คือ อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส)

4.7.5 ศึกษาผลกระทบของการล้างด้วย PBS ที่มีและไม่มี Tween 20

Tween 20 เป็นตัวล้างที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) ทำให้ไม่มีการรบกวนปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แต่ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยา hydrophobic ระหว่างโปรตีนที่เติมลงไปใหม่กับผิววัสดุที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดี และไม่เกิดการทำลายการยึดจับแบบ hydrophobic ระหว่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีอยู่ก่อนแล้ว ดังนั้น Tween 20 จะเป็นตัวป้องกันการเกิดการยึดจับของโปรตีนอื่นกับผิววัสดุอย่างไม่จำเพาะในขั้นตอนต่อไปด้วย (นภาธร, 2536) ในการทำ ELISA มีการใช้ Tween 20 ในการล้างเพื่อลดการจับแบบไม่จำเพาะและเพื่อเพิ่ม

ความไวของชุดตรวจสอบ ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกตัวล้างที่มีหรือไม่มี Tween 20 ในการล้างจานชนิด 96 หลุม คือ ให้ background ของการทำ ELISA ต่ำ และมีอัตราส่วนระหว่าง A_{max} ต่อ A_{min} สูง จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.13 พบว่าเมื่อใช้ตัวล้างที่มี 0.05% Tween 20 จะให้ค่า background ต่ำ และ มีอัตราส่วนระหว่าง A_{max} ต่อ A_{min} สูง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบจะใช้ตัวล้างที่มี 0.05% Tween 20 เพื่อลดการจับแบบไม่จำเพาะเจาะจงและเพิ่มความไวของชุดตรวจสอบ

ตารางที่ 4.13 ผลของ Tween 20 ต่อความไวของการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี ELISA

Tween 20 (%)	A_{max} (A)	IC_{50} (ng/ml) (B)	A_{min} (C)	A/C
0	2.118	9.599	0.156	13.6
0.05	2.117	9.759	0.007	302.4

4.7.6 สร้างกราฟมาตรฐานชุดตรวจสอบต้นแบบโดยวิธี indirect competitive ELISA

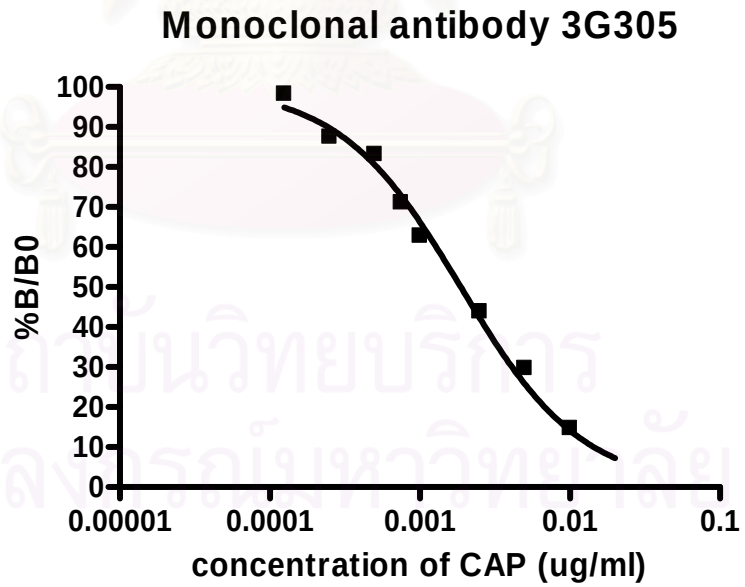
จากการทดสอบโดยวิธี Indirect competitive ELISA ตามขั้นตอน 3.3.7.7 ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงในตารางผนวกที่ ก.2 จากนั้นนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง ค่า $\%B/B_0$ และค่า SD ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.14 และนำข้อมูลมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแกน Y เป็น $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Indirect competitive ELISA ที่มีคลอแรมเฟนิคอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Indirect competitive ELISAที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งกราฟที่สร้างได้แสดงดังรูปที่ 4.10 จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่ทำให้สามารถสร้างกราฟเส้นตรง พบว่า ช่วงความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่จะนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน คือช่วง 0.5 - 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (0.0005-0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งกราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

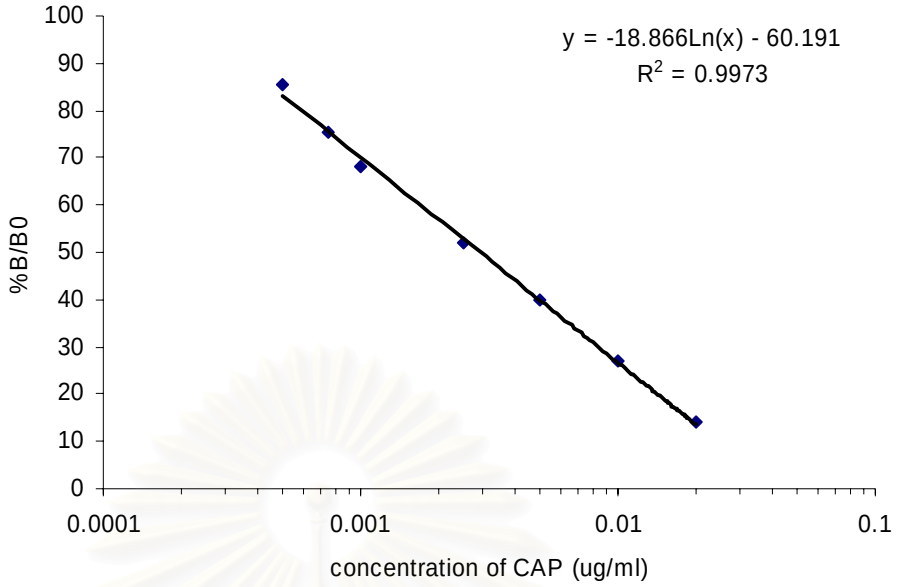
ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ค่า $\%B/B_0$ และค่าความเบี่ยงเบนที่ได้จากการทำ indirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	O.D.492	$\%B/B_0$	SD
0	1.304	100.00	0.033
0.5	1.116	85.57	0.051
0.75	0.982	75.29	0.071
1	0.888	68.13	0.041
2.5	0.677	51.91	0.042
5	0.518	39.74	0.024
10	0.350	26.88	0.038
20	0.186	14.29	0.031

โดยที่ $\%B/B_0$ คือ อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีคลอแรมเฟนิคอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล



รูปที่ 4.10 กราฟหาช่วงความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่เหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03



รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี Indirect competitive ELISA

4.7.7 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.7.7.1 การหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

จากการทดสอบโดยวิธี Indirect competitive ELISA ตามขั้นตอน 3.3.7.7 ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงในตารางผนวกที่ ก.2 เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟเส้นตรงเมื่อให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง จะสร้างกราฟได้ดังรูปที่ 4.12 ซึ่งมีสมการเส้นตรงคือ $y = -0.246Ln(x) - 0.7848$ จากนั้นทำการค่าความไวของชุดตรวจสอบ ซึ่งหาได้จากการนำค่า B_0 20 ค่า จากข้อมูลในตารางที่ 4.15 มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสมการ

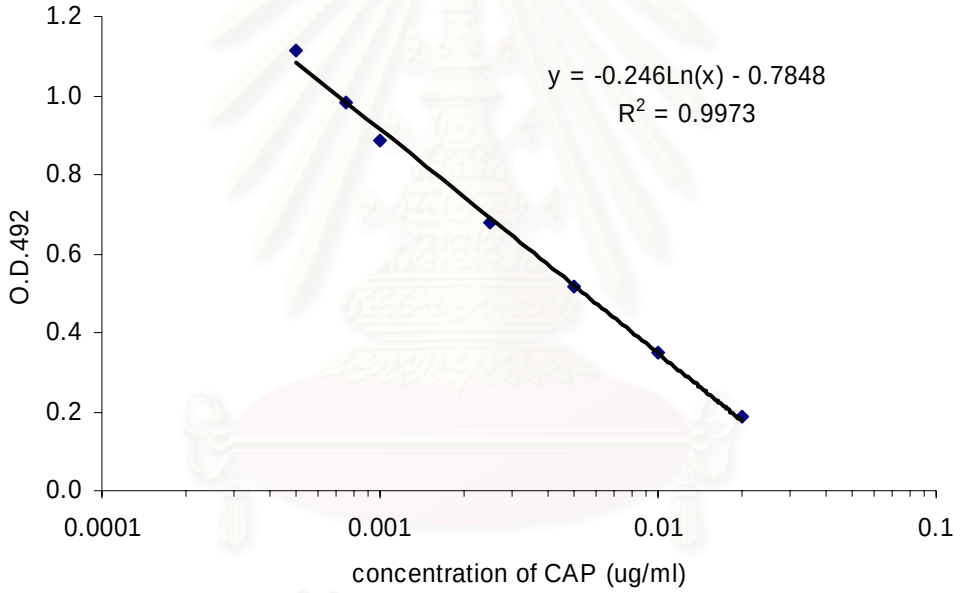
ความไว (LOD) = $B_0 - 3SD$

ความไว (LOQ) = $B_0 - 10SD$

ซึ่งค่า LOD และ LOQ ที่ได้นี้ยังเป็นค่าการดูดกลืนแสง จึงต้องนำไปแปลงเป็นความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาได้จากสมการเส้นตรงของกราฟรูปที่ 4.12 พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความไวหรือสามารถวัดปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลต่ำที่สุดเท่ากับ 0.31 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถวัดปริมาณของคลอแรมเฟนิคอลต่ำที่สุดอย่างถูกต้องเท่ากับ 0.78 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.15 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี Indirect competitive ELISA เพื่อใช้หาค่า LOD ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่ไม่มีคลอแรมเฟนิคอล (B_0) (n=20)				Mean	SD	3SD	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1.336	1.294	1.251	1.332	1.304	0.033	0.099	0.31	0.78
1.328	1.285	1.293	1.299					
1.382	1.296	1.358	1.301					
1.287	1.283	1.331	1.305					
1.261	1.259	1.295	1.302					



รูปที่ 4.12 กราฟเส้นตรงที่นำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี Indirect competitive ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.7.2 ค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

การทำ intra-assay จากการทดสอบโดยวิธี Indirect competitive ELISA ตามขั้นตอน 3.3.7.7 ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงในตารางผนวกที่ ก.2 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient variation; %CV) ของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จาก $\%CV = \frac{SD}{mean} \times 100$ โดยที่ mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยวิธี Indirect competitive ELISA เมื่อมีคลอแรมเฟนิคอลและไม่มีคลอแรมเฟนิคอล และ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 2.5 - 16.4% ส่วน inter-assay จะนำข้อมูลที่ได้จากการทำ Indirect competitive ELISA จากตารางผนวกที่ ก.3-ก.6 มาทำการคำนวณหา %CV ซึ่งให้ค่าอยู่ในช่วง 3.5 - 22.9% ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ค่าความแม่นยำ (intra-assay, inter-assay) ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ug/ml)	intra-assay (n=20)			inter-assay (N=4)		
	Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
0	1.304	0.033	2.5	1.295	0.045	3.5
0.0005	1.116	0.051	4.6	1.202	0.094	7.8
0.00075	0.982	0.071	7.2	1.074	0.096	8.9
0.001	0.888	0.041	4.6	0.983	0.096	9.7
0.0025	0.677	0.042	6.2	0.670	0.054	8.0
0.005	0.518	0.024	4.7	0.550	0.037	6.8
0.01	0.350	0.038	10.9	0.394	0.027	7.0
0.02	0.186	0.031	16.4	0.243	0.056	22.9

หมายเหตุ Mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

n คือ จำนวนซ้ำของการทดลอง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยแต่ละครั้งทำ 5 ซ้ำ

4.7.7.3 หาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบตรวจหาปริมาณคลอแรมเฟนิคอลที่มีอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 1.2 , 3 และ 6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลจากรูปผนวกที่ ก.2 พบว่า % Recovery ที่ได้เท่ากับ 114, 100 และ 103 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.17 ซึ่งจากค่า % Recovery ที่ได้นั้นควรอยู่ในช่วง 80-120% (Krotzky and Seeh, 1995) แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถที่จะตรวจวัดสารคลอแรมเฟนิคอลที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ได้

เมื่อทำการเติมสารคลอแรมเฟนิคอลลงในเนื้อกุ้งให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2, 5.33 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท พบว่า ค่าเฉลี่ยของ % Recovery ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ ชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย และ LC-MS-MS ได้เท่ากับ 97, 101 และ 94 ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.18, 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การวัดปริมาณคลอแรมเฟนิคอลในตัวอย่างกุ้งด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบหรือชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายหรือวิธี LC-MS-MS จะให้ผลถูกต้องใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผลที่ต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ต่างกัน กล่าวคือ หลังจากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทแล้ว ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วย ELISA นั้นจะทำการขจัดไขมันออกด้วยสารละลายผสมของไอโซออกเทนกับคลอโรฟอร์มและสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งคลอแรมเฟนิคอลจะอยู่ในส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ ในขณะที่ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS-MS นั้น จะทำการขจัดไขมันด้วยสารละลายผสมของ 75% เมทานอลและเฮกเซน โดยปราศจากสารละลายบัฟเฟอร์ ทั้งนี้เมื่อนำตัวอย่างที่เตรียมได้จากการสกัดสำหรับนำไปทดสอบด้วยวิธี LC-MS-MS มาทดสอบด้วยวิธี ELISA แทนนั้น พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของตัวอย่างที่สกัดได้ที่ไม่มีการเติมคลอแรมเฟนิคอลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมากทั้งๆที่ความเป็นจริงต้องได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการขจัดไขมันออกจากเนื้อกุ้ง (75% เมทานอล, เฮกเซน) มีผลต่อการทำ ELISA ดังนั้นในการหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างหลังการขจัดไขมันด้วย 75% เมทานอลและเฮกเซน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS-MS อีกส่วนนำมาระเหยให้แห้งและเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

ตารางที่ 4.17 ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอลที่วิเคราะห์ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ เมื่อมีการเติมคลอแรมเฟนิคอลลงไปใน PBS (n=6)

ความเข้มข้นของ CAP ที่เติมลงไปใน PBS (ng/ml)	O.D.492	$\%B/B_0$	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ความเข้มข้นคลอแรมเฟนิคอลที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	% Recovery
1.2	0.735	77.73	0.023	1.37	114
3	0.593	62.70	0.016	3.01	100
6	0.462	48.89	0.057	6.20	103
				ค่าเฉลี่ย	106

หมายเหตุ

ตัวควบคุมลบ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรเท่ากับ 0.858

ตารางที่ 4.18 ค่า % Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=6)

ความเข้มข้นของ CAP ที่เติมลงไป (ng/ml)	การเจือจาง	O.D.492	$\%B/B_0$	SD	[CAP] ที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	[CAP] ที่วิเคราะห์ได้โดยเฉลี่ย (ng/ml)	%Recovery
0	ไม่เจือจาง	0.930	100.00	0.003	0	0	-
2	ไม่เจือจาง	0.672	72.30	0.018	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	91 ± 14
5.33	ไม่เจือจาง	0.488	52.45	0.008	5.1 ± 0.3	5.0 ± 1.2	95 ± 21
	1 ต่อ 2	0.618	66.43	0.028	4.9 ± 1.1		
10	ไม่เจือจาง	0.378	40.61	0.026	9.6 ± 2.0	10.4 ± 2.8	104 ± 28
	1 ต่อ 2	0.472	50.78	0.010	11.2 ± 0.8		
						ค่าเฉลี่ย	97 ± 21

ตารางที่ 4.19 ค่า % Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย (n=2)

ความเข้มข้นของ CAP ที่เติมลงไป (ng/ml)	[CAP] ที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery
0	0	-
2	2.18 ± 0.2	109 ± 10
5.33	5.22 ± 0.8	98 ± 15
10	9.67 ± 1.5	97 ± 15
	ค่าเฉลี่ย	101 ± 13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ค่า %Recovery ที่ได้จากการตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งด้วยวิธี LC-MS-MS

ความเข้มข้นของ CAP ที่เติมลงไป (ng/ml)	[CAP] ที่วิเคราะห์ได้ (ng/ml)	%Recovery
0	0	-
2	1.84	92
5.33	5.39	101
10	9.02	90
	ค่าเฉลี่ย	94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

หลังจากทำการเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลเข้ากับ BSA แล้วคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนของคลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมกับ BSA ได้เท่ากับ 4.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบด้วยวิธี MALDI-TOF MS พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ BSA ที่ได้ เท่ากับ 66,600.346 และน้ำหนักโมเลกุลของคลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมติดกับ BSA ที่ได้ เท่ากับ 70443.032 ดังนั้นคิดเป็นอัตราส่วนที่เชื่อมติดระหว่างคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA (CAP : BSA) เท่ากับ 8.6 : 1

จากการคัดเลือกไฮบริโดมาที่ได้จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จำนวน 8 โคลน มาทำการศึกษาไอโซไทป์ของแอนติบอดี พบว่ามี 4 โคลนเป็นโมโนโคลน คือ โคลนที่ 29, 45, 52 และ79 โดยโคลนที่ 29, 45 และ 52 ผลิตแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ส่วนโคลนที่ 79 ผลิตแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์เป็น IgG2b

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 มาทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและวัดปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 5.198, 5.734, 5.847 และ 7.173 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29, 45, 52 และ 79 มาทำให้บริสุทธิ์โดยโปรตีนเอและวัดปริมาณแอนติบอดีได้เท่ากับ 0.538, 0.582, 0.575 และ 0.796 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดสอบความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลของโคลนที่ 29, 45, 52 และ79 โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าทุกโคลนมีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลคลอแรมเฟนิคอลเดียวกันจึงไม่สามารถพัฒนาชุดตรวจสอบที่เป็นแบบ sandwich ELISA ได้ ดังนั้นจึงเลือกการพัฒนาชุดตรวจสอบเป็นแบบ indirect competitive ELISA

ทำการเลือกโคลนที่ 79 มาทดสอบความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ พบว่าโคลนที่ 79 ไม่มีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระ ดังนั้นแอนติบอดีที่คัดเลือกมาจึงไม่สามารถนำมาใช้พัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ซื้อมาจากบริษัท US Biological ซึ่งเตรียมจากโคลน 3G305 และมีไอโซไทป์ IgG2b เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสำหรับเตรียมชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลโดยวิธี Indirect competitive ELISA พบว่าเท่ากับ 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มแอนติบอดีกับคลอแรมเฟนิคอลและ

แอนติบอดีทุติยภูมิ คือ ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) ซึ่งสะดวกต่อการใช้งาน ในการล้างจานชนิด 96 หลุมควรใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 0.05% Tween 20 เนื่องจากจะลด background ให้ต่ำลง ช่วงของการตรวจสอบอยู่ระหว่าง 0.3-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจสอบนี้มีความไวหรือตรวจคลอแรมเฟนิคอลปริมาณต่ำสุดได้เท่ากับ 0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจคลอแรมเฟนิคอลปริมาณต่ำสุดได้อย่างถูกต้องเท่ากับ 0.78 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra-assay และ inter-assay อยู่ในช่วง 2.5-16.4% และ 3.5-22.9% ค่าเฉลี่ยของ % Recovery ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย และ LC-MS-MS เท่ากับ 97, 101 และ 94 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยของ % Recovery ของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายและวิธี LC-MS-MS ดังนั้นชุดตรวจสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA นี้สามารถที่จะนำไปใช้ตรวจสอบหาคลอแรมเฟนิคอลได้โดยใช้การสกัดตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลได้

เมื่อเปรียบเทียบช่วงการทดสอบของชุดตรวจสอบต้นแบบ (0.3-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) กับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย (0.02-2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จะเห็นว่าช่วงการทดสอบของชุดตรวจสอบต้นแบบนั้นสูงกว่าชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย ดังนั้นหากต้องการพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลให้ได้ช่วงการทดสอบใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายนั้นควรที่จะผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลให้มีความสามารถในการจับคลอแรมเฟนิคอลในรูปอิสระในความเข้มข้นต่ำๆได้ และหากต้องการให้ชุดตรวจสอบมีความจำเพาะต่อคลอแรมเฟนิคอลมากขึ้นควรที่จะผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มาจากต้นกำเนิดต่างกันอย่างน้อย 2 เซลล์ เพื่อที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอลในแบบ Sandwich ELISA ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ไซแอนติฟิกซัพพลาย. คู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบคลอแรมเฟนิคอล. Euro Diagnostica B.V.: Netherlands.

ธารารัชต์ ธารากุล. (2545). ชุดตรวจสอบวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน. ครั้งที่ 1. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

นภาธร บานชื่น. (2536). ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. ครั้งที่ 2. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ลิลา เรืองแป้น. ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. วารสารการประมง 55 (พฤษภาคม-มิถุนายน): 54-58.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. (2537). อิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุวรรณา เหลืองชลธาร. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะโดยวิธีเคมี เล่ม 4 ยาในกลุ่มคลอแรมเฟนิคอลและแมกโครไซคลินแลคโตน. (ม.ป.ท., ม.ป.ป.)

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. ปัญหาคลอแรมฟีนิคอลกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. Aquaculture Asia Vol.7 No.1 (January-March 2002): 51-54.

ภาษาอังกฤษ

2003/181/EC. (2003). Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as reguard the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for contain residues in food of animal origin, Official J. L71 17.

Bart, Q.R. (1984). Isolation and Characterization of Chloromycetin. Journal of Biology Chemistry 172: 445-450.

Bogard, W.C., Dean, R.T., Deo, Y., Fuchs, R., Mattis, J.A., McLean, A.A., Berger, H.J. (1989). Practical considerations in the production, purification, and formulation of monoclonal antibody for immunoscintigraphy and immunotherapy. Seminars in Nuclear Medicine, 19: 202-220.

Bogusz, M.J., Hussan, H., Enazi, E.A., Ibrahim, Z., Tufail, M.A. (2004). Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 807: 343-356.

Cambell, A.M. (1984). Monoclonal antibody technology. Elsevier Science, Netherland.

Cambell, G.S., Mageau, R.P., Schwab, B., Johnston, R.W. (1984). Detection and Quantitation of chloramphenicol by competitive Enzymed-link immunoassay. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 25 (2): 205-211.

Cazemier, G., Haasnoot, W., Stouten, P. (1996). Screening of chloramphenicol in urine, tissue, milk and eggs in consequence of the prohibitive regulation, in Proceeding of euroresidue III. In Haagsma, N., and Ruiter, A. (eds.), Conference on veterinary drug residues in Food, pp. 315-319. Veldhoven: The Netherlands.

Connolly, L., Fodey, T.L., Crooks, S.R.H., Delahaut, P. (2002). The production and characterization of dinitrocarbanilide antibodies raised using antigen mimics. Journal of Immunological Methods 264: 45-51.

EEC. (1993). Official Journal of the European Community, Commission Decision (EEC) No. 93/256, L 118/64 of 14 April 1993.

Guadin, V., and Maris, P. (2001). Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk. Food and Agricultural Immunology 13:77-86.

Hudson, L., Hay, F.C. (1980). Practical Immunology. Blackwell Scientific plublication, London.

Johnstone, A., and Thrope, R. (1987). Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publication, England.

Krotzky, A.J., Zeeh, B. (1995). Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: Proposed guidelines for precision, standardization and quality control. Pure And Applied Chemistry 67: 2065-2088.

Lee, J.K., Ahn, K.C., Park, O.S., Kang, S.Y., Hammock, B.D. (2001). Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide Imidaclopid in agricultural and environmental. Journal of Agricultural Food Chemistry 49: 2159-2167.

Mamenta, E.L., Scholz-Steele, M., and Schmidt, R.C. (1996). Development of a microlitter-based enzyme immunoassay (EZ-Quant chloramphenicol) for the quantitation of chloramphenicol residue in animal urine, tissue and milk, in Proceeding of Euroresidue III. In Haagsma, N., and Ruiter, A. (eds.), Conference on Veterinary Drug Residues in Food, pp. 680-684. Veldhoven: The Netherlands.

Official Journal of the European Union L 71/17,15 March 2003.

Shan, G., Lipton, C., Gee, S.J., and Hammock B.D. (2002). Immunoassay, biosensors and other nonchromatographic methods. In Lee, P.W. (ed.), Hapten conjugation, pp.639-644. Chichester: John Wiley & Sons.

Shen, H.Y., Jiang, H.L. (2005). Screening,determination and confirmation of chloramphenicol on seafood, meet and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-EDC, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. Analytica Chimica Acta 535: 33-41.

Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. Journal of Clinical Pathology 37: 507.

World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1988). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO Food Additives Series No 23, Geneva.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

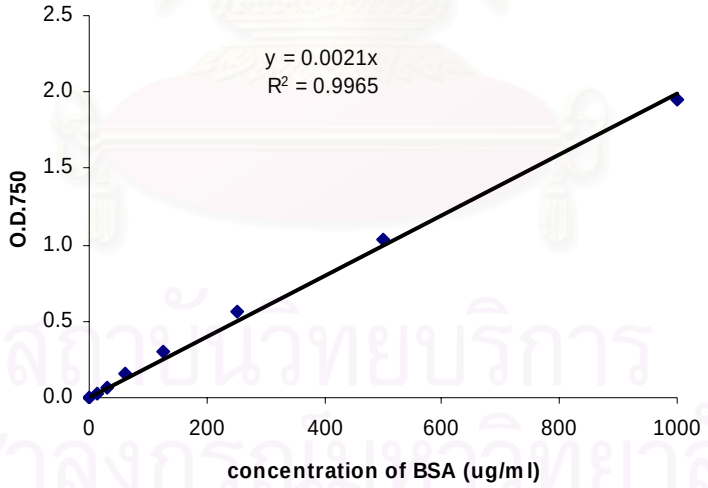
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ความเข้มข้นของโปรตีน BSA มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	O.D.750
0	0.000
15.125	0.025
31.25	0.064
62.5	0.152
125	0.297
250	0.567
500	1.037
1000	1.950



รูปผนวกที่ ก.1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA สำหรับหาค่า intra-assay

จำนวนซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร									
	ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)									
	0	0.000125	0.00025	0.0005	0.00075	0.001	0.0025	0.005	0.01	0.02
1	1.336	1.252	1.184	1.115	0.928	0.922	0.601	0.517	0.396	0.126
2	1.328	1.281	1.134	1.099	0.961	0.932	0.623	0.494	0.352	0.121
3	1.382	1.235	1.064	1.081	0.958	0.884	0.653	0.517	0.397	0.190
4	1.287	1.284	1.079	1.008	0.945	0.908	0.626	0.471	0.394	0.184
5	1.261	1.217	1.155	1.012	0.820	0.843	0.719	0.561	0.311	0.185
6	1.294	1.220	1.144	1.121	0.979	0.942	0.715	0.511	0.322	0.145
7	1.285	1.250	1.195	1.179	0.958	0.923	0.696	0.514	0.335	0.218
8	1.296	1.130	1.219	1.109	0.953	0.913	0.655	0.522	0.322	0.212
9	1.283	1.268	1.212	1.185	0.986	0.915	0.680	0.542	0.345	0.205
10	1.259	1.274	1.270	1.129	0.992	0.846	0.676	0.510	0.336	0.221
11	1.251	1.264	1.134	1.175	0.932	0.813	0.690	0.515	0.291	0.193
12	1.293	1.352	1.167	1.075	1.170	0.834	0.732	0.503	0.314	0.172
13	1.358	1.324	1.231	1.124	0.952	0.931	0.631	0.485	0.391	0.152
14	1.331	1.310	1.148	1.125	1.086	0.892	0.742	0.497	0.356	0.193
15	1.295	1.375	1.149	1.105	1.014	0.915	0.725	0.513	0.314	0.206
16	1.332	1.379	1.210	1.103	0.917	0.919	0.728	0.536	0.319	0.175
17	1.299	1.339	1.146	1.091	1.015	0.887	0.687	0.527	0.396	0.196
18	1.301	1.323	1.110	1.117	0.995	0.836	0.639	0.531	0.313	0.198
19	1.305	1.294	1.188	1.146	1.046	0.822	0.642	0.521	0.392	0.197
20	1.302	1.327	1.161	1.217	1.026	0.889	0.678	0.577	0.413	0.237
ค่าเฉลี่ย	1.304	1.285	1.165	1.116	0.982	0.888	0.677	0.518	0.350	0.186
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.033	0.060	0.050	0.051	0.071	0.041	0.042	0.024	0.038	0.031

ตารางผนวกที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 1 สำหรับหาค่า inter-assay

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร				
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3	4	5
0	1.336	1.328	1.382	1.287	1.261
0.000125	1.252	1.281	1.235	1.284	1.217
0.00025	1.184	1.134	1.064	1.079	1.155
0.0005	1.115	1.099	1.081	1.008	1.012
0.00075	0.928	0.961	0.958	0.945	0.820
0.001	0.922	0.932	0.884	0.908	0.843
0.0025	0.6	0.623	0.653	0.626	0.719
0.005	0.517	0.494	0.517	0.471	0.561
0.01	0.396	0.352	0.397	0.394	0.311
0.02	0.126	0.121	0.19	0.184	0.185

ตารางผนวกที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 2 สำหรับหาค่า inter-assay

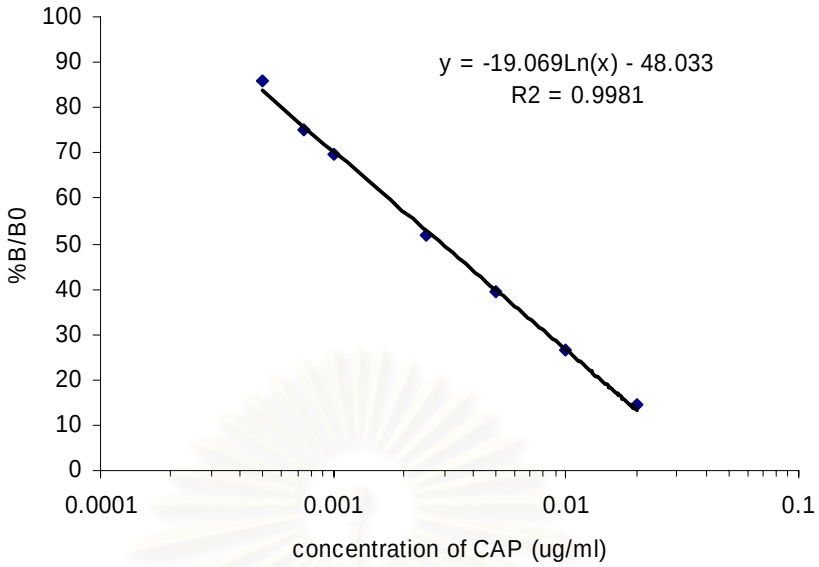
ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร				
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3	4	5
0	1.358	1.331	1.295	1.332	1.351
0.000125	1.244	1.291	1.225	1.279	1.371
0.00025	1.274	1.317	1.215	1.295	1.287
0.0005	1.250	1.303	1.291	1.317	1.304
0.00075	1.129	1.110	1.146	1.132	1.121
0.001	1.075	1.119	1.087	1.136	1.148
0.0025	0.628	0.738	0.643	0.664	0.764
0.005	0.577	0.567	0.585	0.571	0.562
0.01	0.413	0.403	0.411	0.412	0.404
0.02	0.237	0.271	0.291	0.268	0.273

ตารางผนวกที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 3 สำหรับหาค่า inter-assay

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร				
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3	4	5
0	1.283	1.259	1.251	1.222	1.207
0.000125	1.168	1.174	1.164	1.152	1.130
0.00025	1.201	1.189	1.202	1.186	1.184
0.0005	1.275	1.275	1.249	1.257	1.218
0.00075	1.134	1.167	1.131	1.148	1.108
0.001	1.013	1.034	1.031	1.022	0.993
0.0025	0.728	0.744	0.739	0.702	0.703
0.005	0.536	0.527	0.531	0.521	0.518
0.01	0.370	0.396	0.389	0.392	0.365
0.02	0.275	0.310	0.298	0.307	0.296

ตารางผนวกที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ของการทำ Indirect competitive ELISA ครั้งที่ 4 สำหรับหาค่า inter-assay

ความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร				
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3	4	5
0	1.287	1.261	1.294	1.285	1.296
0.000125	1.184	1.117	1.136	1.150	1.167
0.00025	1.179	1.058	1.106	1.055	1.092
0.0005	1.221	1.179	1.209	1.185	1.190
0.00075	1.144	1.095	1.119	1.112	1.070
0.001	0.942	0.903	0.913	0.915	0.846
0.0025	0.592	0.641	0.631	0.642	0.625
0.005	0.600	0.603	0.585	0.597	0.553
0.01	0.401	0.428	0.419	0.422	0.414
0.02	0.233	0.242	0.252	0.253	0.246



รูปผนวกที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของคลอแรมเฟนิคอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การตรวจคลอแรมเฟนิคอลโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบ

วิธีการทดสอบ

1. เคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน (CAP-BSA) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 12-24 ชั่วโมง
2. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง
3. เติมสารละลาย 5% นมพร่องมันเนย หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง
5. เติมแอนติบอดีที่ผสมกับสารตัวอย่างหรือคลอแรมเฟนิคอลมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (V/V) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) 1 ชั่วโมง
6. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง
7. เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:10000 ใน 1% BSA ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
8. ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง
9. เติมสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที
10. เติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
11. วัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมสาร

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer (Stock reagent)

   ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

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

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	19	ลิตร
0.01% Thimerosal	20	มิลลิลิตร

   ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกรองสารละลาย แล้วเก็บใส่ถังสีขาว

3. PBS-Tween 20; PBS-T (ใช้ Tween20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween20	250	ไมโครลิตร
PBS	500	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อ Mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

   ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

5. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

   Na_2HPO_4 11.9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   Citric acid 7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

6. Substrate OPD

O-phenylenediamine	0.04	กรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer, pH 5.0	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจะเกิดความร้อน ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะใช้ผสม 20% FCS

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้การเชื่อมคลอแรมเฟนิคอลกับ BSA

0.1 M Phosphate buffer, pH 6

KH_2PO_4	3.025	กรัม
Na_2HPO_4	0.39	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M citrate buffer, pH 3.5

   citric acid 0.1 M

   Na_2HPO_4 0.1 M

   ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 3.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M citrate buffer, pH 5.5

   citric acid 0.1 M

   Na_2HPO_4 0.1 M

   ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 5.5 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 0.1 M citrate buffer, pH 6.0

   citric acid 0.1 M

   Na_2HPO_4 0.1 M

   ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 6.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

4. 0.1 M Phosphate buffer, pH 8

   ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22ไมโครเมตร

5. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

   Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

   HCl 1 M

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

Bovine serum albumin	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

<u>Working reagent</u>

Reagent A: 2% Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH

1. 0.1 M NaOH

   ชั่ง NaOH 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2. 2% Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH

   ชั่ง Na_2CO_3 5 กรัม ละลายด้วย 0.1 M NaOH 250 มิลลิลิตร

Reagent B: 0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 1% trisodium citrate

1. 1% trisodium citrate

   ชั่ง trisodium citrate 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. 0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 1% trisodium citrate

   ชั่ง $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 กรัม ละลายด้วย 1% trisodium citrate 100 มิลลิลิตร

Reagent C: Reagent A + Reagent B

นำ Reagent A 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Reagent B 0.4 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

Reagent D: Folin-Ciocalteu

นำ Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตรละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรพิมล พันธุ์ธีรานุรักษ์ เกิดเมื่อวันที่ 2 กันยายน พ.ศ. 2523 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546

ผลงานทางวิชาการ

Srivilai Phean-o-pas, **Pornpimon Punteeranurak**, Teerapong Buaboocha (2005). Calcium Signaling-mediated and Differential Induction of Calmodulin Gene Expression by Stress in *Oryza sativa* L. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (4):432-439.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย