

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดอะฟลาทอกซินเอ็ม1

ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนธ์แอสเสย์

Production of monoclonal antibody for aflatoxin M₁ detection
based on enzyme-linked immunosorbent assay

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นางทรงจันทร์ ภูทอง

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

นายอนุมาศ บัวเขียว

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2558

บทคัดย่อภาษาไทย

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin, AF) เป็นกลุ่มสารพิษที่เกิดจากราซึ่งอาจปนเปื้อนอยู่ในพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ อะฟลาทอกซินหลักที่พบได้แก่ อะฟลาทอกซินบี1 อะฟลาทอกซินบี2 อะฟลาทอกซินจี1 และอะฟลาทอกซินจี2 เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินชนิด บี1 (AFB₁) เข้าสู่ร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นอะฟลาทอกซินชนิด เอ็ม1 (AFM₁) ที่บริเวณตับและหลั่งออกมาในนม ซึ่งสารนี้เป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง ดังนั้นการตรวจหาปริมาณของ AFM₁ ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นมจึงมีความจำเป็น ในการตรวจวัดปริมาณ AFM₁ นั้นทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้แก่วิธี เอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ในปัจจุบัน ชุดตรวจ AFM₁ ด้วยวิธี ELISA นี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีเป้าประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM₁ สำหรับใช้ในการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทำการฉีดแอนติเจน AFM₁ ที่เชื่อมต่อกับอัลบูมินในซีรัมของวัว เพื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว พบว่าหนูทุกตัวตอบสนองต่อแอนติเจน โดยสร้างแอนติบอดีที่มีค่าระดับแอนติบอดีในเลือด ระหว่าง 1:8,192,000 และ 1:32,768,000 เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูไมซ์กับเซลล์มัยยิวโลมา P3X เพื่อเตรียมโมโนโคลน พบว่าได้โมโนโคลนจำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 โมโนโคลนแอนติบอดี (MAb) จากโคลนเหล่านี้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG₁ ทั้งหมด เมื่อทดสอบความไวของ MAb ซึ่งวัดในรูปของค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) มีค่าเท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พีโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของ MAb ต่อสารต่างๆ แสดงว่า MAb เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB₁ และ AFG₁ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ ต่อมาได้ทำการเลือก AFM₁-9 มาผลิต MAb แล้วใช้ในการเตรียม ELISA และประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด AFM₁ ที่ถูกเติมลงไปนมน้ำนมตัวอย่าง จากการทดลองพบว่า ค่าร้อยละของการได้กลับคืน และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์แบบ Intra-assay อยู่ในช่วง 92 – 104% และ 3.50 – 15.8% ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์แบบ Inter-assay จะได้ค่าอยู่ในช่วง 100 – 103% และ 1.32 – 7.98% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจวัด AFM₁ ระหว่างวิธี ELISA และ HPLC พบว่าผลการตรวจวัดทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน โดยมีค่า R² เท่ากับ 0.992 จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า MAb ที่ผลิตจากโมโนโคลน AFM₁-9 มีความเหมาะสม สำหรับการนำมาใช้ ELISA เพื่อตรวจวัด AFM₁ อย่างมีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองตัวอย่างนมดิบ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Aflatoxins (AFs) are the group of toxin produced from fungi which may contaminate animal feeds. The major AFs found are B₁ (AFB₁), B₂, G₁ and G₂. After AFB₁ enters into the animals, it is transformed to aflatoxin M₁ (AFM₁) at the liver and is secreted into the milk gland. AFM₁ is known to be a carcinogenic agent. Therefore, detection of AFM₁ presented in dairy products is essential. Detection of AFM₁ can be performed by several methods but the most widely used method suitable for screening a large number of samples is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Currently, ELISA kit for AFM₁ must be imported. Therefore, this research aims to produce monoclonal antibody (MAb) against AFM₁ for development of ELISA. Mice (BALB/c) were immunized with AFM₁-bovine serum albumin conjugate. All mice responded to the injected antigen by producing antibody at the titer level between 1:8,192,000 and 1:32,768,000. Conventional cell fusion between splenocytes and P3X myeloma cells was performed to obtain 5 monoclones assigned as AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 and AFM₁-17. Isotype of monoclonal antibody from these monoclones was found to be IgG₁. The sensitivity of each MAb, measured in term of the lowest concentration that can be detected called limit of detection, (LOD) was found to be 16, 15, 5, 7 and 9 pg/ml, respectively. Test of cross-reactivity to several substances showed that MAb cross-reacted to AFB₁ and AFG₁ but did not cross-reacted to other non-aflatoxin substances. Subsequently, AFM₁-9 was selected to produce MAb which was used in ELISA preparation and evaluation of the detection of AFM₁ fortified in milk sample. It was found that % recovery and % coefficient of variation (CV) of intra-assay was in the range of 92 – 104% and 3.50 – 15.8%, respectively. In case of inter-assay, those values were 100 – 103% and 1.32 – 7.98%, respectively. Comparative detection of AFM₁ between ELISA and HPLC illustrated that both methods were in a good agreement with the R² of 0.992. These results indicated that MAb produced from monoclonal AFM₁-9 was suitable for efficiently ELISA - screening detection of AFM₁ in raw milk samples.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ซ
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	5
2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	5
2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	5
2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	6
2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซีให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁	8
2.5 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	8
2.6 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁	9
2.7 ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	9
2.8 ทดสอบความไวของแอนติบอดี	10
2.9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี	10
2.10 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดของ ELISA	11
2.11 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ระหว่าง ELISA และ HPLC	11
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	
3.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซีให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁	12
3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM ₁ ในรูปอิสระ	13

	หน้า
3.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁	13
3.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
3.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM ₁ ในรูปอิสระ	15
3.6 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
3.7 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด AFM ₁	19
3.7.1 การตรวจสอบความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดด้วยวิธี ELISA	19
3.7.2 การเปรียบเทียบการตรวจวัด AFM ₁ ในตัวอย่างน้ำนมโดยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี HPLC	20
4. สรุปงานวิจัย	23
บรรณานุกรม	24
ประวัติผู้วิจัย	27

สารบัญตาราง (List of tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 สรุประดับแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFM ₁ -BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA	12
ตารางที่ 2 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM ₁ อีสาระ	13
ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA	14
ตารางที่ 4 IC ₅₀ และ LOD ของโมนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA	15
ตารางที่ 5 ค่า IC ₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมนโคลนอลแอนติบอดี ต่อสารในกลุ่ม AFs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA	18
ตารางที่ 6 การตรวจวัด AFM1 ที่เติมลงในน้ำนมดิบโดยวิธี indirect competitive ELISA	19
ตารางที่ 7 การตรวจวัด AFM1 ที่เติมลงในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการโดยวิธี indirect competitive ELISA	20

สารบัญภาพ (List of figures)

	หน้า
ภาพที่ 1 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูโมซที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM ₁ -BSA จำนวน 5 ตัวด้วยวิธี indirect ELISA	11
ภาพที่ 2 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM ₁ ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมนโคลอนอลแอนติบอดี AFM ₁ -1, AFM ₁ -3, AFM ₁ -9, AFM ₁ -15 และ AFM ₁ -17	15
ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบการตรวจวัด AFM ₁ ในตัวอย่างน้ำนมโดยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี HPLC	22

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

A	Absorbance
Ab	Antibody
AFB ₁	Aflatoxin B ₁
AFB ₂	Aflatoxin B ₂
Ag	Antigen
AFG ₁	Aflatoxin G ₁
AFG ₂	Aflatoxin G ₂
AFM ₁	Aflatoxin M ₁
AP	Alkaline phosphatase
AFs	Aflatoxins
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
C	Constant region
CDRs	Complementarity determining region
Da	Dalton (g/mol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DON	Deoxynivalenol
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
FI-IA	Flow-injection immunoassay
FRs	Framework region
H	Heavy chain
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HWE	Hot water extraction
IAC	Immunoaffinity column
IC ₅₀	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin

L	Light chain
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
MHC	Major histocompatibility complex
MSPD	Matrix solid phase dispersion
PAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	Phosphate buffer saline ^{၀.၀၅} 0.05% Tween20
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppt	Part per trillion
R _f	Relative mobility
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
T _C	Cytotoxic T cell
T _H	Helper T cell
TK	Thymidine kinase
V	Variable region
v	Volume

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ ทุติยภูมิ ของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่มีการปนเปื้อนอยู่ในพืช และผลผลิตที่สำคัญทางการเกษตร อะฟลาทอกซินแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซินบี (AFB₁, AFB₂) อะฟลาทอกซินจี (AFG₁, AFG₂) และอะฟลาทอกซินเอ็ม (AFM₁, AFM₂) ซึ่ง *A. flavus* จะผลิตเฉพาะอะฟลาทอกซินชนิดบีเท่านั้น ส่วน *A. parasiticus* จะผลิตทั้งอะฟลาทอกซินชนิดบี และอะฟลาทอกซินชนิดจี เมื่อสัตว์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของ AFB₁ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น AFM₁ ที่บริเวณตับและจะถูกหลั่งออกมาอย่างต่อเนื่องในนมของสัตว์ โดย AFM₁ นี้มีสมบัติทนความร้อนได้สูง จึงมีความเสถียรเมื่อผ่านกระบวนการถนอมอาหารด้วยความร้อน AFM₁ เป็นสารที่มีพิษต่อตับและเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับสูงเป็นระยะเวลานานหลายวันจะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันได้ โดยจะมีอาการไอสูง มีดีซ่านเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แขนขาบวม ปวดเมื่อย อาเจียน ตับบวม และถึงเสียชีวิตในรายที่รุนแรง ส่วนการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำถึงปานกลางเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง ดังนั้นการบริโภคนมหรือผลิตภัณฑ์นมที่มีการปนเปื้อนของ AFM₁ ในปริมาณน้อยก็สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กซึ่งเป็นผู้บริโภคหลัก จากอันตรายดังกล่าว จึงได้มีการกำหนดให้มีปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limit, MRL) ของ AFM₁ ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกไว้ที่ 0.05 และ 0.025 ppb ตามลำดับ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM₁ ที่ปนเปื้อนในนมและผลิตภัณฑ์นม โดยการตรวจด้วยวิธีทางเคมี เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) มีความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และไม่เหมาะสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ส่วนการตรวจโดยใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาจะเป็นวิธีที่ตรวจสอบง่าย สะดวก ได้ผลเร็ว แม่นยำ ค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และเหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรอง (Screening Test) ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมี ในปัจจุบันชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA นี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อAFM₁ และนำแอนติบอดีที่คัดเลือกได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจด้วยวิธี ELISA

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AFM₁

1.2.2 พัฒนา ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ได้สำหรับตรวจวัด AFM₁ ในน้ำนม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 กระตุ้นหนูทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁
- 1.3.2 หลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองและเซลล์ไมอีโลมาเพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี
- 1.3.3 คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาการตรวจด้วย ELISA
- 1.3.4 วิเคราะห์ AFM₁ มาตรฐานในน้ำนมดิบด้วย ELISA ที่พัฒนาขึ้น

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสมบัติเป็นพิษต่อคน พืช และสัตว์ อะฟลาทอกซินที่สำคัญมี 4 ชนิด คือ บี1 บี2 จี1 และจี2 ส่วนอะฟลาทอกซินเอ็ม1 จะพบได้ในน้ำนม ซึ่งเกิดจากการเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ที่เกิดขึ้นในบริเวณตับของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน บี1 และจะหลั่งออกมาอย่างต่อเนื่องในน้ำนมของสัตว์

อะฟลาทอกซิน มักพบในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง และในอาหารแห้งหลายชนิด เช่น พริกแห้ง พริกป่น กระเทียม หัวหอม กุ้งแห้ง ผลไม้แห้ง สมุนไพร รวมถึงเมล็ดข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และเมล็ดพืชที่ใช้ทำอาหารสัตว์ สภาวะที่เหมาะสมทำให้เชื้อราสามารถผลิตสารพิษได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 24-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 75 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญเติบโต และสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี โดยสารพิษจะอยู่ภายในเมล็ดพืชหรือวัตถุดิบเหล่านั้น และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งประเทศไทยอยู่ในภูมิอากาศดังกล่าวจึงทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินกับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

องค์การอนามัยโลกจัดให้สารอะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่ร้ายแรงมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากปริมาณของอะฟลาทอกซินเพียง 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย และทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้หากได้รับอย่างต่อเนื่อง เมื่ออะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกาย บางส่วนจะถูกกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเปลี่ยนแปลงเป็นสารเมแทบอลิซึมหลายตัว ซึ่งมีทั้งที่มีพิษมากขึ้น และพิษน้อยลง โดยสารเมแทบอลิซึมดังกล่าวจะถูกสะสมในร่างกาย และบางส่วนถูกขับออกทางปัสสาวะ อุจจาระ และทางน้ำนม โดยจะพบอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมได้ภายใน 12-24 ชั่วโมง หลังจากโคได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซิน และจะพบมากในช่วงวันแรก โดยปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ที่พบจะมีปริมาณ 1% ของอะฟลาทอกซินบี1 ที่โคได้รับ เนื่องจากพิษของอะฟลาทอกซินนั้นรุนแรงมาก แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้ ทางคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (USFDA) กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินในอาหารและนมได้ไม่เกิน 20 และ 0.5 ppb ตามลำดับ แต่ประเทศในยุโรปกำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ในน้ำนมและนมเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 และ 0.025 ppb ตามลำดับ ส่วนคณะกรรมการอาหารโคเด็กซ์ (Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Joint FAO/WHO Food Standard Programme) ซึ่งทำหน้าที่กำหนดและควบคุมมาตรฐานสากลของการปนเปื้อนในอาหารที่แลกเปลี่ยนระหว่างประเทศได้ตั้งข้อเสนอการกำหนดค่ามาตรฐานสากล ว่าด้วยการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารต่างๆ ไว้ในเกณฑ์ที่ต่ำ คือในนมและผลิตภัณฑ์นม

ให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ไม่เกิน 0.5 ppb สำหรับประเทศไทยมีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารทั่วไปได้ไม่เกิน 20 ppb

โดยวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารเพื่อคัดกรองจากตัวอย่างมากในปัจจุบันวิธีหนึ่งคือ ELISA ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการตรวจวัดสารตกค้างชนิดต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ทำให้มีชุดตรวจ ELISA สำเร็จรูปทางการค้าอยู่จำนวนมาก โดยวัตถุประสงค์ที่สำคัญในการเตรียม ELISA คือ แอนติบอดี เพราะเป็นปัจจัยสำคัญต่อความไวและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจ โดยแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเพื่อใช้งานในระยะยาวคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เพราะมีสมบัติคงที่ สามารถเก็บโมโนโคลนสำหรับนำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในระยะยาวได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่พบว่ามีการผลิตชุดตรวจ ELISA สำหรับตรวจ AFM₁

1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM₁ ได้ถูกสร้างขึ้นโดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูสายพันธุ์ BALB/C ด้วย AFM₁-BSA และนำม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา P3-NS1-Ag4-1 จนได้โมโนโคลน 2 โคลน ได้แก่ AMW-1 และ AMW-4 ซึ่งมีค่าความไวโดยรายงานอยู่ในรูปของความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (IC50) ในการทำ ELISA อยู่ที่ 25 และ 50 ppb ตามลำดับ โดยแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB1 และ AFG1 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFB2 และ AFG2 (Woychik และคณะ, 1984) ต่อมาได้มีรายงานการตรวจเปรียบเทียบวิเคราะห์ AFM₁ ในช่วงความเข้มข้น 0.005-0.5 ppb) ในนมะระหว่างวิธี HPLC และ ELISA พบว่า วิธี HPLC จะให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 103 - 120% และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) อยู่ที่ 0.01 ppb ส่วนวิธี ELISA จะให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 88-106% และ LOD อยู่ที่ 0.002 ppb (Kim และคณะ, 2000) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาใช้แอนติบอดีในเทคนิค flow-injection immunoassay ในการตรวจ AFM₁ ในนม โดยนำตัวอย่างนมมาบ่มรวมกับแอนติบอดีและแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP ทั้งไว้ให้เกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่อยู่ในนมกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วย HRP จากนั้นนำมาฉีดเข้าสู่ระบบที่มีคอลัมน์ Protein G แอนติบอดีจะจับกับ Protein G อยู่ในคอลัมน์ ส่วนแอนติเจนทั้งตัวที่ไม่ได้ติดฉลากและตัวที่ติดฉลากที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดีจะออกจากคอลัมน์ เข้ามาในส่วนของการทำงานปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของเอนไซม์และวัดกระแสไฟที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ถ้าวัดกระแสไฟที่เกิดจากปฏิกิริยาได้สูงแสดงว่าในตัวอย่างมีความเข้มข้นของ AFM₁ สูง ซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.011 ppb (Badea และคณะ, 2004) ต่อมาได้มีพัฒนาวิธีตรวจหาการปนเปื้อนของ AFM₁ ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ superparamagnetic nanoparticles เพื่อลดเวลาและขั้นตอนในการทำ ELISA ทำให้ทราบผลได้เร็วขึ้น นำ superparamagnetic nanoparticles มาเชื่อมต่อกับโปรตีนจีและนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM₁ ยึดเกาะกับโปรตีนจี เพื่อลดขั้นตอนในการ blocking จากนั้นนำไปเคลือบในงาน 96 หลุม ใส่ตัวอย่างและ AFM₁-HRP เพื่อใช้แข่งขันในการจับกับแอนติบอดีกันหลุม ใส่สับสเตรตและหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 450 นาโนเมตรซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.004 ppb (Radoi และคณะ, 2008) อีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาคือการนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFB1 มาเชื่อมติดเข้ากับเจล

Sepharose 4B ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ แล้วทำการใส่ตัวอย่างและ AFB1-HRP เพื่อไปจับกับแอนติบอดีที่อยู่ในคอลัมน์ ใส่สารตั้งต้นของเอนไซม์ ในกรณีที่ในตัวอย่างไม่มี AFM1 จะเกิดสีฟ้าในคอลัมน์ แต่ถ้ามี AFM1ปนเปื้อนในตัวอย่างจะไม่เกิดสีในคอลัมน์ ซึ่งจากวิธีนี้สามารถวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.04 ppb (Goryacheva และคณะ, 2009) แต่วิธีนี้ไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก ในช่วงเวลาใกล้เคียงกันได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM1 และใช้ในการตรวจหา AFM1 ในนม แอนติบอดีที่ผลิตได้มีไอโซไทป์เป็น IgG2a เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFM1, AFB1 และ AFG1 คิดเป็น 100, 13.9 และ 6.7% ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.04 ppb จากการทดลองใส่ AFM1 ในปริมาณ 0.1 - 3.2 ppb พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 98% (Pei และคณะ, 2009)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.6.1 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและจำเพาะต่อ AFM₁
- 1.6.2 ได้วิธี ELISA ที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจวัด AFM₁ ในน้ำนม

1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ระยะเวลา			
	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือน 1-6	เดือน 7-12	เดือน 1-6	เดือน 7-12
กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูโมซีให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁	●√			
เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	●√	●√		
คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM ₁		●√		
ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี		●√		
ทดสอบความไวของแอนติบอดี		●√	●√	
ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี			●√	
ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด AFM ₁ ด้วย ELISA			●√	●√
เขียนรายงาน	●√	●√	●√	●√
เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์				●√

หมายเหตุ ● หมายถึงจะดำเนินการ และ √ หมายถึงได้ดำเนินการแล้ว

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์ มัยอีโลมา SP2/0-Ag14	ATCC: CRL 8287
เซลล์ มัยอีโลมา P3X 63AG8	ATCC: TIB-9

2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง	Mettler Toledo, USA
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเซลล์	Spl, Korea
จานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Costar, USA
ชุดอิมมูโนโพรบอเรซิส	Bio-rad, USA
ตู้ดูดควัน	Theera Trading co., Thailand
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
ทิป	Axygen, USA
ปิ๊มลม	Iwaki, Japan
ปิเปตแก้ว	HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-Rll Memmert, Japan
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	Fermentek, Israel
Aflatoxin G ₁ (AFG ₁)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M ₁ (AFM ₁)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M ₁ -BSA (AFM ₁ -BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ ; APS	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Jackson Immuno research laboratories, USA
BCA TM protein assay kit	Pierce, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Cinoxacin	Sigma-Aldrich, USA
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	Merck, Germany
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Deoxynivalenol (DON)	Fermentek, Israel
Diethyl ether	Merck, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Fluka, China
Fetal calf serum (FCS)	Invitromax, USA
Enoxacin	Sigma-Aldrich, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	T.P.drug laboratories (1969) Co.,Ltd., Thailand
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
Isotyping kit	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
Nitrofurantoin	Sigma-Aldrich, USA
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol HYBRI-MAX [®] (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Skim milk	Anline, Thailand
Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Merck, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Germany

สารเคมี	แหล่งที่มา
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	Pierce, USA
Tetracycline	Sigma-Aldrich, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) Aminomethane (Trizma base)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Riedel-de Haën, UK

2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁

ทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยการฉีด AFM₁ ที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ (AFM₁-BSA; Sigma -Aldrich) เข้าภายในช่องท้องหนู โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสม Freund's complete adjuvant (FCA) กับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาณแอนติเจนที่ฉีด 2.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) และฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน หลังจากฉีดกระตุ้น 3-4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ AFM₁ อิสระได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

2.5 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

นำเซลล์มัยโอโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยโอโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วัน ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตในจำนวนที่มากกว่า 10⁷ เซลล์ และนำเซลล์มัยโอโลมาไปปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้ามเตรียมเซลล์ม้ามโดยทำการสลับหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัม จากนั้นทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามออกมา ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ตามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้ไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์ของม้ามหนูที่ได้มาหลอมรวมกับเซลล์มัยโอโลมา P3X ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยโอโลมาเป็น 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเขย่าเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆ หยด 50% PEG ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ที่เป็นสารช่วยหลอมเซลล์ลงไป โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร โดยควบคุมการหยดของ PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที พร้อมกับการหมุนหลอดช้าๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ดูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้าง PEG ออกจากเซลล์ เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งเป็นอาหารที่เติมสาร hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นเปิดลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ไว้ 10-14 วัน ดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁ หรือไม่

2.6 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁

2.6.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานชนิด 96 หลุมด้วย AFM₁-BSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่มี tween20 (PBS-T) เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ความเข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มี horse redish peroxidase (GAM-HRP) เชื่อมอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ H₂O₂ ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 1M H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.6.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ AFM₁ ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยทำการเคลือบหลุมเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 จากนั้นเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์หรือซีรัมหนู จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกในข้อ 2.6.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย AFM₁ ลงไปผสม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการแอสเสย์เอนไซม์เช่นเดียวกับ 2.6.1 ถ้าหลุมที่เติม AFM₁ ในรูปอิสระให้การดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า หลุมที่ไม่มีการเติม AFM₁ แสดงว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสาร AFM₁ ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution โดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์เดี่ยวนี้ให้เจริญประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุมแล้วตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

2.7 ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Isotyping kit โดยทำการเตรียมแอนติบอดี ที่จำเพาะกับไอโซไทป์ชนิดต่าง ๆ คือ IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM จาก isotyping kit มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:6,000 เท่าใน PBS เติมลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติม

แอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไซท์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ (โดยที่แอนติบอดีทุติยภูมิมีความจำเพาะกับส่วน Fab (HRP-Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนู ที่เจือจาง 1:2,000 ใน PBS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1M H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.8 ทดสอบความไวของแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (50% of inhibition concentration; IC₅₀) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เทียบกับที่ไม่ใส่สารแข่งขัน และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการเติมลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.0048-4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า %B/B₀ และ แกน X เป็นค่า ล็อกกาลีทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นที่ B₀-3SD เมื่อ B และ B₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มีการเติมแอนติเจนและไม่เติม แอนติเจน ตามลำดับ และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

ทำการทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งได้จากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และเติมลงไปผสมกับสาร AFM₁ และ ตัวแข่งขันที่ต้องการทดสอบซึ่งเป็นสารในกลุ่ม AFs จำนวน 2 ชนิด คือ AFB1 และ AFG1 ที่ความเข้มข้น 0.0048-4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร รวมถึงสารนอกกลุ่ม AFs คือ deoxynivalenol ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างจาก Fusarium sp และสารกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ chloramphenicol, cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, enrofloxacin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline และ tetracycline ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลายกับสารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า %B/B₀ และ แกน X เป็นค่าล็อกกาลีทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50 % (50% of inhibition concentration; IC₅₀) หาได้จากการนำค่าที่ 50% B/B₀ มาเทียบกับกราฟได้เป็นค่าความเข้มข้น และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่า IC₅₀ ของสารแต่ละตัวที่ใช้เป็นตัวแข่งขัน

$$\text{ร้อยละของปฏิกิริยาข้าม} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของ AFM}_1}{\text{IC}_{50} \text{ ของ ตัวแข่งขันที่ทดสอบ}} \times 100$$

2.10 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัดของ ELISA

นำตัวอย่างน้ำหนักดิบมาเติม AFM₁ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย ELISA ที่เตรียมขึ้น แล้วคำนวณหาค่าของความถูกต้องในรูปของร้อยละ ของการได้กลับคืน (% Recovery) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณของสารที่วิเคราะห์ได้และสารที่เติมลงไป ดังสมการ

$$\text{ร้อยละของการได้กลับคืน} = \frac{\text{ปริมาณ AFM1 ที่วัดได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ปริมาณ AFM1 ที่เติมลงในตัวอย่าง}} \times 100$$

ทำการวิเคราะห์หาค่าความแม่นยำในการตรวจวัดทั้งแบบ intra-variation assay และ inter-variation assay โดยในแบบ intra-assay จะเป็นการตรวจวัดปริมาณของ AFM₁ ที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ จำนวน 6 ซ้ำใน บริเวณที่ต่างๆ กันของไมโครไตเตอร์เพลท ส่วนในแบบ inter-assay จะเป็นการตรวจวัดปริมาณสารที่ความเข้มข้น หนึ่งๆ ที่เตรียมขึ้น 6 ตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน ทำการคำนวณหาค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความ แปรปรวนของการวิเคราะห์ (% coefficient of variation) ดังสมการ

$$\text{ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัด (SD)} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของการวัดปริมาณสาร (\mu)}}$$

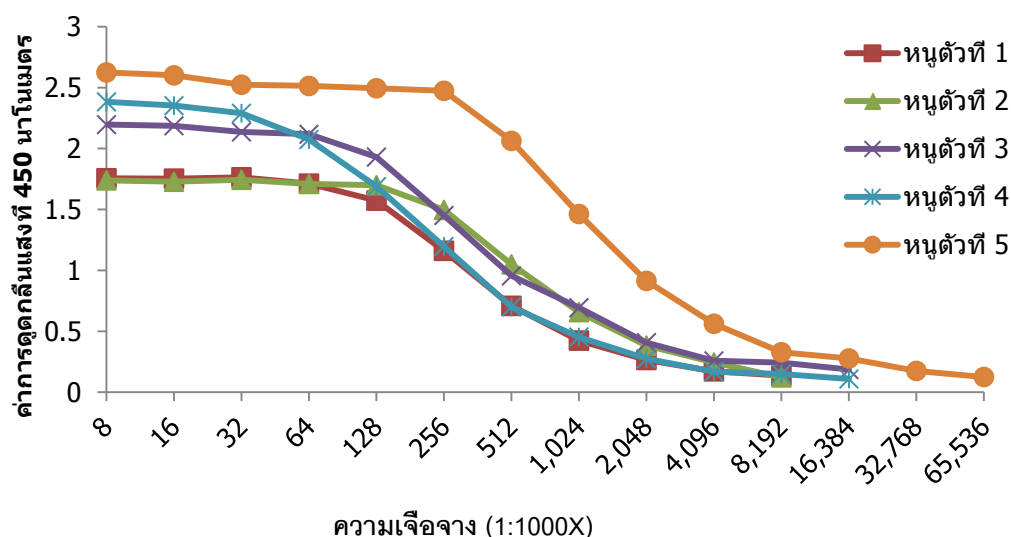
2.11 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ระหว่าง ELISA และ HPLC

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างการวิเคราะห์ด้วย ELISA และ HPLC โดยในการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นจะส่งวิเคราะห์ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง จำกัด (ประเทศไทย)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูโมซัสให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁

ทำการฉีดกระตุ้นหนูโมซัสทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM₁-BSA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของหนูโมซัสในวันที่ 7 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 และแยกซีรัมมาหา ระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังภาพที่ 1 พบว่าหนูทั้ง 5 ตัว มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีด เข้าไป โดยสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ AFM₁-BSA ได้ ทำการระบุระดับแอนติบอดีโดยพิจารณาจากความเจือจาง ของซีรัม ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.1 (Liddle และ Cryer, 1991) พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวให้ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM₁-BSA อยู่ในช่วง 8,192,000 – 32,768,000 โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดี ต่ำที่สุด คือ หนูตัวที่ 1 และ 2 ให้ระดับแอนติบอดี 8,192,000 ส่วนหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด คือ หนูตัวที่ 5 โดยให้ระดับแอนติบอดี 32,768,000



ภาพที่ 1 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูโมซัสที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM₁-BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM₁ ในรูปอิสระ

เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองนั้นอยู่ในรูปของ AFM₁ ที่เชื่อมติดกับโปรตีน ซึ่งแอนติบอดีอาจจดจำส่วนที่เชื่อมติดนี้ได้จึงให้ผลบวกในการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA ในข้อ 3.1 ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM₁ ในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูไม่ซ้ทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ AFM₁ ในรูปอิสระได้ โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรลดลง เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่มีการแย่งจับของ AFM₁ อิสระ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการแย่งจับของ AFM₁ ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 53 - 86 % ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

หนูตัวที่	ระดับความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร(n=3)		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM ₁	AFM ₁ (2µg/ml)	
1	1: 256,000	1.258	0.541	57
2	1: 512,000	0.927	0.410	56
3	1:512,000	0.956	0.185	81
4	1:256,000	1.196	0.169	86
5	1:1,024,000	0.808	0.380	53

3.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM₁

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูไม่ซ้กับเซลล์มัยอีโลมาและเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ที่ผ่านการหลอมรวมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งเซลล์มัยอีโลมาจะไม่สามารถเจริญได้และเซลล์ม้ามจะมีอายุขัยที่จำกัด ดังนั้นจะมีเฉพาะเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดนี้เท่านั้นที่เจริญได้ ตรวจสอบเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับหลังจากการหลอมรวมประมาณ 10 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มมีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT หลังจากที่มีการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาเซลล์ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาเจริญขึ้นมาตรวจการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 450 นาโนเมตร มากกว่าหรือเท่ากับ 0.7) มาทำการทดสอบต่อไปเพื่อดูว่าแอนติบอดีที่เซลล์ไฮบริโดมาผลิตได้ สามารถจับกับ AFM₁ ในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA

จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 1 สัปดาห์พบว่าในหลุมมีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเพียงเล็กน้อยเป็นโคโลนีอยู่ในหลุม แต่พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งมีจำนวนมากว่าเซลล์ไฮบริโดมา และมีเจริญอย่างรวดเร็วจึงส่งผลให้ไปบดบังการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM₁-BSA ที่ใช้เคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA จากการทำ indirect ELISA แต่ไม่สามารถจับกับ AFM₁ อีสาระจากการทำ indirect competitive ELISA จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM₁ อีสาระ จำนวน 2 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution หลังจากขั้นตอนนี้รอให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบว่าเซลล์ยังสามารถผลิตแอนติบอดีและจับกับสารอีสาระได้หรือไม่ แต่พบว่าเซลล์ได้สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM₁ อีสาระ จำนวน 11 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ทำการคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับ AFM₁ อีสาระได้ดี โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect competitive ELISA โดยหลุมที่ใส่ AFM₁ อีสาระแล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากกว่า 90% เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่ใส่ AFM₁ พบว่ามีทั้งหมด 5 โคลนที่มีสมบัติดังกล่าว จึงทำการกำหนดรหัสของเซลล์ไฮบริโดมา ได้แก่ AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 ดังตารางที่ 2 ทำขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดย แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป

ตารางที่ 2 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM₁ อีสาระ

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n=3)		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM ₁	AFM ₁ (2µg/ml)	
AFM ₁ -1	130/1F/5G/11E/10F	2.737	0.088	97
AFM ₁ -3	130/1F/6F/10B/6H	2.838	0.075	97
AFM ₁ -9	131/11D/9D/10H/7G	2.992	0.277	91
AFM ₁ -15	70/3F/8H/11C	2.900	0.091	97
AFM ₁ -17	151/7B/12F/9H	2.756	0.118	96

3.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบไอโซไทป์เพื่อที่จะได้เลือกชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสมในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์หลังจากการผลิต เนื่องจากกลุ่มย่อยของ IgG แต่ละชนิด มีความสามารถในการจับกับ โปรตีนเอ หรือ โปรตีนจี ด้วย affinity ต่างกัน จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG₁ (แสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

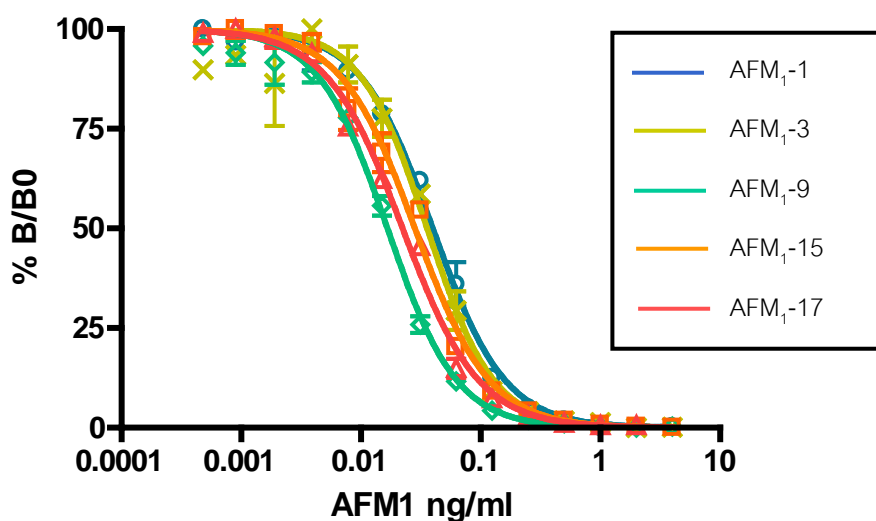
รหัสเซลล์ ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n=3)					
	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	IgM
AFM ₁ -1	1.087	0.071	0.086	0.085	0.073	0.216
AFM ₁ -3	1.098	0.073	0.071	0.088	0.072	0.221
AFM ₁ -9	1.124	0.074	0.086	0.09	0.07	0.219
AFM ₁ -15	1.034	0.071	0.084	0.087	0.074	0.225
AFM ₁ -17	1.051	0.072	0.083	0.09	0.071	0.226

3.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM₁ ในรูปอิสระ

เนื่องจากในแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างกัน จึงทำให้ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน AFM₁-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบหลุม เลือกค่าความเจือจางที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 พบว่าระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมของโคลน AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-15 และ AFM₁-17 คือ 1:3,200 และโคลน AFM₁-9 คือ 1:1,600

เมื่อทราบค่าความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนแล้ว จากนั้นหาค่าความไวของแอนติบอดีซึ่งรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของแอนติเจนแข่งขันที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีตัวแข่งขันลดลงครึ่งหนึ่ง (50% inhibition concentration, IC₅₀) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (limit of detection, LOD) ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM₁ ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 4.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (0.0048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จนถึง 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 40, 36, 17, 28 และ 23 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 และตารางที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในงานวิจัยนี้กับแอนติบอดีที่รายงานโดย Pei และคณะ (2009) ซึ่งมีค่า LOD อยู่ที่ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (40 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 มีความไวสูงกว่า และมีความไวสูงเพียงพอต่อการนำไปพัฒนาการตรวจ AFM₁ ในระดับที่ต่ำกว่าค่าที่คณะกรรมการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ว่าให้มีปริมาณของ AFM₁ ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM₁ ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 (n=3)

ตารางที่ 4 IC₅₀ และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (n=3)

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC ₅₀ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)
AFM ₁ -1	40	16
AFM ₁ -3	36	15
AFM ₁ -9	17	5
AFM ₁ -15	28	7
AFM ₁ -17	22	8

3.6 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลนโดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ตัวแข่งขันเป็นสารในกลุ่ม AFs คือ AFB₁ และ AFG₁ ส่วนสารนอกกลุ่ม AFs ได้แก่ deoxynivalenol (DON) ซึ่งเป็นสารพิษจาก *Fusarium* sp. และสารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ tetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, enoxacin, cinoxacin และ nitrofurantoin นำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA มาคำนวณหา IC₅₀ ของแต่ละสารโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 จากการทดสอบพบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม คือ AFB₁ และ AFG₁ ทั้งสองชนิด แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ DON ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อราและสารในกลุ่มยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารนอกกลุ่ม AFs ดังตารางที่ 5 ถึงแม้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะมีความจำเพาะสูง แต่แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดหนึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งปฏิกิริยาข้ามอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ กรณีที่แอนติเจนอาจมีอิพิโทปบางส่วนเหมือนกัน และกรณีที่แอนติบอดีอาจจะจับกับอิพิโทปอื่นที่มีโครงสร้างหรือ มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน ดังนั้นจากการทดสอบความจำเพาะแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีความจำเพาะกับสารในกลุ่ม AFs สูง คาดว่าเนื่องจากสารภายในกลุ่ม AFs ด้วยกันจะมีโครงสร้างของโมเลกุลใกล้เคียงกัน หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Pei และคณะ(2009) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM₁ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเช่นเดียวกัน โดยเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ AFM₁, AFB₁ และ AFG₁ คิดเป็น 100, 13.9 และ 6.7% ตามลำดับ (Pei และคณะ, 2009)

ตารางที่ 5 ค่า IC₅₀ และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่ม AFs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี indirect competitive ELISA

สารแข่งขัน	AFM ₁ -1		AFM ₁ -3		AFM ₁ -9		AFM ₁ -15		AFM ₁ -17	
	IC ₅₀ (pg/ml)	% CR	IC ₅₀ (pg/ml)	% CR	IC ₅₀ (pg/ml)	% CR	IC ₅₀ (pg/ml)	% CR	IC ₅₀ (pg/ml)	% CR
Aflatoxins										
AFM ₁	39.8	100	35.8	100	16.7	100	28.3	100	22.3	100
AFB ₁	3.0	1,328	2.4	1,491	1.6	1,043	0.9	3,144	1.6	1,393
AFG ₁	14.8	269	34.1	105	15.7	106	16.2	175	12.5	178
Mycotoxin										
DON	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Antibiotics										
Tetracycline	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Oxytetracycline	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Chloramphenicol	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Ciprofloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Enrofloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Norfloxacin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02
Nitrofurantoin	>100,000	<0.04	>100,000	<0.04	>100,000	<0.02	>100,000	<0.03	>100,000	<0.02

3.7 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด AFM₁

3.7.1 การตรวจสอบความแม่นยำและความถูกต้องของการวัดด้วยวิธี ELISA

จากโคลนทั้งหมดที่ได้ เมื่อพิจารณาจากค่า IC₅₀ และค่า LOD พบว่า โคลนรหัส AFM₁-9 ให้ค่า LOD ต่ำที่สุด จึงถูกเลือกไปใช้ในการผลิตแอนติบอดีและใช้ในการเตรียม ELISA เพื่อตรวจวัด AFM₁ ในน้ำนม โดยมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีตัวแรก (แอนติบอดีจากโคลน AFM₁-9) และ แอนติบอดีตัวที่สอง (GAM-HRP) ทำให้ค่า IC₅₀ และ LOD ที่ดีที่สุดคือ 0.13 และ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเตรียม ELISA โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมไปใช้ตรวจวัด AFM₁ ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนม โดยตัวอย่างน้ำนมที่นำมาตรวจจำเป็นต้องมีการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกไขมันส่วนบนที่มีผลรบกวนการตรวจโดยวิธี ELISA เสียก่อน (Wang *et al.*, 2011) ผลการทดลองพบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนและร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์แบบ Intra-assay อยู่ในช่วง 92 – 104% และ 1 - 10% ตามลำดับ และการวิเคราะห์แบบ Inter-assay อยู่ในช่วง 100 – 103% และ 1 – 8% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) โดยทั่วไปแล้วช่วงที่ยอมรับได้ของค่าร้อยละการได้กลับคืน ต้องอยู่ในช่วง 80 – 120% และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต้องน้อยกว่า 20% (Chadseesuvan *et al.*, 2013; Pimpitak *et al.*, 2009) ดังนั้น จากผลการทดลองนี้แสดงว่า ชุดตรวจวัดโดยวิธี ELISA นี้ มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะตรวจวัดสาร AFM₁ ในน้ำนมดิบได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ตารางที่ 6 การตรวจวัด AFM₁ ที่เติมลงในน้ำนมดิบโดยวิธี indirect competitive ELISA

Fortified conc. (ng/ml)	Intra-assay			Inter-assay		
	Measured conc. (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)	Measured conc. (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
0.80	0.83±0.03	3.50	104	0.81±0.01	1.32	101
0.70	0.71±0.05	6.82	102	0.71±0.02	2.47	101
0.60	0.62±0.04	7.08	104	0.61±0.01	1.86	102
0.50	0.49±0.08	15.8	97	0.51±0.01	2.25	101
0.40	0.40±0.04	9.63	100	0.40±0.01	3.51	101
0.30	0.30±0.01	4.47	100	0.30±0.01	3.25	100
0.20	0.18±0.03	14.0	92	0.21±0.02	7.98	103

นอกจากนี้ยังได้ทำทดสอบการวัดปริมาณ AFM₁ ในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ปราศจากไขมัน (pasteurized nonfat milk) นมสเตอริลไรซ์ปราศจากไขมัน (sterilized nonfat milk) นมสเตอริลไรซ์ (sterilized milk) นมผงละลายน้ำ (powdered milk) นมพาสเจอร์ไรซ์แต่งรสสตรอเบอร์รี่ (pasteurized strawberry flavored milk) และ นมพาสเจอร์ไรซ์แต่งรสช็อคโกแลต (pasteurized chocolate flavored milk) พบว่าการวัดปริมาณ AFM₁ ด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์แต่งรสไม่สามารถทำได้เพราะสีของนมตัวอย่างรบกวนการวิเคราะห์อย่างมากจนไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างถูกต้อง เมื่อแก้ไขด้วยการเจือจางตัวอย่างเพื่อลดผลกระทบของสีของตัวอย่างก็ทำให้ปริมาณของ AFM₁ มีค่าต่ำกว่าค่า LOD ของการทดสอบ ส่วนผลการวัดในตัวอย่างนมชนิดที่เหลืองแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การตรวจวัด AFM₁ ที่เติมลงในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการโดยวิธี indirect competitive ELISA

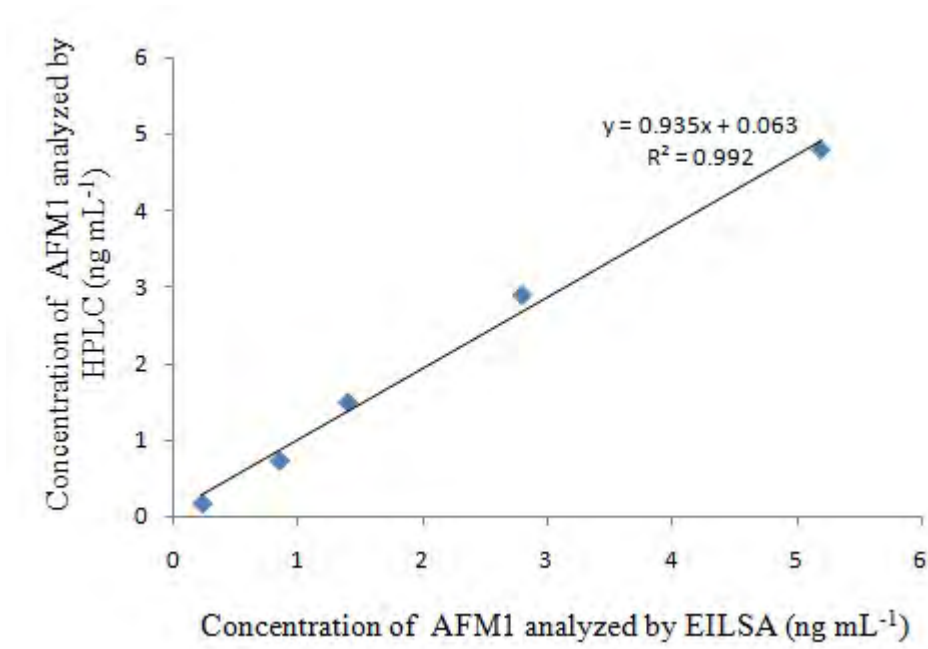
Fortified concentration (ng/ml)	Pasteurized non-fat milk			Sterilized non-fat milk		
	Measured concentration (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)	Measured concentration (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
0.80	0.73±0.01	0.73	91	0.76±0.01	0.60	95
0.70	0.66±0.01	1.74	96	0.66±0.02	2.40	94
0.60	0.57±0.01	0.09	96	0.57±0.01	2.20	95
0.50	0.50±0.02	4.15	100	0.46±0.01	2.10	92
0.40	0.42±0.01	2.86	104	0.40±0.02	4.40	100
0.30	0.31±0.01	0.79	103	0.27±0.03	11.9	90
0.20	0.19±0.02	9.24	96	0.20±0.02	11.3	100

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Fortified concentration (ng/ml)	Sterilized fresh milk			Powdered milk		
	Measured		Recovery	Measured		Recovery
	concentration	CV		concentration	CV	
	(ng/ml)	(%)	(%)	(ng/ml)	(%)	(%)
0.80	0.87±0.01	0.10	109	0.82±0.01	0.44	103
0.70	0.76±0.01	0.35	108	0.71±0.01	0.78	102
0.60	0.61±0.01	1.55	102	0.59±0.01	0.49	98
0.50	0.48±0.01	1.94	96	0.52±0.01	2.30	103
0.40	0.42±0.01	3.53	105	0.41±0.02	4.40	103
0.30	0.30±0.02	5.37	101	0.30±0.02	5.00	101
0.20	0.21±0.01	5.97	103	0.20±0.07	33.0	101

3.7.2 การเปรียบเทียบการตรวจวัด AFM1 ในตัวอย่างน้ำนม โดยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี HPLC

ทำการเติม AFM₁ ลงในตัวอย่างน้ำนมให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.02 ถึง 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปตรวจวัด AFM₁ ที่เติมลงไปด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี HPLC (โดยบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง กรุงเทพมหานคร) ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3.13 โดยทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธี ได้ค่า $R^2 = 0.992$ แสดงว่าวิธีตรวจวัดทั้งสองวิธีให้ผลการตรวจที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งให้เห็นว่าการตรวจวัดด้วยวิธี indirect competitive ELISA สามารถใช้ตรวจวัดแทนวิธี HPLC ได้



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบการตรวจวัด AFM1 ในตัวอย่างน้ำมันโดยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี HPLC

4. สรุปงานวิจัย

จากการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM₁-BSA พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดโดยสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ AFM₁ ในรูปอิสระได้ จากการหลอมรวมเซลล์ 5 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อ AFM₁ จำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 เมื่อทำการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG₁ เมื่อทดสอบความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ AFM₁ ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM₁-1, AFM₁-3, AFM₁-9, AFM₁-15 และ AFM₁-17 ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.8, 35.8, 16.7, 28.3 และ 22.3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถใช้ตรวจวัด AFM₁, AFB₁ และ AFM₁ ได้ เมื่อนำแอนติบอดีจากโคลน AFM₁-9 มาตรวจวัด AFM₁ ในน้ำนมดิบที่มีการเติมลงไป พบว่าสามารถตรวจได้อย่างถูกต้องและแม่นยำและสามารถใช้แทนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ได้ แต่ไม่สามารถตรวจวัดตัวอย่างน้ำนมที่มีการปรุงแต่งสีได้

บรรณานุกรม

- คณิงนิจ ก่อธรรมฤทธิ. 2545. ความปลอดภัยของอาหารสัตว์. วารสารข่าวปศุสัตว์ 25(212) : 16-9.
- คณิงนิจ ก่อธรรมฤทธิ และอดิศักดิ์ เล็บนาค. 2538. ผลการตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินในสัตว์. สารสนเทศและการเกษตร 43(10) : 47-53.
- ชัยวัฒน์ วิฑูระกุล, นัฐวุฒิ อินคำเชื้อ และวิชาญ สุขประเสริฐ. 2551. การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมและนมโคในฟาร์มโคนมจังหวัดลำพูน. ข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ 16(4) : 44-50.
- เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหาร และอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 161-166.
- เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2544. การหาชนิดวัตถุอันตรายที่ใส่ผสมในอาหารชั้น และชนิดของอาหารหยาดสำหรับเลี้ยงโคนมที่มีผลกระทบต่ออัตราการขับออกของสารพิษอะฟลาทอกซินทางน้ำนมของแม่โครีดนม. การสัมมนาเรื่องการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจร. ชลบุรี.
- ประพฤษ ตั้งมันคง และ ปกรณ์ จਾਲะ. 2549. การตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) งานตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา. นครปฐม: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยานิพนธ์ฉบับพิมพ์ สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพมหานคร : ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.
- มาลินี ลิมโกคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จักรสันติวงศ์.
- วิทยา สังข์ทอง. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหาร และอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 123-129.
- ศุภกิจ อังศุภากร. 2526. ผลของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคนและสัตว์ในประเทศไทย. สัตวแพทยสาร 34(3) : 285-303.
- สุทธิพร พิริยาน. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารสัตว์. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วน รับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์ : 158-160.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2529. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522.
- อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Badea, M., Micheli, L., Messia, M. C., Candigliota, T., Marconi, E., Mottram, T., Velasco-Garcia, M., Moscone, D and Palleschi, G. 2004. Aflatoxin M₁ determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. Analytica Chimica Acta 520 : 141-148.

- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarini, C., Marzioni, F., Nazzari, M., Samperi, R., and Lagana, A. 2006. Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 1135 : 135–141.
- Cathey, C. G., Huang, A. G., Sarr, A. B., Clement, B. A and Phillips, T. D. 1994. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M₁ in milk. Journal of Dairy Science 77 : 1223–1231.
- Creepy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters 127 : 19–28.
- Curits, L.R. and Zhang, Q. 1995. Temperature modulated incidence of aflatoxin B₁- initiated liver cancer in rainbow trout. Fundamental and Applied Toxicology 25 : 146-159.
- Diaz, S., Dominguez, L., Prieta, J., Blanco, J. L., and Moreno, M. A. 1995. Application of a diphasic dialysis membrane produce for surveying occurrence of aflatoxin M₁ in commercial milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 : 2678-2680.
- European Commission Regulation, No. 683/2004/EC of 13 April 2004, Amending Regulation (EC) No. 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for Infants and Young Children, Official Journal of European Communities L106 : 3-5.
- Gallagher, E. P., and Eaton, D. L. 1995. In vitro biotransformation of aflatoxin B₁ in channel catfish liver. Toxicology and Applied Pharmacology 132 : 82-90.
- Goryacheva, I. Y., Karagusheva, M. A., Peteghem, C. V., and Sibanda, L. 2009. Immunoaffinity pre-concentration combined with on-column visual detection as a tool for rapid aflatoxin M₁ screening in milk. Food Control 20 : 802–806.
- Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J., and Kim, Y. B. 2000. Occurrence of aflatoxin M₁ in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants 17 : 59-64.
- Lee, J. E., Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Jeon, T. H. 2009. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control 20 : 136–138.
- Manetta, A.C., Giammarco, M., Giuseppe, L.D., Gramenzi, A., Formigoni, A., and Lambertini, L. 2009. Distribution of aflatoxin M₁ during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. Food Chemistry 113 : 595–599.
- Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., and Palleschi, G. 2005. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ determination in milk using screen-printed electrodes. Biosensors and Bioelectronics 21 : 588–596.
- Pei, S. C., Zhang, Y. Y., Eremin, S. A., and Lee, W. J. 2009. Detection of aflatoxin M₁ in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. Food Control 20 : 1080–1085.
- Radoi, A., Targa, M., Prieto-Simon, B., and Marty, J. L. 2008. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M₁

- detection. Talanta 77 : 138-143.
- Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., and Das, M. 2004. Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control 15 : 287–290.
- Reddy, S. V., and Waliyar, F. Properties of aflatoxin and its producing fungi [Online]. 2005. Available from:<http://www.aflatoxin.info/Aflatoxin.asp> [2011, July 24]
- Shundo, L., and Sabino, M. 2006. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. Brazillian Journal of Microbiology 37 : 164-167.
- Tekinsen, K. K., and Tekinsen, O. C. 2005. Aflatoxin M₁ in white pickle and van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern in Turkey. Food Control 16 : 565–568.
- Wilson, D. A., and Payne, G. A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.), The toxicology of aflatoxins. New York Academic Press: 309-326.
- Woychik, N. A., Hinadill, R. D., and Chu, S. F. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. Applied and Environmental Microbiology 48 : 1096-1099.
- Yang C, C., Jiun L, W., and Yao P, K. 2005. Determination of aflatoxin M₁ in Milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53 : 8474-8480.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

- 1.1 ชื่อ-นามสกุล (ไทย) นายกิตตินันท์ โกมลภิส
 1.2 ชื่อ-นามสกุล (อังกฤษ) Mr.Kittinan Komolpis
 1.3 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0
 1.4 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ A4
 1.5 หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
 โทรศัพท์ 02-218-8078 (ทำงาน) 089-664-6266 (มือถือ)
 โทรสาร 02-253-3543 e-mail: kittinan.k@chula.ac.th

1.6 ประวัติการศึกษา

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

1.7 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคโนโลยีชีวภาพ (การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี การวิเคราะห์ด้วย ELISA และแถบทดสอบ)

1.8 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

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

1.8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

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

1.8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1.8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

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

2. Wongtangprasert T, Natakathung W, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T, **Komolpis K** and Kongchareonporn N. 2014. Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology)* 15: 165-172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
3. Umarphorn Chadseesuwana, U., Puthong, S., Gajanandana, O., Palaga, T. and **Komolpis, K.** 2013 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. *Journal of AOAC International* 96: 1-8 (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project-954-31023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
4. Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S. and **Komolpis, K.** 2013. A Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 69-75 (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
5. **Komolpis, K.**, Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16: 567-571
6. Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K.**, Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chemistry* 116: 785-791 (แหล่งทุน – สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)
7. Damrongsakkul S., Ratanathampan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14: 202-206
8. **Komolpis K.**, Srivannavit, O. and Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. *Biotechnology Progress*, 18:641-646.
9. Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (Glycine max). *Biotechnology Progress*; 17:421-430.
10. Wu E., **Komolpis K.**, Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques*, 13:567-569.

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

1.8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

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

2. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K and **Khongchareonporn N.** Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.

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

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

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

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

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

8. Kaewwiset, S., **Komolpis, K.**, Palaga, T. Development of progesterone test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. 9th National Grad

Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185

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

1.8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.8.4.1 การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมีโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์ (90%) (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

1.8.4.2 การพัฒนาชุดตรวจเร็วโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ (80%) (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

1.8.4.3 การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจสารฟลูออโรควิโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร (90%) (แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

1.8.4.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (70%) (แหล่งทุน – สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Nanthika Khongchareonporn (Panchan)
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-6399-00091-73-5
4. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A5
5. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 02-2188076-8 โทรสาร 02-2533543
E-mail nanthika.k@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2539	ตรี	วท.บ.	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2542	โท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2547	เอก	วท.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

7. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

8.2.1 สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

8.2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีที่ 1)

2.8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

2.8.3.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C,

Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. 2011. Nutritional

composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. Animal Feed

Science. 169:265-269

2. Khamjing W, **Khongchareonporn** N and Rengpipat S. 2011. Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially-contaminated pork. *Microbiology and Immunology*. 55: 605-615.
 3. **Panchan N**, Sithigorngul P, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia*. 31: 29-35.
 4. **Panchan N**, Bendena WG, Browser P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkuru P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 24(10):1563-1570.
 5. Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1934-1952
 6. Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptide*. 23: 1895-1906.
 7. Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptide*. 22 : 191-197.
 8. Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol B*. 124 : 73-80.
- 2.8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
1. Noipapai K, Khongchareonporn N and Rengpipat S. 2011. Production of monoclonal antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand
 2. Nuntanidvorakul P, Komolpis K and Khongchareonporn N. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.
 3. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent

assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.

4. Tesvichian S, Komolpis K, Khongchareonporn N, Puthong S, Piampitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.
5. Khongchareonporn N, Komolpis K and Puthong S. Production and Characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1st CMU Graduate Research conference . 27th November 2009. Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.
6. Kanchanabanca C, Komolpis K and **Khongchareonporn N**. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.
7. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against Yersinia enterocolitica. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.
8. Kongkaviton P, Khongchareonporn N and Komolpis K. Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14th - 17th, 2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138
9. Saneewong S, Khongchareonporn N and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14th - 17th, 2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129
10. Techapremprecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

2.8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

2.8.4.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกกโตปามีนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555 การวิจัยลู่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 70

2.8.4.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์
เอสเสย์ (ELISA) แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยลู่ทางไปแล้วประมาณร้อยละ
70

cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complementary and Alternative Medicine. 12:27.

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

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

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

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

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

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

7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

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

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

3) Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochan, S., Gamnarai, P., Kangsadalampai, S., Roytrakul, S., and Rojpibulstit, P. (2011). Proteomic study of tumor antigen recognized by Hep88 mAb: A novel harmful mAb to hepatocellular carcinoma. Proceeding in The 3rd Biochemistry and Molecular biology (BMB) conference "From Basic to

Translational Research for a Better Life". April 6-8 ,2011 ,The Empress Convention Centre ,Chiang Mai ,Thailand.

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

7.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

7.3.1 โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์”

7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจแร่กโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”

7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพเรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์”

7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคมีคาร์บาไซด์”

7.3.5 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน”

- 7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจเร็วกโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”
- 7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โปรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์”
- 7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคมีคาร์บาไซด์”
- 7.3.5 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน”

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 4

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอนุมาศ บัวเขียว
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Anumart Buakeaw
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
E-mail anumart.b@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2545 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2541 วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี
7. ผลงานวิจัย
 - 7.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
 - 1) Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.
 - 7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
 - 1) Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M₁. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.
 - 2) Khongarsa, K., Khongchareonporn, N., Komolpis, K., and **Buakeaw, A.** (2012). 1st ASEAN PLUS THREE GRADUATE RESEARCH CONGRESS. 1 – 2 March 2012 Chaing Mai ,Thailand.
 - 3) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., Pimpitak, U., and **Buakeaw, A.** Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.
 - 7.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่
 - 7.3.1 โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์”
 - 7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจเร็วโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”

- 7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรงประสาทฟันในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์”
- 7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเคมีคาร์บาไซด์”
- 7.3.5 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน”

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 5

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธนาภัทร ปาลกะ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Tanapat Palaga
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100602876498
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท
แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 02-218-5070 โทรศัพท์มือถือ 081-454-9295 โทรสาร 02-252-7576
e-mail: tanapat.p@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Tokyo Institute of Technology	B. Eng.	Bioengineering	2534
Tokyo Institute of Technology	M. Eng.	Biotechnology	2536
University of Massachusetts at Amherst	Ph.D.	Microbiology/Immunology	2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
ภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลและจุลชีววิทยา
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - โครงการ วิถีสัญญาณ Notch ในแมคโครฟาจและผลต่อการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ (แหล่งทุน สกว.)
 - โครงการ ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับแอนติเจน LipL32 จากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคโดยใช้อนุภาคนาโนโคโทซานดัดแปร (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
 - โครงการ Notch and TLR crosspath in innate immune cells (Fogarty International Research Collaboration Award, NIH, USA)
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :
 - (1) Puwiprom, H, Hirankarn, N, Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Wongpiyabovorn, J, **Palaga, T***. (2010) Increased interleukin-23 receptor+ T cells in peripheral blood mononuclear

- cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, R215. (IF=4.30)
- (2) Kuncharin, Y, Sangphech, N, Kueanjinda, P, Bhattarakosol, P, **Palaga, T***. (2011) MAML1 regulates cell viability via the NF- κ B pathway in cervical cancer cell lines *Exp. Cell Res.* 317, 1830-1840. (IF=3.557)
- (3) Ravangpai, W, Sommit, D, Teerawatananon, T, Sinpranee, N, **Palaga, T**, Pengpreecha, S, Muangsin, N, Pudhom, K. (2011) Limonoids from seeds of Thai *Xylocarpus moluccensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4485-4489. (IF=2.661)
- (4) Yorsangsukkamol, J, Chaiprasert, A, **Palaga, T**, Prammananan, T, Faksri, K, Palittapongarnpim, P, Prayoonwiwat, N. (2011) Apoptosis, production of MMP9, VEGF, TNF- κ and intracellular growth of *M. tuberculosis* for different genotypes and different pks15/1 genes. *Asia. Pac. J. Allerg. Immunol.* 29, 1-13. (IF=0.79)
- (5) Wongchana, W, **Palaga, T***. (2011) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 1-8. (IF=4.185)
- (6) Wisutthiwong, C, Buranaruk, C, Pudhom, K, **Palaga, T***. (2011) The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF- κ B and MAPK pathways *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415, 361-366. (IF=2.595)
- (7) **Palaga, T**, Minter, LM. (2012) Notch signaling and its emerging role in autoimmunity. *Front. Biol.* DOI 10.1007/s11515-012-1209-z.
- (8) Boonyatecha, N, Sangphech, N, Wongchana, W, Kueanjinda, P, **Palaga, T***. (2012) Involvement of Notch signaling pathway in regulating IL-12 expression via c-Rel in activated macrophages. *Mol. Immunol.* 51, 255-62. (IF=3.003)
- (9) Arayachukeat S, **Palaga, T**, Wanichwecharungruang SP. (2012) Clusters of carbon nanospheres derived from graphene oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 4, 6808-15. (IF=4.525)
- (10) Chantaranothai, C, **Palaga, T**, Karnchanatat, A and Sangvanich, P. (2013) Inhibition of nitric oxide production in the macrophage-like Raw 264.7 cell line by protein from the rhizomes of zingiberaceae plants. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43, 60-78. (IF=0.466)
- (11) Chusri, M, Wongphanit, P, **Palaga, T**, Puthong, S, Sooksai, S, Komolpis, K. (2013) Production and characterization of a monoclonal antibody against enrofloxacin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 65-75. (IF=1.399)
- (12) Meerak, J, Wanichwecharungruang, SP, **Palaga, T***. (2013) Enhancement of immune response to a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B by incorporation of an autophagy inducing system. *Vaccine* 31, 784-790. (IF=3.77)
- (13) Osathanon, T, Manokawinchoke, J, Nowwarote, N, Aguilar, P, **Palaga, T**, Pavasant, P. (2013) Notch signaling is involved in neurogenic commitment of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 22, 1220-1231. (IF=4.459)

- (14) Chadseesuwan, U, Puthong, S, Gajanandana, O, **Palaga, T**, Komolpis, K. (2013) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. *J. AOAC Int.* 96, 1-8. (IF=1.199)
- (15) **Palaga, T***, Ratanabunyong, S, Pattarakankul, T, Sangphech, N, Wongchana, W, Hadae, Y, Kuenjinda, P. (2013) Notch signaling regulates expression of Mcl-1 and apoptosis in PPD-treated macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 444-52. (IF=4.185)
- (16) Wongtangprasert, T, Natakathung, W, Pimpitak, U, Buakeaw, A, **Palaga, T**, Komolpis, K, Khongchareonporn, N. (2014) Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *J Zhejiang Univ Sci B.* 15, 165-72. (IF=1.108)
- (17) Sangthong, S, Sangphech, N, **Palaga, T***, Ngamrojanavanich, N, Puthong, S, Vilaivan, T, Muangsin, N. (2014) Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression. *Eur. J. Med. Chem.* 77, 334-342. (IF=3.499)
- (18) Sangphech, N, Osborne, BA, **Palaga, T***. (2014) Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via regulator of G protein signaling 19 (RGS19). 219, 653-660. *Immunobiology* (IF=3.180)
- (19) Buaklin, A, **Palaga, T**, Hannaman, D, Kerdkaew, R, Patarakul, K and Jacquet A. (2014) Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein. *Mol. Biotech.* 56, 903-910. (IF=2.275)
- (20) Anuleejun, S, **Palaga, T**, Katakura, Y, Kuroki, M, Kuroki M and Napathorn, SC. (2014) Optimal production of a fusion protein consisting of a single-chain variable fragment antibody against a tumor-associated antigen and interleukin-2 in fed-batch culture of *Pichia pastoris*. *Anticancer Res.* 34, 3925-35. (IF=1.872)
- (21) Faksri, K, Chaiprasert, A, Pardieu, C, Casali, N, **Palaga, T**, Prammananan, T, Palittapongarnpim, P, Prayoonwiwat, N and Drobniewski, F. (2014) Heterogeneity of phenotypic characteristics of the modern and ancestral Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 32, 124-132. (IF=1.25)
- (22) Umthong, S, Buaklin, A, Jacquet, A, Sangjun, N, Kerdkaew, R, Patarakul, K, and **Palaga, T***. (2015) Immunogenicity of a DNA and recombinant protein vaccine combining LipL32 and Loa22 for Leptospirosis using chitosan as a delivery system. *J Microbiol Biotechnol* (in press) (IF=1.32)
- (23) Sarigaputi, C, Sangpech, N, **Palaga, T*** and Pudhom, K. Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway by 7-Deacetylgedunin, a Limonoid from *Xylocarpus* sp. (2015) *Planta Med.* 81, 312-319. (IF=2.36)

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย

- โครงการ ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับแอนติเจน LipL32 จากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคโดยใช้อนุภาคนาโนโคโทซานดัดแปร (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

สถานภาพในการทำวิจัยได้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 50%

- โครงการ Notch and TLR crosspath in innate immune cells (Fogarty International Research Collaboration Award, NIH)

สถานภาพในการทำวิจัยได้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 60%