ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาวศานิกานต์ เสนีวงศ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NORFLOXACIN TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE

Miss Sanikan Saneewong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์
โดย	นางสาวศานิกานต์ เสนีวงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศานิกานต์ เสนีวงศ์ : ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (NORFLOXACIN TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.นันทิกา คงเจริญพร, 122 หน้า.

สารนอร์ฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ถูกนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียในปศุสัตว์ ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์และส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค โดยการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และการดื้อยาของแบคทีเรีย การตรวจสารนอร์ฟลอกซาซินสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น High performance liquid chromatography (HPLC) วิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (ELISA) ซึ่งเทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจคัดกรองสารนอร์ฟลอกซาซินเนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง ตรวจวัดง่าย และมีรูปแบบเหมาะสำหรับตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ในงานวิจัยนี้ชุดตรวจสอบ ELISA ได้ถูกพัฒนาขึ้น จากการทดลองเปรียบเทียบ ELISA แบบต่างๆ พบว่า ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) เหมาะสมที่สุด ให้ค่าเฉลี่ย IC_{50} ค่าขีดจำกัดของการวัด (LOD) และช่วงการทดสอบ เท่ากับ 8.28, 1.01 และ 1 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีความจำเพาะต่อสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน และค่าปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะอื่นที่ทดสอบน้อยกว่า 0.1% เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปทดสอบกับตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ และไข่ไก่ พบว่า %recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 86.28-109.68% และ 89.49-111.34% ตามลำดับ และจากการตรวจวัดปริมาณเปรียบเทียบโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบที่พัฒนาขึ้นเอง ชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย (EURO-DIAGNOSTICA) และเทคนิค HPLC พบว่าให้ค่าที่วัดได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จากการทดสอบการแปรปรวนของการวัดทั้งแบบ intra variation และ inter variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.29-9.37% และ 5.27-11.01% ตามลำดับ ผลการทดลองต่างๆ แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้เหมาะสมสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างเพื่อตรวจหาสารนอร์ฟลอกซาซินและสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนตกค้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972500223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: NORFLOXACIN / ELISA TEST KIT

SANIKAN SANEEWONG: NORFLOXACIN TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., CO ADVISOR: NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 122 pp.

Norfloxacin is an antibiotic in the group of fluoroquinolone. This antibiotic is used for the prevention and treatment of various diseases from bacteria in livestock. Residue of norfloxacin may found in animal product and this might affect to consumers. It can cause mutation and drug resistance in bacteria. Various analytical methods can be used to detect norfloxacin, including chemical method, such as HPLC, and serological methods such as RIA and ELISA. ELISA method has become the most popular method for screening of norfloxacin due to its high sensitivity, high specificity, simplicity and appropriate format for screen large numbers of samples. In this research, ELISA test kits were developed. A direct competitive ELISA (Ag captured) has been validated to be the most suitable method with the average IC_{50} value, limit of detection (LOD) and detectable range of 8.28, 1.01, and 1-50 ng/ml respectively. The prototype test kit was specific to quinolones and fluoroquinolones with %cross-reactivities to other tested antibiotics of less than 0.1%. The developed test kit was used to test different samples including chicken muscle and egg, yielding recovery of 86.28-109.68% and 89.49-111.34%, respectively. Furthermore, comparative quantification of norfloxacin using the developed ELISA test kit, the commercially available test kit (EURO-DIAGNOSTICA) and HPLC technique showed that all three methods gave comparable values. In addition, the inter-assay and intra-assay variations of the developed test kit were also investigated and found to be 4.29-9.37% and 5.27–11.01%, respectively. These result indicated that the prototype test kit is suitable and efficient for sample screening for norfloxacin, quinolones and fluoroquinolones.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2008

Student's Signature Sanikan Saneewong

Advisor's Signature K. Komolpis

Co-Advisor's Signature Nanthika K.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และอาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำ พร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานโครงการบูรณาการทางด้าน ยา เคมีภัณฑ์และวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอณุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ในทุกๆ ด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุขตลอดมา ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจ และการสนับสนุนในทุกด้าน ด้วยดีตลอดมา

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความห่วงใย รวมทั้งคำปรึกษา กำลังใจ และแง่คิดดีๆ ในการดำรงชีวิต และให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างไม่มีข้อแม้ใดๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฒ
บทที่
1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4
2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (quinolone) และฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) 4
2.1.2 สารนอร์ฟลอกซาซิน 5
2.1.3 กลไกการทำงานของสารนอร์ฟลอกซาซิน 5
2.1.4 ผลกระทบจากการใช้สารปฏิชีวนะนอร์ฟลอกซาซิน 5
2.1.5 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซิน 8
2.1.6 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) 10
2.1.7 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA 13
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 24
3.1 เซลล์ไฮบริโดมา 24

บทที่ หน้า
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 24
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 26
3.4 การดำเนินงานวิจัย 30
3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 30
3.4.2 การเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินกับ BSA 32
3.4.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน 32
3.4.4 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 33
3.4.5 การหาปริมาณโปรตีน 34
3.4.6 การหาปริมาณแอนติบอดี 35
3.4.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 36
3.4.8 การทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ 37
3.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ 37
3.5.1 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) 37
3.5.2 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) 40
3.5.3 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) 41
3.6 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) 43
3.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน 43
3.6.2 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ 44
3.6.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซิน 44
3.7 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ 45
3.7.1 การหาค่าความไว (sensitivity) 45
3.7.2 การหาค่าความแม่นยำ (precision) 46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.7.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) 47
3.8 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่สำหรับชุดตรวจสอบต้นแบบ 48
3.8.1 การหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่ 48
3.8.2 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ 48
3.8.3 การศึกษาผลกระทบของแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่ 48
3.9 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง 49
3.9.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่เพื่อทำการทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ 49
3.9.2 การเตรียมตัวอย่างไข่ไก่เพื่อทำการทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ 49
3.10 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับชุดตรวจสอบทางการค้าและเทคนิค HPLC 50
3.10.1 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับชุดตรวจสอบทางการค้า 50
3.10.2 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC 51
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 53
4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตแอนติบอดี 53
4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 54
4.2.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ protein A affinity column chromatography 54
4.2.2 การหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี 56
4.2.3 การหาปริมาณของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA 56
4.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 57
4.2.5 การทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ 59
4.3 การเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ 61
4.3.1 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag capture) 61
4.3.2 ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab capture) 64

บทที่ หน้า

4.3.3 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab capture) 67
4.3.4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ 69
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ 71
4.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag capture) 71
4.4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ 73
4.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซิน 75
4.4.4 การประเมินประสิทธิภาพองชุดตรวจสอบต้นแบบ 77
4.5 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่สำหรับชุดตรวจสอบต้นแบบ 78
4.5.1 การหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่ 78
4.5.2 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 81
4.5.3 การศึกษาผลกระทบของแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่ 82
4.6 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง 83
4.6.1 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ 83
4.6.2 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่ 85
4.7 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค HPLC 88
4.7.1 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบทางการค้า 88
4.7.2 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC 93
5. สรุปผลการทดลอง 98
รายการอ้างอิง 100
ภาคผนวก..... 104
ภาคผนวก ก 105
ภาคผนวก ข 123
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 128

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดโดยประเทศญี่ปุ่นสำหรับสารนอร์ฟลอกซาซินตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ..... 8

2.2 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี 9

3.1 เซลล์ไฮบริโดมา..... 24

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 24

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 26

3.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้นำไปทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ..... 44

4.1 ผลการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินจากเซลล์ไฮบริโดรมา
ด้วยวิธี indirect ELISA 54

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีที่ผลิตได้ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์วัด
ด้วยวิธี BCA 56

4.3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีวัดด้วยวิธี indirect ELISA..... 57

4.4 ค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุล
แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 59

4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ
ด้วยวิธี indirect competitive ELISA..... 60

4.6 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ
HRP เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) 62

4.7 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ
BSA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) .. 65

4.8 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดี
ที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA
(Ab captured)..... 68

4.9 สรุปผลการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบต่างๆในงานวิจัยนี้ 71

4.10 ผลค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ direct competitive
ELISA (Ag captured) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ 72

ตารางที่ หน้า

4.11 ผลของการศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซิน ที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ 74
4.12 ค่า IC_{50} และผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโลน 76
4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) เพื่อใช้หาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 77
4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ 78
4.15 ผลการหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่ 80
4.16 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อไก่ 83
4.17 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อไก่ 85
4.18 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างไข่ไก่ 86
4.19 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างไข่ไก่ 87
4.20 ผลการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง 88
4.21 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA 91
4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA 92
4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC 95
4.24 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC 96
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 492 นาโนเมตรของการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้ protein A affinity column chromatography 105
ก.2 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) 108
ก.3 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Ab captured) 109

ตารางที่ หน้า

ก.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) 110
ก.5 ผลการหาความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน .. 111
ก.6 ผลจากการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) 112
ก.7 ผลการหาค่า intra-assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 113
ก.8 ผลการหาค่า inter-assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 114
ก.9 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ 114
ก.10 ผลการศึกษาผลกระทบของแมทริกต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ 115

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 รูปโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน 4

2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารนอร์ฟลอกซาซินและสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลน 6

2.3 หลักการของ indirect ELISA 11

2.4 หลักการของ sandwich ELISA 11

2.5 หลักการของ competitive ELISA 14

2.6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 15

2.7 โครงสร้างของแอนติบอดีไอโซไทป์ต่างๆ 16

4.1 โครมาโทแกรมจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ protein A sepharose 55

4.2 แถบของแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 58

4.3 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) 63

4.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Ab captured) 67

4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) 69

4.6 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินด้วยโปรแกรม Graph Pad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ 72

4.7 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) 73

4.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบในภาวะการบ่มต่างๆ 74

4.9 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เตรียมใน PBS และเมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร 81

4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อไก่และตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อไก่ 82

รูปที่ หน้า

4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIANOSTICA..... 93
4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC 97
ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA จากวิธี BCA..... 106
ก.2 กราฟของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA 106
ก.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) ของโปรตีนมาฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 107
ก.4 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ..... 112
ก.5 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่..... 115
ก.6 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่..... 116
ก.7 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนที่มีวางจำหน่ายของบริษัท EURO-DIAGNOTICA..... 116
ก.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนที่มีวางจำหน่ายของบริษัท (EURO-DIAGNOTICA) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ 117
ก.9 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยวิธี HPLC 117

รูปที่ หน้า

ก.10 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่ ด้วยวิธี HPLC 118
ก.11 โครมาโทแกรมของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่ที่ได้จากเทคนิค HPLC 119
ก.12 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC..... 120
ก.13 โครมาโทแกรมของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างไข่ไก่ที่ได้จากเทคนิค HPLC..... 121
ก.14 โครมาโทแกรมของตัวอย่างไข่ไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC..... 122

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์

Ab	Antibody
Ag	Antigen
AP	Alkaline Phosphatase
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
conc.	Concentration
CR	Cross-reactivity
CV	Coefficient of variation
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide
ELISA	Enzyme Linked Iimmunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-FL	High Performance Liquid Chromatography- Fluorescent
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet
HRP	Horseradish Peroxidase
IC_{50}	Inhibitory Concentration 50%
Ig	Immunoglobulin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KLH	Keyhole Limpet Haemocyanin
LA	Latex Agglutination
LC-FL	Liquid Chromatography-Fluorescent
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LC-UV	Liquid Chromatography-Ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
M	Molar
ml	Milliliter
MRLs	Maximum Residue Limits
N	Normal
ng	Nanogram
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
Nor	Norfloxacin
NP	1-Napthyl Phosphate
OD	Optical Density
OPD	*O*-phenylenediamine
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	0.05% PBS-Tween 20
PNP	p-Nitrophenyl Phosphate
PMP	Phenolphthalein Monophosphate
R_f	Relative Mobility
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine
v/v	Volume per volume
v/w	Volume per weight
w	Weight
µg	Microgram
%	Percent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารนอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงนิยมนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินปัสสาวะ ทั้งในคนและสัตว์เพื่อการบริโภค เช่น โค สุกร สัตว์ปีก และกุ้ง เป็นต้น โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้สามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียงทั้งแบบฉับพลันและแบบเรื้อรัง เช่น เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ผมร่วง เกิดผื่นคันที่ผิวหนัง และส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น เวียนศีรษะ มึนงง อ่อนเพลีย เศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และความจำเสื่อม เป็นต้น (Cohen, 2001) จากคุณสมบัติในการรักษาโรคของสารนอร์ฟลอกซาซินนี้ทำให้มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการทำปศุสัตว์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้บริโภค ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค เกิดการกระตุ้นการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย (Guardabassi และคณะ, 2004) จึงทำให้ประเทศต่างๆ หันมาให้ความสำคัญในการควบคุมและตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่นำมาบริโภค โดยทางองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาไม่อนุญาตให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ใช้สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในสัตว์ปีก โดยระบุว่าการใช้ยาในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ *Campylobactor sp.* (FDA, 2000) ส่วนในประเทศญี่ปุ่น ได้กำหนดค่าปริมาณการตกค้างสูงสุดที่ให้มีได้ (Maximum Residue Limits ; MRLs) ในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และชั้นไขมันของสุกรและไก่ เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และชั้นไขมันของสัตว์ปีกอื่นๆ เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (The Japan Food Chemical Research Foundation, 2005) สำหรับสหภาพยุโรปและในประเทศไทย ไม่อนุญาตให้มีการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้บริโภค ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและการส่งออกสินค้าไปยังต่างประเทศโดยไม่ถูกตีกลับ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการตรวจหาการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิค high-liquid performance chromatography (HPLC) (Kowalski และคณะ, 2005) liquid chromatography (LC) (Anadon และคณะ, 1995) และ liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) (Vynchta และคณะ, 2002) ซึ่งเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้เป็นเทคนิคที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ มีความไวและมีประสิทธิภาพสูง แต่เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนานจึงตรวจตัวอย่างได้น้อย อีกทั้งจำเป็นต้องใช้ผู้ชำนาญการที่มีความชำนาญสูง เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างสูงตามไปด้วย จึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยาหรือหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งก็คือ การตรวจสอบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

เทคนิค ELISA นี้เป็นเทคนิคที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาน้อย สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการทดสอบแต่ละครั้ง อีกทั้งให้ความถูกต้องแม่นยำสูงใกล้เคียงกับเทคนิคทางเคมี แต่มีค่าใช้จ่ายต่ำ เนื่องจากชุดตรวจสอบสาร (ELISA kit) ที่มีใช้ในปัจจุบันนี้ต้องทำการสั่งซื้อและนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาสูง จึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจสอบเพื่อใช้เองภายในประเทศซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินลดลง

จากข้อมูลข้างต้น กอปรกับประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์สำหรับการบริโภครายสำคัญของโลก ดังนั้นคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตได้จะต้องมีคุณภาพ เพื่อสามารถส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ได้โดยไม่มีการกีดกันและตีกลับของสินค้า จึงจำเป็นต้องวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ในงานวิจัยนี้ได้นำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน ที่ผลิตได้โดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินต้นแบบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เตรียมชุดตรวจสอบเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ต้นแบบต่างๆ สำหรับตรวจสารนอร์ฟลอกซาซิน

1.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจต้นแบบ

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน

1.3.3 ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1.3.4 เตรียมชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินแบบต่างๆ

1.3.4.1 แบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

1.3.4.2 แบบ indirect competitive ELISA (Ab captured)

1.3.4.4 แบบ direct competitive ELISA (Ab captured)

1.3.5 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

1.3.6 วิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ และไข่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

1.3.7 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบโดยใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

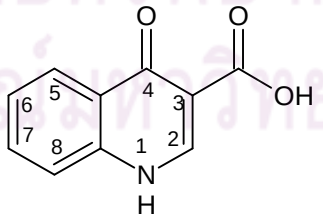
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (quinolone) และฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone)

สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน เป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี มีคุณสมบัติในการยับยั้งการจำลองตัวของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงนิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในคนและในสัตว์ โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนนั้นเป็นสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และหมู่คาบอกซิลิคตรงตำแหน่งที่ 3 ซึ่งโครงสร้างของสารมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) (Holtzapple และคณะ, 2001) ของแบคทีเรียแกรมลบ และยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอร์-เรส (DNA topoisomerase IV) ในแบคทีเรียแกรมบวก (Bertino และ Fish, 2000) หากมีการเติมธาตุฟลูออรีนในตำแหน่งที่ 6 จะทำให้สารในกลุ่มนี้ถูกแยกออกเป็นกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และจะมีการเติมหมู่ต่างๆ เช่น piperrazino group ในตำแหน่งที่ 7 หรือการเติมธาตุไนโตรเจนที่ตำแหน่งที่ 8 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (Wolfson และคณะ, 1985)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 **สารนอร์ฟลอกซาซิน** (norfloxacin)

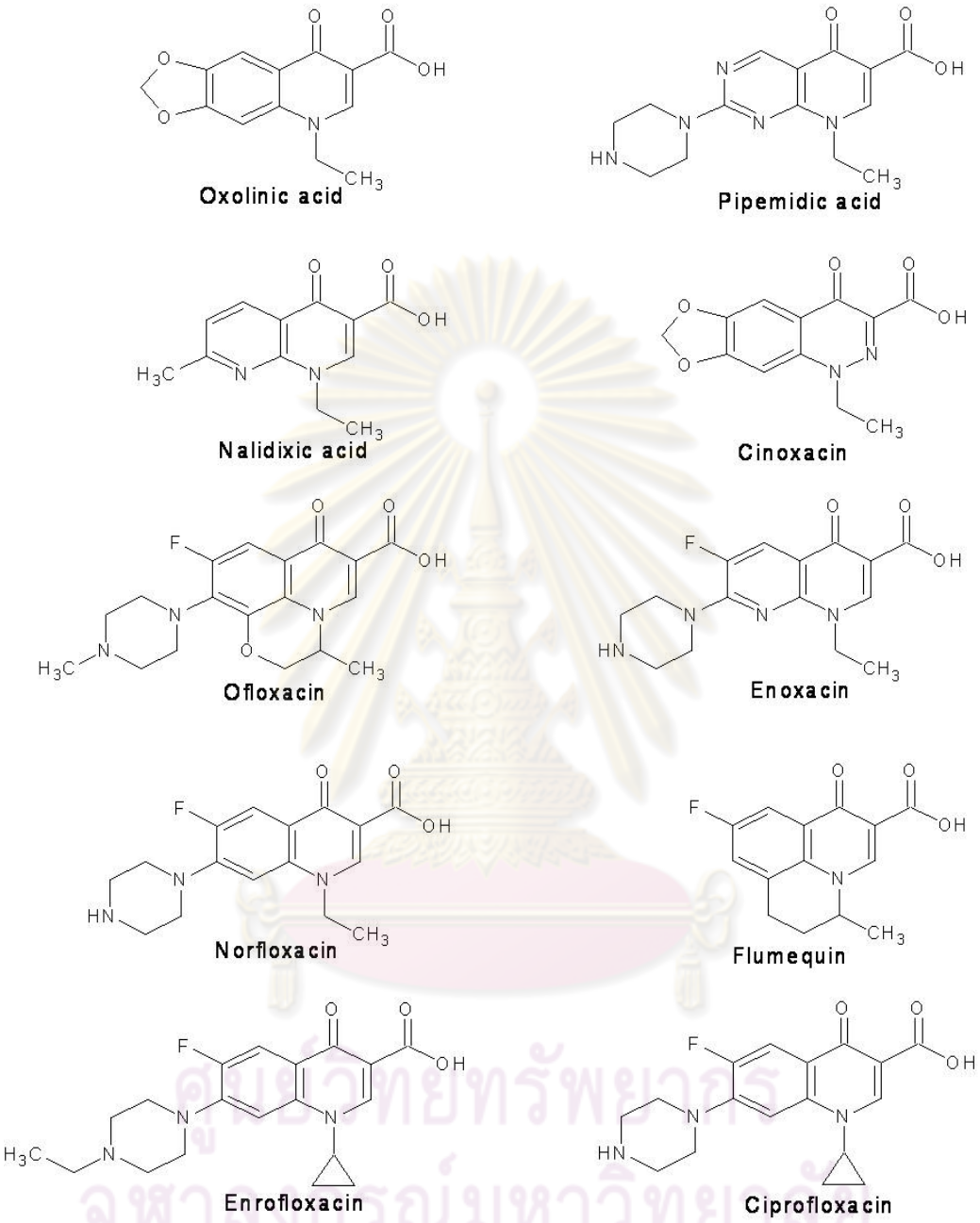
สารนอร์ฟลอกซาซิน หรือ 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-1*H*-quinoline-3-carboxylic acid เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 319.34 ดาลตัน ลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลวที่ 221 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ดีในกรดอะซิติกและสามารถละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล เอทานอลและน้ำ (WHO, 1997) มีการพัฒนาสูตรโครงสร้างโดยมีการเติม piperazine ring เข้าที่ตำแหน่งที่ 7 และเพิ่มหมู่ ethyl เข้าที่ธาตุไนโตรเจนในตำแหน่งที่ 1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ให้กว้างขึ้นฆ่าจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก แต่จะออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้สารมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน นิยมนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินปัสสาวะในโค สุกร สัตว์ปีก กุ้ง แกะ แพะ ม้า และกระต่าย

2.1.3 **กลไกการทำงานของสารนอร์ฟลอกซาซิน**

สารนอร์ฟลอกซาซิน มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี โดยจะเคลื่อนตัวผ่านชั้น ไลโพโปรตีน (lipoprotein) ของเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ได้ง่ายและรวดเร็ว หลังจากนั้นตัวยาจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของร่างกาย และผ่านเข้าไปในส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของแบคทีเรีย โดยจะไปยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียถูกยับยั้ง ทำให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นไม่เชื่อมติดกัน การเรียงตัวของโครโมโซม (chromosome) ผิดปกติไป ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

2.1.4 **ผลกระทบจากกการใช้สารปฏิชีวนะนอร์ฟลอกซาซิน**

สารนอร์ฟลอกซาซินเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง ทำให้มีการนำไปใช้ในการทำปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างของสารเหล่านี้อยู่ในผลิตภัณฑ์ของสัตว์เพื่อการบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง เกิดอาการ



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารนอร์ฟลอกซาซินและสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บวมที่ริมฝีปาก ลิ้น และใบหน้า กระสับกระส่าย และยังส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ทำให้เกิดอาการปวดหัว อ่อนเพลีย เศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้นจากการใช้สารนอร์ฟลอกซาซินอย่างแพร่หลายทำให้มีรายงานว่าก่อให้เกิดกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย ในส่วนของดีเอ็นเอไจเรส และดีเอ็นเอโทโพไอโซเมอเรส (Ruiz, 2003) และพบว่ามีการดื้อยาของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นหลังจากที่เริ่มมีการนำสารกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาสัตว์ รวมทั้งการดื้อยาของแบคทีเรียในมนุษย์ ซึ่งเชื้อที่มีรายงานว่าพบการดื้อยาแล้ว คือ *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp. ทางองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้ประกาศห้ามใช้สารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนในสัตว์ปีก (FDA , 2000) ส่วนสหภาพยุโรปและประเทศไทยไม่อนุญาตให้มีการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์จากสัตว์สำหรับการบริโภค สำหรับในประเทศญี่ปุ่นได้กำหนดปริมาณการตกค้างในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ที่ใช้ในการบริโภค MRLs (maximum residue limits) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดโดยประเทศญี่ปุ่นสำหรับสารนอร์ฟลอกซาซินตกค้างเนื้อเยื่อต่างๆ

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	MRLs (μg/kg)
สุกร	กล้ามเนื้อ	20
	ไขมัน	20
	ตับ	20
	ไต	20
ไก่	กล้ามเนื้อ	20
	หนังและไขมัน	20
	ตับ	20
	ไต	20
สัตว์ปีกอื่นๆ	กล้ามเนื้อ	100
	ไขมัน	100
	ตับ	100
	ไต	100

(The Japan Food Chemical Research Foundation, 2005)

2.1.5 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซิน

2.1.5.1 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิคทางเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงและให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ โดยแต่ละเทคนิคจะมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ (limit of detection, LOD) แตกต่างกัน ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีจะใช้เวลานานและทำได้ทีละตัวอย่าง กอปรกับเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ทำให้ค่าดูแลรักษาเครื่องมือสูงตามไปด้วย ในการใช้เครื่องมือแต่ละครั้งต้องอาศัยผู้ชำนาญการทำการวิเคราะห์ และยังจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือนั้นๆ อีกด้วย การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิค ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ขีดความสามารถในการตรวจ (ng/g)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
LC-UV	3	ไขมัน กล้ามเนื้อ ไต ตับ ผิวหนัง ของไก่	Anadon และคณะ, 1995
LC-MS	<10	ตับหมู	Vynchta และคณะ, 2002
LC–FI	10	กล้ามเนื้อ และไต ของไก่	Schneider และ Donoghue, 2002
HPLC-FI	2.5	ไขมัน กล้ามเนื้อ และตับของไก่	Kowalski และคณะ , 2005
HPLC-UV	8	กล้ามเนื้อไก่ และไข่แดง	Christodoulou และคณะ, 2007

2.1.5.2 การตรวจวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

จากข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีทำให้มีการพัฒนาการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันโดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน คือ เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) และเทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay, RIA) ซึ่งเทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ทำให้มีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำ ทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว ใช้งานได้ง่าย อีกทั้งยังให้ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี จึงทำให้เทคนิค ELISA นี้เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน ได้มีรายงานของ Huet และคณะ (2006) ทำการผลิตพอลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนอร์ฟลอกซาซินโดยการฉีดกระตุ้นในกระต่าย หลังจากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาผลิตชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ได้มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นเนื้อไก่ ไข่ ไต และผลิตภัณฑ์ทางทะเล นอกจากนี้บริษัทต่างๆ ได้ทำการผลิตชุดตรวจสอบ ELISA ที่ใช้ในวิเคราะห์หาการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินออกมาจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ส่วนเทคนิค RIA เป็นเทคนิคที่มีการติดฉลากด้วย

สารกัมมันตภาพรังสี แล้วติดตามปริมาณสารจากเครื่องนับปริมาณรังสี เทคนิค RIA นี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง โดยให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำแต่เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการตรวจวัดสารกัมมันตภาพรังสีซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการที่จัดไว้โดยเฉพาะเท่านั้น และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้ใช้ได้

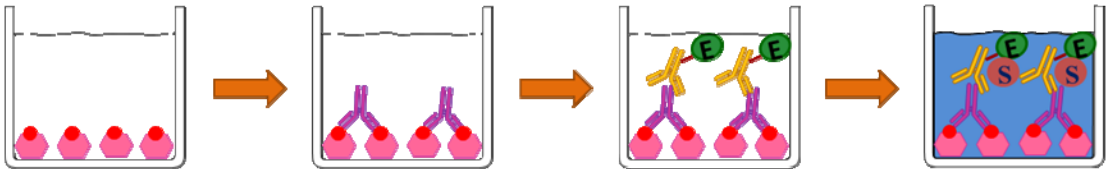
2.1.6 **เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์** (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาแอนติบอดีในซีรัม การตรวจหาซัยโตไคน์หรือฮอร์โมน รวมทั้งหาการตกค้างของสารต่างๆ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะสูง (specificity) และมีความเหนียวแน่นในการจับ (affinity) หลักการของเทคนิค ELISA คือใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับโดยใช้เอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันมีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และยังสามารถดัดแปลงให้ใช้ได้กับเครื่องมืออัตโนมัติได้ทุกขั้นตอน

เทคนิค ELISA สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.1.6.1. indirect ELISA

วิธีนี้ใช้ในการวัดและตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ จะเริ่มจากการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ ทำการเติมตัวอย่างที่มีแอนติบอดีลงไป แอนติบอดีที่จำเพาะเท่านั้นที่จะจับกับแอนติเจนที่เคลือบไว้ ทำการล้างส่วนที่ไม่จำเพาะกับแอนติเจนออกไป แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา โดยถ้าในตัวอย่างมีแอนติบอดีอยู่มาก แอนติบอดีตัวที่สองก็จะจับกับแอนติบอดีตัวแรกได้มาก หลังจากล้างและเติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (รูปที่ 2.3)

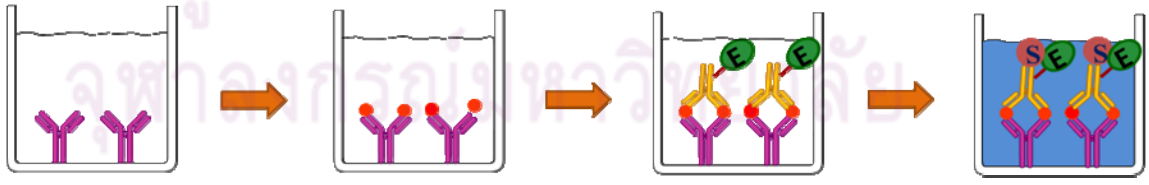


เคลือบพื้นผิวด้วย | เติมตัวอย่างที่มี แอนติบอดี | เติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

รูปที่ 2.3 หลักการของ indirect ELISA

2.1.6.2. sandwich ELISA

วิธีนี้ใช้ในการหาแอนติเจนในตัวอย่าง ซึ่งจะต้องมีแอนติบอดี 2 ตัว ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่อิพิโทป (epitope หรือ antigenic determinant) ที่แตกต่างกัน โดยแอนติบอดีสองตัวจับกับแอนติเจนหนึ่งตัว แบบประกบคู่ จึงเรียกวิธีการนี้ว่า sandwich ELISA โดยเริ่มจากทำการเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนจากนั้นเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดลงไป แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนเช่นกัน และติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปจับกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบนั้น ถ้ามีแอนติเจนอยู่มาก แอนติบอดีตัวที่สองจะจับกับแอนติเจนได้มาก ล้างเอาส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกไป เติมสับสเตรตของเอนไซม์ลงแล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง (รูปที่ 2.4)



เคลือบพื้นผิวด้วย แอนติบอดี | เติมตัวอย่างที่มี แอนติเจน | เติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

รูปที่ 2.4 หลักการของ sandwich ELISA

2.1.6.3. competitive ELISA

competitive ELISA เป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยทำการกำหนดให้สารตัวใดตัวหนึ่งมีปริมาณคงที่ทำให้เกิดการแข่งขันกันขึ้น ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน สามารถติดฉลากด้วยเอนไซม์ได้ทั้งที่แอนติบอดีหรือแอนติเจน ถ้าใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะทำการเคลือบพื้นผิวจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดี และทำการเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไปพร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาณแอนติเจน หากในตัวอย่างมีแอนติเจนจะเกิดการแย่งกันระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างและแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการจับกับแอนติบอดีที่เคลือบพื้นผิวจาน ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีได้น้อยลง เมื่อล้างเอาแอนติเจนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไปแล้ว เติมสับสเตรตของเอนไซม์จะสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นปริมาณผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 2.5 (ก))

ถ้าใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการตรวจวัดแอนติเจน จะทำการเคลือบพื้นผิวจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน และทำการเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไปพร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบปริมาณแอนติเจน หากในตัวอย่างมีแอนติเจนที่ต้องการทดสอบจะเกิดการแข่งขันกับแอนติเจนที่เคลือบผิวจานในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณแอนติเจนมาก จะจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์มาก ทำให้แอนติบอดีที่ติดฉลากจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่ในหลุมได้น้อย ส่งผลให้ในปฏิกิริยามีแอนติบอดีที่ติดฉลากน้อย เมื่อเติมสับสเตรตของเอนไซม์ แล้ววัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีจะเป็นค่าผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่นำมาทดสอบ เช่นเดียวกันกับการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์ (รูปที่ 2.5 (ข))

นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมชุดตรวจสอบโดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป ซึ่งแอนติบอดีจะจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ (รูปที่ 2.5 (ค))

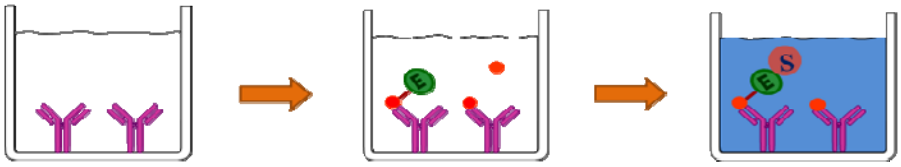
ในการทดสอบเพื่อหาปริมาณของแอนติเจนด้วยวิธีเหล่านี้ จำเป็นต้องมีการสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตของเอนไซม์กับแอนติเจนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อต้องการหาปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง นำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะรู้ปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างได้ การตรวจสอบด้วยวิธี competitive ELISA มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยการติดฉลากแอนติเจนด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนการติดฉลากแอนติเจนอาจมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอิพิโทป ในตำแหน่งที่แอนติบอดีจับ ทำให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเปลี่ยนแปลงได้

2.1.7 **องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ** ELISA

2.1.7.1 **แอนติบอดี** (antibody)

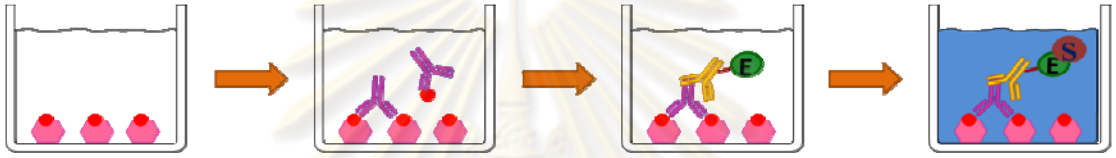
แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; Ig) เป็นไกลโคโปรตีน ที่สร้างจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบได้ในเลือดหรือของเหลวในร่างกาย มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส แอนติบอดีถูกหลั่งมาจากเซลล์พลาสมาที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ แอนติบอดีที่ถูกหลั่งออกมาจะเข้าสู่กระแสโลหิตและเข้าไปทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดจะสามารถจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันที่เรียกว่าแอนติเจน (antigen) โดยแอนติบอดีจะจับแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีตรงบริเวณอิพิโทป (epitope) ของแอนติเจน ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ การเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่สนใจสามารถทำได้โดยฉีดโปรตีนหรือเพปไทด์ ซึ่งเราเรียกว่าแอนติเจนเข้าไปในสิ่งมีชีวิต เช่น หนู กระต่าย แพะ หรือ แกะ เป็นต้น แอนติเจนซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ต่อมาระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune system) ของสัตว์เหล่านี้ก็จะสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y shape) ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ แอนติบอดี 1 โมเลกุล (รูปที่ 2.6) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ สายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน ส่วนอีก 2 สายที่สั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเรียกว่า Light chain (L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สายเช่นเดียวกัน

(ก)



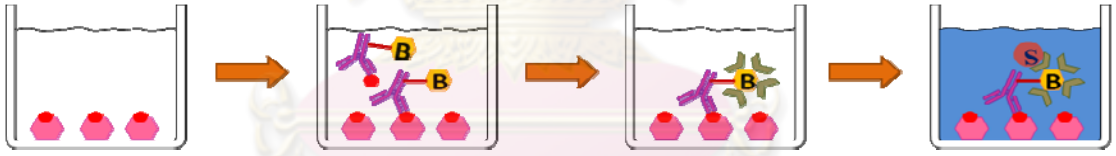
เคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดี | เติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไปพร้อมกับแอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

(ข)



เคลือบพื้นผิวด้วยแอนติเจน | เติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไปพร้อมกับแอนติบอดี | เติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

(ค)



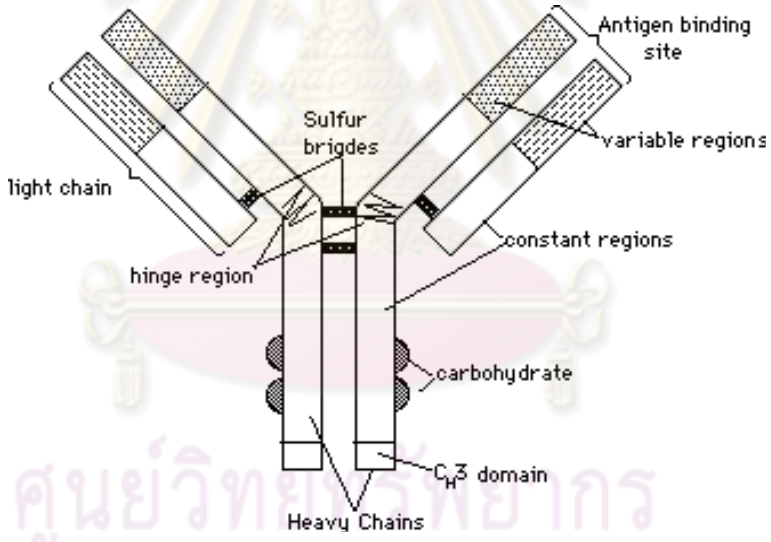
เคลือบพื้นผิวด้วยแอนติเจน | เติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับ biotin | เติม streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

รูปที่ 2.5 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และ (ข) แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ค) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin

(หมายเหตุ คือแอนติบอดี, คือแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน, คือแอนติเจนในรูปอิสระ, คือแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin, คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือสับสเตรต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

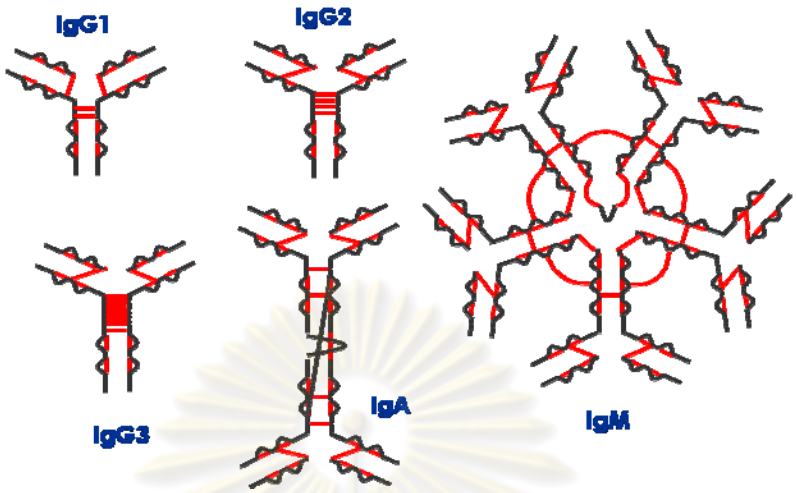
โดย Heavy chain และ Light chain ทั้ง 4 สายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์สามารถถูกทำลายได้ด้วยสาร reducing agent เช่น เมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของแต่ละสายจะเป็น -NH_2 นิยมเรียกว่า N หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น - COOH นิยมเรียกว่า C หรือ carboxy terminal ทั้ง 4 สายจะหันปลายข้าง - NH_2 หรือ - COOH ไปทางเดียวกัน โมเลกุลของแอนติบอดีมีบริเวณที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น ได้มากทำให้แขนทั้ง 2 ข้าง ยืดห่างออกจากกันเพื่อจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น สามารถแบ่งแอนติบอดีโดยอาศัยความแตกต่าง H-chain ได้เป็น 5 ไอโซไทป์ คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE แอนติบอดีสามารถแบ่งออกตามลักษณะเด่นได้ออกเป็น คือ พอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

(แหล่งที่มา http://8e.devbio.com)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแอนติบอดีไอโซไทป์ต่างๆ

2.1.7.1.1 พอลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody)

เป็นกลุ่มแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในความจำเพาะกับแอนติเจน โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ อิพิโทปบนแอนติเจนได้หลายตำแหน่ง เนื่องจากแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์หลายๆ โคลน (บี-ลิมโฟไซต์ 1 โคลน สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้ 1 ชนิด) สัตว์ที่นิยมใช้ในการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีมักเป็นสัตว์ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เช่น กระต่าย แพะ ม้า เป็นต้น

2.1.7.1.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจากเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์เริ่มต้นเซลล์เดียว (single clone หรือ monoclone) เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีลักษณะที่สำคัญคือ มีความจำเพาะสูงต่ออิพิโทปของแอนติเจนชนิดหนึ่งชนิดใดของแอนติเจนเท่านั้น (Nelson และคณะ, 2000) เซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้เจริญเติบโตได้ด้วยการหลอมรวมเซลล์ 2 เซลล์เข้าด้วยกัน โดยเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ ส่วนอีกเซลล์หนึ่ง

สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง หลังจากหลอมรวมเซลล์จะได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดี และมีชีวิตยืนยาว (immortalize) สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่มีสิ้นสุด แบ่งตัวและหลั่งแอนติบอดีออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถเก็บเซลล์นี้แบบถาวรได้ และนำกลับมาเพาะเลี้ยงได้อีก เพื่อให้เซลล์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกในปริมาณและเวลาที่ต้องการ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตเป็นชนิดเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

ในชุดตรวจสอบส่วนใหญ่นิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากว่ามีความจำเพาะมากกว่า และสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้การผลิตชุดตรวจสอบได้ เมื่อเปรียบเทียบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับพอลิโคลนอลแอนติบอดีพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีจุดเด่นต่างๆ ดังนี้

1. ใช้แอนติเจนน้อยและไม่ต้องบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้น

โดยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูอาจใช้แอนติเจนในปริมาณ 100 ไมโครกรัม หรือน้อยกว่าก็ได้ต่อการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง โดยที่แอนติเจนนั้นมีความบริสุทธิ์พอประมาณ เนื่องจากสามารถเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ในระหว่างขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์

2. มีความเป็นมาตรฐาน

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกันเป็นมาตรฐานในทุกครั้งการผลิตเนื่องจากเซลล์ที่ใช้ผลิตแอนติบอดีในแต่ละครั้งมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน ซึ่งการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมักมีปัญหาเนื่องจากสมบัติไม่ค่อยคงที่ในแต่ละครั้งที่ผลิต และจุดเด่นอีกประการของโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถผลิตได้ในปริมาณที่ต้องการไม่จำกัด ดังนั้นความเป็นมาตรฐานของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีสูงมาก

3. มีความจำเพาะสูง

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำอันตรกิริยากับอิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์หรือศึกษาลักษณะของโมเลกุลของแอนติเจนได้ ในขณะที่พอลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะแต่ละอิพิโทปบนแอนติเจนจึงสามารถทำปฏิกิริยาได้กับอิพิโทปหลายตำแหน่งบนแอนติเจน

4. มีสัมพรรคภาพสูง

ในวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพสูงต่อแอนติเจนได้ ซึ่งสัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพนี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในความเข้มข้นที่ถูกเจือจางลง ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวนในการทดลองลงได้ และยังสามารถนำไปใช้ในการทำแอนติเจนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity chromatography

5. สามารถเก็บรักษาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีได้อย่างถาวร

สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้เป็นเวลานานในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทุกเมื่อต้องการ

2.1.7.2 แอนติเจน (antigen)

แอนติเจน คือ สารที่สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้สร้างแอนติบอดี และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดี และยังมีคุณสมบัติที่สามารถจดจำสารนั้นได้ แอนติเจนเป็นส่วนที่ต้องการการตรวจหาเมื่อมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น หรือเป็นส่วนที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น แอนติเจนมีความสำคัญ เนื่องจากในชุดตรวจ ELISA อาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นกลไกหลักในการตรวจ แอนติเจนขนาดเล็กที่เรียกว่าแฮปเทน (hapten) มักต้องทำการเชื่อมต่อเข้ากับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า เช่น โปรตีน ในลักษณะของ hapten carrier conjugate เพื่อชักนำในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่าอิมมูโนเจน (immunogen)

2.1.7.3. เอนไซม์ (enzyme)

เอนไซม์เป็นส่วนสำคัญของชุดตรวจ ELISA ซึ่งอยู่ในส่วนของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยาใช้โดยการเชื่อมหรือติดฉลากเข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัดเอนไซม์ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ horseradish peroxidase (HRP) และ alkaline phosphatase (AP)

Horseradish peroxidase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44 กิโลดาลตัน ได้จากส่วนรากของต้นหัวไชเท้า (*Amoracia rusticana*) เอนไซม์จะถูกออกซิไดส์ด้วย hydrogen peroxide เกิดเป็น oxidized horseradish peroxidase ซึ่งสามารถออกซิไดส์

สับสเตรตที่เหมาะสมทำให้มีสีที่เปลี่ยนแปลงไป การเชื่อมหรือติดฉลากเอนไซม์ HRP เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้โดยอาศัย กรดอะมิโน lysine 4 ตัวที่อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์นี้

Alkaline phosphatase (AP) เป็นเอนไซม์ที่ได้จาก bovine intestinal mucosa และเตรียมจาก *E. coli* โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม มีขนาด 84 กิโลดาลตัน เป็นไกลโคโปรตีนไดเมอร์ เอนไซม์ทำหน้าที่คะตะไลซ์ (catalyze) เกิดไฮโดรไลสิส (hydrolysis) ของ phosphate ester บนสับสเตรต ทำให้มีสีเกิดขึ้น บนโมเลกุลของ AP มีหมู่อะมิโนจำนวนมากสำหรับการเชื่อมต่อกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี

นอกจากนี้ยังมีระบบของ biotin / streptavidin เป็นระบบตรวจวัดสัญญาณโดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin สามารถเพิ่มความแรงของสัญญาณให้ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้น biotin เป็นวิตามินชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติจับกับสารอื่นๆ ได้ ในตอนแรกใช้ในการจับกับ avidin ที่ได้จากการไข่ขาว ต่อมา avidin ถูกแทนที่ด้วย streptavidin ซึ่งได้จากแบคทีเรีย ซึ่งให้ความแรงของสัญญาณที่เพิ่มมากขึ้น

2.1.7.4. สับสเตรต (substrate)

การวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์จะต้องใช้สับสเตรตเป็นตัววัด สามารถเลือกใช้ได้ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้และวิธีการตรวจวัด ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดของชุดตรวจ ELISA คือ colorimetry, fluorometry และ chemiluminescence วิธีการตรวจวัดที่เป็นที่นิยมที่สุดคือ colorimetry

Colorimetry เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่เกิดจากเอนไซม์ แล้วทำการอ่านผลด้วยตาหรือใช้เครื่องมือที่อ่านค่าความดูดกลืนแสง (spectrophtometer หรือ ELISA reader) ทำได้ง่ายและสะดวก สับสเตรตที่ทำให้เกิดสีในวิธีนี้เรียกว่า chromogenic substrate ซึ่งเดิมไม่มีสีแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะให้สีเข้มขึ้น สับสเตรตแต่ละชนิดจะอ่านผลที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน ที่นิยมใช้ในชุดตรวจ ELISA ที่ใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase ได้แก่

ATBS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียว อ่านผลที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

OPD (*O*-Phenylenediamine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง อ่านผลที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง อ่านผลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ส่วนในชุดตรวจ ELISA ที่ใช้เอนไซม์ alkaline Phosphatase (AP) สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่

PNP (p-nitrophenyl phosphate) อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

PMP (phenolphthalein monophosphate) อ่านผลที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

1NP (1-napthyl phosphate) อ่านผลที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

2.1.7.5 พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึง (solid support)

ชุดตรวจ ELISA จะใช้การยึดตรึงหรือเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวในรูปแบบของ Solid phase ก่อน เรียกว่า coating หรือ immobilization หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยาตามลำดับขั้นตอน แล้วอ่านผลของปฏิกิริยานั้น การใช้พื้นที่ผิวในการยึดตรึงช่วยให้ขั้นตอนล้างเอาสารเกินออกได้ดีขึ้น ทำให้ลดการเกิด background ได้ และอ่านผลของปฏิกิริยาได้สะดวกขึ้น ซึ่งรูปแบบการใช้พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึงในชุดตรวจ ELISA มีหลายแบบ ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันคือ ชนิดจานเคลือบ 96 หลุม (96-well plate) ทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็น ออร์แกนิกพอลิเมอร์ (organic polymer) จะมีคุณสมบัติให้การโปร่งแสงที่ดี ใช้กับเครื่องอ่าน spectophptometer ได้สะดวก โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะจับกับชนิดจานเคลือบ 96 หลุมด้วย noncovalent binding

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากสารนอร์ฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีการนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องมีการตรวจหาการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธีต่างๆ

เทคนิคทางเคมีที่เป็นที่นิยม ได้แก่ เทคนิค HPLC โดย Christodoulou และคณะ (2007) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินและสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ตกค้างในกล้ามเนื้อไก่ และ ไข่แดง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 reversed-phase และใช้สารละลายตัวพาเป็นน้ำ และ acetronitrile ในอัตราส่วน 85:15 ปริมาตรโดยปริมาตร แล้วทำการติดตามด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด UV ที่ความยาวคลื่น 255 และ 275 นาโนเมตร สามารถวัดปริมาณที่น้อยที่สุดในกล้ามเนื้อไก่ได้เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม และในไข่แดงได้เท่ากับ 8 นาโนกรัมต่อกรัม นอกจากนี้

ยังมีการใช้เทคนิค LC-MS โดยการใช้ C18 reversed-phase column เช่นเดียวกัน ทำการตรวจวัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างนมโค โดยสารละลายตัวพาที่ใช้คือ acetronitrile และเมทานอล ในอัตราส่วน 60:40 ปริมาตรโดยปริมาตร มีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.064 นาโนกรัมต่อกรัม

ต่อมา Bucknall และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน คือ สารนอร์ฟลอกซาซิน เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) ฟลูเมควิน (flumequin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) โดยเชื่อมสารต่างๆในกลุ่มเข้ากับ ovalbumin แล้วฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแกะ จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจ พบว่าได้ชุดตรวจสอบแบบที่จำเพาะโดยใช้แอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน ฟลูเมควิน และกรดนาลิดิซิก และชุดตรวจสอบแบบ generic test โดยใช้แอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินและพบว่ามีการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มอยู่ในช่วง 1%-143% และนำมาทดสอบในตัวอย่างน้ำนมโค และไตของแกะ มีปริมาณที่น้อยที่สุดที่วัดได้ เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ในปี 2006 Huet และคณะ ได้ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะฟลูออโรควิโนโลน ได้แก่ สารนอร์ฟลอกซาซิน และซาราฟลอกซาซิน โดยการเชื่อมต่อสารเหล่านี้ด้วยโปรตีนตัวพา (carrier protein) นำไปฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายจากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนา เป็นชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA และนำไปตรวจสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม ได้แก่ ดาโนฟลอกซาซิน มาโบฟลอกซาซิน โอฟลอกซาซิน ฟลูเมควิน กรดออกโซลินิก ซินอกซาซิน ไดฟลอกซาซิน และอินอกซาซิน พบว่าแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน และแอนติบอดีต่อซาราฟลอกซาซินเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม จากนั้นนำมาทดสอบในตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่ ไตของหมู ผลิตภัณฑ์จากทะเล และไข่ พบว่ามีปริมาณที่น้อยที่สุดที่วัดได้ เท่ากับ 0.5, 0.6, 0.7, และ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ต่อมาในปี 2007 Kato และคณะได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินด้วยการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c ด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ KLH (keyhole limpet haemocyanin) นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาเตรียมชุดตรวจสอบต่อสารในกลุ่มควิโนโลนโดยใช้สารนอร์ฟลอกซาซินเป็นสารมาตรฐานในชุดตรวจสอบ มีค่า LOD เท่ากับ 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าปฏิกิริยาข้ามต่อเอนโรฟลอกซาซิน ซิโพรฟลอกซาซิน 100% นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลน

Tittlemier และคณะ (2008) ได้มีการศึกษาและผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน แล้วนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่วัดได้ในตัวอย่างเนื้อกุ้งเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นนำมาทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกับสารเอนโรฟลอกซาซิน ซิโปรฟลอกซาซิน ไดฟลอกซาซิน และซาราฟลอกซาซิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันกับสารนอร์ฟลอกซาซิน พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาข้ามมากกว่า 10 เปอร์เซนต์

เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดการตกค้างของสารนอร์ฟลอกซาซินทั้งเทคนิคทางเคมีและเทคนิค ELISA พบว่าเทคนิค ELISA มีข้อได้เปรียบ คือ จะมีความไวสูง ให้ผลตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีการผลิตชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้หลักการ ELISA ออกมาจำนวนมาก ซึ่งในประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาจำหน่าย ตัวอย่างเช่นชุดตรวจที่มีชื่อทางการค้าว่าชุดตรวจฟลูออโรควิโนโลน ผลิตโดยบริษัท Euro-Diagnostica B.V. (Netherland) สามารถตรวจติดตามสารนอร์ฟลอกซาซินในเนื้อ น้ำนม ไข่ ปัสสาวะ น้ำผึ้ง และซีรัม โดยพบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในกล้ามเนื้ออยู่ที่ 12 นาโนกรัมต่อกรัม ในน้ำนมอยู่ที่ 3 นาโนกรัมต่อกรัม ในไข่อยู่ที่ 6 นาโนกรัมต่อกรัมในปัสสาวะอยู่ที่ 7 นาโนกรัมต่อกรัม ในน้ำผึ้งอยู่ที่ 3 นาโนกรัมต่อกรัม และในซีรัมอยู่ที่ 2.5 นาโนกรัมต่อกรัม ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน คือ ซิโพรฟลอกซาซิน เท่ากับ 124% เอนโรฟลอกซาซิน เท่ากับ 92% โอฟลอกซาซิน เท่ากับ 18% ดาโนฟลอกซาซิน เท่ากับ 89% อินอกซซินและกรดออกโซลินิก เท่ากับ 57% นาดิฟลอกซาซิน เท่ากับ 85% กรดไพโรมิดิก เท่ากับ 62% โลมีฟลอกซาซิน เท่ากับ 40% มาโบฟลอกซาซิน เท่ากับ 16% กรดไพเพอร์มิดิก เท่ากับ 5% ซาราฟลอกซาซิน เท่ากับ 4% ฟลูมิควิน เท่ากับ 2% ส่วน ซินอกซาซิน โทซูฟลอกซาซิน และกรดนาลิดิซิกให้ค่าน้อยกว่า 0.1% และชุดตรวจฟลูออโรควิโนโลน ที่ผลิตโดยบริษัทอะบราซิส มีช่วงมาตรฐานอยู่ที่ 0.1 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจติดตามสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ในน้ำนม เนื้อ ปลา กุ้ง และน้ำผึ้ง โดยพบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในน้ำนมอยู่ที่ 1 นาโนกรัมต่อกรัม ในเนื้อ ปลา กุ้ง และน้ำผึ้ง อยู่ที่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากชุดตรวจที่ใช้อยู่ภายในประเทศต้องนำเข้าจากต่างประเทศ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบดังกล่าวขึ้นสำหรับใช้ในประเทศ ซึ่งสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ประสบผลสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน จากการกระตุ้นหนู

ด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมกับโปรตีน KLH โมโนโคนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น IgG1 แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ได้นี้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนได้หลายชนิดจึงเหมาะสำหรับนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนได้หรือที่เรียกว่า generic test ด้วยเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ไฮบริโดมา

ตารางที่ 3.1 เซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมา	แหล่งที่มา
1.เซลล์ไฮบริโดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน (nor#155)	หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
2. เครื่องมือ	
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น TMS	Nikon Corporation, Japan
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator)	D.S.C. group Co.,Ltd, Taiwan
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	Corning, USA
- เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-S และรุ่น AG204	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy™ HT	BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35	M.S.E. LTD, England
- เครื่อง microplate reader	Titertek multiskan, Finland
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato Scientific Co.,Ltd., Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-124	International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
- ปิเปตต์อัตโนมัติ (auto pipette)	Gilson, France
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	Memmert, Germany
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	Boro, Germany
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
- ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน (Spinner culture vessel and biological stirrer) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Techne, USA
- ปิเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	HBG, Germany
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
1. Acetonitrile	เฟสเคลื่อนที่ใน HPLC	Sigma-Aldrich, USA
2. Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide	เชื่อมต่อกับแอนติบอดี	Zymed, USA
3. 1-Aminohydantonin (AHD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
4. 3-Amino-2oxazolidone (AOZ)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
5. Ammoniumpersulfat (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
6. BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Thermo scientific, USA
7. Bovine serum albumin	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมกับนอร์ฟลอกซาซิน	Sigma-Aldrich, USA
8. Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
9. Chloramphenical	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
10. Cinoxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
11. Ciprofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
12. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
13. Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
14. CoomassieBrilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce, USA
15. Dichloromethane	สกัดตัวอย่างจากเนื้อไก่	Ajax Finechem, Australia
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	Fluka, Switzerland
17. Disodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carloerba, USA
18. Enoxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
19. Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
20. Ethanol	ตัวทำละลาย	BDH, England
21.1-Ethy-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	สารเชื่อมต่อ	Sigma-Aldrich, USA
22. Fetal calf serum (FCS)	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Invitromex, USA
23. Flumequine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
24. Furazolidone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
25. Hydrochloric acid (HCL)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
26. Hydrogen peroxide (H_2O_2)	เตรียมสับสเตรต	Fluka, Switzerland
27. L-Glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
28. Methanol	ตัวทำละลาย	BDH, England
29. N-Hydroxysuccinimide (NHS)	สารเชื่อมต่อ	Fluka, China
30. Nalidixic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
31. Norfloxacin	เป็นแฮบเทนและทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
32. Ofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
33. *O*-phenylenediamine	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	Abkem Iberia S.L., Spain
34. Oxolinic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
35. Oxytetracycline	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
36. Peroxidase-Goat Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	Jackson Immuno Research, USA
37. Penicllin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
38. Pipermidic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
39. Progesterone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
40. RPMI 1640 medium	อาหารเลี้ยงเซลล์	Biochrom AG, Germany
41. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
42. Sodium bicarbonate ($NaCO_3$)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
43. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Merck, Germany
44. Sodium chloride (NaCl)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
45. Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
46. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDSPAGE	Sigma-Aldrich, USA
47. Streptomycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
48. Sulfamethazine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
49. Sulfuric acid (H_2SO_4)	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck, Germany
50. Tetracyclin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
51. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	Sigma-Aldrich, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

52. Hydroxymethyl aminomehane (Tris)	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
53. Tween 20	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
54. นมพร่องมันเนย (skim milk)	ทดสอบ ELISA	Mission health food, Thailand

3.4 การดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อสารนอร์ฟลอกซาซินมีรหัสไฮบริโดมา รหัสโคลน nor#155 ออกจากไนโตรเจนเหลว นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสทันที หลังจากนั้นทำการถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ไว้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงไว้ประมาณ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด จึงทำการย้ายเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร โดยแบ่งใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนแอนติบอดีต่อไป และอีกส่วนนำไปเก็บอย่างถาวรในไนโตรเจนเหลว

3.4.1.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดรมาอย่างถาวร

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 ที่แบ่งใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร 1 ขวด มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ขณะเย็น ลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็ง นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่ง DMSO ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกอันจะส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายระหว่างการแช่เย็น

3.4.1.3 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 ที่แบ่งใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร 1 ขวด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ปริมาตรประมาณ 1,500 มิลลิลิตร แล้วจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีอยู่ไว้เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.2 การเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินกับ BSA

ในการเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินกับ BSA ทำการเชื่อมต่อด้วยวิธี cabodiimide โดยใช้ EDC และ NHS เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำสารนอร์ฟลอกซาซิน 20 มิลลิกรัม NHS 10 มิลลิกรัม และ EDC 12.5 มิลลิกรัม ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตร เขย่าช้าๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA 50 มิลลิกรัมใน 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปทีละหยด กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน (Els Van และคณะ, 2004)

3.4.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน ด้วยวิธี indirect ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุม ด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (PBST) 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:5 – 1:1,600 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) เชื่อมอยู่ (GAM-HPR) ที่เจือจาง 1:5,000 เท่า ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M phosphate citrate buffer pH 5.0 หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4.4 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4.4.1 การทำแอนติบอดีให้เข้มข้น

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากไฮบริโดรมาโคลน nor#155 มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ซึ่งเป็นไอโซไทป์ที่สามารถจับกับ protein A ได้น้อยกว่าไอโซไทป์อื่นๆ จึงต้องทำการเพิ่มความสามารถในการจับระหว่างแอนติบอดีและ protein A โดยเริ่มจากการทำ อาหารเลี้ยงเซลล์ให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำ ultrafiltration จากนั้นทำการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 M นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปผ่าน protein A sepharose ในข้อ 3.4.2.2 (Johnstone และ Thrope, 1987)

3.4.4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography

protein A มีขนาด 42 กิโลดาลตัน เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถทำจับกับแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ IgG2a ได้ดีที่สุด รองลงมาคือไอโซไทป์ IgG2b, IgG3 และ IgG1 ตามลำดับ โดยจับกับแอนติบอดีที่บริเวณ Fc ของโมเลกุลแอนติบอดี ซึ่งอาศัยหลักการของ affinity chromatography โดย protein A จะสามารถเกิดอันตรกิริยาได้ดีที่สุดที่ค่า pH 9.0 และเมื่อค่า pH ลดต่ำลงอันตรกิริยาระหว่าง protein A กับแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพต่ำลง จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกได้ โดยมีวิธีการทำดังนี้

นำ protein A sepharose 0.5 กรัม มาทำให้พองตัว (swell) โดยแช่ใน PBS 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปบรรจุใส่คอลัมน์ จากนั้นปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 M Tris buffer, pH 9.0 แล้วเติมลงในคอลัมน์ ปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 M citrate buffer, pH 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองที่มี 1 M Tris buffer, pH 9.0

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 8.0 โดยเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน (Hudson และ Hay, 1980)

3.4.5 การหาปริมาณโปรตีน

3.4.5.1 การวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี ด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี โดยการใช้ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE โดยเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A และ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA เจือจางที่ความเข้มข้น 0-1200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (แอนติบอดีทั้งก่อนและหลังจากทำให้บริสุทธิ์) เจือจางที่ความเจือจาง 2, 4, และ 8 เท่าใน PBS แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5.2 การหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

การหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง สามารถวัดได้หลังจากแอนติบอดีผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเท่านั้น เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีโปรตีนชนิดต่างๆ อยู่เป็นจำนวนมากอาจทำให้การคำนวณหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีผิดพลาดไป ขั้นตอนในกาวัดค่าการดูดกลืนแสงจะเริ่มจากนำแอนติบอดีที่ไดแอไลซ์แล้วมาเจือจาง 1:2-1:32 เท่า จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และ

นำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีจากสูตร (Johnstone และ Thrope, 1987)

ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(OD_{280} \times 1.55) - (OD_{260} \times 0.77)$

3.4.6 การหาปริมาณแอนติบอดี

3.4.6.1 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ทำการหาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยการนำสารละลายแอนติบอดีที่ไดแอไลซ์แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{OD_{280}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1.35

3.4.6.2 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

นำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วและก่อนทำให้บริสุทธิ์ มาเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยวิธี indirect ELISA สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำเป็นแอนติบอดีมาตรฐาน ทำการหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

3.4.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์นิยมใช้เทคนิค SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ซึ่งมีหลักการคือ ใช้สนามไฟฟ้าแยกโปรตีนผ่านเจลพอลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่งมีรูพรุนขนาดต่างๆ กัน โดยโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับ 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) ทำให้พันธะไดซัลไฟด์แตกออก และโปรตีนถูกทำให้มีประจุเป็นลบโดย SDS ทำให้โปรตีนที่มีขนาดต่างกัน จะมีการเคลื่อนตัวที่ไม่เท่ากัน โปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลกว่า หลังจากทำอิเลคโทรฟอเรซีส (electrophoresis) นำเจลมาย้อมสีหาแถบโปรตีน ทำการหาระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน และเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้

การเตรียมเจลเพื่อใช้แยกแอนติบอดี จะเตรียม 10% separating gel (แสดงในภาคผนวก ข) ด้วย Miniprotean II Dual Slab Cell Bio-Rad โดยมีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตรและหนา 0.75 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ separating gel เกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ เทน้ำกลั่นทิ้งแล้วเติม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel ใส่หวีลงในส่วน stacking gel ตั้งทิ้งไว้ให้ stacking gel เกิด เกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์

ทำการแยกแอนติบอดีโดย นำชุดของเจลที่เตรียมได้ไปใส่ในเครื่องทำอิเลคโทรฟอเรซีส (electrophoresis chamber) ที่มีอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer) ทั้งส่วนบนและล่างของเครื่อง นำตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์และหลังทำให้บริสุทธิ์ มีปริมาณโปรตีนรวมหลุมละ 5 ไมโครกรัม มาเติมสีย้อมที่มีองค์ประกอบเป็น beta-mercaptoethanal, SDS และ bromophenal blue ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมลงใจหลุมเจล ส่วนหลุมของโปรตีนมาตรฐานจะเติม 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีย้อมเคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุด

ให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue เป็นเวลา 15 นาที และล้างสีออกจนหมดด้วยสารละลาย destaining

3.4.8 การทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เตรียมสารนอร์ฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับแอนติบอดีโดยผสมในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.3 โดยทำการเติมแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แทนอาหารเลี้ยงเซลล์

3.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบทั้งหมด 3 แบบ คือ

- Direct competitive ELISA (Ag captured)
- Indirect competitive ELISA (Ab captured)
- Direct competitive ELISA (Ab captured)

3.5.1 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) เริ่มจากการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ กันใน PBS ลงไปพร้อมกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (hoseradish peroxidase, HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่ง

ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) นี้จะต้องทำการเตรียมสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ HRP เพื่อใช้เป็นตัวแข่งขันกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.5.1.1 การเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินกับเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (norfloxacin-HRP)

การเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินเข้ากับเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (norfloxacin-HRP) ทำได้โดยอาศัยเทคนิคคาร์โบไดไมด์ (cabodiimide) นำสาร NHS 12.36 มิลลิกรัม และ EDC 6.9 มิลลิกรัม มาละลายใน DMF 0.5 มิลลิลิตร นำมาเติมลงในสารนอร์ฟลอกซาซิน 2 มิลลิกรัมที่ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย HRP 9.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน (Bucknall และคณะ, 2003)

3.5.1.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

หลังจากทำการเชื่อมต่อสารนอร์ฟลอกซาซินกับเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดสแล้ว จะต้องทำการหาอัตราส่วนของแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่ทำปฏิกิริยาเหมาะสม ด้วยวิธี direct ELISA ก่อนที่จะนำมาทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่อง

มันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร และทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:25,000–1:400,000 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.1.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจจะศึกษาถึงความสามารถของชุดตรวจในการที่จะบ่งบอกถึงการมีสารปรากฏในตัวอย่าง โดยจะแสดงอยู่ในรูปของค่าขีดจำกัดในการวัด (limit of detection, LOD) หรือปริมาณต่ำสุดของสารที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบได้ และในรูปของค่า IC_{50} หรือปริมาณของสารที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง B/B_0 ลดลงครึ่งหนึ่ง โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$LOD = B_0\text{-}3SD$$

$$IC_{50} = 50\%\ B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

โดยทำการแปรความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับแอนติบอดีและสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เลือกมาทั้ง 3 ค่า ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีสาร

นอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วนที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบแบบอื่นต่อไป

3.5.2 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured)

ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวจานชนิด 96 หลุม ด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ทำการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู ที่ทำการเชื่อมต่ออยู่กับเอนไซม์ HRP (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 เท่า ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ทำโดยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0078, 0.015, 0.031, 0.062, 0.125 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) ศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2.1 มาทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.5.3 การออกแบบชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured)

ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) เตรียมโดยทำการเคลือบสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA บนพื้นผิวของจานชนิด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1:4,000 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.3.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน

ทำการเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน โดยเริ่มจากนำแอนติบอดีความเข้มข้น 0.693 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรไปไดแอไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer pH 8.4 ข้ามคืน แล้วทำการเติมไบโอติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO ทีละหยด กวนเบาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปไดแอไลซิสใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน (คู่มือการใช้งานสาร Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide ของบริษัท Zymed)

3.5.3.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม และนำไปเตรียมชุดตรวจสอบ ทำโดยการแปรความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0078, 0.015, 0.031, 0.062 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000 และ 1:64,000 เท่า แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี direct ELISA โดยเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวของจานชนิด 96 หลุมด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ลงไปที่ความเข้มข้น 1:4000 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มนาน 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.3.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) ศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ โดยนำอัตราส่วนระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ได้จากข้อ 3.5.3.2 มาทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.6 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured)

จากการเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบข้างต้น กับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ พบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความเหมาะสมมากที่สุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) จึงนำมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยทำการศึกษาในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเคลือบผิวของจานชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร และทำการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจางที่ความเข้มข้น 1:200,000 เท่า หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100

ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.6.2 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRPและสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ในการเตรียมชุดตรวจสอบ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ คือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งในการปฏิบัติงานจริงจะต้องเตรียมชุดตรวจสอบให้สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จึงทำการแปรอุณภูมิและเวลา ดังในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้นำไปทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ภาวะ	เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม
1	2	37 องศาเซลเซียส
2	1	37 องศาเซลเซียส
3	2	อุณหภูมิห้อง
4	1	อุณหภูมิห้อง

3.6.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซิน

เพื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ทำการทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ตามวิธีในข้อ 3.5.1 สารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) โอฟลอกซาซิน (ofloxacin) กรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) อินอกซาซิน (enoxacin) กรดไปเปอร์มิดิก (pipermidic acid) ฟลูเมควิน (flumequine) ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) กรดโอโซลินิก (oxolinix acid) และซินอกซาซิน (cinoxacin)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนสารนอกกลุ่มที่นำมาทดสอบมีดังนี้ เพนิซิลลินจี (penicillin G) เตตราไซคลิน (tetracycline) ออกซิเตตราไซคลิน (oxytetracycline) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ฟูราโซลิโดน (furazolidone) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) โพรเจสเตอร์โรน (progesterone) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิโด (3-amino-2-oxazolido) 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-Aminohydantoin) ซัลฟาเมทราซีน (sulfamethazine) เคลนบูเทรอล (clenbuterol) และซัลบูทามอล (salbutamol) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดเป็น 50% B/B_0

$$IC_{50} = 50\%\ B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบต่อสารนอร์ฟลอกซาซินและทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity, %CR) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50}\ \text{ของนอร์ฟลอกซาซิน} \times 100}{IC_{50}\ \text{ของสารที่ทดสอบ}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.7.1 การหาค่าความไว (sensitivity)

ทำการหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยรายงานเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง (Limit of

Quantitation; LOQ) หรือ ซึ่งค่า LOD และ LOQ หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือ ค่าความไวของชุดตรวจสอบ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินและแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$

$$LOD = B_0 - 3SD$$

$$LOQ = B_0 - 10SD$$

เมื่อ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.7.2 การหาค่าความแม่นยำ (precision)

การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ ศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้ง การทดลอง (inter-variation assay) ดังนี้

3.7.2.1 intra-variation assay

เป็นการดูความแปรปรวนของการตรวจวัดของชุดตรวจสอบในจานทดสอบ ELISA เดียวกัน จากการทดลองในขั้นตอน 3.5.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Intra-variation assay ของชุดตรวจสอบโดยทำการหาค่า mean SD และ %CV ของ 9 ซ้ำนั้น (ธารารัชต์, 2545)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

เมื่อ mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรโดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) เมื่อมีสารนอร์ฟลอกซาซินและไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

%CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.7.2.2 inter-variation assay

เป็นการดูความแปรปรวนในการวิเคราะห์ระหว่างชุดของการทดลองที่ทำที่เวลาและจานทดสอบ ELISA ที่ต่างกัน โดยทำการทดลองเหมือนในขั้นตอน 3.7.2.1 แต่ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน 4 ครั้งที่เวลาต่างกันโดยที่แต่ละครั้งทำ 12 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 48 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหา ค่า mean, SD และ %CV ของทั้ง 48 ซ้ำนั้น (ธารารัชต์, 2545)

3.7.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy)

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า %recovery โดยนำตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการหาค่า %recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสารนอร์ฟลอกซาซินจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า %recovery จากสูตรดังนี้

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

3.8 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่สำหรับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.8.1 การหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่

นำเนื้อไก่มาทำการบดให้ละเอียด แบ่งชั่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม จำนวน 6 หลอด จากนั้นทำการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินลงไปในแต่ละหลอดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเติมตัวทำละลาย ซึ่งได้แก่ เมทานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วนต่างๆ คือ 50:50 (Huet และคณะ, 2006) และ 80:20 (วิธีการสกัดตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของ EURO-DIAGNOSTICA) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตรส่วน 1:10 เท่าแล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ทำการเปรียบเทียบหาความถูกต้องของปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีตามข้อ 3.7.3

3.8.2 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ

นำตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.1 มาทำการเปรียบเทียบการเตรียมสารนอร์ฟลอกซาซินที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานใน PBS และ เมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยการเตรียมความเข้มข้นใน PBS เป็น 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมความเข้มข้นเป็น 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบและทำการคำนวณหา % B/B_0 เพื่อนำไปวาดกราฟมาตรฐาน เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของเมทานอลที่อาจเกิดขึ้นกับชุดตรวจสอบต้นแบบได้

3.8.3 การศึกษาผลกระทบของแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่

ศึกษาผลกระทบของแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่ โดยทำการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.1 เปรียบเทียบกับการสกัดโดยไม่ผ่านตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยเทคนิค direct competitive ELISA (Ag capture) ทำการเปรียบเทียบหา

ความถูกต้องของปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีต่างๆ ตามข้อ 3.7.3 จากนั้นนำค่าปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซิที่ทำการเติมลงในตัวอย่างและค่าที่คำนวณได้มาวาดกราฟเพื่อทำการเปรียบเทียบผลของแมทริกจากตัวอย่าง

3.9 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง

3.9.1 การเตรียมตัวย่างเนื้อไก่เพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการเตรียมสารละลายสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้น 100, 200, 500, 1,000, 2,000 และ 5,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ที่บดละเอียด 1 กรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น 10 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสมาทำการเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:10 เท่าแล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.9.2 การเตรียมตัวย่างไข่ไก่เพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการเตรียมสารละลายสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้น 75, 150, 375, 750, 1,500. และ 3,750 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเติมลงในไข่ไก่ที่ชั่งมา 1 กรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 40:60 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น 10 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสมาทำการเจือจางในอัตราส่วน 1:5 เท่าด้วย PBS แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.10 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับชุดตรวจสอบทางการค้าและเทคนิค HPLC

3.10.1 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นกับชุดตรวจสอบทางการค้า

นำตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่า 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างไข่ไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันทั้งหมด แล้วแบ่งวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสอง ซึ่งขั้นตอนและการเตรียมตัวอย่างของชุดตรวจสอบต้นแบบทำตามขั้นตอนในข้อ 3.5.1 และ 3.10.1.1 ตามลำดับส่วนขั้นตอนในการวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างของชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA มีขั้นตอนดังนี้

3.10.1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

เริ่มจากเติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมของจาน 96 หลุม ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแกะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของกระต่าย จากนั้นเติมแอนติบอดี ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย rinsing buffer 3 ครั้ง เติมสับสเตรตของเอนไซม์ บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย stop solution นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.10.1.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ในชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

ชั่งเนื้อไก่ที่บดละเอียด 1 กรัม ทำการเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น 30

นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสมา 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางใน PBS 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

3.10.1.3 การเตรียมตัวอย่างไข่ไก่ในชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

ชั่งไข่ไก่ 1 กรัม ทำการเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 40:60 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสมา 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางใน PBS 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

3.10.2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ ที่มีความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินสุดท้ายเท่ากับ 1, 5, 10, และ 50 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร มาแบ่งวิเคราะห์ในชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18-reverse phrase มีสารละลาย acetronitrile และน้ำในอัตราส่วน 5:95 ถึง 25:75 โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา โดยกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลด้วย UV ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร ทำการกรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์กรอง ฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบ ครั้งละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งสารนอร์ฟลอกซาซินมี retention time ประมาณ 10 นาที นำผลวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ได้เทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซิน ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.10.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

นำตัวอย่างเนื้อไก่ 1 กรัม เติม 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและ dichloromethane ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นของ dichloromethane และนำมาสกัดอีกครั้งด้วย dichloromethane ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำชั้นของ dichloromethane ไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมสารละลายตัวพาปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบกับ HPLC (Garcia-Ovando และคณะ, 2000)

3.10.2.2 การเตรียมตัวอย่างไข่ไก่ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

นำตัวอย่างไข่ไก่ 1 กรัม เติม 0.75 M NaOH ใน acetronitrile ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบนมาทำการระเหยให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนและนำตัวอย่างมาสกัดอีกครั้งด้วยสารละลายเดิมปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นบนมาทำการระเหยให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นทำการเติมสารละลายตัวพาปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบกับ HPLC (Christodoulou และคณะ, 2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตแอนติบอดี

ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีรหัสโคลน nor#155 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เติม FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดสอบแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA (ตารางที่ 4.1) โดยทำการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์ ซีรัมของหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้นด้วยสารนอร์ฟลอกซาซิน อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้ผ่านการเลี้ยงซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมลบ และซีรัมของหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารนอร์ฟลอกซาซิน ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวก พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้ผ่านการเลี้ยง และมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับซีรัมของหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารนอร์ฟลอกซาซิน แสดงว่าเซลล์ไฮบริโดมายังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินจากเซลล์ไฮบริโดรมาด้วยวิธี indirect ELISA

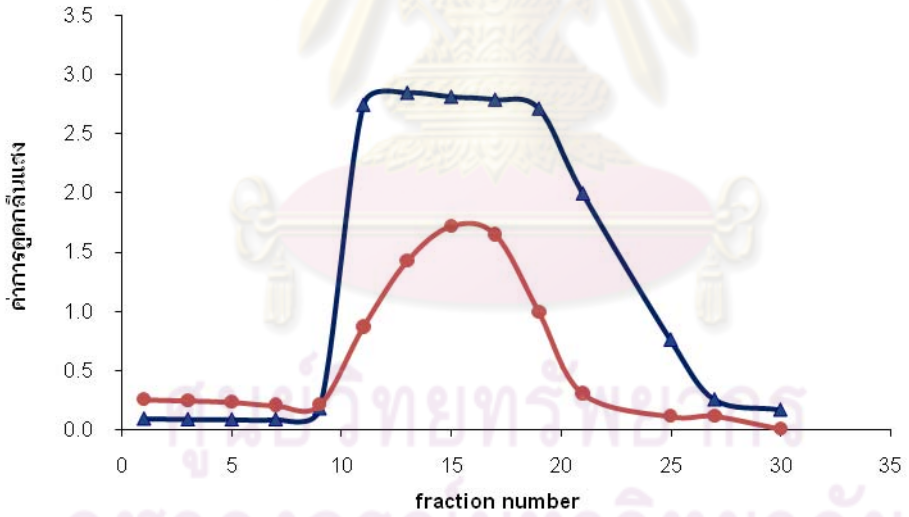
ชนิดตัวอย่าง	อัตราการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร	
อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมา nor#155	1:5	2.737	2.974
	1:10	2.735	2.651
	1:20	2.313	2.414
	1:100	1.929	1.895
	1:200	1.455	1.414
	1:400	1.029	1.273
	1:800	0.578	0.566
	1:1,600	0.384	0.362
ซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น	1:4,000	0.045	0.049
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	-	0.038	0.042
ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยนอร์ฟลอกซาซิน	1:4,000	2.869	2.776

4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.2.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ protein A affinity column chromatography

นำเซลล์ไฮบริโดมา nor#155 มาเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตร จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ protein A ซึ่งแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดรมามีไอโซไทป์เป็น IgG1 จึงมีอันตรกิริยาสูงต่อ protein A ที่ pH 8.0 และความเข้มข้นเกลือ 4 โมลาร์ โดยที่โปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับ protein A แต่ที่ค่า pH ต่ำลงอันตรกิริยาของแอนติบอดีต่อ

protein A จะลดลงซึ่งที่ค่า pH 3.0 นั้นแอนติบอดีทั้งหมดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ protein A ทำให้สามารถแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ หลังจากนั้นจึงนำแอนติบอดีที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพื่อทดสอบโปรตีน และทำการทดสอบหาแอนติบอดีแต่ละส่วนด้วยวิธี indirect ELISA เมื่อนำส่วนที่ชะด้วย pH 8.0 มาทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA เช่นเดียวกัน พบว่าผลได้เป็นลบแสดงว่าแอนติบอดีไม่ถูกชะออกมา แต่เมื่อนำส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์มาทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าได้ผลการทดลองเป็นบวกแสดงว่า protein A ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้หมด และเมื่อนำแต่ละ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร พบว่าในหลอดทดลองที่ 11 ถึงหลอดที่ 19 นั้นมีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ในช่วงกราฟที่เป็นพีคของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์จึงได้นำแอนติบอดีมารวมกันและนำไปวัดปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีต่อไป (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ protein A sepharose โดยที่ —●— คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร; —▲— คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่ได้จากการทำ indirect ELISA

4.2.2 การหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี

ทำการวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีทั้งก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA (ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.5.1) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.1 ในภาคผนวก ก) พบว่าปริมาณโปรตีนที่ คำนวณได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมา nor#155 ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 7.873 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 1.132 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีที่ผลิตได้ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์วัดด้วยวิธี BCA

	อัตราการเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	***ปริมาณโปรตีน*** (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
แอนติบอดีก่อนผ่านการทำให้บริสุทธิ์	1:16	0.645	7.672
	1:32	0.354	8.074
	เฉลี่ย		**7.873**
แอนติบอดีหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์	1:2	0.761	1.141
	1:4	0.391	1.123
	1:8	0.203	1.071
	เฉลี่ย		**1.132**

4.2.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.2 ในภาคผนวก ก) แสดงผลดังในตารางที่ 4.3 พบว่าปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมา nor#155 ก่อนทำให้บริสุทธ์และหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่า 0.038 และ 0.693 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (%purity) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน (ตารางที่ 4.2) ได้เป็น 61.23% เนื่องจากอาจมี protein A หรือโปรตีนอื่นๆ หลุดปนออกมาในระหว่างขั้นตอนของการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้คืน (%recovery) พบว่าได้เท่ากับ 16.78% เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์

จะมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนอยู่หลายชนิดปนอยู่มาก เมื่อคำนวนหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์จึงมีค่ามาก และแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ซึ่งจับกับ protein A ได้ไม่ดีถึงแม้ว่าจะมีการทำแอนติบอดีให้เข้มข้นแต่ก็มีการสูญเสียแอนติบอดีไปเนื่องจาก protein A ไม่สามารถจับกับแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้หมด ทำให้มีแอนติบอดีบางส่วนหลุดออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์

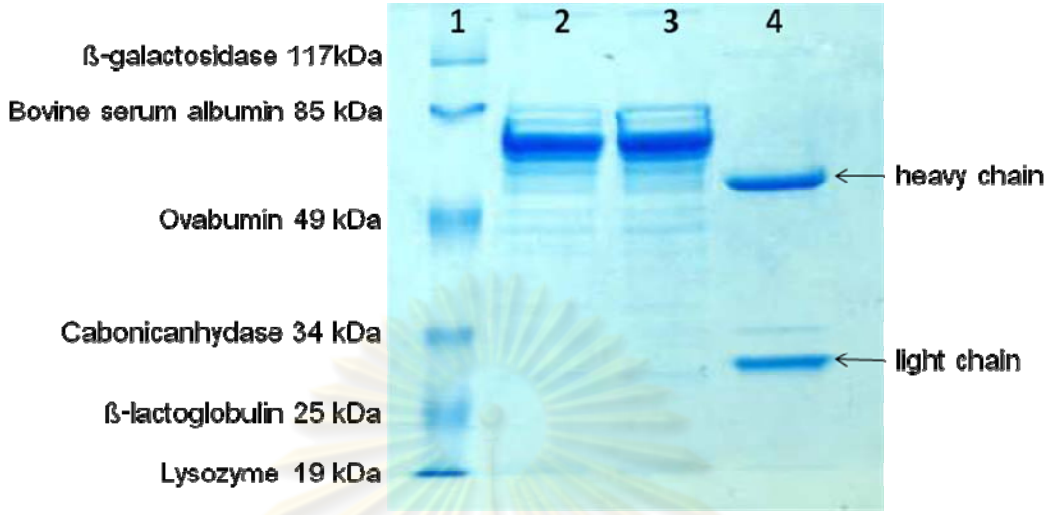
ตารางที่ 4.3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีวัดด้วยวิธี indirect ELISA

	ปริมาณโปรตีน (BCA assay)		ปริมาณแอนติบอดี (ELISA)		recovery (%)	purity (%)
	mg/ml	Total (mg)	mg/ml	Total (mg)		
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	7.873	$19.68x10^3$	0.038	95	-	0.80
หลังทำให้บริสุทธิ์	1.132	26.036	0.693	15.939	16.78	61.23

4.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์แถบโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 แถบของแอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ช่อง 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

ช่อง 2 คือ ซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

ช่อง 3 คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี10% FCS ก่อนทำให้บริสุทธิ์

ช่อง 4 คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำแอนติบอดีก่อนผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์แถบโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE จะพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า relative mobility (R_f) กับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.3 ในภาคผนวก ก) ระหว่างค่า relative mobility และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ช่อง 3) พบแถบโปรตีนที่เหมือนกับแถบโปรตีนของซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดี (ช่อง 2) เนื่องจากว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมี 10% ซีรัมอยู่ด้วย และในซีรัมก็มีโปรตีนขนาดใหญ่อยู่มากมาย เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จึงพบแถบโปรตีนขนาดใหญ่เด่นชัดเพียงแถบเดียวแต่จะมีแถบโปรตีนขนาดเล็กไม่เด่นชัดปรากฏอยู่มากมาย เมื่อทำการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนขนาดใหญ่พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 81.34 กิโลดาลตัน และเมื่อนำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ พบว่าปรากฏแถบโปรตีนสองแถบชัดเจนมีน้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 60.66 และ 27.35 กิโลดาลตัน (ช่อง 4) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบโปรตีนของ heavy chain และ light chain ของ

โมเลกุลแอนติบอดี ตามลำดับ เนื่องจากเทคนิค SDS-PAGE จะมีการเติม beta-mercaptoethanal ทำให้เกิดการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อม heavy chain และ light chain ในโมเลกุลของแอนติบอดีออกได้ และไม่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 81.34 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องจากว่า ในการทำ SDS-PAGE นี้จะใช้โปรตีนที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์จึงมาจากซีรัมเป็นส่วนใหญ่ เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วโปรตีนจากซีรัมจึงถูกกำจัดออกเหลือแต่แอนติบอดีเป็นส่วนใหญ่ (61.23%)

ตารางที่ 4.4 ค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	Relative mobility (Rf)
β-galactosidase	118	0.15
Bovine serum albumin	86	0.26
Ovalbumin	49	0.47
Carbonic anhydrase	34	0.72
□-lactoglobulin	24	0.87
Lysozyme	19	1.00
FCS	81.34	0.29
แอนติบอดีจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี nor#155 (IgG1) หลังจากทำให้บริสุทธิ์	60.66 27.35	0.43 0.81

4.2.5 การทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทดสอบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังคงมีความสามารถในการจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินอยู่หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระตั้งแต่ 0 – 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA มีค่าสูงขึ้นเมื่อทำการลดปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระและมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง

เมื่อปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผกผันกับปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ แสดงว่า แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ชนิดตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร		
โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์	0	1.103	1.149	1.126
	0.001	1.143	1.212	1.043
	0.002	1.028	1.023	1.099
	0.005	1.002	1.008	1.012
	0.01	0.939	0.910	0.924
	0.02	0.844	0.884	0.814
	0.05	0.749	0.806	0.777
	0.1	0.501	0.554	0.532
	0.2	0.327	0.335	0.337
	0.5	0.189	0.178	0.189
	1	0.111	0.107	0.108
	2	0.094	0.091	0.104
	5	0.082	0.084	0.085
	10	0.076	0.076	0.075
ซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น	-	0.045	0.054	0.056
ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยนอร์ฟลอกซาซิน	-	1.138	1.086	1.042

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่าง ๆ

4.3.1 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

4.3.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

หาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่างปริมาณแอนติบอดีที่เคลือบจานชนิด 96 หลุม กับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีให้อยู่ในช่วง 0.25-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP อยู่ในช่วง 1:25,000–1:400,000 เท่า จากนั้นทำการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA สูงกว่า 1 เล็กน้อย (ดังแสดงในตารางที่ 4.6) พบว่าปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากันได้ค่าดูดกลืนแสงสูงกว่า 1 เล็กน้อยมีอยู่หลายค่าความเข้มข้นด้วยกัน โดยทำการเลือกแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:50,000 เท่า และแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:200,000 เท่า และ1:300,000 เท่า นำไปใช้ในการหาความไวต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

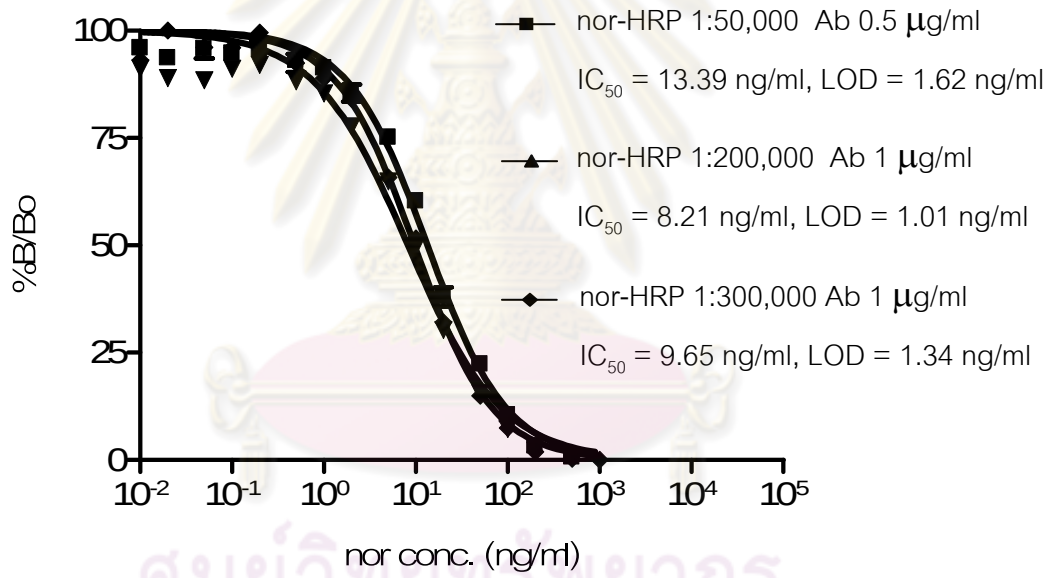
อัตราการเจือจาง ของ nor-HRP (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ความเข้มเข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	0	0.25	0.5	1	2
1:25,000	0.043	0.763	1.594	2.448	2.673
1:50,000	0.067	0.604	**1.366***	2.313	2.599
1:100,000	0.044	0.358	0.943	1.716	2.309
1:200,000	0.048	0.306	0.854	**1.307***	2.442
1:300,000	0.050	0.293	0.644	**1.157***	2.094
1:400,000	0.061	0.201	0.410	0.984	1.645

หมายเหตุ * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.1.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ทำการทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ โดยเลือกใช้ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีและสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.3.1.1 และทำการแปรค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่นำมาใช้เป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B ต่อ B_0 โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีสารนอร์ฟลอกซาซินอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน มาวาดกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระทำการหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินอิสระที่ทำให้ค่า $\%B/B_0$ ลดลงครึ่งหนึ่ง และหาค่า LOD ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจางที่ 1:50,000 เท่ามีค่า

IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 13.39 และ 1.62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจางที่ 1:200,000 เท่า และ 1:300,000 เท่า จะให้ลักษณะของกราฟและความชันใกล้เคียงกัน โดยมี ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.21 และ 9.65 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า LOD เท่ากับ 1.01 และ 1.34 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} และค่า LOD ที่ได้จากทั้ง 3 ค่าความเข้มข้น พบว่า เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:200,000 เท่าจะให้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่ทำให้การตรวจมีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 **ชุดตรวจสอบแบบ** indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA สำหรับวิธี indirect ELISA โดยการแปรความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่นำมาเคลือบก้นหลุมในช่วง 0.0078-0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีในช่วง 1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลือกค่าอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 1 เล็กน้อย จากการทดลองพบว่าสามารถเลือกได้ 3 อัตราส่วน คือ แอนติบอดี 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดี 15 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7) ดังนั้นจึงได้นำอัตราส่วนทั้ง 3 นี้ไปใช้ในการทดสอบความไวในการจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured)

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
	ความเข้มข้นของ nor-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0.0078	0.0156	0.0312	0.0652	0.125	0.25
0	0.128	0.136	0.080	0.140	0.156	0.211
1	0.288	0.462	0.630	0.885	1.031	1.061
2	0.329	0.570	0.979	1.227	1.356	1.443
4	0.408	0.778	1.208*	1.526	1.736	1.770
8	0.655	1.020	1.628	2.006	2.149	2.191
10	0.622	1.009	1.693	2.023	2.136	2.252
15	0.651	1.100*	1.818	2.202	2.364	2.370
20	0.760	1.204*	1.847	2.261	2.454	2.432
25	0.838	1.289	1.992	2.353	2.529	2.548
30	0.865	1.308	2.034	2.306	2.477	2.516
35	0.858	1.375	2.021	2.360	2.487	2.551
40	0.822	1.421	2.013	2.315	2.500	2.507
45	0.911	1.365	2.022	2.296	2.543	2.571
50	0.950	1.376	2.042	2.448	2.519	2.564

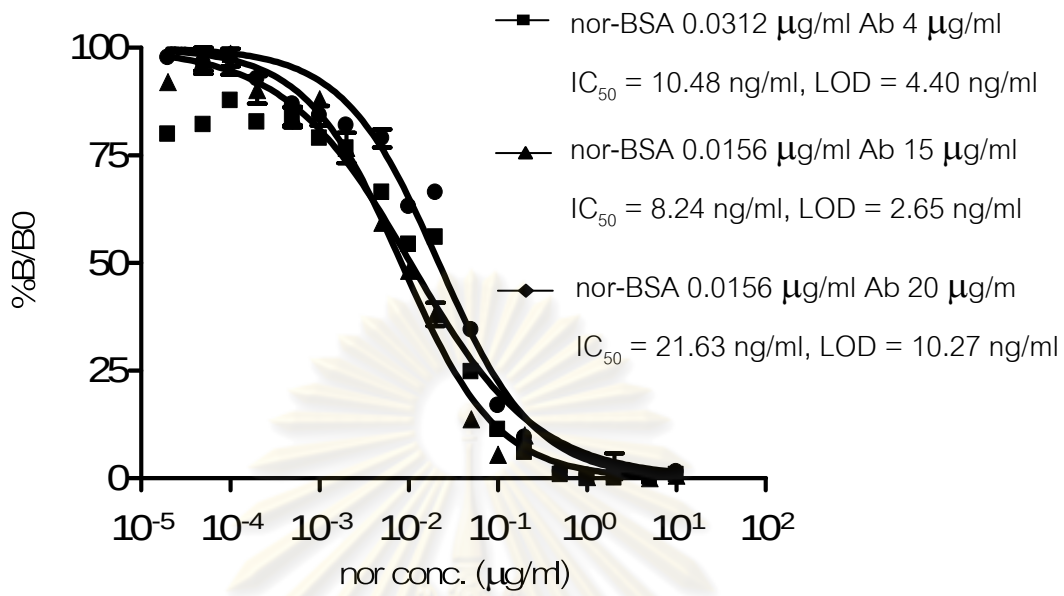
หมายเหตุ * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

หลังจากทำการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA จากข้อ 4.3.2.1 ซึ่งทำการเลือกมาทั้งหมด 3 อัตราส่วน แล้วนำไปทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 -10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดี 15 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.24 และ 21.63 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า LOD เท่ากับ 2.65 และ 10.27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดี 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 10.48 และ 4.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ให้ความไวมากที่สุด คือ สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดี 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากทำการเคลือบหลุมด้วยสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ในปริมาณที่น้อยแล้วเติมแอนติบอดีลงไปพร้อมกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ ทำให้โอกาสที่แอนติบอดีจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระนั้น มีมากกว่าสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของหลุม แอนติบอดีจึงสามารถจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระได้หมด จึงทำให้มีความไวมากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.3 ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured)

4.3.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ทำการการแปรความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่นำมาเคลือบก้นหลุมในช่วง 0.0078-0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินในช่วงเจือจาง 1:1,000-1:64,000 เท่า จากนั้นเลือกค่าอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 1 เล็กน้อย จากการทดลองพบว่าสามารถเลือกได้ 2 อัตราส่วน คือ สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0156 และ 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 1:8,000 เท่า และ 1:16,000 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured)

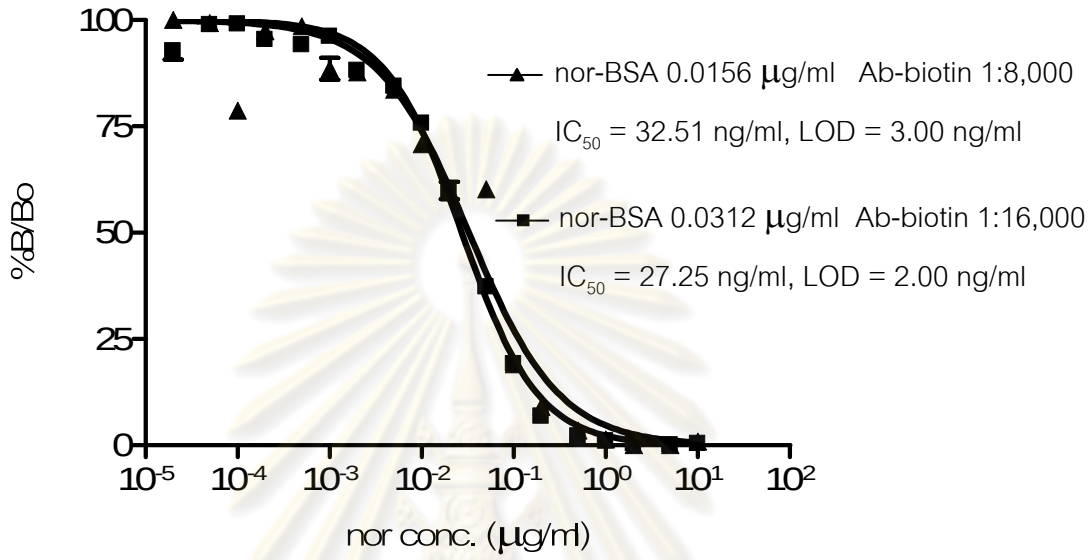
อัตราการเจือจางของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
	ความเข้มข้นของ nor-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078
1:1,000	0.148	2.792	2.816	2.525	1.731	1.437
1:2,000	0.144	2.925	2.764	2.358	1.598	1.021
1:4,000	0.149	2.858	2.666	2.097	1.276	0.898
1:8,000	0.166	2.714	2.440	1.880	**1.311***	0.821
1:16,000	0.146	2.261	1.859	**1.339***	0.923	0.562
1:32,000	0.182	1.487	1.166	0.873	0.613	0.289
1:64,000	0.167	0.877	0.704	0.535	0.372	0.287

<u>หมายเหตุ</u> * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.3.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

หลังจากนำอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA จากข้อ 4.3.3.1 ไปใช้ในการทดสอบการจับกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 -10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.5) พบว่าเมื่อใช้สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:8,000 เท่า จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 32.51 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 3.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:16,000 เท่า จะให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 27.25 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองอัตราส่วนที่ให้ความไวของชุดตรวจสอบมากที่สุดคือ เมื่อใช้สารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ

กับ BSA 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:16,000 เท่า



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured)

4.3.4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่าง ๆ

การตรวจสอบสารตกค้างในปัจจุบันสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ แต่แบบที่เป็นที่นิยมทั่วไป ได้แก่ ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) และแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบเพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่ง แบบ คือ direct competitive ELISA (Ab captured) ซึ่งมีการเชื่อมต่อแอนติบอดีเข้ากับไบโอติน เพื่อเป็นการเพิ่มขยายสัญญาณ ทำให้มีความแรงของสัญญาณในการวัดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นทำให้ชุดตรวจสอบมีความไวสูงขึ้น เนื่องจากไบโอตินมี multiple binding site โดยที่ไบโอติน 1 โมเลกุล สามารถจับกับ streptavidin ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ HRP ได้ถึง 4 โมเลกุล (Diamandis และ Christodoulos, 1991)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบชุดตรวจสอบแบบต่างๆ พบว่า ชุดตรวจสอบที่ให้ความไวสูงสุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) รองลงมา คือ indirect

competitive ELISA (Ab captured) และ direct competitive ELISA (Ab captured) เป็นชุดตรวจสอบที่ให้ความไวน้อยที่สุด

จากการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) พบว่ามีความไวน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบแบบต่างๆ โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 27.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้จะมีการขยายสัญญาณด้วยไบโอตินก็ตาม ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากการเชื่อมต่อกันระหว่างแอนติบอดีและไบโอติน โดยไบโอตินจะจับกับแอนติบอดีที่บริเวณหมู่เอมีนของกรดอะมิโนไลซีนทำให้มีการเชื่อมต่อกับส่วน F_{ab} ของแอนติบอดี ซึ่งส่วน F_{ab} ของแอนติบอดีเป็นส่วนที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน เมื่อบริเวณ F_{ab} ของแอนติบอดีถูกรบกวนทำให้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนลดลง จึงส่งผลให้ชุดตรวจสอบที่ได้มีความไวลง (Simons และคณะ, 2006) ถึงแม้ว่าชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) จะใช้เวลาในการทดสอบไม่นานนัก ซึ่งใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมง 40 นาที แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์คาดว่าจะไม่เหมาะแก่การใช้งาน เนื่องจากจะมีค่าใช้จ่ายในส่วนของไบโอตินและ streptavidin เพิ่มขึ้นมา

ชุดตรวสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) เป็นชุดตรวจสอบที่ให้ความไวใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) ซึ่งชุดตรวสอบทั้งสองแบบให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.24 และ 8.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD เท่ากับ 2.65 และ 1.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่ามีค่าต่ำกว่า MRLs ที่กำหนดไว้และเมื่อพิจารณาถึงความสะดวกในการใช้งาน ระยะเวลาในการตรวจสอบและค่าใช้จ่าย เมื่อนำไปผลิตชุดตรวจสอบในเชิงพาณิชย์ ชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA (Ab captured) จะใช้เวลาในการทดสอบ 2 ชั่วโมง 30 นาที และยังต้องใช้ HPR-labelled goat anti-mouse IgG ทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น

เมื่อพิจารณาชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) พบว่ามีขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการทดสอบน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชุดตรวจสอบแบบอื่นๆ ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง 30 นาที และที่สำคัญยังมีค่าใช้จ่ายต่ำเนื่องจากใช้เพียงแอนติบอดีและสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ กับ HRP เท่านั้นดังนั้นชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) จึงน่าจะเป็นชุดตรวจสอบที่เหมาะสมและมีความไวที่สุด จึงได้ทำการเลือกชุดตรวจสอบระบบดังกล่าว มาเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบและทำการหาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่อไป

ตารางที่ 4.9 สรุปผลการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบต่างๆ ในงานวิจัยนี้

รูปแบบของชุดตรวจสอบ	อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี	เวลาในการทดสอบ (ชั่วโมง)	IC_{50} (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Direct competitive ELISA (Ag captured)	Ab 1 µg/ml nor-HRP 1:200,000	1.30	8.28	1.01
Indirect competitive ELISA (Ab captured)	nor -BSA 0.0156 µg/ml Ab 15 ng/ml	2.30	8.24	2.65
Direct competitive ELISA (Ab captured)	nor -BSA 0.0312 µg/ml Ab-biotin 1:16,000	2.40	27.25	2.00

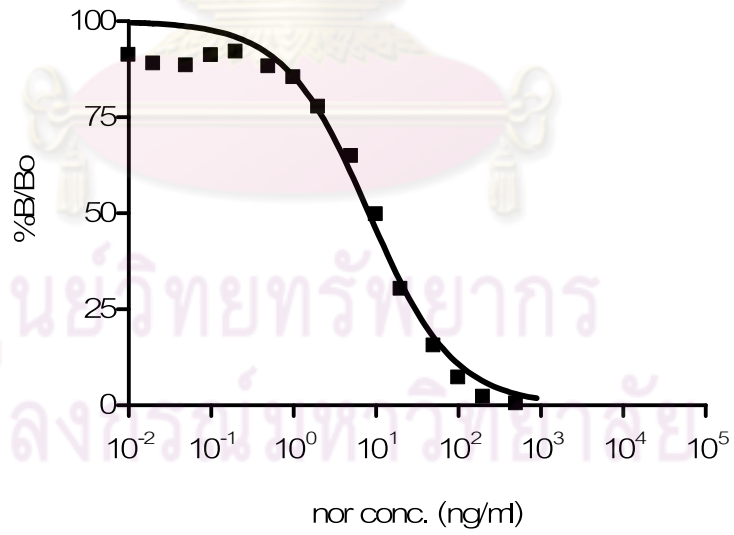
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured)

ทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เคลือบจานชนิด 96 หลุมเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจาง 1:200,000 เท่าจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.10 และนำข้อมูลมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแกน Y เป็น $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่มีสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน ได้กราฟแสดงดังรูปที่ 4.6 ทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่สามารถนำมาสร้างกราฟเส้นตรงได้ พบว่า ช่วงความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่จะนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน คือช่วง 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.7

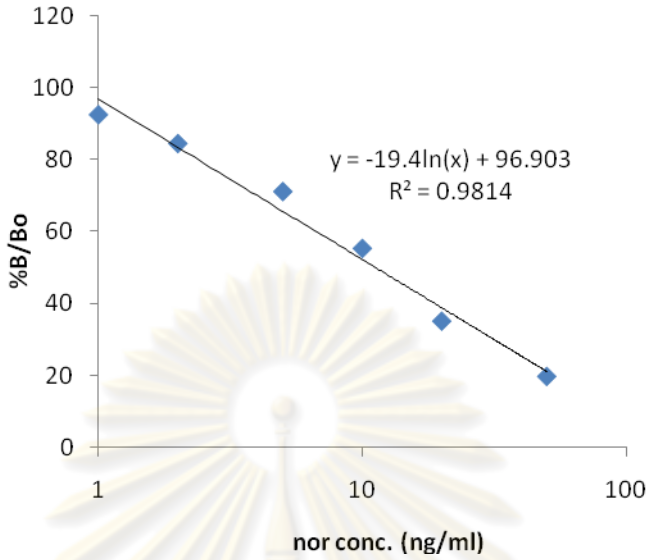
ตารางที่ 4.10 ผลค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากการทำ direct competitive ELISA (Ag captured) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	$\%B/B_0$	SD
0	1.345	100.00	0.130
1	1.244	92.493	0.041
2	1.136	84.465	0.019
5	0.957	71.110	0.039
10	0.744	55.278	0.008
20	0.471	35.035	0.007
50	0.264	19.648	0.029



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



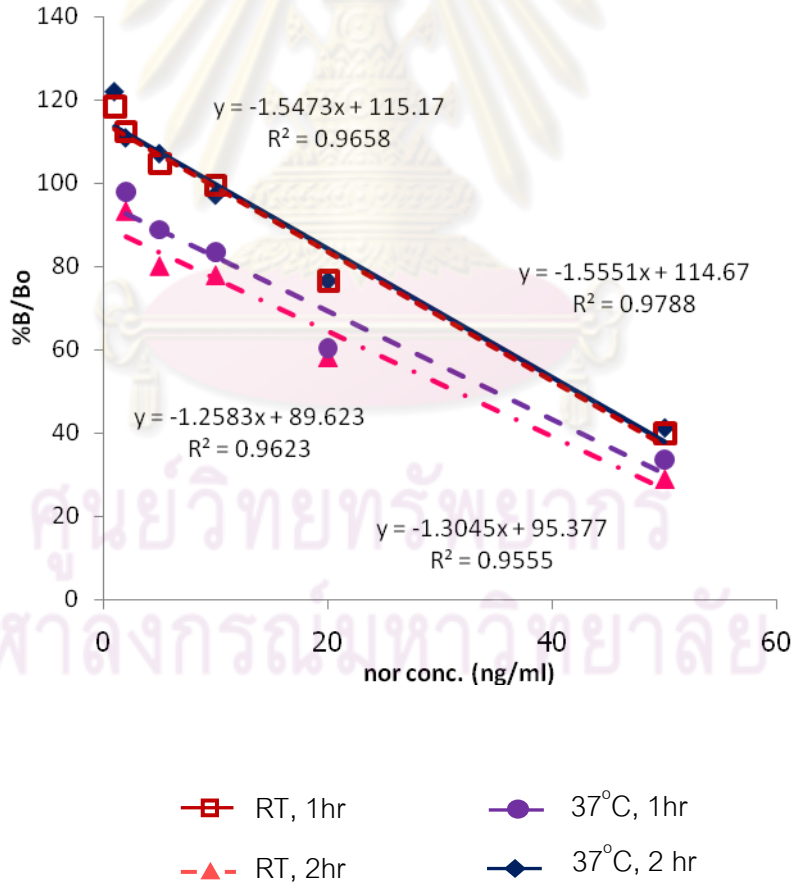
รูปที่ 4.7 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

4.4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระ

การพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบจะต้องคำนึงถึงความสะดวกและง่ายต่อการใช้งาน ดังนั้นจึงต้องทำการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตัวอย่าง โดยการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่า R^2 และกราฟมาตรฐานของแต่ละชุดการทดลอง พบว่า ค่า R^2 และเส้นกราฟมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.8) และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันและค่าที่ได้ไม่ต่ำกว่า 1 แสดงในตารางที่ 4.11 ดังนั้นจึงทำการเลือกเวลาที่ใช้ในการบ่มน้อยที่สุดคือ 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิที่ใช้ได้สะดวกคือ ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 4.11 ผลของการศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ

เวลาและอุณหภูมิ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวควบคุมลบ	R^2
RT/1 hr	1.312	0.9788
37^0C/1 hr	1.251	0.9555
RT/2 hr	1.328	0.9623
37^0C/2 hr	1.116	0.9658



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบในภาวะการบ่มต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซิน

ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ จะทำการทดสอบกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มของควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน ดังแสดงในตารางที่ 4.12 เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารในกลุ่มที่ใช้ในการแข่งขันสูงถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลงมากมีค่าใกล้เคียงกับตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการทำปฏิกิริยาข้ามในช่วง 72-118% และเมื่อทดสอบกับสารนอกกลุ่ม ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลดลงเพียงเล็กน้อย ทำให้มีค่า IC_{50} มีค่าสูงมากกว่า 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามได้ต่ำกว่า 0.1% แสดงว่าชุดตรวจสอบที่ได้สามารถจับกับสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนแต่ไม่จับกับสารนอกกลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 ค่า IC_{50} และผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน

Competitors		CR (%)	IC_{50} (ng/ml)
Quinolones and fluoroquinolones	Norfloxacin	100	8.28
	Enrofloxacin	181	4.55
	Nalidixic acid	116	7.11
	Cinoxacin	81	10.10
	Oxolinic acid	178	4.65
	Enoxacin	91	9.05
	Ofloxacin	118	6.99
	Flumequin	74	11.11
	Pipemidic acid	89	9.23
	Ciprofloxacin	72	11.48
Hormone	Progesterone	<0.1	>10,000
□-agonists	Clenbuterol	<0.1	>10,000
	Salbutarmol	<0.1	>10,000
Other antibiotics	Tetracycline	<0.1	>10,000
	Oxytetracycline	<0.1	>10,000
	Streptomycin	<0.1	>10,000
	Furazolidone	<0.1	>10,000
	Penicillin G	<0.1	>10,000
	Chloramphenical	<0.1	>10,000
	3-Amino-2-oxazolido; AOZ	<0.1	>10,000
	1-Aminohydantoin; AHD	<0.1	>10,000
	Sulfamethazine	<0.1	>10,000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.4.4.1 ความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) มาสร้างกราฟเส้นตรงโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นสารนอร์ฟลอกซาซินและแกน Y เป็นค่า %B/B_0 จากนั้นนำค่า B_0 12 ค่า จากข้อมูลในตารางที่ 4.13 มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ นำไปแปลงเป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาได้จากสมการเส้นตรงของรูปที่ ก.4 ภาคผนวก ก พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความไวหรือสามารถวัดปริมาณของสาร นอร์ฟลอกซาซินต่ำที่สุดเท่ากับ 1.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถวัดปริมาณของสาร นอร์ฟลอกซาซินต่ำที่สุดอย่างถูกต้องเท่ากับ 3.21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่าปริมาณสูงที่สุดของสารนอร์ฟลอกซาซินที่อนุญาตให้ตกค้างได้ (MRLs) ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ซึ่งกำหนดโดยประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) เพื่อใช้หาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีสารนอร์ฟลอกซาซิน (B_0) (n=12)			mean	SD	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1.183	1.172	1.181				
1.224	1.210	1.186				
1.127	1.260	1.281	1.207	0.043	1.01	3.21
1.183	1.235	1.246				

4.4.4.2 ความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าความแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถพิจารณาได้จากการทำ inter variation assay และ intra variation assay (direct competitive ELISA (Ag captured)) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการหาค่าร้อยละสัมประสิทธิ์การแปรปรวน (%coefficient variation, %CV) ซึ่งพบว่าค่า %CV ของ Intra variation assay มีค่าอยู่ในช่วง 4.286-9.371% ส่วน inter variation assay มีค่าอยู่ในช่วง 5.268-11.101% (ตารางที่ 4.14) ซึ่งค่าที่ได้นี้สามารถ

ยอมรับได้เนื่องจากมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ในช่วงที่ยอมรับได้ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่า 20% (Krotzky และ Seeh, 1995)

ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	intra-variation assay (n=12)			inter-variation assay (N=4)		
	A_{450}	SD	%CV	A_{450}	SD	%CV
0	1.269	0.054	4.286	1.222	0.064	5.268
1	1.135	0.094	8.242	1.112	0.093	8.399
2	1.034	0.045	4.396	1.000	0.072	7.188
5	0.874	0.053	6.063	0.840	0.080	9.558
10	0.655	0.061	9.285	0.602	0.067	11.101
20	0.455	0.032	6.980	0.423	0.043	10.262
50	0.245	0.023	9.372	0.243	0.026	10.287

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.5 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่สำหรับชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.5.1 การหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่

ทำการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่ ตามวิธีในข้อ 3.4.4.5.1 โดยเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายเมทานอลกับ PBS ที่ 2 อัตราส่วน คือ 50:50 และ 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตรแล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ นำผลการทดลองที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำการคำนวณหาปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินและ %recovery (ตาราง 4.15) พบว่าวิธีสกัดโดยใช้เมทานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 50:50 ปริมาตรต่อปริมาตรให้ %recovery อยู่ในช่วง 34.86 -79.99% ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินพบว่าค่าที่ได้แตกต่างไปจากเดิมมาก อาจเนื่องมาจากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอลกับ PBS ใน

อัตราส่วนนี้มีเมทานอลน้อยเกินไป ทำให้สกัดสารนอร์ฟลอกซาซินออกจากตัวอย่างได้น้อย แต่เมื่อใช้ใช้ตัวทำละลายเมทานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งมีปริมาณเมทานอลที่มากพอสำหรับการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่าง ค่า %recovery ที่คำนวนได้จึงอยู่ในช่วง 80.34-114.25% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 80-120% (Krotzky และ Seeh,1995) และปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไป จึงทำการเลือกวิธีสกัดโดยใช้เมทานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นตัวทำละลายในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 การหาอัตราส่วนของเมทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่

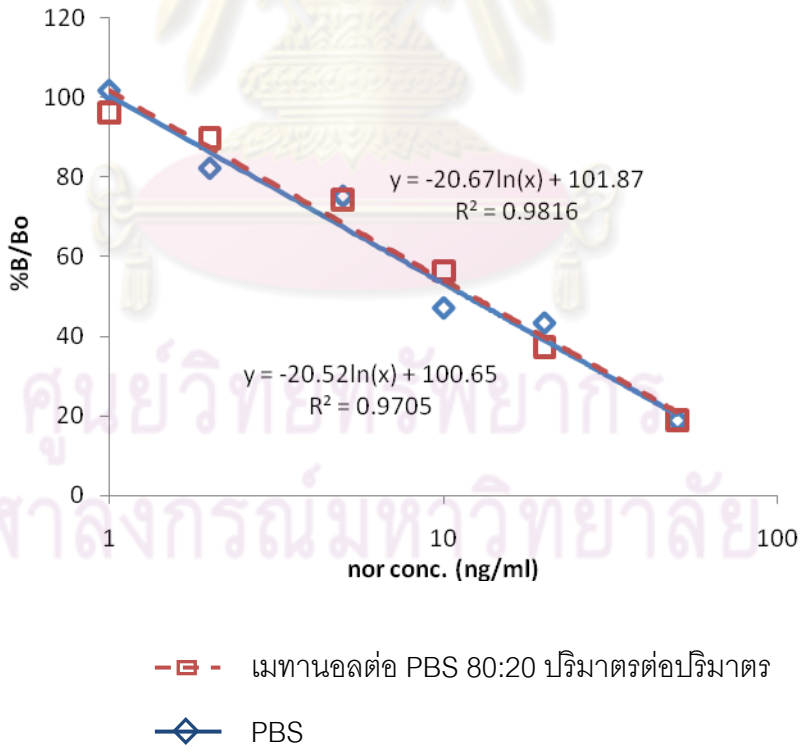
fortified concentration (ng/ml)	สกัดด้วย methanol:PBS (50:50 (v/v))			สกัดด้วย methanol:PBS (80:20 (v/v))		
	average A_{450}	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	average A_{450}	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery
10	1.361	7.99±0.02	79.99	1.408	11.42±0.01	114.25
20	1.366	7.84±0.01	39.24	1.293	16.79±0.09	83.94
50	1.133	34.86±0.04	34.86	0.961	50.91±0.04	101.82
100	0.762	62.09±0.05	62.09	0.825	80.39±0.02	80.39
200	0.518	143.17±0.09	71.59	0.554	198.79±0.05	99.39
500	0.371	237.25±0.03	47.45	0.269	515.97±0.03	103.19

หมายเหตุ n = 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.2 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

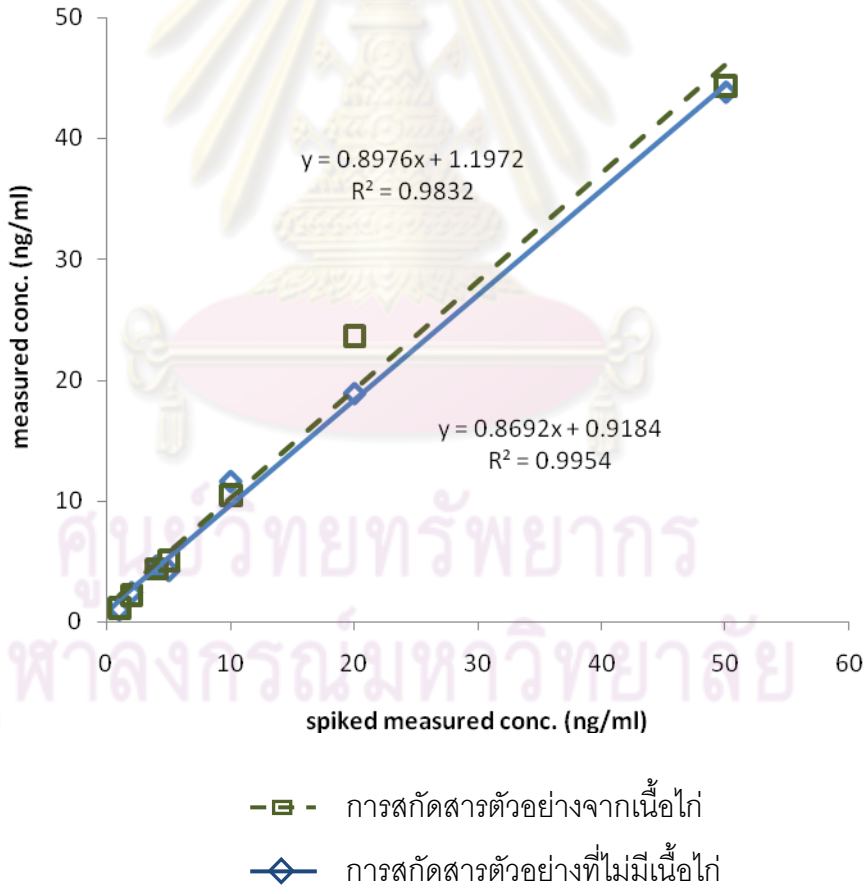
จากการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในข้อ 4.5.1 มาทำการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเมทานอลต่อ PBS คือ 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวมีเมทานอลถึง 80% อาจมีผลกระทบต่อชุดตรวจสอบต้นแบบได้ จึงทำการเปรียบเทียบการเตรียมความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานใน PBS และ เมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็น $\%B/B_0$ (ตารางที่ ก.9 ภาคผนวก ก) และนำมาวาดกราฟมาตรฐาน ดังรูป 4.9 พบว่ากราฟทั้งสองเส้นมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน เนื่องจากจะต้องทำการเจือจางความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินใน 80% เมทานอลลง 10 เท่าและเมื่อนำมาเติมลงในจานหลุมชนิด 96 หลุม พร้อมกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเมทานอลในจานหลุมเหลือเพียง 4% ดังนั้นเมทานอลที่อัตราส่วน 80% จึงไม่มีผลต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เตรียมใน PBS และ เมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร

4.5.3 การศึกษาผลกระทบของแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่

เมื่อทำการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินลงในตัวอย่างที่มีเนื้อไก่และไม่มีตัวอย่างเนื้อไก่ ทำการสกัดสารนอร์ฟลอกซาซินโดยตัวทำละลายเมทานอลต่อ PBS 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อศึกษาถึงผลกระทบจากแมทริกที่อาจเกิดขึ้นกับชุดตรวจสอบต้นแบบได้ จากนั้นนำไปเปรียบเทียบหาความถูกต้องของปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่คำนวณได้มีค่าใกล้เคียงกัน และ %recovery ที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ตารางที่ ก.10 ภาคผนวก ก) และเมื่อนำมาวาดกราฟ พบว่าเส้นกราฟมีค่า R^2 ที่ใกล้เคียงกันดังรูป 4.10 ดังนั้นแมทริกของตัวอย่างเนื้อไก่จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ชุดตรวจสอบต้นแบบ



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อไก่และตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อไก่

4.6 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง

4.6.1 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ทำการหาความเข้มข้นโดยนำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.5 ภาคผนวก ก.) คำนวณหา %recovery และ %CV พบว่า ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับที่เติมลงในตัวอย่าง %recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และ %CV ที่ได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 2.95-15.31% และ 9.20-19.88%.ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16 และ 4.17) ค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวัดสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อไก่

experiment number	fortified concentration (ng/ml)	intra-variation assay (n=12)		
		measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	%CV
ครั้งที่ 1	10	8.17±0.03	81.70	2.95
	20	17.25±0.07	86.25	6.94
	50	41.74±0.05	83.48	8.09
	100	112.72±0.06	112.73	11.92
	200	166.40±0.07	83.20	6.97
	500	455.44±0.03	91.09	11.85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อไก่ (ต่อ)

ครั้งที่ 2	10	10.96±0.05	109.63	4.09
	20	23.85±0.04	119.22	9.58
	50	49.45±0.07	98.89	9.58
	100	105.69±0.06	105.69	14.78
	200	236.37±0.07	118.18	3.04
	500	402.77±0.03	80.55	8.11
ครั้งที่ 3	10	11.81±0.06	118.15	5.90
	20	22.15±0.05	110.75	6.12
	50	41.19±0.02	82.37	3.75
	100	113.03±0.05	113.03	9.71
	200	235.23±0.04	117.61	12.09
	500	580.17±0.02	116.03	9.92
ครั้งที่ 4	10	11.61±0.11	116.13	9.76
	20	21.18±0.06	105.88	6.51
	50	40.18±0.03	80.36	3.93
	100	88.65±0.04	88.64	6.01
	200	239.46±0.03	119.73	6.89
	500	592.31±0.04	118.46	15.31

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อไก่

fortified concentration (ng/ml)	inter-variation assay (N=4)		
	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	%CV
10	10.64±0.10	106.40	9.20
20	21.11±0.09	105.55	10.45
50	43.14±0.12	86.28	10.72
100	105.02±0.08	105.02	17.95
200	219.36±0.10	109.68	19.88
500	507.67±0.08	101.53	17.41

หมายเหตุ N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.6.2 การวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวิเคราะห์หาปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างไข่ไก่โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอล และ PBS ในอัตราส่วน 40:60 ปริมาตรต่อปริมาตร ตามขั้นตอน 3.4.5.2 ทำการหาปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.6 ภาคผนวก ก.) คำนวณหา %recovery %CV intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า ปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับที่เติมลงในตัวอย่าง และ %recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และค่า %CV ของ intra-variation assay และ inter-variation assay มีค่าอยู่ในช่วง 1.82-12.50% และ 7.72-16.64% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18 และ 4.19) ค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวัดสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างไข่ไก่

experiment number	fortified concentration (ng/ml)	intra-variation assay (n=12)		
		measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	%CV
ครั้งที่ 1	5	5.85±0.05	116.97	2.66
	10	9.43±0.03	94.31	1.82
	25	20.43±0.03	81.72	3.67
	50	40.98±0.03	81.97	3.94
	100	98.57±0.01	98.57	3.25
	250	295.38±0.02	118.15	2.84
ครั้งที่ 2	5	5.75±0.04	114.99	2.64
	10	11.27±0.03	112.72	3.54
	25	20.23±0.03	80.91	3.79
	50	49.95±0.02	99.90	2.73
	100	118.71±0.04	118.71	8.32
	250	296.69±0.03	118.68	12.50
ครั้งที่ 3	5	4.50±0.01	90.00	9.87
	10	8.32±0.09	83.28	9.50
	25	20.33±0.02	81.30	2.96
	50	53.15±0.03	106.30	6.42
	100	114.12±0.02	114.12	4.97
	250	214.63±0.01	85.85	3.95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ intra-variation assay ในตัวอย่างไข่ไก่(ต่อ)

ครั้งที่ 4	5	5.91±0.04	118.12	3.92
	10	9.79±0.02	97.94	2.62
	25	28.50±0.03	113.98	4.33
	50	59.26±0.01	118.51	2.54
	100	113.95±0.04	113.94	8.46
	250	271.07±0.01	108.43	3.64

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์ inter-variation assay ในตัวอย่างไข่ไก่

fortified concentration (ng/ml)	inter-variation assay (N=4)		
	measured conc. ±SD (ng/ml)	%recovery	%CV
5	5.50±0.14	110.05	11.79
10	9.70±0.07	97.02	7.72
25	22.37±0.10	89.49	12.31
50	50.83±0.15	101.67	12.79
100	111.34±0.14	111.34	9.94
250	269.44±0.11	107.78	16.64

หมายเหตุ N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	%recovery	%CV intra assay (n=12)	%CV inter assay (N=4)
เนื้อไก่	86.28-109.68	2.95-15.31	9.20-19.88
ไข่ไก่	89.49-111.34	1.82-12.50	7.72-16.64

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.7 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค HPLC

4.7.1 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบทางการค้า

ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างโดยชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag capture) และชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA เพื่อนำผลที่ได้มาประเมินความถูกต้องและประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีเดียวกันทั้งหมดและทำการแบ่งตัวอย่างมาทดสอบตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสองแบบ

นำตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่า 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA (รูปที่ ก.7 และ ก.8 ภาคผนวก ก) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.21 โดยเมื่อวัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินพบว่าในตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินลงไปสามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 5.26 และ 1.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจทางการค้าของบริษัท EURO- DIAGNOSTICA ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในตัวอย่างเนื้อไก่มีสารนอร์ฟลอกซาซินตกค้างอยู่หรืออาจเกิดจากขั้นตอนในการสกัด ที่อาจมีผลทำให้องค์ประกอบที่อยู่ในเนื้อไก่ เช่น โปรตีน ไขมัน หลุดออกมา หรืออาจเกิดจาก systematic error ในระบบของการตรวจวัดจึงสามารถคำนวณปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินออกมาได้ดังกล่าวและเมื่อพิจารณาถึงปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมใน

ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวิเคราะห์ปริมาณออกมาได้ใกล้คียงกับที่เติมลงไป ค่า %recovery อยู่ในช่วง 81.71-112.71% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (80-120%) ส่วนและชุดตรวจทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA จะมีค่า %recovery บางค่าที่ต่ำกว่าและมากกว่าช่วงที่ยอมรับได้ คือ ที่ความเข้มข้นสารนอร์ฟลอกซาซินเท่ากับ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 144.78 มีค่า %recovery อยู่ที่ 72.39% และที่ความเข้มข้นสารนอร์ฟลอกซาซินเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 127.72 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %recovery อยู่ที่ 127.72%

ในตัวอย่างไข่ไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.22 ทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจทางการค้าของบริษัท EURO- DIAGNOSTICA สามารถวิเคราะห์ปริมาณออกมาได้ใกล้คียงกับปริมาณที่เติมลงไปในตัวอย่างแต่จะมีเพียงหนึ่งค่าที่วิเคราะห์ออกมาได้ต่ำกว่าปริมาณที่เติมลงไป คือ ในตัวอย่างที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 61.43 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %recovery อยู่ที่ 61.43% และในตัวอย่างไข่ไก่ที่ไม่มีการเติมสารนอร์ฟลอกซาซินลงไปสามารถตรวจได้ 2.15 และ 1.58 นาโนกรัมต่อมิลลิตร จากชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินที่ตรวจวัดได้นั้น อาจมีสาเหตุมาจากการสกัดเช่นเดียวกันกับในตัวอย่างเนื้อไก่ แต่ในตัวอย่างไข่ไก่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายคือ เมทานอล 40% น้อยกว่าในตัวอย่างเนื้อไก่ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายถึง 80% ทำให้ได้ปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารนอร์ฟลอกซาซินลงไปมีค่าต่ำกว่า

เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วชุดตรวจสอบทั้งสองแบบสามารถตรวจวัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินได้ใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงในตัวอย่างทั้งในเนื้อไก่และไข่ไก่จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ตัวอย่างไปวาดกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบ EURO- DIAGNOSTICA ดังแสดงในรูปที่ 4.11 คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) จากกราฟของตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ ได้เท่ากับ 0.9818 และ 0.9968 ตามลำดับ ซึ่งค่า r เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO- DIAGNOSTICA ซึ่งจะต้องมีค่ามากกว่า 0.85 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันสูง (Saita และคณะ, 2003) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดให้ค่า r มากกว่า 0.85 แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบ

กับชุดตรวจสอบ EURO- DIAGNOSTICA ให้ผลที่สอดคล้องและใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมขึ้นมา มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน ดังนั้น ถ้ามีการตกค้างของสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนในตัวอย่างจะไม่สามารถบอกได้อย่างเจาะจงว่าเป็นสารชนิดใด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.21 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified concentration (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=3)			ชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลน EURO-DIAGNOSTICA(n=2)		
	A450	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	average concentration (ng/ml)	%recovery
0	1.417	5.26±0.03	-	1.312	1.19	-
10	1,241	10.40±0.03	104.03	1.032	8.14	81.36
20	1.128	16.14±0.02	80.71	0.724	19.62	98.10
50	0.807	56.25±0.04	112.49	0.395	50.09	100.19
100	0.669	96.34±0.03	96.34	0.067	127..72	127..72
200	0.450	225.42±0.04	112.71	0.830	144.78	72.39
500	0.275	445.52±0.01	89.10	0.427	457.89	91.58

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

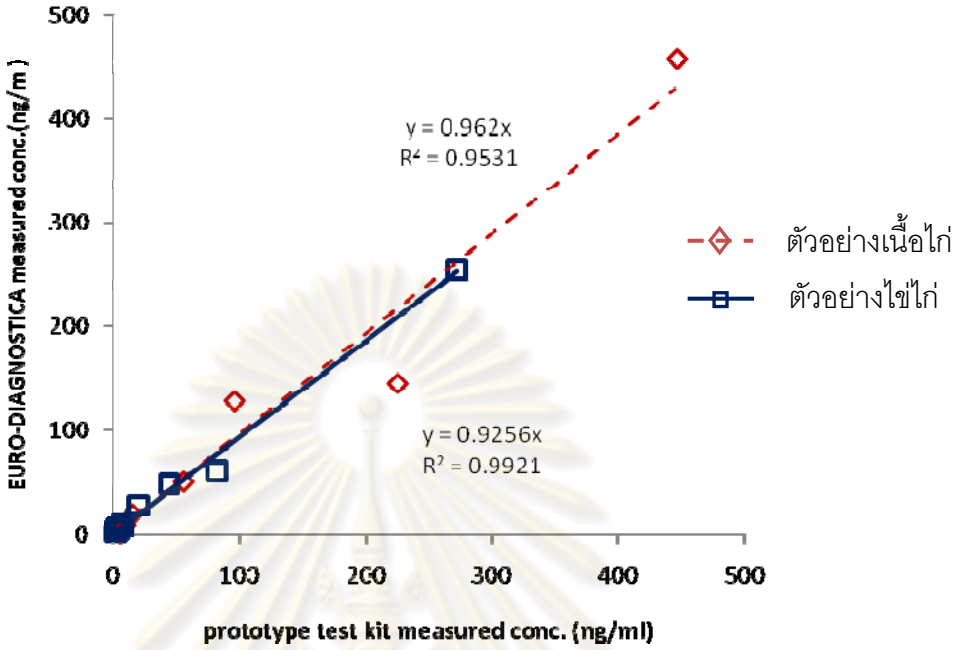
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified concentration (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=3)			ชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลน EURO-DIAGNOSTICA (n=2)		
	A450	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	average concentration (ng/ml)	%recovery
0	1.395	2.15±0.06	-	1.623	1.58	-
5	1.252	4.29±0.02	85.85	1.142	5.95	119.04
10	1.119	8.14±0.03	81.39	0.967	9.79	97.93
25	0.923	20.97±0.04	83.90	0.595	28.31	113.24
50	0.764	45.16±0.01	90.31	0.404	48.89	97.79
100	0.638	82.77±0.02	82.77	0.324	61.43	61.43
250	0.391	272.37±0.01	108.94	0.632	254.74	101.89

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนของบริษัท EURO-DIANOSTICA

4.7.2 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้ด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) กับเทคนิค HPLC เนื่องจากเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคทางเคมี ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง และเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากงานวิจัยนี้ จึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันแล้วแบ่งวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี โดยทำการเตรียมความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 0, 1, 5, 10, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิธี HPLC (รูปที่ ก.9 และ ก.10 ภาคผนวก ก) จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่นำใช้ในการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบฟลูออโรควิ-โนโลนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA มาก ทั้งนี้เนื่องมาจากในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นี้ มีความสามารถในการตรวจวัดสารนอร์ฟลอกซาซินได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับการทดลองที่ได้รับการตีพิมพ์อื่นๆ ซึ่งอาจเกิด

จากความแตกต่างและประสิทธิภาพของเครื่องมือแต่ละเครื่อง จึงทำให้วัดค่าต่ำสุดได้แตกต่างกัน จึงเลือกความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินดังที่กล่าวมาในข้างต้น ใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สารนอร์ฟลอกซาซินจะออกจากคอลัมน์เมื่อ มี %acetonitrie ในสารละลายตัวพาประมาณ 15% เมื่อเพิ่ม % acetonitrie จาก 5%-25% ภายในเวลา 20 นาทีสารจึงออกมาที่เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อไก่ พบว่า สารนอร์ฟลอกซาซินออกจากคอลัมน์ที่เวลาประมาณ 10 นาที และไม่มีสารอื่นๆ เจือปนออกมาแต่ในตัวอย่างไข่ไก่จะพบว่ามีสารชนิดอื่นออกมาที่เวลาใกล้เคียงกับเวลาของสารนอร์ฟลอกซาซิน ทำให้ทั้งสองพีคอยู่ใกล้กันมากและมีบางส่วนซ้อนทับกัน จึงทำการปรับเวลาการเพิ่ม %acetonitrie จาก 20 นาทีเป็น 30 นาที จาก 10-22% ทำให้สารนอร์ฟลอกซาซินจะออกจากคอลัมน์ที่เวลาประมาณ 15 นาที และสารอีกชนิดออกมาที่เวลาประมาณ 10 นาที จึงสามารถแยกพีคทั้งสองออกมาจากกันได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคทั้งสอง พบว่าปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ได้ให้ค่าใกล้เคียงกันกับปริมาณของสารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงไป ในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ และ %recovery ที่ได้ทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC ได้ไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4.23-4.24 และนำผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างเนื้อไก่และไข่ไก่ ที่ได้จากชุดตรวจสอบกับเทคนิค HPLC ไปเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากเทคนิค HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ได้เท่ากับ 0.9958 และ 0.9999 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดให้ค่า r มากกว่า 0.85 แสดงว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ให้ผลที่สอดคล้องกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้จากทั้ง 2 วิธีพบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถตรวจวัดได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าถึง 1,000 เท่า ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC มีความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ ได้อย่างถูกต้อง มีประสิทธิภาพและมีความไวกว่า

ตารางที่ 4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

fortified concentration (µg/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		เทคนิค HPLC (n=3)	
	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery
0	0.28± 0.01	-	0.000	-
1	1.17± 0.02	116.58	1.09± 5.39	109.31
5	4.82± 0.09	96.55	5.53± 6.48	110.59
10	11.09± 0.04	110.94	8.00± 18.44	80.08
50	49.58± 0.06	97.93	44.50± 45.13	89.00

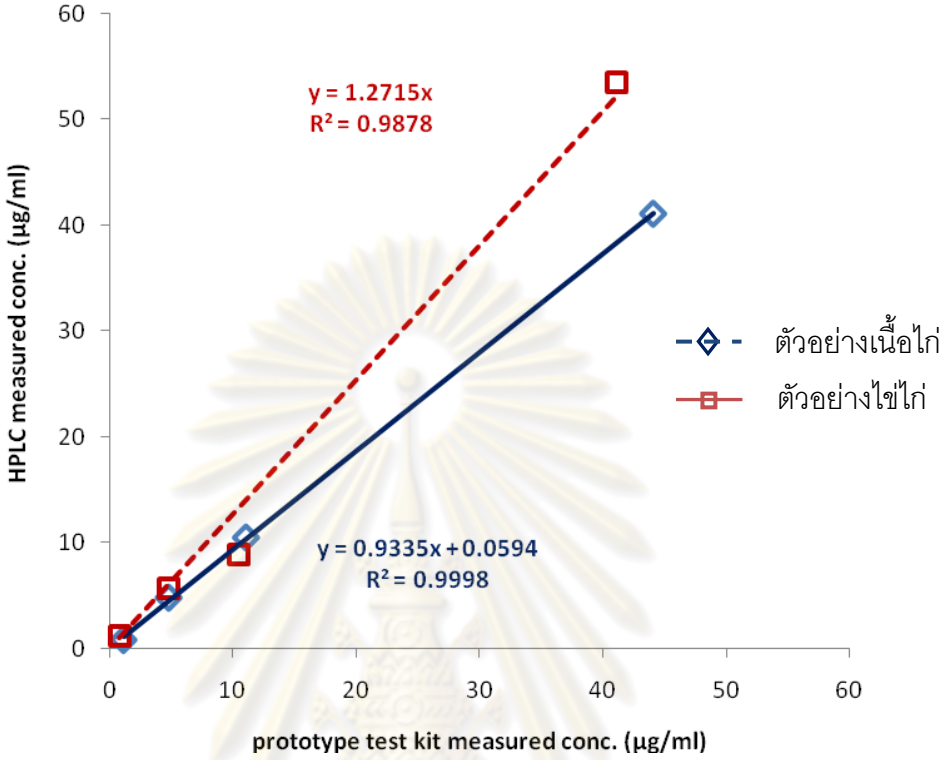
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.24 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างไข่ไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC

fortified concentration (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		เทคนิค HPLC (n=3)	
	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery	measured concentration ± SD (ng/ml)	%recovery
0	0.60± 0.02	-	0.000	-
1	0.83± 0.02	82.77	1.17± 8.12	116.96
5	4.83± 0.01	96.55	5.68± 10.43	113.67
10	10.52± 0.03	105.21	8.90± 14.74	89.04
50	46.79± 0.01	83.94	53.54± 16.13	107.09

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

เมื่อเปรียบเทียบชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้กับชุดตรวจสอบที่ได้มีรายงานไว้ พบว่า ชุดตรวจสอบที่ได้รับการพัฒนาขึ้นจาก Kato และคณะ ในปี 2007 มีค่า LOD เท่ากับ 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบต้นแบบ และมีปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนเช่นเดียวกัน

จากประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ได้ สามารถตรวจวัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินที่มีปริมาณต่ำกว่าปริมาณสูงสุดที่กำหนดให้ตกค้างได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ มีขั้นตอนการวิเคราะห์ง่ายสะดวก และใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย ตรวจวัดได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่างพร้อมกัน โดยตรวจวัดสารนอร์ฟลอกซาซินได้ทั้งในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ รวมทั้งให้ผลการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย และมีความไวมากกว่าเทคนิค HPLC ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากการวิจัยนี้ จึงสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อตรวจวัดหาการตกค้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

นำเซลล์ไฮบริโดรมา nor#155 ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าเซลล์ไฮบริโดรมาสามารถสร้างแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินได้ จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ protein A sepharose ซึ่งเป็นการแยกแบบ affinity chromatography เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน แอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์ protein A มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก 0.80 เปอร์เซ็นต์ เป็น 61.23 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของแอนติบอดีที่ได้จากการทำ SDS-PAGE พบว่าแอนติบอดี จะให้น้ำหนักโมเลกุลของ heavy chain และ light chain ขนาด 60.66 และ 27.35 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจสารนอร์ฟลอกซาซินต่อไป

สำหรับการเปรียบเทียบชุดตรวจสารนอร์ฟลอกซาซินด้วยวิธี ELISA ทั้ง 3 แบบ คือ direct competitive ELISA (Ag captured) indirect competitive ELISA (Ab captured) และ direct competitive ELISA (Ab captured) พบว่าชุดตรวจสอบที่ให้ความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 8.28 และ 1.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ indirect competitive ELISA (Ab captured) ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 8.24 และ 2.65 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดตรวจสอบที่มีความไวน้อยที่สุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ab captured) ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 27.25 และ 2.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงเลือกชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA (Ag captured) ซึ่งมีความไวสูงที่สุดมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ

โดยชุดตรวจสอบต้นแบบนี้สามารถตรวจสารนอร์ฟลอกซาซินได้ในช่วงความเข้มข้น 1 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้แอนติบอดีเคลือบหลุมที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจาง 1:200,000 เท่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม คืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และชุดตรวจมีความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินต่ำที่สุดเท่ากับ 1.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถ

ตรวจวัดสารนอร์ฟลอกซาซินได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 3.21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน แต่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนทุกตัวที่นำมาทดสอบทำให้ชุดตรวจสอบต้นแบบเหมาะแก่การนำไปใช้ในการตรวจวัดสารในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนได้ เมื่อทดสอบความแม่นยำของชุดตรวจสอบโดยคำนวณจากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra-variation assay และ inter-variation assay อยู่ในช่วง 4.286-9.317% และ 5.268-11.101% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปวิเคราะห์สารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ และไข่ไก่ จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ซึ่งวิธีการในการเตรียมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างจากเนื้อไก่ คือ เมทานอลกับ PBS อัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ส่วนในการสกัดตัวอย่างจากไข่ไก่ คือ เมทานอลกับ PBS อัตราส่วน 40:60 ปริมาตรต่อปริมาตร คำนวณปริมาณที่ตรวจวัดได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่า %recovery และ %CV ของ intra และ inter-variation assay ในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

ในการนำชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้วัดปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ และไข่ไก่ เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA และเทคนิค HPLC พบว่าทั้ง 3 วิธีสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารนอร์ฟลอกซาซินได้ถูกต้องใกล้เคียงกัน ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซิน direct competitive ELISA (Ag captured) ต้นแบบที่ได้มีความสามารถในการตรวจวัดสารนอร์ฟลอกซาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ความถูกต้องและความแม่นยำสูง ใช้ขั้นตอนและเวลาในการทดสอบสั้น สะดวกต่อการใช้งาน

แต่อย่างไรก็ตามยังต้องทำการศึกษาในหลายๆด้านหากจะนำไปพัฒนาในเชิงการค้า คือ ศึกษาการเคลือบแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินบนจานชนิด 96 หลุม อายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ การเตรียมเอนไซม์และสับสเตรตที่พร้อมใช้งานได้ทันที เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินที่สามารถผลิตจำหน่ายได้ในประเทศ ซึ่งช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

ธารารัชต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป.กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ห้างหุ้นส่วนบางกอกบล็อก.

นภาธร บานชื่น. (2536). ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

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

ภาษาอังกฤษ

Anadon, A., Martınez-Larranaga, R., Dıaz, M.J., Bringas, P., Mart´ınez, M.A., Fernandez-Cruz, M.L., Fernandez, M.C. and Fernandez, R. 1995. Journal of Veterinary Research 56: 501.

Arnab, C., Valakunja, N. and Dharmarajan, S. 2009. Antimycobacterial activities of novel fluoroquinolones. Biomedicine & Pharmacotherapy: 27-35

Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Bailac, S. and Barbosa, J. 2002. Simultaneous determination of flumequine and oxolinic acid in chicken tissues by solid phase extraction and capillary electrophoresis. Analytica Chimica Acta 477: 21–27.

Bertino, J. and Fish, D.Jr. 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. Clinical Therapeutics 22: 798-817.

Brown, S.A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 19: 1–14.

Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L. and Jackman, R. 2003. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific

immunoassays for detection of these residues in animal products. Food Additives and Contaminants 20: 221-228.

Christodoulou, E., Samanidou, V. and Papadoyannis.I. 2007. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. Journal of Chromatography B 859: 246–255

Duan, J. and Yuan, Z. 2001. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry 493: 1087-1089.

Els Van C., Jan De B. and Wim R. 2004. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4975-4978.

FDA. 2000. Enrofloxacin for poultry: opportunity for hearing. Federal Register. 65: 64954-64965.

Garsia, O.H., Gorla, N., Luders, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G. and Puelles, I. 1999. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 22: 209–212.

Guardabassi, L., Schwarz, S. and Lloyd, D. H. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54: 321-332.

Guesdon, J.,Ternynck, T. and Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 27: 1131-1139

Sarkozy, G. 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. Journal of Veterinary Medicine 46: 2257-2274.

Hernandez-Arteseros, J.A.,Barbosa, J., Compano, R. and Prat, M. D. 2002. Analysis of quinolone residues in edible animal products. Journal of Chromatography A 945: 1-24.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Holtzapple, C.K., Buckley, S.A. and Stanker, L.H. 2001. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography B 754: 1-9.

Hudson, L. and Hay, F.C. 1980. Practical immunology. London: Blackwell Scientific publication.

Huet, A., Charlier, C., Tittlemier, S., Singh, G. and Benrejeb, S. 2006. Simultaneous Determination of (Fluoro)quinolone Antibiotics in Kidney, Marine Products, Eggs, and Muscle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 2822-2827.

Johnstone, A. and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge. Cambridge university press.

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

Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 1109-1117.

Simons B., Kaplan H. and Hefford M. A. 2006. Novel cross-linked enzyme–antibody conjugates for Western blot and ELISA. Journal of Immunological Methods 315: 88-98

Vynchta, G., Ja`nosib, A., Bordina, G. and Toussainta. B. 2002. Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 952: 121-129

Watanabe, H., Satake, A., Matsumoto, M., Kido, Y., Tsuji, A., Ito, K. and Maeda, M. 1998. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromato graphic rapid assay for monensin. Analyst 123: 2573-2578.

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., and Tsuji, A. 2002. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. Analyst 127: 98-103.

WHO.1997. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additive Series 39 : Enrofloxacin. World Health Organization, Geneva.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

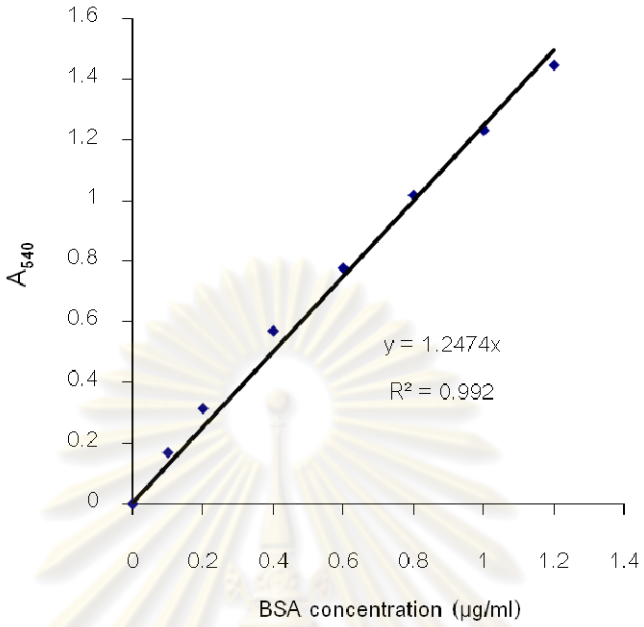
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

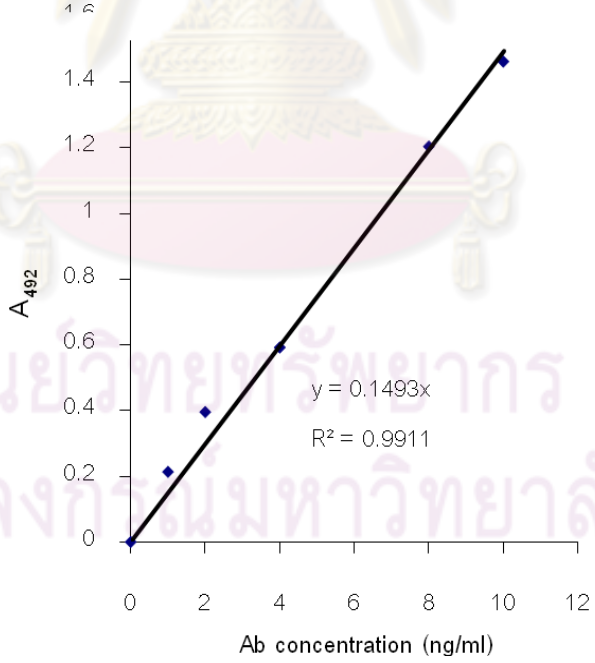
ตารางที่ ก1. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 และ 492 นาโนเมตรของการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้ protein A affinity column chromatography

ตัวอย่าง	fraction number	OD_{280}	OD_{492}
แอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์	1	0.256	0.093
	3	0.247	0.088
	5	0.235	0.086
	7	0.206	0.088
	9	0.211	0.180
	11	0.871	2.739
	13	1.426	2.839
	15	1.717	2.806
	17	1.649	2.783
	19	0.994	2.707
	21	0.306	1.992
	25	0.114	0.759
	27	0.118	0.256
	30	0.009	0.169
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านคอลัมน์ protein A	-	-	2.706
ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ protein A	-	-	0.229

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

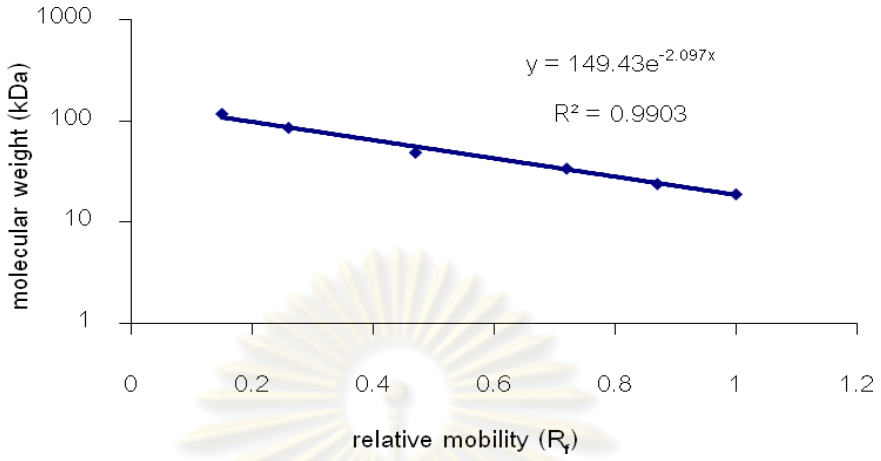


รูปที่ ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA



รูปที่ ก.2 กราฟของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) ของโปรตีนมาฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.2 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured)

norfloxacin concentration (ng/ml)	OD_{450}		
	nor-HRP 1:50,000 Ab 0.5 µg/ml	nor-HRP 1:200,000 Ab 1 µg/ml	nor-HRP 1:300,000 Ab 1 µg/ml
0	1.992	1.345	1.210
0.001	1.896	1.366	1.192
0.002	1.940	1.311	1.225
0.005	1.945	1.303	1.177
0.01	1.945	1.325	1.172
0.02	1.900	1.295	1.254
0.05	1.942	1.288	1.207
0.1	1.921	1.324	1.206
0.2	1.936	1.337	1.249
0.5	1.888	1.283	1.163
1	1.853	1.244	1.121
2	1.738	1.136	1.062
5	1.535	0.957	0.841
10	1.243	0.744	0.670
20	0.803	0.471	0.433
50	0.496	0.264	0.227
100	0.263	0.147	0.136
200	0.119	0.078	0.069
500	0.070	0.053	0.050
1000	0.057	0.047	0.046

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.3 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Ab captured)

norfloxacin concentration (ng/ml)	OD_{450}		
	Ab 4 µg/ml nor-BSA 0.0312 µg/ml	Ab 15 µg/ml nor-BSA 0.0156 µg/ml	Ab 20 µg/ml nor-BSA 0.0156 µg/ml
0	1.292	1.013	1.210
0.001	1.198	0.739	0.636
0.002	1.129	0.556	0.554
0.005	1.119	0.340	0.425
0.01	1.111	0.456	0.392
0.02	0.996	0.248	0.624
0.05	1.054	0.452	0.676
0.1	0.868	0.338	0.422
0.2	1.029	0.266	0.521
0.5	1.049	0.386	0.518
1	0.603	0.363	0.295
2	0.819	0.160	0.357
5	0.758	0.267	0.328
10	0.603	0.182	0.275
20	0.548	0.251	0.225
50	0.396	0.225	0.236
100	0.196	0.189	0.252
200	0.140	0.287	0.159
500	0.119	0.272	0.162
1000	0.148	0.289	0.252

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured)

norfloxacin concentration (ng/ml)	OD_{450}	
	nor-BSA 0.0156 µg/ml Ab-biotin 1:8,000	nor-BSA 0.0312 µg/ml Ab-biotin 1:16,000
0	1.821	2.075
0.001	1.845	1.939
0.002	1.850	1.928
0.005	1.838	2.053
0.01	1.478	2.055
0.02	1.804	1.982
0.05	1.825	1.958
0.1	1.650	1.997
0.2	1.635	1.836
0.5	1.565	1.761
1	1.340	1.587
2	1.153	1.271
5	1.156	0.815
10	0.438	0.453
20	0.263	0.206
50	0.165	0.111
100	0.130	0.088
200	0.106	0.076
500	0.105	0.069
1000	0.120	0.077

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

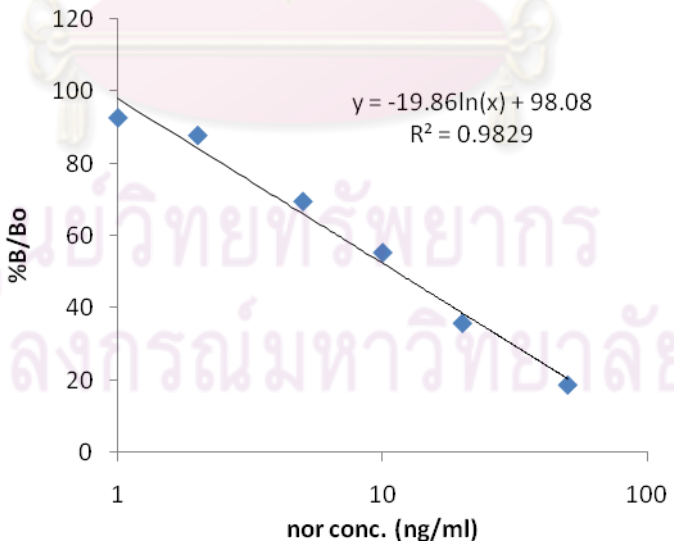
ตารางที่ ก.5 ผลการหาความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินเหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
0	1.342	1.346	1.347
0.001	1.331	1.333	1.328
0.002	1.322	1.339	1.371
0.005	1.316	1.275	1.295
0.01	1.370	1.310	1.345
0.02	1.351	1.319	1.325
0.05	1.248	1.313	1.373
0.1	1.396	1.343	1.333
0.2	1.374	1.322	1.315
0.5	1.258	1.294	1.298
1	1.203	1.245	1.285
2	1.153	1.115	1.141
5	0.968	0.947	0.955
10	0.709	0.736	0.786
20	0.481	0.466	0.467
50	0.257	0.264	0.272
100	0.152	0.154	0.145
200	0.077	0.075	0.081
500	0.052	0.054	0.052
1000	0.046	0.047	0.047

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.6 ผลจากการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับสารนอร์ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และสารนอร์ฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA (Ag captured)

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	RT 1 hr	37^{0}C 1 hr	RT 2 hr	37^{0}C 2 hr
0	1.179	1.251	1.428	1.265
1	1.343	1.224	1.498	1.361
2	1.224	1.109	1.299	1.238
5	1.072	1.042	1.044	1.195
10	0.966	0.753	1.002	1.084
20	0.515	0.418	0.723	0.855
50	0.287	0.292	0.361	0.461



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.7 ผลการหาค่า intra-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

จำนวนซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	1	2	5	10	20	50
1	1.37	0.932	0.999	0.946	0.555	0.438	0.239
2	1.306	1.317	1.119	0.853	0.639	0.422	0.235
3	1.289	1.122	1.015	0.911	0.630	0.451	0.191
4	1.191	1.148	1.063	0.908	0.656	0.404	0.245
5	1.289	1.16	1.063	0.875	0.682	0.458	0.248
6	1.284	1.137	1.018	0.892	0.709	0.461	0.253
7	1.263	1.228	1.032	0.925	0.634	0.510	0.261
8	1.156	1.201	1.095	0.927	0.670	0.462	0.257
9	1.26	1.106	1.048	0.792	0.699	0.514	0.251
10	1.295	1.102	0.991	0.785	0.717	0.446	0.22
11	1.269	1.078	1.000	0.838	0.537	0.454	0.261
12	1.252	1.083	0.963	0.841	0.731	0.435	0.282

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.8 ผลการหาค่า inter-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	จำนวนซ้ำที่			
	1	2	3	4
0	1.269	1.254	1.207	1.159
1	1.135	1.197	1.099	1.016
2	1.034	1.067	0.933	0.966
5	0.874	0.929	0.819	0.739
10	0.655	0.641	0.534	0.578
20	0.455	0.439	0.379	0.420
50	0.245	0.254	0.219	0.254

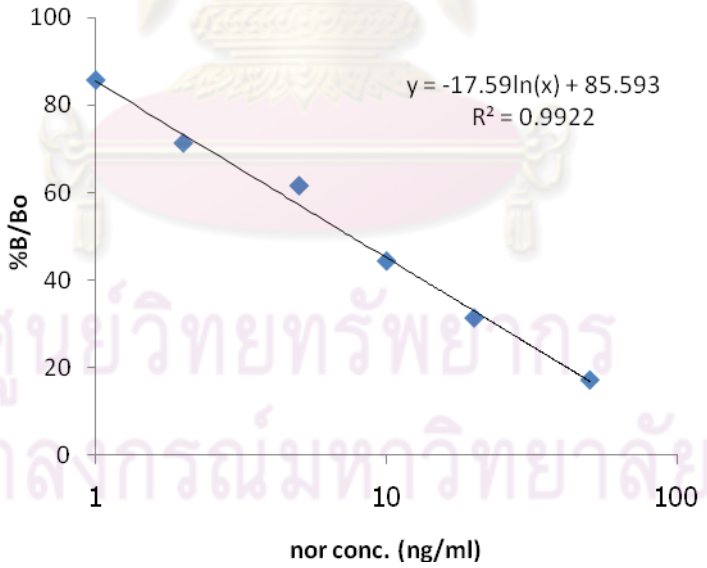
ตารางที่ ก.9 ผลการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	เตรียมสารด้วย PBS	เตรียมสารด้วย 80%เมทานอล
0	1.258	1.404
1	1.278	1.353
2	1.032	1.261
5	0.945	1.044
10	0.591	0.793
20	0.544	0.524
50	0.236	0.266

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

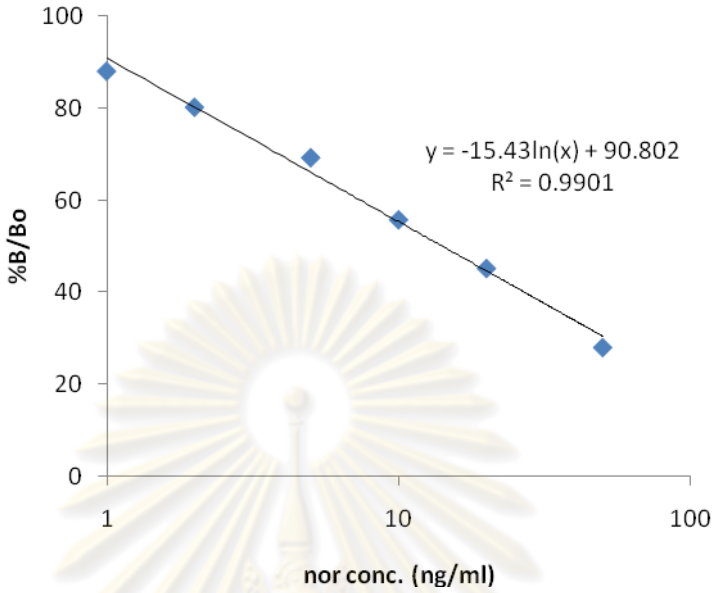
ตารางที่ ก.10 ผลการศึกษาผลกระทบของแมทริกต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	
	สกัดผ่านตัวอย่างเนื้อไก่	สกัดไม่ผ่านตัวอย่างเนื้อไก่
0	1.421	1.324
10	1.354	1.320
20	1.083	1.112
50	0.913	0.860
100	0.612	0.643
200	0.476	0.401
500	0.217	0.214

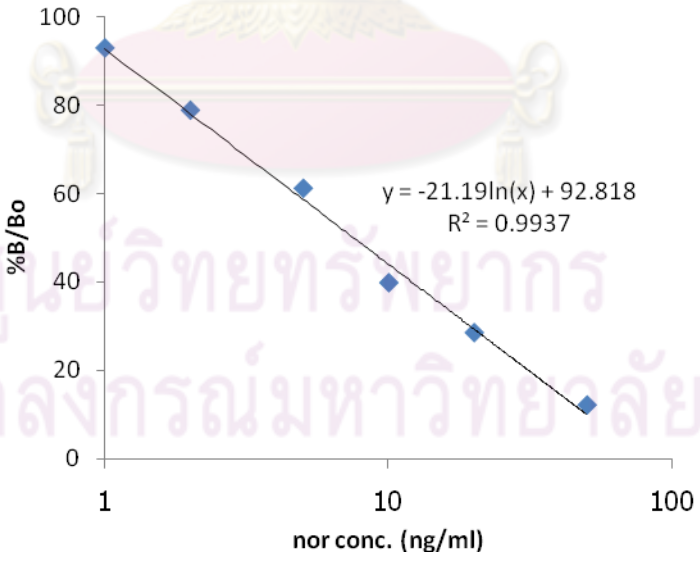


รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

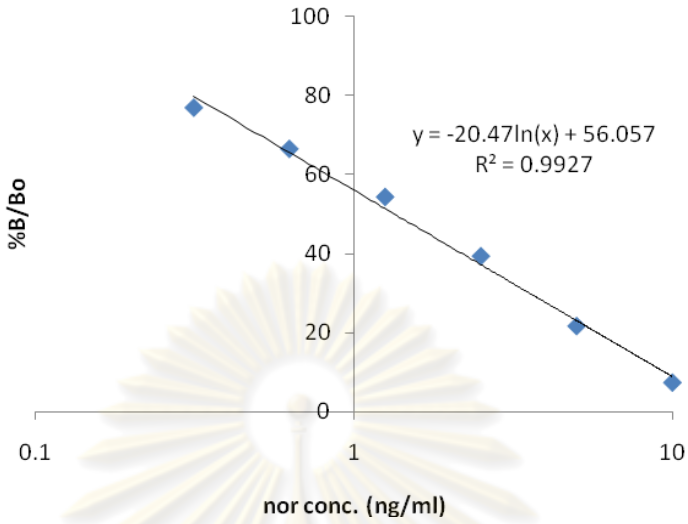


รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่

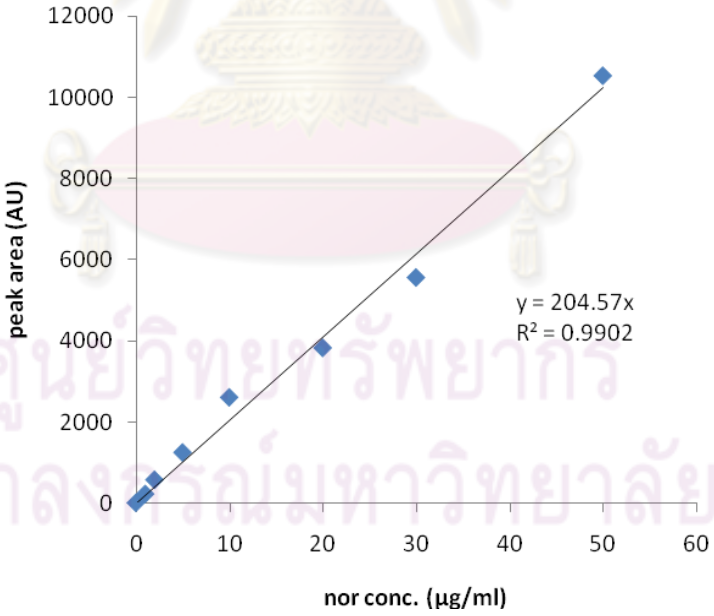


รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนที่มีวางจำหน่าย (EURO-DIAGNOTICA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

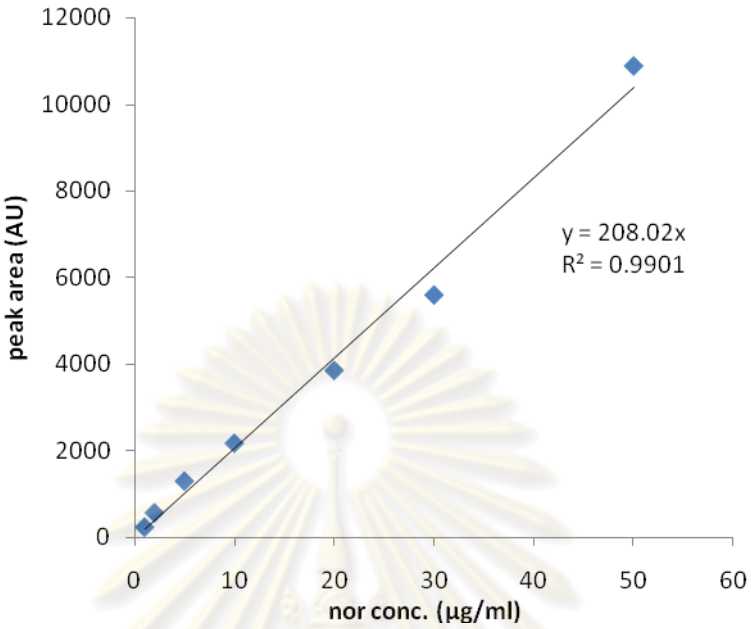


รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบฟลูออโรควิโนโลนที่มีวางจำหน่าย (EURO-DIAGNOTICA) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ



รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยวิธี HPLC

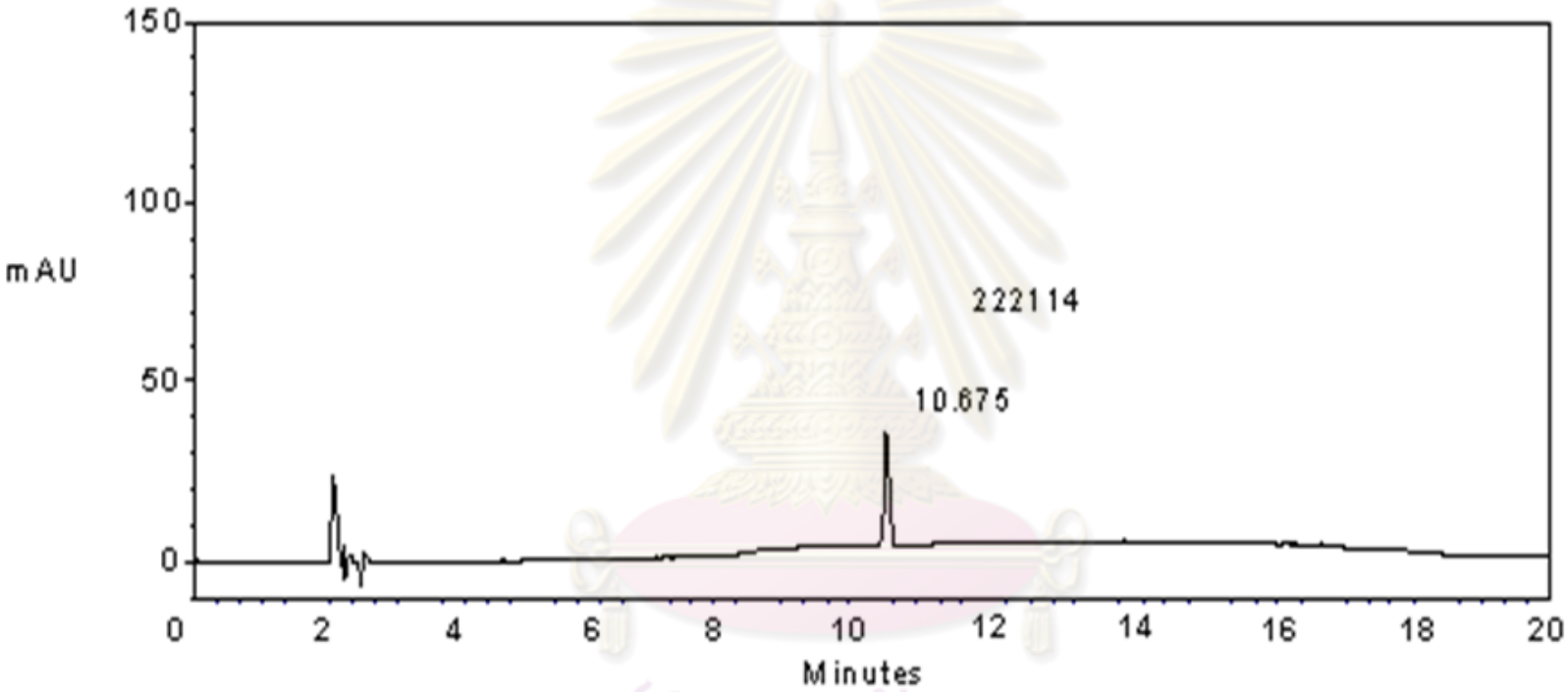
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารนอร์ฟลอกซาซินในตัวอย่างไข่ไก่ ด้วยวิธี HPLC

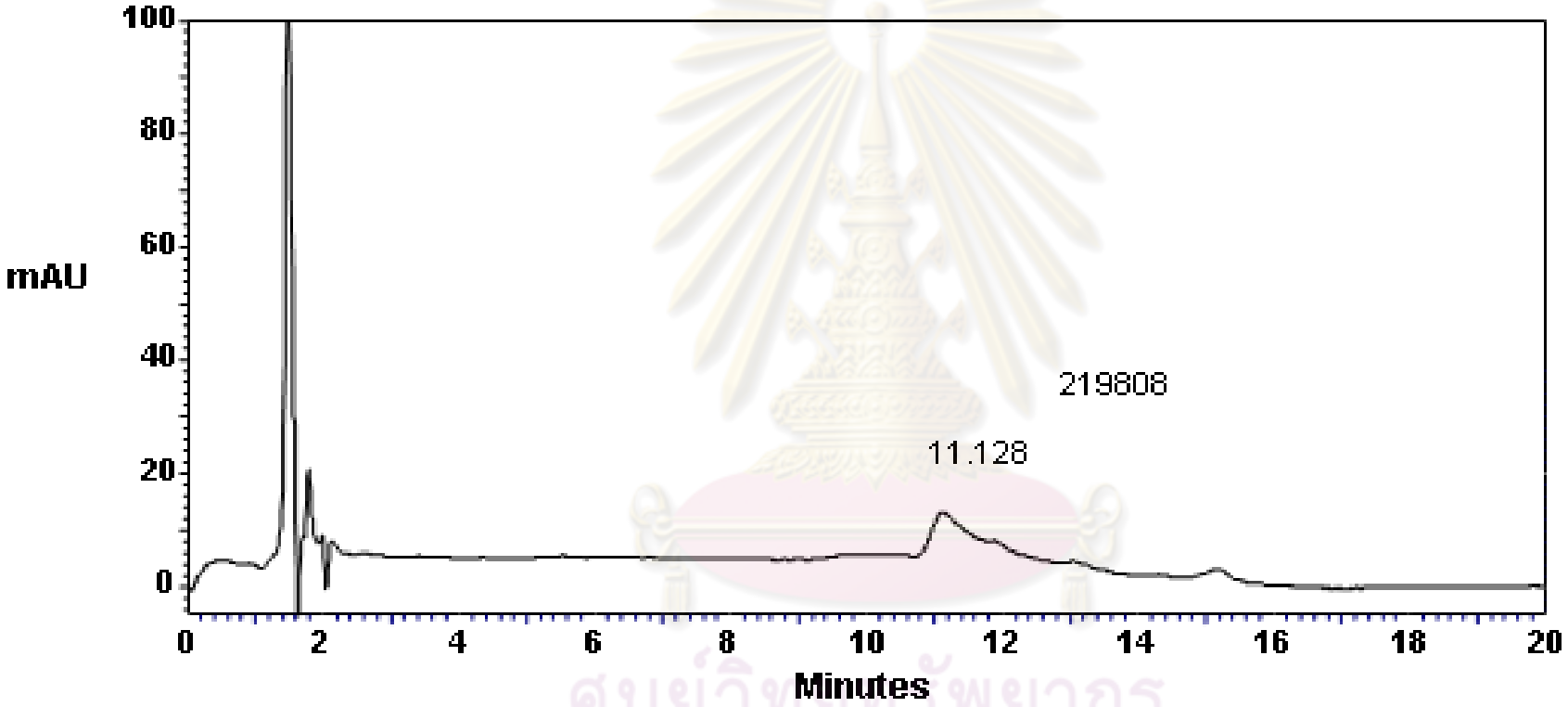
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.11 โครมาโตแกรมของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่ที่ได้จากเทคนิค HPLC



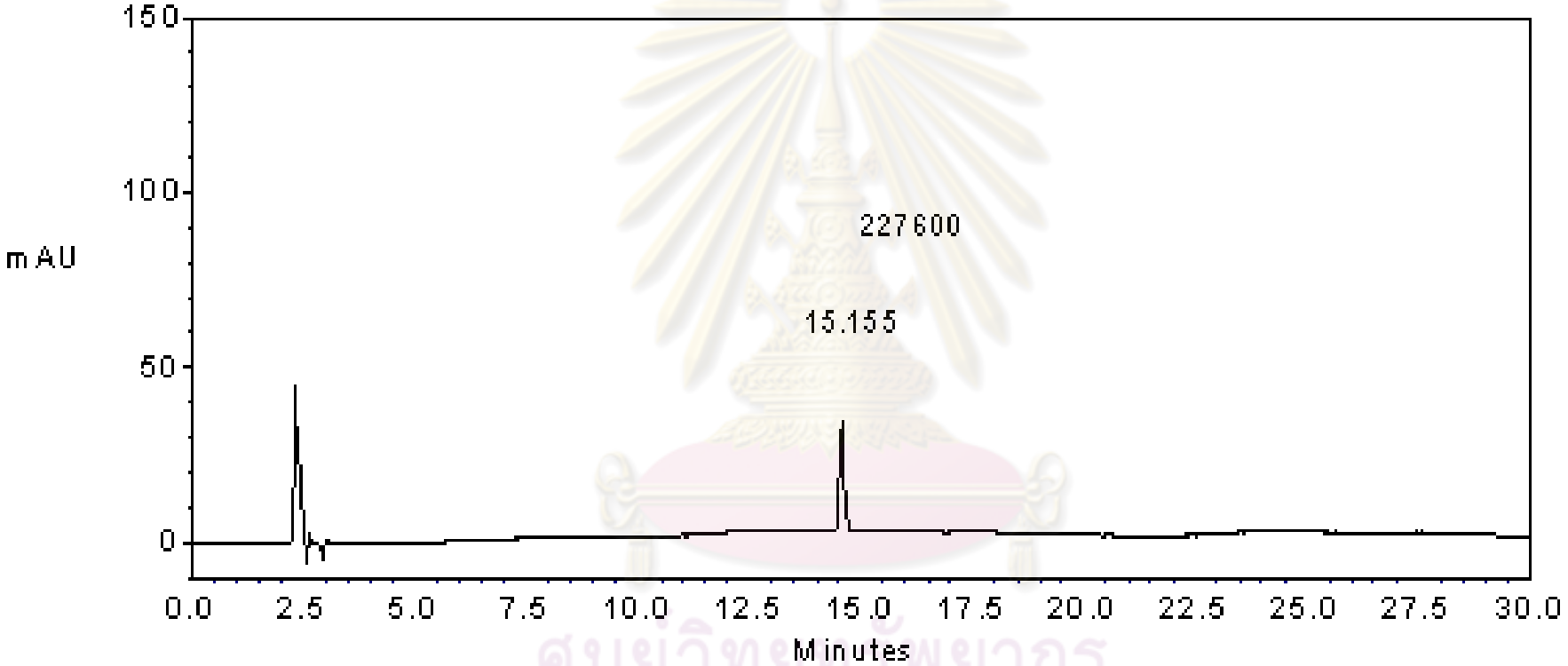
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.12 โครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากเทคนิค HPLC



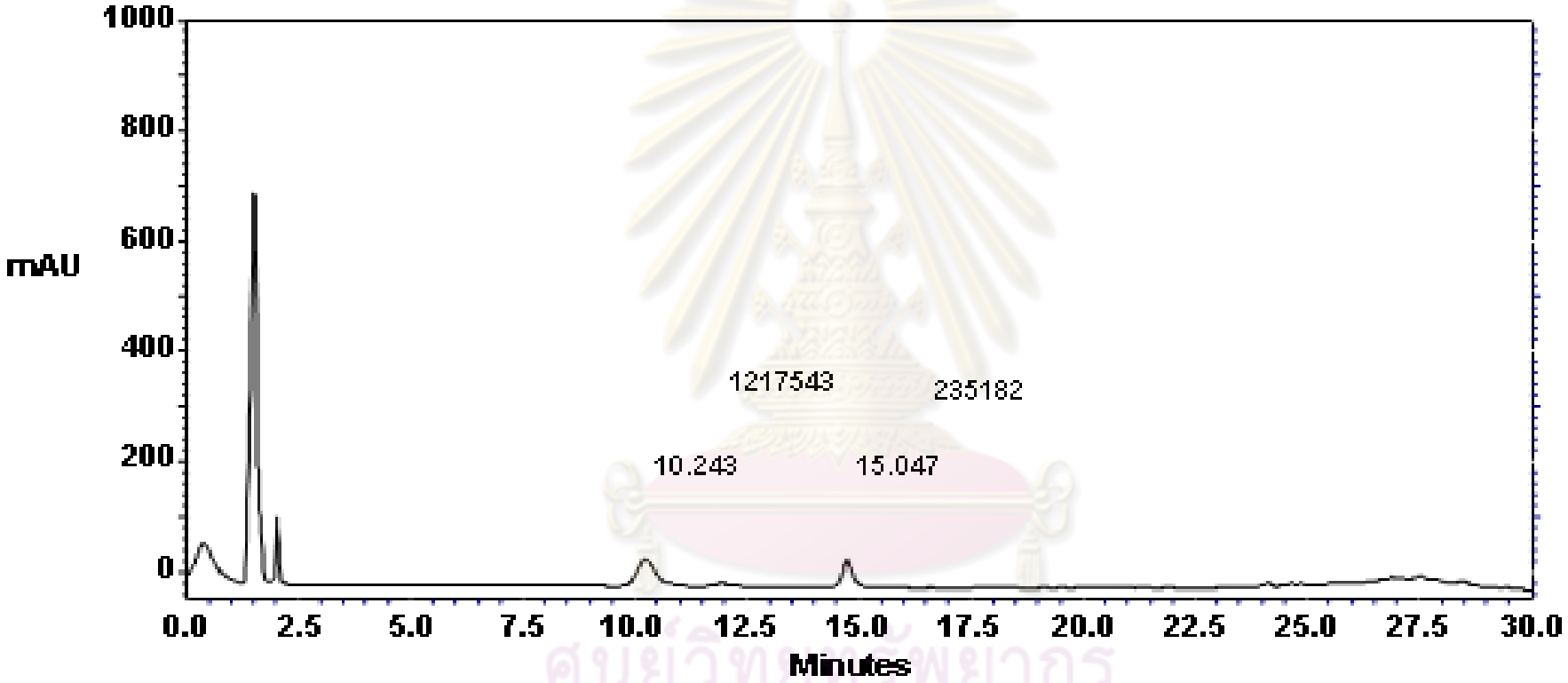
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.13 โครมาโตแกรมของสารนอร์ฟลอกซาซินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สำหรับตัวอย่างไข่ไก่ที่ได้จากเทคนิค HPLC



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.14 โครมาโตแกรมของตัวอย่างไข่ไก่ที่เติมสารนอร์ฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากเทคนิค HPLC



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ชั่ง	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 แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	20	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

Bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ BCA protein assay เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

<u>BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B</u> (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE) ก่อนใช้ผสม Reagent A: B ในอัตราส่วน 50:1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมนอร์ฟลอกซาซินกับ BSA และ HRP

0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 ด้วย 3M NaCl หรือ 3M HCL และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

5. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 4 M NaCl

NaCl	233.76	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. 0.1 M Citrate buffer, pH 6 4.5 3.5 และ 3

Citric acid 19.21 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Na_2HPO_4 14.19 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรต citric acid ด้วย Na_2HPO_4 จนได้ pH 6 4.5 3.5 และ 3.0 แล้วจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง

3. 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

ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 8.0 แล้วจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง

4. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Hydrochloric acid (HCl) 1 M

ไตเตรต Tris (hydroxymethyl) aminomethane ด้วย HCl จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stracking gel and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separation gel (10%)
Sterile distilled water (ml)	1.46	3.84
40% Acrylamide gel (ml)	0.25	2.0
1.5 M Tris , pH 8.8 (ml)	-	2.0
1.0 M Tris , pH 6.8 (ml)	0.25	-
10% SDS (ml)	0.02	0.08
10% APS (ml)	0.02	0.08
TEMED (ml)	0.002	0.0032
final volume (ml)	2	8

2. Sample buffer

SDS	4	มิลลิลิตร
1M Tris (pH 6.8)	1	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.001	กรัม
87% Glycerol	2.29	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ทำการเติม beta-mercaptoethanol 100 ไมโครลิตร

3. Running buffer(1X) 1 ลิตร

Tris	15.1	ไมโครลิตร
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. Coomassie brilliant blue 1 ลิตร

Coomassie Brilliant blue R-250	2.5	มิลลิลิตร
Methanol	500	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	397.5	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. Destaining solution 1 ลิตร

Methanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

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

   ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

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	18	ลิตร

   ผสมให้เข้ากัน

3. 0.05% PBS-Tween 20

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

   ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

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

   ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย citric acid จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. <u>0.1 M Sodium Acetate, pH 6.0</u>

$C_2H_3O_2NaH_2O$ 13.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรต $C_2H_3O_2NaH_2O$ ด้วย acetic acid จนได้ pH 6.0 เก็บใส่ขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. <u>Substrate OPD</u>

O-phenylenediamine	40	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

8. <u>Substrate TMB</u>

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	1	มิลลิกรัม
0.1 M Sodium Citrate buffer, pH 6.0	10	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	3.14	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

9. <u>2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)</u>

H_2SO_4 (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

<u>หมายเหตุ</u> ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

10. <u>1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)</u>

2.5 M H_2SO_4	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

<u>หมายเหตุ</u> ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศานิกานต์ เสนีวงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549 และได้นำเสนอผลงานเรื่องชุดตรวจสอบสารนอร์ฟลอกซาซินโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติในระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 20 ณ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อวันที่ 14-17 ตุลาคม 2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย