การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน

นางสาว วิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXYTETRACYCLINE

Miss Wirongrong Natakuathung

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	**การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน**
โดย	นางสาววิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อออกซีเตตราซัยคลิน. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXYTETRACYCLINE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 92 หน้า.

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

สาขาวิชา ....เทคโนโลยีชีวภาพ....... ลายมือชื่อนิสิต.....วิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง.....
ปีการศึกษา........2552..................... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....นันทิกา คงเจริญพร
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....Kittinan Komolpis.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5072471123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: OXYTETRACYCLINE/ ELISA/ MONOCLONAL ANTIBODIES/ HYBRIDOMA

WIRONGRONG NATAKUATHUNG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST OXYTETRACYCLINE. THESIS ADVISOR: NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 92 pp.

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : Biotechnology Student's Signature Wirongrong Natakuathung

Academic Year : 2009 Advisor's Signature Nanthika K.

Co-Advisor's Signature K. Komolpis.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้โอกาสในการทำวิจัย ให้คำปรึกษา คำแนะนำ แนะแนวทางการทำวิจัยเพื่อให้งานวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ และ อาจารย์ ดร.พอจิต นันทนาวัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางทำการวิจัย เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์โดยไม่คิดมูลค่า

ขอกราบขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความเห็นในการทำวิจัย และความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์ และ อาจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ในการทำงานวิจัยทุกชิ้น

ขอขอบคุณพี่ ๆ นักวิจัย โดยเฉพาะคุณอณุมาศ บัวเขียว สำหรับการสนับสนุนอย่างดีในการทำวิจัย และความช่วยเหลือต่าง ๆ คุณอุมาพร พิมพ์พิทักษ์ สำหรับคำแนะนำ ให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยตลอดการทำวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน รวมถึงเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำ ในด้านต่าง ๆ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้ในเวลาที่พบเจอกับอุปสรรค

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้ให้กำเนิด ที่ให้โอกาสในการศึกษาในระดับปริญญาโทและการสนับสนุนด้านการศึกษา มีความรัก ความเข้าใจ และกำลังใจให้มาตลอด รวมถึงน้องชายที่สนับสนุนและให้กำลังใจเสมอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ
กิตติกรรมประกาศ... ฉ
สารบัญ.. ช
สารบัญตาราง.. ฌ
สารบัญภาพ.. ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ... ฑ
บทที่

1. บทนำ.. 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.. 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.. 2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.. 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.. 4
2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารออกซีเตตราซัยคลิน........................ 4
2.1.1.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา.. 5
2.1.1.2 ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยา... 5
2.1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน.............................. 6
2.1.3 คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์... 7
2.1.3.1 การดูดซึมยา... 7
2.1.3.2 การแพร่กระจายตัวของยา.. 8
2.1.3.3 การเปลี่ยนแปลงของยา.. 8
2.1.3.4 การขับถ่ายยา 9
2.1.4 ปัญหาการใช้ยาและสารเคมี ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ในประเทศไทย............. 10
2.1.5 ความสำคัญของสารในกลุ่มเตตราซัยคลินต่อการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย 10
2.1.6 พิษของสารตกค้างในกลุ่มเตตราซัยคลิน... 11
2.1.7 มาตรฐานสารตกค้างออกซีเตตราซัยคลิน.. 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.8 ปัญหาสารตกค้าง ในกลุ่มเตตราซัยคลินในประเทศไทย........................ 15
2.1.9 วิธีการตรวจติดตามสารตกค้างในกลุ่มเตตราซัยคลิน.......................... 17
2.1.10 ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.. 19
2.2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 32
3. วิธีการดำเนินการวิจัย
3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 35
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 35
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.. 36
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย.. 39
3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน............................... 39
3.4.2. การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย OTC-BSA............................. 40
3.4.3. การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ต่อ OTC... 41
3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้........... 44
3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์... 45
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง
4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง............................... 48
4.2. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูในการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC.......... 49
4.3. ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอล
แอนติบอดี ต่อ OTC.. 52
4.4. ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี....................... 54
4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี............................ 54
4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ.... 54
4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC........... 58
4.5. ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.. 61
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ... 64
รายการอ้างอิง.. 67
ภาคผนวก 72
ภาคผนวก ก.. 73
ภาคผนวก ข.. 86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดของยากลุ่มเตตราซัยคลิน	9
2.2	ระยะเวลาหยุดให้ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ	9
2.3	มาตรฐานปริมาณของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่มนุษย์สามารถรับได้ในแต่ละวัน (ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร (MRLs)	13
2.4	มาตรฐานปริมาณของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในสัตว์น้ำ (MRLs)	14
2.5	ข้อกำหนดยาสัตว์ในกลุ่มเตตราซัยคลิน ตกค้างที่ประกาศโดยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549	15
2.6	คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอิมมูโนโกลบูลิน คลาสและสับคลาสต่าง ๆ	26
2.7	คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี	27
3.1	สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	35
3.2	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	35
3.3	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	36
4.1	แสดงระดับแอนติบอดีของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA	50
4.2	การทดสอบความสามารถในการจับกับ OTC ในรูปอิสระ จากซีรัมของหนูทดลอง ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA โดยวิธี Indirect competitive ELISA	52
4.3	ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 10 ตัว ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ OTC-BSA	53
4.4	ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA	54
4.5	ความสัมพันธ์ของความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A กับค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบวิธี Indirect ELISA	55
4.6	IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A โดยวิธี Indirect competitive ELISA	56

4.7	ค่า IC_{50} เฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเฉลี่ยของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A ต่อสารในกลุ่ม TCs และ สารนอกกลุ่ม โดยวิธี Indirect competitive ELISA................................	59
4.8	ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE..	63
ก.1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA..	73
ก.2	ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในครั้งที่ 2 โดยวิธี Indirect competitive ELISA	74
ก.3	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect ELISA...	74
ก.4	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-3G โดยวิธี Indirect ELISA...	75
ก.5	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect ELISA...	76
ก.6	ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA..	77
ก.7	ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA..	78
ก.8	ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-11A กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA	79
ก.9	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยการทำ Indirect ELISA เพื่อหา Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..	80
ก.10	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ Indirect ELISA ที่ 492 นาโนเมตร..	80
ก.11	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA..	81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.12	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 2-4F ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........	82
ก. 13	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 7-3G ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........	82
ก. 14	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 11-11A ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA	83
ก.15	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA..	83
ก. 16	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 2-4F หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........	84
ก. 17	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 7-3G หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........	84
ก. 18	ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 11-11A หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA..	85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน..	6
2.2	การเกิด enterohepatic recycling ของยากลุ่มเตตราซัยคลิน............................	8
2.3	โครงสร้างของโปรตีน โครงสร้างปฐมภูมิ(Primary structure), โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure), โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure)	20
2.4	โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี..	24
2.5	โครงสร้างของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์..	25
2.6	ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง......................................	29
2.7	แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ de novo pathway และ salvage pathway	30
2.8	Indirect ELISA และ Indirect Competitive ELISA..	32
3.1	แสดงการเชื่อมติดของ OTC กับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich............................	39
4.1	โครมาโตรแกรมของมวลโมเลกุลของ OTC-BSA เมื่อเทียบกับ BSA โดยวิธี MALDI-TOF MS..	49
4.2	ตัวอย่างระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA จำนวน 4 ตัว จาก 10 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม เทียบกับซีรัมของหนูตัวที่ 1 ที่ใช้แอนติเจน OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุม โดยใช้ซีรัมของหนูทดลองเจือจาง 1:1,000 ถึง 1:1,024,000...	51
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F..	56
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G..	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน11-11A 57

4.6 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A 58

4.7 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect competitive ต่อสารในกลุ่ม TCs........ 60

4.8 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 7-3G โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อ สารในกลุ่ม TC s........ 60

4.9 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs 61

4.10 โครมาโตแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F ให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร ชะแอนติบอดีด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที........ 62

4.11 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE........ 63

ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........ 73

ก.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยมีโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ Phosphorylase (MW. 97.4 kDa) Albumin (MW. 66.2O kDa) Ovalbumin (MW. 45.2 kDa) Carbonic anhydrase (MW. 31 kDa) Trypsin inhibitor (MW. 21.5 kDa) และ α-lactalbumin (MW. 14.4 kDa) ตามลำดับ........ 81

ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........ 82

ก.4 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA........ 84

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	ความหมาย
RIA	radio immunoassay
RTC	rolitetracycline
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TC	tetracycline
TC-HCl	tetracycline hydrochloride
TCs	tetracyclines
TEMED	N,N,N,N-tetramethy-ethylenediamine
T_C	cytotoxic T cell
T_H	helper T cell
TK	thymidine kinase
UV	ultraviolet
V	volt
V_H	variable region of heavy chain
V_L	variable region of light chain
v	volume
w	weight
μ	micro
%	percent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งสินค้าออกไปจำหน่ายต่างประเทศเป็นจำนวนมาก โดยมีสินค้าออกที่สำคัญ ได้แก่ สินค้าด้านเกษตรกรรม ซึ่งสินค้าที่สำคัญชนิดหนึ่งได้แก่ กุ้ง โดยประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งเป็นอันดับ 1 ของโลก มีมูลค่าการส่งออกประมาณ 94,149 ล้านบาท คิดเป็นประมาณ 20 % ของส่วนแบ่งตลาดโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) ในปี พ.ศ. 2533 ประเทศไทยพบปัญหา การตรวจพบยาออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อกุ้งที่ส่งออกไปขายในประเทศญี่ปุ่น จึงต้องมีการทำลายสินค้าทั้งหมด ทำให้สูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก (สุรพล ว่องวัฒนโรจน์, 2534)

ออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline; OTC) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน ซึ่งประกอบไปด้วย เตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลินเป็นต้น ยากลุ่มเตตราซัยคลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงออกฤทธิ์กับเชื้อก่อโรคบางชนิดที่ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นรักษาไม่ได้ เช่น ริกเกตเซีย ไวรัสขนาดใหญ่ มัยโครพลาสมา และ โปรโตซัว ซึ่งออกซีเตตราซัยคลินถูกใช้อย่างกว้างขวาง ในการเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ล็อปสเตอร์และ ปลาดุก เพื่อช่วยในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในช่วงการเจริญเติบโตของสัตว์ แต่ได้ถูกยกเลิกการใช้งานเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตซึ่งผสมลงไปในอาหารในปี พ.ศ. 2546 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2546) การใช้ออกซีเตตราซัยคลินเพื่อการรักษา โดยไม่มีการคำนึงถึงระยะพักสัตว์ก่อนการจับไปขาย ส่งผลให้มีปริมาณสารปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภค ซึ่งอาจทำให้เกิดการแพ้หรือทำให้เกิดปฏิกิริยาในระบบภูมิคุ้มกัน การได้รับยาปฏิชีวนะในปริมาณน้อยเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดปัญหาในการเกิดการต้านทานเชื้อก่อโรคในคน ทำให้หลายประเทศได้กำหนดปริมาณยาปฏิชีวนะที่มากที่สุดที่สามารถตกค้างได้ (maximum residue limits ;MRLs) Codex Alimentarius ได้กำหนด MRLs สำหรับออกซีเตตราซัยคลิน ในเนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อปลา และ เนื้อกุ้ง ในปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb) ส่วนในสหภาพยุโรปและประเทศไทยได้กำหนด MRLs ในเนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อปลา และ เนื้อกุ้ง ในปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ppb)

จากปัญหาดังกล่าวทำให้ประเทศไทยต้องหันกลับมาคำนึงถึงปริมาณยาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในเนื้อสัตว์

และผลิตภัณฑ์สัตว์ก่อนการส่งออกในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ในการตรวจด้วยวิธีทางเคมี เช่น High Performance Liquid Chromatrography (HPLC) (Cherlet และ คณะ, 2003) และ Liquid Chromatrography Mass Spectrometry (LC-MS) (Koesukwiwat และคณะ , 2007) สามารถหาปริมาณหาสารตกค้างได้ถูกต้องและแม่นยำสูงแต่เครื่องมือมีราคาแพง ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจสอบที่ใช้หลักการของวิธี Colorimetric method (แพรวพรรณ ห้องทองแดง และคณะ, 2548) โดยปฏิกิริยาการเกิดสีที่แตกต่างกันระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิด มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ราคาถูก ใช้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือปริมาณต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ค่อนข้างสูง จึงนิยมใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์มากว่าใช้ตรวจการตกค้างในอาหารสำหรับมนุษย์

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ค่าใช้จ่ายราคาถูก รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้นได้เป็นจำนวนมากเพื่อเป็นการคัดกรองตัวอย่างก่อนที่จะนำไปตรวจโดยการใช้เครื่องมือทางเคมี เช่น HPLC, LC-MS, LC-MS-MS

ในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการนำเข้าชุดตรวจสอบ ELISA จากต่างประเทศเป็นจำนวนมากเพื่อใช้สำหรับตรวจหาสารตกค้าง ก่อนทำการส่งออกสินค้า แต่ชุดดังกล่าวมีราคาสูงประมาณ 25,000 บาท โดยสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละ 40 ตัวอย่าง ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูปใช้เองภายในประเทศจะช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบได้ ซึ่งการเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA นั้น จำเป็นจะต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OTC และมีลักษณะสมบัติเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบหาสาร OTC ตกค้าง ด้วยวิธี ELISA ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OTC

2) ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1) ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2) เตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู

3) ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ OTC

4) หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

5) ผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

6) ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

7) วิเคราะห์ สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ OTC และทราบลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่คัดเลือกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ที่มาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline; OTC)

OTC เป็นยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน (Tetracyclines; TCs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Streptococcus, Staphylococcus, Anthracoids, Pasteurella, Brucella, Corynebacteria, กลุ่ม coliforms และ Salmonella (ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์, 2535)

ยาในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจากเชื้อราในตระกูล *Streptomyces* ยาตัวแรกที่ค้นพบคือ คลอเตตราซัยคลิน (Chlortetracycline; CTC) ค้นพบในปี 1948 โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* ต่อมาก็มีการค้นพบยา Oxytetracycline โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตยากลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดึงเอาอะตอมของ คลอรีนอะตอมออกจาก CTC ยาที่ผลิตได้ใหม่นี้ เรียกว่า เตตราซัยคลิน (Tetracycline; TC) เหมือนชื่อกลุ่มยา

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

ยาในกลุ่มนี้จะจับกับสารที่รวมตัวกับไอออนของโลหะ ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และ เหล็ก ยาที่มีการสร้างโครงสร้างขนาดใหญ่ซึ่งมีไอออนของโลหะอยู่ภายใน จะไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร ดังนั้น ฤทธิ์ของยาในกลุ่มจึงขึ้นกับยาส่วนที่ไม่เกาะกับไอออนของโลหะ เพราะยาส่วนนี้ดูดซึมเข้าไปในร่างกายโดยตรง จึงไม่ควรให้ยาในกลุ่มนี้พร้อมกับนม และ อาหาร

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินที่นิยมใช้ในทางสัตวแพทย์ ได้แก่

1. Tetracycline hydrochloride (TC-HCl) มีชื่อทางการค้าตามบริษัทที่ผลิต ได้แก่ Achromycin, Panmycin, Polycycline ยา TC-HCl มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่นและละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารละลาย ด่างแก่ และสารละลายกรดที่มี pH ต่ำกว่า 2
2. Oxytetracycline hydrochloride (OTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Terramycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง มีรสขมและไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในน้ำและสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ยานี้นิยมให้โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

3. Chlortetracycline hydrochloride (CTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Aureomycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีรสขมและละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ไม่ควรให้ยาตัวนี้เข้ากล้ามเนื้อ เพราะยาอาจทำให้กล้ามเนื้อระคายเคืองและเกิดเนื้อตายได้
4. Doxycycline monohydrate (DC) เป็นยาที่ดูดซึมได้ดีและขับถ่ายออกในระยะเวลาช้ากว่ายาเตตราซัยคลินตัวอื่น ๆ ยาจึงออกฤทธิ์นาน ยาตัวนี้เริ่มเป็นที่นิยมใช้ในวงการสัตวแพทย์ เพราะให้ขนาดยาน้อยลง และไม่ต้องให้ยาซ้ำบ่อย ๆ เหมือนยาในกลุ่มเตตราซัยคลินตัวอื่น ๆ
5. Methacycline hydrochloride เป็นยาที่สังเคราะห์และดัดแปลงมาจากยาออกซีเตตราซัยคลินมีประสิทธิภาพดีกว่ายาเตตราซัยคลินตัวอื่น ๆ
6. Minocycline hydrochloride เป็นยาเตตราซัยคลินกึ่งสังเคราะห์จะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามต่อการดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus sp.* บางสายพันธุ์กับยาเตตราซัยคลินตัวอื่นและยาตัวนี้จะถูกเมแทบอลิซึมได้สมบูรณ์กว่ายาในกลุ่มเตตราซัยคลินตัวอื่น

2.1.1.1 **กลไกการออกฤทธิ์ของยา**

การออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มเตตราซัยคลินสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ

1. Active chelating ของ cation ยานี้จะไปเกาะกับแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม จึงยับยั้งการเกิด oxidative phosphorylation ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ร่างกายสัตว์
2. ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเป็น ยา CTC จะยับยั้งเอนไซม์ organic nitroreductase ของเซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์นี้ยังถูกยับยั้งโดยส่วนของแบคทีเรียที่ถูกทำลายแล้วด้วย
3. ขัดขวางการสร้างโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตและ แบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ที่สำคัญของยากลุ่มนี้ โดยยาจะไปเกาะกับส่วน 50s ไรโบโซม ของ 70s ไรโบโซม ของเซลล์แบคทีเรีย จึงขัดขวางการขนย้ายของกรดอะมิโน จาก aminocyl-tRNA ไปยังส่วน polypeptide ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ (bacteriostatic)

2.1.1.2 **ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยา**

ยากลุ่มของยาเตตราซัยคลินออกฤทธิ์ได้ดังนี้

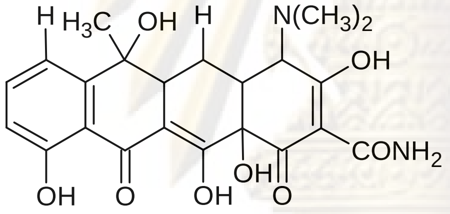
1. ออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยยาจะไปออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic) แต่ถ้าให้ยาในขนาดสูง ๆ จะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ

แบคทีเรีย (bactericidal) เลย ฤทธิ์ของยาจะลดลงเมื่อมีซีรัม เลือด และ bacterial debris ที่บริเวณนั้น ยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อยากลุ่มเตตราซัยคลิน ได้แก่ *β-Hemolytic Streptococcus*, *Klebsiella sp.*, *Nonhemolytic Streptococcus*, *Clostridium sp.*, *Brucella sp.*, *Hemophilus sp.*

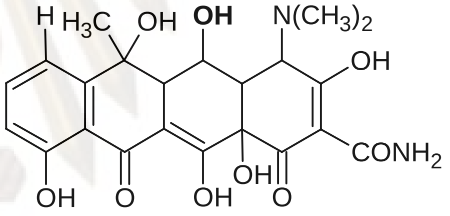
2. ออกฤทธิ์ทำลาย pathogenic agent บางชนิดที่ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ทำลายไม่ได้ ได้แก่ พวก Rickettsiae ไวรัสขนาดใหญ่ เช่น Psittacosis ในสัตว์ และ Lymphogranuloma venereum ในคน
3. ออกฤทธิ์ทำลาย *Mycoplasma sp.*, *Spirochete sp.*และ *Actinomyces sp.*
4. ถ้าให้ขนาดสูง ๆ จะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโปรโตซัวได้

2.1.2 **สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน**

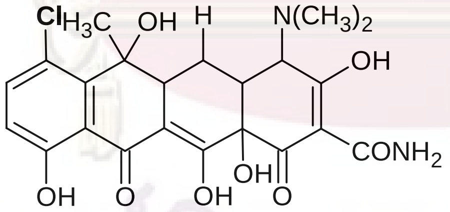
ยาทุกตัวในกลุ่มเตตราซัยคลินจะมีโครงสร้างหลักเหมือนกันคือ hydronapthacene skeleton หรือ เรียกว่า tetracycline nucleus



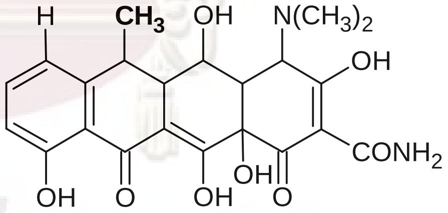
Tetracycline



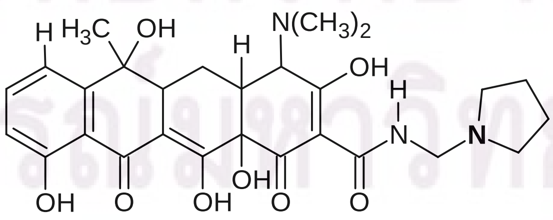
Oxytetracycline



Chlortetracycline



Doxycycline



Rolitetracycline

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่มเตตราซัยคลิน

ที่มา : กมลชัย ตรงวาณิชนาม, 2547

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 คุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์

2.1.3.1 การดูดซึมยา

1. ทางการกิน

ในพวกสัตว์กินเนื้อ ภายหลังจากที่ให้กินยากลุ่มนี้แล้ว ยาจะดูดซึมได้ดีใน กระเพาะ อาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ยาจะถึงระดับสูงสุดในกระแสเลือดภายใน 2-4 ชั่วโมง และคงอยู่ในระดับนี้นาน 6 ชั่วโมงหรือมากกว่านี้ จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง จนตรวจพบเพียงเล็กน้อยในเลือดภายหลังจากให้ยา 24 ชั่วโมง จึงให้ยาทุก 6 ชั่วโมง พวกแคลเซียมและแมกนีเซียมในทางเดินอาหาร จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับยา กลุ่มนี้ทำให้ยาดูดซึมได้ลดลง ดังนั้นจึงควรให้ยาหลังจากกินอาหาร 1 ชั่วโมง สารพวก citric acid และ sodium metaphosphate จะช่วยป้องกันไม่ให้แคลเซียมมาทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับยากลุ่มนี้ ทำให้ยาถูกดูดซึมได้ดี ภายหลังจากที่ถูกดูดซึมแล้ว ยาบางส่วนจะไปอยู่ที่ตับแล้วขับออกมากับน้ำดีและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก เรียกว่าเกิด enterohepatic recycling จึงยังมียาบางส่วนคงอยู่ในเลือดเป็นเวลานาน ซึ่งต่างจากยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ที่ขับถ่ายออกมาจากร่างกายอย่างรวดเร็ว

2. ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

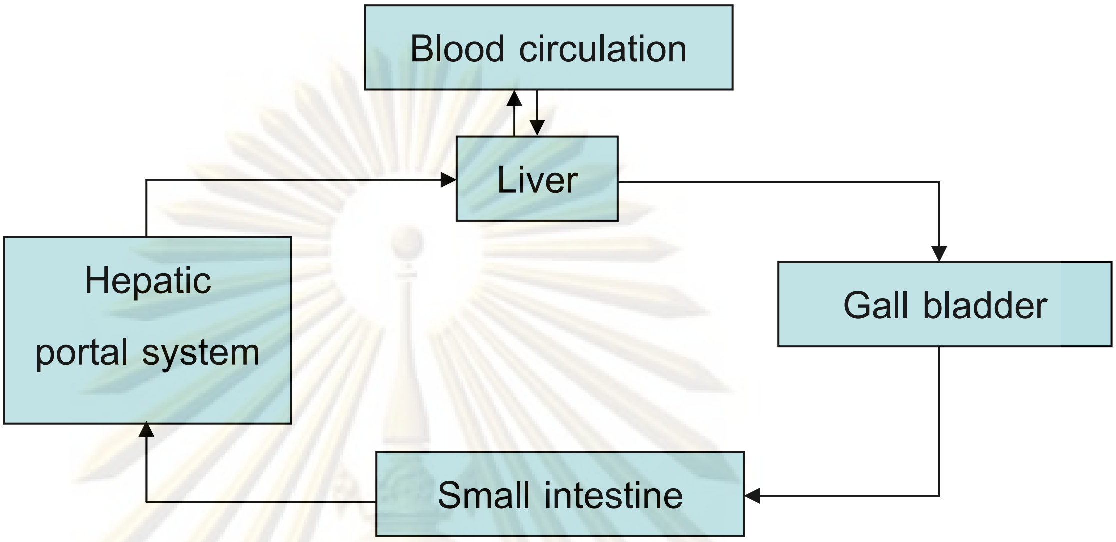
นิยมใช้วิธีนี้กับออกซีเตตราซัยคลิน และ เตตราซัยคลินเว้นแต่จะไม่สามารถใช้กับ CTC เพราะทำให้เกิดเนื้อตายที่บริเวณที่ฉีด โดยควรจะฉีด OTC เข้ากล้ามเนื้อลึก ส่วนการฉีด TC อาจทำให้กล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีดเกิดอาการระคายเคือง เกิดการบวมน้ำและอักเสบขึ้นได้ เมื่อให้ยา TC หรือ OTC เข้ากล้ามเนื้อจะตรวจพบยาในเลือดภายในเวลา 15 นาที หลังการฉีด และยาจะขึ้นถึงระดับสูงสุดภายใน 1 ชั่วโมง ยาจะคงที่อยู่ในระดับที่ให้ผลในการรักษาโรคนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงจนตรวจพบเพียงเล็กน้อย หลังการฉีด 24 ชั่วโมง ในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ไม่ควรฉีดยานี้เข้ากล้ามเนื้อแห่งละเกิน 10 มิลลิลิตร เพราะยาจะทำให้ระคายเคืองและเกิดยาตกค้าง

3. ทางการฉีดเข้าหลอดเลือด

จะฉีดเข้าหลอดเลือดเมื่อไม่สามารถให้สัตว์กินได้ หรือเมื่อให้กินยาแล้วเกิดความผิดปกติของทางเดินอาหาร เช่น เกิดอาการบวมน้ำ และ อาเจียน รวมทั้งเมื่อต้องการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรง เพราะเมื่อให้ยาเข้าทางหลอดเลือด ยาจะถึงระดับการรักษาทันที ยา กลุ่มเตตราซัยคลิน ที่ผสมยาชาเฉพาะแห่งไม่ควรใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดเพราะยาชาที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมอยู่จะไปมีผลต่อกลไกการนำกระแสประสาทของหัวใจ (cardiac conduction mechanisms)



ภาพที่ 2.2 การเกิด enterohepatic recycling ของยากลุ่มเตตราซัยคลิน
ที่มา : กมลชัย ตรงวาณิชนาม, 2547

2.1.3.2 **การแพร่กระจายตัวของยา**

ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินจะเกาะกับโปรตีนในพลาสมาแบบผันกลับได้ (reversible) แพร่กระจายไปทั่วร่างกาย พบความเข้มสูงสุดที่ไต ตับ ม้าม และ ปอด ตามลำดับ อีกทั้งยังพบยากลุ่มนี้ที่ส่วนของกระดูกที่กำลังเกิด ossification และ พบในส่วน prostatic fluid ด้วย จึงใช้ยาในกลุ่มนี้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ต่อมลูกหมาก (prostate gland) นอกจากนั้นยากลุ่มนี้ยังแพร่กระจายผ่านรกไปยังลูกอ่อนจึงสามารถพบยาในเปลือกไข่ไก่และไก่งวง แต่ข้อเสียของยากลุ่มนี้คือจะแพร่ผ่านไปในน้ำเลี้ยงสมอง (cerebrospinal fluid) ได้เพียงเล็กน้อยโดยที่ยาเตตราซัยคลิน จะแพร่เข้าไปได้ดีกว่ายาออกซีเตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน

2.1.3.3 **การเปลี่ยนแปลงของยา**

ยากลุ่มเตตราซัยคลินมีการเปลี่ยนแปลงหลายระดับ แต่ส่วนใหญ่พบในปัสสาวะ อุจจาระ และในเนื้อเยื่อจะอยู่ในรูป parent tetracycline ในอุจจาระจะพบยาเตตราซัยคลินในรูปเดิมอยู่ถึง 30%

2.1.3.4 การขับถ่ายยา

ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะขับถ่ายออกได้ทั้งทางปัสสาวะโดยผ่านทางไต ทาง อุจจาระ และทางน้ำนม แต่ส่วนใหญ่จะขับถ่ายโดยผ่านทางไต เมื่อให้ยานี้เพียงครั้งเดียวจะพบยาขับออกทางปัสสาวะประมาณ 20-30% ยาในกลุ่มนี้แต่ละตัวจะขับถ่ายออกจากร่างกายโดยใช้เวลาต่างกัน ขึ้นอยู่กับค่าครึ่งชีวิตของยาในเลือด

ตารางที่ 2.1 ค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดของยากลุ่มเตตราซัยคลิน

ยา	ค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง)
Chlortetracycline	5.5
Tetracycline	8.5
Oxytetracycline	9.5
Methacycline	15.0
Demeclocycline	17.0
Minocycline	17.5
Doxycycline	19.5

ที่มา : กมลชัย ตรงวาณิชนาม, 2547

ถึงแม้ยาจะถูกขับถ่ายออก แต่ก็มียาบางส่วนที่ตกค้างอยู่ในร่างกายสัตว์ได้ เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการกำหนดระยะเวลาที่หยุดให้ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ (withdrawal time)

ตารางที่ 2.2 ระยะเวลาหยุดให้ยาในกลุ่มเตตราซัยคลินก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ

ยา	ระยะเวลาที่หยุดให้ยาก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ (วัน)			
	โค	หมู	ไก่	กุ้ง
Chlortetracycline hydrochloride	3	5	1	-
Tetracycline hydrochloride	5	26	0	-
Oxytetracycline hydrochloride	7	4	-	25

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) ไม่มีรายงาน

ที่มา : ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์, 2535 และ กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2547

2.1.4 ปัญหาการใช้ยาและสารเคมี ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ในประเทศไทย

การใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันหรือรักษาโรค เป็นปัจจัยหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ทุกชนิด เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย ซึ่งได้รับการพัฒนาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา จนเป็นระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาหนาแน่น (Intensive culture) มีการใช้ยาและสารเคมีในกระบวนการเลี้ยงทั้งวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรค รักษาโรค และการจัดการคุณภาพดินและน้ำ จนเมื่อปี พ.ศ. 2545 ปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกุ้งส่งออก ทำให้เกิดคำถามถึงการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลแบบหนาแน่น คือ การเกิดโรคระบาด ทำให้เกษตรกรใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันและรักษาโรค การใช้ยาและสารเคมีโดยขาดการควบคุมและความเข้าใจในการใช้ยาอย่างถูกต้องทำให้เป็นปัญหาต่อเนื่องอย่างมากมาย รวมถึงการตกค้างของยาหรือสารเคมีในเนื้อกุ้งซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งทะเลไทยมากที่สุดในปัจจุบัน

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

การศึกษาการใช้ยาและสารเคมีในฟาร์มกุ้ง พบว่ายาตัวอย่างที่ได้รับการสุ่มตรวจตามท้องตลาดไม่มีประสิทธิภาพตามที่อ้างไว้บนฉลากสำหรับการรักษาและป้องกันแบคทีเรียในสัตว์น้ำ ยาไม่มีการขึ้นทะเบียนตำรับยาตามกฎหมาย ยาดังกล่าวจึงขาดการรับรองคุณภาพและเอกสารกำกับยาไม่ถูกต้อง ทำให้เกษตรกรมีการใช้ยาผิดวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค โดยยาที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ ออกซีเตตราซัยคลิน ออกโซลินิก แอซิด คลอแรมฟินิคอล และ ฟูราโซลิโดน เป็นต้น (เจนนุช ว่องธวัชชัย, 2547)

2.1.5 ความสำคัญของสารในกลุ่มเตตราซัยคลินต่อการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย

สารในกลุ่มเตตราซัยคลิน เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างและมีราคาถูก ทำให้เกษตรกรใช้ในการเลี้ยงสัตว์ เพื่อเป็นสารป้องกันการติดเชื้อและรักษาโรคในสัตว์เพราะเมื่อสัตว์เกิดอาการป่วยหรือล้มตายจะทำให้เกิดการขาดทุน นอกจากนี้ได้มีการใช้งานสารในกลุ่มนี้ใน

การเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งใน ค.ศ. 1940 นักวิทยาศาสตร์พบว่ายาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น เตตราซัยคลิน สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ได้ (Antibiotic growth promoter; AGP) ในปี ค.ศ. 1953 องค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา หรือ USFDA ได้รับรองให้ออกซีเตตราซัยคลิน และ คลอเตตราซัยคลิน เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ (Animal feed additive) หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1969 Swann Committee แห่งสหราชอาณาจักร ค้นพบสารพันธุกรรมที่ต้านฤทธิ์ยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินในสัตว์เลี้ยงที่ได้รับสารเร่งการเจริญเติบโต และ ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* สหราชอาณาจักร จึงประกาศห้ามใช้ออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลิน เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 และ เมื่อปี ค.ศ. 2006 สหภาพยุโรปได้ประกาศห้ามใช้ออกซีเตตราซัยคลินและคลอเตตราซัยคลินผสมในอาหารสัตว์ เช่นกัน

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้ใช้อย่างถูกกฎหมาย โดยเป็นยาที่ CODEX รับรองให้ใช้ในการผลิตสัตว์น้ำและสัตว์บกเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ (ศูนย์วิจัยประมงน้ำจืดขอนแก่น, 2545)

ในปี พ.ศ. 2538 ญี่ปุ่นตรวจพบออกซีเตตราซัยคลินและกรดออกโซลินิก (Oxolinic acid) ในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งในระดับเกินที่กฎหมายกำหนด จึงต้องเผาทำลายสินค้าเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นกรมประมงจึงได้กำหนดให้มีการตรวจปริมาณออกซีเตตราซัยคลินและกรดออกโซลินิกตกค้าง ในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งก่อนส่งออก ไม่ให้เกินจากที่กฎหมายของประเทศคู่ค้ากำหนด ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา (อมรชัย เลิศเจริญ, 2545)

2.1.6 **พิษของสารตกค้างในกลุ่มเตตราซัยคลิน**

ในปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินกันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ โดยจะใช้เพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียต่าง ๆ และใช้เพื่อชะลอการเน่าเปื่อยของเนื้อสัตว์ ซึ่งปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในกล้ามเนื้อหรือน้ำนมของสัตว์ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ถ้าได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งอาจเป็นพิษและมีฤทธิ์แทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร กระทบต่อตับและไต นอกจากนั้นยังมีผลต่อกระดูกและฟัน

การตกค้างของยาเตตราซัยคลิน ในผลิตภัณฑ์อาหารในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) จะไม่ส่งผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่ในระยะยาวอาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ เนื่องจากการที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรคได้ ถ้าตรวจพบสารในระดับ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจทำให้เกิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานหรือผู้ที่มีโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยจะสามารถทำลายเชื้อ normal flora จนทำให้เกิดการติดเชื้อก่อโรคแทรกซ้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียอื่น ๆ ทำให้มีอาการท้องเดิน มีไข้จากเชื้อ *Staphylococcus sp.* เกิดการติดเชื้อรา *Candida albican* ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือ ทางเดินอาหาร มีผลต่อกระดูกและฟัน โดย TCs จะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟัน ยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟัน สารเกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันมีสีน้ำตาลและเมื่อถูกแสง จะทำให้สีน้ำตาลดูเข้มขึ้น เนื่องจากยากลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้ ดังนั้นถ้าใช้ขณะตั้งครรภ์และทำให้ฟันน้ำนมของทารกมีสีน้ำตาลแต่จะไม่มีผลกับฟันแท้ นอกจากนี้ยาเตตราซัยคลิน ทุกชนิดยังทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ และรู้สึกชาบริเวณที่ถูกแสง (ปริญญา มาสวัสดิ์, 2550)

2.1.7 มาตรฐานสารตกค้างออกซีเตตราซัยคลิน

สำนักงานมาตฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้กำหนดมาตรฐานปริมาณของสารที่มากที่สุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ (Maximun residue limits; MRLs) ในอาหารเพื่อเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงคุณภาพมาตรฐานสินค้าเกษตรให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดและได้มาตรฐานสากล นำมาเป็นข้อตกลงในการเจรจาทางการค้า เพื่อให้มีคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดที่มีอยู่ในมาตรฐานระหว่างประเทศ และของประเทศคู่ค้า เช่น ข้อกำหนดของ EU, โครงการมาตรฐานอาหาร เอฟเอโอ/ดับเบิลยูเอชโอ (Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme; Codex), JECFA (joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), FDA (Food and Drug Administration) และ Japanese Ministry of Health รวมถึงได้กำหนด ปริมาณของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่มนุษย์สามารถรับได้ในแต่ละวัน (Acceptable daily intake; ADI) เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังตารางที่ 2.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 มาตรฐานปริมาณของสารกลุ่มเตตราซัยคลินที่มนุษย์สามารถรับได้ในแต่ละวัน (ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้พบได้ในอาหาร (MRLs)

Source		MRLs (µg/ml)				
	ADI	Codex[1]	EU[2]	US[3]	Japan[4]	Thailand[5]
กล้ามเนื้อ		0.2	0.1	2	0.2	0.2
	0-3 µg/kg ต่อ					
ตับ	น้ำหนัก	0.6	0.3	6	0.6	0.3
ไต	ต่อ วัน	1.2	0.6	12	1.2	0.6
ไข่ไก่		0.4	0.2	-	0.4	0.4
นม		0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
ไขมัน		-	-	12	-	-

<u>หมายเหตุ</u> ผลิตภัณฑ์ เนื้อวัว หมู ไก่ เป็ด ไก่งวง แกะ กุ้ง ปลา และไข่ไก่

1. Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, 2000;
2. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections, *2006*
3. US Food and Drug Administration, 2003
4. สินค้าเกษตรและอาหารญี่ปุ่น มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2547
5. บัญชีแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ.2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารที่ USFDA (U.S. Food and Drug Administration) อนุญาตให้ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Drugs Used in the US Aquaculture Industry, 2003) แต่การใช้สารปฏิชีวนะในลักษณะดังกล่าว ก็จำเป็นจะต้องมีระยะหยุดยา ก่อนจับสัตว์น้ำขาย กองการตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง ได้กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี (Chemical Reference Criteria for Fishery Products) ของสารออกซีเตตราซัยคลิน ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำของประเทศต่าง ๆ ไว้ดังตารางที่ 2.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 มาตรฐานปริมาณของสารออกซีเตตราซัยคลินที่ระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในสัตว์น้ำ (MRLs)

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

<u>หมายเหตุ</u> - ไม่มีข้อมูล

ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี กรมประมง, 2552

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารรายใหญ่ของโลก สินค้าหลายชนิดที่ไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับ 1 รวมถึงกุ้งซึ่งมีมูลค่าการส่งออกของกุ้งและผลิตภัณฑ์ของกุ้งในปี 2552 มีมูลค่าการส่งออกมากขึ้นกว่าปี 2551 10.89% (จาก 84,303 เป็น 85,633 ล้านบาท) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2009) โดยประเทศที่ไทยมีการส่งออกสินค้าเกษตรมากที่สุดคือ สหรัฐอเมริกา รองลงมาคือ ประเทศญี่ปุ่น ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาและยกระดับผู้ผลิตของไทยให้สามารถผลิตสินค้าเกษตรและอาหารที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงเห็นสมควรจัดทำมาตรฐานเรื่องข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์และคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) ได้เห็นสมควรจัดทำข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร (Safety requirements for agricultural commodity and food) โดยอ้างอิงมาตรฐานและหลักเกณฑ์ที่ประกาศโดยองค์กรมาตรฐานระหว่างประเทศได้แก่ โครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO (Joint FAO/WHO Food Standard Programme; Codex) สำนักงานเลขาธิการอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention; IPPC) องค์การโรคระบาดสัตว์

ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties; OIE) และมาตรฐานของประเทศคู่ค้าที่สำคัญ ประกอบกับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร, 2549) ได้ให้นิยาม ยาสัตว์ตกค้าง ว่าหมายถึงสารประกอบตั้งต้น (parent drug) ซึ่งอาจเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการสร้างและสลาย (metabolites) สารตั้งต้นรวมถึงสารอื่นๆ ที่ติดมากับยาสัตว์ (associated impurities) ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ของสัตว์สำหรับบริโภค สินค้าเกษตร ซึ่งอาหารจะถูกตรวจสารพิษตกค้างที่เกิดจากการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ขึ้นทะเบียนอย่างถูกต้องตามกฎหมายได้ไม่เกินปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRLs) (สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหาร, 2549)

ตารางที่ 2.5 ข้อกำหนดยาสัตว์ในกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างที่ประกาศโดยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549

สินค้า	ยาสัตว์	ปริมาณสูงสุด (MRLs) (µg/ml)
เนื้อสัตว์สด แช่เย็น/แช่แข็ง	CTC, OTC, TC	0.2
กุ้งแช่เย็น/แช่แข็ง	OTC	0.2
เนื้อสัตว์ปีกสด แช่เย็น/แช่แข็ง	CTC, OTC, TC	0.2

ที่มา : สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหาร, 2549

2.1.8 **ปัญหาสารตกค้าง ในกลุ่มเตตราซัยคลินในประเทศไทย**

ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งสินค้าออกไปจำหน่ายต่างประเทศเป็นจำนวนมากและสินค้าออกที่สำคัญ ซึ่งได้แก่ สินค้าด้านเกษตรกรรม ในแต่ละปีประเทศไทยส่งสินค้าออกประเภทอาหารไปจำหน่ายต่างประเทศมีมูลค่ากว่า 300,000 ล้านบาทหรือร้อยละ 10 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าทั้งหมดของประเทศ ในจำนวนนี้เป็นรายได้จากการส่งออกกุ้งประมาณ 97,000 ล้านบาทและไก่ประมาณ 38,000 ล้านบาท จึงทำให้อุตสาหกรรมกุ้งและไก่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สำหรับประเทศที่เป็นลูกค้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่นและกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป ประเทศไทยพบปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งที่ส่งออกไปขายในประเทศญี่ปุ่นและตรวจพบสารออกซีเตตราซัยคลิน ทำให้ต้องมีการทำลายสินค้าในปี พ.ศ. 2538 (อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ, 2545) และจากข้อมูลการตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างออกซีเตตราซัยคลินและออกโซลินิกแอซิดในผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง จากโรงงานผู้ผลิตอาหารทะเลส่งออกในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนบน ระหว่างเดือนมกราคม 2540 ถึงเดือนธันวาคม 2542 ผลการตรวจสอบพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 1,092 ตัวอย่าง มีออกซีเตตราซัยคลินตกค้าง จำนวน 173 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ

15.84 และออกโซลินิก แอซิดตกค้าง จำนวน 53 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 4.85 ซึ่งปริมาณออกซีเตตราซัยคลินตกค้างอยู่ในช่วง 0.001-0.74 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งเกินมาตรฐานที่ Codex กำหนด ส่วนออกโซลินิก แอซิด มีปริมาณตกค้างอยู่ในช่วง 0.001-0.04 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งอยู่ในมาตรฐานที่ Codex กำหนด (ประทุมวัลย์ สงคง, 2544)

สหภาพยุโรปตรวจพบสารตกค้าง เช่น คลอแรมเฟนนิคอล ในสินค้าน้ำผึ้งจากประเทศจีน ทำให้เราทราบว่ามีปัญหาสารตกค้างในน้ำผึ้ง แสดงว่าระบบการผลิตและจัดการความปลอดภัยของน้ำผึ้งตลอดวงจรยังไม่มีมาตรการที่ดีพอ จึงมีการกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารตกค้างที่พึงมีได้ในน้ำผึ้ง สำหรับประเทศออสเตรเลีย กำหนดให้พบสารออกซีเตตราซัยคลินตกค้างในน้ำผึ้งได้ 0.3 ppm สำหรับประเทศญี่ปุ่น กำหนดให้ตรวจพบสารในกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้าง เช่น ออกซีเตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน และ เตตราซัยคลิน ได้มากที่สุด 0.3 ppm เช่นเดียวกัน

สารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน นิยมนำไปใช้อย่างไม่ถูกต้องโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตโดยใช้ผสมในอาหารสัตว์ ได้แก่คลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลินทำให้สัตว์ได้รับสารนั้นในปริมาณน้อย เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้เกิดการดื้อยา รวมถึงการไม่มีระยะการหยุดใช้ยาตามที่กำหนดก่อนการจับ หรือ ส่งโรงฆ่าสัตว์ เป็นสาเหตุให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์ในระดับที่สูงกว่าค่า MRLs โดยการใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน ในแง่เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตได้ถูกห้ามในปี 2545 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2546)

การใช้ออกซีเตตราซัยคลินนิยมใช้ในรูป HCl salt และ Quaternary ammonium salt โดยนำมาผสมกับอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งหรือผลิตในรูปอาหารเม็ดที่ใช้เป็นยา (Medicated diet) ให้มีความเข้มข้นประมาณ 2-5 กรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร จากงานวิจัยพบว่า การใช้ออกซีเตตราซัยคลินเข้มข้น 5 กรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร ทำให้มียาตกค้างในกุ้ง 0.1-20 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัม ในช่วงระยะหยุดให้ยา 10 วัน ซึ่งการได้รับยาในระดับที่ต่ำกว่าระดับรักษาโรคนี้ทำให้แบคทีเรียในร่างกาย เกิดการดื้อยา (เจนนุช ว่องธวัชชัย, 2547)

กระทรวงสาธารณสุข ได้มีประกาศกระทรวง ฉบับที่ 231 พ.ศ. 2544 เรื่องอาหารที่มียาสัตว์ตกค้างและได้มีการทบทวนในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 ปีพ.ศ. 2550 เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดพิษสะสมจากการบริโภคอาหารซึ่งมีการตกค้างจากยาสัตว์โดยกำหนด MRLs ซึ่งไม่ ให้เกินปริมาณที่กำหนดไว้ (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.9 วิธีการตรวจติดตามสารตกค้างในกลุ่มเตตราซัยคลิน

2.1.9.1 วิธีทางเคมี

2.1.9.1.1 High Performance Liquid chromatography (HPLC)

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์นิยมใช้วิธีทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งเป็น โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีความสามารถสูง ซึ่งสามารถแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว โดยเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มาก

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีด ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ในปี 2003 Cherlet และ คณะ ได้พัฒนาเทคนิค HPLC positive electrospray ionization mass spectrometry ในการตรวจ OTC และ 4-epiOTC ในเนื้อลูกวัว โดยพบว่าให้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ของ OTC และ 4-epiOTC เท่ากับ 0.8-48.2 ppb ต่อมาในปี 2008 Maia และ Rath ได้พัฒนาการใช้ HPLC โดยใช้ fluorescence detector ในการตรวจหาปริมาณ OTC ตกค้างในมะเขือเทศ พบว่าให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบเชิงปริมาณ (LOQ) ที่ระดับต่ำกว่า 250 ppb

2.1.9.1.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

การใช้เทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ผสมระหว่างการแยกสาร ซึ่งอาศัยหลักการของโครมาโทกราฟีและการตรวจวัดโดย mass spectrometer การผสมของเทคนิคทั้ง 2 นี้ช่วยเพิ่มความสามารถในการวิเคราะห์ และความไวของการวิเคราะห์ซึ่งสามารถเลือกใช้ชนิดของ mass spectrometer ให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่างได้ LC-MS ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในงานวิจัยด้านการตรวจหาสารพิษ หรือยาที่ตกค้างในอาหาร LC-MS คือเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลักการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน (ionization) ซึ่งเหมาะ

สำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถตรวจสอบยืนยันระบุชื่อสารในระดับที่ต่ำมาก ได้อย่างแม่นยำ และใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย

ในปี 2005 Anderson และคณะ ได้ใช้เทคนิค LC-MS-MS ในการตรวจหาสารในกลุ่มเตตราซัยคลินตกค้างในกุ้งและน้ำนมซึ่งสามารถตรวจวัดสารในกลุ่มเตตราซัยคลินในเชิงปริมาณในกุ้งและน้ำนม ได้ในระดับ 25-400 และ 50-300 ppb ตามลำดับ

2.1.9.1.3 ชุดตรวจสอบทางเคมี

ใช้หลักการของ colorimetric method โดยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างน้ำยาทดสอบกับยาแต่ละชนิดเกิดสีที่แตกต่างกัน มีวิธีการง่าย รวดเร็วใช้สะดวก รู้ผลทันทีราคาถูก ค่าใช้จ่ายน้อยไม่ต้องใช้ผู้มีความเชี่ยวชาญในการทดสอบ นำไปตรวจในพื้นที่ได้ทราบผลชนิดยาหลายชนิดพร้อมกันต่อการตรวจ 1 ครั้ง บอกได้ถึงชนิดยาแต่ละชนิด ใช้ได้ทั้งการตรวจเพื่อการพิสูจน์ชนิดยาและระดับของการปนเปื้อน ใช้ตรวจ ได้ 30- 60 ซ้ำต่อชุด มีอายุการเก็บรักษาได้มากกว่า 12 เดือน แต่มีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจสอบปริมาณคลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลินได้ค่อนข้างสูง คือ 6 และ 5.36 ppm ตามลำดับ ซึ่งผลิตโดยกรมปศุสัตว์ใช้ชื่อว่า Tetra Test Kit ซึ่งสามารถตรวจสอบคลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลิน (แพรวพรรณ ห้องทองแดง และคณะ, 2548) รวมถึงชุดทดสอบสารปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และนมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งใช้หลักการของ colorimetric เช่นเดียวกันโดยสามารถตรวจสอบสารตกค้างในกลุ่มของ Tetracycline Penicillin Macrolide Aminoglycoside และ Sulfonamide โดยใช้น้ำยาขึ้นอยู่กับกลุ่มยาที่ต้องการตรวจหา ชุดทดสอบนี้มีความถูกต้อง 95.9% ความไว 92.6% ความ จำเพาะ 96.9% (สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารด้านอาหาร กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์, 2551)

2.1.9.3 วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological method)

เป็นเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Radioimmunoassay (RIA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่พบปัญหาในการเก็บสารกัมมันตภาพรังสีที่ใช้ในการตรวจสอบ และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้างในสัตว์เลี้ยงและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัด มีความรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง ในงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2007) ใช้เทคนิค Competitive ELISA ในการตรวจวัดเตราซัยคลินในน้ำนม ซึ่ง

สามารถให้ค่า Inhibition concentration (IC_{50}) ที่ 3.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Joen และคณะ (2008) ได้นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ที่ได้จากแกะ มาพัฒนาเทคนิค Biotin-avidin competitive ELISA โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัดเตตราซัยคลินในน้ำนมได้ในระดับ 0.048 ไมโครกรัมต่อลิตร

2.1.10.ทฤษฎีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

2.1.10.1. แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน คือ สารซึ่งสามารถชักนำให้ร่างกายมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหรือสร้างแอนติบอดี ชนิดจำเพาะ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีนั้น ๆ

ซึ่งแอนติเจนจะต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการคือ

1. Immunogenicity คือ ความสามารถที่จะชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ
2. Specific reactivity คือ ความสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี ที่ทำให้เกิดขึ้นได้

อีพิโทป (Epitope) หรือ antigenic determinant คือตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยแอนติเจน 1 โมเลกุลจะมีอีพิโทปจำนวนมากและมีจำนวนไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนนั้นๆ สารที่มีความเป็นอิมมูโนเจนจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีความเป็นสิ่งแปลกปลอม (foreignness)

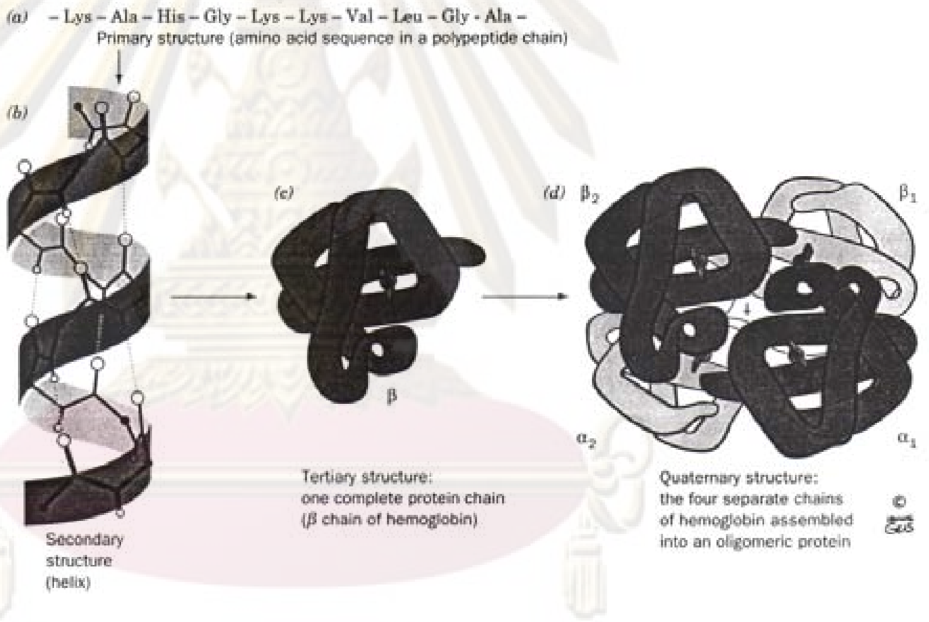
   โมเลกุลที่จะชักนำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ จะต้องเป็นสิ่งแปลกปลอมที่โดยปกติจะไม่พบอยู่ในร่างกาย หรือ อาจเป็นสิ่งที่อยู่ในร่างกายแต่ไม่เคยได้สัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปสารจากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างกันมากมักจะมีโครงสร้างแตกต่างกันมาก
2. คุณสมบัติทางฟิสิกส์

   2.1 ขนาดโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาด 5,000-10,000 ดาลตัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับต่ำ ๆ ได้ ส่วนอิมมูโนเจนที่กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีขนาด 100,000 ดาลตัน เนื่องจากการที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นจะมีอิพิโทปมากขึ้น และ มาโครฟาจจะสามารถจับกินได้ดีมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 โครงสร้างโมเลกุล แอนติเจนที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีที่ซับซ้อน (complex) จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี โปรตีนบางชนิดเป็นโมเลกุลเดี่ยว จะไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่โปรตีนนั้นประกอบด้วยหลายโมเลกุล หรือ มีการเกาะกลุ่ม จะสามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ รวมถึงความซับซ้อนของลักษณะโมเลกุลด้านอื่น ๆ เช่น โฮโมโพลิเมอร์ (Homopolymer) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนหรือน้ำตาลเพียงชนิดเดียวจะขาดความเป็นอิมมูโนเจน แม้ว่าจะมีขนาดใหญ่ก็ตามแต่ถ้านำโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ หรือเพิ่มความซับซ้อนทางเคมีเป็นโคพอลิเมอร์ (co-polymer) ก็จะทำให้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

ลักษณะการจัดเรียงตัวของโปรตีนทั้ง 4 ระดับ มีส่วนเกี่ยวข้องกับความซับซ้อนด้านโครงสร้างซึ่งมีผลต่อการเป็นอิมมูโนเจนของสาร ดังภาพ 2.3



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของโปรตีน โครงสร้างปฐมภูมิ(Primary structure), โครงสร้างทุติภูมิ (Secondary structure), โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) (Keith, W. 2005)

2.3 ประจุ (charge) ความเป็นอิมมูโนเจนไม่ขึ้นกับประจุของแอนติเจน แต่จะมีผลต่อประจุของแอนติบอดีที่เกิดขึ้น

2.4 ทางที่สามารถเข้าถึง (accessibility) การเรียงตัวของอิพิโทปที่หนาแน่นเกินไปอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถรับรู้ได้ ดังนั้นจะต้องมีการเรียงตัวที่เหมาะสม จึงจะทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้

3. คุณสมบัติทางเคมี

สารอินทรีย์ทั้งหลาย รวมทั้งจุลชีพและผลผลิตของจุลชีพ เช่น พิษ หรือ แม้สารสังเคราะห์บางชนิด ก็สามารถเป็นแอนติเจนได้ โดยสารประเภทโปรตีนเป็นแอนติเจนที่ดีที่สุด คาร์โบไฮเดรตบางชนิดก็สามารถเป็นแอนติเจนที่ดีได้ กรดนิวคลีอิกไม่ใช่แอนติเจนที่ดีและไขมันไม่เป็นแอนติเจน นอกจากนี้สารที่จะเป็นแอนติเจนที่ดีได้จะต้องถูกฟาโกซัยท์จับกินและถูกย่อยในฟาโกซัยท์ แล้วได้โครงสร้างที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นแอนติเจนไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้

4. ความสามารถในการถูกแปรรูปและนำเสนอ

พัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดีและภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต้องการการเกิดปฏิกิริยาระหว่างที-เซลล์ กับ แอนติเจนที่ถูกแปรรูปและนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC โดยแอนติเจนจะถูกนำเสนอร่วมกับ class II MHC บนผิวของเซลล์นำเสนอต่อ T_H หรือแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปถูกนำเสนอร่วมกับ class I MHC นำเสนอต่อ T_C กรณีของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้เมื่อถูกนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC จะมีการเป็นอิมมูโนเจนต่ำ

5. คุณสมบัติที่เกี่ยวกับ host

ความเป็นอิมมูโนเจน จะต้องเกี่ยวข้องกับ host ซึ่งแตกต่างกันเมื่อต่างชนิดกัน หรือ ต่างบุคคล ขึ้นกับพันธุกรรม อายุ และอาหาร ทั้งนี้ขึ้นกับยีนที่ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์นั้น

6. ปริมาณและเส้นทางการให้แอนติเจน

การให้แอนติเจนปริมาณต่ำเกินหรือสูงเกินไปจะไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากมีปริมาณแอนติเจนน้อยเกินไปที่จะกระตุ้นลิมโฟซัยท์หรืออาจเป็นเพราะก่อให้เกิดการชักนำให้เกิดสภาวะไม่ตอบสนองขึ้น (tolerance) การให้แอนติเจนเพียงครั้งเดียวโดยทั่วไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นรุนแรง จึงต้องให้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซ้ำ กัน หลาย ๆ ครั้ง เป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่รุนแรงได้

เส้นทางการให้แอนติเจนทั่ว ๆ ไป ได้แก่

- การฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (Intravenous injection)
- การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (Intradermal injection)
- การฉีดเข้าชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (Subcutaneous injection)
- การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection)
- การฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection)

เส้นทางการให้แอนติเจนเกี่ยวข้องกับอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีเซลล์ต่าง ๆ สะสมอยู่ จะมีผลต่อการตอบสนองของแอนติเจน การให้เข้าสู่หลอดเลือดดำ แอนติเจนจะถูกนำเข้าสู่ม้ามก่อน ในขณะที่ฉีดเข้าสู่ร่างกายบริเวณต่างๆ แอนติเจนจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในอวัยวะต่อมน้ำเหลืองจะเป็นตัวบอกถึงสภาวะการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541 และ ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.1.10.2. **แอนติบอดี** (Antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนทำหน้าที่จับกับแอนติเจนถูกสร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิด บี-ลิมโฟไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ (plasma cell) แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity) โดยจะทำหน้าที่ในการตรวจจับการสลายพิษ (neutralization) และการกำจัดแอนติเจนออกจากร่างกาย

โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบุลิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วย สายโพลีเพปไทด์ 4 สาย คือ โปรตีนสายยาว (heavy chain, H) 2 สายที่เหมือนกัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 450-550 ตัว และ โปรตีนสายสั้น (light chain, L) 2 สายที่เหมือนกัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 211-217 ตัว เชื่อมต่อกันด้วยไดซัลไฟด์บอนด์ ปลายข้างหนึ่งของสายโพลีเพปไทด์ จะเป็นกรดอะมิโนเรียกปลายข้างนี้ว่า N หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเป็นคาร์บอกซิลิก เรียกปลายข้างนี้ว่า C หรือ carboxy terminal แต่ละสายของ light chain และ heavy chain จะประกอบด้วยส่วนที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนไม่คงที่ เรียกว่า V (Variable region) และส่วนที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคงที่เรียกว่า C (Constant region) ดังภาพที่ 2.4 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง light chain ได้เป็น ชนิด κ และ γ และแบ่ง heavy chain ได้เป็น 5 ชนิด คือ γ μ α δ และ ε ใช้เป็นตัวกำหนดคลาส (class) ของแอนติบอดี ได้แก่ IgG IgM IgA IgD และ IgE ตามลำดับ แอนติบอดีแต่ละโมเลกุลประกอบด้วย H chain และ L chain ที่เหมือนกันอย่างละ 2 สาย

ความแตกต่างเล็กน้อยของลำดับกรดอะมิโนของ H chain ชนิด α และ γ ทำให้แยกออกเป็นกลุ่มย่อยได้ ในมนุษย์ α chain มี 2 กลุ่มย่อย (α_1 และ (α_2) และกรณีของ γ มี 4 กลุ่ม กลุ่ม γ_1 γ_2 γ_3 และ γ_4

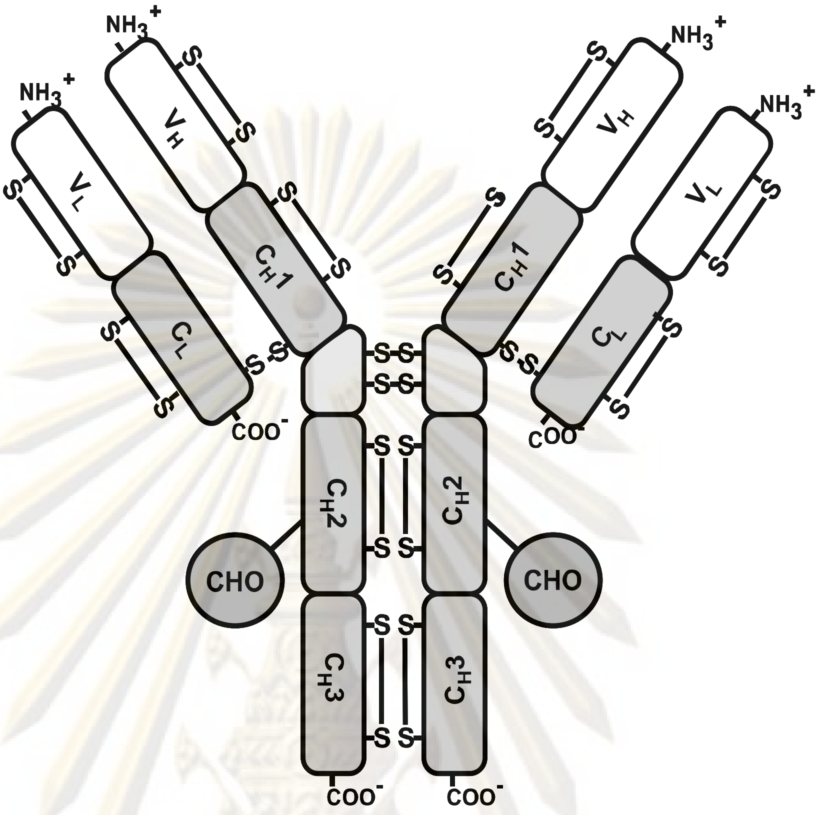
โครงสร้างของ Ig กำหนดโดยโครงสร้างปฐมภูมิ โครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิและโครงสร้างจตุรภูมิ โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนส่วน ของ V และ C ของ H chain และ L chain กรณีของโครงสร้างทุติยภูมิเกิดจากการพับทบกันไปมาของสายเพปไทด์ แบบ β-pleated sheet เสถียรภาพของโครงสร้างนี้เกิดจากพันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายที่เชื่อมระหว่างสายเพปไทป์ที่พับไปมา ซึ่งสายเพปไทป์ม้วนทับเป็นโครงสร้างตติยภูมิอัดแน่นเป็นก้อน (globular domain) และส่วนของโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนต่าง ๆ ของ H-chain และ L-chain รวมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ พบว่ามีในส่วน variable region ของทั้ง heavy chain และ light chain จะมี hypervariable segment สั้น ๆ อยู่ 3 ช่วง ซึ่งแต่ละช่วงประกอบด้วยกรดอะมิโน 3-11 ตัว ที่มีความเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของกรดอะมิโนบ่อยกว่าบริเวณอื่น ๆ เรียกส่วนนี้ว่า Complementarity Determining Region (CDR) ซึ่งเป็นส่วนที่มีหน้าที่สำคัญในการจับกับแอนติเจน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของกรดอะมิโนในบริเวณนี้จะทำให้เกิดความจำเพาะต่อแอนติเจนต่าง ๆ ได้มากมาย

คุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลิน มีการทำหน้าที่ 2 แบบ คือ จับกับแอนติเจนโดยใช้ส่วนของ V region ของ H และ L chain และการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับส่วน C region ของ H และ L chain ไอโซไทป์ต่าง ๆ ของแอนติบอดีเกิดจากตำแหน่งของแอนติเจนในบริเวณคงที่ ที่ซึ่งใช้จำแนกคลาส (class) และสับคลาส (subclass) ของ H chain และ L chain ซึ่งแต่ละ ไอโซไทป์ ถูกถอดรหัสจากยีนต่าง ๆ แยกกัน สัตว์ชนิดเดียวกันจะพบส่วนของบริเวณคงที่เหมือนกันซึ่งจะมีการแสดงออกทุก ๆ ไอโซไทป์ สัตว์ต่างชนิดมีส่วนของบริเวณคงที่ต่างออกไป

คลาส หรือ ไอโซไทป์ (Isotype) ของ Ig ชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาวในบริเวณคงที่ ทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้างและบทบาทการทำงานแตกต่างกันไป ดังนั้นอิมมูโนโกลบูลินทั้ง 5 class คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE จึงมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2.7 และลักษณะของ Ig ชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ดังภาพที่ 2.5

นอกจากนั้น IgG ยังสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (subclass) บนบริเวณคงที่ของโปรตีนสายยาวชนิด γ ได้แก่ γ1 γ2 γ3 และ γ4 ทำให้เป็น subclass IgG_1 IgG_{2a} IgG_{2b} และ IgG_3 ตามลำดับ ทั้ง 4 ซับคลาสนี้ถอดรหัสจากยีนต่างกันจึงมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันประมาณ 90-95% โครงสร้างลักษณะที่แตกต่างกันของแต่ละสับคลาส ได้แก่ ขนาดของข้อพับ จำนวนและ

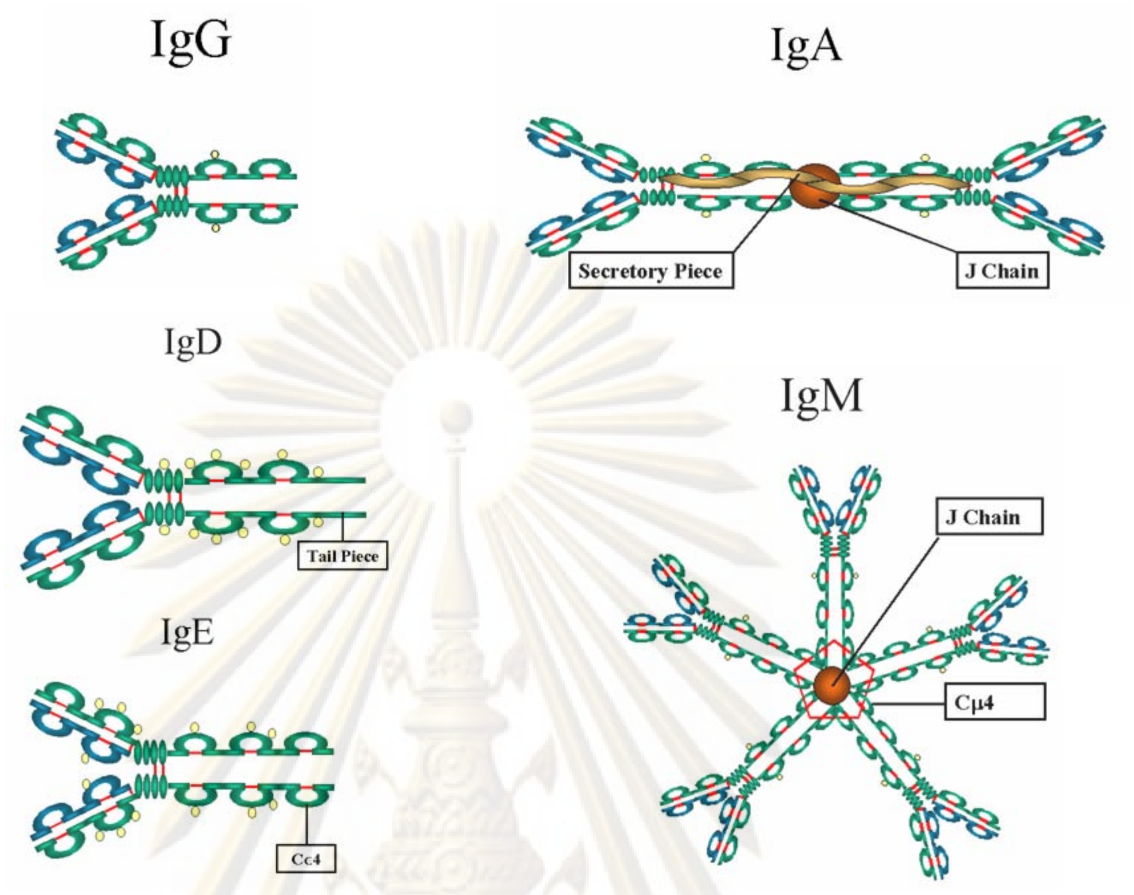
ตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ ภายในสายระหว่าง H chain (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541 และ ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี

ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์

ที่มา : Mayer, G. 2009

2.1.10.3. **การกระตุ้นบี-ลิมโฟไซต์ ให้สร้างภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี**

เซลล์ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) หรือ บีเซลล์ (B-cell) จะถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (specific antibody) ซึ่งแอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลชนิดต่างๆ ได้ โดยโมเลกุลของแอนติบอดีจะมีบริเวณจำเพาะที่จะจับกับแอนติเจน ความจำเพาะของบี- เซลล์ เกิดจากการแสดงออกของตัวรับบนผิวเซลล์ เมื่อบี-เซลล์มีการจับกับแอนติเจนที่เหมาะสมตรงบริเวณที่จับ (binding site) ของแอนติบอดีบนผิวเซลล์ บี-เซลล์จะถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและพัฒนาเป็นเซลล์ความจำ (Memory B-cell) และ บางส่วนพัฒนาเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) ทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเหมือนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541)

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอิมมูโนโกลบูลิน คลาสและสับคลาสต่างๆ

สมบัติ/ ปฏิกิริยา	IgG_1	IgG_2	IgG_3	IgG_4	IgA	IgM	IgE	IgD
น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	150	150	150	150	150 - 600	150 - 600	190	150
ชนิดโปรตีนสายยาว	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	α	μ	ε	δ
ระดับในซีรัม (mg/ml)	9	3	1	0.5	3.0	1.5	0.0003	0.03
ครึ่งชีวิตในร่างกาย (วัน)	23	23	8	23	6	5	2.5	3
กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์	+	+/-	++	-	-	+++	-	-
ผ่านรก	+	+/-	++	-	-	-	-	-
พบบนผิว บี-เซลล์	-	-	-	-	-	+	-	+
จับกับตัวรับ Fc ของแมคโครฟาจ	++	+/-	++	+	-	+	-	-
พบในสารคัดหลั่ง	-	-	-	-	++	+	-	-
ชักนำการปล่อยสารในมาสต์เซลล์	-	-	-	-	-	-	+	-

ระดับการทำงานแสดงโดยเครื่องหมาย ++ สูง, + ปานกลาง, +/- เล็กน้อย และ - ไม่มี
ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548

2.1.10.4.ความแตกต่างระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองในระดับโมเลกุลแล้ว โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) หลาย ๆ ชนิดรวมกัน เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำการกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบีเซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีที่จำเพาะกับแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ในซีรัม เรียกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมบางครั้งอาจลดประสิทธิภาพ หรือ ก่อให้เกิดปัญหาในการใช้นอกร่างกาย เช่น ในการวินิจฉัย การรักษา รวมถึงในงานวิจัยต่าง ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี กับแอนติเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในซีรัมมีอยู่หลายชนิด การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่

สร้างจากโคลนต้นกำเนิดเพียงโคลนเดียวของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนแอนติเจน จะสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดจะแสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

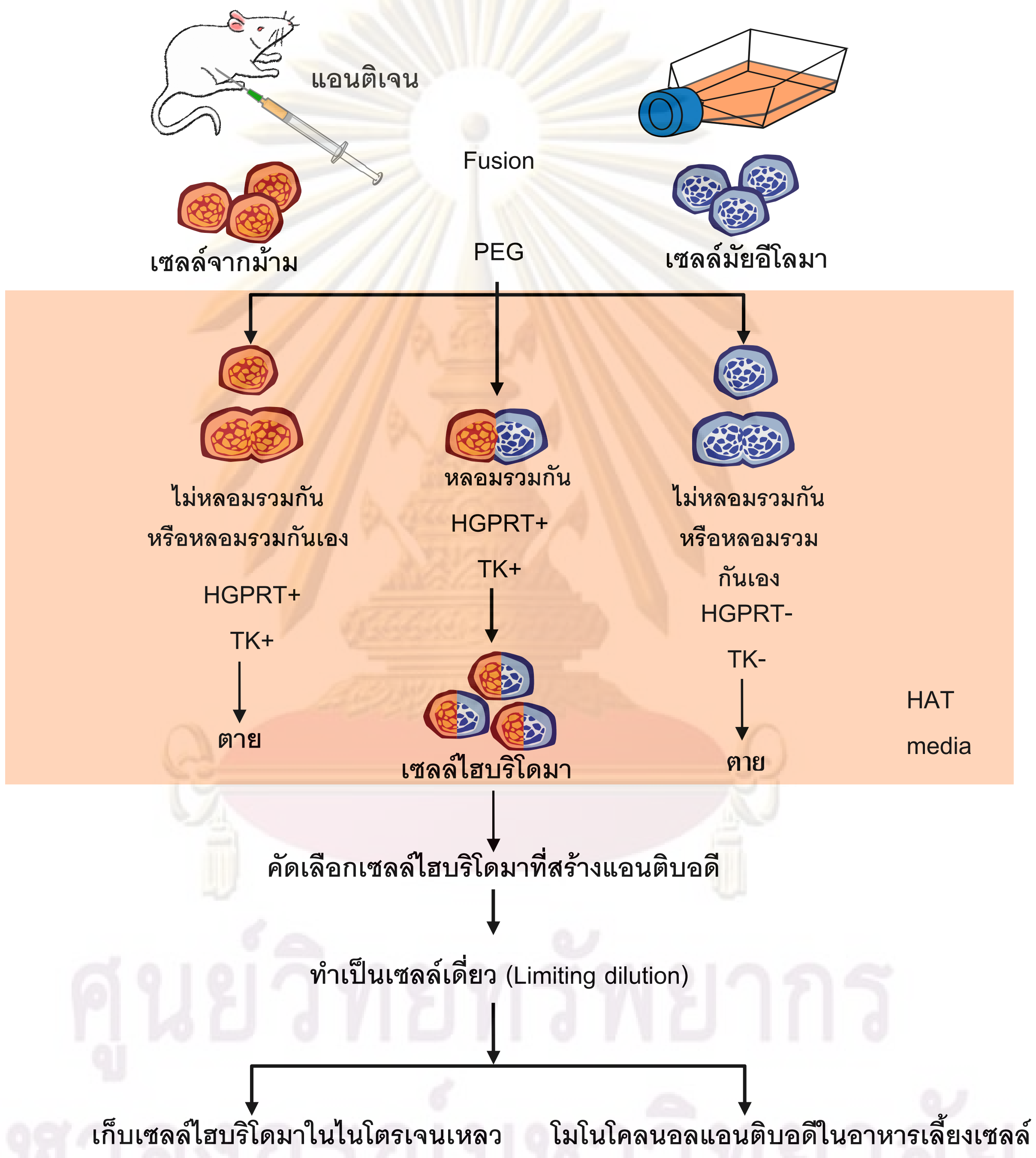
2.1.10.5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้หลักการของ somatic hybridization

การใช้กระบวนการทางเคมีเพื่อแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีทำได้ยากมาก ในปี ค.ศ. 1975 Kohler, G.และ Milstein, C. ได้มีแนวทางในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ ซึ่งได้กลายเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญทางภูมิคุ้มกัน จากการนำบี-เซลล์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมารวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาหรือเซลล์มัยอีโลมา (myeloma cell) ได้เป็นเซลล์ลูกผสม หรือ เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีของทั้งเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 คือ สามารถสร้างแอนติบอดีได้และสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัด ทำให้สามารถผลิตโคลนของไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้จำนวนมากและไม่จำกัดปริมาณ เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและสามารถใช้ในงานต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง

2.1.10.6. การสร้างและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

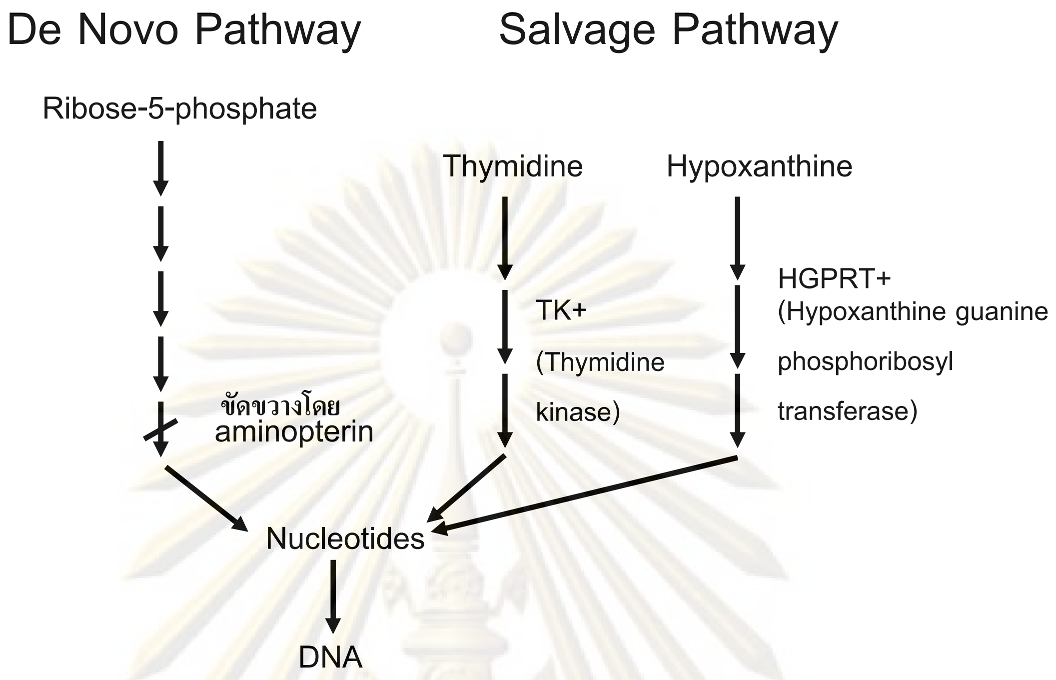
นำบี-เซลล์จากสัตว์ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา โดยใช้วิธีการหลอมรวมเซลล์ทางเคมี ซึ่งใช้โพลีเอทีลินไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ดังภาพที่ 2.6 โดยในทางปฏิบัติไม่สามารถที่จะหลอมรวมเซลล์ทุกเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมา จึงมีเซลล์ที่หลอมรวมกันเอง ไม่หลอมรวม และเซลล์ไฮบริโดมาปะปนกันอยู่จำนวนมาก จึงต้องทำการคัดเลือกให้มีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้น ที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังนั้นจึงจะใช้เซลล์มัยอีโลมาที่ถูกทำให้มีความบกพร่องของเอนไซม์ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) ที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน Salvage pathway ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการหลอมรวมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งมี hypoxanthine aminopterin และ thymidine เป็นส่วนประกอบ aminopterin จะไปขัดขวาง de novo pathway ซึ่งเป็นอีกกระบวนการพื้นฐานในการสร้างนิวคลีโอไทด์ส่วนเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่ถูกหลอมรวม หรือหลอมรวมกันเองจะขาดเอนไซม์ HGPRT และ TK ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ผ่านทาง Salvage pathway ได้ ส่วนบี-เซลล์ที่หลอมรวมกันเอง หรือ ไม่หลอมรวม ก็จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ได้ระยะเวลาหนึ่งและจะตายไป ดังนั้นจึงมีเพียงเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาแล้ว จึงมีการคัดเลือกเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ วิธีที่ใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีได้ใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ วิธี ELISA และ Immunoassay ต่าง ๆ หลังจากพิสูจน์ได้ว่าไฮบริโดมาสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการแล้วจำเป็นต้องทำการโคลนซ้ำ(reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้น ๆ

มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวกัน และ ขยายโคลนเพื่อเพิ่มการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการในปริมาณมากขึ้นต่อไป (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, 2541)



ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง

ที่มา Keith, W. 2005



ภาพที่ 2.7 แนวทางการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยใช้ de novo pathway และ salvage pathway
ที่มา : ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548

2.1.10.7. หลักการ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

หลักการของ ELISA หรือ enzyme immunoassay (ELA) เป็นการพัฒนาต่อมาจาก การทดสอบด้วยวิธี Radio immunoassay (RIA) เพียงแต่ใช้เอนไซม์แทนการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เชื่อมต่อกับแอนติบอดี เอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสับเสรตที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromogenic subatrate) เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย วิธี ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, β-galactosidase เป็นต้น ซึ่งความไวของ EIA มีความใกล้เคียงกับ RIA และมีข้อได้เปรียบที่ความปลอดภัย ความประหยัด รวมถึงความสามารถของเอนไซม์ที่สามารถที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้หลายโมเลกุล การเปลี่ยนจากสารกัมมันตภาพรังสีมาเป็นเอนไซม์ทำให้การตรวจมีความสะดวกมากขึ้น ไม่ต้องใช้สารกัมมันต-ภาพรังสีที่มีอันตราย ทิ้งของเสียได้ง่าย และ ชุดตรวจสอบมีอายุการเก็บที่มากขึ้น เนื่องจากไม่ต้องคำนึงถึงการหมดอายุของสารกัมมันตภาพรังสี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การพัฒนา ELISA รูปแบบต่าง ๆ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่าง (ธาราวัชต์ ธารากุล, 2545)

เทคนิค ELISA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแบ่งตามลักษณะได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. Indirect ELISA

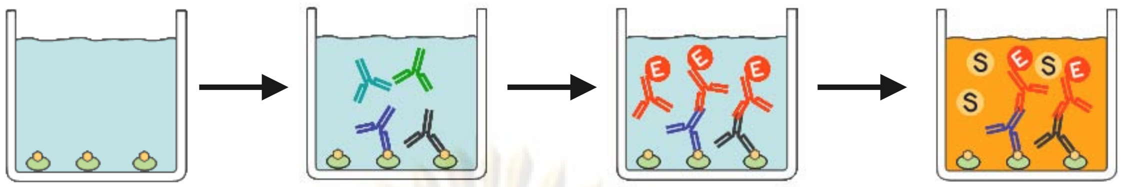
วิธี Indirect ELISA ใช้ในการหาระดับของแอนติบอดีหลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนและใช้ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ภายหลังจากการหลอมรวมเซลล์ ทำได้โดยเติมซีรัมหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ก้นหลุมแล้วล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนที่ก้นหลุมออก หลังจากนั้นตรวจสอบแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สอง ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยแอนติบอดีตัวที่สองจะมีความจำเพาะกับส่วน Fc ของแอนติบอดีตัวแรก หลังจากล้างแอนติบอดีอิสระออก เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ ปริมาณสีที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถวัดได้โดย microplate reader ที่สามารถอ่านหลุมทดสอบในจาก 96 หลุม ได้ทั้งหมดในเวลาเดียวกัน และทราบผลค่าการดูดกลืนแสงจากทั้ง 96 ได้ภายในเวลาไม่ถึงนาที ดังภาพที่ 2.8

2. Competitive ELISA

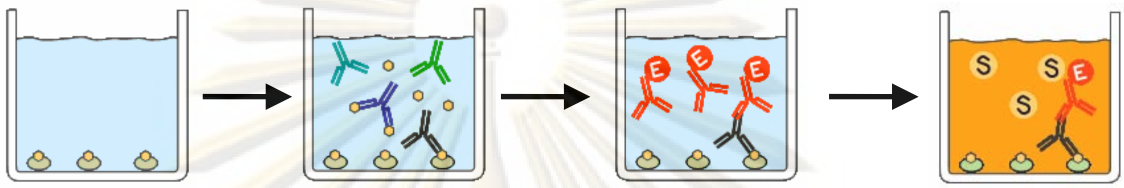
วิธี Competitive ใช้ในกรณีทดสอบซีรัมที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนว่ามีแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนในรูปอิสระหรือไม่ และใช้ในการคัดเลือกโคลนที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนในรูปอิสระได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่วัดปริมาณแอนติเจนคล้ายกับ RIA โดยวิธีนี้แอนติบอดีผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐาน หรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมลงในถาดหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจน (เหมือนกับกรณีของ Indirect ELISA) ซึ่งถ้าเติมตัวอย่างมากแอนติบอดีที่จะจับกับแอนติเจนก้นหลุมจะมีน้อยลง ดังนั้นหลังจากเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่เชื่อมด้วยเอนไซม์ตัวที่สอง และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับก้นหลุมคล้ายกับ Indirect ELISA แต่ในกรณีนี้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอนติเจนสูงจะให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ต่ำกว่าหลุมที่ไม่มีแอนติเจน ดังภาพที่ 2.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Indirect ELISA



2. Indirect Competitive ELISA



ภาพที่ 2.8 Indirect ELISA และ Indirect Competitive ELISA

: แอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ

: แอนติเจนในรูปอิสระ

: แอนติบอดี

: แอนติบอดีทุตยภูมิ ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP

: สารตั้งต้นของเอนไซม์

2.2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลิน ตกค้างโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาได้เริ่มมีการตรวจวิเคราะห์ในปี 1980 โดย Faraj และคณะ ซึ่งได้มีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC เพื่อใช้ในการตรวจหา TC โดยใช้เทคนิค Radioimmuno assay (RIA) ซึ่งได้เชื่อม TC-HCl กับ โปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich แล้วฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย หลังจากที่ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีแล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับเตตราซัยคลินโดยใช้ [^{3}H]TC เป็นตัวแข่งขัน พบว่าวิธี RIA สามารถให้ค่า LOD และให้ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้การยับยั้งลดลง 50% (inhibition concentration; IC_{50}) ที่ 1 และ 7 นาโนกรัมตามลำดับ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารภายในกลุ่ม เช่นคลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลินที่ 39 และ 10 % ตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจสอบเตตราซัยคลินในพลาสมาและปัสสาวะของสุนัข พบว่าให้ % recovery ในช่วง 90-95%

หลังจากนั้นในปี 2007 Navarro และ คณะ ได้ตรวจหาสารตกค้างในกลุ่ม TC ในน้ำผึ้ง โดยพัฒนาการสังเคราะห์ hapten และความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ สำหรับใช้ในเทคนิค immunoassay การผลิต hapten มีพื้นฐานมาจากการสร้าง อนุพันธ์ของ carboxamino และ diazo โดยที่โครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม TCs และส่วนแขนของสารยังคงอยู่ เพื่อทำให้มีหมู่ทำปฏิกิริยาเหมาะสมต่อการเชื่อมกับโปรตีนพาหะ โดยปฏิกิริยา mannich หลังจากฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะถูกนำมาทดสอบกับ TC และปรับปรุงปัจจัยที่ใช้ในเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (PBS-T 10 mmol/L, pH 7.5, 0.01% Tween 20 และเวลาในการทำปฏิกิริยา 45 นาที) ซึ่งตรวจพบสารได้ต่ำที่สุด 0.4 ppb และมีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ RTC OTC และ CTC 91, 30 และ 14% ตามลำดับ ให้ค่า %

recovery ในช่วง 79-108% ในปีเดียวกัน Zhang และ คณะ ได้พัฒนาวิธีตรวจหา TC ในน้ำนม โดยได้ทำการผลิต polyclonal antibody โดยใช้อิมมูโนเจน 3 ชนิดซึ่งมีวิธีการเชื่อมกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน มาฉีดกระตุ้นในกระต่าย หลังจากที่ได้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมา ได้ทำการทดสอบความสามารถทำปฏิกิริยากับ TC โดยใช้วิธี homologous ELISA และ heterologous ELISA ซึ่งพบว่าการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี heterologous ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า ซึ่งสามารถให้ค่า IC_{50} ที่ 3.92 ppb ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่ม เช่น CTC และ OTC ที่ 112 และ <2 % ตามลำดับ และให้ค่า % recovery ในช่วง 74-116 % โดยมีค่า intra และ inter coefficient < 14.5 และ < 25.0 ตามลำดับ

นอกจากนั้น Jeon และ Kim (2007) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ TC เพื่อตรวจหาสารตกค้าง TC ในน้ำนมด้วยเทคนิค biotin-avidin mediated competitive ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ TC ที่ได้จากแกะเป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ใช้ anti-sheep IgG ที่ได้จากกระต่ายเป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ และใช้ horseradish peroxidase-conjugated avidin เป็นตัวตรวจวัดพบว่าให้ค่า LOD และ LOQ ที่ระดับ 0.048 และ 0.48 ppb ตามลำดับ โดยไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs อย่างมีนัยสำคัญ (CTC 13.7% และ OTC 10.0% ตามลำดับ) และมี % recovery ที่ 90%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) อายุ 8 สัปดาห์	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์ มัยอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1(NSI)	ATCC: TIB 18

3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen, Germany
เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง	Metter Toledo, USA
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Nunc, Denmark
จานเลี้ยงเซลล์	Spl, Korea
จานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม, 48 หลุม และ 24 หลุม	Costar, USA
ชุดอิเล็กโทรฟอเรซีส	Bio-rad, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตู้ดูดควัน	Theera Trading co., Thailand
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Electron Corporation, USA
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co., Ltd.,Thailand
ทิป	Axygen, USA
ปั๊มลม	Iwaki, Japan
ปิเปตแก้ว	HBG, Germany
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII Memmert, Japan
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

3.3 **สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย**

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate $(NH_4)_2S_20_8$; APS	Sigma-Aldrich, USA
3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Jackson Immuno research laboratories, USA
BCA™ protein assay kit	Pierce, USA
Beta mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	Fluka, China
Citric acid	Merck, Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Fluka, China
Doxycycline (DC)	Sigma-Aldrich, USA
1-ethyl-3-(3-diamethylaminoprophyl)carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Fetal calf serum (FCS)	Invitromax, USA
Formaldehyde	Sigma-Aldrich, USA
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma-Aldrich, USA
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma-Aldrich, USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	T.P.drug laboratories (1969) Co.,Ltd., Thailand
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
Isotyping kit	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	BDH, England

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)	Fluka, China
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, USA
O-Phenylenediamine (OPD)	Sigma-Aldrich, USA
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline hydrochloride (OTC)	Fluka, China
Penicillin G	Sigma-Aldrich, USA
Picrylsufonic acid (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; TNBS)	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol HYBRI-MAX® (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Pyruvic acid	Sigma-Aldrich, USA
Rolitetracycline (RTC)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Biochrom AG, Germany
Salbutamol	Sigma-Aldrich, USA
Skim milk	Anline, Thailand
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Merck, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck, Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	Pierce, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) Aminomethane (Trizma base)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Riedel-de Haën, UK

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

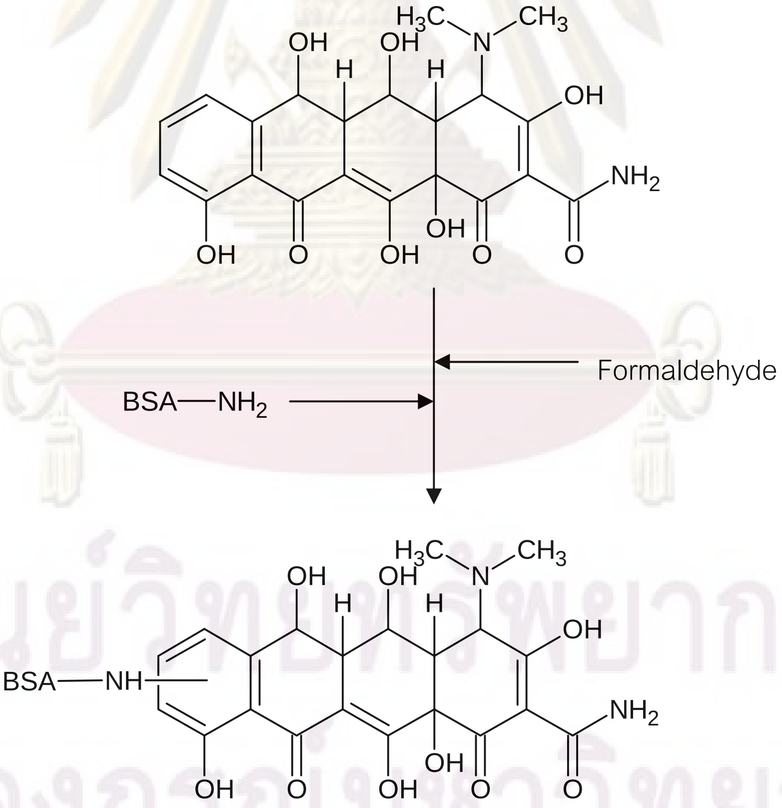
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

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

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

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



ภาพที่ 3.1 แสดงการเชื่อมติดของ OTC กับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich

ที่มา : Faraj และคณะ, 1980

3.4.1.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี bicinchoninic acid protein assay (BCA) โดยใช้ BCA^{TM} protein assay kit (บริษัท Pierce, USA) โดยทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเตรียมสารตัวอย่าง ด้วย PBS เพื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานของโปรตีน เตรียมสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยผสมสารละลาย A โซเดียมไฮดรอก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่มีโซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไบคาร์บอเนต กรดไบคาร์บอนิค และโซเดียมทาเทรตอยู่ และสารละลาย B คูปลิกซัลเฟต เข้มข้น 4% ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย A และ B ที่ผสมเข้ากันแล้ว หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 562 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำข้อมูลระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างมาสร้างกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณกลับไปเป็นปริมาณโปรตีน

3.4.1.3 การคำนวณอัตราส่วนโมเลกุลของ OTC ที่เชื่อมติดโดยวิธี MALDI-TOF-MS

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

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

3.4.2. การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วย OTC-BSA

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย OTC ที่เชื่อมติดกับ BSA โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ฉีดเข้าภายในช่องท้องหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ 100 ไมโครกรัมต่อตัว และฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยผสมกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) หลังการกระตุ้นครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน เก็บเลือดจากหางของหนูทดลอง เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้

สามารถจับกับ OTC ในรูปอิสระ ได้หรือไม่โดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ที่เตรียมได้จากวิธีเดียวกับการเตรียม OTC-BSA ในข้อ 3.4.1.1 แต่เปลี่ยนโปรตีนพาหะจาก BSA เป็น OVA มาเคลือบบนจานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA เลือกหนูทดลองที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงสุดและสามารถจับกับ OTC อิสระได้ไปทำการหลอมรวมเซลล์ ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 3-4 วัน ฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อตัว โดยไม่ผสม Freund's adjuvant

3.4.3. การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

3.4.3.1 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา

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

3.4.3.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

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

3.4.3.3 การหลอมรวมเซลล์ (Cell fusion)

นำเซลล์ของม้ามหนูจากข้อ 3.4.3.2 มารวมกับเซลล์มัยอีโลมาจากข้อ 3.4.3.1 ในอัตราส่วน 1:2 ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เขย่าเบา ๆ ให้เซลล์ไม่เกาะตัวเป็นก้อน หลังจากนั้น หยดโพลีเอทีลีนไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดาลตัน ความเข้มข้น 50% (v/v) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์บางลง จึงทำให้เกิดการหลอมรวมเซลล์ ลงไปพร้อมกับหมุนหลอด

ทดลองและเคาะเบาๆ โดยควบคุมการหยด PEG 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนตามัยซินความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นและลงเพื่อเจือจาง PEG หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก นำเซลล์ที่ได้เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปิเปตเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10-14 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเติบโตประมาณ 25% ของพื้นที่หลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมไปทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC หรือไม่โดยวิธี Indirect ELISA

3.4.3.4 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีต่อ OTC

3.4.3.4.1 การคัดเลือกเซลล์โดยวิธี Indirect ELISA

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

3.4.3.4.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ OTC ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยปิเปตสารละลาย OTC ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานหลุม ELISA ที่เคลือบด้วย OTC-OVA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมัน

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

3.4.3.5 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution

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

3.4.3.6 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว

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

3.4.3.7 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวมาแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันทีเมื่อน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในหลอดละลายหมดแล้ว ให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v)

3.4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

3.4.4.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

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

3.4.4.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งที่ 50% (50% of inhibition concentration; IC_{50}) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการเติมลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.001-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม Graph pad Prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่าล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD

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

3.4.4.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

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

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

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทรกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography column) โดยใช้โปรตีนจี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sapharose) 5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในเอทานอลเข้มข้น 20%(w/v) มาล้างเอทานอลออก แล้วเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเตรียมคอลัมน์โปรตีนจีให้เข้าสู่สภาวะสมดุลโดยปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์โปรตีนจี ปริมาตร 300-400 มิลลิลิตร ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับกับโปรตีนจีในคอลัมน์ออกด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนจี ด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Glycine-HCl) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในหลอดที่มี ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) pH 9.0 เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่าค่าความเป็นกรดเป็นเบสของสารละลายให้เป็นกลาง หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อนำมาวาดโครมาโตแกรม แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน เพื่อนำไป dialysis ใน PBS ที่มี 0.01% thymerosal เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน

3.4.5.2 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.5.2.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

ทดสอบความบริสุทธิ์ และมวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอเรซีสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยเตรียม 15% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.2 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมหน้ากลั่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หวีเพื่อเป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว 30 นาที

3.4.5.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายสีย้อมทีมี SDS, mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปิเปตในหลุมเจล

3.4.5.2.3 การทำอิเล็กโทรฟอเรซีส

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับเครื่องทำอิเล็กโตฟอเรซีส (electrophoresis chamber) ที่มี SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (running buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง นำสารละลายตัวอย่างมาปิเปตในหลุมเจลไม่เกินหลุมละ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของ marker ให้ปิเปตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue (staining solution) ข้ามคืนและล้างในสารละลายของเอทานอลและกรดอะซิติก (destaining solution) จนกว่าเจลจะใสและเห็นสีของแถบโปรตีนชัดเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

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

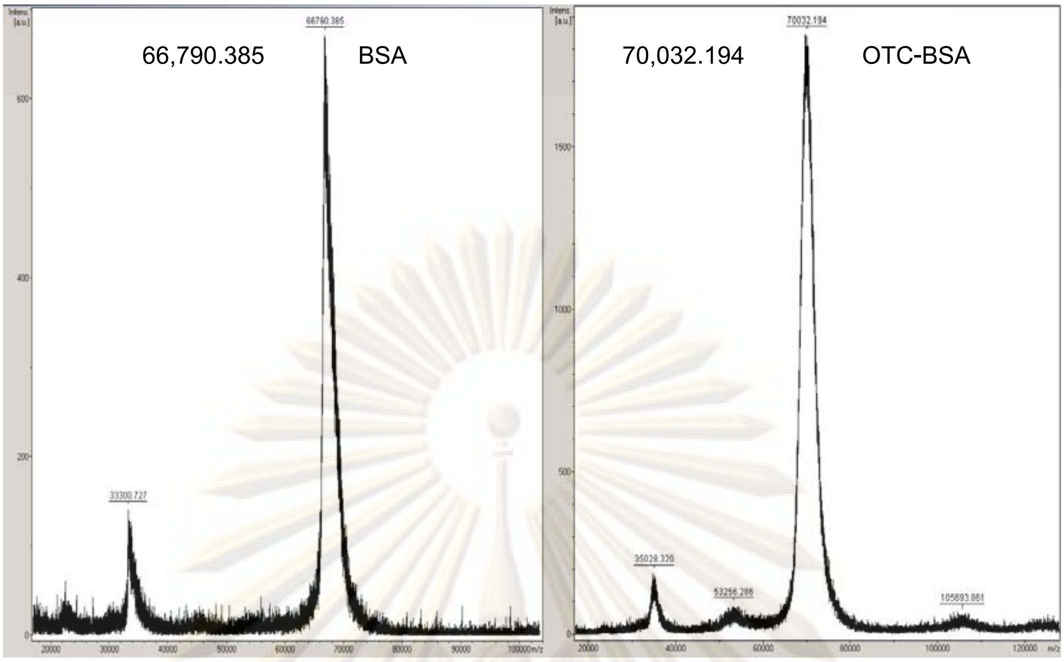
4.1.1 ผลการเตรียม OTC เชื่อมติดกับ BSA

จากการเตรียมแอนติเจนที่จะใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง โดยทำการเชื่อมต่อ OTC กับ โปรตีนพาหะ BSA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich ซึ่งจะมีการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้มีการควบแน่นระหว่างหมู่อะมิโนของ BSA กับวงฟีนอลของ OTC (Faraj และ คณะ, 1980)

นำ OTC-BSA วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำการเชื่อมติดที่ความเจือจางต่างๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร พบว่า OTC-BSA ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 3.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

4.2. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของหนูในการสร้างแอนติบอดีต่อ OTC

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

4.2.1 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้น

จากการหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA ได้ผลดังภาพที่ 4.2 โดยเลือกระดับแอนติบอดีที่ความเจือจาง ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 0.1 พบว่าหนูทั้ง 10 ตัว สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC-BSA ได้

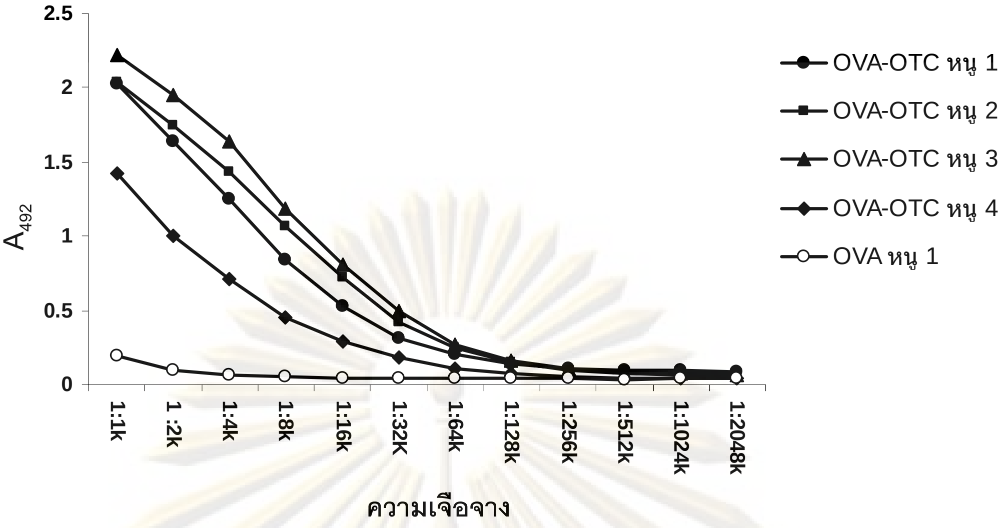
พบว่าหนูทั้ง 10 ตัวให้ระดับแอนติบอดีอยู่ในช่วง 1:16,000 – 1:128,000 โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีต่ำที่สุด คือ หนูตัวที่ 8 ให้ระดับแอนติบอดี 1:16,000 ส่วนหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด คือ หนูตัวที่ 3 และ 7 โดยให้ระดับแอนติบอดี 1:128,000 ดังตารางที่ 4.1

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

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

4.2.2 ความสามารถในการจับของแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

4.3. ผลการหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย OTC-BSA กับเซลล์มัยอีโลมา (NSI) จากหนูทั้งหมด 10 ตัว หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์เป็นระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับพบว่าเซลล์ไฮบริโดมา เริ่มมีการเจริญเติบโตภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT โดยจะเห็นเซลล์ขนาดเล็ก ลักษณะกลมใสเริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเป็นโคโลนีภายในหลุม หลังจากที่มีการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาเซลล์ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาเจริญขึ้น มาคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ โดยวิธี Indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 492 nm มากกว่าหรือเท่ากับ 0.7) มาทำการทดสอบต่อไปเพื่อดูว่าเซลล์ไฮบริโดมาสามารถผลิตแอนติบอดีที่ต่อ OTC ในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี Indirect competitive ELISA ให้ผลดังตารางที่ 4.3

ผลของการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 10 ครั้ง ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ OTC อิสระทั้งหมด 3 หลุม นำทั้ง 3 หลุมมาทำการแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution เพื่อยืนยันว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ มาจากเซลล์เริ่มต้นเพียงเซลล์เดียวและยังคงสร้าง

แอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ โดยตั้งชื่อโคลนที่ได้ คือ 2-4F, 7-3G และ 11-11A หลังจากนั้นเพิ่มจำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดใหญ่ แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอยู่ไว้เพื่อศึกษาลักษณสมบัติต่อไป

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

ตารางที่ 4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ของหนูทั้ง 10 ครั้ง ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ OTC-BSA

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4. ผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

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

4.4.2 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC ในรูปอิสระ

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

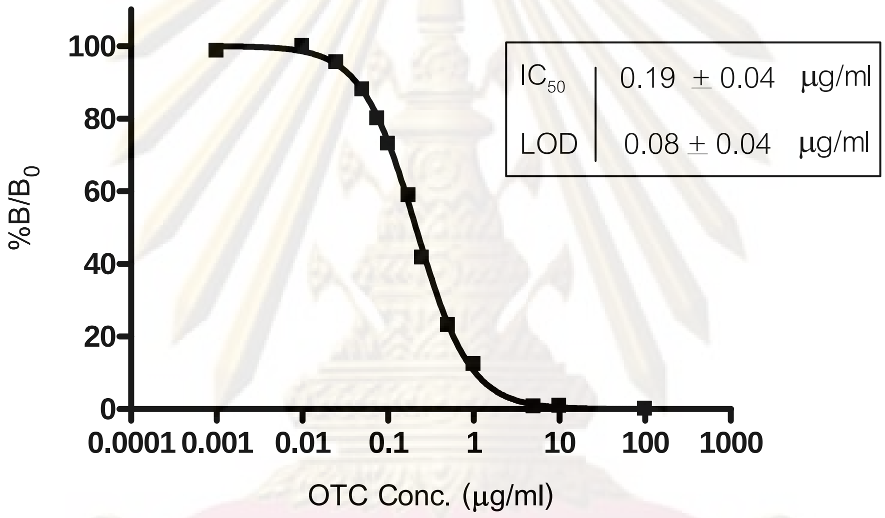
ทำการหาค่า IC_{50} และ LOD โดยใช้ความเจือจางที่เหมาะสมของแต่ละโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำมาคำนวณผลโดยใช้โปรแกรม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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

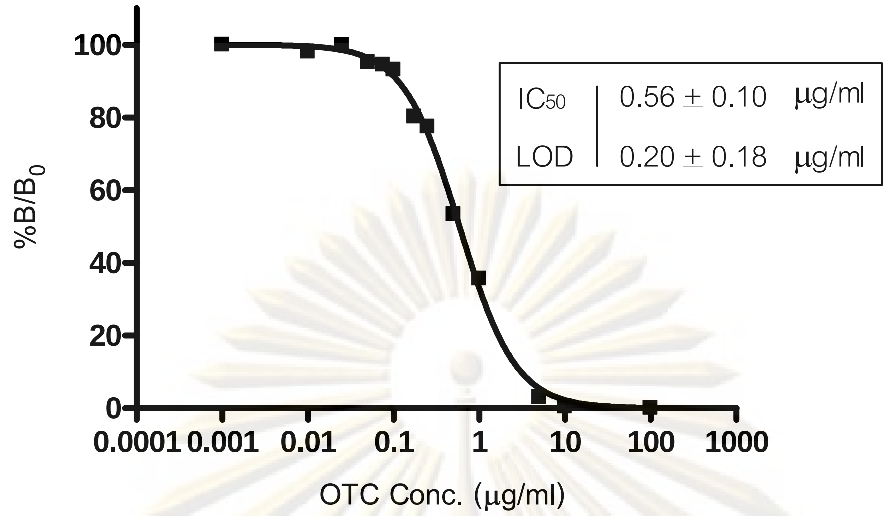
ตารางที่ 4.6 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

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

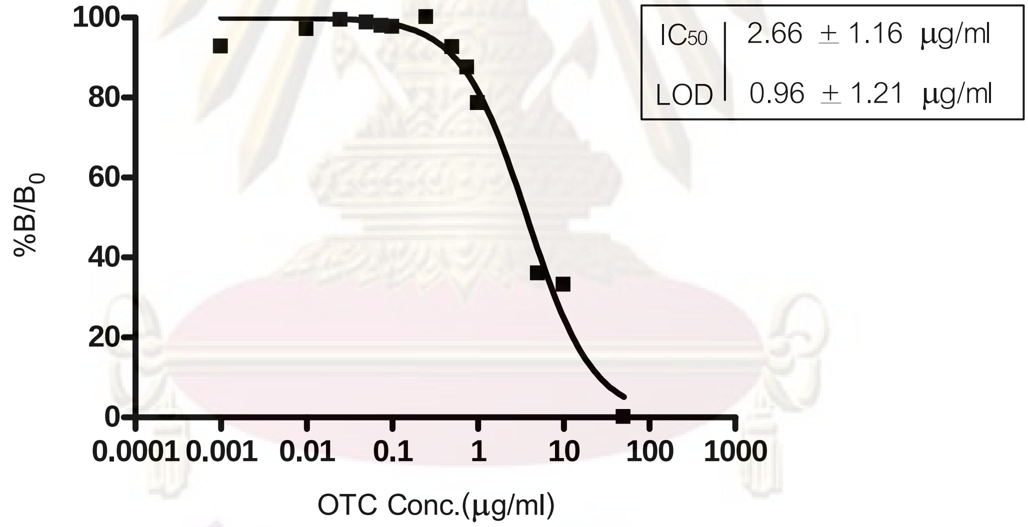


ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

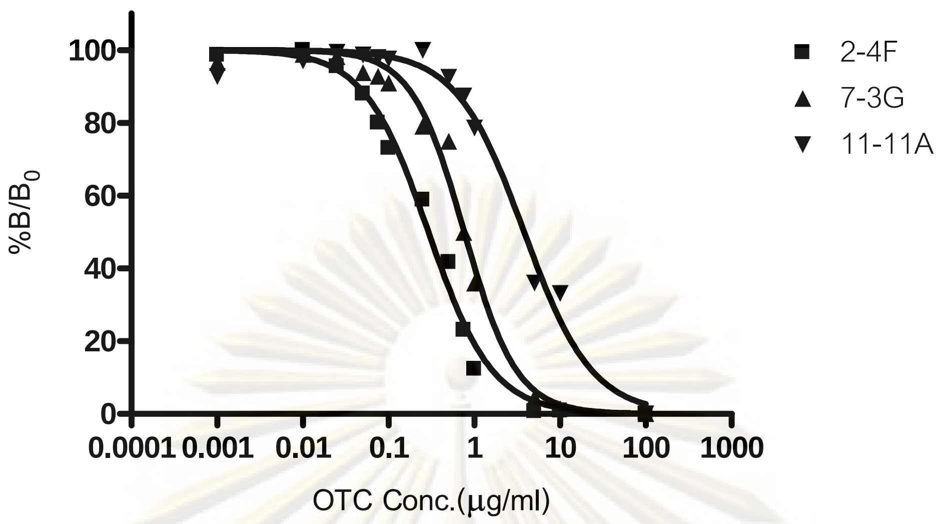


ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ OTC ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย Indirect competitive ELISA โดยใช้ OTC-OVA ความเข้มข้น 20 ต่อมิลลิลิตรเคลือบที่ก้นหลุมและโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G



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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

4.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OTC

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

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

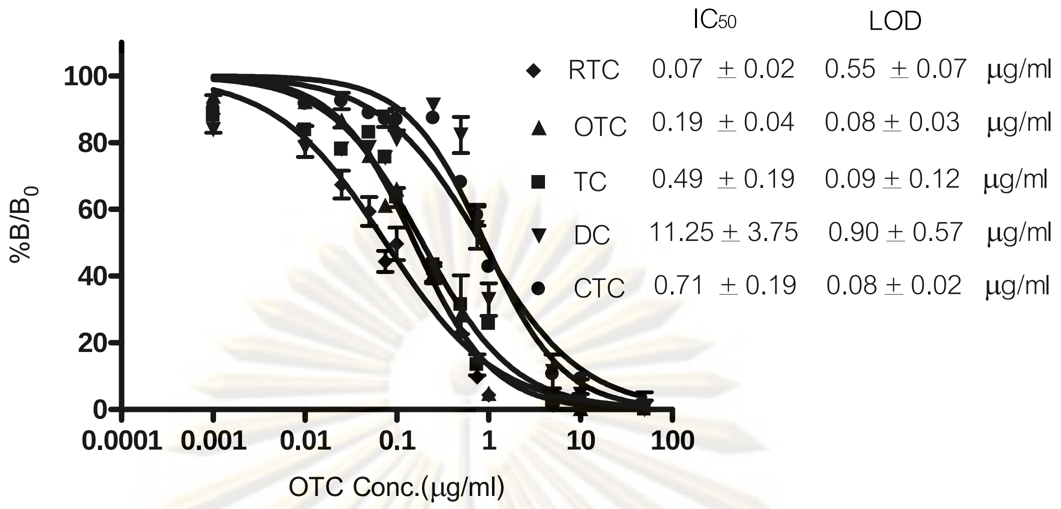
ผลการเกิดปฏิกิริยาข้ามของโคลน 7-3G พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับกับสารในกลุ่ม 3 ชนิดคือ TC, DC และ RTC โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดปฏิกิริยาข้ามเท่ากับ 2, 41 และ 5%ตามลำดับ ส่วน CTC เกิดปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.6% ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-11A มีปฏิกิริยาข้ามเฉพาะกับ DC เพียงชนิดเดียวโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเฉลี่ยเท่ากับ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

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

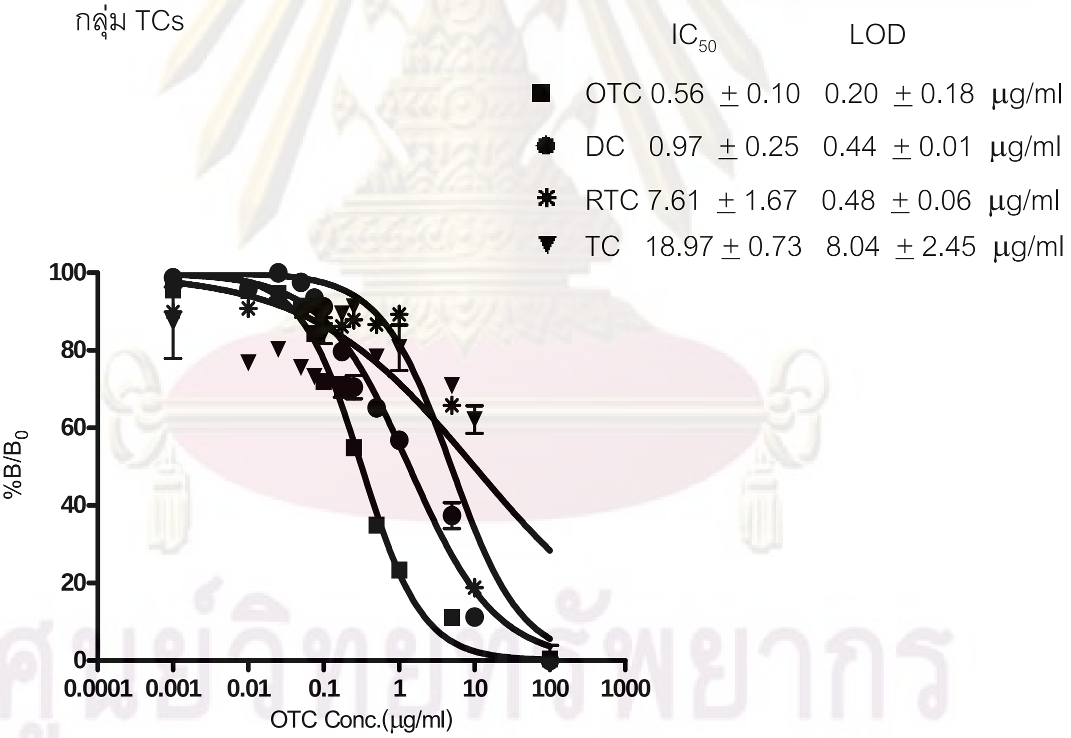
ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} เฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเฉลี่ยของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A ต่อสารในกลุ่ม TCs และ สารนอกกลุ่มโดยวิธี Indirect competitive ELISA

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

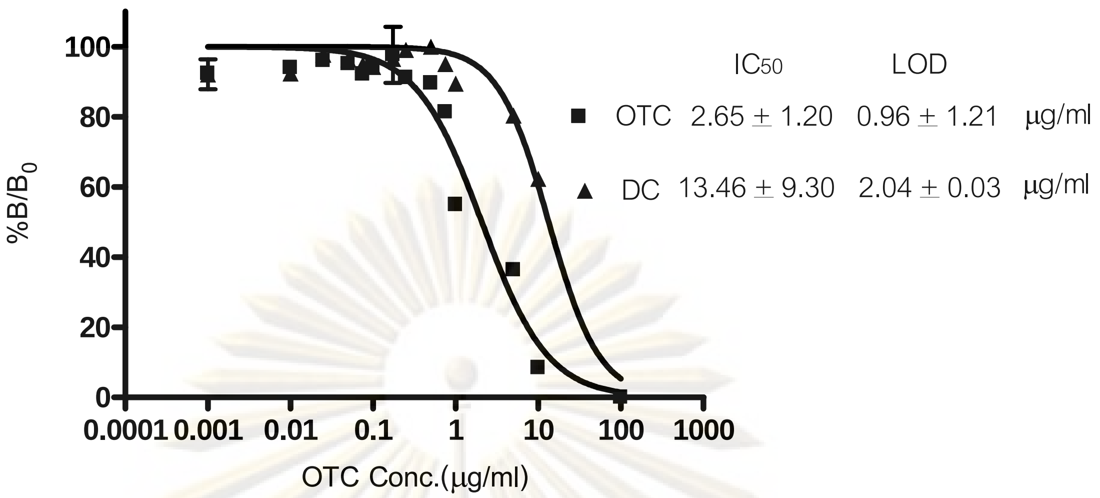


ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect competitive ต่อสารในกลุ่ม TCs



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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



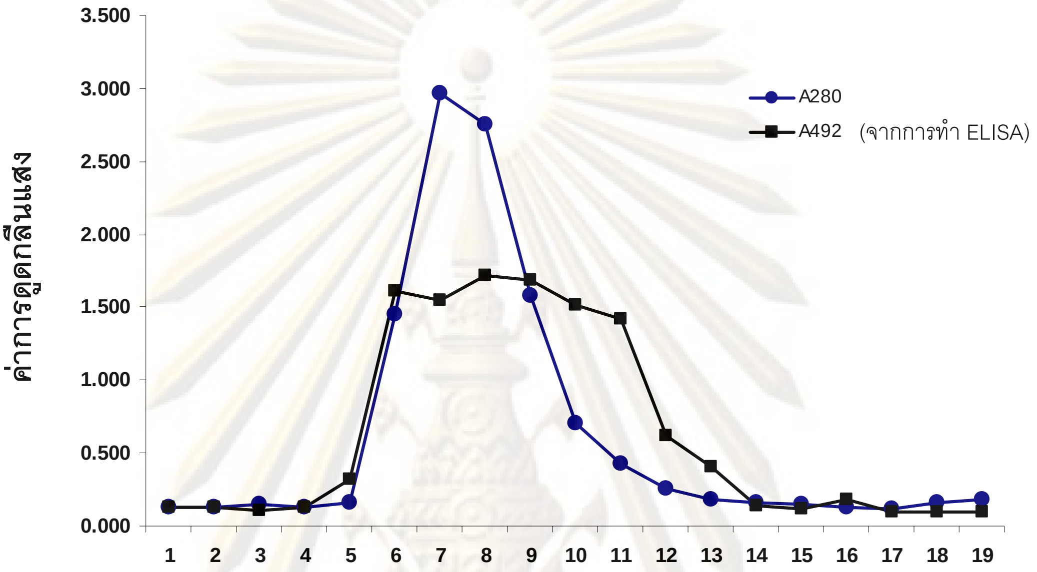
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ OTC ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect competitive ELISA ต่อสารในกลุ่ม TCs

4.5. ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F มีความไวมากที่สุด จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ของโคลน 2-4F มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ซึ่งมีโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sepharose) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 2-4F มีไอโซไทป์ IgG_1 ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีน จี แอนติบอดีจึงถูกจับอยู่ในคอลัมน์ และจะถูกชะออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 โดยนำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้มาตรวจหาโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและตรวจการมีแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้ความเจือจางของแต่ละส่วนที่ 1:100 ได้ผลดังภาพที่ 4.10 พบว่าในส่วนที่ 5-13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ 492 นาโนเมตรสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นส่วนที่แอนติบอดีถูกชะออกมา จึงนำส่วนนั้น ๆ มารวมกันและทำการไดอะไลซีสเพื่อทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นและทำให้แอนติบอดีอยู่ใน pH 7.4

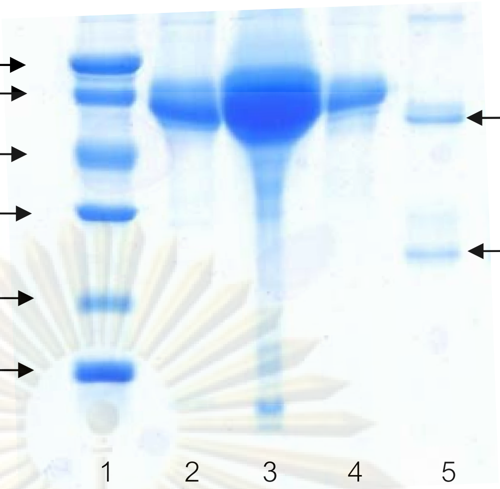
หลังจากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ มาทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE โดยการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Marker) เพื่อให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของโมโนโคลนอลแอนติบอดี เมื่อเปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้น พบว่าก่อนทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบมีขนาดใหญ่ ซึ่งคาดว่ามีโปรตีนอื่นปะปนอยู่มาก แต่หลังจากทำโมโนโคลนอล

แอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนจี คอลัมน์ ซึ่งจะมีเฉพาะแอนติบอดีเท่านั้นที่จับอยู่ในคอลัมน์ โดยโปรตีนอื่น ๆ จะถูกชะออกไปจากคอลัมน์ วิธีนี้ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ขึ้นจึงพบโปรตีน 2 ขนาด มีมวลโมเลกุลประมาณ 51.92 กิโลดาลตัน และ ประมาณ 28.20 กิโลดาลตัน คาดว่าเป็นขนาดโปรตีนสายยาว (heavy chain) และโปรตีนสายสั้น (light chain) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.10 โครมาโตแกรมของการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F ให้บริสุทธิ์ โดยใช้โปรตีนจีคอลัมน์ ชะแอนติบอดีด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 2.7 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.11 แสดงแถบโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE

โดยช่องที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน

2 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 10% FCS

3 ซีรัม (FCS)

4 อาหารเลี้ยงเซลล์ 2-4F ก่อนทำให้บริสุทธิ์

5 อาหารเลี้ยงเซลล์ 2-4F หลังทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.8 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีนมาตรฐาน	มวลโมเลกุล (kDa)	ระยะทางที่เคลื่อนที่	Relative mobility (R_f)
ชนิดโปรตีน			
Phosphorylase	97.4	0.17	1.10
Albumin	66.2	0.23	1.50
Ovalbumin	45.2	0.35	2.25
Carbonic anhydrase	31.0	0.44	2.85
Trypsin inhibitor	21.5	0.60	3.85
α−lactalbumin	14.4	0.73	4.70
โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F			
Heavy chain	52.0	1.80	0.28
Light chain	28.2	3.35	0.52

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

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

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

ดังนั้นจึงเลือกแอนติบอดีที่มีความไวมากที่สุดคือ จากโคลน 2-4F มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรสคอลัมน์ ได้แอนติบอดีที่บริสุทธิ์ขึ้น ตรวจสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของแอนติบอดีโดยการทำ SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์และพบว่ามวลโมเลกุลของแอนติบอดีสายสั้นและสายยาวมีขนาด 51.92 และ 28.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

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

ตารางสรุป การศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F, 7-3G และ 11-11A

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

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-11A เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงที่สุด ซึ่งควรจะนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบสาร OTC ในผลิตภัณฑ์ แต่เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี 11-11A มีความไวค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ ELISA

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F มีความไวมากที่สุด โดยให้ค่า LOD ต่ำกว่าค่า MRLs ที่กำหนด และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเตตราซัยคลินที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิด ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2-4F มาใช้พัฒนาชุดตรวจสอบสารในกลุ่ม TC (generic test)

โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบสารในกลุ่มเตตราซัยคลินโดยวิธี ELISA SNAP Tetracycline Test Kit ซึ่งใช้ตรวจ TC, OTC และ CTC ในน้ำนมดิบ สามารถตรวจ OTC ได้ในระดับ 50 ppb ซึ่งมีระดับความไวใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงควรพัฒนาความไวของแอนติบอดี 2-4F ให้มีความไวมากขึ้น สามารถตรวจ OTC และสารในกลุ่ม TCs ในเชิงปริมาณได้ และพัฒนารูปแบบชุดตรวจสอบ ELISA ให้เหมาะกับการหาปริมาณสารตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้ง ซึ่งจะทำให้การตรวจ OTC ในโรงงานอาหารส่งออกทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัดมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

กองนโยบายมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร. สินค้าเกษตรและอาหารของญี่ปุ่น 2547. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ [Online] แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/datakm/standard/standard.html.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2546 เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ที่ให้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขาย ตลอดจน อัตราส่วนหรือปริมาณที่ให้ใช้หรือห้ามมิให้ใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด [online]. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/th/images/stories/ law/ announce_sellanimalfeed8-2546.pdf (6 ม.ค. 53)

เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2547. การใช้ยาและสารเคมีในฟาร์มกุ้ง. สัตวแพทยสภา. แหล่งที่มา: www.vetcouncil.or.th/download/word (7 ม.ค. 53)

ธารารัชต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพมหานคร: บางกอกบล็อก

ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์. 2535. การตกค้าง และผลของยาปฏิชีวนะชนิดออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโต และโรคในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา: http:// pikul.lib.ku.ac.th/dblink/dbresult.php?query...database=agre (7 ม.ค. 53)

ปริญญา มาสวัสดิ์. 2550. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารปฏิชีวนะในกลุ่มเตตราซัยคลินที่ตกค้างในนมโดยวิธี On-line SPE-FIA. LAB TODAY 6 (สิงหาคม): 41-44.

ประทุมวัลย์ สงคง สุชาติ พรหมสมบัติ และธีระพงษ์ อภัยภักดี. การตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างออกซีเตตราซัยคลิน และออกโซลินิก แอซิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง เพื่อการส่งออกในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนบน. ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี. 2543.

แพรวพันธุ์ ห้องทองแดง, ดรุณี กอเซาะ และ มนวิภา จารุตามระ. 2548. การพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดยาในอาหารสัตว์ ยาสัตว์ tetra test kit. ธุรกิจอาหารสัตว์ 100(22): 50-61.

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

วรรณนภา สมบุญสำราญ สุพิศ ทองรอด สุภาพรรณ บริลเลียนเตส และ อุมา ซูแก้ว. ผลของยาออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโต และการตกค้างในกุ้งกุลาดำ. 2544. กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ (ปีที่ 11) ฉบับ 2.

สาธารณสุข, กระทรวง. คู่มือการใช้ชุดทดสอบอาหาร.สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. แหล่งที่มา :http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/Test%20kit.pdf (7 ม.ค.53)

สาธารณสุข, กระทรวง. 2544. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 231) พ.ศ.2544. เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง [online]. แหล่งที่มา : elib.fda.moph.go.th/fulltext2/lawfda/38112/1.pdf

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

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. 2541. อิมมูโนวิทยา: พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: บริษัทพริ้นต์โพร.

สุรพล ว่องวัฒนโรจน์. 2534. สินค้ากุ้งแช่แข็งเพื่อการส่งออก. วารสารกรมประมง 44(1): 17-18.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี 2549. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. กรมประมง.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางเคมี 2552. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. กรมประมง.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. มูลค่าสินค้าเกษตรส่งออกที่สำคัญ ปี 2552-2553 [online]. แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/exp_topten.php [5 ม.ค.53]

ศูนย์วิจัยประมงน้ำจืดขอนแก่น. 2552. สารตกค้างในเนื้อสัตวน้ำ. แหล่งที่มา http://www.fisheries. go.th / if-khonkaen/web2/index.php.(6 ม.ค.53)

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

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ สุปราณี ชินบุตรและชลอ ลิ้มสุวรรณ การตกค้างของออกโซลินิก แอซิดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา: http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC3104021.pdf.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Agasoster, T., and Rasmussen, K.E. 1992. On-line dialysis, liquid chromatography and post column reaction detection of oxytetracycline in salmon muscle extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 10: 349-354.

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

Blanchflower, J.W., McCracken, R.J., Haggan, A.S., and Glenn Kennedy, D. (1997) Confirmatory assay for the determination of tetracyline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B 692: 351-360.

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

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

Codex Alimentarius. 2000. Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. [Online] Available from : http://ec.europa.eu /food/fs/ifsi /eupositions/ccrdvf /archives /ccrdvf_archives_en.html [2010, April 1]

European Medicines Agency. 2005. Veterinary Medicines and Inspections. [online] Available from:http: //www.ema.europa.eu/pdfs/general/direct/pr/38462205en.pdf [2010, April 1]

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

Fletouris, D.J., Papapanagiotou, E.P. and Nakos, D.S. 2008. Liquid chromatographic determination and depletion profile of oxytetracycline in milk after repeated intramuscular administration in sheep. Journal of Chromatography B, 876: 148-152.

Furusawa, N. 1999. Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk. Journal of Chromatography A 839: 247-251.

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

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

Keith, W., and Walker, J. 2005. Principle and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University: 295

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

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

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

Mayer, G. 2009. Immunology-chapter four immunoglobulins-structure and function. [Online] Available from: http://pathmicro.med.sc. edu/mayer/ IgStruct 2000.htm. [2010, April 26]

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

US food and drug administration. 2003. Drugs Used in the US Aquaculture Industry. [Online] Available from: http://www.thenaa.net/downloads/Drugs _and_ Chemicals_in_US_ Aquaculture_11.10.pdf [2010, April 1]

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0
0.1	0.168
0.2	0.279
0.4	0.508
0.6	0.769
0.8	0.979
1.0	1.201

ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ผลของการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในครั้งที่ 2 โดยวิธี Indirect competitive ELISA

ครั้งที่หลอมรวมเซลล์	โมโนโคลนอลแอนติบอดี	A_{492}		
		ไม่เติมOTC	OTC 50 μg/ml	% A_{492} ที่ลดลงเมื่อเติม OTC
4	7-3G	2.033	0.558	72.55
9	2-4F	0.963	0.073	92.42
10	11-11A	1.801	0.599	66.74

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 2-4F โดยวิธี Indirect ELISA

ตัวแข่งขัน (μg/ml)	A_{492}			
	1	2	3	Average
0	1.242	1.245	1.181	1.223
0.001	1.170	1.462	1.462	1.365
0.01	1.151	1.500	1.500	1.384
0.025	1.085	1.443	1.443	1.324
0.05	0.962	1.356	1.356	1.224
0.075	0.786	1.285	1.285	1.119
0.1	0.842	1.119	1.119	1.027
0.25	0.546	0.985	0.985	0.839
0.5	0.399	0.718	0.718	0.612
0.75	0.251	0.422	0.422	0.365
1.0	0.122	0.274	0.274	0.223
5.0	0.090	0.059	0.059	0.069
10	0.070	0.073	0.073	0.072
100	0.066	0.057	0.057	0.060
IC_{50}	0.156	0.239	0.175	0.190
LOD	0.071	0.127	0.054	0.084

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 7-3G โดยวิธี Indirect ELISA

ตัวแข่งขัน	A_{492}			
(μg/ml)	1	2	3	Average
0	1.769	1.380	0.860	1.336
0.001	1.706	1.529	0.644	1.293
0.01	1.675	1.512	0.774	1.320
0.025	1.625	1.510	0.802	1.312
0.05	1.566	1.436	0.769	1.257
0.075	1.536	1.444	0.754	1.244
0.1	1.470	1.474	0.720	1.221
0.25	1.299	1.301	0.614	1.071
0.5	1.204	1.259	0.595	1.019
0.75	0.818	0.857	0.438	0.704
1.0	0.651	0.664	0.272	0.529
5.0	0.231	0.093	0.075	0.133
10	0.165	0.073	0.046	0.095
100	0.123	0.061	0.046	0.077
IC_{50}	0.58	0.657	0.46	0.566
LOD	0.07	0.12	0.4	0.197

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีจากโคลน 11-11A โดยวิธี Indirect ELISA

ตัวแข่งขัน	A_{492}			
(μg/ml)	1	2	3	Average
0	0.998	1.329	1.031	1.119
0.001	0.901	0.901	1.409	1.070
0.01	0.916	0.916	1.507	1.113
0.025	0.935	0.935	1.541	1.137
0.05	0.926	0.926	1.538	1.130
0.075	0.899	0.899	1.567	1.122
0.1	0.917	0.910	1.529	1.119
0.25	0.950	0.950	1.530	1.143
0.5	0.890	0.890	1.424	1.068
0.75	0.876	0.876	1.300	1.017
1.0	0.799	0.799	1.185	0.928
5.0	0.554	0.554	0.395	0.501
10	0.381	0.381	0.654	0.472
100	0.122	0.122	0.175	0.140
IC_{50}	3.92	1.64	2.41	2.657
LOD	0.11	0.42	2.35	0.960

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.6 ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2-4F กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA

Compounds (100 µg/ml)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย	
	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} ± SD (µg/ml)	CR (%)
Oxytetracycline	0.16	100	0.24	100	0.18	100	0.19 ± 0.42	100
Tetracyclines								
TC	0.19	82	0.54	44	0.51	35	0.41 ± 0.19	54
CTC	0.91	17	0.68	35	0.53	34	0.71 ± 0.19	29
DC	6.92	2	13.40	2	13.42	1	11.25 ± 3.75	27
RTC	0.07	206	0.09	267	0.05	353	0.07 ± 0.02	275
Other antibiotics								
Norfloxacin	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Penicilin G	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Avermectin	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Streptomycin	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Sulfaquinoxaline	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
AMOZ	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Metronidazole	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Chloramphenicol	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2
Clenbuterol	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2	>100	< 0.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.7 ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 7-3G กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA

Compounds (100 µg/ml)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย	
	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	$IC_{50} \pm$ SD (µg/ml)	CR (%)
Oxytetracycline	0.46	100	0.74	100	0.48	100	0.56 $\pm$ 0.10	100
Tetracycline family								
TC	17.40	2	18.76	2	20.74	1	18.97 $\pm$ 0.73	2
CTC	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
DC	0.69	67	1.56	17	0.66	39	0.97 $\pm$ 0.51	41
RTC	8.56	5	4.92	6	9.36	3	7.61 $\pm$ 1.67	5
Other antibiotics								
TC	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
CTC	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
DC	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
RTC	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
Other antibiotics	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
Norfloxacin	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
Penicilin G	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
Avermectin	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6
Streptomycin	>100	< 0.5	>100	< 0.7	>100	< 0.5	>100	< 0.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.8 ค่า IC_{50} และ%การทำปฏิกิริยาข้ามของ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 11-11A กับสารในและนอกกลุ่ม TCs โดยวิธี Indirect competitive ELISA

Compounds (100 µg/ml)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3		เฉลี่ย	
	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} (µg/ml)	CR (%)	IC_{50} ± SD (µg/ml)	CR (%)
Oxytetracycline	3.92	100	2.41	100	1.64	100	2.66 ± 1.20	100
Tetracycline family								
TC	>100	< 4	>100	<2	>100	<2	>100	< 3
CTC	>100	< 4	>100	<2	>100	<2	>100	< 3
DC	2.77	48	17.90	13	19.70	8	13.46 ± 9.30	19
RTC	>100	< 4	>100	<2	>100	<2	>100	< 3
Other antibiotics								
TC	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
CTC	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
DC	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
RTC	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
Other antibiotics	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
Norfloxacin	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
Penicilin G	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
Avermectin	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3
Streptomycin	>100	< 4	>100	< 2	>100	< 2	>100	< 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยการทำ Indirect ELISA เพื่อหา Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

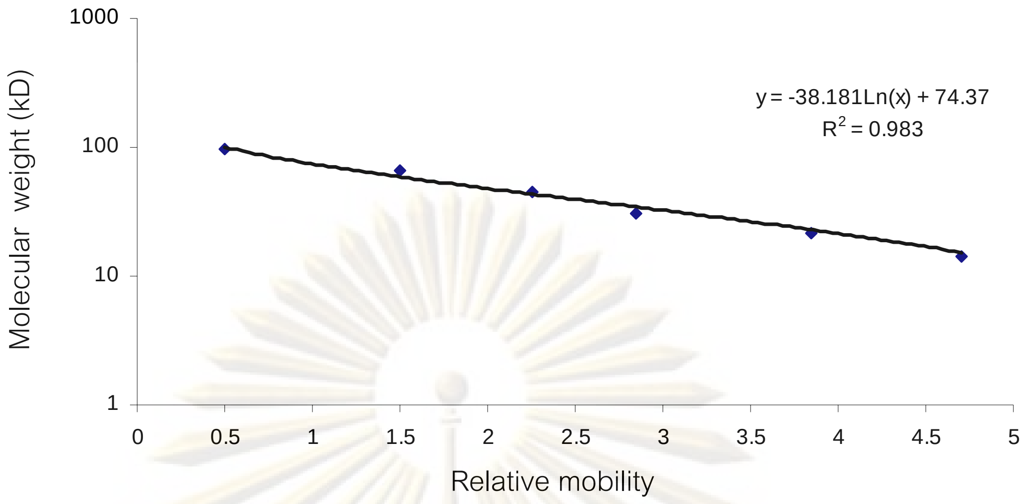
โคลน	A_{492}					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
2-4F	**1.415**	0.32	0.329	0.328	0.222	0.301
7-3G	0.123	**0.827**	0.183	0.181	0.117	0.295
11-11A	**1.514**	0.107	0.158	0.417	0.103	0.269
Control IgG_3	0.112	0.404	0..576	**1.721**	0.381	0.147

ตารางที่ ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ Indirect ELISA ที่ 492 นาโนเมตร

Fraction	A_{280}	A_{492}	Fraction	A_{280}	A_{492}
1	0.172	-	16	0.204	0.287
2	0.175	0.172	17	0.212	0.175
3	0.188	-	18	0.186	-
4	0.180	0.132	19	0.159	0.129
5	0.176	0.436	20	0.175	-
6	0.538	1.603	21	0.168	0.107
7	2.625	1.768	22	0.210	-
8	2.565	1.754	23	0.224	0.121
9	1.717	1.688	24	0.208	-
10	1.089	1.598	25	0.225	0.09
11	0.703	1.612	26	0.179	-
12	0.505	1.541	27	0.209	-
13	0.372	0.746	28	0.168	-
14	0.291	0.454	29	0.168	-
15	0.229	0.421	30	0.162	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย – ไม่ได้นำไปทำ Indirect ELISA

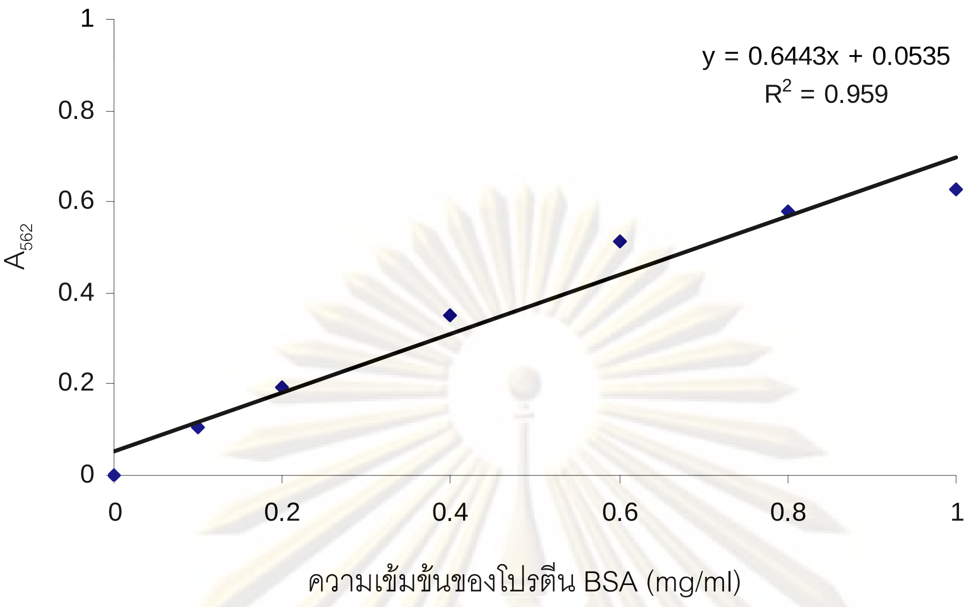
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ก. 2 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยมีโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ Phosphorylase (MW. 97.4 kD) Albumin (MW. 66.2O kD) Ovalbumin (MW. 45.2 kD) Carbonic anhydrase (MW. 31 kD) Trypsin inhibitor (MW. 21.5 kD) และ α-lactalbumin (MW. 14.4 kD) ตามลำดับ

ตารางที่ ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0.000
0.1	0.168
0.2	0.279
0.4	0.508
0.6	0.769
0.8	0.979
1.0	1.201



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.12 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 2-4F ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	2.383	3.955
1:5	1.098	4.468
1:10	0.626	4.950
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		5.124

ตารางที่ ก. 13 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 7-3G ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	1.954	3.232
1:5	0.872	3.515
1:10	0.453	3.495
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		3.414

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

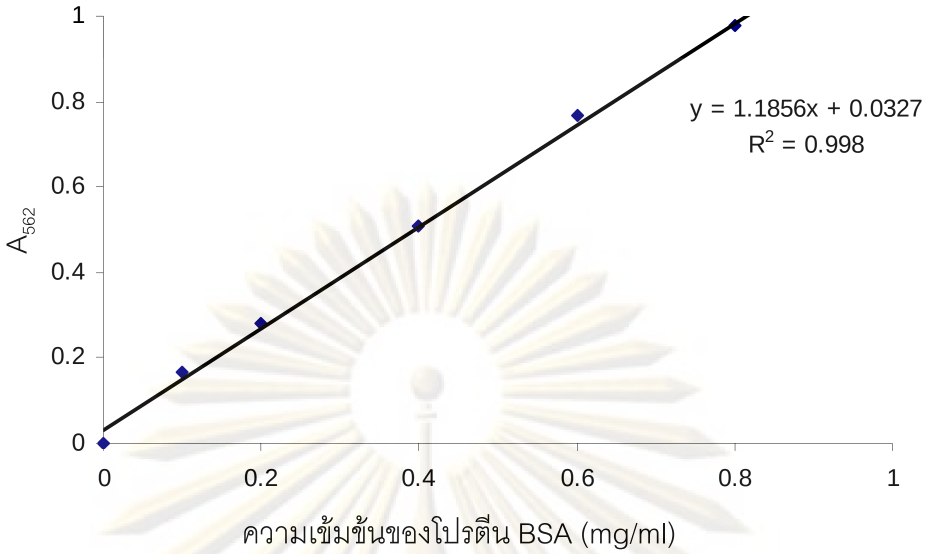
ตารางที่ ก.14 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 11-11A ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	2.330	3.865
1:5	0.997	4.042
1:10	0.608	4.798
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		4.235

ตารางที่ ก.15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

ความเข้มข้นโปรตีน BSA (mg/ml)	A_{562}
0	0.000
0.1	0.106
0.2	0.193
0.4	0.353
0.6	0.512
0.8	0.579
1.0	0.629

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ก. 4 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.16 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 2-4F หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	0.517	1.063
1:5	0.276	1.420
1:10	0.144	1.477
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		1.320

ตารางที่ ก.17 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 7-3G หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	0.581	1.196
1:5	0.309	1.588
1:10	0.177	1.822
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		1.535

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.18 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในแอนติบอดี 11-11A หลังทำให้บริสุทธิ์ ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

Dilution	A_{562}	ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml)
1:2	0.406	0.836
1:5	0.177	0.911
1:10	0.103	1.060
ความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ย		0.936

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมติด OTC เข้ากับโปรตีนพาหะ BSA

1) 7.5% (v/v) formaldehyde

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

2) 3M Sodium acetate pH 5.5

Sodium acetate	246.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 5.5

2. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดสอบโดยเทคนิค ELISA

1) 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

Na_2HPO_4	27.60	กรัม
NaH_2PO_4	71.63	กรัม

แต่ละสารละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วปรับ pH ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4

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

PB Stock	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

3) 0.05% Tween 20 ใน PBS (PBS-T)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1	ลิตร

4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS เตรียมใหม่ก่อนใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) 0.15 M Phosphate citrate buffer, pH 5.0

Na_2PO_4	9.5	กรัม
Citric acid	7.3	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย 3 N HCl ให้ได้ pH 5.0

6) Substrate solution OPD

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

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

7) 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	98	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	902	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน (หลังจากเทกรดลงไปในน้ำกลั่นอาจเกิดความร้อน ควรนำขวดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง)

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) Stock 100X HAT

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

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) 100X HT

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

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

3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

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

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

4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

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

5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6) 50% PEG (Polyethylene glycol)

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

7) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็ง (Freezing medium)

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

4. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1) 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

$Na_2PO_4 \bullet 12\ H_20$	2.77	กรัม
$NaH_2PO_4 \bullet H_20$	1.69	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2) 0.1 M glycine-HCl pH 2.7

Glycine	7.5	กรัม
Conc. HCl	2.42	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 2.7 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3) 1 M Tris HCl buffer, pH 9.0

Trizma base	121.14	กรัม
Conc. HCl	6.41	กรัม

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE

1) 10% Separating gel (1 แผ่น ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.836	กรัม
40% Acylamide/Bis	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	2	มิลลิลิตร
10% SDS	80	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2)_8$	80	ไมโครลิตร
TEMED	40	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

2) 5% Stacking gel (1 แผ่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	1.204	มิลลิลิตร
40% Acylamide/Bis	250	ไมโครลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	504	ไมโครลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% $(NH_4)_2S_2)_8$	20	ไมโครลิตร
TEMED	2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการ polymerization

3) SDS Staining dye

SDS dye	900	ไมโครลิตร
β-mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

4) Running buffer

Trizma base	15.1	กรัม
Glycine-HCl	94	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) Staining solution

Comasssie brilliant blue R 250	5	กรัม
95% Ethanol	450	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

6) Destaining solution

Methanol	250	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	680	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิรงรอง ณ ตะกั่วทุ่ง เกิดเมื่อวันที่ 25 กันยายน พ.ศ.2523 ที่จังหวัด ลำพูน สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ในปีการศึกษา 2544 หลังจากนั้นทำงานในตำแหน่งหัวหน้าแผนกฟรีสและบรรจุสินค้ากุ้งดิบ บริษัทจันทบุรีโฟรเซ่นฟู้ด จำกัด เป็นเวลา 2 ปี และทำงานในตำแหน่งหัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ บริษัทสุราษฎร์ซีฟู้ดส์ จำกัด เป็นเวลา 2 ปี และเข้าศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย