การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเอนโรฟลอกซาซินโดยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาวปิติกานต์ วงศ์พานิช

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Miss Pitikarn Wongphanit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

500513

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเอนโรฟลอกซาซินโดยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์
โดย	นางสาวปิติกานต์ วงศ์พานิช
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิติกานต์ วงศ์พานิช : การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเอนโรฟลอกซาซินโดยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (DEVELOPMENT OF ENROFLOXACIN TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา:ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, 113 หน้า.

เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี นิยมนำมาใช้ในการควบคุม และรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบในการทำปศุสัตว์ ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค และสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ก่อให้เกิดการกระตุ้นการกลายพันธุ์ และการดื้อยาของแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้าง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินต้นแบบด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จากการเตรียมชุดตรวจสอบทั้งหมด 4 แบบ พบว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) เป็นชุดตรวจสอบที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.5 ppb โดยสามารถตรวจสารได้ในช่วง 0.5-25 ppb ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีความจำเพาะสูง โดยทำปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะอื่นๆทั้งในและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนน้อยกว่า 0.01% เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปทดสอบกับตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค พบว่า %recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 82-111%, 80-125% และ 80-124% ตามลำดับ และจากการตรวจวัดปริมาณสารเปรียบเทียบโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบที่พัฒนาขึ้นเอง ชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย (บริษัท EURO-DIAGNOSTICA) และ HPLC พบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จากการทดสอบการแปรปรวนของการวัดของชุดตรวจสอบต้นแบบทั้งแบบ intra-variation และ inter-variation assay พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 2.9-7.4% และ 2.7-15.7% ตามลำดับ แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้างได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต ปิติกานต์ วงศ์พานิช

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4872370923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ENROFLOXACIN / ELISA TEST KIT

PITIKARN WONGPHANIT: DEVELOPMENT OF ENROFLOXACIN TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. THESIS ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 113 pp.

Enrofloxacin is a chemically synthetic antibiotic in fluoroquinolone group. It has been widely used in animal husbandry to control and treat diseases caused by both Gram positive and Gram negative bacteria. This practice might lead to drug residue in animal products, thus directly affecting the consumers. The residue can also enter the food chain, leading mutation and drug resistance in bacteria. Therefore, determination of enrofloxacin residue is essential. In this research. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kits were developed. Among the four types of ELISA kit tested, direct competitive ELISA (Ag captured) was the most suitable type for test kit prototype preparation with the limit of detection (LOD) of 0.5 ppb and the detectable range of 0.5-25 ppb. The prototype test kit was highly specific to enrofloxacin. The %cross-reactivity with other antibiotics and fluoroquinlones were less than 0.01%. The developed test kit was tested on different samples including chicken muscle, cow milk and cow urine. It revealed the %recovery of 82-111%, 80-125% and 80-124%, respectively. Furthermore, comparative quantification of enrofloxacin using the developed ELISA test kit, the commercially available test kit (EURO-DIAGNOSTICA) and HPLC showed that all methods gave comparable results. In addition, the intra-assay and inter-assay variations of the developed test kit were also investigated and found to be 2.9-7.4% and 2.7-15.7%, respectively. These indicated that the developed prototype test kit in this study can be used to accurately and efficiently determine the enrofloxacin residue.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study: Biotechnology

Academic year: 2007

Student's signature Pitikarn Wongphanit

Advisor's signature K. Komolpis

Co-advisor's signature Tanapat Palaga

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำพร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอณุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ในทุกด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุข ตั้งแต่เริ่มทำการจนทดลองจนเสร็จสิ้น รวมทั้ง เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้าน ด้วยดีตลอดมา

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความห่วงใย กำลังใจ รวมถึงให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างไม่มีข้อแม้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4

2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) 4

2.1.2 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซิน 7

2.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 9

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 18

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 18

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 20

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 24

3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 24

3.3.2 การเชื่อมต่อเอนโรฟลอกซาซินกับ BSA 25

3.3.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 26

3.3.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ 29

3.3.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ 35

3.3.6 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง 41

บทที่ หน้า

3.3.7 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบ..... ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีวางจำหน่าย (EURO-DIAGNOSTICA) ..... และเทคนิค HPLC.....42
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....45
4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตแอนติบอดี.....45
4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....46
4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบ.....51
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ.....61
4.5 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง.....67
4.6 ผลการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบ..... ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินที่มีวางจำหน่าย (EURO-DIAGNOSTICA) ..... และเทคนิค HPLC.....77
5 สรุปผลการทดลอง.....86
รายการอ้างอิง.....88
ภาคผนวก.....92
ภาคผนวก ก.....93
ภาคผนวก ข.....109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปสำหรับเอนโรฟลอกซาซินตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ..... 7

2.2 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี..... 8

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....18

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....20

3.3 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้นำไปทดสอบกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ.....37

4.1 ผลการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินจากเซลล์ไฮบริโดรมา ..... ด้วยวิธี Indirect ELISA.....45

4.2 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างแอนติบอดีที่ผลิตได้ ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์.....48

4.3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของแอนติบอดี.....48

4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ..... จากการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....50

4.5 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP..... ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA..... (Ag captured) 51

4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP..... ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA..... (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู 53

4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA..... เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured).....55

4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่..... เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ..... Direct competitive ELISA (Ab captured) 57

4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ 61

4.10 ผลค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ..... (SD) ที่ได้จากการทำ Direct competitive ELISA (Ag captured) สำหรับสร้างกราฟ..... มาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ 62

ตารางที่ หน้า

4.11 ผลของการศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่..... เชื่อมต่อกับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....64
4.12 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ต่อสารในกลุ่ม..... และนอกกลุ่มฟลูออโรควิโลน.....65
4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)..... เพื่อใช้หาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....66
4.14 ค่าความแม่นยำ (intra- และ inter-variation assay) ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ.....67
4.15 ผลการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยวิธีต่างๆ 69
4.16 ผลการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยวิธีต่างๆ.....69
4.17 ผลการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างปัสสาวะโคด้วยวิธีต่างๆ.....70
4.18 สรุปผลการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ.....73
4.19 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ.....74
4.20 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 75
4.21 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 76
4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และ..... ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA).....78
4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และ ..... ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA).....79
4.24 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และ..... ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA) 80
4.25 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ..... และเทคนิค HPLC 82
4.26 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ..... และเทคนิค HPLC 82
4.27 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ..... และเทคนิค HPLC 83
4.28 สรุปผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ . ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA และเทคนิค HPLC.....85
ก.1 ผลของการหาปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีน BSA ที่ เชื่อมต่อกับเอนโรฟลอกซาซิน ...94

ตารางที่ หน้า

ก.2 ค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของ..... แอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....95
ก.3 ผลการหาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินเหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน.....96
ก.4 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....97
ก.5 ผลการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ ..... กับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ 98
ก.6 ผลการหาค่า intra-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 99
ก.7 ผลการหาค่า inter-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 99
ก.8 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค.....100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน	4
2.2	โครงสร้างทางเคมีของเอนโรฟลอกซาซิน	5
2.3	หลักการของ Indirect ELISA	10
2.4	หลักการของ Sandwich	10
2.5	หลักการของ Competitive ELISA	12
2.6	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน	13
4.1	โครมาโทแกรมจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้ คอลัมน์ protein A sepharose	47
4.2	แถบของสาย heavy chain และ light chain ของแอนติบอดีก่อน และ หลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	49
4.3	ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วน ระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)	52
4.4	ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วน ระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะ ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู	54
4.5	ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วน ระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ BSA ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured)	56
4.6	ผลการทดสอบความไวของอัตราส่วนระหว่างเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)	58
4.7	กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ	62
4.8	กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)	63

รูปที่ หน้า

4.9 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบเมื่อทำการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม....64
4.10 กราฟแสดงการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเนื้อไก่ น้ำนมและ....
ปัสสาวะโค....71
4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่....
น้ำนมโค และปัสสาวะโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ....
EURO-DIAGNOSTICA....81
4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่....
น้ำนมโค และปัสสาวะโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC....84
ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) จากวิธี BCA....93
ก.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS....
(ก) ก่อนการเชื่อมต่อกับเอนโรฟลอซาซิน....93
(ข) หลังการเชื่อมต่อกับเอนโรฟลอซาซิน....93
ก.3 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA....94
ก.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีน....
มาตรฐานใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจาก....
ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE....95
ก.5 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ....98
ก.6 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่างเนื้อไก่ครั้งที่ 1....100
ก.7 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่าง เนื้อไก่ครั้งที่ 2....101
ก.8 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่างเนื้อไก่ครั้งที่ 3....101
ก.9 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 1....102
ก.10 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 2....102
ก.11 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน....
ในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 3....103

รูปที่ หน้า

ก.12 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ใช้หาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน .....
ในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท.....
(EURO-DIAGNOSTICA).....103
ก.13 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA)...
ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบ.....
กับชุดตรวจสอบต้นแบบ.....104
ก.14 กราฟมาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร .....
สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างด้วย.....
เทคนิค HPLC 104
ก.15 โครมาโตแกรมของเอนโรฟลอกซาซินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....
ที่ได้จากเทคนิค HPLC.....105
ก.16 โครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย .....
400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากเทคนิค HPLC.....106
ก.17 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย.....
400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากเทคนิค HPLC.....107
ก.18 โครมาโตแกรมของตัวอย่างปัสสาวะโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย .....
400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC.....108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์

BCA assay	bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
g	gram
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%
LC-MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quatitation
M	molar
ml	milliliter
MRLs	Maximum Residue Limits
N	normal
ng	nanogram
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
OPD	*O*-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
SDS	sodium dodecyl sulfate
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
v	volume
w	weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี นิยมนำมาใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินปัสสาวะในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น โค สุกร สัตว์ปีก กุ้ง และปลา เป็นต้น โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้สามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียง คือ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย คันระคายเคืองผิวหนัง และส่งผลกระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น เวียนศีรษะ อ่อนเพลีย เศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน เป็นต้น (Bertino และ Fish, 2000) แต่เนื่องจากประโยชน์ของเอนโรฟลอกซาซินที่สามารถรักษาโรคได้หลากหลาย จึงทำให้มีการใช้ในการทำปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดการตกค้างในสัตว์ที่เป็นอาหาร ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค เกิดการกระตุ้นการกลายพันธุ์ และการดื้อยาของแบคทีเรีย (Guardabassi และคณะ, 2004) จึงทำให้ประเทศต่างๆ หันมาให้ความสำคัญในการควบคุมการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ที่นำมาบริโภค ในปัจจุบันสหภาพยุโรปได้จัดเอนโรฟลอกซาซิน อยู่ใน Annex I of Council Regulation (ECC) No. 2377/90 กำหนดค่าปริมาณการตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ (Maximum Residue Limits ; MRLs) ในกล้ามเนื้อของโค สุกร สัตว์ปีก และนมโค เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในไตของโค และตับของสุกรและสัตว์ปีก เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (EMEA, 2002) สำหรับในประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มีการกำหนดการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินในสินค้ากลุ่มปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์เช่นเดียวกันกับกำหนดของสหภาพยุโรป ตามที่ประกาศในข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2548 เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและการจำหน่ายหรือส่งออกสินค้าไปยังต่างประเทศได้ โดยไม่ถูกกีดกัน และตีกลับของสินค้า จึงจำเป็นจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยเทคนิคทางเคมี คือ เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) (Gorla และคณะ, 1997) liquid chromatography (LC) (Anadon และคณะ, 1995) และ liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) (Granelli และ Branzell, 2007) ซึ่งเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง แต่เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนาน จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์แต่ละ

ตัวอย่างสูง รวมทั้งต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือเท่านั้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ทำได้สะดวก และรวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง โดยอาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยา คือ การตรวจสอบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้าง เทคนิค ELISA นี้เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อย และมีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการทดสอบแต่ละครั้ง ให้ความถูกต้องสูงใกล้เคียงกับเทคนิคทางเคมี แต่ชุดตรวจ (ELISA kit) ที่ใช้ในปัจจุบันต้องทำการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจสอบขึ้นใช้เองภายในประเทศจะทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินลดลง

กอปรกับอุตสาหกรรมอาหารเป็นอุตสาหกรรมสำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศ คุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตได้ ส่งผลโดยตรงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และเพื่อเป็นการยืนยันคุณภาพของสินค้า ให้สามารถส่งออก และบริโภคภายในประเทศได้ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ได้ทำการผลิตไฮบริโดรมาเซลล์ ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน โดยมีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วัดได้ (Lower limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.014 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (มนัสพงศ์, 2549) ในงานวิจัยนี้ จึงได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินต้นแบบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เตรียมชุดตรวจสอบเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ต้นแบบต่างๆ สำหรับตรวจเอนโรฟลอกซาซิน

1.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจต้นแบบ

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

1.3.3 ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1.3.4 เตรียมชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินต้นแบบ

1.3.4.1 แบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

1.3.4.2 แบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่รองด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

1.3.4.3 แบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

1.3.4.4 แบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

1.3.5 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

1.3.6 วิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

1.3.7 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบโดยใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

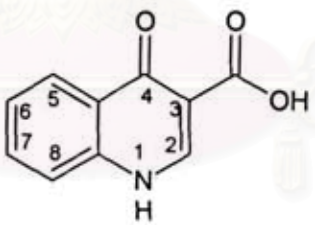
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone)

2.1.1.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

สารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลน เป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี ใช้ในการรักษาการติดเชื้อทั้งในคนและในสัตว์ โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลนนั้นเป็นสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกอะโรมาติก (heterocyclic aromatic) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีหมู่คีโตนตรงตำแหน่งที่ 4 และหมู่คาบอกซิลิคตรงตำแหน่งที่ 3 ซึ่งโครงสร้างของสารมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) (Holtzapple และคณะ, 2001) ของแบคทีเรียแกรมลบ และยับยั้งเอนไซม์ดีเอ็นเอโทโปไอโซเมอเรส (DNA topoisomerase IV) ในแบคทีเรียแกรมบวก (Bertino และ Fish, 2000) หากในตำแหน่งที่ 6 นั้นมีธาตุฟลูออรีนจะทำให้สารในกลุ่มนี้ถูกแยกออกเป็นกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และจะมีการเปลี่ยนแปลงหมู่ที่ตำแหน่งต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (Hernandez-Arteseros และคณะ, 2002)

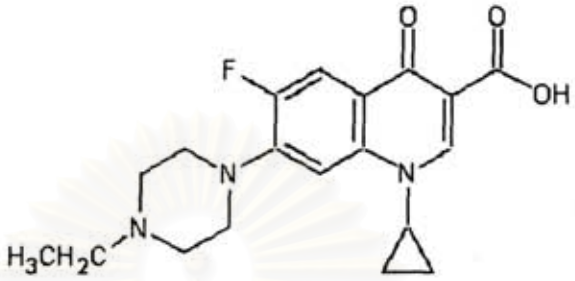


รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน

2.1.1.2 เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin)

เอนโรฟลอกซาซินมีชื่อทางเคมี คือ 1-cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid (hydrochloride) จัดอยู่ในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 359.4 ดาลตัน ลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลวที่ 219-221 องศาเซลเซียส (WHO, 1997) มีการพัฒนาสูตรโครงสร้างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ให้กว้างขึ้นฆ่าจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก แต่จะออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ และมีการเติม piperazine ring และเพิ่มหมู่

ethyl เข้าที่ piperazine ring ทำให้สารปฏิชีวนะมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน นำมาใช้รักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และระบบทางเดินปัสสาวะในโค สุกร สัตว์ปีก กุ้ง ปลา แกะ แพะ ม้า และกระต่าย



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของเอนโรฟลอกซาซิน

2.1.1.3 กลไกการทำงานของเอนโรฟลอกซาซิน

เอนโรฟลอกซาซิน มีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดี จะเคลื่อนตัวผ่านชั้นไลโพโปรตีน (lipoprotein) ของเซลล์เมมเบรน (cell membranes) ได้ง่ายและรวดเร็ว จากนั้นสารปฏิชีวนะจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ผ่านเข้าไปในส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของแบคทีเรีย เกิดการสะสมอย่างรวดเร็ว และไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดยไปยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อเอนโรฟลอกซาซินไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้สายดีเอ็นเอไม่เชื่อมติดกัน การเรียงตัวของโครโมโซม (chromosome) ผิดไป ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด

เมื่อเอนโรฟลอกซาซินเข้าสู่ร่างกายจะเปลี่ยนเป็นซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) โดยปฏิกิริยา N-dealkylation ในตับ ซึ่งสารซิโพรฟลอกซาซินจะออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียด้วย ดังนั้นฤทธิ์ของเอนโรฟลอกซาซินในร่างกายที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย เป็นผลรวมที่เกิดจากเอนโรฟลอกซาซิน และจากเมแทบอไลซ์ที่เกิดขึ้นจากการศึกษาในสัตว์ต่างๆ (Brown และคณะ 1996, Kaartonen และคณะ1995 และ Garsia และคณะ 1999)

2.1.1.4 ผลกระทบจากการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซิน

เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง จึงทำให้มีการใช้กันเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดการตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ ซึ่งมีรายงานของ Lolo และคณะ (2006) ได้นำเนื้อไก่ที่มีการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินมาผ่านกระบวนการปรุงต่างๆ คือ การใช้ไมโครเวฟ การย่าง การต้ม การอบ และการทอด แล้วทำการหาเอนโรฟลอกซาซินด้วยเทคนิค LC-MS พบว่า เมื่อผ่านการปรุงด้วยวิธีต่างๆ แล้วยังพบว่ามีการตกค้างของสารนี้อยู่ทุกวิธี และสรุปว่าเนื้อไก่ที่มีการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินแม้จะผ่านการให้ความร้อน ก็ไม่สามารถทำลายส่วนที่ตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการก่อให้เกิดกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากการใช้สารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนในส่วนของดีเอ็นเอไจเรส และดีเอ็นเอโทโพไอโซเมอเรส (Ruiz, 2003) และพบว่ามีการดื้อยาของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นหลังจากที่เริ่มมีการนำสารกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาสัตว์ รวมทั้งการดื้อยาของแบคทีเรียในมนุษย์ ซึ่งเชื้อที่มีรายงานว่าพบการดื้อยาแล้ว คือ *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp.

2.1.1.5 ข้อกำหนดในการตรวจหาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซิน

เนื่องจากเอนโรฟลอกซาซินก่อให้เกิดการดื้อยา และการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย และการตกค้างทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาจึงได้ประกาศห้ามการใช้เอนโรฟลอกซาซินในสัตว์ปีก (FDA , 2000) ส่วนสหภาพยุโรปและหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยยังสามารถใช้เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะในการทำปศุสัตว์ได้ โดยสหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณการตกค้างในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ที่ใช้ในการบริโภค MRLs (maximum residue limits) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (The Europeon Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2002) สำหรับในประเทศไทยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2548 ให้กำหนดการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินเช่นเดียวกันกับของสหภาพยุโรป

ตารางที่ 2.1 ค่า MRLs ที่กำหนดโดยสหภาพยุโรปสำหรับเอนโรฟลอกซาซินตกค้างในเนื้อเยื่อต่างๆ

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อเป้าหมาย	MRLs (μg/kg)	หมายเหตุ
โค, แกะ, แพะ	กล้ามเนื้อ	100	
	ไขมัน	100	
	ตับ	300	
	ไต	200	
	น้ำนม	100	
สุกร, กระต่าย	กล้ามเนื้อ	100	
	ไขมัน	100	
	ตับ	200	
	ไต	300	
สัตว์ปีก	กล้ามเนื้อ	100	ห้ามใช้ในสัตว์ที่ผลิตไข่สำหรับบริโภค
	หนังและไขมัน	100	
	ตับ	200	
	ไต	300	
สัตว์ทุกชนิดยกเว้น โค, แกะ, แพะ, หมู, กระต่าย และสัตว์ปีก	กล้ามเนื้อ	100	
	ไขมัน	100	
	ตับ	200	
	ไต	200	

2.1.2 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซิน

2.1.2.1 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี

การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิค ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ขีดความสามารถในการตรวจ (ng/g)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
LC-UV	3	ไขมัน กล้ามเนื้อ ไต ตับ ผิวหนัง ของไก่	Anadon และคณะ, 1995
LC-MS	7.5	กล้ามเนื้อของสุกร	Delephin และคณะ, 1998s
LC–FI	20	กล้ามเนื้อ ไต ผิวหนัง ของไก่ และไก่งวง	Waggoner และ Bowman, 1987
HPLC-FI	2	เลือดและน้ำนม ของโค	Idowu และ Peggins , 2004
HPLC	0.019	ไข่ไก่	Gorla และคณะ, 1997

เทคนิคทางเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซิน เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ ซึ่งแต่ละเทคนิคจะมีขีดความสามารถในการตรวจหา (limit of detection, LOD) แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพสูง แต่ในการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละครั้งใช้เวลานานและทำได้ทีละตัวอย่าง เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาแพง การดูแลรักษามีค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการใช้เครื่องมือทำการวิเคราะห์ และยังจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือนั้นๆ อีกด้วย

2.1.2.2 การตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร คือ เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง โดยใช้หลักการการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างเอนติเจนและแอนติบอดี สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว ทำให้มีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำ และทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว ได้มีรายงานของ Watanabe และคณะ (2002) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน แล้วนำมาผลิตชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ได้กราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นเนื้อไก่ ตับไก่ และน้ำนมโค

นอกจากนี้บริษัทต่างๆ ได้ทำการผลิตชุดตรวจสอบ ELISA ที่ใช้ในวิเคราะห์หาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินออกมาจำหน่ายอีกด้วย

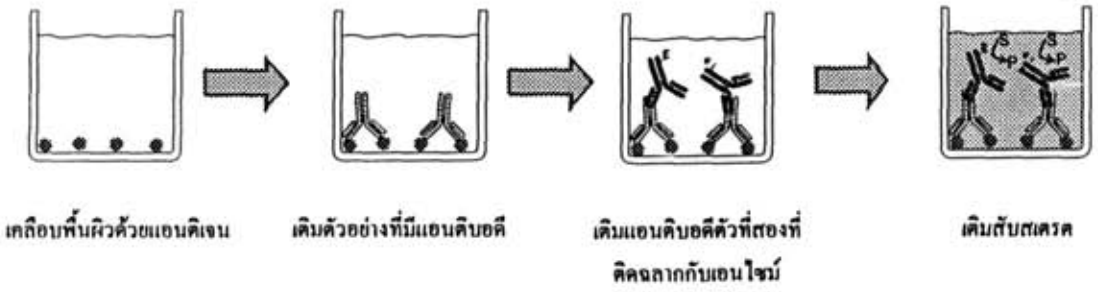
2.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่คิดค้นได้ในเวลาที่ไล่เลี่ยกันจากกลุ่มนักวิจัยจาก 2 ประเทศ คือ ประเทศฝรั่งเศส (Avramaeas และ Guilbert, 1971) และประเทศสวีเดน (Engvall และ Perlman, 1971) นำมาใช้ในการหาแอนติบอดีในซีรัม การตรวจหาซัยโตไคน์หรือฮอร์โมน รวมทั้งหาการตกค้างของสารต่างๆ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะสูง (specificity) และมีความเหนียวแน่นในการจับ (affinity) หลักการของเทคนิค ELISA คือใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับโดยใช้เอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่มีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และยังสามารถดัดแปลงให้ใช้ได้กับเครื่องมืออัตโนมัติได้ทุกขั้นตอน

2.1.3.1 เทคนิค ELISA สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.1.3.1.1. Indirect ELISA

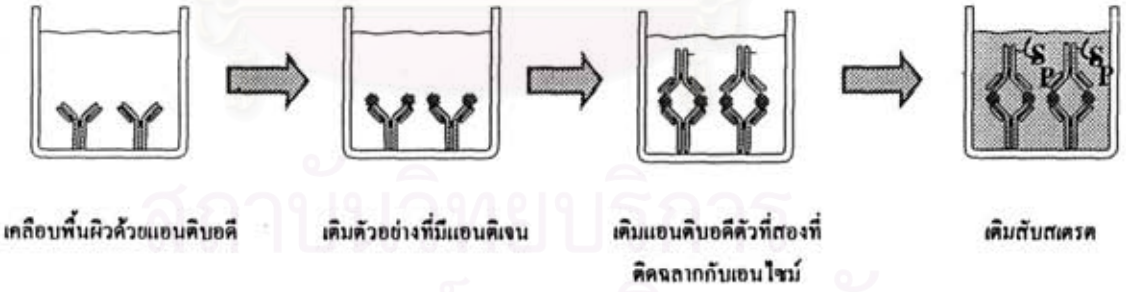
วิธีนี้ใช้ในการวัดและตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ จะเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ ทำการเติมตัวอย่างที่มีแอนติบอดีลงไป แอนติบอดีที่จำเพาะเท่านั้นที่จะจับกับแอนติเจนที่เคลือบไว้ ทำการล้างส่วนที่ไม่จำเพาะกับแอนติเจนออกไป แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา หลังจากล้างและเติมสับสเตรตของเอ็นไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น ซึ่งสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ



รูปที่ 2.3 หลักการของ Indirect ELISA

2.1.3.1.2. Sandwich ELISA

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาแอนติเจนในตัวอย่าง ซึ่งวิธีนี้จะต้องมีแอนติบอดี 2 ตัว ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่เอพิโทป (epitope หรือ antigenic determinant) ที่ต่างกัน วิธีนี้ใช้แอนติบอดีสองตัว จับกับแอนติเจนหนึ่งตัว โดยการประกบคู่ จึงเรียกวิธีการนี้ว่า Sandwich ELISA เริ่มจากทำการเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดีตัวที่หนึ่งจากนั้นเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดลงไป แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนเช่นกัน และติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปจับกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบนั้น ถ้ามีแอนติเจนอยู่มาก แอนติบอดีตัวที่สองจะจับกับแอนติเจนได้มาก ล้างเอาส่วนเกินออกไป เติมสับสเตรตของเอนไซม์ลงไป วัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น ซึ่งความเข้มของสีที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง



รูปที่ 2.4 หลักการของ Sandwich ELISA

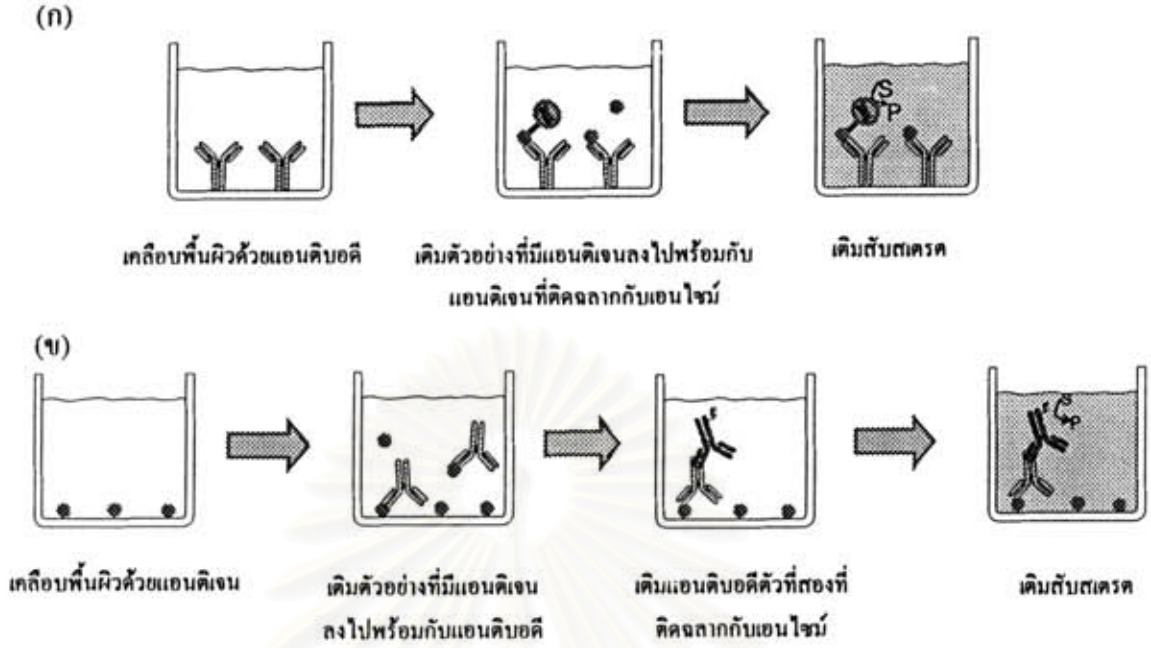
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3.1.3. Competitive ELISA

เป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดีที่สารตัวใดตัวหนึ่งมีปริมาณจำกัด ทำให้เกิดการแข่งขันกันขึ้น ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน สามารถใช้แอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ถ้าใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดี และกำหนดให้มีแอนติเจนที่ติดฉลากปริมาณคงที่และทราบจำนวนลงไป หากมีแอนติเจนในตัวอย่างจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีที่พื้นผิวระหว่างแอนติเจนกับแอนติเจนที่ติดฉลาก ทำให้แอนติเจนติดฉลากที่เติมลงไปส่วนหนึ่งจับกับแอนติบอดีได้น้อย ล้างเอาแอนติเจนส่วนเกินออกไป เติมสับสเตรตของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่เกิดขึ้นจะเป็นปริมาณผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่นำมาทดสอบ และถ้าใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการตรวจวัดแอนติเจน จะทำการเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติเจน ให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบแย่งกับแอนติเจนที่เคลือบผิวในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณแอนติเจนมาก จะจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์มาก ทำให้แอนติบอดีที่ติดฉลากจับกับแอนติเจนได้น้อย ส่งผลให้ในปฏิกิริยามีแอนติบอดีที่ติดฉลากน้อย ทำการเติมสับสเตรตของเอนไซม์ แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นจะเป็นค่าผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่นำมาทดสอบ เช่นเดียวกันกับการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากกับเอนไซม์

ในการทดสอบเพื่อหาปริมาณของแอนติเจนด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องมีการสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตของเอนไซม์กับแอนติเจนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อต้องการหาปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง นำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะรู้ปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างได้ การตรวจสอบด้วยวิธี Competitive ELISA มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยการติดฉลากแอนติเจนด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนการติดฉลากแอนติเจนอาจมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอพิโทป ในตำแหน่งที่แอนติบอดีจับ ทำให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเปลี่ยนแปลงได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



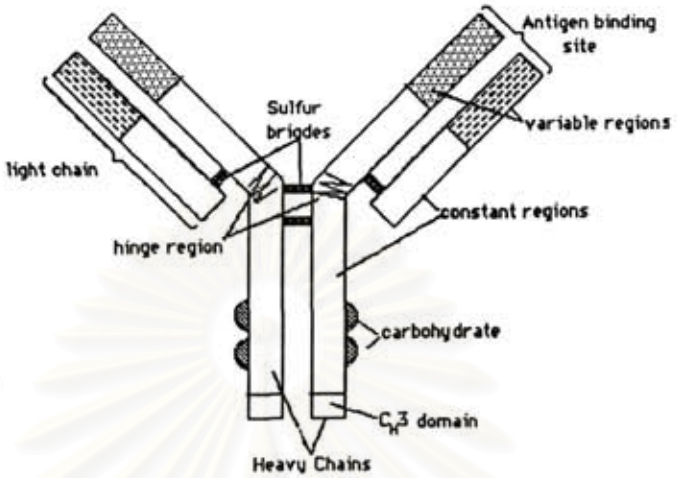
รูปที่ 2.5 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และ (ข) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

2.1.3.2 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA

2.1.3.2.1 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีน ที่หลั่งมาจากเซลล์พลาสมา ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก B cell ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีบนผิวของ B cell เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ antigenic determinant หรือ เอพิโทปที่แปลกปลอม และจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอพิโทปนั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้จะกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ แอนติบอดี 1 โมเลกุล (รูปที่ 2.6) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ สายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมากเรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน ส่วนอีก 2 สายที่สั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเรียกว่า Light chain (L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สายเช่นเดียวกัน โดย Heavy chain และ Light chain ทั้ง 4 สายจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งสามารถแยกแรงยึดนี้ออกจากกันได้ด้วยสาร reducing agent เช่น เมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของแต่ละสายจะเป็น หรือ $-NH_2$ นิยมเรียกว่า N หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น -COOH นิยมเรียกว่า -C หรือ carboxy terminal ทั้ง 4 สายจะหันปลายข้าง $-NH_2$ หรือ -COOH ไปทางเดียวกัน โมเลกุลของอิมมูโนโกลบุลินมีรูปร่างคล้ายๆ กับตัว Y โดยมี hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น ได้มากทำให้แขนทั้ง 2 ข้าง ยืดห่างออกจากกันเพื่อจับกับ

แอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น แอนติบอดีสามารถแบ่งออกตามลักษณะเด่น คือ พอลิโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

2.1.3.2.1.1 พอลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody)

เป็นกลุ่มแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในความจำเพาะกับแอนติเจน โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ เอพิโทป หลายตำแหน่ง บนแอนติเจน เนื่องจากแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจาก B-cell หลายๆ โคลน (บี-เซลล์ 1 โคลน สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้ 1 ชนิด)

2.1.3.2.1.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจากพลาสมาซึ่งกำเนิดมาจาก บี-เซลล์ โดยเซลล์เหล่านี้เกิดจากเซลล์เริ่มต้นเซลล์เดียว (single clone หรือ monoclone) เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ มีลักษณะที่สำคัญคือ มีความจำเพาะสูงต่อเอพิโทปของแอนติเจนชนิดหนึ่งชนิดใดของแอนติเจนเท่านั้น (Nelson และคณะ, 2000) เซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นสามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการให้เจริญเติบโต แบ่งตัวและหลั่งแอนติบอดีออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถเก็บเซลล์นี้แบบถาวรได้ และนำกลับมาเพาะเลี้ยงได้อีก เพื่อให้เซลล์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกในปริมาณและเวลาที่ต้องการ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตเป็นชนิดเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

แอนติบอดีมีความสำคัญต่อชุดตรวจ ELISA มาก สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ ในชุดตรวจสอบส่วนใหญ่นิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าพอลิ

โคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากว่ามีความจำเพาะมากกว่า และสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้การผลิตชุดตรวจสอบได้

2.1.3.2.2 แอนติเจน (antigen)

แอนติเจน คือ สารที่สามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีหรือ T-lymphocyte ชนิดจำเพาะ (Specific sensitized T lymphocyte) ได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดี หรือลิมโฟซัยท์นั้นๆ แล้วสามารถจดจำสารนั้นได้ แอนติเจนเป็นส่วนที่ต้องการการตรวจหาเมื่อมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น หรือเป็นส่วนที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น แอนติเจนมีความสำคัญ เนื่องจากในชุดตรวจ ELISA อาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นกลไกหลักในการตรวจ

2.1.3.2.3 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์เป็นส่วนสำคัญของชุดตรวจ ELISA ซึ่งอยู่ในส่วนของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา ใช้โดยการเชื่อมหรือติดฉลากเข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ horseradish peroxidase (HRP) และ alkaline phosphatase (AP)

Horseradish peroxidase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44 กิโลดาลตัน ได้จากส่วนรากของต้น horseradish (*Amoracia rusticana*) เอนไซม์จะถูกออกซิไดส์ด้วย hydrogen peroxide เกิดเป็น oxidized horseradish peroxidase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สับเตรตที่เหมาะสมทำให้มีสีที่เปลี่ยนแปลงไป การเชื่อมหรือติดฉลากเอนไซม์ HRP เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้โดยอาศัย กรดอะมิโน lysine 4 ตัวที่อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์นี้

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

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

2.1.3.2.4 พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึง (Solid support)

ชุดตรวจ ELISA จะใช้การยึดตรึงหรือเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวก่อน เรียกว่า coating หรือ immobilization หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยาตามลำดับขั้นตอน แล้วอ่านผลของปฏิกิริยานั้น การใช้พื้นที่ผิวในการยึดตรึงช่วยให้ขั้นตอนล้างเอาสารเกินออกได้ดีขึ้น ทำให้ลดการเกิด background ได้ และอ่านผลของปฏิกิริยาได้สะดวกขึ้น ซึ่งรูปแบบการใช้พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึงในชุดตรวจ ELISA มีหลายแบบ ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันคือ ชนิดจานเคลือบ 96 หลุม (96-well plate) ทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็น ออร์แกนิกพอลิเมอร์ จะมีคุณสมบัติให้การโปร่งแสงที่ดี ใช้กับเครื่องอ่าน spectophptometer ได้สะดวก โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะกับชนิดจานเคลือบ 96 หลุมด้วย noncovalent binding

2.1.3.2.5 สับสเตรต (Substrate)

การวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะต้องใช้สับสเตรตเป็นตัววัด สามารถเลือกใช้ได้ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้และวิธีการตรวจวัด ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดของชุดตรวจ ELISA คือ Colorimetry, Fluorometry และ Chemiluminescence วิธีการตรวจวัดที่เป็นที่นิยมที่สุดคือ Colorimetry

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

- ATBS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียว อ่านผลที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร
- OPD (*O*-Phenylenediamine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีน้ำตาล อ่านผลที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร
- TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง อ่านผลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากเอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีการนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องมีการตรวจหาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธีต่างๆ

การใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์หาเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้างในเลือดของแกะ ด้วย C18 reversed-phase column ใช้ น้ำ, methanol และ acetronitrile (17:3:80, โดยปริมาตร) เป็นสารละลายตัวพาแล้วติดตามด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร สามารถวัดความเข้มข้นที่น้อยที่สุดได้เท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Rao และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค HPLC แล้วทำการติดตามด้วย fluorescence ด้วยการใช้ C18 reversed-phase column เช่นเดียวกัน สกัดเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วย dichloromethane โดยสารละลายตัวพาที่ใช้คือ น้ำ, acetonitrile และ triethylamine (80:19:1) โดยปริมาตร และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.48 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Garcia-Ovando และคณะ, 2000)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการเตรียมชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน และสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากสามารถตรวจติดตามสารตกค้างในปริมาณน้อยได้ดี Watanabe และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน โดยเชื่อมเอนโรฟลอกซาซินกับ HSA (human serum albumin) แล้วฉีดเข้าหนู BALB/c หลังจากนั้นนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งไมอีโลมา P3X63Ag8U แล้วนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) กราฟมาตรฐานที่ได้อยู่ในช่วง 0.1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่วัดได้ในตัวอย่างตับและกล้ามเนื้อไก่เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อกรัม และในน้ำนมโคเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งรายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินด้วยเทคนิค ELISA

ต่อมา Bucknall และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน และฟลูออโรควิโนโลน คือ นอร์ฟลอกซาซิน เอนโรฟลอกซาซิน ซิโพรฟลอกซาซิน ฟลูเมควิน และกรดนาลิดิซิก โดยเชื่อมสารต่างๆ กับ ovalbumin แล้วฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแกะ จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจ โดยให้ค่า detection limit ต่อเอนโรฟลอกซาซิน, ซิโพรฟลอกซาซิน, ฟลูเมควิน และกรดนาลิดิซิก เท่ากับ 3.1, 6, 4 และ 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบกับเอนโรฟลอกซาซิน 69.8% และ นอร์ฟลอกซาซินเท่ากับ 44.6% และนำมาทดสอบในตัวอย่างน้ำนมโค และไตของแกะ มีความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่วัดได้ เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน ด้วยการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c ด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ KLH (keyhole limpet haemocyanin) นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาเตรียมชุดตรวจสอบต่อสารในกลุ่มควิโนโลน โดยใช้เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารมาตรฐานในชุดตรวจสอบ มีค่า LOD เท่ากับ 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าปฏิกิริยาข้ามต่อ นอร์ฟลอกซาซิน และซิโพรฟลอกซาซิน 100% นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มควิโนโลน (Kato และคณะ, 2007)

ในการตรวจวัดการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินพบว่า นิยมตรวจติดตามโดยใช้เทคนิค HPLC-UV หรือ HPLC-FI และเทคนิค ELISA เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค ELISA กับเทคนิคทางเคมี เทคนิค ELISA มีความไวสูง ให้ผลตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีการผลิตชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินโดยใช้หลักการ ELISA ออกมาจำนวนมาก ซึ่งในประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาจำหน่าย มีชื่อทางการค้าว่า EURO-DIAGNOSTICA ผลิตโดยบริษัท Euro-Diagnostica B.V. (Netherland) สามารถตรวจติดตาม เอนโรฟลอกซาซินในเนื้อ ตับ ไต อาหารสัตว์ น้ำนม ไข่ ปัสสาวะ และซีรัม โดยพบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ในกล้ามเนื้ออยู่ที่ 7 นาโนกรัมต่อกรัม และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน คือ ซิโพรฟลอกซาซิน เท่ากับ 0.003%, เบโนฟลอกซาซิน เท่ากับ 0.008%, โอฟลอกซาซิน เท่ากับ 0.16%, ดาโนฟลอกซาซิน เท่ากับ 0.04%, 1-เอธิลพิเพราซิน เท่ากับ 0.45%, 1-เมธิลพิเพราซิน เท่ากับ 0.15% ส่วน พิเพราซิน, นอร์ฟลอกซาซิน และออบิฟลอกซาซิน ให้ค่าน้อยกว่า 0.001%

จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าการตรวจหาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินด้วยหลักการ ELISA เป็นเทคนิคที่ให้ความไวและจำเพาะสูง สามารถตรวจติดตามสารตกค้างในปริมาณน้อยได้ดี รวมทั้งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว มีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำ และทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยของคุณมนัสพงศ์ ชูศรี (2549) ที่มีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินสูง จากการกระตุ้นหนูด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมกับ BSA (bovine serum albumin) โดยแอนติบอดีที่ได้สามารถวัดปริมาณเอนโรฟลอกซาซินได้ต่ำสุด (lower limit of detection; LOD) เท่ากับ 0.0014 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นๆ ในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน โมโนโคนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น IgG1 จึงนำมาเตรียมชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินด้วยเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เซลล์ไลน์	
เซลล์ไฮบริโดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน (ENRO#44)	หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
2. เครื่องมือ	
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ(Inverted microscope) รุ่น TMS	บริษัท Nikon Corporation, Japan
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator)	บริษัท D.S.C. group Co.,Ltd, Taiwan
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	บริษัท Corning, USA
- เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-S และ รุ่น AG204	บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy™ HT	บริษัท BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy	บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35	บริษัท บริษัท M.S.E. LTD, England
- เครื่อง Microtiterplate reader	บริษัท Titertek multiskan, Finland
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Yamato Scientific Co.,Ltd., Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-124	บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
- ปิเปตต์อัตโนมัติ	บริษัท Gilson, France
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	บริษัท Memmert, Germany

3. อุปกรณ์ต่างๆ	
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	บริษัท Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	บริษัท Boro, Germany
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc, Denmark
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	บริษัท Nipro, Thailand
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	บริษัท Nunc, Denmark
- ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน (Spinner culture vessel and biological stirrer) ขนาด 250 มิลลิลิตร	บริษัท Techne, USA
- ปิเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	บริษัท HBG, Germany
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	บริษัท Axygen, USA
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc, Denmark

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
1.Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide	เชื่อมต่อกับแอนติบอดี	บริษัท Zymed, USA
2. AHD (1-Aminohydantoin)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. AOZ (3-amino-2-oxazolidone)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. APS (Ammoniumpersulfate)	เตรียมเจลในเทคนิค SDSPAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
5. BCA protein assay kit	หาปริมาณโปรตีน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
6. Bipemidic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
7. Bovine serum albumin	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมกับเอนโรฟลอกซาซิน	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
8. Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
9. Chloramphenicol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
10. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
11. Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
12. Cinoxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
13. Ciprofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Siam pharmaceutical, ไทย
14. Coomassie Brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	บริษัท Pierce, USA

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
15. Dimethyl sulfoxide	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	บริษัท Fluka, Switzerland
16. Disodium hydrogenphosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carloerba, USA
17. 1-ethy-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide (EDC)	สารเชื่อมต่อ	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
18. Enrofloxacin	เป็นแฮบเทนและทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
19. Fetal bovine serum	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
20. Furazolidone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
21. Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	บริษัท Fluka, Switzerland
22. L-glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
23. Methanol	ตัวทำละลาย	บริษัท BDH, England
24. N-Hydroxysuccinimide (NHS)	สารเชื่อมต่อ	บริษัท Fluka, china
25. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
26. Nalidixic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
27. Ofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
28. *O*-phenylenediamine	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
29. Oxytetracycline	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
30. Oxolinic acid	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
31. Penicllin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
32. Peroxidase-Goat Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	บริษัท Zymed, USA
33. RPMI 1640 medium	อาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromex, USA
34. Sodium bicarbonate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
35. Sodium cabonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Merck, Germany
36. Sodium chloride	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck, Germany
37. Sodium dihydrogen phosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Carlo erba, USA
38. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDSPAGE	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
39. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck, Germany
40. Streptomycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
41. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
42. Sulfamethazine	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
43. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	บริษัท Merck, Germany
44. Tetracyclin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
45. TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
46. Tween 20	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
47. นมพร่องมันเนย	ทดสอบ ELISA	บริษัท Mission health food, Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน มีรหัสไฮบริโดมา enro#44 ออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมด จึงถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการถ่ายเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด

3.3.1.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาอย่างถาวร

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ขณะเย็น ลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ ถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่ง DMSO ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกอันจะส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายระหว่างการแช่เย็น

3.3.1.3 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมา enro#44 ที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการย้ายเซลล์ลงสู่ spinner flask ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3.1.4 การเชื่อมต่อเอนโรฟลอกซาซินกับ BSA (Watanabe และคณะ, 2002)

ในการเชื่อมต่อเอนโรฟลอกซาซินกับ BSA ทำการเชื่อมต่อโดยใช้วิธี NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำเอนโรฟลอกซาซิน 20 มิลลิกรัม, NHS 10 มิลลิกรัม และ EDC 12.5 มิลลิกรัม ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA 50 มิลลิกรัม ใน 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปทีละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.3.1.5 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมาได้จำนวนมาก และได้แอนติบอดีที่ปริมาณมาก นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน ด้วยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซินเชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (PBST) 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดรมา enro#44 เจือจางที่ความเข้มข้น 1:100-1:64,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน 0.15 M phosphate citrate buffer, pH 5.0 หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.3.1 การทำแอนติบอดีให้เข้มข้น

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากไฮบริโดมาโคลน enro#44 เป็นแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์เป็น IgG1 ซึ่งเป็นไอโซไทป์ที่จับกับ protein A ได้น้อยกว่าไอโซไทป์อื่น จึงต้องมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ลงไปเพื่อเพิ่มความสามารถในการจับระหว่าง protein A กับแอนติบอดี ดังนั้นจึงต้องทำการลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อน ด้วยการทำ ultrafiltration ให้อาหารเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น และมีปริมาตรลดลง จากนั้นจึงทำการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 M และนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี Protein A affinity chromatography

protein A สามารถทำอันตรกิริยากับแอนติบอดีได้ ซึ่งอาศัยหลักการของ affinity chromatography โดย protein A มีอันตรกิริยากับแอนติบอดีสูงที่ pH 9.0 และอันตรกิริยาจะต่ำลงเมื่อ pH 3.5 ทำให้แยกแอนติบอดีออกจากโปรตีนอื่นๆ ได้โดยวิธีการดังนี้

นำ protein A มาทำให้พองตัว โดยการแช่ใน PBS 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมใส่คอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer,pH 8 ลงในคอลัมน์ protein A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ pH 8 โดยใช้บัฟเฟอร์ 1 M Tris, pH 9 ก่อนนำมาเติมลงในคอลัมน์ protein A โดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 9 ลงในคอลัมน์protein A ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ protein A โดยการเติม 0.1 M citrate buffer, pH 3.5 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 4 M Tris ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ protein A โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำสารละลายในหลอดทดลองที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงมารวมกันก่อนนำไปไดแอไลซ์ใน PBS โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง

3.3.3.3 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

หาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ไดแอไลซ์แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

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

หมายเหตุ ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35

3.3.3.4 การวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีด้วยวิธี BCA

ทำการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีด้วยการใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE โดยเตรียม Working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับรีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA เจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (แอนติบอดีทั้งก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ซึ่งสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.3.5 การหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการทดสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีหลักการคือ ใช้สนามไฟฟ้าแยกโปรตีนผ่าน polyacrylamide ซึ่งมีรูพรุนขนาดต่างๆ กัน เป็นผลให้เกิด sieving properties โดยโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับ 2-Mecaptoethanol (2-ME) ทำให้พันธะไดซัลไฟด์แตกออก และโปรตีนถูกทำให้มีประจุเป็นลบโดย SDS ทำให้โปรตีนที่มีขนาดต่างกัน (หรืออีกนัยหนึ่งคนละชนิดกัน) จะมีการเคลื่อนตัวที่ไม่เท่ากัน ตัวเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลกว่า เมื่อทำ

electrophoresis เสร็จแล้วจะนำเจลมาย้อมสีหาแถบโปรตีน เมื่อทำเทียบกับโปรตีนที่รู้ขนาดแน่นอน ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างได้ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสายพอลิเปปไทด์ของแอนติบอดีที่ได้

การเตรียมเจล เตรียม 10% separating gel (แสดงในภาคผนวก ข) ด้วย Miniprotean II Dual Slab Cell Bio-Radโดยมีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร เติมน้ำสเตอไรด์ ข้างละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ separating gel เกิด polymerization อย่างสมบูรณ์ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วเท 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel ตั้งทิ้งไว้ให้ stacking gel เกิด polymerization อย่างน้อย 30 นาที

ทำการแยกแอนติบอดีโดย นำชุดของเจลที่เตรียมได้ไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งส่วนบนและล่างของ chamber นำตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์และหลังทำให้บริสุทธิ์ มีปริมาณโปรตีนรวมหลุมละ 5 ไมโครกรัม มาเติม loading dye ที่มีร้อยละ 10 ของ beta-mercaptoethanal ในอัตราส่วน ตัวอย่าง ต่อ loading dye (1:1 (โดยปริมาตร)) นำไปต้มที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง thermo mixer compact ส่วนหลุมของ marker มีปริมาณ 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำชุดของเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งส่วนบนและล่างของ chamber เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของ 1x loading dye เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 15 นาที และล้างสีออกจนหมดด้วยสารละลาย destain

3.3.3.6 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการทำ ELISA

นำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 0-0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยวิธี Indirect ELISA (3.3.2.3) สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร (รูปที่ ก.2 ภาคผนวก ก) หาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

3.3.3.7 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จะต้องมีการทดสอบว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วย protein A แล้ว ยังมีความสามารถในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี Indirect ELISA ซึ่งในการทำ indirect ELISA ไม่สามารถเคลือบเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระบนจานชนิด 96 หลุมได้โดยตรงจะต้องใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับแบบจำเพาะกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ จึงต้องใช้หลักการแข่งจับโดยวิธี Indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เตรียมสารเอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 10^{-5} -10^{3} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับแอนติบอดีโดยผสมในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.2.3 โดยทำการเติมแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แทนอาหารเลี้ยงเซลล์

3.3.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบทั้งหมด 4 แบบ คือ

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

เตรียมชุดตรวจสอบโดยการเคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วลงบนผิวในแต่ละหลุมของจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตรแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) นี้ ต้องทำการเชื่อมต่อระหว่างเอนโรฟลอกซาซินกับเอนไซม์ hoseradish peroxidase (HRP) เพื่อใช้เป็นตัวแข่งขันกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

3.3.4.1.1 การเชื่อมต่อเอนโรฟลอกซาซินกับ เอนไซม์ hoseradish peroxidase (HRP) (Watanabe และคณะ, 2002)

นำเอนโรฟลอกซาซินกับ 3.6 มิลลิกรัม, NHS 1.8 มิลลิกรัม และ EDC 2.25 มิลลิกรัม ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ HRP 0.8 มิลลิกรัม ใน PBS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไปทีละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยวิธี Direct ELISA ในข้อ 3.3.4.1.2

3.3.4.1.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

ในการเตรียมชุดตรวจสอบจะต้องมีการหาอัตราส่วนของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่ทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมด้วยวิธี Direct ELISA ก่อนที่จะนำมาทดสอบกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วย แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร และทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST ครั้ง เติมเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000–1:12,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.4.1.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ทำการแปรความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระตั้งแต่ 10^{-5}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับแอนติบอดีและเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เลือกมาทั้ง 3 ค่า ด้วยวิธี Direct competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีเอนโรฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วนที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบแบบอื่นต่อไป

3.3.4.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เริ่มจากเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมบนจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 ไมโครลิตร กับเอนโร-ฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 25 ไมโครลิตร และแอนติบอดีหลุมละ 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBSTจำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium

citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.4.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดี และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

ทำการหาอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับHRP ที่ทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมด้วยวิธี Direct ELISA โดยเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่เจือจาง 1:500 และทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000 ถึง 1:14,000 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันกับขั้นตอน ในข้อ 3.3.4.1.2

3.3.4.2.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

การหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู จากการแปรความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระตั้งแต่ 0.025-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เลือกมาทั้ง 4 ค่า ด้วยวิธี Direct competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีเอนโรฟลอกซาซินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปหาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.3.4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

เตรียมโดยเคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม ด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3

ต้นฉบับไม่มีหน้านี้
NO THIS PAGE IN ORIGINAL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1:4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน sodium acetate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.4.4.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน (คู่มือการใช้งานสาร Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide ของบริษัท zymed)

ทำการเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน เริ่มจากนำแอนติบอดีความเข้มข้น 1,108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปไดแอไลซ์ใน 0.1 M carbonate buffer pH 8.4 ข้ามคืน แล้วทำการเติมไบโอติน 3 มิลลิกรัม ที่ละลายใน DMSO 300 ไมโครลิตร ทีละหยด กวนเบาๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วไดแอไลซ์ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 12 ชั่วโมง

3.3.4.4.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม และนำไปเตรียมชุดตรวจสอบ ทำโดยการแปรความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000 และ 1:128,000 แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Direct ELISA โดยเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวด้านในหลุมของจาน 96 หลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ลงไปที่ความเข้มข้น 1:4000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มนาน 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วล้างแต่ละ

หลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน sodium acetrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.4.4.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

นำอัตราส่วนระหว่างเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ได้จากข้อ 3.3.4.4.2 มาทดสอบกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0.5-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วน แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบในการเลือกชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.3.4.5 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

ทำการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบต่างๆ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

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

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน

3.3.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

เมื่อได้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความเหมาะสมมากที่สุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) จึงนำมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยทำการศึกษาในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เคลือบพื้นผิวของก้นหลุมของจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินซึ่งได้จากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:6,000 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.3.5.2 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRPและเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ในการเตรียมชุดตรวจสอบ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ คือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งในการปฏิบัติงานจริงจะต้องเตรียมชุดตรวจสอบให้สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จึงทำการแปรอุณภูมิและเวลาดังในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.3 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้นำไปทดสอบกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.5.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน

เพื่อทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนและนอกกลุ่มกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ทำการทดสอบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ตามวิธีในข้อ 3.3.5.1 สารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่นำมาทดสอบ ได้แก่ อีนอกซาซิน (enoxacin) ซินอกซาซิน (cinoxacin) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) กรดไบเพมิดิก (bipemidic acid) กรดออกโซลินิก (oxolinic acid) ฟลูเมควิน (flumequin) โอฟลอกซาซิน (ofloxacin) ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ส่วนสารนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ทดสอบมีดังนี้ เททราไซคลิน (tetracycline) ออกซีเททราไซคลิน (oxytetracycline) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ฟูราโซลิโดน (furazolidone) เพนิซิลลิน จี (penicillin G) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-2-oxazolido; AOZ) 1-อะมิโนไฮดาโทนิน (1-aminohydantoin; AHD) เคลนบูเทอรอล (clenbuterol) ซัลบูทามอล (salbutamol) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

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

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบต่อสารเอนโรฟลอกซาซินและทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณดังนี้

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

3.3.5.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.5.4.1 หาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

ทำการหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยรายงานเป็นค่า LOD หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of detection; LOD) และค่า LOQ (Limit of quantitation; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง ซึ่งค่า LOD และ LOQ หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือ ค่าความไวของชุดตรวจสอบ จากข้อมูลในการทดลองที่ 3.3.5.1 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน และแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$

$$LOD = B_0 - 3SD$$

$$LOQ = B_0 - 10SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.3.5.4.2 การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ

3.3.5.4.2.1 Intra-variation assay (ธารารัชต์, 2545)

จากการทดลองในขั้นตอน 3.3.5.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Intra-variation assay ของชุดตรวจสอบโดยทำการหาค่า Mean SD และ %CV ของ 12 ซ้ำนั้น

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

โดยที่ mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) เมื่อมีเอนโรฟลอกซาซินและไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

%CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งคำนวณได้จาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.5.4.2.2 Inter-variation assay หรือ Between-assay (ธารารัชต์, 2545)

ทำการทดลองเหมือนในขั้นตอน 3.3.6.1 แต่ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน 4 ครั้งที่เวลาต่างกันโดยที่แต่ละครั้งทำ 12 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 48 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Mean, SD และ %CV ของทั้ง 48 ซ้ำนั้น

3.3.5.4.2.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

โดยดูความถูกต้องของชุดตรวจสอบด้วยการหาค่า %Recovery นำตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่มีการเติมเอนโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการสกัดตามขั้นตอน 3.3.6 มาทำการหาค่า %Recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเอนโรฟลอกซาซินจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

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

3.3.5.5 การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.5.5.1 การสกัดที่เหมาะสมในตัวอย่างเนื้อไก่

นำเนื้อไก่มาบดให้ละเอียด แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม จำนวน 5 หลอด จากนั้นทำการเติมเอนโรฟลอกซาซินในแต่ละหลอดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นเติมเมธานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วนต่างๆ คือ 70:30 (วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของ Maxsignal™) และ 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร(วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของ EURO-DIAGNOSTICA) หลอดละ 4 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ แล้วทำการเปรียบเทียบหาความถูกต้องของปริมาณเอนโรฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้ในแต่ละวิธีตามขั้นตอนในข้อ 3.3.5.4.3 ต่อไป

3.3.5.5.2 การสกัดน้ำนมโคด้วยวิธีที่เหมาะสม

ทำการทดลองโดยนำน้ำนมโคปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด แล้วเติมเอนโรฟลอกซาซินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นชั้นไขมัน และนำส่วนที่เหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยสารละลายต่างๆ คือ PBS, เอธานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของ Maxsignal™) และเมธานอลที่ผสมกับ PBS 8:92 โดยปริมาตร (วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของ EURO-DIAGNOSTICA) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ได้ของสารละลายต่างๆ ด้วยขั้นตอนในข้อ 3.3.5.4.2.3 เช่นเดียวกันกับในตัวอย่างเนื้อไก่ เพื่อใช้เป็นวิธีสกัดในตัวอย่างน้ำนมโคของชุดตรวจสอบต่อไป

3.3.5.5.3 การสกัดที่เหมาะสมในตัวอย่างปัสสาวะโค

ทำการทดลองโดยเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.3.6.5.2 แต่เปลี่ยนจากน้ำนมโคเป็นปัสสาวะโคในการทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.5.5.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อชุดตรวจสอบต้นแบบ

นำตัวทำละลายที่เหมาะสมจากการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค ในข้อ 3.3.6.5.1 และ 3.3.6.5.2 มาเขียนกราฟข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน และ แกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง

3.3.6.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่เพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

เตรียมสารละลายเอนโรฟลอกซาซินในเมธานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 400, 800, 2000, 4000 และ 8000 นาโนกรัม แล้วทำการเติมลงในเนื้อไก่ที่บดละเอียด 1 กรัม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังนั้นเอนโรฟลอกซาซินในแต่ละหลอดจะมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง เมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วย PBS 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.6.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการเตรียมสารละลายเอนโรฟลอกซาซินในเมธานอลที่ความเข้มข้น 100, 200, 500, 1000 และ 2000 นาโนกรัม เติมสารละลายเอนโรฟลอกซาซินแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในน้ำนมโคปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังนั้นตัวอย่างน้ำนมโค 1 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนบนที่เป็นชั้นไขมันทิ้งไป และนำส่วนที่เหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอธานอล กับ PBS ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.6.3 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะโคเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

เตรียมสารละลายเอนโรฟลอกซาซินเช่นเดียวกันกับในข้อ 3.3.6.2 และเติมสารละลายเอนโรฟลอกซาซินแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในปัสสาวะโคปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังนั้นในตัวอย่างปัสสาวะโคจะมีความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน เท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.7 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค HPLC

3.3.7.1 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบทางการค้า

นำตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 25, 50, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนในตัวอย่างน้ำนม และปัสสาวะโคเติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 10, 50, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันทั้งหมด แล้วแบ่งวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสอง ซึ่งขั้นตอนและการเตรียมตัวอย่างของชุดตรวจสอบต้นแบบทำตามขั้นตอนในข้อ 3.3.5.1 และ 3.3.6 ตามลำดับ ส่วนชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ขั้นตอนในการวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของคู่มือการใช้งาน ดังต่อไปนี้

3.3.7.1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

เริ่มจากเติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมของจาน 96 หลุม ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของกระต่ายที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู จากนั้นเติมแอนติบอดี ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย ringing buffer 3 ครั้ง เติมสับสเตรต ของเอนไซม์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย stop solution นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.7.1.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ในชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

ชั่งเนื้อไก่ที่บดละเอียด 0.5 กรัม เติมสารละลายผสมระหว่าง เมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และนำส่วนใส 900 ไมโครลิตร เจือจางด้วย PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

3.3.7.1.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมและปัสสาวะโคในชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

นำน้ำนม และปัสสาวะโค ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 4.5 มิลลิลิตร ของตัวละลายผสมระหว่าง เมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบกับชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

3.3.7.2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค ที่มีความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน เท่ากับ 0, 50, 80, 100, 200 และ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาแบ่งวิเคราะห์ในชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18-reverse phrase มีสารละลายน้ำ acetronitrile และ triethylamine ในอัตราส่วน 80:19:1 โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา โดยกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลด้วย UV ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างเข้าสู่ระบบ ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ซึ่งเอนโรฟลอกซาซินมี retention time ประมาณ 8 นาที นำผลวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ได้เทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินที่ละลายใน 0.1 M NaOH ความเข้มข้น 0, 62.5, 125, 250 และ 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก รูปที่ ก.11) ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างของชุดตรวจสอบต้นแบบทำตามขั้นตอนในข้อ 3.3.5.1 และ 3.3.6 ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

3.3.7.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อไก่ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Garcia-Ovando และคณะ, 2000)

นำตัวอย่างเนื้อไก่ 1 กรัม เติม 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 และ dichloromethane ปริมาตร 4 และ 8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นของ dichloromethane ทำการสกัดอีกครั้งด้วย dichloromethane ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำชั้นของ dichloromethane ที่ได้มารวมกัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อระเหย dichloromethane ออกไป จากนั้นนำสารละลายตัวพาปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาละลายส่วนที่เหลือ แล้วจึงนำไปทดสอบกับ HPLC

3.3.7.2.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโคในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Tyczkowska และคณะ, 1994)

นำตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาเติมลงใน 500 ไมโครลิตร ของสารละลายผสมระหว่าง 0.1 M NaOH กับ acetronitrile ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ ไปทดสอบกับ HPLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อผลิตแอนติบอดี

ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน enro#44 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FCS 10 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงเมื่อเทียบกับซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้นและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้ผ่านการเลี้ยงที่ใช้เป็นตัวควบคุมลบ และมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซินซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมบวก แสดงว่าเซลล์ไฮบริโดมายังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินจากเซลล์ไฮบริโดรมาด้วยวิธี Indirect ELISA

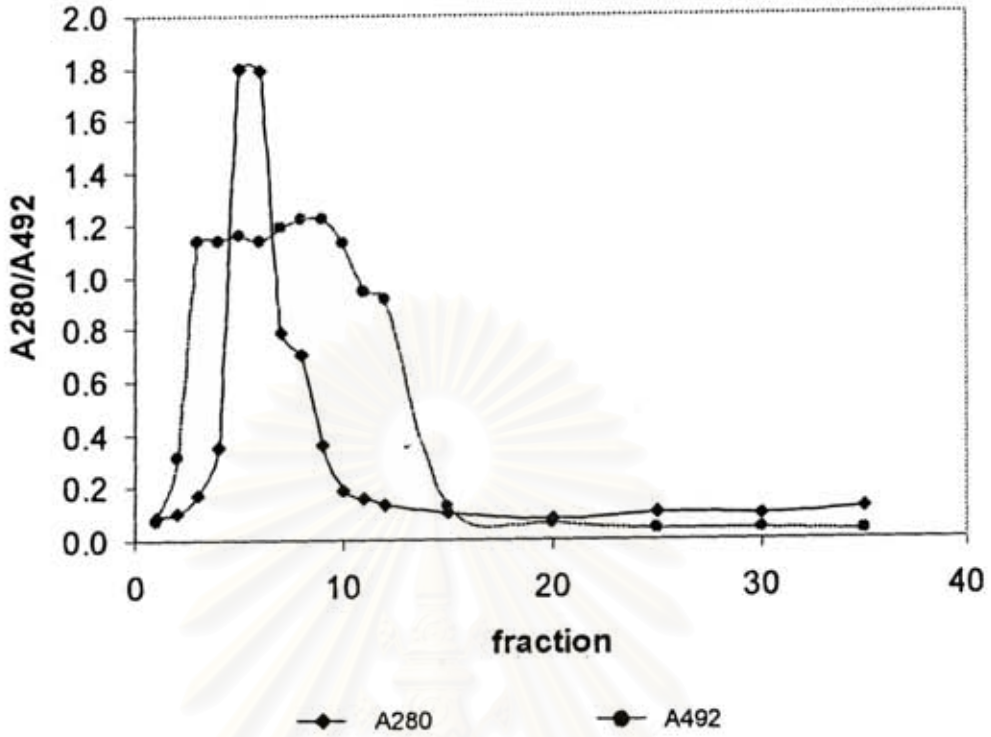
สิ่งทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร	
1. อาหารเลี้ยงเซลล์ enro#44		
เจือจาง 1:100	1.935	2.248
เจือจาง 1:200	1.625	1. 815
เจือจาง 1:400	1.455	1.755
เจือจาง 1:800	0.692	0.737
เจือจาง 1:1,600	0.304	0.375
เจือจาง 1:3,200	0.178	0.196
เจือจาง 1:6,400	0.109	0.113
2. ซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น	0.095	0.097
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI-1640)	0.051	0.048
4. ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน	2.081	1.878

4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.2.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ Protein A affinity column chromatography

นำเซลล์ไฮบริโดมา enro#44 มาเพิ่มจำนวน และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ Protein A affinity column chromatography ซึ่งแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดรมามีไอโซไทป์เป็น IgG1 จึงมีอันตรกิริยาสูงต่อ protein A ที่ pH 9 และความเข้มข้นเกลือ 4 โมลาร์ โดยที่โปรตีน และสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่จับกับ protein A แต่ที่ค่า pH ต่ำลงอันตรกิริยาของแอนติบอดีต่อ protein A จะลดลงซึ่งที่ค่า pH 3.5 นั้นแอนติบอดีทั้งหมดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ protein A ทำให้สามารถแยกแอนติบอดีออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ หลังจากนั้นจึงนำบัฟเฟอร์และแอนติบอดีที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 4.1) จากการทดลองพบว่า จะมีโปรตีนถูกชะออกมาในหลอดทดลองที่ 3 ถึง 12 และจากการทดสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกัน โดยตรวจพบแอนติบอดี ในหลอดที่ 3 ถึง 12 จึงได้นำแอนติบอดีจากหลอดทดลองดังกล่าวมารวมกัน เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีและโปรตีนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ protein A sepharose

4.2.2 การวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี

วัดปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่เก็บได้ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 3.3.3 ด้วยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.1 ในภาคผนวก ก) พบว่าปริมาณโปรตีน ของอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดรมา enro#44 ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีนอยู่ที่ 5,178 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณโปรตีนเป็น 1,109 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 4.2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างแอนติบอดีที่ผลิตได้ ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์

	อัตราการเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
แอนติบอดีก่อนผ่านการทำ	1:10	0.580	4,571
ให้บริสุทธิ์	1:20	0.379	5,785
		เฉลี่ย	**5,718**
แอนติบอดีหลังผ่านการทำ	1:5	0.360	1,367
ให้บริสุทธิ์	1:10	0.134	850
		เฉลี่ย	**1,109**

4.2.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

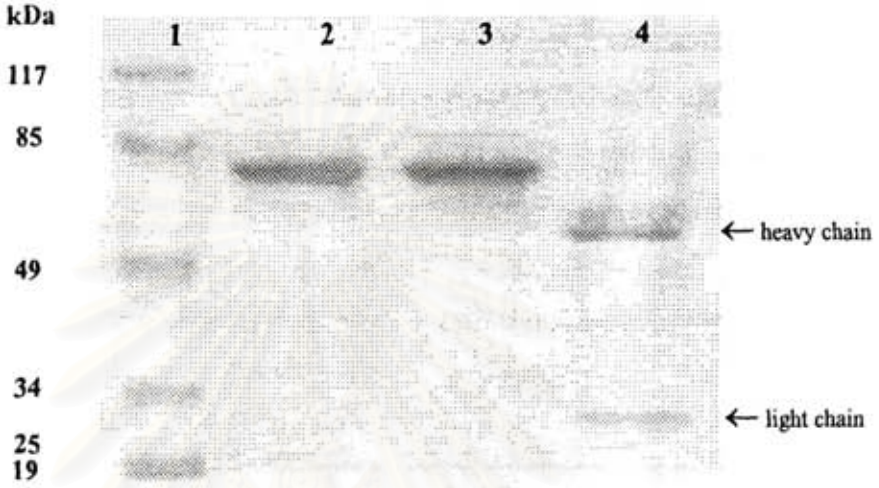
เมื่อนำแอนติบอดีมาหาปริมาณด้วยวิธี Indirect ELISA จากตารางที่ 4.3 แสดงผลการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.2 ในภาคผนวก ก) พบว่าปริมาณแอนติบอดีของอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดรมา enro#44 เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.097 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (%purity) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน (ตารางที่ 4.2) ได้เป็น 99.0%

ตารางที่ 4.3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของแอนติบอดี

	ปริมาณโปรตีน (BCA assay)		ปริมาณแอนติบอดี (ELISA)		% recovery	% purity
	mg/ml	Total(mg)	mg/ml	Total (mg)		
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	5.178	4.66×10^3	0.089	80.1	-	1.7%
หลังทำให้บริสุทธิ์	1.109	11.634	1.097	11.518	14.3%	99.0%

4.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย protein A แล้ว มาวิเคราะห์แถบโปรตีนเพื่อยืนยันความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 4.2 แถบของแอนติบอดี ก่อน และหลังการทำให้บริสุทธิ์
ด้วยเทคนิค SDS-PAGE
Lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน
Lane 2 คือ ซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดี
Lane 3 คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ ก่อนทำให้บริสุทธิ์ที่มี 10% FCS
Lane 4 คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์

จากการผลการทดลองพบว่าในตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์จะปรากฏแถบของโปรตีนอย่างชัดเจนที่บริเวณ 80 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (lane 2) เหมือนกันแถบโปรตีนของซีรัมที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ (lane 3) แต่หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะปรากฏแถบของโปรตีนชัดเจนที่บริเวณขนาด 69 และ 26 กิโลดาลตัน เท่านั้น ซึ่งคาดว่าเป็นแถบโปรตีนของสาย heavy chain และ light chain ของแอนติบอดี ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก วิธี SDS-PAGE นี้จะมีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วนของ heavy chain และ light chain แยกออกจากกัน และไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่บริเวณอื่น แสดงว่าแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง

4.2.5 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อเอนโรฟลอกซาซิน ในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์แล้วทำการทดสอบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินอยู่หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA จากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-5}–10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงเมื่อมีปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระต่ำ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แสดงว่า แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

สิ่งทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร
1.เอนโรฟลอกซาซินที่ใช้แข่งขัน (ng/ml)	
0	1.117
0.00001	1.089
0.0001	1.085
0.001	0.786
0.01	0.611
0.1	0.474
1	0.301
10	0.282
100	0.154
1000	0.088
2. ซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น	0.052
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI-1640)	0.046
4. ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอนโรฟลอกซาซิน	1.089

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.3.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

4.3.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

ทำการหาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เหมาะสม โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในช่วง 0.1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP อยู่ในช่วง 1:1,000–1:12,000 โดยมีเกณฑ์การกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ประมาณ 1 (ดังแสดงในตารางที่ 4.5) พบว่าปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากันได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 1 มีอยู่หลายความเข้มข้นด้วยกัน โดยแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม และเลือกความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:4,000 1:6,000 และ 1:8,000 เพื่อนำไปใช้ในการหาความไวต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระต่อไป

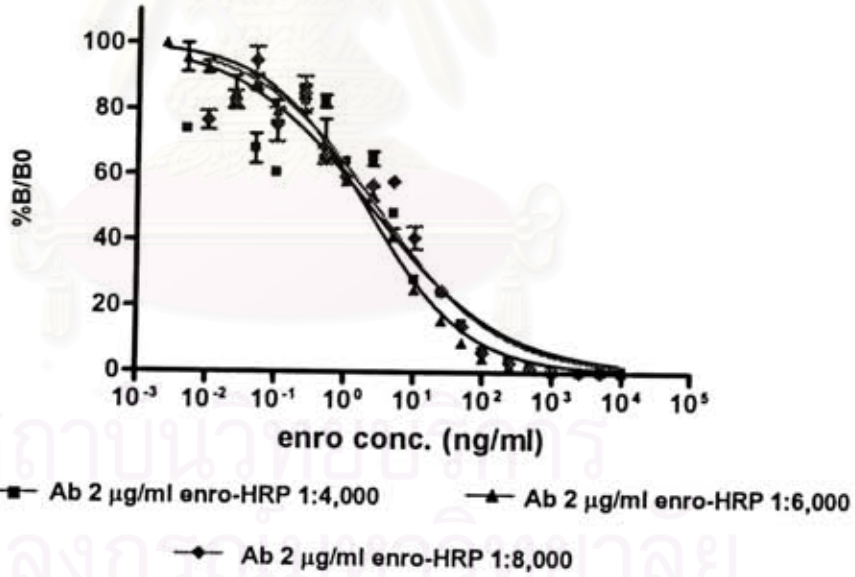
ตารางที่ 4.5 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

enro-HRP (เจือจาง)	ความเข้มเข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	0.1	1	2	3	4	5
1:1,000	0.188	0.116	0.433	1.946	2.432	2.663	2.619
1:2,000	0.131	0.092	0.373	1.607	2.178	2.377	2.242
1:4,000	0.076	0.068	0.317	**1.568**	1.952	2.138	2.168
1:6,000	0.061	0.067	0.244	**1.233**	1.650	1.834	1.932
1:8,000	0.057	0.064	0.124	**1.103**	1.413	1.620	1.623
1:10,000	0.054	0.053	0.190	0.975	1.219	1.476	1.495
1:12,000	0.049	0.053	0.180	0.872	1.182	1.226	1.391

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.1.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ทำการทดสอบหาความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ แอนติบอดีที่เคลือบหลุม และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่หาได้ จากข้อ 4.3.1.1 และแปรปริมาณเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระที่มาแข่งขันการจับในช่วง 10^{-3}-10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในการวิเคราะห์ จะนำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B ต่อ B_0 โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีเอนโรฟลอกซาซินอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน จากนั้นทำการหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินอิสระที่ให้ค่า $\%B/B_0$ เท่ากับ 50% จากการทดลอง พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:4,000 1:6,000 และ 1:8,000 จะให้ลักษณะของกราฟและความชันใกล้เคียงกัน โดยมี ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.31, 1.99 และ 2.86 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้จากทั้ง 3 ภาวะ พบว่า เมื่อใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:6,000 จะให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การตรวจมีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

4.3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

4.3.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP

ทำการหาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP โดยวิธี direct ELISA ซึ่งในการทดลองนี้จะแตกต่างจากการทดลองในข้อ 4.3.1.1 โดยจะมี การเคลือบพื้นที่ผิวในหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู (เจือจาง 1:500) ก่อน แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000 ถึง 1:14,000 พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 4 อัตราส่วน คือ แอนติบอดี 2 ไมโครกรัม กับ เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจาง 1:1,000 และ 1:2,000 แอนติบอดี 4 ไมโครกรัม กับ เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจาง 1:1,000 และ 1:2,000 ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

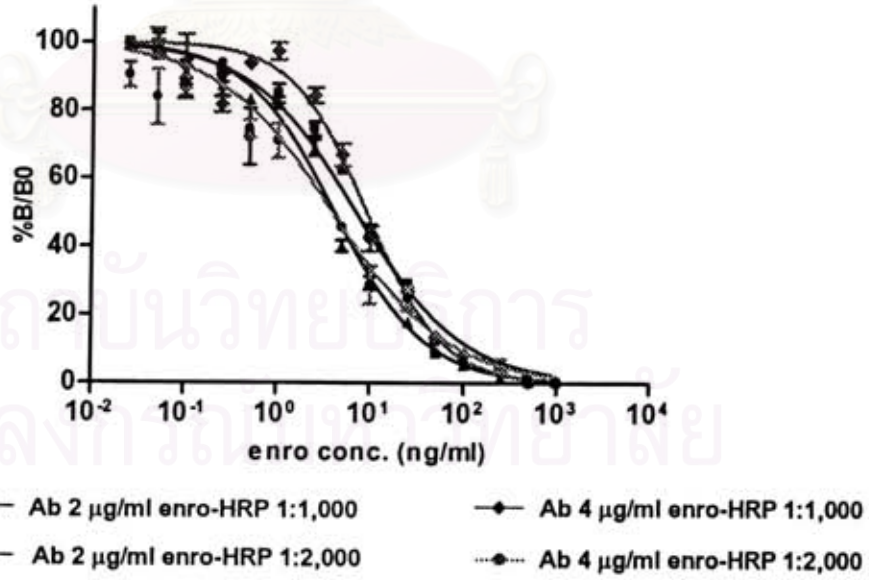
ตารางที่ 4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

enro-HRP	ความเข้มเข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0	2	4	6	8	10
1:1,000	0.098	**0.942**	**1.232**	1.332	1.260	1.189
1:2,000	0.089	**0.877**	**0.962**	0.872	0.780	0.751
1:4,000	0.044	0.647	0.619	0.544	0.484	0.414
1:6,000	0.055	0.417	0.380	0.309	0.270	0.235
1:8,000	0.078	0.369	0.320	0.266	0.244	0.205
1:10,000	0.065	0.311	0.290	0.228	0.203	0.180
1:12,000	0.047	0.238	0.200	0.175	0.170	0.145

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.2.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ทำการทดสอบหาความสามารถในการจับของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระด้วยวิธี competitive ELISA โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP 4 อัตราส่วน (จาก 4.3.2.1) แล้วแปรความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0.025-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลในรูปของอัตราส่วนระหว่าง B/B_0 ดังแสดงในรูป 4.4 จากการคำนวณหาค่า IC_{50} ของแต่ละอัตราส่วน พบว่าในภาวะที่ใช้ โดยแอนติบอดี 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000 และ 1:2,000 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 6.96 และ 4.09 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในภาวะที่ใช้แอนติบอดี 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000 และ 1:2,000 จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 9.07 และ 3.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นอัตราส่วนที่ให้ความไวมากที่สุดคือ แอนติบอดี 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:2,000 นอกจากนี้ ยังพบว่า ในภาวะที่ใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่มีความเข้มข้นต่ำจะให้ความไวที่สูงกว่าภาวะที่ใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่มีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก มีปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เหลือจากการจับอยู่มากเกินไป ทำให้ส่วนที่เหลือนี้ไปจับกับแอนติบอดีได้มาก ส่งผลให้เห็นความแตกต่างในการแข่งขันได้น้อยลง



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

4.3.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA สำหรับวิธี Indirect ELISA โดยการเลือกอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 พบว่าสามารถเลือกได้ 3 อัตราส่วน คือ ภาวะที่ใช้ แอนติบอดี 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภาวะที่ใช้แอนติบอดี 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดี 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7) ดังนั้นจึงได้นำอัตราส่วนทั้ง 3 นี้ไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระต่อไป

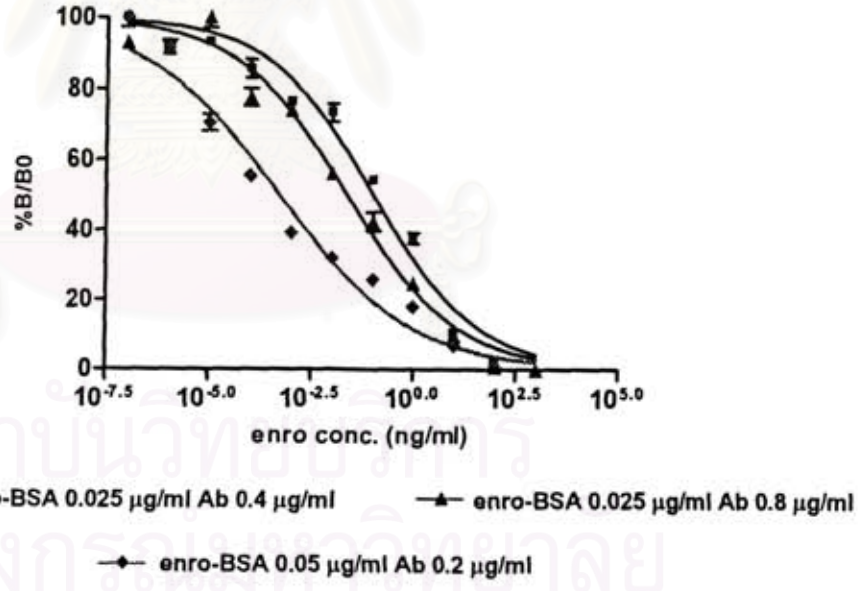
ตารางที่ 4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ enro-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0.01	0.025	0.05	0.1
0.1	0.208	0.642	0.887	1.030
0.2	0.554	0.788	**1.115**	1.369
0.4	0.645	**0.906**	1.342	1.646
0.8	0.657	**0.932**	1.438	1.741
1.6	0.704	1.020	1.456	1.944

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.3.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

หลังจากหาอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA เลือกมาทั้งหมด 3 อัตราส่วน แล้วนำไปทดสอบกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10^{-5} -10^{4} นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดี 0.4 และ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.10 และ 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อให้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดี 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-3}$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ให้ความไวมากที่สุด เนื่องจากเมื่อทำการเคลือบหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA แล้วเติมแอนติบอดีลงไปพร้อมกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ โอกาสที่แอนติบอดีจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระนั้น มีมากกว่าแอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของหลุม ซึ่งอัตราส่วนนี้มีปริมาณของแอนติบอดีน้อยกว่าอัตราส่วนอื่น จึงไปจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้หมด ไม่เหลือแอนติบอดีไปจับกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA จึงทำให้มีความไวมากที่สุด



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ BSA ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

4.3.4.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมตามขั้นตอนในข้อ 3.3 โดยทำการแปรความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.01-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:2,000-1:128,000 พบว่าสามารถเลือกอัตราส่วนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทั้งหมดได้ 3 อัตราส่วน คือ เมื่อใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.05, 0.01 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 1:4,000 1:8,000 และ 1:16,000 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) และเมื่อนำแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบโดยไม่มีการเคลือบหลุมด้วยเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าต่ำซึ่งเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินจะจับกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA เท่านั้น

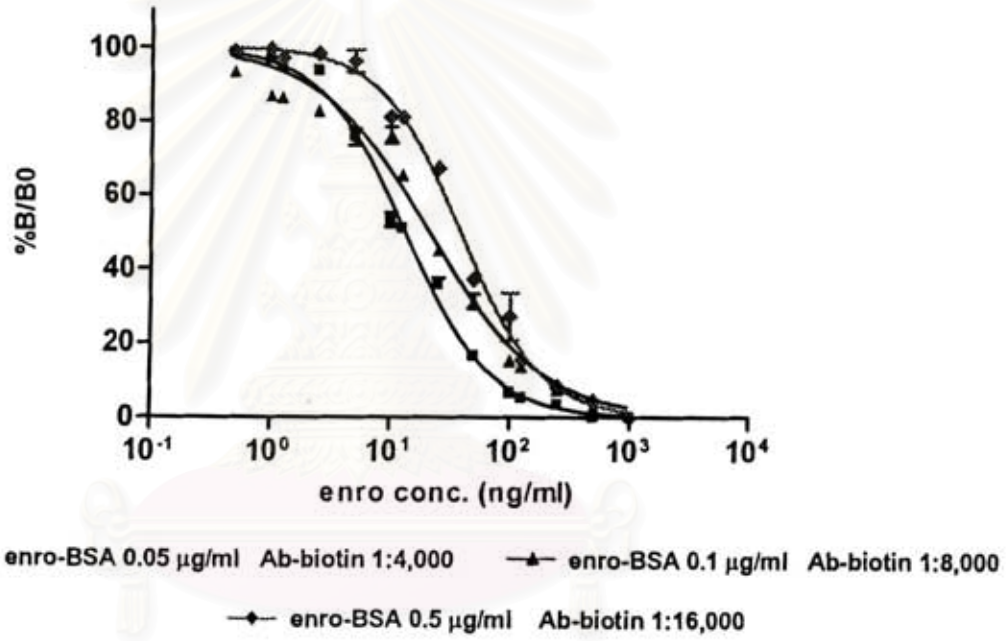
ตารางที่ 4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน	ความเข้มข้นของ enro-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5
1:2,000	0.112	0.452	0.878	1.732	2.547	2.806
1:4,000	0.079	0.316	0.581	**1.131**	2.108	2.669
1:8,000	0.054	0.155	0.289	0.537	**1.094**	2.240
1:16,000	0.048	0.146	0.263	0.509	0.838	**1.552**
1:32,000	0.044	0.113	0.159	0.302	0.479	0.806
1:64,000	0.045	0.055	0.063	0.099	0.160	0.332
1:128,000	0.044	0.054	0.089	0.094	0.139	0.196

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

4.3.4.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

เมื่อนำอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินกับแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ได้จากข้อ 4.3.4.1 มาใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.05, 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:4,000, 1:8,000 และ 1:16,000 จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 12.56, 20.65 และ 37.78 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.6 โดยอัตราส่วนที่ให้ความไวต่อเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระมากที่สุดคือ ภาวะที่ใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:4,000



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวของอัตราส่วนระหว่างเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) และแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) เป็นชุดตรวจสอบที่นิยมใช้ทั่วไปในการตรวจวัดการตกค้างของสาร แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้เตรียมชุดตรวจสอบเพิ่มขึ้นอีก 2 แบบ คือ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู และ Direct competitive ELISA (Ab captured) ซึ่งชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูนี้ จะเหมือนกันกับชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) เพียงแต่มีการใช้แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูในการเคลือบหลุมก่อนเท่านั้น โดยคาดว่าเมื่อใช้แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูเคลือบหลุมก่อนเพื่อให้ส่วน Fc ของแอนติบอดีจับกับส่วนของ Fab ของแอนติบอดีของแพะ ส่งผลให้ส่วน Fab ของแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนได้มากขึ้น ทำให้ชุดตรวจสอบที่ได้มีความไวสูงมากขึ้น (Schneider และ Hammock, 1992) ส่วนชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) จะมีการเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน ซึ่งเป็นการตรวจวัดอีกระบบหนึ่ง เนื่องจากไบโอตินมี multiple binding site ซึ่งไบโอติน 1 โมเลกุล จับกับ streptavidin ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ ได้ 4 โมเลกุล ทำให้มีความแรงของสัญญาณในการวัดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ทำให้มีความไวสูงขึ้น (Diamandis และ Christopoulos, 1991)

จากการทดสอบชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบ ในงานวิจัยนี้พบว่าชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) เป็นชุดตรวจสอบที่มีความไวมากที่สุด รองลงมาคือ Direct competitive ELISA (Ag captured), Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู และ Direct competitive ELISA (Ab captured) ตามลำดับ

จากผลการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู พบว่ามีความไวน้อยกว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่ใช้เคลือบหลุมนั้น ใช้ส่วนของ Fab ไปในการยึดติดกับพื้นผิว ทำให้เหลือส่วนของ Fab น้อย ทำให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินซึ่งจะจับ Fab สามารถจับได้ในปริมาณที่ลดลง ดังนั้นในการที่จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าประมาณ 1 จึงต้องใช้เอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น (1:1,000-1:2,000) ทำให้ความสามารถในการแข่งขันการจับของเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระลดลง จึงส่งผลให้ระบบของ ELISA นี้มีความไวลดลง ส่วนชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ได้

จากงานวิจัยนี้มีความไวต่ำกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่น แม้ว่าจะใช้ไบโอตินที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีช่วยในการขยายสัญญาณก็ตาม อาจมีสาเหตุมาจากการเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน โดยที่ไบโอตินจะจับกับแอนติบอดีที่หมู่แอมีนของกรดอะมิโนไลซีน ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันที่ส่วน Fab ของแอนติบอดีได้ ซึ่งส่วน Fab นี้เป็นส่วนที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน ดังนั้นเมื่อแอนติบอดีมีความสามารถในการจับกับแอนติเจนลดลง จึงส่งผลให้ชุดตรวจสอบที่ได้มีความไวลง (Simons และคณะ, 2006) แต่อย่างไรก็ตามในการเตรียมชุดตรวจสอบไม่ว่าจะเตรียมชุดตรวจสอบแบบใด สิ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด คือ ความสามารถเฉพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้เตรียมชุดตรวจสอบ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงกับความไวของชุดตรวจสอบที่ได้

ถึงแม้ว่าชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) ที่ได้ จะเป็นชุดตรวจสอบที่มีความไวมากที่สุด แต่มีข้อคำนึงในการนำมาเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบหลายประการ จากค่า IC_{50} และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) มีค่าต่ำกว่า MRLs ที่กำหนดไว้มาก หากนำไปเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบอาจมีความผิดพลาดในการตรวจวัดสูง และเมื่อพิจารณาค่าใช้จ่ายและความสะดวกในการใช้งาน จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) มีขั้นตอนและเวลาในการทดสอบนานกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่น ต้องใช้ HPR-labelled goat anti-mouse IgG ทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น และไม่เป็นที่นิยมในการนำมาเป็นชุดตรวจสอบ แต่ในทางตรงกันข้ามแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) มีค่าใช้จ่ายในการเตรียมต่ำกว่าชุดแบบอื่นๆ เนื่องจากใช้เพียงแอนติบอดี และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เท่านั้น นอกจากนี้ยังเป็นชุดตรวจสอบที่มีความไวสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.99 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD เท่ากับ 0.501 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่า MRLs ที่กำหนดไว้ รวมทั้งขั้นตอนและเวลาในการทดสอบง่ายและรวดเร็ว ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นจึงได้เลือก ELISA ระบบดังกล่าวสำหรับเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

รูปแบบของชุดตรวจสอบ	อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี	IC_{50} (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Direct competitive ELISA (Ag captured)	Ab 2 µg/ml enro-HRP 1:6,000	1.99	0.501
Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู	Ab 4 µg/ml enro-HRP 1:2,000 goat anti mouse 1: 500	4.10	0.910
Indirect competitive ELISA (Ab captured)	enro-BSA 0.05 µg/ml Ab 0.2 µg/ml	$5x10^{-3}$	0.026
Direct competitive ELISA (Ab captured)	enro-BSA 0.05 µg/ml Ab-biotin 1:4,000	12.56	1.618

4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

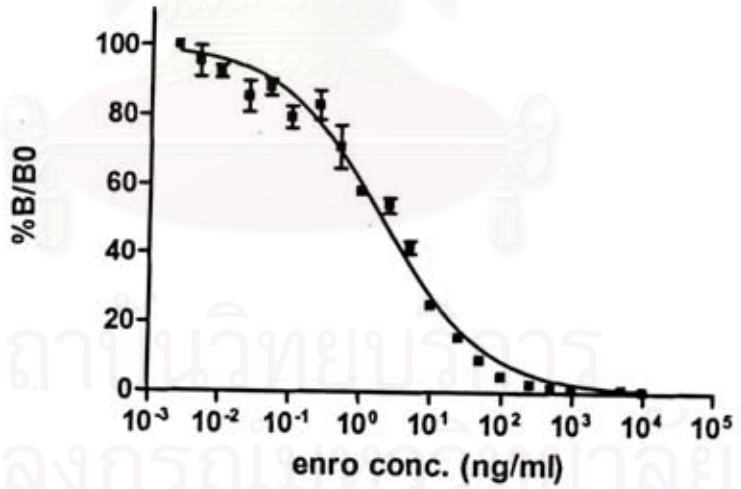
4.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.5.1 โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เคลือบหลุมเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เจือจาง 1:6,000 เป็นชุดตรวจสอบที่มีความเหมาะสมที่สุดดังแสดงในตารางที่ 4.9 นำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.10 และนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแกน Y เป็น $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่มีเอนโรฟลอกซาซินอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวแข่งขัน และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน ได้กราฟแสดงดังรูปที่ 4.7 จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่สามารถสร้างกราฟ

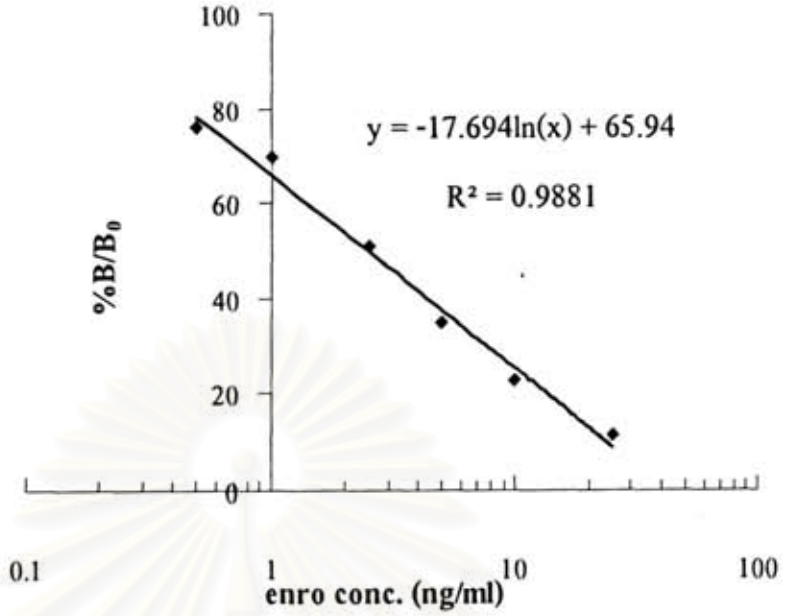
เส้นตรง พบว่า ช่วงความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่จะนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน คือช่วง 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.10 ผลค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ Direct competitive ELISA (Ag captured) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	$\%B/B_0$	SD
0	1.395	100.00	0.130
0.5	1.062	76.138	0.071
1	0.972	69.725	0.029
2.5	0.709	50.858	0.077
5	0.486	34.815	0.052
10	0.314	22.543	0.020
25	0.160	11.442	0.015



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ



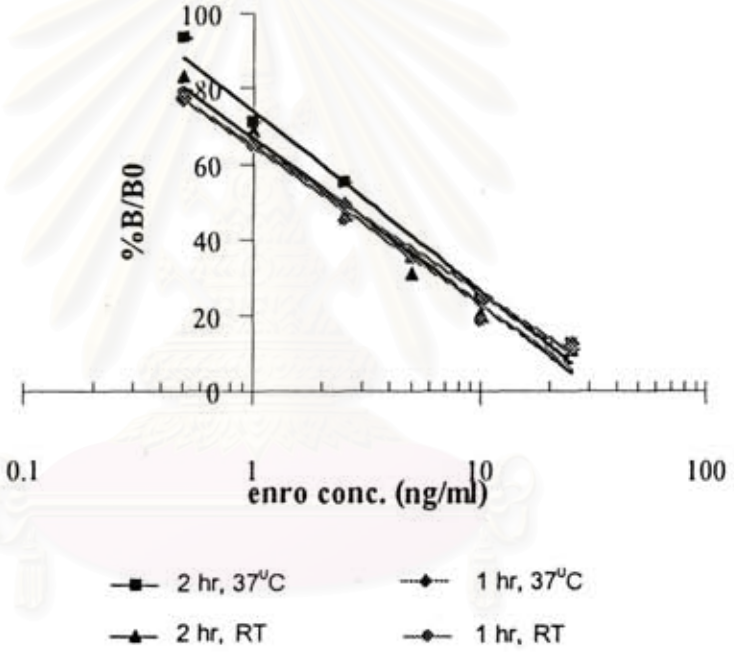
รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

4.4.2 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดี กับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระ

ในการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบจะต้องคำนึงถึงเวลาและอุณหภูมิที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งาน ดังนั้นจึงทำการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตัวอย่าง (ข้อ 3.3.5.2) โดยจะเลือกเวลาที่ใช้ในการบ่มน้อยที่สุด และอุณหภูมิที่สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จากผลการทดลองพบว่า กราฟมาตรฐานของแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.9) ซึ่งพิจารณาจากค่า R^2 ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก และค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีการเติมเอนโรฟลอกซาซินให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันและไม่ต่ำกว่า 1 (ตารางที่ 4.11) เมื่อนำไปคำนวณหาความแตกต่างจากสถิติพบว่า อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ 0.05 ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิในการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กับชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) นี้ ซึ่งเป็นเวลาและอุณหภูมิที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งาน

ตารางที่ 4.11 ผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวควบคุมลบ	R^2
1	RT	1.154	0.9835
1	37°C	1.111	0.9960
2	RT	1.466	0.9800
2	37°C	1.250	0.9806



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบในภาวะการบ่มต่างๆ

4.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน

ในการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินที่ทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารทั้งในกลุ่มและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ดังแสดงในตารางที่ 4.12 พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการแข่งขันสูงมากถึงเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ยังลดต่ำลงเพียงเล็กน้อย ทำให้ค่า IC_{50} มีค่าสูงมากกว่า 20,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามได้ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีความจำเพาะกับเอนโรฟลอกซาซินเท่านั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับสารทั้งในกลุ่มและนอกกลุ่ม

ตารางที่ 4.12 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโลน

	Competitors	CR (%)	IC_{50} (ng/ml)
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	100	1.99
	Ciprofloxacin	<0.01	>20,000
	Norfloxacin	<0.01	>20,000
	Enoxacin	<0.01	>20,000
	Cinoxacin	<0.01	>20,000
	Bipemidic acid	<0.01	>20,000
	Oxolinic acid	<0.01	>20,000
	Flumequin	<0.01	>20,000
	Ofloxacin	<0.01	>20,000
	Nalidixic acid	<0.01	>20,000
β-agonists	Clenbuterol	<0.01	>20,000
	Salbutarmol	<0.01	>20,000
Other antibiotics	Tetracycline	<0.01	>20,000
	Oxytetracycline	<0.01	>20,000
	Streptomycin	<0.01	>20,000
	Furazolidone	<0.01	>20,000
	Penicillin G	<0.01	>20,000
	Chloramphenical	<0.01	>20,000
	3-amino-2-oxazolidone; AOZ	<0.01	>20,000
	1-Aminohydantoin; AHD	<0.01	>20,000

4.4.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.4.4.1 การหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการทดสอบโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ตามขั้นตอน 3.3.5.1 ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงในตารางที่ ก.3 ภาคผนวก ก เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟเส้นตรงโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นเอนโรฟลอกซาซิน และแกน Y เป็นค่า%B/B_0 แล้วทำการหาค่าความไวของชุดตรวจสอบ ซึ่งหาได้จากการนำค่า B_0 12 ค่า จากข้อมูลในตารางที่ 4.13 มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณหาค่า LOD และ LOQ แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาได้จากสมการเส้นตรงของรูปที่ ก.5 ภาคผนวก ก พบว่า ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความไวหรือสามารถวัดปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินต่ำที่สุดเท่ากับ 0.501 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถวัดปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินต่ำที่สุดอย่างถูกต้องเท่ากับ 8.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินตกค้างสูงสุดที่กำหนดให้มีได้ (MRLs) ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ซึ่งกำหนดโดยสหภาพยุโรป มีค่าเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) เพื่อใช้หาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีเอนโรฟลอกซาซิน (B_0) (n=12)			Mean	SD	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1.167	1.152	1.171	1.145	0.023	0.501	8.61
1.172	1.142	1.146				
1.157	1.137	1.162				
1.125	1.105	1.106				

4.4.4.2. ค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

การหาค่าความแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบ ดูได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay ทำการทดลองด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงในตารางผนวกที่ ก.6-ก.7 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient variation ;%CV) พบว่า intra-variation assay มีค่าอยู่ในช่วง 2.88-7.37 ส่วน inter-variation assay ให้ค่าอยู่ในช่วง 2.66–15.72 (แสดงในตารางที่ 4.14) ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ในช่วงที่ยอมรับได้ซึ่งเท่ากับ 20 (Krotzky และ Seeh, 1995)

ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	intra-variation assay (n=12)			inter-variation assay (N=4)		
	A450	SD	%CV	A450	SD	%CV
0	1.088	0.040	3.667	1.112	0.030	2.656
0.5	0.999	0.074	7.369	0.968	0.058	6.029
1	0.935	0.042	4.541	0.885	0.108	12.249
2.5	0.773	0.026	3.316	0.771	0.105	13.564
5	0.553	0.016	2.884	0.526	0.073	13.782
10	0.342	0.027	7.840	0.314	0.049	15.717
25	0.195	0.007	3.655	0.176	0.018	10.402

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.5 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง

4.5.1 การศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม

4.5.1.1 การสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยวิธีที่เหมาะสม

ทำการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยเมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 70:30 และ 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร (ข้อ 3.3.5.5.1) นำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน และ %recovery พบว่าในการสกัดด้วยเมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร จะสามารถตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไป มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 82.30-104.06 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ คือ 80-120 (Krotzky และ Seeh, 1995) ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้เมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 70:30 ปริมาตรต่อปริมาตร ในการสกัด พบว่า ปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้ ต่างจากปริมาณที่เติมลงไปมาก (ตารางที่ 4.15) จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการสกัดที่ดีได้ ดังนั้นในการสกัดเอนโรฟลอกซาซินจากตัวอย่างเนื้อไก่สำหรับการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ จึงควรใช้เมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร

4.5.1.2 การสกัดตัวอย่างน้ำนมโคด้วยวิธีที่เหมาะสม

การสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโค ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ PBS, ตัวทำละลายผสมระหว่างเมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร และ เอธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร (ข้อ 3.3.5.5.2) จากการคำนวณความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นวิธีการสกัดที่ให้การวัดปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไป มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นที่ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.16 โดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 80.40-111.66 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นตัวทำละลายผสมระหว่าง เอธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร จึงมีเป็นวิธีที่เหมาะสมกับที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้ำนมโคเพื่อหาเอนโรฟลอกซาซินกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.5.1.3 การสกัดตัวอย่างปัสสาวะโคด้วยวิธีที่เหมาะสม

ในการหาวิธีการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างปัสสาวะโค ใช้ตัวทำละลายในการสกัดเช่นเดียวกันกับในตัวอย่างน้ำนมโค จากการคำนวณความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นวิธีการสกัดที่ให้การวัดปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่ได้ใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไป มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นที่ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.17 โดยมีค่า %recovery ที่ได้ อยู่ในช่วง 89.48-118.41 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นตัวทำละลายผสมระหว่างเมธานอล กับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นวิธีที่เหมาะสมใช้ในการหาเอนโรฟลอกซาซินตัวอย่างปัสสาวะโคกับชุดตรวจสอบต้นแบบ จากนั้นนำตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดในตัวอย่างแต่ละชนิดไปศึกษาผลกระทบต่อการชุดตรวจสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.15 ผลของการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยวิธีต่างๆ

Fortified conc. (ng/g)	สกัดด้วย methanol:PBS (70:30 (v/v))			สกัดด้วย methanol:PBS (80:20 (v/v))		
	A450	measured conc. ± SD (ng/g)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/g)	%recovery
5	0.993	2.99±0.06	59.7	1.340	5.20±0.06	104.0
10	0.903	4.50±0.05	44.9	1.159	9.09±0.00	90.9
25	0.588	20.13±0.07	80.5	0.895	20.57±0.04	82.3
50	0.383	52.85±0.03	105.7	0.629	46.65±0.01	93.3
100	0.253	97.83±0.04	97.8	0.424	87.88±0.05	87.8

ตารางที่ 4.16 ผลการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยวิธีต่างๆ

Fortified conc. (ng/ml)	สกัดด้วย PBS			สกัดด้วย methanol:PBS (8:92 (v/v))			สกัดด้วย ethanol:PBS (35:65 (v/v))		
	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc ± SD (ng/ml)	%recovery
5	0.656	15.43±0.03	308.5	0.729	5.41±0.02	108.1	0.623	9.03±0.07	180.5
10	0.645	16.28±0.04	162.7	0.620	9.15±0.05	91.4	0.623	9.06±0.04	90.5
25	0.361	64.62±0.01	258.4	0.379	29.60±0.01	118.4	0.350	34.03±0.02	136.1
50	0.222	126.61±0.06	253.2	0.243	57.23±0.04	114.3	0.275	49.09±0.00	98.1
100	0.147	182.27±0.08	182.2	0.151	89.48±0.05	89.4	0.176	79.25±0.04	79.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

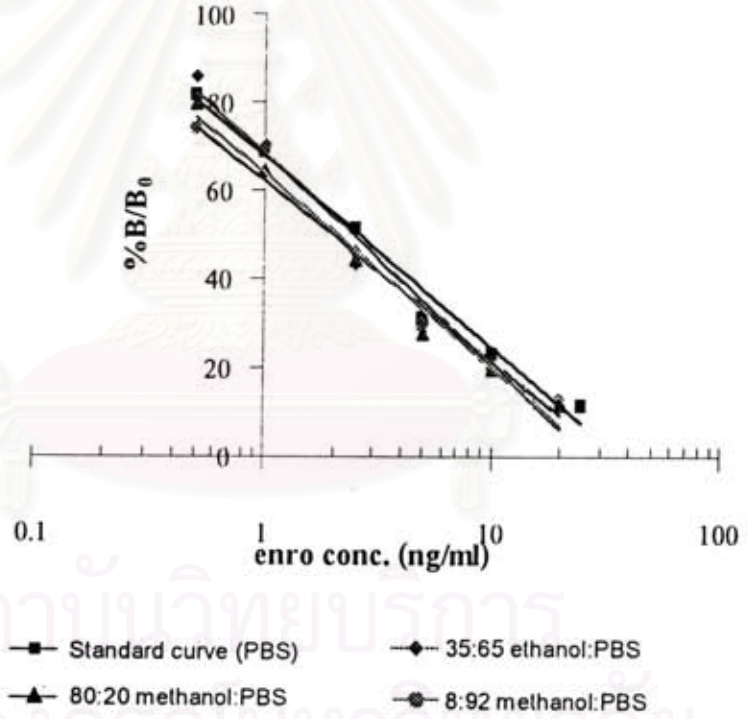
ตารางที่ 4.17 ผลการสกัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างปัสสาวะโคด้วยวิธีต่างๆ

Fortified conc. (ng/ml)	สกัดด้วย PBS			สกัดด้วย methanol:PBS (8:92 (v/v))			สกัดด้วย ethanol:PBS (35:65 (v/v))		
	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery
5	0.838	5.09±0.04	101.9	0.924	8.05±0.03	160.9	0.716	4.84±0.03	96.8
10	0.743	8.38±0.02	83.8	0.619	16.65±0.07	156.5	0.580	9.85±0.04	98.5
25	0.643	14.17±0.05	56.6	0.491	43.64±0.01	174.6	0.397	25.66±0.06	102.6
50	0.743	85.72±0.04	171.4	0.295	78.07±0.04	156.1	0.248	55.83±0.01	111.6
100	0.299	126.37±0.07	126.3	0.184	98.26±0.05	98.2	0.178	80.40±0.05	80.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.1.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการนำตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค คือ เมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 70:30 ปริมาตรต่อปริมาตร, เอธานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร และ เมธานอลกับ PBS ในอัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ นำมากราฟเทียบกับกราฟมาตรฐานได้ใน รูปที่ 4.10 พบว่าเส้นกราฟของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด ให้ผลใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบซึ่งใช้ PBS เป็นตัวทำละลาย แสดงว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างไม่มีผลกระทบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ และเมื่อคำนวณปริมาตรสุดท้ายจนถึงการทดสอบกับชุดตรวจสอบ มีปริมาณของเมธานอล และเอธานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายมีปริมาณน้อยมากจึงไม่ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินที่สกัดจากเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

4.5.2 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่

การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยให้ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงไปในเนื้อไก่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการสกัดเอนโรฟลอกซาซินด้วยเมธานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6.1 นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน %recovery และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินและ %recovery ที่วิเคราะห์ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่เติมลงไป และ %CV ที่ได้จากการหา intra-variation assay และ inter-variation assay ที่ได้จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อไก่อยู่ในช่วง 2.07-11.70 และ 12.31-16.14 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่กำหนด (ตารางที่ 4.19) แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถใช้วิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในเนื้อไก่ได้อย่างถูกต้อง

4.5.3 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโค

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำนมโค ที่มีความเข้มข้นเอนโรฟลอกซาซินเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6.2 ใช้เอธานอลที่ผสมกับ PBS ในอัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร นำผลการทดลองที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก รูปที่ 9-11) เพื่อคำนวณความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน %recovery และ %CV ดังแสดงในตารางที่ 4.20 พบว่าในการทดลองครั้งที่ 2 ความเข้มข้นเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโคเท่ากับ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการวิเคราะห์จากชุดตรวจสอบเท่ากับ 31.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %recovery เท่ากับ 124.5 ซึ่งเกินกว่าค่าที่กำหนดไว้เล็กน้อย แต่จากการทดลองทั้งหมด ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ และ %recovery ที่ได้ให้ค่าใกล้เคียง และยอมรับได้ ในการหา intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า %CV มีค่า 3.08-14.06 และ 3.07-10.57 ตามลำดับ ดังนั้น ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความสามารถวัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโคได้อย่างถูกต้อง

4.5.4 การวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างปัสสาวะโค

สำหรับตัวอย่างปัสสาวะโคที่นำมาวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบได้ทำการเติมความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินลงไปให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อ

มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางในเมธานอลกับ PBS อัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์กับชุดตรวจสอบต้นแบบ ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่ทำการวิเคราะห์ได้หลังจากนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก. รูปที่ 9-11) มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงไป แต่มีผลการทดลองในครั้งที่ 1 เมื่อเติมเอนโรฟลอกซาซินลงไปในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่วิเคราะห์ได้ถึง 61.84 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณเป็น %recovery แล้ว ได้เท่ากับ 123.6 ซึ่งเกินกว่าช่วงที่กำหนดไว้เล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน และ %recovery ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับ รวมทั้ง %CV ที่ได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay ได้ค่าไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด เท่ากับ 2.75-17.09 และ 3.99-14.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.21) ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างปัสสาวะโคได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 4.18 สรุปผลการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (ปริมาตรต่อปริมาตร)	%recovery	%CV intra-assay (n=12)	%CV (inter-assay) (N=3)
เนื้อไก่	เมธานอล:PBS (80:20)	82.3-111.8	2.07-11.70	12.31-16.14
น้ำนมโค	เอธานอล:PBS (35:65)	80.4-124.5	3.08-14.06	3.07-10.57
ปัสสาวะโค	เมธานอล:PBS (8:92)	77.9-118.4	2.75-17.09	3.99-14.64

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 12 ซ้ำ

ตารางที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

	Fortified conc. (ng/g)				
	5	10	25	50	100
Intra-variation assay (n=12)					
ครั้งที่ 1					
measured conc. ± SD (ng/g)	4.28±0.03	11.18±0.06	26.26±0.05	41.56±0.10	104.83±0.02
%recovery	85.5	111.8	105.0	83.1	104.8
%CV	4.83	6.37	3.75	5.57	7.23
ครั้งที่ 2					
measured conc. ± SD (ng/g)	5.20±0.01	9.10±0.05	20.58±0.05	46.65±0.04	87.88±0.02
%recovery	104.1	91.0	82.3	93.3	87.9
%CV	4.85	2.07	4.33	5.33	10.95
ครั้งที่ 3					
measured conc. ± SD (ng/g)	5.23±0.09	8.55±0.01	21.03±0.06	46.81±0.03	87.92±0.04
%recovery	104.6	85.4	84.1	93.6	87.9
%CV	4.05	3.99	4.35	11.70	10.21
Inter-variation assay (N=3)					
measured conc. ± SD (ng/g)	4.90±0.21	9.61±0.11	22.62±0.34	45.01±0.29	93.55±0.17
%recovery	98.0	96.0	90.4	90.0	93.5
%CV	15.36	12.31	13.23	16.14	13.26

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 12 ซ้ำ

ตารางที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

	Fortified conc. (ng/ml)				
	5	10	25	50	100
Intra-variation assay (n=12)					
ครั้งที่ 1					
measured conc. ± SD (ng/ml)	4.84±0.06	9.85±0.01	25.66±0.12	55.83±0.04	80.40±0.08
%recovery	96.8	98.5	102.6	111.6	80.4
%CV	5.03	6.60	6.17	13.54	3.90
ครั้งที่ 2					
measured conc± SD. (ng/ml)	5.46±0.05	10.38±0.05	31.13±0.03	52.86±0.01	83.19±0.02
%recovery	109.1	103.8	124.5	105.7	83.2
%CV	3.08	6.28	5.53	12.23	14.06
ครั้งที่ 3					
measured conc. ± SD (ng/ml)	5.97±0.03	9.81±0.04	26.56±0.04	55.73±0.02	90.17±0.02
%recovery	119.7	98.0	106.2	111.5	90.2
%CV	4.12	6.16	7.50	13.03	12.27
Inter-variation assay (N=3)					
measured conc. ± SD (ng/ml)	4.84±0.23	9.85±0.24	25.66±0.12	55.83±0.45	80.40±0.11
%recovery	108.5	100.1	111.1	109.6	84.6
%CV	10.57	3.20	10.55	3.07	5.95

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 12 ซ้ำ

ตารางที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างปัสสาวะโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

	Fortified conc. (ng/ml)				
	5	10	25	50	100
Intra-variation assay (n=12)					
ครั้งที่ 1					
measured conc. ± SD (ng/ml)	4.06±0.05	8.02±0.03	28.83±0.04	61.84±0.09	83.85±0.06
%recovery	81.3	80.1	115.3	123.7	83.9
%CV	6.13	17.09	15.15	16.80	5.36
ครั้งที่ 2					
measured conc. ± SD (ng/ml)	5.41±0.06	9.15±0.07	29.60±0.06	57.23±0.04	89.48±0.03
%recovery	108.1	91.5	118.4	114.3	89.5
%CV	6.05	8.01	6.34	4.59	7.22
ครั้งที่ 3					
measured conc. ± SD (ng/ml)	4.52±0.09	8.26±0.03	25.92±0.01	58.64±0.06	77.94±0.02
%recovery	90.4	82.6	103.6	117.3	77.9
%CV	2.75	4.87	5.17	5.45	7.29
Inter-variation assay (N=3)					
measured conc. ± SD (ng/ml)	93.29±0.26	84.74±0.30	112.46±0.24	118.47±0.19	83.76±0.22
%recovery	14.6	7.0	6.9	3.9	6.9
%CV	4.06	8.02	28.83	61.84	83.85

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 12 ซ้ำ

4.6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค HPLC

4.6.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบทางการค้า

ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง เนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้กับชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA เพื่อประเมินความถูกต้องและประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้ โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันทั้งหมด แล้วแบ่งมาวิเคราะห์ตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสอง

ทำการเติมเอนโรฟลอกซาซินลงไปในตัวอย่างเนื้อไก่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0, 25, 50, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.22 ในตัวอย่างเนื้อไก่ที่ไม่ได้เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป ทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA สามารถตรวจวัดปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินได้ เท่ากับ 3.67 และ 4.85 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างเนื้อไก่ที่นำมาใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมเอนโรฟลอกซาซิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลจากการสกัดตัวอย่าง ทำให้องค์ประกอบจากเนื้อไก่ เช่น ไขมัน โปรตีน หลุดออกมา ไปรบกวนการจับกันระหว่างแอนบอดีกับแอนติเจน ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าลดลง หรืออาจเนื่องมาจากมีสารดังกล่าวอยู่ในเนื้อไก่ จึงสามารถคำนวณปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินออกมาได้ดังกล่าว และเมื่อพิจารณาในส่วนของปริมาณเอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงไปในตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดตรวจสอบทั้งสอง พบว่าชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA มีผลการวิเคราะห์บางค่า ได้ %recovery ต่ำกว่าค่าที่กำหนดไว้ คือ ตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป 50 นาโนกรัมต่อกรัม ตรวจวัดได้ 31.58 นาโนกรัมต่อกรัม คำนวณหา %recovery ได้เท่ากับ 63.17% ต่ำกว่าค่าที่กำหนด ส่วนชุดตรวจสอบต้นแบบให้ค่า %recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับ คือ 81.15-104.15

สำหรับในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ทำการเติมเอนโรฟลอกซาซินลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0, 5 10, 25, 50, 80 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.23 และ 4.24 ทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA วิเคราะห์ปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่าง ให้ค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไปในตัวอย่าง ถึงแม้ว่าจะมีบางผลการทดลองในชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ที่ให้ปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงไป เห็นได้จาก %recovery ที่ได้ต่ำกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ เช่น ในตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 70.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %recovery ที่ได้เท่ากับ 70.15 แต่ในชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนม และปัสสาวะโค ได้ %recovery อยู่ในช่วงที่กำหนด สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้มีการเติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป ในตัวอย่างน้ำนมโคชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 1.32 และ 2.91 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในตัวอย่างปัสสาวะโคตรวจวัดได้ เท่ากับ 2.17 และ 1.26 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่ตรวจวัดได้นั้น อาจมีสาเหตุมาจากการสกัดเช่นเดียวกันกับในตัวอย่างเนื้อไก่ แต่ในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค มีความเข้มข้นของตัวทำละลายน้อยกว่า ต่างจากเนื้อไก่ที่ใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไปมีค่าสูงกว่า เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA สามารถตรวจวัดปริมาณเอนโรฟลอกซาซินได้ใกล้เคียงกันกับปริมาณที่เติมลงไป และนำผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ไปเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ได้เท่ากับ 0.9622, 0.9980 และ 0.9991 ตามลำดับ ซึ่งค่า r เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ต้องมีค่ามากกว่า 0.85 ถือว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันสูง (Saita และคณะ, 2003) เห็นได้ว่าในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดให้ค่า r มากกว่า 0.85 แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ให้ผลที่สอดคล้องและใกล้เคียงกัน ดังนั้น ชุดตรวจสอบต้นแบบมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบที่มีวางจำหน่าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified conc. (ng/g)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=3)			ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน EURO-DIAGNOSTICA(n=2)		
	A450	measured conc. ± SD (ng/g)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/g)	%recovery
0	0.962	3.67±0.01	-	0.896	4.85±0.03	-
25	0.571	26.04±0.03	104.1	0.633	19.42±0.06	77.6
50	0.441	49.80±0.07	99.6	0.582	31.58±0.02	63.1
80	0.339	81.15±0.05	103.7	0.443	72.40±0.11	90.5
100	0.344	83.00±0.06	81.1	0.358	120.24±0.03	120.2
200	0.204	163.18±0.04	81.6	0.284	187.01±0.04	93.5

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=3)			ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน EURO-DIAGNOSTICA(n=2)		
	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery
0	1.027	1.32±0.05	-	0.957	2.91±0.01	-
5	0.870	4.56±0.03	91.2	0.857	4.54±0.10	90.7
10	0.628	9.76±0.07	97.6	0.590	7.51±0.08	75.0
25	0.460	22.64±0.07	90.6	0.497	22.79±0.06	91.1
50	0.320	45.64±0.08	91.2	0.302	54.61±0.03	109.2
80	0.229	72.17±0.04	90.2	0.173	90.41±0.04	113.0
100	0.212	78.39±0.19	78.4	0.159	98.58±0.05	98.5

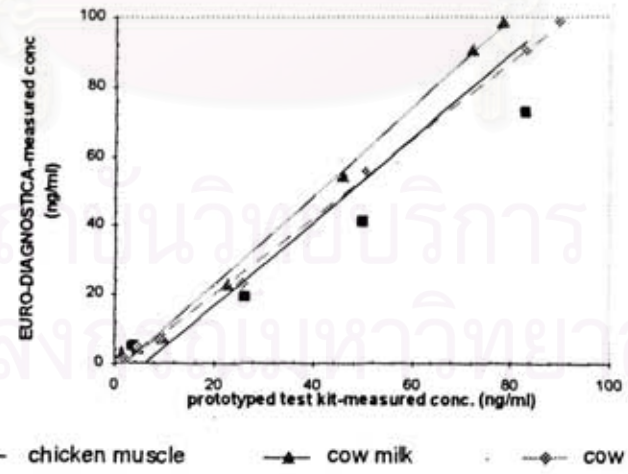
หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.24 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=3)			ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน EURO-DIAGNOSTICA (n=2)		
	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery	A450	measured conc. ± SD (ng/ml)	%recovery
0	0.928	2. 17±0.05	-	1.143	1.26±0.07	-
5	0.768	4.85±0.07	97.1	0.863	4.43±0.03	88.5
10	0.642	9.10±0.08	91.0	0.562	8.90±0.02	88.9
25	0.436	25.60±0.03	102.4	0.496	22.89±0.04	91.5
50	0.301	50.32±0.02	100.6	0.299	55.35±0.06	110.7
80	0.201	83.03±0.04	103.8	0.205	74.91±0.09	93.6
100	0.185	89.74±0.03	89.7	0.216	70.15±0.02	70.1

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

4.6.2 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC เนื่องจากเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคทางเคมี ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง และเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากงานวิจัยนี้ ในการทดลองจะทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันแล้วแบ่งวิเคราะห์ ซึ่งชุดตรวจสอบต้นแบบทำการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6 ส่วนเทคนิค HPLC ใช้สภาวะในการทดลองและการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7.2 ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 0, 80, 100, 200 และ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่นำใช้ในการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่าการเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA เนื่องมาจากในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แล้วประมวลผลด้วย UV นี้ มีความสามารถในการตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 62.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินดังที่กล่าวมาในข้างต้น ใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคทั้งสอง พบว่าปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์ได้ให้ค่าใกล้เคียงกันกับปริมาณของเอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงไป ในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ และ %recovery ที่ได้ทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC ได้ไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4.25-4.27 และนำผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากชุดตรวจสอบกับเทคนิค HPLC ไปเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินที่วิเคราะห์จากเทคนิค HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ได้เท่ากับ 0.9972, 0.9876 และ 0.9950 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดให้ค่า r มากกว่า 0.85 แสดงว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ให้ผลที่สอดคล้องและใกล้เคียงกัน ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC มีความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.25 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อไก่ ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

Fortified conc. (ng/g)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ			เทคนิค HPLC		
	A450	measured conc.±SD (ng/g)	%recovery	peak area	measured conc. (ng/g)	%recovery
0	0.981	3.34±0.05	-	0	0	-
80	0.330	87.04±0.06	108.8	7,243	89.73	112.2
100	0.319	91.74±0.01	91.7	9,436	116.89	116.9
200	0.161	202.39±0.08	101.2	15,765	195.30	97.7
400	0.149	429.85±0.04	107.5	33,537	415.46	103.9

หมายเหตุ A450 ที่ได้จากเนื้อไก่ที่เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าที่ได้จากการเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า

ตารางที่ 4.26 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ			เทคนิค HPLC		
	A450	measured conc.±SD (ng/ml)	%recovery	peak area	measured conc. (ng/ml)	%recovery
0	0.963	1.83±0.08	-	0	0	-
80	0.218	76.09±0.03	95.1	3,578	88.65	110.8
100	0.179	92.73±0.05	92.7	4,275	105.92	105.9
200	0.189	176.41±0.03	88.2	8,670	214.81	107.4
400	0.140	449.77±0.04	112.4	15,784	391.07	97.8

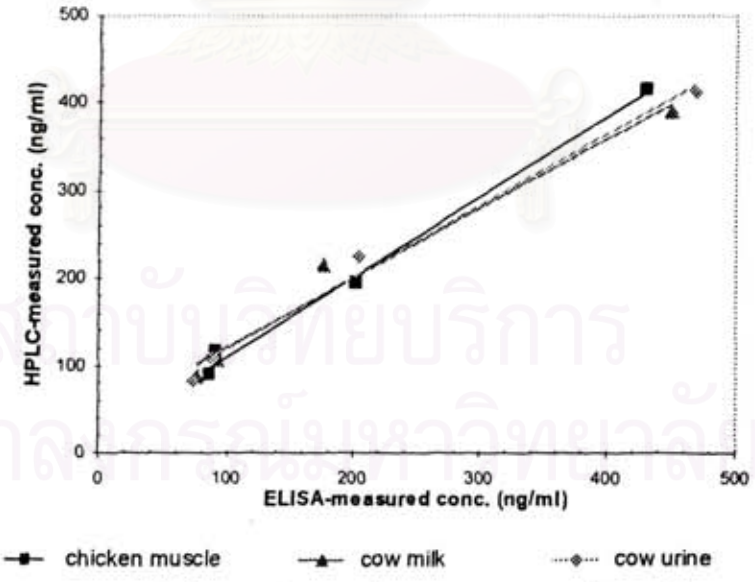
หมายเหตุ A450 ที่ได้จากน้ำนมโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป 200 และ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าที่ได้จากการเจือจางตัวอย่าง 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.27 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ			เทคนิค HPLC		
	A450	measured conc.±SD (ng/ml)	%recovery	peak area	measured conc. (ng/ml)	%recovery
0	1.018	1.39±0.06		0	0	
80	0.225	73.47±0.02	91.8	3,346	82.90	103.6
100	0.189	88.20±0.08	88.2	4,370	108.27	108.3
200	0.160	203.46±0.05	101.7	9,056	224.37	112.2
400	0.132	468.14±0.05	117.0	16,721	414.28	103.6

หมายเหตุ A450 ที่ได้จากปัสสาวะโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินลงไป 200 และ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าที่ได้จากการเจือจางตัวอย่าง 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

ตารางที่ 4.28 สรุปผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA และเทคนิค HPLC

ตัวอย่าง	%recovery		
	ชุดตรวจสอบต้นแบบ	ชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA	เทคนิค HPLC
เนื้อไก่	82.3-111.8	63.1-120.2	97.7-116.9
น้ำนมโค	80.4-124.5	75.0-113.0	97.8-110.8
ปัสสาวะโค	77.9-118.4	70.1-110.7	103.6-112.2

จากประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่ได้สามารถตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินในปริมาณต่ำกว่าค่ามาตรฐานกำหนด และมีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินสูง มีขั้นตอนที่สะดวก และใช้เวลาในการตรวจวัดน้อย ตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินได้ทั้งในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนมโค และปัสสาวะโค รวมทั้งให้ผลการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย และเทคนิค HPLC ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากการวิจัยนี้จึงสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาการตกค้างของเอนโรฟลอกซาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

นำเซลล์ไฮบริโดรมา enro#44 ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณและนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าเซลล์ไฮบริโดรมาสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินได้ จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protein A affinity chromatography ได้ปริมาณโปรตีนและปริมาณแอนติบอดีเท่ากับ 1.109 และ 1.097 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS พบว่าแถบสายของ heavy chain และ light chain ของแอนติบอดีมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 69 และ 26 กิโลดาลตันตามลำดับ และแอนติบอดีที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีการปนเปื้อนจากซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ และยังมีความสามารถในการจับกับเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระได้จากการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

สำหรับการเปรียบเทียบเอนโรฟลอกซาซินโดย ELISA 4 แบบ ชุดตรวจสอบที่ให้ความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $5x10^{-3}$ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ Direct competitive ELISA (Ag captured) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.99 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดตรวจสอบที่ให้ความไวน้อยที่สุดคือ Direct competitive ELISA (Ab captured) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) เป็นชุดตรวจสอบที่มีความเหมาะสมที่สุดในการเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ เนื่องจากเป็นชุดตรวจสอบที่มีความไวสูง มีขั้นตอนและเวลาในการตรวจวัดน้อยกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่นๆ ทำให้สะดวกต่อการใช้งาน ซึ่งในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบนี้ ใช้เพียงแอนติบอดีและเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP เท่านั้น ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการเตรียมชุดตรวจสอบต่ำ โดยใช้แอนติบอดีเคลือบหลุมที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP 1:6,000 โดยกราฟมาตรฐานจะครอบคลุมความเข้มข้นในช่วง 0.5-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดตรวจมีความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินต่ำที่สุดเท่ากับ 0.501 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 8.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมในช่วงที่ต้องการตรวจวัด และทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra-

variation assay และ inter-variation assay อยู่ในช่วง 2.88-7.37 และ 2.66–15.72 ตามลำดับ โดยในการติดตามการจับด้วย HRP สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปวิเคราะห์เอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างต่างๆ คือ เนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ซึ่งวิธีการในการเตรียมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ โดยตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเนื้อไก่ คือ เมธานอลกับ PBS อัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร ส่วนตัวอย่างน้ำนมโคใช้เอธานอล กับ PBS อัตราส่วน 35:65 ปริมาตรต่อปริมาตร และตัวอย่างปัสสาวะโคควรใช้ เมธานอลกับ PBS อัตราส่วน 8:92 ปริมาตรต่อปริมาตร เมื่อทำการศึกษาผลกระทบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างพบว่าไม่มีผลต่อการทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ สำหรับค่า %recovery และ %CV ของ intra และ inter-variation assay ในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด

ในการนำชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้วัดปริมาณสารเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA และเทคนิค HPLC พบว่าทั้ง 3 วิธีสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารได้ถูกต้องใกล้เคียงกัน ซึ่งชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้และชุดตรวจสอบทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA มีขั้นตอนในการทดสอบเหมือนกัน แต่ชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงมีความสะดวกต่อการใช้งานมากกว่า และมีความจำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินมากกว่า

ชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน Direct competitive ELISA (Ag captured) ต้นแบบ ที่ได้มีความสามารถในการตรวจวัดเอนโรฟลอกซาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ความถูกต้องและความแม่นยำสูง ใช้ขั้นตอนและเวลาในการทดสอบสั้น สะดวกต่อการใช้งาน แต่อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไปอีก เช่น อายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ การเตรียมสับสเตรตที่พร้อมใช้งานได้ทันที เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่สามารถผลิตจำหน่ายได้ในทางการค้าต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ไซแอนดิฟิกซัพพลาย. คู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซิน. Netherlands: Euro Diagnostica B.V.

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

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

มนัสพงศ์ ชูศรี. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ไพศาล สิทธิกรกุล.2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการสอนและการวิจัย. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ

ภาษาอังกฤษ

Anadon, A., Martınez-Larranaga, R., Dıaz, M.J., Bringas, P., Mart´ınez, M.A., Fernandez-Cruz, M.L., Fernandez M.C. and Fernandez R. Am. 1995. J. Vet. Res. 56 : 501.

Avrameas, S. and Guilbert, B. 1971. A method for quantitative of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. Eur J. Immumol. 1:394-396.

BIOO Scientific Corp. 2007. MaxSignal™ Enrofloxacin ELISA Test Kit Manual Catalog #: 1017. [cited 2007 Nov. 10]. [Online]
Available:http:// http://www.eugene-chen.com.tw/download/1017%20MaxSignal%20Enrofloxacin%20ELISA%20Test%20Kit%20Manual%20-%20V1701.pdf

Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L. and Jackman, R. 2003. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. Food Addit Contam. 20: 221-8.

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

Brown, S.A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. J. Vet Pharmacol and Ther. 19:1–14.

Diamandis, E.P. and Christopoulos, T.K. 1991. The biotin–(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology, Clin. Chem. 37:625

Duan, J. and Yuan, Z. 2001. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. J. Agric Food Chem. 493: 1087-9.

EMEA. 2002. Enrofloxacin Summary report (5). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. [cited 2004 Sep. 26]. [Online] Available:http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls /082002en.pdf.

Engvall, E. and Perman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 8:871-874

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

Guardabassi, L., Schwarz, S. and Lloyd, D. H. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J. Antimicrob Chemother.54: 321-32.

Garsia, O. H., Gorla, N., Luders, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G. and Puelles, I. 1999. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. J.Vet Pharmacol and Ther. 22:209–12.

Garcia-Ovando, H., Gorla N., Weyers A., Ugnia, L., Martinez, L., Giacomelli, N., Liboa, R., Chiostri, E. and Davicino, R. 2000. Enrofloxacin liquid-liquid extraction from chicken muscle and HPLC Detection. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 23:2391–97.

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

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

Johnstone, A. and Thorpe, R. 1987. Immunochemistry in practice. Blackwell scientific publications. London.

Kaartonen, L., Salonen, M., Alli, L. and PYÖRÄLÄ, S. 1995. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. J. Vet Pharmacol and Ther. 9:254–63.

Lolo, M., Pedreira, S., Miranda, J. M., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Ceped, A. and Fente, C. 2006. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. Food Addit Contam. 23: 988-993.

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

Mark, A. Mitchell. 2005. Enrofloxacin. Journal of Exotic Pet Medicine.15:66-69.

Gorla, N. E., Chiostri, L., Ugnia, A.,Weyers, N., Giacomelli, R., Davicino and Garcia Ovando, H. 1997. Int. J. Antimicrob. Agents. 8:253-56.

Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J. Antimicrob Chemother. 51:1109-17.

Saita, T., Fujito, H. and Mori, M. 2003. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of mexiletine. Biol. Pharm. Bull. 26:761-65.

SÁRKÖZY, G. 2001. Quinolones: aclass of antimicrobial agents. Vet. Med.-Czed. 46: 257-74.

Schneider, P. and Hammock, B.D. 1992. Influence of ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitive of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies. J. Agric. Food Chem. 40:525-30.

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

The europeon agency for the evaluation of medicinal products. 2002. Committee for veterinary madicinal products, Enrofloxacin, Summary report(5)

Tyczkowska, K.L., Voyksner, D. R. and Anderson, L.K. 1994. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography. J.Chromatogr.B. 658:341-48

Waggoner, T.B. and Bowman, M.C. 1987. Spectrofluorometric determination of BAY Vp 2674 residues in poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 813-18.

Watanabe, H., Satake, A., Matsumoto, M., Kido, Y., Tsuji, A., Ito, K. and Maeda, M. 1998. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for monensin. Analyst. 123: 2573-8.

Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y. and Tsuji, A. 1999. Production of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay for kanamycin in biological matrices. Analyst. 124: 1611-5.

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

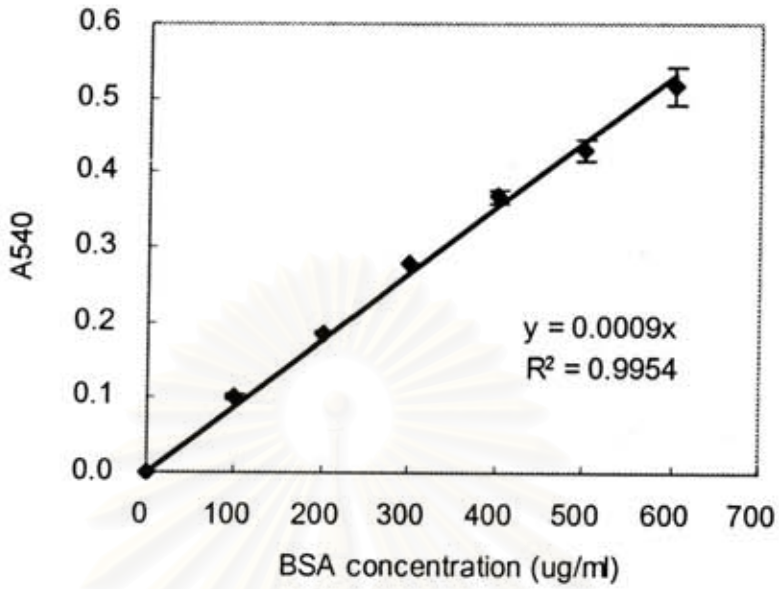
WHO.1997. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additive Series 39 : Enrofloxacin. World Health Organization, Geneva.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

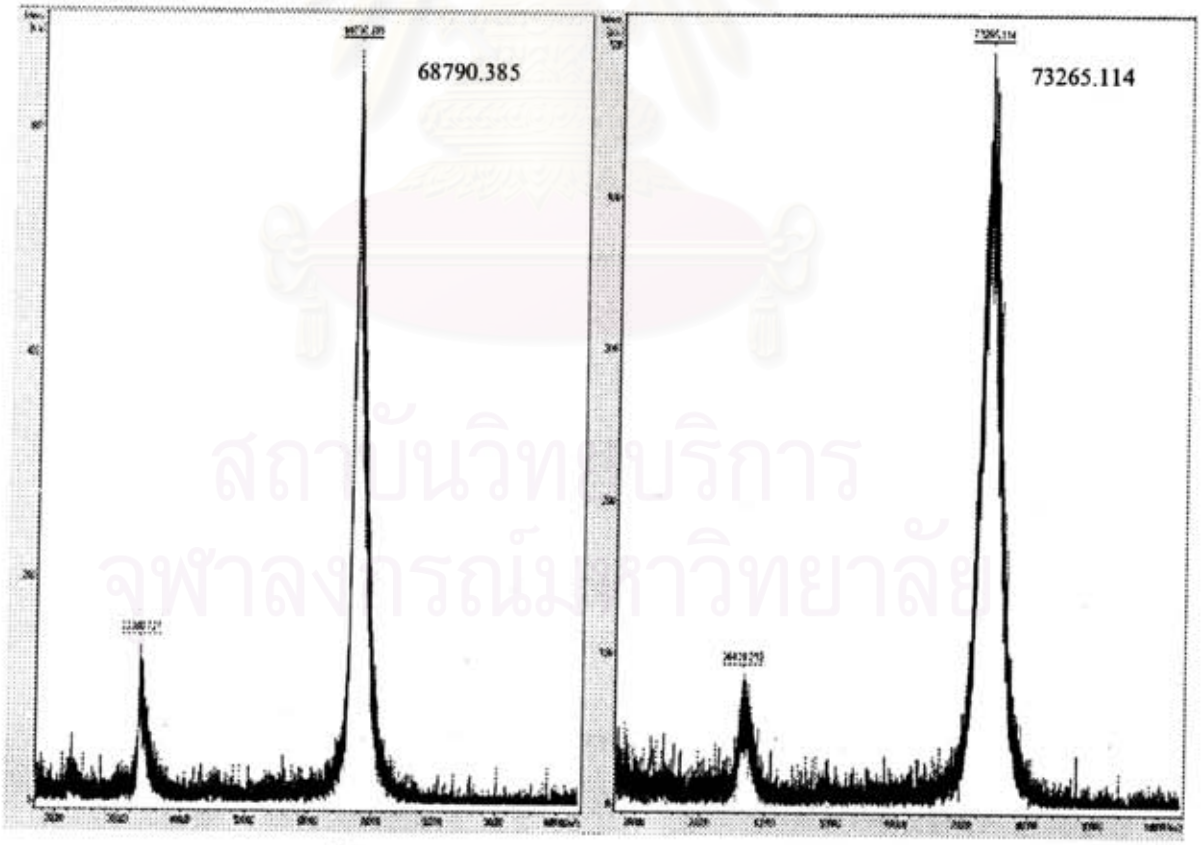
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก



รูปที่ ก.1 กราฟของโปรตีนมาตรฐาน (BSA) จากวิธี BCA



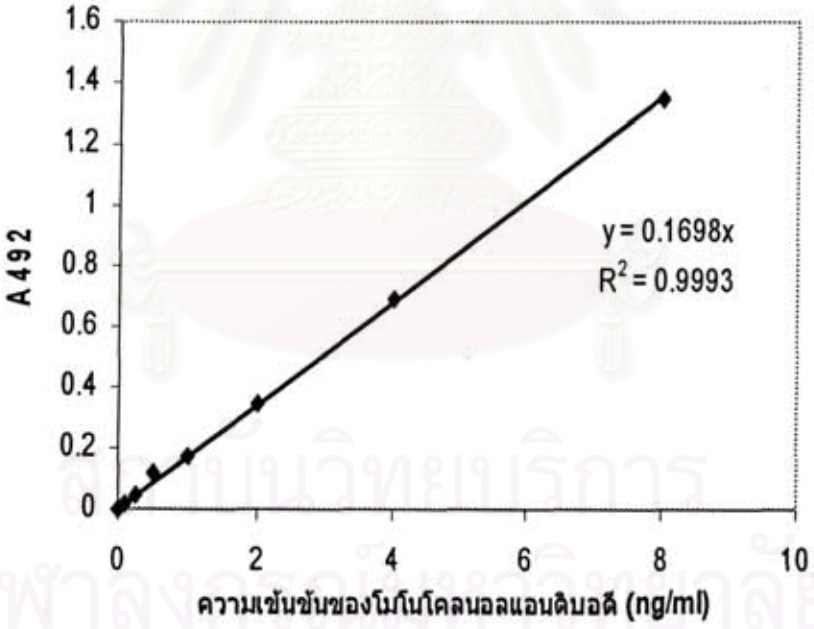
(ก) (ข)

รูปที่ ก.2 สเปกตรัมแสดงน้ำหนักโมเลกุลของ BSA ก่อน (ก) และหลังการเชื่อมต่อกับเอนโรฟลอซาซิน (ข) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MALDI-TOF MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.1 ผลของการหาปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีน BSA ที่ เชื่อมต่อกับเอนโรฟลอกซาซิน

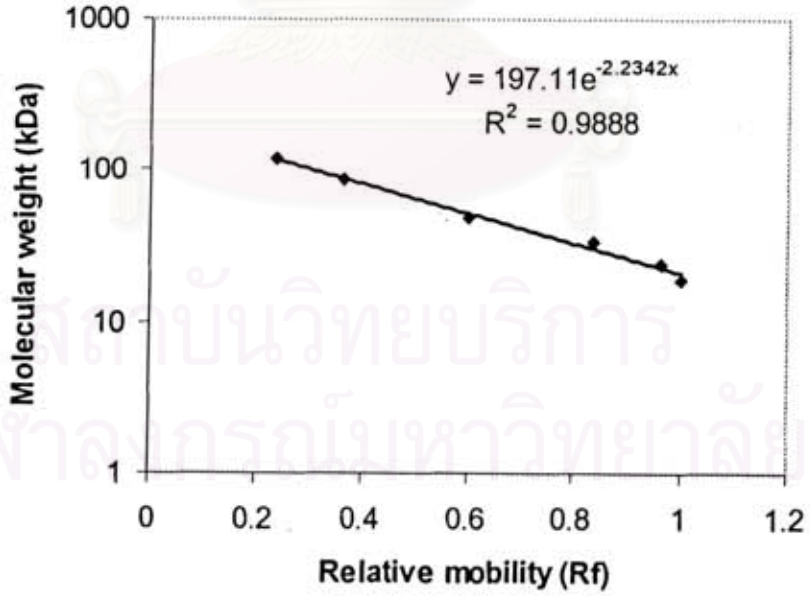
อัตราการเจือจางของเอนโรฟลอกซาซิน ที่เชื่อมต่อกับ BSA	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1:10	0.126	4.97
1:20	0.360	5.29
	เฉลี่ย	**5.13**



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

ตารางที่ ก.2 ค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	Relative mobility (Rf)
b-galactosidase	118	0.24
Bovine serum albumin	86	0.36
Ovalbumin	49	0.60
Carbonic anhydrase	34	0.84
b-lactoglobulin	24	0.96
Lysozyme	19	1.00
FCS	84.69	0.42
แอนติบอดีจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี enro#44	69.48	0.55
(IgG1) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protein A โดยใช้	26.04	0.91
หลักการของ affinity chromatography		



รูปผนวกที่ ก.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

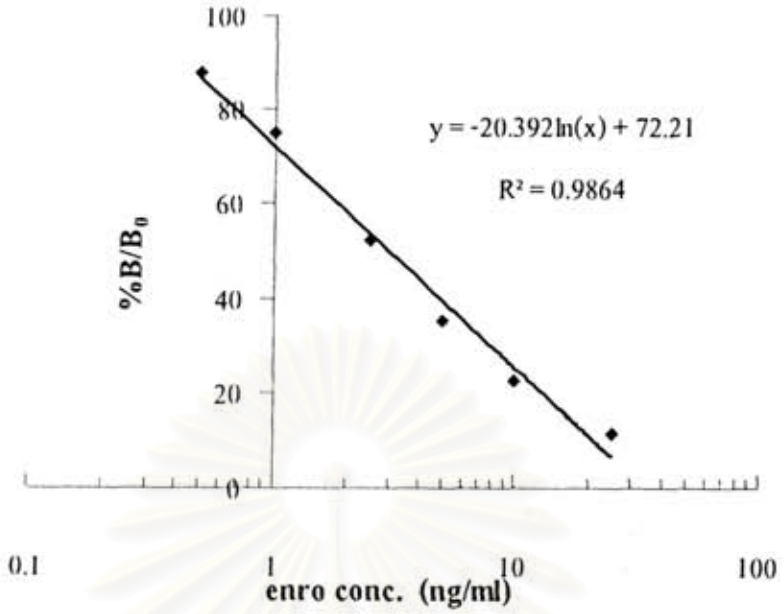
ตารางที่ ก.3 ผลการหาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินเหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
0	1.732	2.012	1.977
0.0025	2.090	2.082	2.153
0.005	1.836	2.057	2.143
0.01	1.907	1.925	2.028
0.025	1.657	1.780	1.970
0.05	1.951	1.829	1.790
0.1	1.798	1.671	1.573
0.25	1.897	1.765	1.598
0.5	1.588	1.669	1.252
1	1.201	1.295	1.217
2.5	1.245	1.128	1.102
5	0.981	0.852	0.884
10	0.556	0.576	0.559
25	0.385	0.381	0.348
50	0.235	0.239	0.226
100	0.131	0.147	0.134
250	0.091	0.097	0.088
500	0.068	0.077	0.062
1,000	0.052	0.055	0.061
2,500	0.048	0.046	0.047
5,000	0.083	0.047	0.046
10,000	0.046	0.047	0.062

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.4 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

	Competitors	ความเข้มข้นของสารที่ใช้แย่งจับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		0	20
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	1.354	0.044
	Ciprofloxacin	1.203	1.182
	Norfloxacin	1.428	1.356
	Enoxacin	1.220	1.259
	Cinoxacin	1.329	1.312
	Bipemidic acid	1.256	1.333
	Oxolinic acid	1.357	1.246
	Flumequin	1.310	1.206
	Ofloxacin	1.417	1.321
	Nalidixic acid	1.206	1.316
β-agonists	Clenbuterol	1.312	1.293
	Salbutarmol	1.396	1.415
Other antibiotics	Tetracycline	1.189	1.200
	Oxytetracycline	1.295	1.284
	Streptomycin	1.236	1.296
	Furazolidone	1.323	1.369
	Penicillin G	1.448	1.387
	Chloramphenical	1.205	1.222
	3-amino-2-oxazolidone; AOZ	1.352	1.365
	1-Aminohydantoin; AHD	1.279	1.332



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ตารางที่ ก.5 ผลการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ HRP และเอนโรฟลอกซาซินในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	1 hr RT	1 hr 37°C	2 hr RT	2 hr 37°C
0	1.077	1.064	1.512	1.296
0.5	0.855	0.827	1.257	1.211
1	0.699	0.699	1.042	0.923
2.5	0.483	0.524	0.703	0.716
5	0.375	0.388	0.473	0.460
10	0.193	0.249	0.306	0.314
25	0.115	0.130	0.161	0.160

ตารางที่ ก.6 ผลการหาค่า intra-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

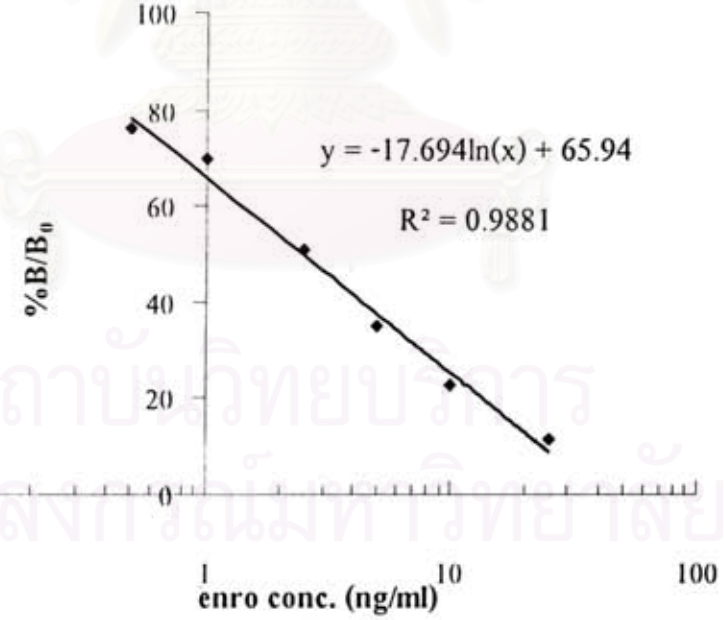
จำนวนซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	0.5	1	2.5	5	10	25
1	1.165	1.027	0.899	0.810	0.529	0.410	0.201
2	1.100	0.928	0.911	0.747	0.557	0.323	0.194
3	1.085	0.921	0.929	0.787	0.554	0.337	0.184
4	1.066	0.938	0.988	0.773	0.552	0.316	0.194
5	1.158	1.027	0.906	0.794	0.546	0.355	0.192
6	1.047	0.964	0.927	0.795	0.578	0.322	0.185
7	1.056	0.915	0.932	0.766	0.559	0.328	0.193
8	1.096	0.950	1.020	0.728	0.548	0.316	0.203
9	1.102	1.052	0.994	0.737	0.529	0.339	0.208
10	1.042	1.049	0.910	0.767	0.583	0.352	0.199
11	1.085	1.072	0.922	0.768	0.553	0.340	0.191
12	1.057	1.147	0.883	0.798	0.553	0.368	0.200

ตารางที่ ก.7 ผลการหาค่า inter-variation assay ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

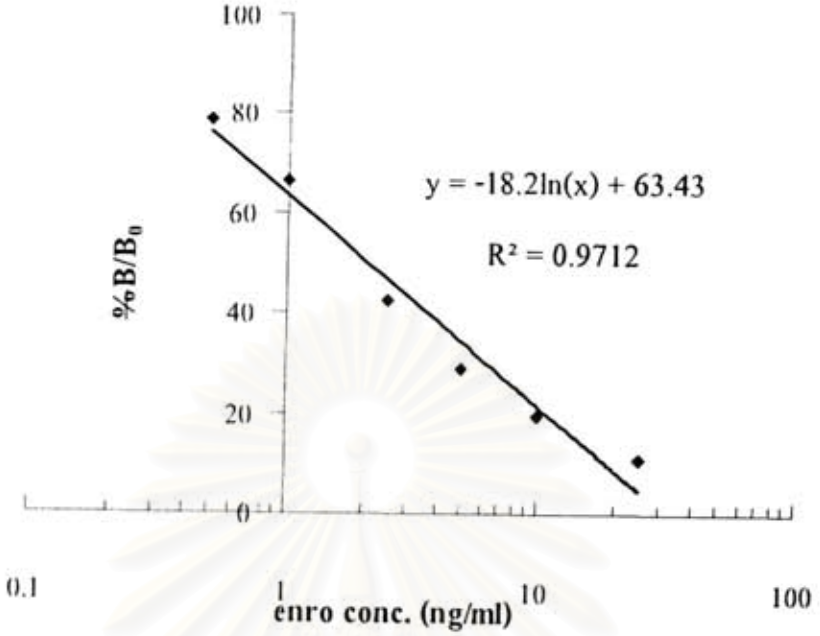
ความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซิน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	จำนวนซ้ำที่			
	1	2	3	4
0	1.088	1.145	1.103	1.111
0.5	0.999	1.005	0.901	0.958
1	0.935	0.960	0.761	0.832
2.5	0.773	0.874	0.665	0.745
5	0.553	0.581	0.444	0.522
10	0.342	0.343	0.257	0.314
25	0.195	0.159	0.172	0.170

ตารางที่ ก.8 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเนื้อไก่ น้ำนม และปัสสาวะโค

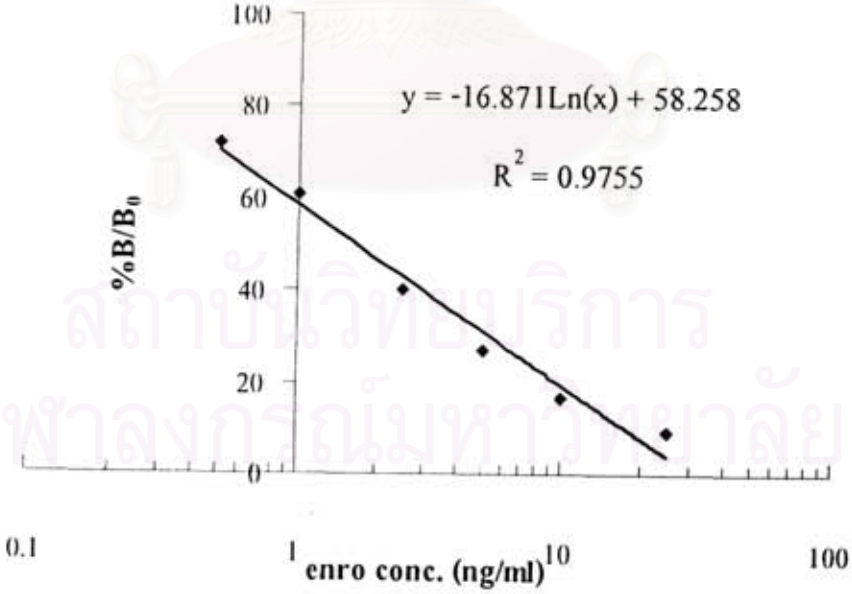
ความเข้มข้นของ	%B/B$_0$			
เอนโรฟลอกซาซิน	PBS	80:20	35:65	8:92
(นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	(Std curve)	methanol:PBS	ethanol:PBS	methanol:PBS
0	100.00	100.00	100.00	100.00
0.5	81.67	79.36	74.20	85.58
1	68.97	64.29	63.64	69.99
2.5	52.26	43.99	45.98	43.38
5	31.18	27.51	29.12	30.55
10	23.31	19.78	19.58	19.56
25	11.54	11.72	13.01	11.83



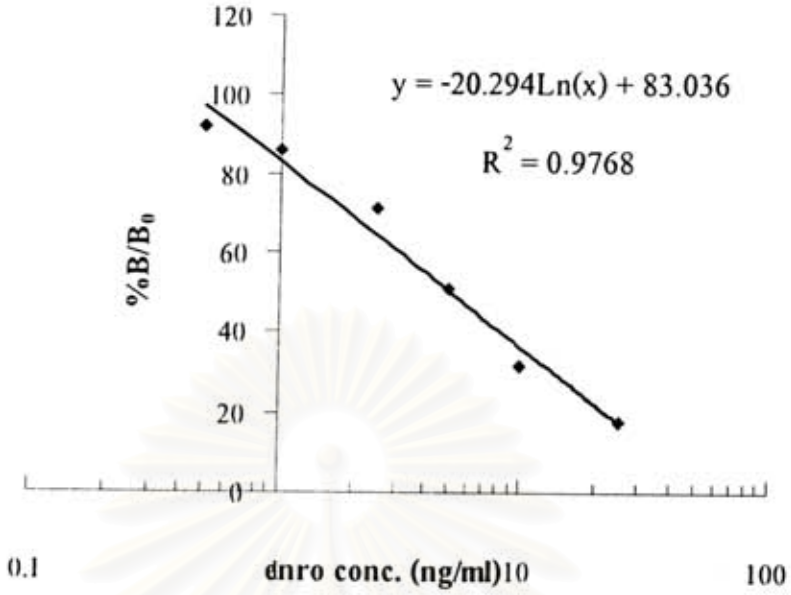
รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ครั้งที่ 1



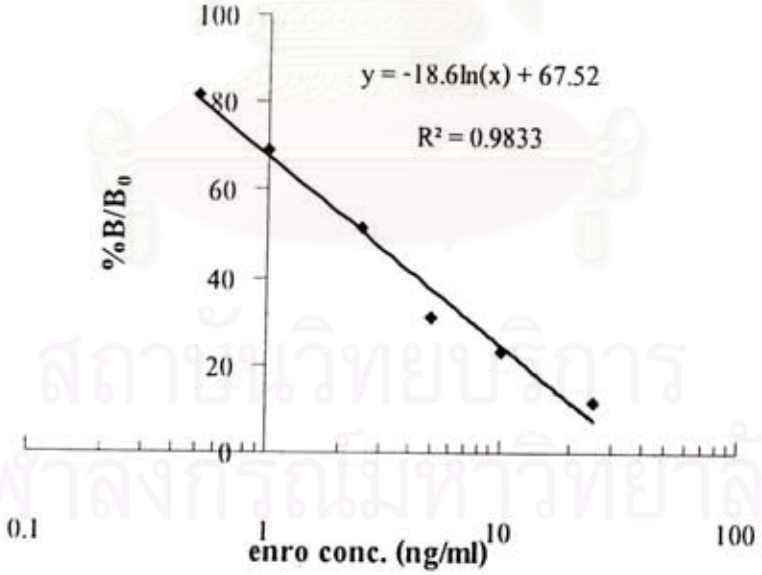
รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ครั้งที่ 2



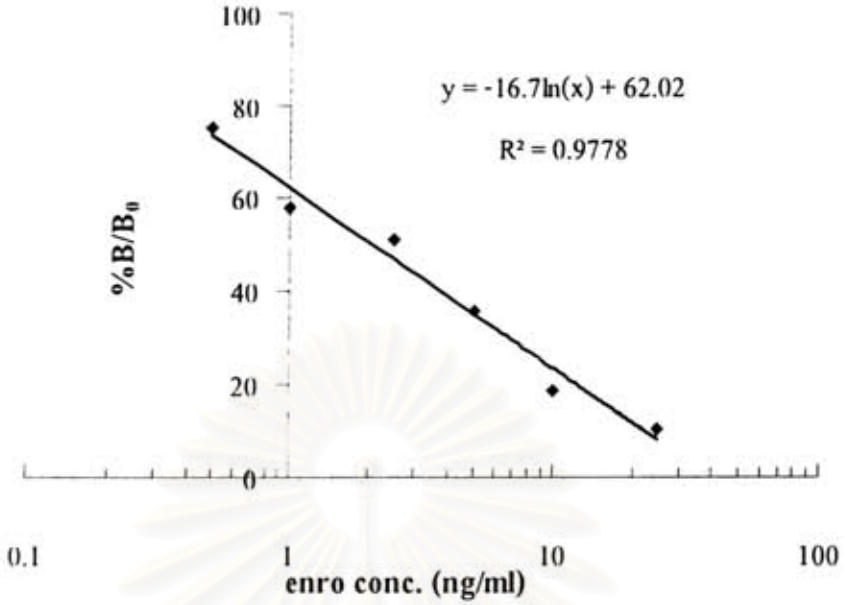
รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเนื้อไก่ครั้งที่ 3



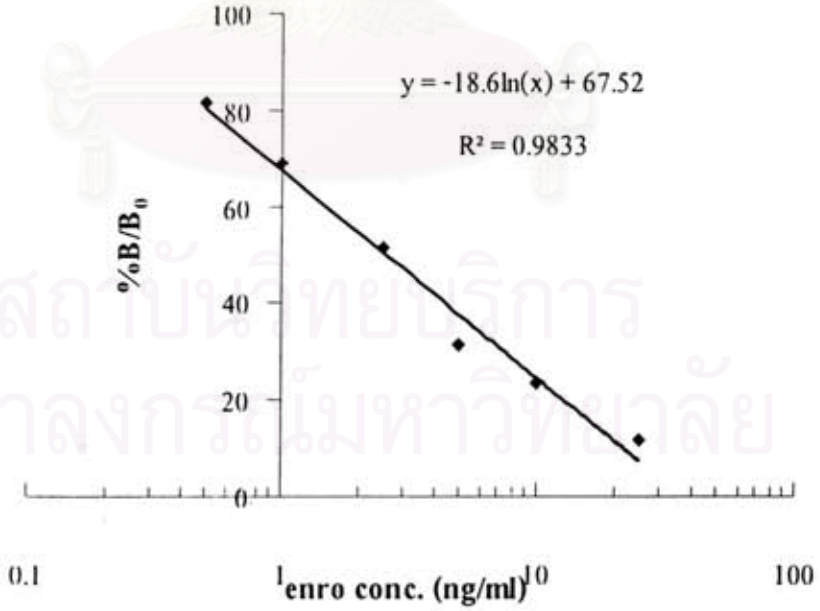
รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 1



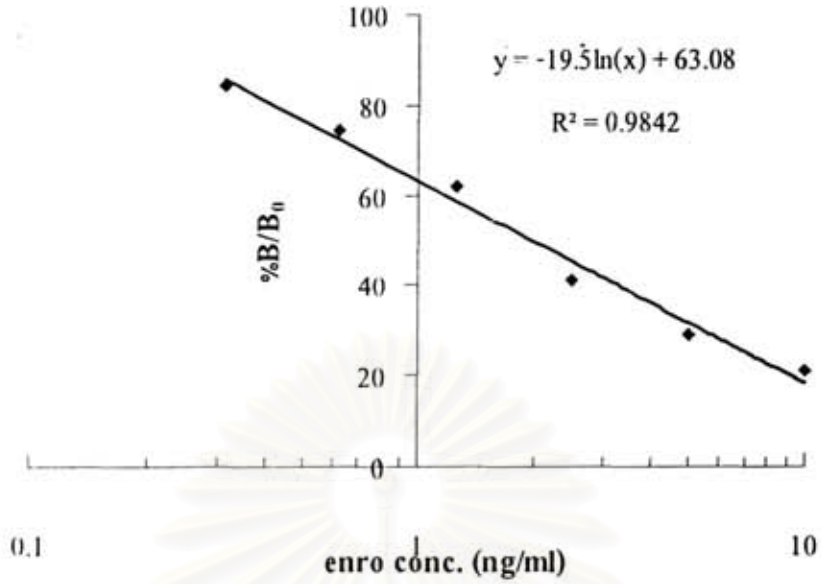
รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 2



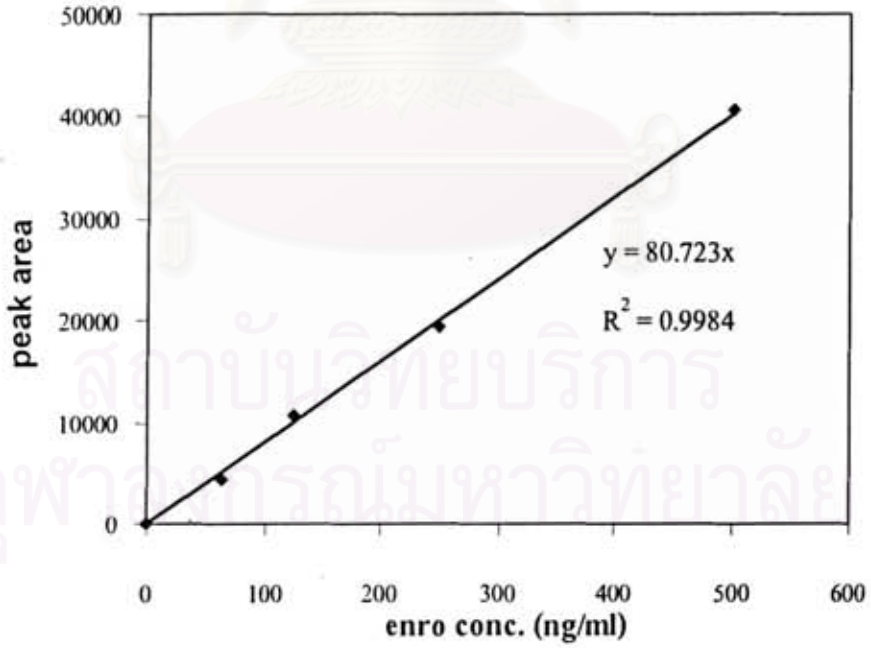
รูปที่ ก.11 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างน้ำนมโค และปัสสาวะโค ครั้งที่ 3



รูปที่ ก.12 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ใช้หาความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA)

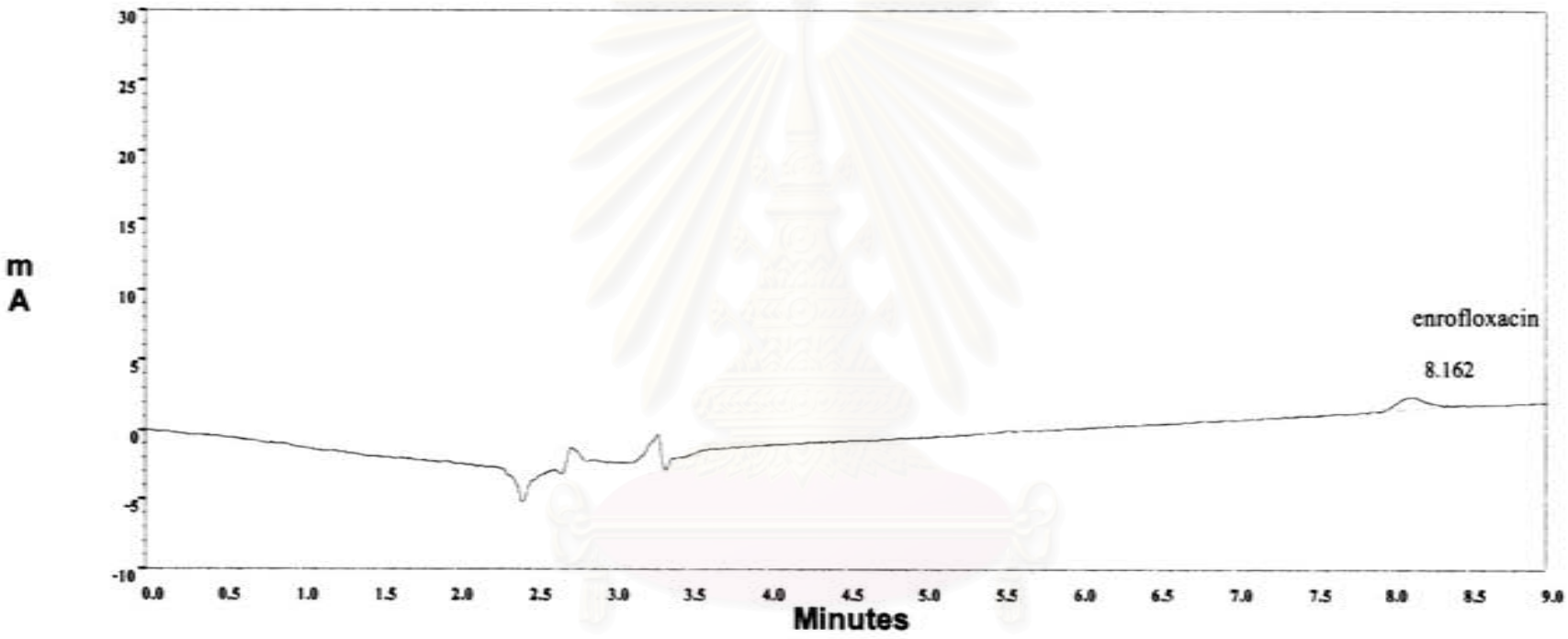


รูปที่ ก.13 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบเอนโรฟลอกซาซินของบริษัท (EURO-DIAGNOSTICA) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ



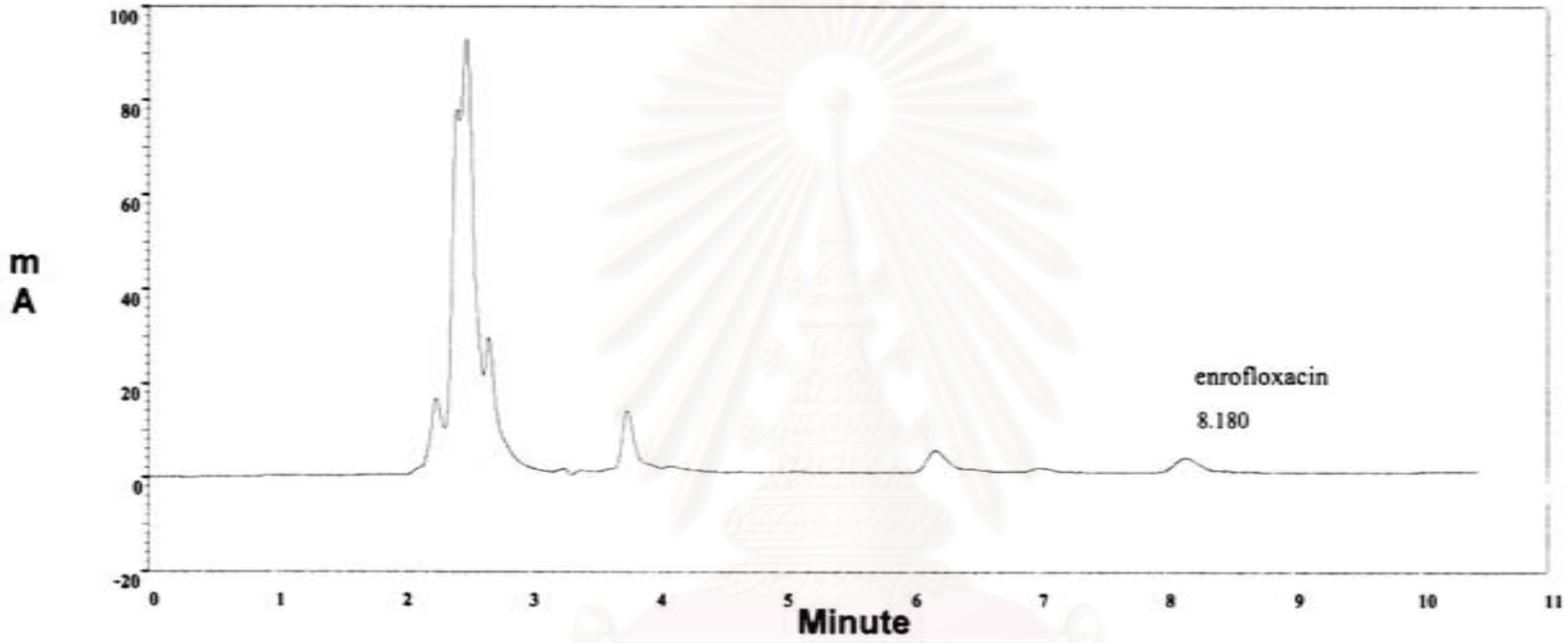
รูปที่ ก.14 กราฟมาตรฐานของเอนโรฟลอกซาซินความเข้มข้น 0-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของเอนโรฟลอกซาซินในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

รูปที่ ก.15 โครมาโตแกรมของเอนโรฟลอกซาซินความเข้มข้น500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC



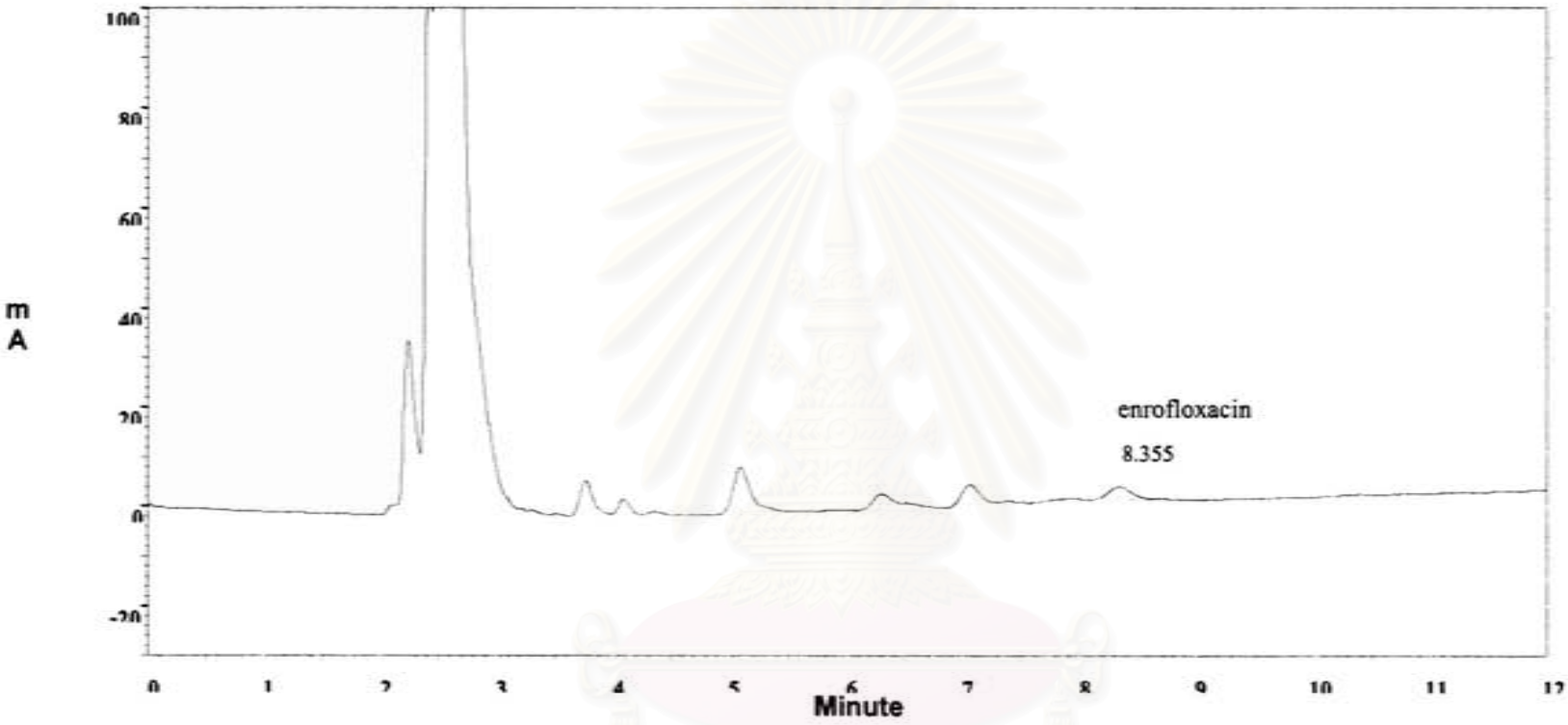
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.16 โครมาโตแกรมของตัวอย่างเนื้อไก่ที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC



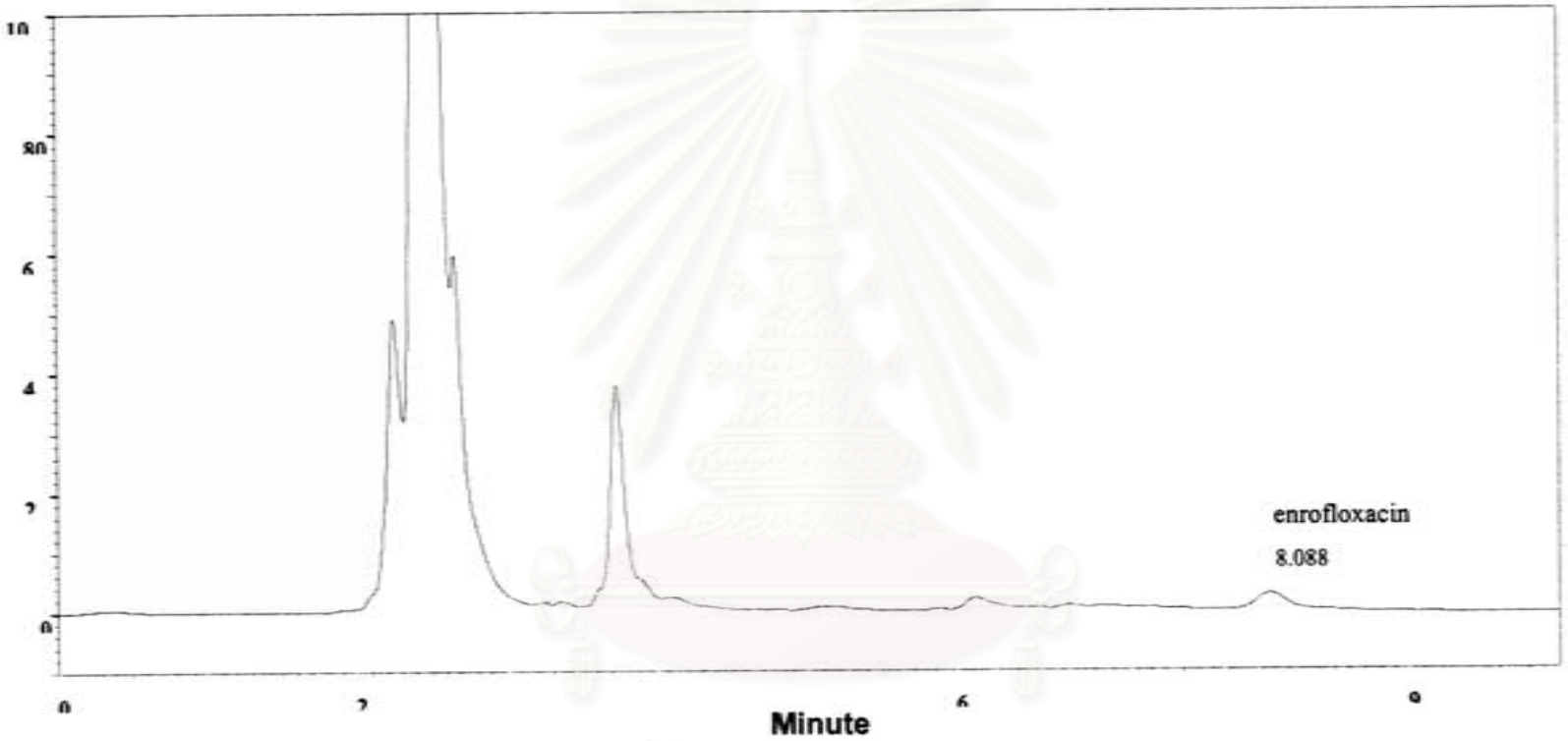
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.17 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ก.18 โครมาโตแกรมของตัวอย่างปัสสาวะโคที่เติมเอนโรฟลอกซาซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer (Stock reagent)

ชั่ง NaH_2PO_4	27.6	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000	มิลลิลิตร
ชั่ง Na_2HPO_4	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock 0.2 M Phosphate buffer

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

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1.0	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	19	ลิตร
อาจเติม 10 เปอร์เซ็นต์ Thimerosal (preservative)	20	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกรองสารละลาย แล้วเก็บใส่ถังสีขาว

3. 5% นมพร่องมันเนย (Blocking solution)

นมพร่องมันเนย mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

4. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na_2HPO_4	11.9	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000	มิลลิลิตร
Citric acid	7	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 เก็บใส่ขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. 0.1 Sodium Acetate beffer, pH 6.0

C2H3O2Na H2O	13.6	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด้วยกรด จนได้ pH 6.0 เก็บใส่ขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Substrate OPD

O-phenylenediamine	6	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer pH 5.0	15	มิลลิลิตร
30 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2	6	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. Substrate TMB

3,3',5,5'-tetramrthylbenzidine	1	มิลลิกรัม
0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0	10	มิลลิลิตร
30 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2	3.14	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

8. 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

9. 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

18 M H_2SO_4	102	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	898	มิลลิลิตร

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
L-glutamine	0.1	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Sodium pyruvate	0.11	กรัม
Penicllin G Sodium	1000000	ยูนิต
Streptomycin sulfate	1	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water)	1	ลิตร

กรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ผสม FCS 10 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมน้ำยาแช่แข็งเซลล์

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

ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมเอนโรฟลอกซาซินกับ BSA และ HRP

0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Bovine serum albumin	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

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

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M citrate buffer, pH 3

citric acid	0.1	M
Na_2HPO_4	0.1	M

   ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M Phosphate buffer, pH 8

   ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 1 M Tris HCl buffer, pH 9

   Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

   HCl 1 M

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stacking and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separating gel (10%)
distill water	1.46	4.8
40% Acrylamide gel	0.25	2.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	2.5
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	-
10% SDS	0.02	0.1
10% APS	0.02	0.1
TEMED	0.002	0.004
final volume (ml)	2	10

2. Sample buffer

SDS	2	%
Bromophenol blue	0.01	%
Glycerol	10	%
beta-mercaptoethanol	10	%
60 mM Tris (pH 6.8)		

3. Running buffer (1X) 1 L

Tris	3.02	กรัม
Glycine	18.8	กรัม
SDS	1.0	กรัม

4. Coomassie brilliant blue (250 ml)

Coomassie Brilliant blue R-250	0.25	%
Methanol	50	%
Acetic acid	10	%

5. Destaining solution (1 L)

Methanol	5	%
Acetic acid	10	%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิติกานต์ วงศ์พานิช เกิดเมื่อวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด ลพบุรี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย