

การพัฒนาชุดตรวจสอบแร่โทพามีนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาวกนกกร คงอาษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ลงทะเบียนที่สำนักงานวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

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

Miss Kanokkorn Khongarsa

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจสอบแร่โทพามีนโดยใช้เทคนิค
	เอนไซม์ลิ่งค้อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์
โดย	นางสาวกนกกร คงอาษา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาคยา งามโรจนวิชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชวโงพงาง)

กนกกร คงอาษา: การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกโทพามีนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์. (DEVELOPMENT OF RACTOPAMINE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 136 หน้า.

แรกโทพามีนเป็นสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ และได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับสุกรและโคกระบือโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา เพื่อเร่งการสร้างโปรตีนและเร่งการสลายไขมัน ทำให้สัตว์มีกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มประเทศในยุโรปและเอเชียห้ามใช้แรกโทพามีนเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ จึงได้มีการกำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดที่ให้มีได้ (Maximum Residue Limits, MRL) ทำให้ต้องมีการตรวจวัดปริมาณแรกโทพามีนในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเนื่องจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAb) ต่อแรกโทพามีน ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้แอนติบอดีดังกล่าวตรวจวัดแรกโทพามีนด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ในรูปแบบต่างๆ จากการทดลองพบว่า Direct competitive ELISA (RAC-HRP) ให้ค่าปริมาณของสารที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง B/Bo ลดลงครึ่งหนึ่ง (50% inhibition concentration, IC₅₀) และค่าปริมาณสารต่ำสุดที่วัดได้ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 21.0 และ 5.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) จะให้ค่า IC₅₀ และ LOD เท่ากับ 0.60 และ 0.09 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และในรูปแบบสุดท้าย Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) มีค่า IC₅₀ และ LOD เท่ากับ 0.23 และ 0.035 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ รูปแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) สามารถตรวจวัดแรกโทพามีนได้ในช่วงความเข้มข้น 0.05-5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ ต่ำกว่า 48.5% แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ต่ำกว่า 0.01% เมื่อทดสอบหาปริมาณแรกโทพามีนในตัวอย่างเนื้อหมูที่เติมแรกโทพามีนลงไป พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 85-108% และ % coefficient of variation (CV) อยู่ในช่วง 1.6-14.7% ผลการทดลองต่างๆ แสดงว่าการใช้ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เหมาะสมสำหรับตรวจหาแรกโทพามีนในตัวอย่างเนื้อหมู

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272691023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : RACTOPAMINE / ELISA TEST KIT / BETA-AGONIST

KANOKKORN KHONGARSA : DEVELOPMENT OF RACTOPAMINE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. ADVISOR : NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., CO-ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 136 pp.

Ractopamine is a chemical in the beta-adrenergic agonist group and has been approved to be used as a feed additive for swine and cattle by the U.S. Food and Drug Administration. It is used to accelerate protein synthesis and lipid degradation in order to increase animal muscles. However, many countries in the European Union (EU) and Asia banned the use of ractopamine as the feed additive. Consequently, the maximum residue limits (MRLs) of ractopamine were set, leading to the need of ractopamine monitoring in animal product. Since, the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering had success in the production of monoclonal antibody (mAb) against ractopamine, the objective of this research was to evaluate the efficiency of the obtained antibody in ractopamine detection based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in various formats. The results showed that direct competitive ELISA (RAC-HRP) gave the 50% inhibition concentration (IC_{50}) and the limit of detection (LOD) at 21.0 and 5.33 ng/ml, respectively. While, indirect competitive ELISA (GAM-HRP) gave the IC_{50} and LOD value of 0.60 ng/ml and 0.09 ng/ml respectively. And, the last format, indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) yielded the IC_{50} and LOD value of 0.23 ng/ml and 0.035 ng/ml respectively. The detection range of indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) was between 0.05 ng/ml and 5 ng/ml. The monoclonal antibody cross-reacted to other beta-agonist lower than 48.5% while cross-reacted to other chemical besides beta-agonists lower than 0.01%. The detection of ractopamine in ractopamine-spiked meat samples revealed the %recovery value between 85-108% and the % coefficient of variation (CV) between 1.6-14.7%. Taken together, the result obtained from this study indicated that the Ab-captured indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP conjugate) was suitable for the detection of ractopamine in meat samples.

Field of Study : BIOTECHNOLOGY..... Student's Signature.....

Academic Year : 2012..... Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ชนาภัทร ปาลกะ และ คุณทรงจันทร์ ภูทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวิชัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และอาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง (ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำ พร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ โครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ (AM1023A) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอนุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้อง 803ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ในทุกๆ ด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุขตลอดมา ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น รวมทั้ง พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้านด้วยดีตลอดมา

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

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปที่.....	ฉ
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ค
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.1.1 สารเบตาอะโกนิสต์.....	4
2.1.2 แร็กโทพามีน.....	6
2.1.3 การตรวจวิเคราะห์ RAC.....	9
2.1.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์.....	10
2.1.5 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA.....	15
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 เซลล์ไฮบริโดมา.....	25
3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.3 การดำเนินงานวิจัย.....	31
3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา.....	31
3.3.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อ RAC กับ BSA.....	32

บทที่	หน้า
3.3.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RAC.....	35
3.3.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography.....	36
3.3.5 การหาปริมาณแอนติบอดี.....	37
3.3.6 การทดสอบความบริสุทธิ์และหาผลโมเลกุลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	37
3.3.7 การเตรียมชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA.....	38
3.3.7.1 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP).....	39
3.3.7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP).....	40
3.3.7.3 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	42
3.3.8 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	43
3.3.9 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	45
3.3.9.1 การหาค่าความไว (sensitivity).....	45
3.3.9.2 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy).....	46
3.3.9.3 การหาค่าความแม่นยำ (precision).....	46
3.3.9.4 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity).....	47
3.3.10 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่าง.....	48
3.3.10.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	48
3.3.10.2 การศึกษาผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมู ต่อการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	50
3.3.10.3 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	52
3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค LC-MS/MS.....	52
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	54
4.1 การเชื่อมต่อ RAC กับ โปรตีน BSA.....	54

บทที่	หน้า
4.2 การทดสอบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา.....	57
4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้ protein G affinity chromatography.....	58
4.4 การหาปริมาณแอนติบอดี.....	59
4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุล ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	60
4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP).....	62
4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP).....	66
4.8 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	69
4.9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ.....	72
4.10 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	73
4.9.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin เมื่อทำการแปรอุณหภูมิ.....	73
4.9.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ เมื่อทำการแปรอุณหภูมิ.....	74
4.9.3 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP).....	77
4.11 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	81
4.11.1 ค่าความไว ของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	81
4.11.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	81
4.12 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	84
4.12.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	84
4.12.2 การศึกษาระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	85
4.12.3 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	86
4.13 การวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค LC-MS/MS.....	88
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	90

บทที่	หน้า
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก.....	98
ภาคผนวก ข.....	129
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	136

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้างของ RAC โดยคณะกรรมการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ.....	8
3.1 แสดงรายการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
3.2 แสดงรายการสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3.3 เวลาและอุณหภูมิที่นำไปทดสอบกับสาร RAC ในรูปอิสระ.....	44
4.1 ปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA ด้วยวิธี BCA.....	56
4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate ด้วยวิธี TNBS.....	57
4.3 ผลการทดสอบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา รหัสโคลน 10A4 ด้วยวิธี Indirect ELISA.....	58
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA.....	60
4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ RAC-HRP ด้วยวิธี BCA.....	64
4.6 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ RAC ที่เชื่อมต่อกับ HRP เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA.....	64
4.7 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และแอนติบอดี เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP).....	67
4.8 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และ Ab-biotin เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	70
4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ.....	72
4.10 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และ Ab-biotin เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	74
4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกราฟความไวที่ใช้สำหรับเลือกช่วงของ กราฟมาตรฐาน.....	78
4.12 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรที่ได้จากการทำ Indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน ของชุดตรวจสอบ RAC ต้นแบบ.....	80

ตารางที่	หน้า
4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) เพื่อใช้คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ.....	81
4.14 ค่า IC ₅₀ และผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเบต้าอะ โกลินิสต์	83
4.15 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	86
4.16 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	88
4.17 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อหมูด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค LC-MS/MS.....	89
ก.1 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสารจากการทำ TLC.....	98
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA.....	99
ก.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณ โปรตีนของ RAC-BSA.....	100
ก.4 ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate ด้วยวิธี TNBS.....	101
ก.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	102
ก.6 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและระยะทางในการเคลื่อนที่จากการทำ SDS-PAGE.....	103
ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี.....	105
ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 1.....	107
ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 2.....	108
ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 3.....	109
ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 1.....	110
ก.12 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 2.....	111

ตารางที่	หน้า
ก.13 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 3.....	112
ก.14 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 1.....	113
ก.15 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 2.....	114
ก.16 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 3.....	115
ก.17 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 1.....	116
ก.18 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 2.....	117
ก.19 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 3.....	118
ก.20 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้ เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องครั้งที่ 1.....	119
ก.21 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้ เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องครั้งที่ 2.....	120
ก.22 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้ เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องครั้งที่ 3.....	121

ตารางที่	หน้า
ก.23 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร Dobutamine HCl, Dopamine HCl, Clenproperal และ Bromchlorobuteral เมื่อทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลา บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการคำนวณหา % CR.....	122
ก.24 แสดงค่าความเข้มข้นของ RAC และค่า % B/B ₀ จากการศึกษาผลกระทบ ของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูต่อการวัด ELISA.....	124
ก.25 แสดงค่าความเข้มข้นของ RAC และค่า % B/B ₀ ในการศึกษาระดับการเจือจาง แมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	125

สารบัญรูปที่

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร RAC และสารอื่นๆ ในกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์.....	7
2.2 หลักการของ direct ELISA.....	11
2.3 หลักการของ indirect ELISA.....	12
2.4 หลักการของ competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์.....	13
2.5 หลักการของ competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์.....	14
2.6 หลักการของ competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin.....	15
2.7 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน.....	16
2.8 โครงสร้างของแอนติบอดีไอโซไทป์ต่างๆ.....	17
2.9 โครงสร้างของ polystyrene.....	19
2.10 ตัวอย่างของ biotin- streptavidin system.....	20
3.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate.....	33
3.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบของเมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู.....	49
3.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลของระดับการเจือจางเมทริกในเนื้อหมู ต่อการตรวจวัดด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	51
3.4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู.....	52
4.1 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate เมื่อส่องดูด้วยแสง อุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร.....	55
4.2 โครมาโทแกรมแสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ protein G sepharose.....	59
4.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของ โมโน โคลนอน แอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	62
4.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Direct competitive ELISA (RAC-HRP).....	66
4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP).....	68

รูปที่	หน้า
4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	71
4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาลบม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	76
4.8 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร RAC ในรูปอิสระ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาลบม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง.....	77
4.9 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของ RAC ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	79
4.10 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP).....	80
4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ RAC ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง เนื้อหมูและตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อหมู.....	84
4.12 ผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมู.....	85
ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของ RAC-BSA.....	99
ก.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างมวล โมเลกุลและค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานจากการทำ SDS-PAGE เพื่อใช้ในการเทียบหามวล โมเลกุลของแอนติบอดีหลังการทำให้ บริสุทธิ์.....	104
ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณ โปรตีน ของ แอนติบอดี.....	105
ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณ โปรตีน ของ RAC-HRP.....	106
ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) ของโปรตีนมาตรฐานเพื่อใช้ในการเทียบหาน้ำหนัก โมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากการ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	106

รูปที่	หน้า
ก. 6 กราฟแสดงความไวของสาร Dobutamine HCl, Dopamine HCl, Clenproporal และ Bromchlorobuteral เพื่อใช้ในการคำนวณหา % CR.....	123
ก. 7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูเพื่อเปรียบเทียบกับวิธี LC-MS/MS.....	125
ก. 8 แสดงกราฟมาตรฐานของ RAC ที่ความเข้มข้นที่ 0.1-5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี LC-MS/MS ของบริษัท Central lab.....	126
ก. 9 แสดงโครมาโตแกรมของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี RAC เข้มข้น 5 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	127
ก. 10 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เดิม RAC เข้มข้น 5 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	128

คำย่อและสัญลักษณ์

A	Absorbance
Ab	Antibody
ABTS	2, 2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)
Ag	Antigen
AP	Alkaline phosphatase
APS	Ammoniumpersulfate
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
CAC	Codex Alimentarius Commission
CAP	Chloramphenicol
CR	Cross-reactivity
CV	Coeffecient of variation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSC	N.N'-Disuccinimidyl carbonate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agriculture Organization
FCS	Fetal calf serum
GAM-HRP	HPR-labelled goat anti-mouse IgG
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
H	Heavy chain
HRP	Horseradish peroxidase
HPLC	High-liquid performance chromatography
IC ₅₀	50% of Inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
kDa	Kilodalton
L	Light chain

LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry/ mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
MRL	Maximum residue limits
OD	Optical density
OPD	<i>O</i> -phenylenediamine
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	0.05% PBS-Tween 20
PMP	Phenolphthalein monophosphate
PNP	p-Nitrophenyl phosphate
RAC	Ractopamine
R _f	Relative mobility
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPE	Solid phase extraction
SPR	Surface plasmon resonance
TC	Tetracycline hydrochloride
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TLC	Thin-layer chromatography
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine
WHO	World Health Organization

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แรกโทพามีน (Ractopamine, RAC) เป็นสารเคมีในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ (Beta-agonist) ซึ่งสารในกลุ่มนี้เป็นตัวยาสำคัญในการบรรเทาอาการหอบในผู้ป่วยโรคหอบหืด มีฤทธิ์ในการกระตุ้นหัวใจ ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเร็วขึ้น ช่วยในการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ขยายหลอดลมทำให้หายใจได้สะดวกขึ้น [Barnes et al., 1997] นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังช่วยในการสลายไขมันและสร้างกล้ามเนื้อ จึงมีการลักลอบนำสารกลุ่มนี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร เช่น โคเนื้อ สุกร ทำให้เนื้อมีลักษณะแดงสด ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค จึงนิยมเรียกสารกลุ่มนี้ว่า “สารเร่งเนื้อแดง” เมื่อมีการใช้ในปริมาณมากขึ้น ทำให้มีปริมาณสารตกค้างมาถึงผู้บริโภค ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคมีอาการหัวใจเต้นเร็วผิดปกติ กล้ามเนื้อหัวใจล้น กระวนกระวาย วิงเวียน ปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคต่อมไทรอยด์

สารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผสมอาหารและน้ำดื่มของสัตว์ เช่น สาร clenbuterol (Clenbuterol) ใช้ชื่อทางการค้าคือ เลนคอด โดโซลบี แอมโพรฟิด บีดอล 2201 และแมคโดเอส สารซัลบูตามอล (Salbutamol) ชื่อทางการค้าคือเวนโทลิน (Ventolin™) และ RAC สำหรับใช้กับสุกรมีชื่อทางการค้าคือเพย์ลีน (Paylean™) และสำหรับใช้กับโค มีชื่อทางการค้าคือออพตาเฟรกซ์ (Optaflexx™) สำหรับใช้กับไก่วง มีชื่อทางการค้าคือ โดแมกซ์ (Tomax™) สารซิลพาเทอร์อล (Zilpaterol) มีชื่อทางการค้าคือ ซิลแมกซ์ (Zilmax™) สำหรับประเทศไทยเริ่มแรกได้นำเข้า clenbuterol มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสุกร โดยมีการระบุผลว่าเป็นกากงา หรือกากถั่ว และมีการใช้อย่างแพร่หลายในฟาร์มสุกร จนกระทั่งกระทรวงพาณิชย์เห็นว่ามีการนำสาร clenbuterol มาใช้กับสัตว์ และตรวจพบสารตกค้างในเนื้อสัตว์ซึ่งปกติไม่มีการนำ clenbuterol มาเป็นส่วนผสมในยารักษาผู้ป่วย และส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงได้มีมาตรการเข้มงวดมากขึ้นในการสั่งนำเข้าสาร clenbuterol และสั่งยกเลิกการจำหน่ายเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ทำให้เกษตรกรหันมาใช้ซัลบูตามอลเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์แทน เพราะมีการใช้เป็นส่วนผสมในยาพ่นขยายหลอดลมในผู้ป่วยอยู่แล้ว เมื่อมีการลักลอบใช้กับสัตว์มากขึ้น จึงมีมาตรการเข้มงวดมากขึ้นในการนำเข้าสารดังกล่าวเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการใช้ RAC เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์แทน และในปี 2546 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ของสหรัฐอเมริกาได้มีการอนุญาตให้ใช้ RAC เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย แต่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ในขณะที่ทวีปยุโรป และเอเชียโดยเฉพาะประเทศจีนห้ามใช้สารกลอนบลูเทอร์อลเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์และห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของกลอนบลูเทอร์อล ในขณะที่ RAC ยังอนุญาตให้ใช้ในอาหารสัตว์ได้ แต่ก็มี การควบคุมปริมาณการใช้ อย่างเข้มงวด [Limin et al., 2007] เนื่องจากการตกค้างของ RAC ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และ ยังส่งผลเสียต่อธุรกิจการส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ทำให้ประเทศคู่ค้าให้ความสำคัญกับคุณภาพสินค้า ให้มีความปลอดภัย ไม่มี RAC ตกค้าง รวมถึงในประเทศไทยเองได้มีการออกประกาศกระทรวงเกษตร และสหกรณ์ ห้ามใช้สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ และห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์ จากสัตว์ที่มีสารตกค้างของสารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 [เกษตรและสหกรณ์, 2545] แต่ยังคงพบมีการลักลอบใช้สารเร่งเนื้อแดงในอาหารสุกรอยู่ เพื่อให้เนื้อเป็นสีแดง ดูสด เป็นที่นิยมของผู้บริโภค เพื่อยอดการขายโดยไม่คำนึงถึงผลกระทบต่อสุขภาพ ของผู้บริโภค ดังนั้นจึงทำการต้องตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างในเนื้อสัตว์ก่อนนำเข้าและส่งออกสู่ ประเทศคู่ค้า

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของสารเร่งเนื้อแดงในผลิตภัณฑ์จากสัตว์จะใช้วิธีการ ตรวจ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) [Limin et al., 2007] เทคนิค High-liquid performance chromatography (HPLC) และเทคนิค Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) [Takatosh et al., 2007] ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่แม่นยำ มีความไวและประสิทธิภาพสูง แต่เนื่องจากวิธีทางเคมีนี้จะใช้เวลาใน การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างนาน มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ต้องมี ผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้โดยเฉพาะ อุปกรณ์เครื่องมือวิเคราะห์ก็ราคาสูง และค่าใช้จ่ายในการตรวจแต่ละ ตัวอย่างราคาค่อนข้างแพง ประมาณ 3,000 บาทต่อ 1 ตัวอย่าง วิธีที่สองคือ วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาโดย อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เช่น เทคนิค Surface plasmon resonance (SPR) [Weilin et al., 2003] เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) [Weilin และ Smith, 2002] ซึ่งเทคนิค ELISA มีข้อดี คือ มีความจำเพาะสูงใกล้เคียงกับเทคนิคทางเคมี สะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย ไม่ ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง และ ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งต่ำกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องทำการตรวจหาปรีมารสารตกค้างก่อนเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ RAC ด้วยเทคนิค ELISA ต้องตั้งซื้อนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ ราคาประมาณ 25,000 บาทต่อหนึ่งชุดตรวจสอบ ซึ่งเป็นราคาที่สูง ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาชุดตรวจสอบ RAC สำหรับใช้เองภายในประเทศ เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง กอปรกับทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC เป็นผลสำเร็จ จึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ แอสเสย์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ RAC ด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์แบบต่างๆ ซึ่งเตรียมจากแอนติบอดี
- 1.2.2 ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู

1.3 ขั้นตอนการวิจัย

- 1.3.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- 1.3.2 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ RAC
- 1.3.3 ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์
- 1.3.4 เตรียมสารคอนจูเกตระหว่าง RAC กับโปรตีน BSA และฮอร์เซอร์ราดิซเพอร์-ออกซิเดส
- 1.3.5 เตรียมชุดตรวจสอบ ELISA ในรูปแบบต่างๆ และประเมินประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ RAC มาตรฐาน
- 1.3.6 วิเคราะห์ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู
- 1.3.7 วิเคราะห์ สรุปผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ RAC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 สารเบตาอะโกนิสต์ (Beta-agonist)

สารเบตาอะโกนิสต์จัดอยู่ในกลุ่มของ Adrenaline Drug เช่นเดียวกับ Adrenaline, Amphetamine และ Ephedrine สารในกลุ่มนี้ส่วนมากจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วย aromatic ring และ amino group แต่ต่างกันในส่วนที่เป็น side-chain ของ amino group [Zhang et al., 2010; He et al., 2008] ตัวอย่างสารที่อยู่ในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ เช่น RAC เทอบูตาไลน์ (terbutaline) ฟิโนเทอร์อล (fenoterol) ซัลบูตามอล (salbutamol) เคลนบูเทอร์อล (clenbuterol) เป็นต้น สารเบตาอะโกนิสต์จะออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับชนิดเบตา (beta-receptor) บนผิวเซลล์ทำให้เกิดการกระตุ้น protein kinases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน [Philipson, 2002] ทำให้มีการสร้างโปรตีนมากขึ้น [Xiao et al., 1999; Pleadin et al., 2012] สารบางตัวในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์เป็นสารสังเคราะห์ที่ใช้เป็นยาสำหรับขยายหลอดลมในผู้ป่วยโรคหอบหืด [Waldeck, 2002] มีผลทำให้กล้ามเนื้อบริเวณรอบๆ หลอดลมขยายตัว หลอดลมจึงขยายขนาดใหญ่ขึ้นทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการหายใจติดขัดหายใจได้สะดวกขึ้น ซึ่งสารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ที่นิยมใช้เป็นตัวยายขยายหลอดลมได้แก่ ฟิโนเทอร์อล เทอบูตาไลน์ และซัลบูตามอล [นิตยสารหมอชาวบ้าน]

2.1.1.1 การใช้สารเบตาอะโกนิสต์ในด้านปศุสัตว์

ปัจจุบันพบว่ามีการนำสารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์มาใช้ในด้านปศุสัตว์ทั้งที่ต่างประเทศและในประเทศไทยเองโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ซัลบูตามอล และเคลนบูเทอร์อล นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารและน้ำดื่มของสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเนื้อ [Shi et al., 2009] ซึ่งเมื่อสัตว์กินอาหารที่มีส่วนผสมของสารเหล่านี้มีผลต่อตัวสัตว์โดยลดการสะสมไขมัน เพิ่มการสร้างกล้ามเนื้อมากขึ้น [Bracher et al., 1990] ทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้นอาจพบการตายของสัตว์บางชนิด พบอาการทางประสาทคือตื่นตกใจง่าย ตัวสั่น ภาวะนกระวาย เกิดอาการเครียด โดยเฉพาะก่อนนำเข้าโรงฆ่าสัตว์ สัตวอาจชักและตายได้ และลักษณะภายนอกของสัตว์ที่ได้รับสารเบตาอะโกนิสต์จะมีลักษณะมีกล้ามเนื้อแน่นเด่นกว่าปกติโดย เฉพาะบริเวณสะโพก ขาหลัง สันหลังและบริเวณหัวไหล่

สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทำให้ปริมาณไขมันในร่างกายลดลง มีกล้ามเนื้อมากขึ้น เจริญเติบโตเร็ว [Shishani et al., 2003] เมื่อฆ่าและเนื้อขายพบว่าลักษณะของเนื้อจะเป็นสีแดงสด เนื้อมีไขมันน้อย ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค เมื่อมีการใช้อย่างแพร่หลายและปริมาณมากขึ้นทำให้เกิดปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค [Mazzanti et al., 2003] ดังนั้นหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบทวีปยุโรป เช่น เบลเยียม สหภาพยุโรปเนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย และเอเชีย เช่น จีน สิงคโปร์ ฮองกง ใต้หวัน เป็นต้น มีการห้ามใช้สารเบตาอะโกนิสต์กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร

สำหรับในประเทศไทยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกราชกิจจานุเบกษา ลงวันที่ 11 กันยายน 2545 ห้ามการนำเข้าอาหารสัตว์ทุกประเภทที่มีส่วนผสมของสารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ และการใช้เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ในการผลิตอาหารสัตว์ แต่ก็ยังพบว่ามีลักลอบนำเข้าและนำสารเบตาอะโกนิสต์ เพื่อเร่งเนื้อแดงในสุกร โดยอาจลักลอบนำเข้ามาหรือสั่งมาในลักษณะของยาที่ใช้ในการรักษาคน

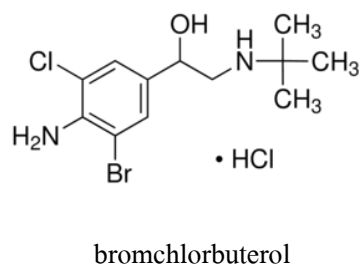
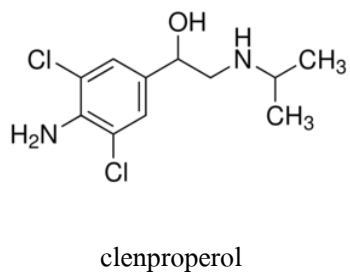
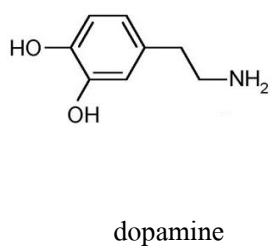
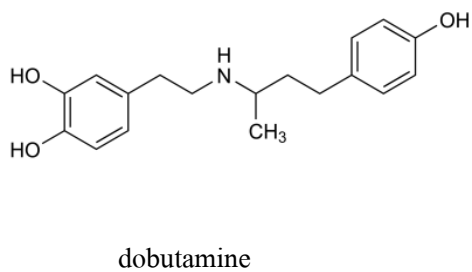
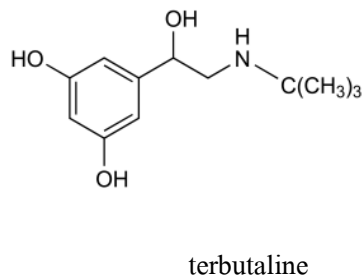
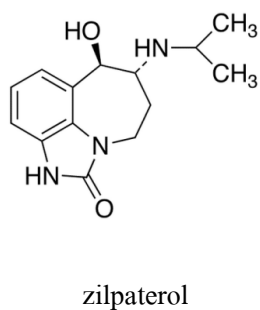
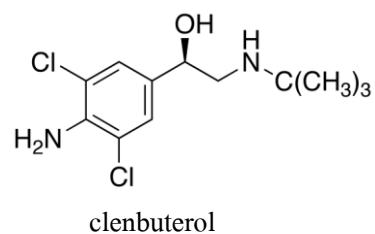
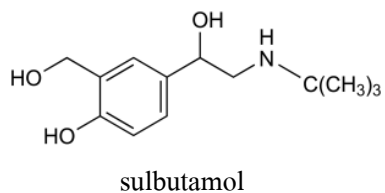
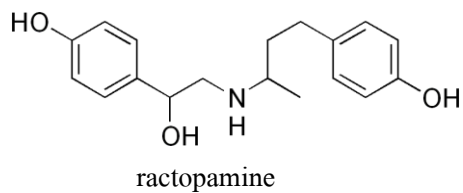
2.1.1.2 ผลกระทบของสารเบตาอะโกนิสต์

ผลกระทบของสารเบตาอะโกนิสต์ส่วนใหญ่จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลาง ทั้งนี้ผู้ที่ได้รับสารกลุ่มนี้จะมีอาการแตกต่างกันไปขึ้นกับปริมาณสารที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย เช่น เกิดอาการกล้ามเนื้อกระตุก มือสั่น ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน กระวนกระวาย หัวใจเต้นผิดปกติ [Martinez-Navarro, 1990; Mitchell and Dunnavan, 1998] ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเกิดอาการหัวใจวายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ บางรายอาจมีอาการทางประสาทด้วย และเป็นอันตรายมากสำหรับหญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง โดยเฉพาะชัลบูทามอล เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อ Na-K-ATPase [Huang et al., 1993; Kuiper et al., 1998] ทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง ดังนั้นการใช้ยานี้ต้องระมัดระวังมากในคนป่วยโรคเบาหวาน นอกจากนี้สารเทอบูทาลีน (Terbutaline) จะทำให้กล้ามเนื้อเรียบในกระเพาะปัสสาวะคลายตัวและอาจปัสสาวะไม่ออกมีปัสสาวะคั่ง [Clouse et al., 2007]

2.1.2 แร็กโทพามีน

2.1.2.1 การใช้แร็กโทพามีน

แร็กโทพามีน (RAC) เป็นสารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ มีชื่อทางเคมีคือ 4-[3-[[2-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino]butyl]phenol สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{23}NO_3$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 301.38 ละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีขาวหรือสีขาวครีม RAC เข้าสู่ร่างกายสัตว์ จะเข้าสู่กระแสเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อ โดย RAC จะจับกับรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์แล้วเร่งกระบวนการสลายไขมัน ทำให้ปริมาณไขมันในไขมันหลังลดลง เร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ เร่งกระบวนการสร้างโปรตีน มีผลทำให้ปริมาณกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น [He et al., 2008; Michell et al., 1990; Veenhuizen et al., 1987] RAC ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตมากกว่า 20 ประเทศทั่วโลก รวมทั้งแคนาดา และสหรัฐอเมริกาด้วย [Zhang et al., 2010] โดยเมื่อปี 2003 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สหรัฐอเมริกา [FDA, 2003] ได้จดทะเบียนให้ใช้ RAC เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ สำหรับประเทศบราซิล เวเนซุเอลา โคลัมเบีย กัวเตมาลา สาธารณรัฐโดมินิกัน ฟิลิปปินส์ [Anonymous, 2001; Weilen et al., 2002] แคนาดา ออสเตรเลีย และเม็กซิโก [European Food Safety Authority, 2009] อนุญาตให้ใช้ และกำหนดให้ RAC เป็นสารควบคุมในอาหารสัตว์ แต่อีกกว่า 150 ประเทศเช่นสหภาพยุโรป จีน ญี่ปุ่น ได้มีการห้ามใช้ RAC เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต [Zhang et al., 2010] สำหรับประเทศไทยมีการพยายามขอจดทะเบียนอนุญาตให้ใช้เพื่อการปศุสัตว์แต่ยังมีรายงานพบการลักลอบใช้ RAC ในเมืองไทยเช่นกัน โดยเกษตรกรนิยมนำ RAC มาใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเนื้อ เช่น สุกร โคเนื้อ รวมทั้งสัตว์ปีกด้วย และได้ผลต่อสัตว์ประเภทโคมากกว่าสุกร มากกว่าไก่ ตามลำดับ ทำให้สัตว์มีกล้ามเนื้อมาก ลักษณะของเนื้อเป็นสีแดง ตรงตามความนิยมของผู้บริโภค และเพื่อผลกำไรทางการค้า ทำให้เกษตรกรนิยมใช้ RAC เพื่อมากขึ้น เมื่อมีปริมาณการใช้มากขึ้น ทำให้เกิดการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเฉพาะส่วนต่างๆของสุกร เช่น ตับ ไต เครื่องใน เนื้อและไขมัน ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค บางรายอาจถึงขั้นเสียชีวิต และหลายประเทศก็มีการนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์รวมทั้งประเทศไทยด้วย จากผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคดังที่กล่าวไว้ข้างต้น องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) กับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) จึงได้มีการประชุมหารือกันเกี่ยวกับการกำหนดปริมาณสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์เพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วโลก



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ RAC และสารอื่นๆ ในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์

2.1.2.2 มาตรฐานสารตกค้างของ RAC

เนื่องจากการอนุญาตให้ใช้ RAC ในด้านปศุสัตว์ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา และการลักลอบใช้ RAC เป็นส่วนผสมในอาหารและน้ำดื่มของสัตว์ในประเทศไทย ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และการเสียผลประโยชน์ทางการค้า นำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีสารตกค้างของ RAC ดังนั้นคณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission, CAC) ภายใต้การดำเนินงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) กับองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้กำหนดปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง (Maximum residue limits, MRL) เพื่อให้เป็นมาตรฐานสากล ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้างของ RAC โดยคณะกรรมการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ

ชนิดสัตว์	เนื้อเยื่อ	MRL ($\mu\text{g}/\text{kg}$, ppb)
โค	ตับ	40
	ไต	90
	กล้ามเนื้อ	10
	ไขมัน	10
สุกร	ตับ	40
	ไต	90
	กล้ามเนื้อ	10
	ไขมัน	10

แหล่งที่มา : Codex Alimentarius Commission (CAC), 2007: 24-25.

2.1.3 การตรวจวิเคราะห์ RAC

2.1.3.1 การตรวจวิเคราะห์ RAC ด้วยวิธีทางเคมี

เนื่องจากการตกค้างของ RAC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและเกิดความเสียหายต่อภาคธุรกิจการนำเข้า-ส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องมีการตรวจหาปริมาณสารตกค้างของ RAC ซึ่งมีวิธีในการตรวจคือ วิธีทางเคมีสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) [Turberge et al., 1994] เทคนิค Liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) [Antignac et al., 2002; Shishani et al., 2003] เทคนิค Liquid chromatography/mass spectrometry/ mass spectrometry (LC-MS/MS) [Elliott et al., 1998; Churchwell et al., 2002; Fesser et al., 2005] เทคนิค Gas chromatography/ mass spectrometry [Bocca et al., 2003] ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงและให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ แต่เทคนิคนี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนานและทำได้ทีละตัวอย่าง เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง [Sakai et al., 2007] ทำให้ค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเครื่องมือสูงตามไปด้วย ในการใช้เครื่องมือแต่ละครั้งต้องอาศัยผู้ชำนาญการทำการวิเคราะห์ และยังจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือเท่านั้น อีกทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจวิเคราะห์ก็มีหลายขั้นตอน ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองตัวอย่างที่ละจำนวนมากได้

2.1.3.2 การตรวจวิเคราะห์ RAC ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

จากข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีดังที่กล่าวข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างในตัวอย่าง โดยวิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological method) เป็นวิธีที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี วิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันวิทยาสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay, RIA) เทคนิคเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance, SPR) ที่ผลิตขึ้นในรูปของไบโอเซนเซอร์ (biosensor) ทำโดยการตรึง RAC ไว้บนแผ่นเซนเซอร์ชิฟและเติมสารตัวอย่างที่มี RAC แล้วเติมแอนติบอดีเพื่อให้เกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีระหว่าง RAC ในตัวอย่างกับ RAC ที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่นชิฟ [Weilen et al., 2003] เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) และ Immunochromatographic assay หรือ strip test [Li et al., 2010] โดยเฉพาะเทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะสูง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ทำให้มี

ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่าวิธีทางเคมี และทำได้ในเวลาที่รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการทำการวิเคราะห์เหมือนวิธีทางเคมี

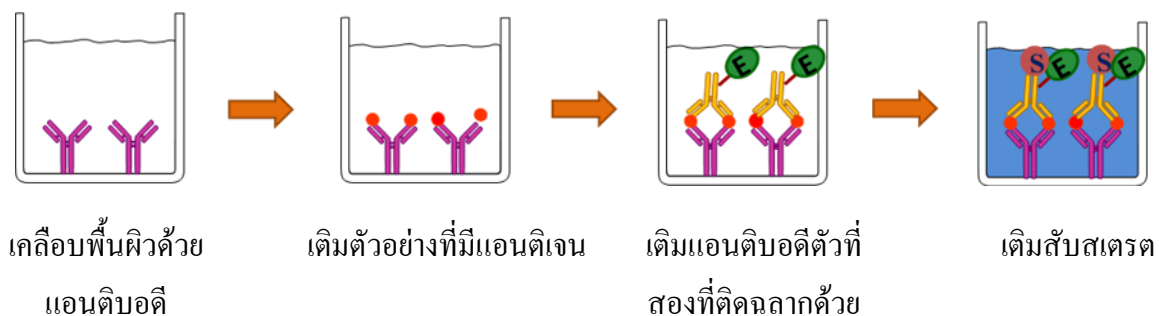
2.1.4 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม หรือการตรวจหาการตกค้างของสารต่างๆ [Zhang et al., 2011] ซึ่งการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะมีความไว (sensitivity) และความแม่นยำสูง [Zhang et al., 2009] วิธีการคือ ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (solid support) แล้วเติมแอนติบอดีหรือแอนติเจนลงไปในกลุ่มที่เคลือบไว้ จะเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งสามารถตรวจวัดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาดัวยสารที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์และเปลี่ยนสีได้เมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ ในปัจจุบันเทคนิค ELISA เป็นที่นิยมมาก เพราะสามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยในระดับนาโนกรัมได้ มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ [Bhattacharya et al., 1999] เครื่องมือและอุปกรณ์ สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งเทคนิค ELISA แบ่งได้หลายวิธีดังนี้

2.1.4.1 Direct ELISA

วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่าง ซึ่งวิธีการจะเริ่มจากเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนลงไป แอนติเจนในตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยบัฟเฟอร์ แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนเช่นกัน และติดฉลากแอนติบอดีตัวที่สองด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก ซึ่งถ้ามีแอนติเจนอยู่มาก แอนติบอดีตัวที่สองก็จะจับกับแอนติเจนได้มากเช่นกัน จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยบัฟเฟอร์ แล้วเติมสับสเตรตของเอนไซม์ลงไปจะเกิดการเปลี่ยนสี [Zhang et al., 2010] ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ

ปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งวิธี direct ELISA เรียกอีกชื่อหนึ่งคือ sandwich ELISA (รูปที่ 2.2)

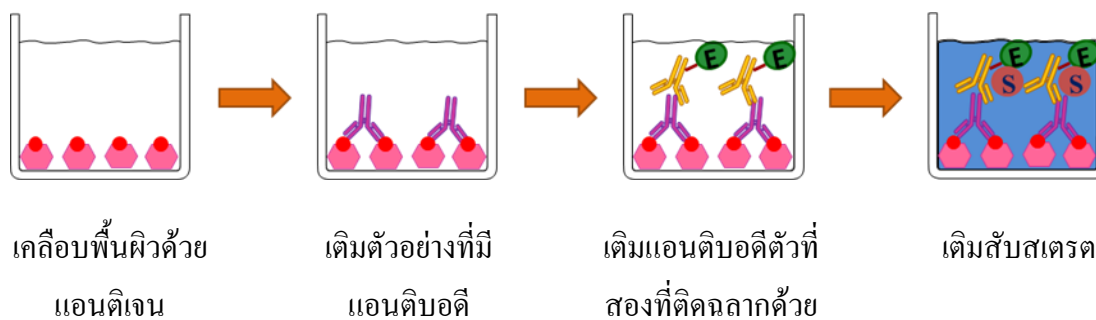


รูปที่ 2.2 หลักการของ Direct ELISA




หมายเหตุ: คือแอนติบอดี, คือแอนติเจน, คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์
 คือสับสเตรต



2.1.4.2 Indirect ELISA

วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ ซึ่งวิธีการจะเริ่มจากเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติเจน ทำการเติมตัวอย่างที่มีแอนติบอดีลงไป จะเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวเท่านั้น หลังจากนั้นทำการล้างส่วนที่ไม่จำเพาะกับแอนติเจนออกไปด้วยบัฟเฟอร์ แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรกที่ต้องการตรวจหา โดยถ้าในตัวอย่างมีแอนติบอดีอยู่มาก แอนติบอดีตัวที่สองก็จะจับกับแอนติบอดีตัวแรกได้มากเช่นกัน ทำการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาดับบัฟเฟอร์อีกครั้งก่อนที่จะเติมสับสเตรตของเอนไซม์ จะเกิดการเปลี่ยนสี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตที่ได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 หลักการของ Indirect ELISA

หมายเหตุ :  คือแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับ โปรตีน,  คือแอนติบอดี,  คือแอนติเจน

 คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์,  คือสับสเตรต

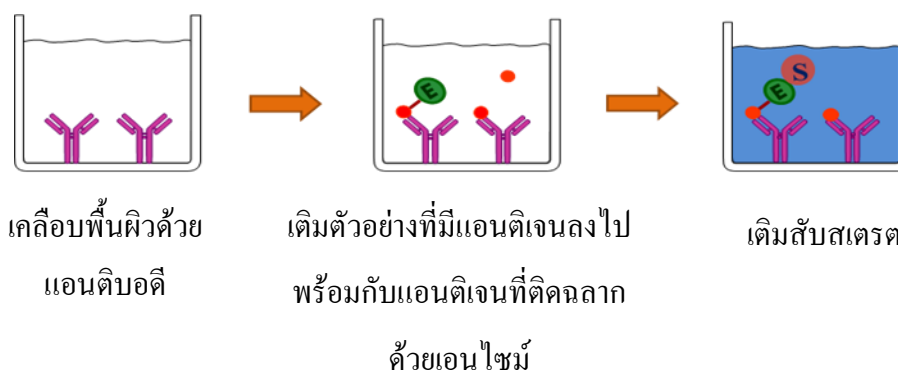
2.1.4.3 Competitive ELISA

วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในสารตัวอย่าง โดยการกำหนดให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เคลือบพื้นผิวและแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ต้องการให้ทำปฏิกิริยามีปริมาณคงที่เพื่อให้เกิดการแข่งขันในการจับกันของแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติบอดี วิธี competitive ELISA จะใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นตัวกระทำในการทดสอบ วิธี competitive ELISA แต่ละแบบมีวิธีและขั้นตอนที่แตกต่างกันดังนี้





(ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

วิธีทดสอบ เริ่มจากเคลือบพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีแล้วเติมสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณแอนติเจนซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบพร้อมกับเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนแล้ว หากในตัวอย่างที่เติมลงไปมีแอนติเจนจะเกิดการแข่งกันระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างและแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการจับกับแอนติบอดีที่เคลือบบนพื้นผิวของจานทดสอบ ทำให้แอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ จับกับแอนติบอดีได้น้อยลง เมื่อล้างเอาแอนติเจนที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออกไปแล้ว

ด้วยบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นเติมสับสเตรตของเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต แล้วนำไปวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น [Zhang et al., 2010] ซึ่งปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างจะแปรผกผันกับความเข้มสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.4)



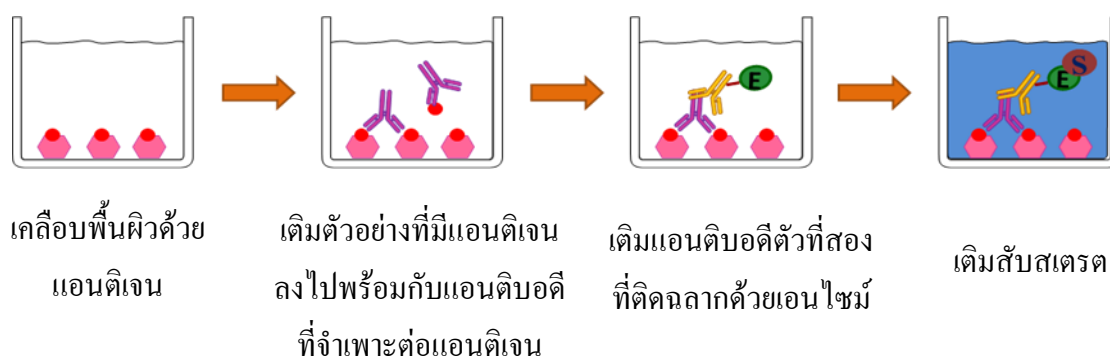
รูปที่ 2.4 หลักการของ Competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

หมายเหตุ:  คือแอนติบอดี,  คือแอนติเจน,  คือแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์
 คือสับสเตรต

(ข) แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

วิธีทดสอบ เริ่มจากเคลือบพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน แล้วเติมสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณแอนติเจน หลังจากนั้นแล้วเติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบและแอนติเจนในตัวอย่าง ซึ่งทราบปริมาณแอนติบอดีที่แน่นอน หากในตัวอย่างที่เติมลงไปมีแอนติเจน จะเกิดการแข่งขันกันระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างและแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณแอนติเจนมากจะจับกับแอนติบอดีได้มาก ทำให้เหลือปริมาณแอนติบอดีน้อยลงที่จะมาจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ เมื่อล้างเอาแอนติเจนที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออกไปแล้วด้วยบัฟเฟอร์ แล้วทำการเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนแล้วเช่นกัน หลังจาก

นั่นเติมสับสเตรตของเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต แล้วนำไปวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น ซึ่งปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างจะแปรผกผันกับความเข้มสีที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกันกับวิธีการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างจะแปรผกผันกับความเข้มสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 หลักการของ Competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

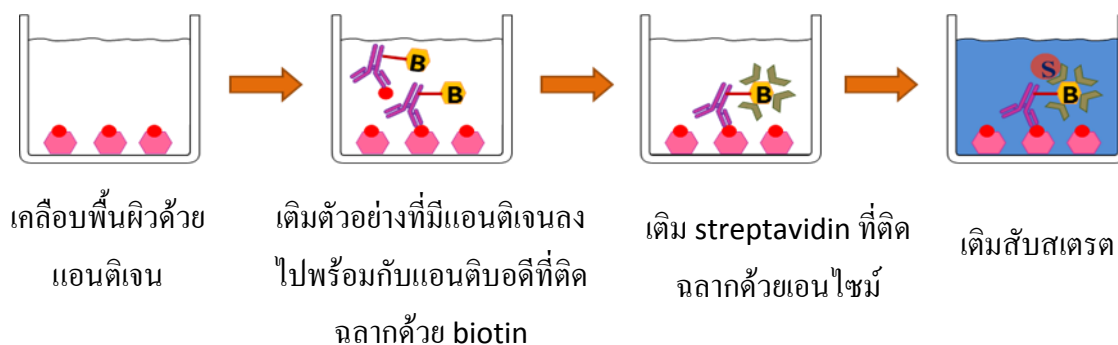
หมายเหตุ: คือแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับ โปรตีน, คือแอนติบอดี, คือแอนติเจน

คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือสับสเตรต

(ก) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin

วิธีนี้อาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่าง biotin และ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยวิธีทดสอบ เริ่มจากเคลือบพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน แล้วเติมสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณแอนติเจน หลังจากนั้นแล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ ซึ่งแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin จะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนแล้ว จะเกิดปฏิกิริยาการแย่งจับกันระหว่างแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin กับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบและแอนติเจนในตัวอย่าง เมื่อล้างเอาแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออกไปแล้วด้วยบัฟเฟอร์ เติม streptavidin ที่ติดฉลาก

ด้วยเอนไซม์ ล้างอีกครั้งด้วยบัพเฟอร์ แล้วจึงเติมสับสเตรตของเอนไซม์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต แล้วนำไปวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น ซึ่งปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างจะแปรผกผันกับความเข้มสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 หลักการของ Competitive ELISA ชนิดที่ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin

หมายเหตุ: คือแอนติเจนที่เชื่อมต่อกับ โปรตีน, คือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

คือแอนติเจน, คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือสับสเตรต

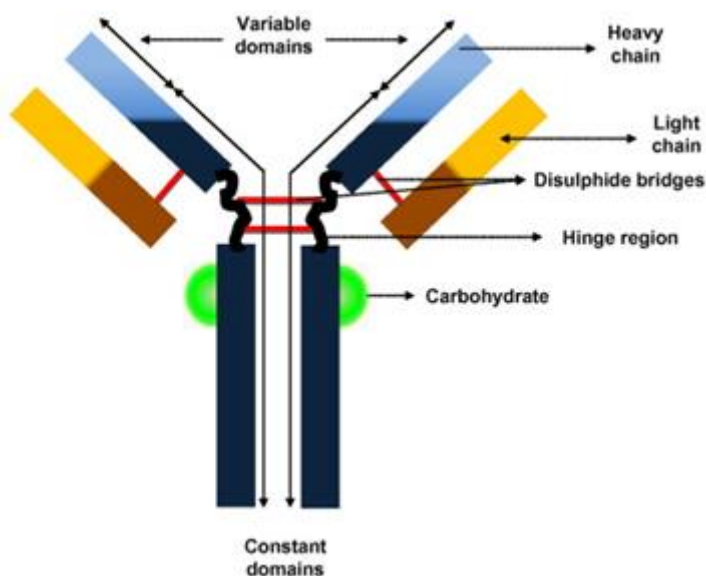
2.1.5 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA

2.1.5.1 แอนติบอดี (antibody, Ab)

แอนติบอดีหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคืออิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงสร้างขึ้นจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ เพื่อทำหน้าที่จับกับสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกที่เข้าสู่ร่างกายทางกระแสเลือด ซึ่งสิ่งแปลกปลอมนั้น เรียกว่า แอนติเจน (antigen, Ag) เช่น สารเคมี ไวรัสและแบคทีเรีย เป็นต้น แอนติบอดีพบได้ในเลือดหรือของเหลวในร่างกาย ซึ่งเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน เซลล์บีจะแบ่งเซลล์ได้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า เซลล์พลาสมา ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างแอนติบอดีเพื่อทำลายแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย โดยแอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลของ

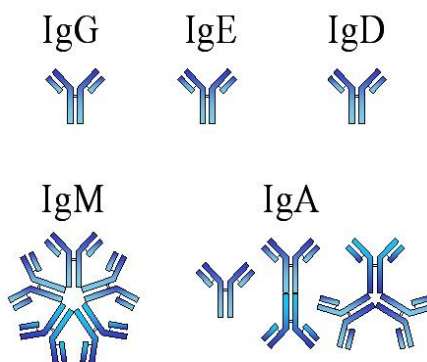
แอนติเจนที่จำเพาะของมัน และจับกับแอนติเจนที่บริเวณ อีพิโทป (epitope) ของแอนติเจน การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทำให้มีการรวมกันของโปรตีนหลายตัวในเซรุ่ม ซึ่งจะช่วยให้แอนติเจนถูกกำจัดออกจากร่างกายได้

โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีมีลักษณะคล้ายรูปตัววาย (Y shape) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 4 เส้น คือ เส้นหนัก (heavy chain, H) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าจำนวน 2 สาย และเส้นเบา ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจำนวน (light chain, L) 2 สาย แต่ละสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ส่วนปลายของแขนตัว Y ทั้งสองข้างประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความแปรปรวนสูง (variable domains) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน (antigen binding site) บริเวณที่เรียกว่า hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น ได้มากทำให้แขนทั้ง 2 ข้างของแอนติบอดี ยืดห่างออกจากกันเพื่อจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น ส่วนโคนของตัววายของโมเลกุลแอนติบอดี เรียกว่า constant domains เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 2.7) แอนติบอดีสามารถแบ่งได้หลายไอโซไทป์ โดยอาศัยความแตกต่างกันที่บริเวณ H-chain ได้เป็น 5 ไอโซไทป์ คือ IgG , IgA , IgM , IgD และ IgE (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

(แหล่งที่มา <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202311002088>)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแอนติบอดีไอโซไทป์ต่างๆ

(แหล่งที่มา <http://www.beltina.org/health-dictionary/immunoglobulin.html>)

เนื่องจากคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนบวกกับความเจริญก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ต้องการผลิตยาที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะชนิดหรือสารที่ก่อให้เกิดโรค โดยไม่ทำลายเซลล์ของร่างกาย จึงได้มีการทำการวิจัยและประยุกต์ใช้แอนติบอดีเพื่อนำมาใช้ในการตรวจรักษาโรคในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะต้องมีขั้นตอนและกระบวนการในการผลิตแอนติบอดีให้มีจำนวนมากพอสำหรับการทดลอง โดยการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่สนใจสามารถทำได้โดย ฉีดแอนติเจนเข้าไปในสิ่งมีชีวิต เช่น หนู กระจ่าง แพะ หรือ แกะ เป็นต้น แอนติเจนเป็นสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้บนตำแหน่งเอพิโทปของแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้น ต่อมาาระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune system) ของสัตว์เหล่านี้ก็จะสร้างแอนติบอดีตอบสนองอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป ก็จะได้แอนติบอดี 2 ลักษณะ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี และ โพลีโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถผลิตได้โดยการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน แล้วนำเซลล์บี-ลิมโฟไซต์เริ่มต้นเซลล์เดี่ยว (single clone หรือ monoclonal) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ มาหลอมรวมกับเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง จะได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้และมีชีวิตยืนยาว (immortalize) สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่มีสิ้นสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ แอนติบอดีที่ผลิตได้จะถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์

เพื่อไปผ่านขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์เพื่อจะได้นำแอนติบอดีไปใช้งานต่อไป การที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกผลิตจากเซลล์เริ่มต้นเดียวกัน ทำให้ทุกโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ มีความจำเพาะสูงต่อตำแหน่งอีพิโทปของแอนติเจนชนิดหนึ่งชนิดใดเท่านั้น หากต้องการเก็บรักษาเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีการแช่แข็งก็สามารถทำได้ หรือหากต้องการนำเซลล์กลับมาเพาะเลี้ยงอีก เพื่อให้เซลล์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกในปริมาณและเวลาที่ต้องการก็สามารถทำได้ โดยคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตก็เป็นชนิดเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

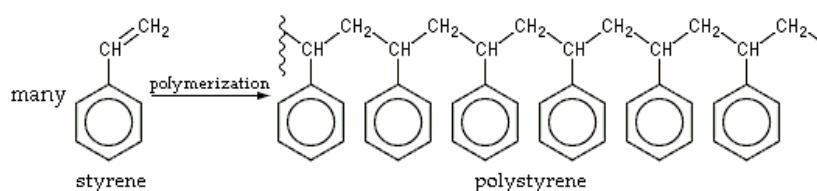
โพลีโคลนอลแอนติบอดี สามารถผลิตได้โดยการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนเช่นเดียวกับวิธีการทำเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่แตกต่างกันที่ขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์ คือ นำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซท์หลายๆ โคลน (poly clone) (บี-ลิมโฟไซท์ 1 โคลน สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะได้ 1 ชนิด) มาหลอมรวมกับเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมา แล้วทำการเลี้ยงไฮบริโดมา ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี แล้วผ่านขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์เพื่อจะได้นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีไปใช้งาน การที่โพลีโคลนอลแอนติบอดีถูกผลิตจากเซลล์เริ่มต้นหลายเซลล์ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีความหลากหลาย โดยสามารถจับกับอีพิโทปบน โมเลกุลของแอนติเจนได้หลายตำแหน่ง

เนื่องจากคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะมากกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี ดังนั้นในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยหาเชื้อโรคหรือตรวจวัดปริมาณสารเคมี มักต้องการโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง เพื่อให้สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างเหนียวแน่น

2.1.5.2 แอนติเจน (antigen)

เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิค ELISA อาศัยหลักการทางวิทยภูมิคุ้มกันวิทยา ในการปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น หรือตรวจหาแอนติเจนที่ต้องการเมื่อมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น ซึ่งโดยปกติแล้วแอนติเจนที่เป็นสารเคมี จะมีขนาดโมเลกุลเล็ก ที่เรียกว่าแฮปเทน (hapten) จะไม่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมซึ่งผลิตจาก polystyrene ได้ จึงต้องทำการเชื่อมต่อโมเลกุลของแอนติเจนเข้ากับโปรตีนก่อน เมื่อทำการเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ส่วนที่เป็น

โมเลกุลโปรตีนจะยึดเกาะกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ด้วย noncovalent binding ทำให้โมเลกุลของแอนติเจนที่เชื่อมกับโปรตีนสามารถยึดติดกับพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ได้ [Hofstetter et al., 1997]



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ polystyrene

(แหล่งที่มา <http://en.wikipedia.org/wiki/Polystyrene>)

2.1.5.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา (Detection system)

เอนไซม์เป็นสารสำคัญที่ใช้ในชุดตรวจโดยหลักการวิทยามิคุ้มกัน ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งจะตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต วิธีการวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะใช้เครื่องมือที่วัดความยาวคลื่นจำเพาะของสีที่เกิดขึ้น โดยอ่านค่าเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical density, OD) เอนไซม์ถือว่าเป็นส่วนสำคัญอีกอย่างหนึ่งของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา สามารถทำได้โดยการเชื่อมหรือติดฉลากเอนไซม์เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish peroxidase (HRP) และ Alkaline phosphatase (AP)

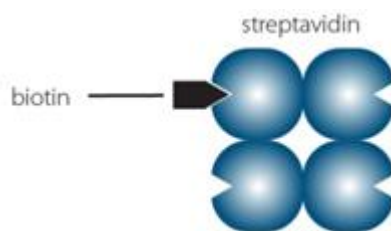
Horseradish peroxidase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 44 กิโลดาลตัน ได้จากส่วนรากของต้นหัวไชเท้า (*Amoracia rusticana*) ในการเชื่อมติดเอนไซม์กับโมเลกุลของสารจะเกิดที่ตำแหน่ง กรดอะมิโน lysine 6 โมเลกุลบนโมเลกุลของเอนไซม์ ในการเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรต เอนไซม์จะถูกออกซิไดส์ด้วย hydrogen peroxide เกิดเป็น oxidized horseradish peroxidase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สับสเตรตที่เหมาะสมทำให้มีสีที่เปลี่ยนแปลงไป

Alkaline phosphatase เป็นไกลโคโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 84 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่ได้จากลำไส้ของวัว หรือสามารถและเตรียมจาก *E. coli* เอนไซม์ทำหน้าที่จะตะไลซ์

(catalyze) เกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของ phosphate ester บนสับสเตรต ทำให้มีสีเกิดขึ้น บนโมเลกุลของ AP มีหมู่อะมิโนจำนวนมากสำหรับการเชื่อมต่อกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี

นอกจากตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตแล้ว ยังมีระบบของ biotin กับ streptavidin มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบตรวจวัดสัญญาณ โดยอาศัยคุณสมบัติของการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มความแรงของสัญญาณให้ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้น

Biotin หรือวิตามิน H เป็นวิตามินที่ละลายน้ำ และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับวิตามิน บี (Vitamin B) สามารถจับกับ avidin [Guesdon et al., 1979] ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่ได้จากไข่ขาว ต่อมามีการใช้ streptavidin แทน avidin เพราะสามารถผลิตได้ง่ายกว่า โดยผลิตได้จากแบคทีเรียที่ทั้ง avidin และ streptavidin มีโครงสร้างที่คล้ายกัน avidin หรือ streptavidin 1 โมเลกุล สามารถจับกับโมเลกุลของ biotin ได้ 4 โมเลกุล ช่วยเพิ่มความแรงของสัญญาณในการตรวจวัด



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างของ biotin- streptavidin system

(แหล่งที่มา : <http://www.iba-lifesciences.com/strep-tag.html>)

2.1.5.4 สับสเตรต (substrate)

เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตเป็นหัวใจหลักของการทดสอบด้วยเทคนิค ELISA ไม่ว่าจะเป็นการเชื่อมต่อกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับเอนไซม์จะต้องเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม และการเลือกใช้สับสเตรตที่เหมาะสมกับเอนไซม์นั้นก็มีความสำคัญเช่นกัน เพราะเมื่อเอนไซม์และสับสเตรตทำปฏิกิริยาจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีขึ้น และจะต้องวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องมือที่อ่านค่าความดูดกลืนแสง (spectrophotometer หรือ ELISA reader) การวัดการเปลี่ยนแปลงสี

ของสับสเตรตที่เกิดจากเอนไซม์ เรียกวิธีนี้ว่า colorimetry ซึ่งเอนไซม์แต่ละตัวเมื่อทำปฏิกิริยากับ สับสเตรตและก็จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีต่างกัน และดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นต่างกันด้วย เช่น เอนไซม์ Alkaline phosphatase ใช้ PNP (p-nitrophenyl phosphate) เป็นสับสเตรต อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ถ้าใช้ PMP (Phenolphthalein monophosphate) เป็นสับสเตรต อ่านผลที่ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และถ้าใช้ INP (1-naphthyl phosphate) เป็น สับสเตรต อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หรือถ้าใช้ horseradish peroxidase เป็นเอนไซม์ในการเชื่อมต่อ สับสเตรตที่ใช้คือ ABTS (2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) เปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีเขียว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ถ้าใช้ OPD (o-phenylenediamine) เป็นสับสเตรต จะเปลี่ยนจากสารละลายไม่มี สีเป็นส้มหรือสีน้ำตาล อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร หรือถ้าใช้ TMB (3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีฟ้า เมื่อหยุดปฏิกิริยาดำรงจะเปลี่ยนเป็นสี เหลือง อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ปัจจุบันใช้ horseradish peroxidase โดยใช้ OPD เป็นสับสเตรต แต่เนื่องจาก OPD มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่งเป็นพิษต่อผู้ใช้จึงได้ เปลี่ยนมาใช้ TMB แทนซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า

2.1.5.5 พื้นที่ผิวสำหรับการยึดตรึง (solid support)

สำหรับชุดตรวจสอบ ELISA ในขั้นตอนแรกของการเตรียมชุดตรวจสอบจะต้องทำ การยึดตรึงหรือเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนพื้นผิวที่อยู่ในรูปแบบของ Solid phase ก่อน เรียกว่า immobilization หรือ coating แล้วทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนของชุดตรวจแต่ละรูปแบบ ซึ่งรูปแบบการใช้ ีผิวสำหรับยึดตรึงในชุด ELISA ที่เป็นมาตรฐานและนิยมใช้ในปัจจุบัน คือ งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หรือ microtitre plate หรือ 96 well-plate ซึ่งทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็น พอลิเมอร์ แบบ organic ที่มี hydrophobic surface สามารถจับกับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ดีด้วย noncovalent binding ทำให้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนพื้นผิวเป็นเนื้อเดียวตลอดพื้นที่ ไม่หลุดออกง่ายๆ ในระหว่างขั้นตอนการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้รูปแบบของงานทดสอบชนิดนี้ก็มีลักษณะโปร่งแสง ทำ ให้สามารถใช้กับเครื่องอ่าน spectrophotometer ได้สะดวก ทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องอ่าน ได้ผลที่แม่นยำมากขึ้น

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากปัญหาที่มีการลักลอบใช้ RAC เป็นส่วนผสมในอาหารและน้ำดื่มของสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคเนื้อดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำให้พบปัญหาต่อมาก็คือผู้บริโภคได้รับผลกระทบทางด้านสุขภาพจากสารตกค้างของ RAC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ นอกจากนี้แล้วภาคอุตสาหกรรมการส่งออกเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ก็ยังได้รับความเสียหายจากสารตกค้างของ RAC ด้วย ซึ่งหลายประเทศได้ให้ความสำคัญในการตรวจวัดปริมาณสารตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ให้อยู่ในปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 2.1) เช่นเดียวกันกับในประเทศไทยเองก่อนที่จะส่งออกหรือนำเข้าผลิตภัณฑ์จากสัตว์ก็ต้องมีการตรวจวัดปริมาณสารตกค้างด้วย ซึ่งวิธีการตรวจวัดหาปริมาณ RAC มี 2 วิธีคือ วิธีทางเคมีและวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2543 เมื่อ Shelver และคณะ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC เป็นผลสำเร็จ โดยทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย RAC ที่เชื่อมกับโปรตีน แล้วนำเซลล์จากม้ามมาเชื่อมต่อกับเซลล์มะเร็งได้เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิต RAC ได้ แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทำการตรวจวัด RAC ด้วยเทคนิค ELISA โดยสามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.8-12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในเนื้อเยื่อหมูและตับพบว่าปริมาณ RAC 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อมาปี พ.ศ. 2545 Shelver และ Smith ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC ที่ผลิตได้ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างปัสสาวะของแกะด้วยเทคนิค ELISA และ เปรียบเทียบกับการตรวจวัด RAC โดยวิธี HPLC ผลการทดลองพบว่าปริมาณของ RAC ที่ตรวจวัดได้ทั้ง 2 วิธีในช่วงที่ใกล้เคียงกันคือ 0.85-51 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดปริมาณ RAC ในเนื้อวัวสามารถตรวจวัดได้ในช่วง 14-8,159 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในเนื้อแกะ 123-10,554 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อีก 6 ปีต่อมา พ.ศ. 2551 Pingli He และคณะ ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยทำการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย RAC ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ของต่อมไทรอยด์ของวัว เพื่อให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี แล้วนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค ELISA รูปแบบ indirect competitive ELISA ซึ่งงานวิจัยนี้ สามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.2-3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าความไวในการตรวจวัด เท่ากับ 0.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่าขีดจำกัด

ในการตรวจวัดเท่ากับ 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความถูกต้องในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 80-120% และความแปรปรวนของการตรวจวัดต่ำกว่า 10%

ในปี พ.ศ. 2553 Li และคณะ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย RAC ที่เชื่อมต่อกับ BSA แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในปัสสาวะหนู ด้วยเทคนิค ELISA ชนิด indirect competitive ELISA พบว่าให้ค่าความไวเท่ากับ 2.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.5-128 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความถูกต้องในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 80-90% ในปีถัดมา Jiang Jinqing และคณะ ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย RAC ที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ ทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร dobutamine 42.7% เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู ตับ และไต พบว่าให้ค่าความไวในการตรวจวัดใกล้เคียงกันคือ 0.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.007 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.013-33.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าความถูกต้องในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 98.2-109.5% , 85.7-110.5% และ 97.4-101.8% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการตรวจวัดปริมาณ RAC โดยวิธีทางเคมี ยกตัวอย่างเช่น ปี พ.ศ. 2550 Takatoshi Sakai และคณะ ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อเยื่อของหมูและวัวด้วยวิธี LC-MS โดยการใช้ C18 reversed-phase column โดยใช้ 0.05% trifluoroacetic acid และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรโดยปริมาตรเป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อกรัม เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในกล้ามเนื้อหมู ไชมัน และตับ พบว่ามีปริมาณ RAC เท่ากับ 0.01, 0.01 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ให้ค่าความถูกต้องในการตรวจวัด 99.7% , 99.5% และ 100.8% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในเนื้อวัว โดยใช้เนื้อเยื่อที่ต่างกันในการตรวจวัด คือ กล้ามเนื้อ ไชมันและตับ พบปริมาณ RAC เท่ากับ 0.01, 0.01 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อกรัม ค่าความถูกต้องในการตรวจวัด 108.3% , 97.0% และ 109.4% ตามลำดับ

ข้อได้เปรียบในการตรวจวัดปริมาณ RAC ด้วยเทคนิค ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางเคมี คือเทคนิค ELISA มีความไวในการตรวจวัดไม่แพ้กับเทคนิคทางเคมี อีกทั้งสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก ตรวจวัดตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง จึงนิยมใช้สำหรับตรวจตัวอย่างเบื้องต้นก่อนที่จะส่งตรวจด้วยวิธีทางเคมีเพื่อยืนยันผล และสามารถทำการตรวจวัดนอกห้องปฏิบัติการได้

ปัจจุบันมีชุดตรวจ RAC ด้วยเทคนิค ELISA ที่ผลิตขายตามท้องตลาดหลากหลายยี่ห้อด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ยี่ห้อ RIDASCREEN® Ractopamine เป็นชุดตรวจ RAC ด้วยเทคนิค ELISA ชนิด direct competitive ELISA สามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 100-8100 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ชัดจำกัดในการตรวจวัดในตัวอย่างเนื้อ ตับ และปัสสาวะ เท่ากับ 200, 300 และ 600 นาโนกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร dobutamine, mabuterol และ ridodrine เท่ากับ 4.7%, 4.4% และ 1.4% ตามลำดับ และใช้เวลาในการตรวจวัด 1 ชั่วโมง 30 นาที และยี่ห้อ MaxSignal® Ractopamine สามารถตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.025-1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชัดจำกัดในการตรวจวัดในตัวอย่างอาหารสัตว์ เท่ากับ 0.025 นาโนกรัมต่อกรัม ในตัวอย่างนมและปัสสาวะเท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อกรัม ในตัวอย่างเนื้อ ตับและไต เท่ากับ 0.0125 นาโนกรัมต่อกรัม และใช้เวลาในการตรวจวัด 1 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับประเทศไทยชุดตรวจเหล่านี้ยังต้องสั่งซื้อนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง ด้วยเหตุผลนี้จึงเป็นแรงบันดาลใจให้ทำงานวิจัยขึ้นนี้เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ RAC ใช้เองภายในประเทศเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่าย ซึ่งสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ RAC ได้ เป็นผลสำเร็จ [พรรัตน์ คงคาวิฑูร , 2551] และนำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อเป็นชุดตรวจสอบ RAC ด้วยเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ RAC รหัสโคลน 10A4 ที่พัฒนาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 แสดงรายการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น TMS	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
- เครื่องชั่งหยาบและละเอียด (Electronic balance) รุ่น PG 4002-S และรุ่น AG204	Mettler Toledo Co., Ltd, Greifensee, Switzerland
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer)	Corning, New York, USA
- เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (Vortex mixer)	Scientific Industries, Inc, Alabama, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)	Mettler Toledo Co., Ltd, Greifensee, Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงรุ่น synergy™ HT (Multi- detection microplate reader)	BIO-TEK® Instruments, Inc, Vermont, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench- centrifuge) รุ่น MSE minor 35	Hettich, Tuttlingen, Germany

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)	Titertek multiskan, Helsinki, Finland
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂ Incubator)	Artisan Scientific, Illinois, USA
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	International Scientific Supply Co. Maharashtra, India
- ตู้เย็น (refrigerator)	Toshiba, Nonthaburi, Thailand
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer)	Sanyo, Chachoeng Sao, Thailand
- ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (freezer)	Sanyo, Osaka, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7	Memmert, Munish, Germany
- ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 20, 100, 200, 1000 มิลลิลิตร (Auto pipette)	Discovery, Warsaw, Poland
- ปิเปตมัลติชานเนล ขนาด 300 ไมโครลิตร (Multichanal auto pipette)	Discovery, Warsaw, Poland
- ปิเปตแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร (glass pipette)	HBG, Luetzellinden, Germany
- จานเลี้ยงเซลล์ (Petridish)	Sterilin, Newport, UK
- ทิป ขนาด 10, 200, 300, 1000 ไมโครลิตร (pipette tip)	Axygen, California, USA
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (test tube)	Axygen, California, USA
- หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, California, USA
- หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์ (screw cap micro tube)	Corning Incorporated, Tamaulipas, Mexico
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม (96 well EIA/RIA Plate)	Corning Incorporated, New York, USA

ตารางที่ 3.2 แสดงรายการสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ammoniumpersulfate (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน	Thermo scientific, Illinois, USA
Biotinamidohexanoic acid (biotin)	เชื่อมติดกับแอนติบอดี	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bovine serum albumin (BSA)	โปรตีนมาตรฐานและใช้ เชื่อมกับ RAC	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Brombuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	สถาบันอาหาร, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
Bromchlorobuteral	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	สถาบันอาหาร, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cipofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Darmstadt, Germany
Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Clenproporal	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	สถาบันอาหาร, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
Chloramphenicol (CAP)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Coomassie brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce, Illinois, USA
Dimethyl sulfoxide	ละลายสับสเตรท TMB	Fluka, Buchs, Switzerland
Dobutamine hydrochloride	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel
Dopamine hydrochloride	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Munich, Germany
N.N'-disuccinimidyl carbonate (DSC)	สารเชื่อมต่อ RAC กับ BSA	Sigma-Aldrich, Seelze, Germany
Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ethanol	ฆ่าเชื้อ	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Methanol	ตัวทำละลาย	Merck, Darmstadt, Germany
Fetal calf serum (FCS)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Furazolidone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Horseradish Peroxidase	ใช้เชื่อมต่อกับ RAC	USBiological, Massachusetts, USA
Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	BDH, Dammam, kingdom of saudi arabia

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Hydrochloric acid	ใช้ปรับค่ากรด-เบส	PAA, Pasching, Austria
L-Glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Oxytetracyclin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ractopamine HCl	ทดสอบ ELISA	LKT Laboratories, Shenzhen, China
Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium chloride (NaCl)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, Michigan, USA
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, Michigan, USA
Streptavidin-HRP	ทดสอบ ELISA	Invitrogen, Maryland, USA
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	หยุดปฏิกิริยาของแอนไซม์	Merck, Darmstadt, Germany

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
RPMI 1640	อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา	Biochrome , Berlin, Germany
Terbutaline hemisulfate salt	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Switzerland
Tetracycline hydrochloride (TC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
3, 3', 5, 5'tetramethylbenzidine (TMB)	เป็นสับสเตรคของเอนไซม์	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
N, N, N', N'-Tetramethyl- Ethylenediamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Pierce, Illinois, USA
Thimerosal	สารป้องกันการปนเปื้อน	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trisma base)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tween 20	สารลดแรงตึงผิวสำหรับ ล้างจานทดสอบ ELISA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
นมผงพร่องมันเนย	ทดสอบ ELISA	Anlene, Bangkok, Thailand

3.3 การดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยง

นำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ที่จำเพาะต่อ RAC [พรรัตน์ คงคาวิฑูร, 2551] ออกจากไนโตรเจนเหลวมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวอยู่ละลาย หลังจากนั้นทำการถ่ายไฮบริโดมาเซลล์ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร จำนวน 2 งานเลี้ยงเซลล์ ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นทำการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร ในงานเลี้ยงเซลล์โดยเพิ่มจำนวนเป็น 4 งานเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มงานเลี้ยงเซลล์ ทำการแบ่งเซลล์ไปเก็บในไนโตรเจนเหลว ส่วนเซลล์ที่เหลือจะทำการเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดี

3.3.1.2 การแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากข้อ 3.3.1.1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ขณะเย็นลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเกิดผลึกของน้ำแข็งที่จะทำให้เซลล์เสียหายระหว่างการแช่แข็ง ใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้เซลล์กับน้ำยาแช่แข็งผสมกันดียิ่งขึ้น จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในหลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

3.3.1.3 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากข้อ 3.3.1.1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร ถ่ายใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร และมีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% เลี้ยง

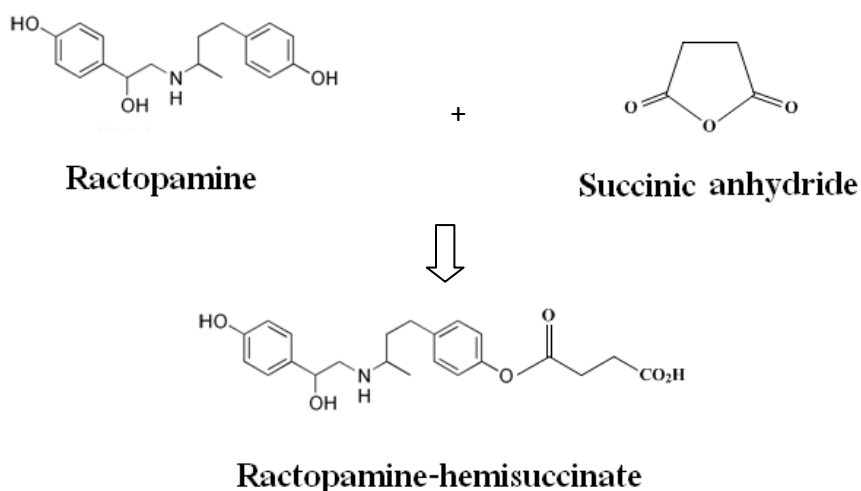
เซลล์เป็นเวลา 4-5 วัน หรือเมื่ออาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ทำการแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดี

การทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา รหัสโคลน 10A4 ทำโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้างต้นไปทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA (ซึ่งจะกล่าวในขั้นตอนต่อไป) ซึ่งในขั้นตอนการทดลองจะต้องมีการใช้ RAC ที่เชื่อมต่อกับ BSA (RAC-BSA) ในการเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียม RAC-BSA เป็นลำดับต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อ RAC กับ BSA

3.3.2.1 การเชื่อมต่อ RAC กับ BSA

เนื่องจากการเชื่อมต่อโมเลกุลของ RAC กับโปรตีนพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ BSA เป็นโปรตีนพาหะ จะเป็นการเกิดพันธะเคมีของสารที่มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (carboxyl group, $-COOH$) กับสารที่มีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) จึงจะเกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลทั้งสอง แต่เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของ RAC (รูปที่ 2.1) ไม่มีหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นต้องทำการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-OH$) ของโมเลกุลของ RAC ให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลโดยการนำ RAC มาทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride เพื่อให้เกิด ractopamine-hemisuccinate ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิล (รูปที่ 3.1) วิธีการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ RAC สามารถทำได้ดังนี้



รูปที่ 3.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate

วิธีการเชื่อมต่อ RAC กับ BSA (RAC-BSA) โดยขั้นตอนแรกจะต้องทำการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ RAC ให้เป็น ractopamine-hemisuccinate โดยนำสาร ractopamine HCl (RAC) 40 มิลลิกรัม ละลายใน pyridine 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม succinic anhydride 0.4 กรัม ที่ละลายอยู่ใน pyridine 3 มิลลิตร กวนเบาๆด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปกำจัด pyridine ออกด้วยวิธีการระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจน และตรวจสอบการเกิดผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) โดยทำการจุดสาร pyridine, RAC ที่ละลายใน pyridine, succinic anhydride ที่ละลายอยู่ใน pyridine, ractopamine-hemisuccinate ก่อนกำจัด pyridine และ ractopamine-hemisuccinate หลังกำจัด pyridine ตามลำดับ ลงบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะระบบปิดและใช้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย 85% dichloromethane (CH_2Cl_2) : 15% methanolic NH_4OH (10%) [พรรัตน์ คงกาวิฑูร, 2551] เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปจนเกือบถึงปลายแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกมาจากภาชนะระบบปิด นำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตรเพื่อตรวจสอบจุดการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC วัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ด้วยไม้บรรทัด เพื่อนำไปคำนวณค่า Relative mobility (R_f) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

หลังจากทำการตรวจสอบ ractopamine-hemisuccinate ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC แล้ว ทำการเติมสาร N,N'-disuccinimidyl carbonate 0.4 กรัม ซึ่งเป็นสารเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA เติม BSA 10 มิลลิกรัมที่ละลายอยู่ใน 0.2 M sodium carbonate buffer pH 9.5 ทำการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปกำจัดตะกอนสีขาวด้วยวิธีไดอะไลซิสโดยใช้ 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง [Anong Kitjaroentham, 1997] จากนั้นนำ RAC-BSA ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA™ protein assay kit) ต่อไป

3.3.2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

หลังจากทำการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA แล้วทำการหาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับ ractopamine-hemisuccinate โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit จากบริษัท Pierce ขั้นตอนเริ่มจากเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับรีเอเจนต์ B ของชุดทดสอบในอัตราส่วน 50: 1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA เจือจางที่ความเข้มข้น 0.025-0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (RAC-BSA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ที่ความเจือจาง 2, 4 และ 8 เท่า เติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน หลังจากนั้นนำ RAC-BSA ที่ได้ไปวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อด้วย TNBS ต่อไป

3.3.2.3 การวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ RAC-BSA

เมื่อทำการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA (RAC-BSA) แล้ว นำ RAC-BSA ที่ได้มาวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อโดยใช้สาร 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic acid (TNBS) จากบริษัท PIERCE โดยประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ RAC กับ BSA จะวัดค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนของ BSA ที่ถูกใช้ในการเชื่อมต่อกับ RAC ซึ่งมีวิธีการทำดังนี้ เริ่มต้นจากการเจือจาง BSA ด้วย 0.1 M Sodium bicarbonate buffer pH 8.5 ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำลงในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำ RAC-BSA ที่ได้หาความเข้มข้นของโปรตีนแล้วจากข้อ 3.3.2.2 มาทำการเจือจางด้วย 0.1 M Sodium bicarbonate buffer pH 8.5 ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำลงในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย 0.01% TNBS ลงในหลุมที่มี BSA และ RAC-BSA ปริมาตรหลุมละ 75 ไมโครลิตร นำจานทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำจานทดสอบออกมาจากตู้บ่ม รอให้จานทดสอบเย็นลงแล้วทำการเติม 10% SDS ปริมาตรหลุมละ 75 ไมโครลิตร และ 1N HCl ปริมาตรหลุมละ 37.5 ไมโครลิตรตามลำดับ เขย่าจานทดสอบเบาๆเป็นเวลา 30 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่ถูกใช้ในการเชื่อมต่อได้จากสมการดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์หมู่เอมีนที่ถูกใช้ไป} = \frac{(A_{335} \text{ ของ BSA} - A_{335} \text{ ของ RAC-BSA})}{A_{335} \text{ ของ BSA}} \times 100$$

3.3.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RAC

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.3.1.3 มาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RAC ว่าหลังจากทำการเก็บเซลล์ไฮบริโดมาแข็งแรงไว้ เมื่อนำเซลล์ออกมาทำการเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง เซลล์ไฮบริโดมายังสามารถผลิตแอนติบอดีได้อยู่หรือไม่ ซึ่งการตรวจสอบใช้วิธี indirect ELISA โดยเริ่มจากเคลือบหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย RAC-BSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (PBST) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำละลายนมพร่องมันเนย 5 % หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์

ไฮบริโดมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:5 – 1:2,560 เท่า ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG, GAM-HRP) ที่เจือจาง 1: 10,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 200 mM potassium citrate buffer pH 4.0 ปริมาตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H₂SO₄ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี protein G affinity chromatography

โปรตีน G เป็นโปรตีนที่ผลิตได้จากส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* และมีการนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ โดยโปรตีน G จะจับกับแอนติบอดีตรงบริเวณ Fc region ของโมเลกุลแอนติบอดี (เป็นบริเวณที่ไม่ได้จับกับแอนติเจน) และโปรตีน G จะจำเพาะกับแอนติบอดีไอโซไทป์ IgG โดยเฉพาะแอนติบอดีที่ผลิตจากหนู กระต่าย และแพะ การนำโปรตีน G มาใช้งานมักจะอยู่ในรูปของการตรึงโปรตีนกับ bead แล้วบรรจุในคอลัมน์เพื่อใช้งาน

ขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ เริ่มจากนำโปรตีน G เซฟาโรส (protein G sapharose) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ๕๕ ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้คอลัมน์อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์และเป็นการล้างเอาสิ่งที่ยังเหลือตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนแล้ว มาผ่านกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง เพื่อกำจัดเซลล์ไฮบริโดมาที่ยังเหลือปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจจะทำให้คอลัมน์เกิดการปนเปื้อนได้ หลังจากนั้นวางขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ในถังน้ำแข็ง เพื่อรักษาอุณหภูมิไว้ป้องกันการเสียหายของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในคอลัมน์โปรตีน G เซฟาโรส ปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับโปรตีน G ในคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่าของคอลัมน์ ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน G ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งแต่ละหลอดมี 1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเป็นเบสของสารละลายให้เป็นกลางเพื่อ

ไม่ให้โปรตีนเสียสภาพ หลังจากนั้นทำความสะอาดคอลัมน์โดยชะด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่าของคอลัมน์ แล้วนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อทดสอบว่ามีแอนติบอดีอยู่ในหลอดทดลองใดบ้าง และเพื่อเป็นการยืนยันว่าในแต่ละหลอดทดลองมีแอนติบอดีที่ยังคงมีความสามารถในการจับกับ RAC ได้ โดยจะทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีที่กล่าวไปแล้วในข้อ 3.3.3 หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน นำไปโคอะไลซิสโดยใน PBS ที่มี 0.01% thymerosal เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 600 มิลลิลิตร

3.3.5 การหาปริมาณแอนติบอดี

เนื่องจากแอนติบอดีมีโครงสร้างเป็นโปรตีน เมื่อทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์แล้ว จึงทำการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีโดยใช้ วิธี BCA assay เช่นเดียวกับวิธีข้อ 3.3.2.2

3.3.6 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

หลังจากที่ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดี และหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดี สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกขนาดของสารชีวโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก หรือโปรตีน ตามน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยมีหลักการคือสารชีวโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม ซึ่งการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุเกิดขึ้นบนร่างแหของเจล ดังนั้นการเคลื่อนที่ของสารผ่านร่างแหเจล จะขึ้นอยู่กับประจุของโปรตีน รวมทั้งขนาดและรูปร่างของโปรตีนด้วย วิธีการทดลองทำได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.3.6.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

SDS เป็น detergent ที่มีประจุไฟฟ้าลบเมื่อเกาะกับโมเลกุลของโปรตีนจะทำให้โมเลกุลโปรตีนที่เดิมจะเกาะกันเป็นก้อนกลม (globular) เสียสภาพและแยกเป็นหน่วยย่อยของโมเลกุลโปรตีน ทำให้หน่วยย่อยของโมเลกุลโปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ ขั้นตอนการทำเริ่มจากเตรียม 12% separating

gel โดยใช้ Electrophoresis ของบริษัท BIO-RAD ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือรอจนกว่าเจลจะแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel แล้วเติมที่ส่วนด้านบนของ separating gel และใส่หัวเพื่อเป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว

3.3.6.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่าง ให้มีปริมาณโปรตีน 5, 3 และ 2 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลายสีย้อมที่ประกอบด้วย SDS, β-mercaptoethanol และ bromphenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปปีเปตในหลุมเจล

3.3.6.3 การทำ electrophoresis

นำแผ่นเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับ electrophoresis chamber เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (Tris-glycine-HCl) (running buffer) ให้ท่วมขั้วไฟฟ้า แล้วนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.6.2 ปีเปตลงในหลุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที หรือจนแถบสีของตัวอย่างเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบสุดแผ่นเจลแล้วจึงทำการปิดสวิตช์ปล่อยกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นแกะแผ่นเจลออกมาอย่างระมัดระวัง แล้วนำไปย้อมสีด้วย coomassie Brilliant blue R-250 (staining solution) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายเอทานอลและกรดอะซิติก (destaining solution) เพื่อล้างสีย้อมที่ติดบนแผ่นเจลออก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าเจลจะใสและเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจนขึ้น

3.3.7 การเตรียมชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA

เมื่อได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการแล้ว นำแอนติบอดีมาทำการเตรียมชุดตรวจสอบ 3 แบบ คือ

- Direct competitive ELISA (RAC-HRP)
- Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)
- Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

จากการเตรียมชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบ จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบแต่ละชุดโดยพิจารณาจากค่าความไวของชุดตรวจ ซึ่งจะแสดงถึงปริมาณต่ำสุดของสารที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจวัดได้ จะอยู่ในรูปของค่า IC_{50} หรือปริมาณสารที่ทำให้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง B/B_0 ลดลงครึ่งหนึ่ง และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) โดยค่า IC_{50} และค่า LOD สามารถคำนวณได้จาก

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

$$LOD : B_0 - 3SD$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มี RAC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มี RAC

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.3.7.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP)

3.3.7.1.1 การเชื่อมต่อสารแรกโทพมินกับฮอรัสตราดิซเพอร์ออกซิเดส (RAC-HRP)

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA มีหลักการคือใช้แอนติบอดีเคลือบบนพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมแล้วให้ RAC กับ RAC-HRP แย่งกันจับกับแอนติบอดี ซึ่งขั้นแรกจะต้องทำการเตรียม RAC-HRP เพื่อที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการการเชื่อมต่อ RAC กับฮอรัสตราดิซเพอร์ออกซิเดส จะใช้วิธีการเดียวกับวิธีที่เชื่อมต่อแรก RAC กับ BSA ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.2.1 จากนั้นนำมาวัดปริมาณ โปรตีนของ RAC-HRP ด้วยวิธี BCA ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.2.2

3.3.7.1.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับ RAC-HRP

หลังจากทำการเชื่อมต่อ RAC-HRP แล้ว จะต้องทำการหาอัตราส่วนของแอนติบอดีกับ RAC-HRP ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม ด้วยวิธี direct ELISA โดยจะทำการเลือกคู่ของแอนติบอดี

และ RAC-HRP ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 ก่อนที่จะนำไปทดสอบกับ RAC ในรูปอิสระเพื่อหาความไวของชุดตรวจ ซึ่งวิธีการทดลองเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปป้อมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำจานทดสอบมาล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้ติดบนพื้นผิวจานทดสอบด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 (PBST) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 (PBST) จำนวน 3 ครั้ง ทำการเติม RAC-HRP เข้มข้น 0.00781-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เพื่อล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป ทำการเติมน้ำสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน

200 mM potassium citrate buffer pH, 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปป้อมในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.7.1.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP)

การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA จะใช้วิธีการดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.1.2 โดยทำการแปรความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำลงในจานทดสอบ ELISA ที่ทำการเคลือบพื้นผิวด้วยแอนติบอดีไว้ก่อนแล้ว เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข่งขันแอนติบอดีกับระหว่าง RAC ในรูปอิสระและ RAC-HRP

3.3.7.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)

ชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA มีขั้นตอนการทดลองโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย RAC-BSA ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำจานทดสอบมาล้างแอนติเจนที่ไม่ได้เกาะติดบนพื้นผิวจานทดสอบด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปป้อมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมทำการเติม RAC ในรูปอิสระ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดีปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่เชื่อมต่อกับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG, GAM-HRP) ที่อัตราการเจือจาง 1:10,000 ใน PBS ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายยับยั้งสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H₂O₂ ละลายใน 200 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 M H₂SO₄ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.7.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่าง

RAC-BSA กับแอนติบอดี

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และแอนติบอดีโดยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.0078-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับ RAC-BSA เข้มข้น 0.5-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.2 และทำการเลือกค่าของ RAC-BSA กับแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 และทำการทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.3.7.2.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุด

ตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA จะศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อ RAC รูปอิสระในการแย่งจับกับ RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ โดยทำการแปรความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้น 0-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปในงานทดสอบ ELISA และใช้วิธีการทดสอบดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.2

3.3.7.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

3.3.7.3.1 การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน (Ab-biotin)

ชุดตรวจสอบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) มีวิธีการทดลองคือทำการเคลือบพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ด้วย RAC-BSA ทำการเติม RAC ในรูปอิสระและเติม Ab-biotin เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข่งขันระหว่างแอนติบอดีกับ RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวจานทดสอบ ELISA และ RAC ในรูปอิสระ ซึ่งวิธีการทดลองจะต้องมีการใช้ Ab-biotin สามารถเตรียมได้ดังนี้

การเชื่อมต่อสารแรกโทพมินกับไบโอตินทำโดย นำแอนติบอดีเข้มข้น 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไปไดแอไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer pH 8.4 ที่อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นเติมไบโอตินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน DMSO โดยค่อยๆหยดลงในสารละลายแอนติบอดี กวนเบาๆเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปไดแอไลซิสใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน (คู่มือการใช้งานสาร Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide ของบริษัท Zymed) เมื่อได้ Ab-biotin จะนำไปเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ต่อไป

3.3.7.3.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin ทำได้โดยการแปรความเข้มข้นของ RAC-BSA 0.25-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Ab-biotin 0.0039-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากเคลือบพื้นผิวจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย RAC-BSA ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำจานทดสอบมาล้างแอนติเจนที่ไม่ได้เกาะติดบนพื้นผิวจานทดสอบด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม Ab-biotin ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเติม streptavidin-HRP ที่ความเข้มข้น 1:4,000 เท่า ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำจานทดสอบมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้น

เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 200 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 เพื่อนำไปทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.3.7.3.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA จะศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อ RAC รูปอิสระในการแข่งขันกับ RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ โดยทำการแปรความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้น 0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปในงานทดสอบ ELISA และใช้วิธีการทดสอบดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.3.2

3.3.8 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

จากการเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบข้างต้นกับ RAC ในรูปอิสระ พบว่าชุดตรวจสอบที่มีความไวมากที่สุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) จึงนำมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยทำการศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม RAC-BSA กับ Ab-biotin, การสร้างกราฟมาตรฐาน และการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.8.1 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม RAC-BSA กับ Ab-biotin และ RAC ในรูปอิสระ

ปัจจุบันชุดตรวจสอบ RAC ด้วยเทคนิค ELISA ที่มีการผลิตขายในท้องตลาดก็ใช้รูปแบบ ELISA แตกต่างกันไป มีการแข่งขันทางด้านประสิทธิภาพในการตรวจวัด ความสะดวกและรวดเร็วในการใช้ชุดตรวจ ยกตัวอย่างชุดตรวจที่ขายในท้องตลาด เช่น ชุดตรวจ RAC ยี่ห้อ MaxSignal[®] เป็นชุดตรวจแบบ Ab-captured Indirect competitive ELISA ตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.025-1.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการตรวจวัด ELISA 1 ชั่วโมง 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) ชุดตรวจ RAC ยี่ห้อ RIDASCREEN[®] เป็นชุดตรวจแบบ Ag-captured direct competitive

ELISA ตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.10-8.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการตรวจวัด ELISA 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) ชุดตรวจ RAC ยี่ห้อ Green Spring® เป็นชุดตรวจแบบ direct competitive ELISA ตรวจวัด RAC ได้ในช่วง 0.10-8.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการตรวจวัด ELISA 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เป็นต้น แต่ชุดตรวจสอบ RAC ด้วยเทคนิค ELISA ในงานวิจัยนี้ใช้เวลาในการทดสอบ ELISA ทั้งหมด 2-3 ชั่วโมงซึ่งถือว่าใช้เวลานานกว่าชุดตรวจสอบยี่ห้ออื่นในท้องตลาด ด้วยเหตุผลนี้จึงทำการลดเวลาและปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ ELISA จากเดิมบ่ม RAC-BSA กับ Ab-biotin และ RAC ในรูปอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ชุดตรวจสอบต้นแบบนี้ใช้งานได้สะดวกและใช้เวลาในการตรวจวัด RAC น้อยที่สุด จึงทำการแปรอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

ตารางที่ 3.3 เวลาและอุณหภูมิที่นำไปทดสอบกับ RAC ในรูปอิสระ

สภาวะ	เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม
1	1	37 องศาเซลเซียส
2	1	อุณหภูมิห้อง

3.3.8.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin เมื่อทำการแปรอุณหภูมิ

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin โดยการแปรความเข้มข้นของ RAC-BSA 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Ab-biotin 0.05-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.3.7.3.2 โดยใช้เวลาและอุณหภูมิที่นำไปทดสอบดังตารางที่ 3.3 แล้วทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 ไปทำการทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.3.8.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC รูปอิสระของชุดตรวจสอบ
 ดัชนีแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อทำการแปรอนุมิตี

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบดัชนีแบบ จะศึกษาจากความไวของแอนติบอดี
 ต่อ RAC ในรูปอิสระในการแย่งจับกับ RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ โดยทำการ
 แปรความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระให้มีความเข้มข้น 0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเติมลงไปในงาน
 ทดสอบ ELISA และใช้วิธีการทดสอบดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.3.2

3.3.8.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน

การใช้ชุดตรวจสอบดัชนีแบบตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างทำโดยเทียบค่าการ
 ดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบดัชนีแบบ ซึ่งการ
 สร้างกราฟมาตรฐาน จะใช้การทดสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ดังที่กล่าว
 ไว้ในข้อ 3.3.7.3.2 นำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดย
 แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของ RAC ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแกน Y เป็น
 $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ที่มี
 RAC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มี RAC ทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ
 RAC ที่กราฟเป็นเส้นตรงมาสร้างกราฟมาตรฐาน

3.3.9 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบดัชนีแบบ

3.3.9.1 การหาค่าความไว (sensitivity)

ค่าความไวของชุดตรวจสอบดัชนีแบบคือ ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of
 Detection; LOD) และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantitation; LOQ) ซึ่งค่า
 LOD และ LOQ หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยวิธี
 Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ที่ไม่มี RAC (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่า
 เบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ [Cliquet et al., 2003] จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟค่าความ
 ไวของกราฟมาตรฐานของ RAC โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03

แสดงวิธีการคำนวณ ค่า LOD และ LOQ

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

$$\text{LOQ} : B_0 - 10SD$$

เมื่อ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ที่ไม่มี RAC

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.3.9.2 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy)

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า % recovery โดยนำตัวอย่างที่มีการเติม RAC มาทำการหาค่า % recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของ RAC ที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ RAC จากกราฟมาตรฐาน [Cliquet et al., 2003] จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % recovery จากสูตรดังนี้

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

ซึ่งค่า % recovery ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80-120% [He et al., 2008]

3.3.9.3 การหาค่าความแม่นยำ (precision)

การหาค่าความแม่นยำ ซึ่งค่าความแม่นยำที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 20% [Krotzky et al., 1995] ซึ่งค่าความแม่นยำหาได้จากการศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) ดังนี้

3.3.9.3.1 intra-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย standard deviation (SD) และ % coefficient of variation (% CV) ของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ซึ่งค่า % CV คำนวณได้จากสูตร [Cliquet et al., 2003]

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

% CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

μ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี

indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.3.9.3.2 Inter-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย (μ), ค่า standard deviation (SD) และ % coefficient of variation (% CV) ของการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันที่เวลาต่างกันด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า μ , SD และ % CV

3.3.9.4 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยใช้วิธีทดสอบแบบ indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ตามวิธีในข้อ 3.3.7.3.2 โดยสารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ dobutamine HCL, dopamine HCL, clenbuteral, bromchlorobuterol, clenproperal, sulbutamol, brombuterol และ terbutaline โดยสารนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ furazolidone, chloramphenical, norfloxacin, enrofloxacin, cipofloxacin และ oxytetracyclin นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดจาก 50% B/B₀ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

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

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากผลการทำ ELISA ที่มีสารทดสอบที่ต้องการวัดการเกิดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีสารทดสอบที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อได้ค่า IC_{50} ของสารที่นำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามแล้ว สามารถคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity, % CR) โดยใช้สูตรคำนวณ [Cliquet et al., 2003; Sheu et al., 2009] ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของ RAC}}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

3.3.10 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

หลังจากที่ทดสอบค่าความไว ความแม่นยำ และการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบต้นแบบแล้ว จะทำการวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้ชุดตรวจสอบ RAC ต้นแบบ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.10.1 การศึกษาผลกระทบของเมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

RAC เป็นสารที่มีขั้วละลายได้ดีในเมทานอล [Wang et al., 2006] จึงได้เลือกใช้ 100% เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู (วิธีการสกัดดัดแปลงมาจากคู่มือ Ractopamine ELISA Test Kit ยี่ห้อ Maxsingnal[®]) เนื่องจากในเนื้อหมูเป็นเนื้อที่มีไขมันปนอยู่ทั่วทุกส่วน ซึ่งไขมันในเนื้อหมูอาจจะเป็นเมทริกที่รบกวนต่อระบบ ELISA ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาผลของเมทริกในเนื้อหมู โดยนำเนื้อหมูส่วนของเนื้อสันนอกมาทำการตัดชิ้นส่วนที่เป็นไขมันออกนำมาบดด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด เตรียมหลอดทดลองไว้ 2 ชุดชุดละ 8 หลอด โดยชุดหนึ่งซึ่งเนื้อหมูบดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม ชุดที่เหลือไม่ต้องใส่เนื้อหมูบด ทำการเติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรลงในหลอดทดลองทั้งสองชุด เติม 100% เมทานอลปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองที่มีเนื้อหมู

บดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เนื้อหูดกตะกอน แล้วทำการดูดส่วนใสของตัวอย่างทั้งสองชุดปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองอันใหม่ นำหลอดทดลองทั้ง 2 ชุดมากำจัดเมทานอลด้วยการระเหยแห้งโดยแช่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนใช้เวลาประมาณ 20 นาที เมื่อ เมทานอลระเหยหมด ทำการเติม PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปวัด ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ตามวิธีข้อ 3.3.7.3.2 ทำการคำนวณความเข้มข้นของ RAC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน RAC ที่ละลายใน PBS

หลอดทดลอง 8 หลอด ที่เติม RAC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	หลอดทดลอง 8 หลอด ที่มีเนื้อหูดกตะกอน 1 กรัม ที่เติม RAC ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
--	---



100 % เมทานอล ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร



เขย่าแต่ละหลอดอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า



15 นาที

ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที



10 นาที

ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร



ระเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



เติม PBS ปริมาตรหลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP)

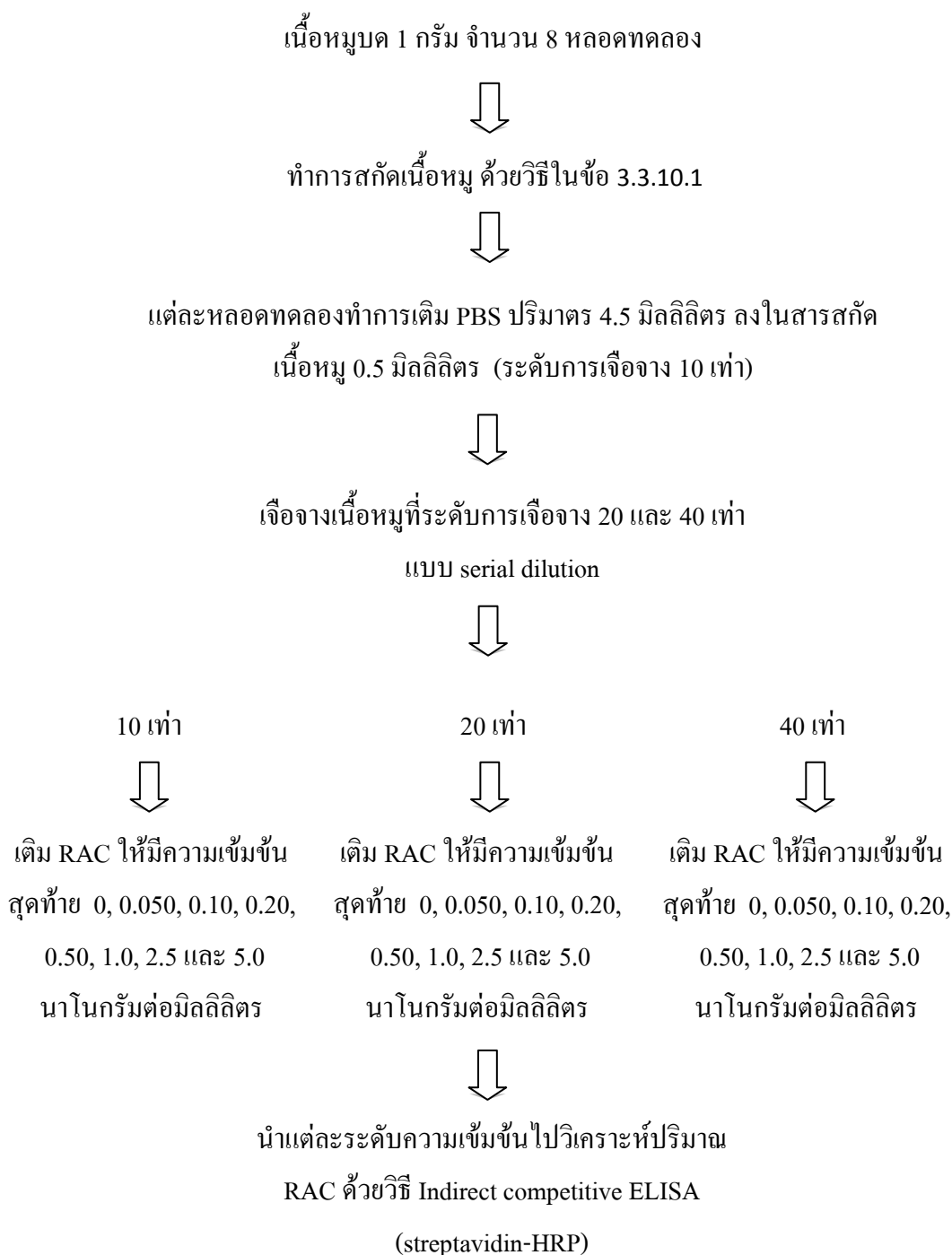
รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหูดก

3.3.10.2 การศึกษาผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมูต่อการตรวจวัด

ปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู

เนื่องจากในเนื้อหมูเป็นเนื้อที่มีไขมันปนอยู่ทั่วทุกส่วน ซึ่งไขมันในเนื้อหมูเป็นแมทริกสำคัญที่รบกวนต่อระบบ ELISA ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกจากเนื้อหมู โดยสกัดเนื้อหมูด้วย 100% เมทานอล ผ่านขั้นตอนการระเหยเมทานอลเพื่อไม่ให้เมทานอลมีผลต่อระบบ ELISA และเจือจางแมทริกด้วย PBS เพื่อหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้แมทริกในเนื้อหมูไม่มีผลต่อ ELISA ซึ่งนำไปวิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) มีขั้นตอนการทดลองดังนี้คือ

นำเนื้อหมูที่บดละเอียดแล้ว แบ่งซึ่งใส่หลอดทดลอง 1 กรัม จำนวน 8 หลอด แล้วทำการสกัดเนื้อหมูตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.10.1 ทำการเจือจางสารละลายที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า ที่แต่ละระดับการเจือจางทำการเติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.5 และ 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวัด ELISA ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.7.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของ RAC ที่เติมลงไปในตัวอย่าง แกน Y เป็นค่า %B/B₀ มาการคำนวณความเข้มข้นของ RAC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ RAC ที่ละลายใน PBS



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหีบุดต่อการตรวจวัดด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

3.3.10.3 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู

นำเนื้อหมูที่บดละเอียดแล้ว แบ่งซั่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม จำนวน 6 หลอด แต่หลอดทำการเติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2, 5, 15, 24 และ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดตัวอย่างเนื้อหมูด้วยวิธีที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.3.10.1 แต่หลอดทดลองทำการเจือจางตัวอย่าง 20 เท่าแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยการหาค่าความแม่นยำและค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบต้นแบบ

หลอดทดลอง 6 หลอดที่มีเนื้อหมอบดหลอดละ 1 กรัม



เติม RAC ลงไปในตัวอย่างเนื้อหมูให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2, 5, 15, 24 และ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ทำการสกัดเนื้อหมูด้วยวิธีในข้อ 3.3.10.1



เจือจางสารสกัดที่ระดับการเจือจาง 20 เท่า



วิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยวิธี

indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP)

รูปที่ 3.4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค LC-MS/MS

ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี โดยทำการตรวจวิเคราะห์ RAC และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS สองครั้ง มีขั้นตอนดังนี้

ครั้งที่ 1 ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูโดยชั่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม เติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและส่งตัวอย่างตรวจที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย จำกัด (Central lab)

ครั้งที่ 2 ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูเหมือนกับครั้งที่ 1 แต่เติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและส่งตัวอย่างตรวจที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย จำกัด (Central lab)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเชื่อมต่อ RAC กับโปรตีน BSA

ในการเชื่อมต่อโมเลกุลของ RAC โมเลกุลของโปรตีน (BSA) จะต้องเกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างสองโมเลกุล โดยการสร้างพันธะเคมีของหมู่คาร์บอกซิลของโมเลกุล ractopamine-hemisuccinate กับหมู่อะมิโนของ BSA แต่เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล RAC ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลจึงต้องทำการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ RAC ก่อน โดยใช้ succinic anhydride เป็นสารที่เติมหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ให้แก่ RAC เกิดเป็น ractopamine-hemisuccinate ซึ่งสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TLC จากการทดลองหลังจากนำแผ่น TLC ออกมาจากภาชนะระบบปิดพบว่า

ช่องที่ 1 ซึ่งทำการจุดสาร pyridine ลงไปเมื่อมองด้วยตาเปล่าไม่พบจุดของสารแต่จะมองเห็นแถบสีน้ำตาลอ่อนบริเวณปลายด้านบนของแผ่น TLC และเมื่อนำแผ่น TLC ส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตไม่พบจุดของสารใดเลยเช่นกันแสดงว่า pyridine อาจจะละลายได้ดีในระบบตัวทำละลายนี้และเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าสารในช่องอื่นจนเกือบถึงปลายแผ่น TLC ทำให้มองเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลอ่อนที่ปลายแผ่น TLC ถ้าหากจะทำให้เห็นจุดของ pyridine ได้ชัดเจนขึ้นอาจจะทำการเพิ่มความยาวของแผ่น TLC เพื่อให้เกิดการแยกสารดีขึ้น

ช่องที่ 2 ทำการจุดสาร ractopamine ที่ละลายใน pyridine ลงไปเมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตพบจุดของสารหนึ่งจุดซึ่งคำนวณค่า R_f ได้เท่ากับ 0.8 และพบแถบสีน้ำตาลอ่อนที่คาดว่าเป็น pyridine ที่ปลายแผ่น TLC เช่นเดียวกับช่องที่ 1

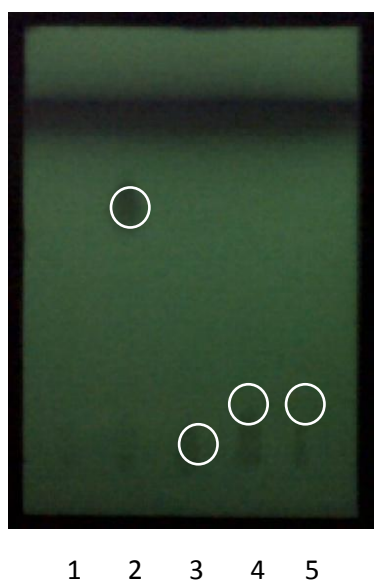
ช่องที่ 3 ทำการจุดสาร succinic anhydride ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการเปลี่ยนอนุพันธ์ของ RAC เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตพบจุดของสารหนึ่งจุดซึ่งคำนวณค่า R_f ได้เท่ากับ 0.07 และพบแถบสีน้ำตาลอ่อนที่คาดว่าเป็น pyridine ที่ปลายแผ่น TLC เช่นกัน

ช่องที่ 4 ทำการจุดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ ก่อนการกำจัด pyridine เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตพบจุดของสารหนึ่งจุดซึ่งคำนวณค่า R_f ได้เท่ากับ 0.2 และพบแถบสีน้ำตาลอ่อนที่คาดว่าเป็น pyridine ที่ปลายแผ่น TLC เช่นเดียวกับช่องที่ 1, 2 และ 3

ช่องที่ 5 ทำการจุดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์หลังการกำจัด pyridine เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตพบจุดของสารหนึ่งจุดซึ่งคำนวณค่า R_f ได้เท่ากับ 0.2 เช่นเดียวกับช่องที่ 4

จากการทดลองพบว่า ในช่องที่ 4 และ 5 เป็นจุดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและไม่ตรงกับจุดของสารตั้งต้นที่ใช้ ค่า R_f ที่คำนวณได้ก็ไม่ตรงกับค่า R_f ของสารตั้งต้นเช่นกัน ดังนั้นจุดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในช่องที่ 4 และ ช่องที่ 5 นี้ น่าจะเป็นจุดของ ractopamine-hemisuccinate ที่เกิดขึ้น

หมายเหตุ ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและการคำนวณค่า R_f แสดงไว้ในภาคผนวก ก ตารางที่ ก.1



Lane 1 = pyridine

Lane 2 = ractopamine ละลายใน pyridine

Lane 3 = succinic anhydride ละลายใน pyridine

Lane 4 = ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (ก่อนกำจัด pyridine)

Lane 5 = ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (หลังกำจัด pyridine)

รูปที่ 4.1 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของ RAC เป็น ractopamine-hemisuccinate เมื่อส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.1.1 การวัดปริมาณโปรตีน

หลังจากการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA แล้วทำการวัดปริมาณโปรตีน ของ RAC-BSA ด้วยชุดทดสอบ BCA พบว่ามีปริมาณ RAC-BSA มีความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.48 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.1) ซึ่งในขั้นตอนการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA ได้ใช้ BSA

ปริมาณ 10 มิลลิกรัม แต่เมื่อคำนวณปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA พบว่ามีความเข้มข้นเพียง 1.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากในระหว่างขั้นตอนการทำการเชื่อมต่อ ractopamine-hemisuccinate กับ BSA เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อไม่สมบูรณ์ และพบว่ายังมีตะกอนสีขาวหลงเหลืออยู่ในภาชนะ ซึ่งตะกอนสีขาวนี้คาดว่าจะเป็้นตะกอนของ BSA และสารอื่นที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA ด้วยวิธี BCA

อัตราส่วนการเจือจาง RAC-BSA (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 562 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
2	0.665	1.11
4	0.415	1.39
8	0.288	1.93
เฉลี่ยค่าความเข้มข้นของโปรตีน		1.48 ± 0.42

หมายเหตุ การคำนวณปริมาณโปรตีน RAC-BSA แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.1.2 การวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ RAC กับ BSA

เมื่อทราบความเข้มข้นของ RAC-BSA ที่ได้จากการหาความเข้มข้นด้วยวิธี BCA จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 แล้ว นำ RAC-BSA มาวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อ RAC กับ BSA โดยการวัดค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของหมู่เอมีนของ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate ด้วยวิธี TNBS พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate ด้วยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน	A ₃₃₅ ของ BSA	A ₃₃₅ ของ RAC-BSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
1.00	1.821	0.932	49
0.50	1.687	0.717	58
0.25	1.221	0.672	45
เฉลี่ยค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของ RAC-BSA			50 ± 6.5

หมายเหตุ การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อแสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา

เมื่อนำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวมาเลี้ยงในอาหารเซลล์ที่เติม 10% FCS และทำการทดสอบความสามารถของเซลล์ไฮบริโดมาในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RAC ด้วยวิธี indirect ELISA ตามข้อ 3.3.3 พบว่าเมื่อทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระดับการเจือจางต่างๆกัน ค่าการดูดกลืนแสงลดลงตามระดับการเจือจางที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฮบริโดมายังคงมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RAC (ตารางที่ 4.3)

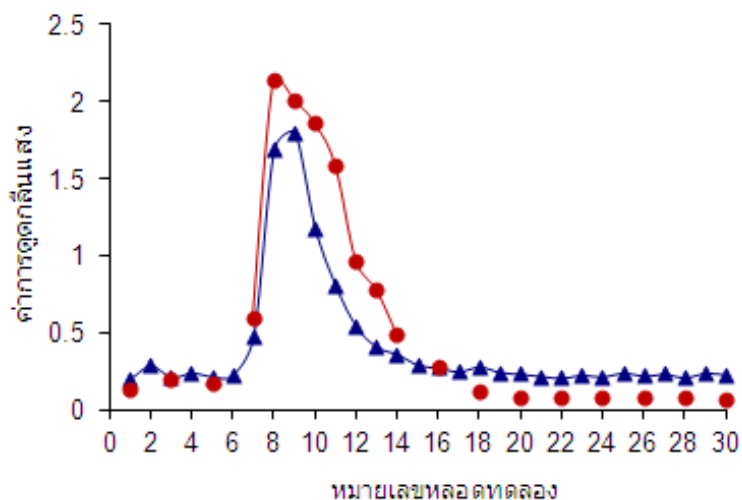
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ด้วยวิธี indirect ELISA

ตัวอย่าง	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4	1	2.718
	5	2.666
	10	2.629
	20	2.422
	40	1.918
	80	1.018
	160	0.729
	320	0.512
	640	0.279
	1280	0.193
2,560	0.125	
อาหารเลี้ยงเซลล์RPMI 1640	-	0.072

4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยใช้ protein G affinity chromatography

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 มีไอโซไทป์ IgG₁ ซึ่งมีความจำเพาะกับโปรตีน G สูง จึงจับกับคอลัมน์ได้ดี เมื่อทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer pH 2.7 ความสามารถในการจับกันระหว่างโปรตีน G และแอนติบอดีลดลง ทำให้แอนติบอดีหลุดจากคอลัมน์ หลังจากทำการเก็บสารละลายแอนติบอดีใส่หลอดทดลองจำนวน 30 หลอด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.5) พบว่าหลอดทดลองหมายเลข 7-14 ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.361-1.805 แสดงว่าแอนติบอดีถูกชะออกมาในหลอดทดลองหมายเลข 7-14 และเพื่อเป็นการยืนยันว่าในหลอดทดลองหมายเลข 7-14

เป็นแอนติบอดีที่ต้องการจริงจึงทำการยืนยันด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.484-2.143 แสดงให้เห็นว่า ในหลอดทดลองหมายเลข 7-14 เป็นแอนติบอดีที่ต้องการจริง



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมแสดงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยการใช้คอลัมน์ protein G sepharose โดยที่ ●— คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ▲— คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ได้จากการทำ indirect ELISA

4.4 การหาปริมาณแอนติบอดี

เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีเป็นโปรตีน หลังจากการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ protein G sepharose แล้วทำการวัดปริมาณแอนติบอดี โดยวิธี BCA คำนวณปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA พบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 10A4 ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 5.87 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีค่าสูงกว่าหลังทำให้บริสุทธิ์เพราะว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมามีการเติมซีรัมและสารอาหารอื่นเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต และอาจจะเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่เซลล์ไฮบริโดมาผลิตแล้วหลั่งออกมาออกเซลล์ ทำให้มีโปรตีนหลายชนิดเจือปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทำให้ค่าที่ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนสูงกว่า เมื่อนำอาหาร

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ protein G ซึ่งจะมีแต่แอนติบอดีที่ต้องการเท่านั้นที่สามารถจับกับคอลัมน์ได้ ทำให้ค่าที่ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนต่ำกว่าโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์วัดด้วยวิธี BCA

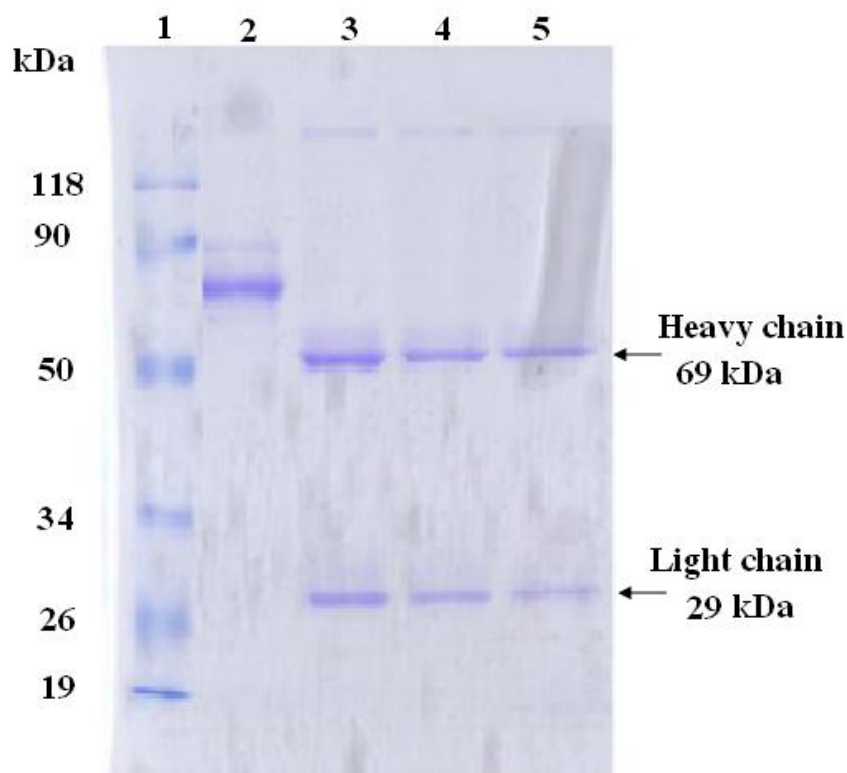
	อัตราส่วนการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาก่อนผ่านการทำให้บริสุทธิ์	6	1.141	5.23
	8	0.943	5.76
	10	0.870	6.64
		เฉลี่ย	5.87 ± 0.71
อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์	ไม่เจือจาง	0.474	0.36
	2	0.370	0.56
		เฉลี่ย	0.46

4.5 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้

บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เมื่อนำแอนติบอดีที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ protein G sepharose แล้ว นำแอนติบอดีมาทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแถบที่ 2 ซึ่งเป็นแถบของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FCS ลักษณะของแถบโปรตีนจะมีแถบที่มองเห็นอย่างชัดเจน และมีแถบเล็กอีกหลายแถบ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์มี FCS และสารอาหารอื่นปนอยู่ ทำให้เห็นแถบโปรตีนหลายแถบ ซึ่งเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

โปรตีนหรือสารอาหารในอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกกำจัดออกไป เหลือเพียงแต่แอนติบอดีที่ต้องการ ในช่องที่ 3, 4 และ 5 จึงไม่พบแถบของโปรตีนในซีรัมอยู่แล้ว ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะทำ SDS-PAGE มีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วน heavy-chain และ light-chain ของโมเลกุลของแอนติบอดีแยกออกจากกัน จึงเห็นแถบของโปรตีนสองแถบในช่องที่ 3, 4 และ 5 ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่า relative mobility (R_r) กับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานเพื่อหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.3 และรูปที่ 4) พบว่าแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 69 กิโลดาลตัน (kDa) คาดว่าจะเป็นส่วนของ heavy-chain ของแอนติบอดี ในขณะที่แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน คาดว่าเป็นส่วน light-chain ของแอนติบอดี



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

- ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.6)
 ช่องที่ 2: อาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มี 10% FCS
 ช่องที่ 3, 4, 5: โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 5, 3 และ 2 ไมโครกรัมตามลำดับ

4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP)

4.6.1 การเชื่อมต่อ RAC กับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (RAC-HRP)

เมื่อทำการวัดปริมาณฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดสที่เชื่อมต่อกับ RAC ด้วยวิธี BCA โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA ในภาคผนวก ก รูปที่ ก.3 พบว่ามีปริมาณโปรตีนของ RAC-HRP เท่ากับ 0.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ RAC-HRP ด้วยวิธี BCA

ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ RAC-HRP (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไม่เจือจาง	0.595	0.46
2	0.390	0.60
	เฉลี่ย	0.53

4.6.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับ RAC-HRP การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่างปริมาณแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม กับ RAC-HRP โดยทำการเตรียมแอนติบอดีให้มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจาง RAC-HRP ให้มีความเข้มข้น 0.0078-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเลือกคู่ของแอนติบอดีกับ RAC-HRP ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ใกล้เคียง 1 (ตารางที่ 4.6) และได้ทำการเลือกคู่ของแอนติบอดีและ RAC-HRP 3 คู่ความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 ดังนี้ ใช้แอนติบอดีเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรคู่กับ RAC-HRP เข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.564, 1.620 และ 1.476 ตามลำดับ แล้วย่นำคู่ของ RAC-HRP และแอนติบอดีทั้ง 3 คู่ไปทำการทดสอบความไวด้วยวิธี Direct competitive ELISA (RAC-HRP) ต่อไป

ตารางที่ 4.6 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ RAC ที่เชื่อมต่อกับ HRP เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP)

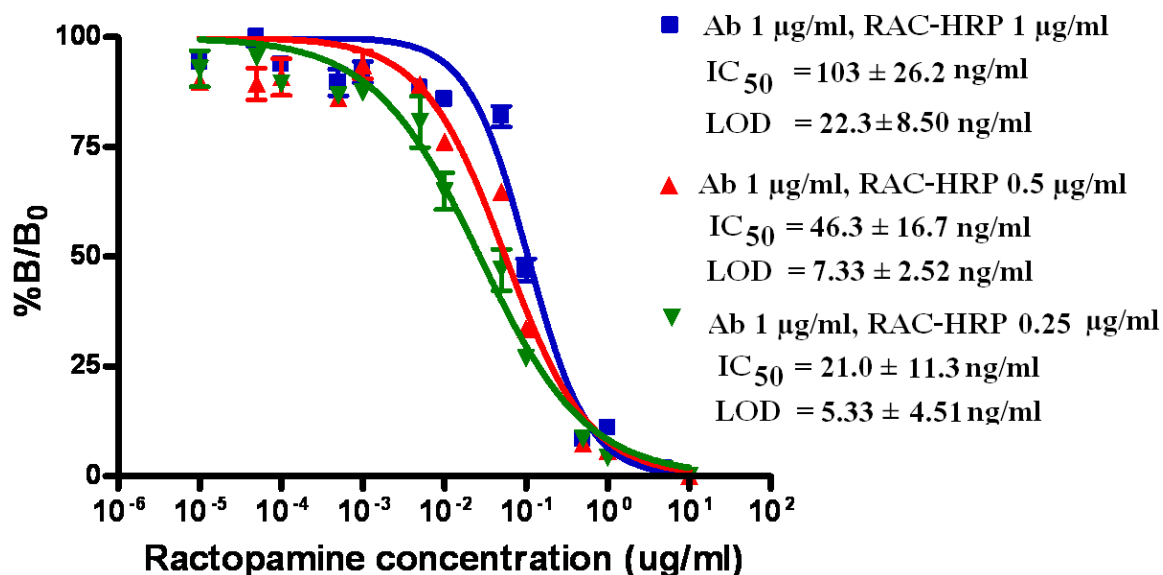
ความเข้มข้นของ RAC-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)			
	1	0.5	0.25	0.125
1.00	1.564*	0.680	0.301	0.240
0.500	1.620*	0.844	0.265	0.175
0.250	1.476*	0.813	0.245	0.211
0.125	0.822	0.523	0.259	0.188
0.0625	0.461	0.360	0.164	0.143
0.0312	0.296	0.227	0.129	0.129
0.0156	0.293	0.244	0.109	0.118
0.0078	0.231	0.170	0.135	0.115

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบและเครื่องหมาย * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติบอดีและ RAC-HRP ที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความไวของแอนติบอดีในการจับกับ RAC รูปอิสระ

4.6.3 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP)

การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP) จะทำการเลือกคู่ของแอนติบอดีและ RAC-HRP ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม โดยเลือกคู่ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (ตารางที่ 4.6) ที่ได้เลือกไว้แล้ว 3 คู่ความเข้มข้น และทำการแปรค่าความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระที่นำมาใช้เป็นตัวแข่งขันในช่วงความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B / B_0 โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสง

ในภาวะที่มี RAC อีสาระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีสาร RAC มาวัดกราฟด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03 ได้ค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของ RAC อีสาระที่ทำให้ค่า $\%B/B_0$ ลดลงครึ่งหนึ่ง และค่า LOD ซึ่งเป็นค่าที่บอกปริมาณต่ำสุดของ RAC ที่สามารถวัดได้ (รูปที่ 4.4) จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-HRP ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 103 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 22.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-HRP ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 46.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 7.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-HRP ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 5.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} และค่า LOD ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ความเข้มข้นของแอนติบอดีและ RAC-HRP พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-HRP ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นคู่ความเข้มข้นที่ทำให้ชุดตรวจแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP) มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี

Direct competitive ELISA (RAC-HRP) (n=3)

หมายเหตุ n คือจำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)

4.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และแอนติบอดี

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่าง RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมกับแอนติบอดี โดยทำการเตรียม RAC-BSA ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางแอนติบอดีให้มีความเข้มข้น 0.0078-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ใกล้เคียง 1 และได้ทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และแอนติบอดี 3 คู่ความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 ดังนี้ ใช้ RAC-BSA เข้มข้น 2, 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรคู่กับ แอนติบอดี เข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 คู่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.882, 1.500 และ 1.600 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) แล้วนำคู่ของ RAC-BSA และแอนติบอดี ทั้ง 3 คู่ไปทำการทดสอบความไวด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ต่อไป

ตารางที่ 4.7 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และแอนติบอดี เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของ RAC-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	4	2	1	0.5
1.00	2.922	3.038	2.921	2.626
0.500	2.986	3.072	2.855	2.080
0.250	2.866	2.856	2.343	1.600*
0.125	2.226	2.056	1.500*	0.824
0.0625	0.899	0.882*	0.699	0.472
0.0312	0.348	0.378	0.334	0.258
0.0156	0.189	0.186	0.170	0.161
0.00780	0.119	0.106	0.109	0.101

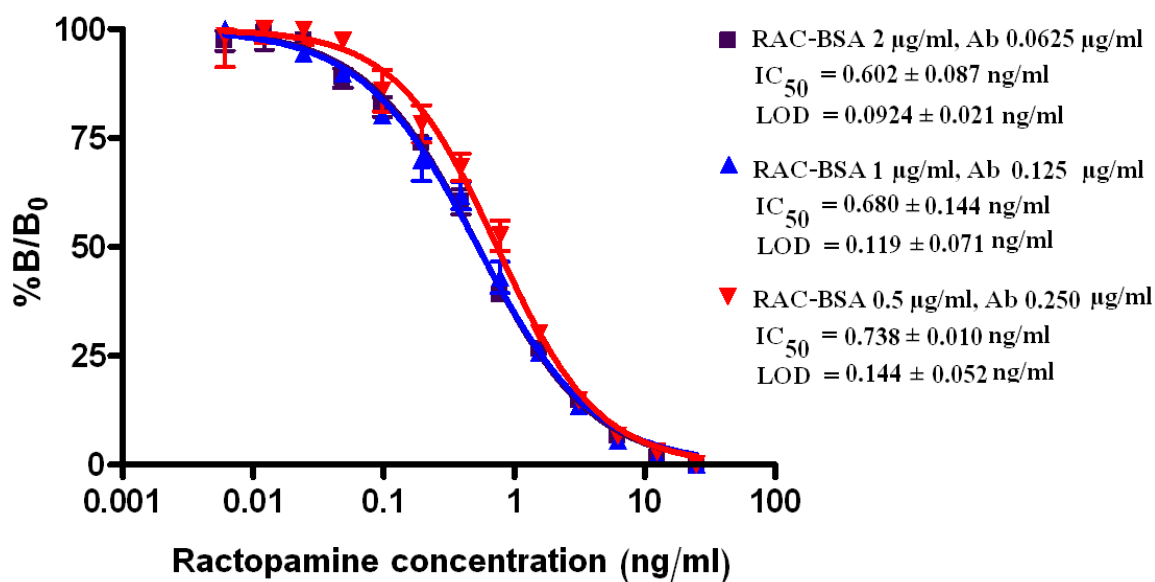
หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบและเครื่องหมาย * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้ RAC-BSA และแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความไวของแอนติบอดีในการจับกับ RAC รูปอิสระ

4.7.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบ

แบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)

การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA จะทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และแอนติบอดี ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม โดยเลือกคู่ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (ตารางที่ 4.7) ที่ได้เลือกไว้แล้ว 3 คู่ความเข้มข้นจากการทดลองในข้อ 4.7.1 ทำการแปรค่าความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระในช่วงความเข้มข้น 0-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B / B_0 มาวาดกราฟด้วยโปรแกรม Graphpad Prism

4.03 เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} และค่า LOD จากการทดลอง พบว่าเมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและแอนติบอดีเข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.09 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและแอนติบอดีเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.680 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและแอนติบอดีเข้มข้น 0.250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.74 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.14 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (รูปที่ 4.5) จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} และค่า LOD ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ความเข้มข้นของ RAC-BSA และแอนติบอดี พบว่าเมื่อใช้ RAC-BSA ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ชุดตรวจแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี

Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) (n=3)

หมายเหตุ_n คือจำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

4.8 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

4.8.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่าง RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมกับ Ab-biotin โดยทำการเตรียม RAC-BSA ให้มีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจาง Ab-biotin ให้มีความเข้มข้น 0.0039-0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ใกล้เคียง 1 (ตารางที่ 4.8) โดยเมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรคู่กับ Ab-biotin เข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คู่กับ Ab-biotin เข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทั้ง 3 คู่ความเข้มข้นให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.958, 1.203 และ 0.848 ตามลำดับ แล้วนำ 3 คู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ไปหาค่าความไวด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ต่อไป

ตารางที่ 4.8 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และ Ab-biotin เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

ความเข้มข้นของ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ไมโครเมตร ความเข้มข้นของ RAC-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	2	1	0.5	0.25
0.500	3.351	2.943	2.759	1.638
0.250	3.315	2.628	1.730	0.893
0.125	1.368	1.203*	0.848*	0.528
0.0625	0.958*	0.623	0.544	0.311
0.0312	0.622	0.347	0.255	0.225
0.0156	0.239	0.177	0.186	0.165
0.0078	0.121	0.138	0.188	0.159
0.0039	0.105	0.114	0.121	0.154

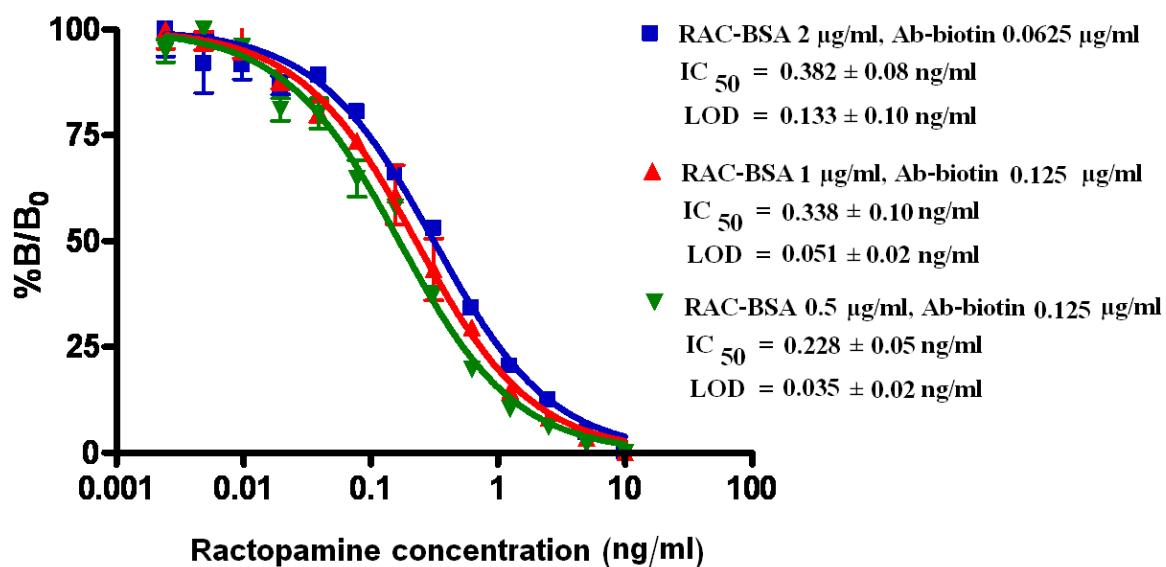
หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบและเครื่องหมาย * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความไวของแอนติบอดีในการจับกับ RAC รูปอิสระ

4.7.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบ

แบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA จะทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ทำปฏิกิริยากันอย่างเหมาะสม โดยเลือกคู่ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (ตารางที่ 4.8) ที่ได้เลือกไว้แล้ว 3 คู่ความเข้มข้นจากการทดลองในข้อ 4.8.1 ทำการแปรค่าความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระที่ในช่วงความเข้มข้น 0-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B / B_0 มาวาดกราฟด้วยโปรแกรม Graphpad Prism

4.03 เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} และค่า LOD จากการทดลอง (รูปที่ 4.6) พบว่าเมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและ Ab-biotin เข้มข้น 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.38 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและ Ab-biotin เข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.34 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อใช้ RAC-BSA เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและ Ab-biotin เข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD เท่ากับ 0.228 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.035 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} และค่า LOD ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin พบว่าเมื่อใช้ RAC-BSA ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ Ab-biotin ที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ชุดตรวจแบบ Indirect competitive ELISA มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี

Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) (n=3)

หมายเหตุ n คือจำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

4.9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบ พบว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (RAC-HRP) ให้ค่าความไวต่ำที่สุดโดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 21 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ ชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 0.602 และ 0.092 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และชุดตรวจสอบที่มีความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 0.228 และ 0.035 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) จึงได้เลือกชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เป็นชุดตรวจสอบต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษาผลของ อุณหภูมิและเวลาในการบ่ม, สร้างกราฟมาตรฐาน และประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

ตารางที่ 4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

รูปแบบของชุด ตรวจสอบ	ความเข้มข้นของ		IC_{50} (นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	เวลาที่ใช้ ในการ ทดสอบ
	แอนติเจน	แอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
Direct competitive ELISA (RAC-HRP)	0.2500	1	21	5	2 ชั่วโมง 15 นาที
Indirect competitive ELISA (GAM-HRP)	2	0.0625	0.60	0.09	3 ชั่วโมง 15 นาที
Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)	0.5	0.125	0.23	0.04	2 ชั่วโมง 30 นาที

4.10 การเตรียมชุดตรวจสอบค้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

4.9.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RAC-BSA และ Ab-biotin เมื่อทำการแปรรูณภูมิ

จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่เปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบทั้ง 3 แบบ จะใช้เวลาในการบ่มแอนติเจนและแอนติบอดีประมาณ 2-3 ชั่วโมง ดังนั้นจึงได้ทำการลดเวลาในการบ่ม โดยใช้เวลาดบ่ม RAC-BSA และ Ab-biotin เพียงแค่ 1 ชั่วโมง เพื่อความรวดเร็วและสะดวกมากขึ้นในการใช้งาน วิธีการทดลองจะทำการโดย บ่ม RAC-BSA และ Ab-biotin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ อุณหภูมิห้อง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่าง RAC-BSA กับ Ab-biotin และหาค่าความไวต่อไป

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากันระหว่าง RAC-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมกับ Ab-biotin จะใช้วิธีทดสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) โดยทำการเตรียม RAC-BSA ให้มีความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจาง Ab-biotin ให้มีความเข้มข้น 0.05-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ใกล้เคียง 1 พบว่าเมื่อบ่ม RAC-BSA และ Ab-biotin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ RAC-BSA เข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คู่กับ Ab-biotin เข้มข้น 0.05, 0.075 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อบ่ม RAC-BSA และ Ab-biotin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ RAC-BSA เข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คู่กับ Ab-biotin เข้มข้น 0.05, 0.075 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง RAC-BSA และ Ab-biotin เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

ความเข้มข้นของ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ไมโครเมตร					
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส			1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง		
	1	0.5	0.25	1	0.5	0.25
0.200	2.350	2.264	1.369	2.425	2.164	1.200
0.175	2.326	1.962	1.174	2.308	1.987	1.134
0.150	2.356	2.064	1.186	2.348	1.896	1.205
0.125	2.285	1.773	1.035*	2.255	1.773	1.071*
0.100	2.075	1.543	0.888	2.053	1.587	0.897
0.075	1.710	1.137*	0.674	1.647	1.106*	0.699
0.050	1.377*	0.860	0.495	1.228*	0.863	0.532

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบและเครื่องหมาย * คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความไวของแอนติบอดีในการจับกับ RAC รูปอิสระ

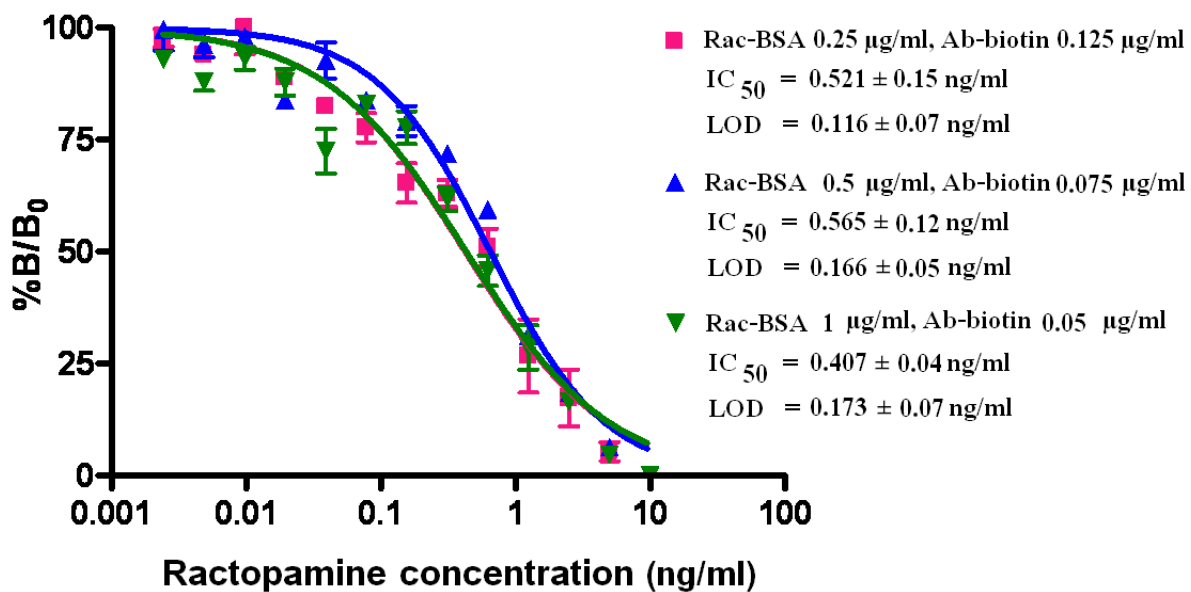
4.9.2 การทดสอบหาความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจ

สอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อทำการแปรอุณหภูมิ

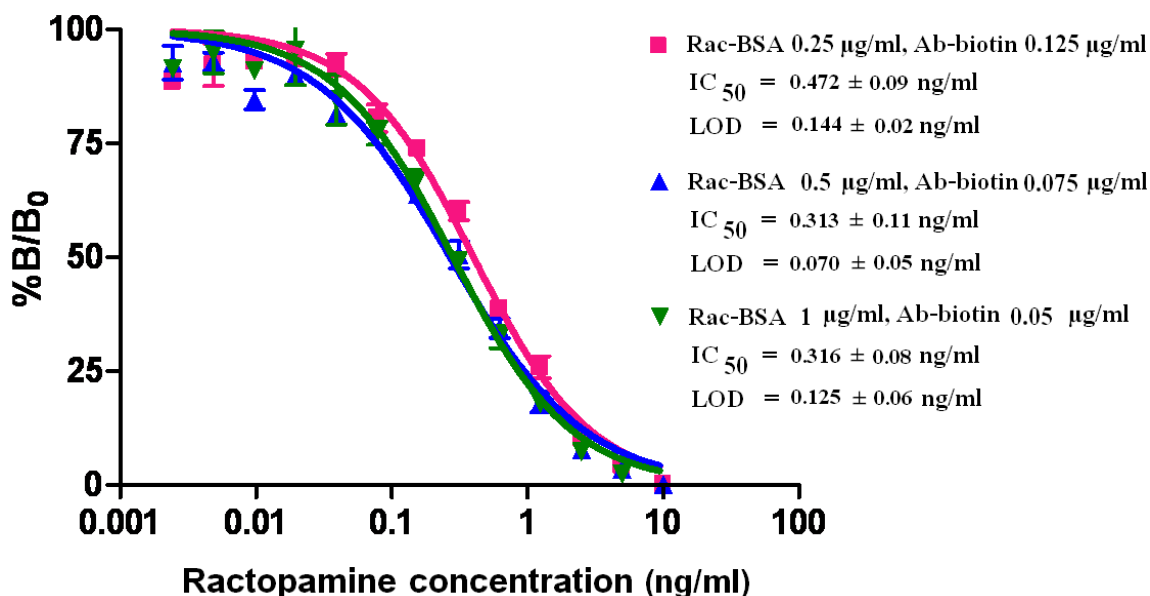
การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) จะทำการเลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 (ผลการทดลองจากตารางที่ 4.8) และทำการแปรค่าความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระที่ในช่วงความเข้มข้น

0-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง B / B_0 มาวาดกราฟด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 4.03 เพื่อคำนวณหา IC_{50} และค่า LOD จากการทดลอง (รูปที่ 4.7 และ 4.8) พบว่าเมื่อบ่ม ELISA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ RAC-BSA เข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและ Ab-biotin เข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, RAC-BSA เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Ab-biotin เข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-BSA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Ab-biotin เข้มข้น 0.050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.521, 0.565 และ 0.407 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 0.12, 0.17, 0.17 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อบ่ม ELISA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องใช้ RAC-BSA เข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเคลือบพื้นผิวจานทดสอบและ Ab-biotin เข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, RAC-BSA เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Ab-biotin เข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RAC-BSA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Ab-biotin เข้มข้น 0.050 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.47, 0.31, 0.32 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOD เท่ากับ 0.14, 0.07, 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบที่บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ RAC-BSA ความเข้มข้น 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ Ab-biotin ความเข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ค่า IC_{50} และ LOD ต่ำที่สุด แสดงว่ามีความไวสูง จึงได้เลือกคู่ของ RAC-BSA และ Ab-biotin ดังกล่าวไปสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาร่วม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง

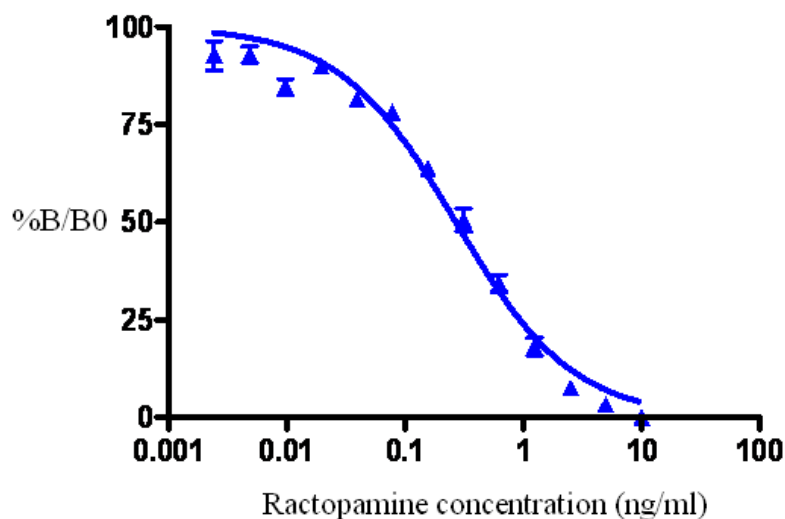
4.9.3 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

หลังจากทำการเลือกชุดตรวจสอบที่มีความไวมากที่สุดจากการแปรอุณหภูมิในการบ่ม ELISA โดยใช้ RAC-BSA ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเคลือบพื้นผิวของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมและ Ab-biotin ที่ความเข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแปรความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน ความเข้มข้น 0 -10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเลือกช่วงความเข้มข้นของ RAC ที่กราฟเป็นเส้นตรงสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และจากรูปกราฟแสดงความไวและค่าการดูคลิ่นแสงช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรง ได้เลือกช่วงความเข้มข้นของ RAC 0.0390-5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเตรียมกราฟมาตรฐานต่อไป (ตารางที่ 4.11, รูปที่ 4.9)

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกราฟความไวที่ใช้สำหรับเลือกช่วงของกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ RAC อีสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	
	RAC-BSA 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	Ab-biotin 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
0		1.122
0.002		1.048
0.005		1.050
0.010		0.966
0.020		1.020
0.039		0.935
0.078		0.902
0.156		0.757
0.312		0.623
0.625		0.460
1.25		0.297
2.50		0.191
5.00		0.148
10.0		0.114

ช่วงความเข้มข้นของ RAC
ที่เลือกสำหรับสร้างกราฟ
มาตรฐาน

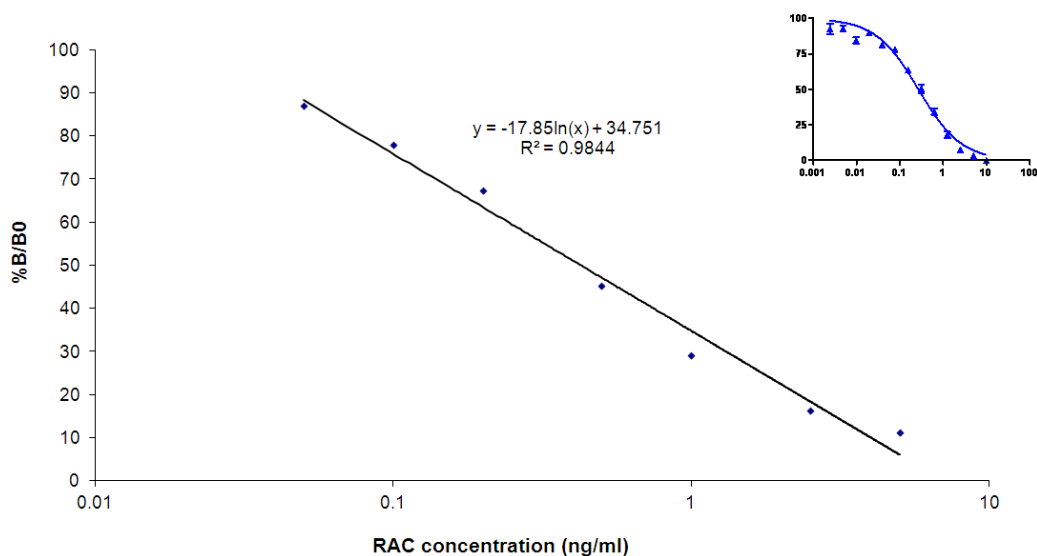


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของ RAC ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

เมื่อทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของ RAC ในรูปอิสระที่อยู่ในช่วงเส้นตรงของกราฟความไวแล้ว เพื่อให้เกิดความสะดวกในการเตรียมสาร จึงได้กำหนดความเข้มข้นของ RAC ใหม่แต่ยังอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ RAC ที่ได้เลือกไว้ โดยใช้ความเข้มข้นของ RAC 7 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.5 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการเตรียมกราฟมาตรฐานในการทดลองครั้งต่อไป เมื่อทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) นำค่าการดูดที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน X เป็นค่า %B/B0 แกน Y เป็นความเข้มข้นของ RAC ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.12, รูปที่ 4.10)

ตารางที่ 4.12 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรที่ได้จากการทำ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ RAC ต้นแบบ

ความเข้มข้น RAC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	%B/B ₀
0	1.288	100
0.050	1.121	87
0.10	1.005	78
0.20	0.866	67
0.50	0.584	45
1.00	0.374	29
2.50	0.209	16
5.00	0.135	11



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP)

4.11 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.11.1 ค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการทดสอบหาค่าความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยวิธี indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) แล้วนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 พบว่า ค่า LOD เท่ากับ 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 0.133 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้สามารถตรวจวัดปริมาณ RAC ได้ต่ำกว่าค่า MRL ที่กำหนด (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 ค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เพื่อใช้คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ไม่มี RAC (B_0)		ค่าเฉลี่ยของค่า B_0	SD	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
1.180	1.134	1.122	0.035	0.02	0.13
1.146	1.100				
1.077	1.084				
1.110	1.145				

4.11.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ RAC ต้นแบบ

ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยทำการทดสอบกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ และสารในเบตาอะโกนิสต์ ได้แก่ clenbuteral, sulbutamol, brombuterol, terbutaline ที่ใช้ในการแข่งขันที่ความเข้มข้น 30,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงใกล้เคียง 1 นั้นแสดงว่าสารเหล่านี้ไม่แย่งจับกับ Ab-biotin ทำให้มีค่า IC_{50} สูง มากกว่า 30,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหา

เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามพบว่าได้ค่าต่ำกว่า 0.01% แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบไม่สามารถจับกับสารเหล่านี้ได้ เมื่อทดสอบกับสารในกลุ่มได้แก่ Dobutamine HCL, Dopamine HCL, clenproperal และ bromchlorobuteral ที่ใช้ในการแข่งขันที่ความเข้มข้น 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำมากมีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวก คือหลุมที่มีการเติม RAC ในอิสระที่ความเข้มข้น 3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นแสดงว่าสารเหล่านี้มีการแย่งจับกับ Ab-biotin เมื่อทำการหาค่า IC_{50} และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามพบที่ % CR อยู่ในช่วง 0.05-48.5%

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบต้นแบบเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่มเบตาอะโกนิสต์เพียงบางสารเท่านั้น แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ Dobutamine HCL มากที่สุดเนื่องจากโมเลกุลของ Dobutamine มีวงอะโรมาติกที่ส่วนปลายโมเลกุลทั้งสองด้านซึ่งคล้ายคลึงกับโครงสร้างโมเลกุลของ RAC ทำให้แอนติบอดีสามารถจดจำและจับกับโครงสร้างของสารที่มีโครงสร้างคล้ายโมเลกุลของ RAC ได้ ส่วนสารอื่นในกลุ่มและนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามน้อย นั้นแสดงให้เห็นว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อ RAC สูงและไม่ทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์ (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ค่า IC_{50} และผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเบตาอะโกนิสต์

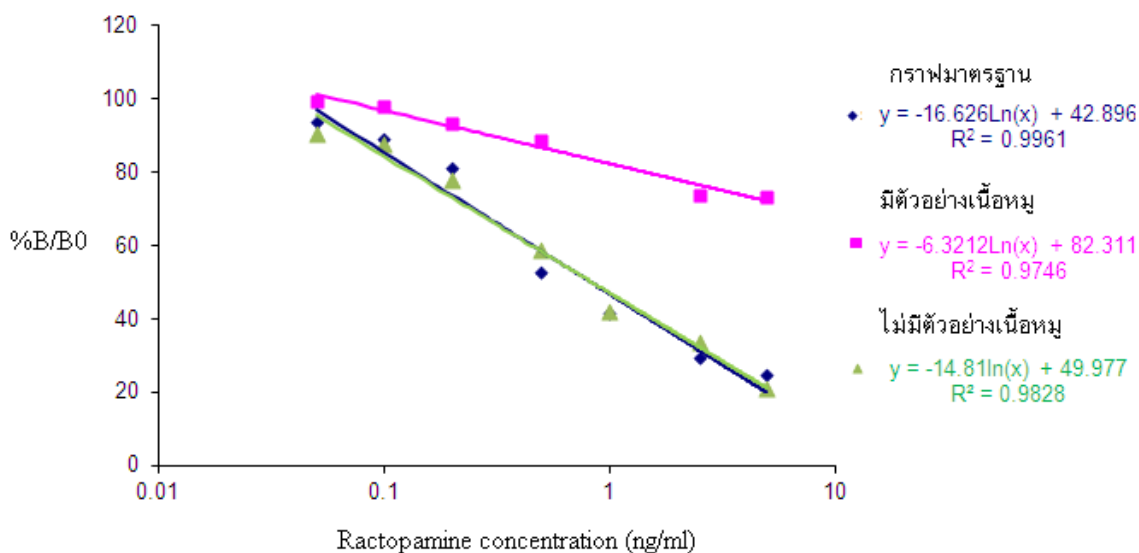
	สารที่ใช้ทดสอบ	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	%CR
สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์	Ractopamine	0.31	100
	Dobutamine HCL	0.64	48.5
	Dopamine HCL	187.7	0.17
	clenproperal	625.0	0.05
	bromchlorobuteral	25.15	1.24
	clenbuteral	> 30,000	< 0.01
	sulbutamol	> 30,000	< 0.01
	brombuterol	> 30,000	< 0.01
	terbutaline	> 30,000	< 0.01
สารกลุ่มเบตาอะโกนิสต์	furazolidone	> 30,000	< 0.01
	chloramphenical	> 30,000	< 0.01
	norfloxacin	> 30,000	< 0.01
	enrofloxacin	> 30,000	< 0.01
	cipofloxacin	> 30,000	< 0.01
	oxytetracyclin	> 30,000	< 0.01

หมายเหตุ การคำนวณ % CR อยู่ในภาคผนวก ก

4.12 การตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.12.1 การศึกษาผลกระทบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

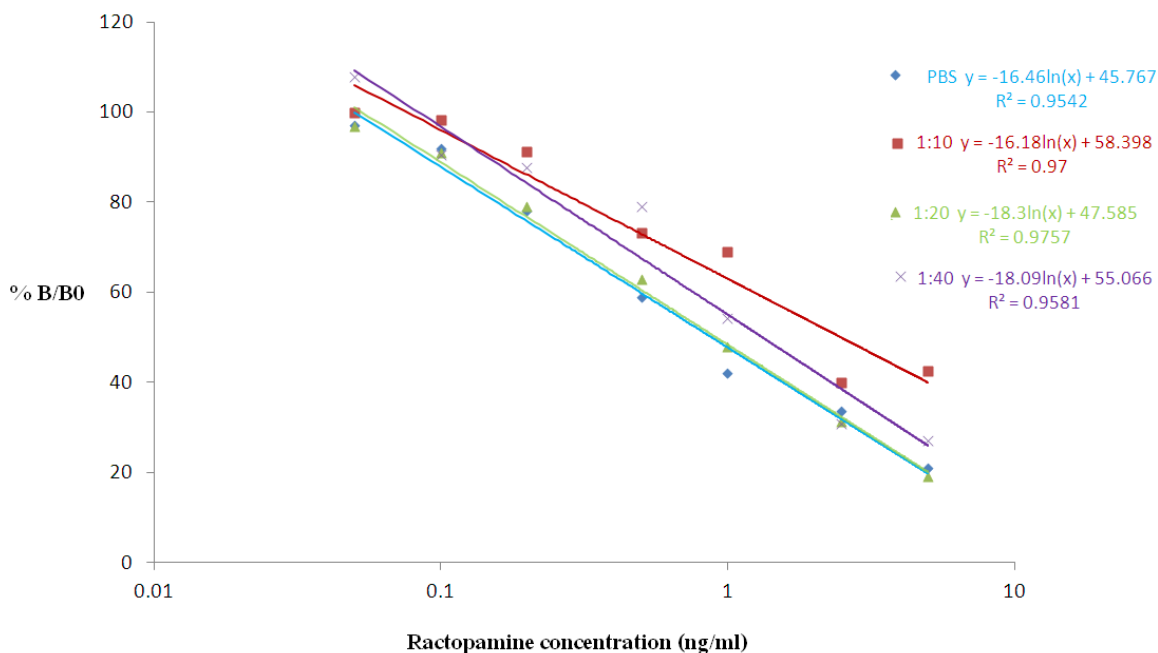
จากการศึกษาผลของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูต่อการทำ ELISA โดยการเติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรลงในตัวอย่างที่มีเนื้อหมอบดและไม่มีเนื้อหมอบด ทำการสกัดตัวอย่างและตรวจวัดปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเติม RAC ลงไปในตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อหมูแล้วสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของ RAC ที่เติมลงไป แกน Y เป็นค่า %B/B₀ พบว่าได้เส้นกราฟใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของ RAC ที่ละลายใน PBS ส่วนเส้นกราฟของค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเติม RAC ลงไปในตัวอย่างที่มีเนื้อหมูพบว่าเส้นกราฟคลาดเคลื่อนไปจากเส้นกราฟของกราฟมาตรฐานมาก แสดงว่าแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูมีผลต่อ ELISA ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณ RAC คลาดเคลื่อนไปมาก ดังนั้นจึงต้องทำการลดแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูเพื่อให้มีผลต่อ ELISA น้อยที่สุด (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ RAC ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างเนื้อหมูและตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อหมู

4.12.2 การศึกษาระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

จากผลการทดลองข้อ 4.12.1 พบว่าแมทริกในเนื้อหมูมีผลต่อ ELISA ทำให้การตรวจวัดปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบคลาดเคลื่อน จึงได้ทำการลดแมทริกในเนื้อหมู โดยการสกัดเนื้อหมูตามวิธีข้อ 3.4.10.1 และทำการเจือจางแมทริกในเนื้อหมูที่ระดับการเจือจาง 10, 20 และ 40 เท่า นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของแรกพามีนในตัวอย่าง แกน Y เป็นค่า %B/B0 แล้วเทียบกราฟของระดับการเจือจางต่างๆกับกราฟของ RAC มาตรฐานที่ละลายใน PBS พบว่า ที่ระดับการเจือจาง 10 เท่าเส้นกราฟยังเบนออกจากเส้นกราฟของ RAC มาตรฐานแสดงว่าที่ระดับการเจือจาง 10 เท่ายังมีผลของแมทริกจากเนื้อหมูอยู่ ส่วนที่อัตราการเจือจาง 20 เท่าเส้นกราฟทับกับเส้นกราฟมาตรฐานของ RAC แสดงให้เห็นว่าที่ระดับการเจือจาง 20 เท่า เป็นค่าการเจือจางที่เหมาะสมที่ทำให้ไม่มีผลของแมทริกจากเนื้อหมูต่อการวัดปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และที่อัตราการเจือจาง 40 เท่า เส้นกราฟเบนออกจากเส้นกราฟของ RAC มาตรฐานเล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกอัตราการเจือจางตัวอย่างที่ 20 เท่าสำหรับตรวจวัดปริมาณ RAC ในขั้นตอนต่อไป (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 ผลของระดับการเจือจางแมทริกในเนื้อหมู

4.12.3 การตรวจวัดปริมาณ RAC ตัวอย่างเนื้อหมู

ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อหมุบดขังหมูใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 กรัม จำนวน 6 หลอดโดยเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูไว้ 4 ชุด แต่ละชุดทำการเติม RAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 2, 5, 15, 25, 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากทำการสกัดเนื้อหมูแล้วตามวิธีการสกัดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.10.1 ทำการเจือจางตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ วิเคราะห์ปริมาณ RAC ในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน พร้อมกับหาค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยจะรายงานปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในรูปของค่า % recovery (RV) และค่าความแม่นยำในรูปของค่า % CV พบว่าเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูเมื่อทำการทดลองที่วันและเวลาเดียวกัน กับเมื่อทำการทดลองที่วันและเวลาต่างกัน พบว่าความถูกต้องในการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมู อยู่ที่ระหว่าง 85-108% และค่าความแม่นยำอยู่ที่ระหว่าง 1.6-14.7% (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู

ครั้งที่สกัด	ปริมาณ RAC ที่เติมลงไป ในตัวอย่างเนื้อหมู (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Intra-variation assay (n=4)			
		ปริมาณสารที่แท้จริง (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารที่ วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% RV	%CV
1	2.00	0.05	1.85±0.14	92	7.6
	5.00	0.25	4.72±0.15	94	3.2
	15.0	0.75	14.01±2.06	94	14.7
	25.0	1.25	23.18±1.08	93	4.7
	40.0	2.00	38.42±3.21	96	8.4

2	2.00	0.05	2.03±0.16	101	8.1
	5.00	0.25	4.25±0.07	85	1.6
	15.0	0.75	13.15±1.06	88	8.1
	25.0	1.25	26.90±1.89	108	7.0
	40.0	2.00	37.63±2.57	94	6.8
3	2.00	0.05	1.88±0.09	94	4.9
	5.00	0.25	4.72±0.55	94	11.7
	15.0	0.75	15.00±0.66	100	4.4
	25.0	1.25	24.71±2.13	99	8.6
	40.0	2.00	39.16±1.56	98	4.0
4	2.00	0.05	1.97±0.22	99	11.1
	5.00	0.25	4.41±0.40	88	9.1
	15.0	0.75	13.86±1.77	92	12.7
	25.0	1.25	23.72±1.63	95	6.9
	40.0	2.00	40.59±4.03	101	9.9

หมายเหตุ n คือจำนวนครั้งของการสกัด , % RV ; % recovery

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation assay ในตัวอย่างเนื้อหมู

ปริมาณ RAC (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	Inter-variation assay (N=4)		
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% RV	%CV
2.00	1.93±0.08	97	4.3
5.00	4.52±0.23	90	5.5
15.0	14.00±0.76	93	5.4
25.0	24.63±1.65	91	6.7
40.0	38.95±1.26	97	3.2

หมายเหตุ N คือจำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

4.13 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค LC-MS/MS

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ RAC (ภาคผนวก ก รูปที่ ก. 6) พบว่าปริมาณ RAC ที่ตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0.88-21.26 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและค่า % recovery อยู่ในช่วง 88-114% ซึ่งอยู่ในช่วงของค่าที่ยอมรับได้ระหว่าง 80-120% ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ RAC ด้วยวิธี LC-MS/MS จากบริษัท Central lab ทั้งสองครั้งพบว่าปริมาณ RAC อยู่ในช่วง 0.46-8.87นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและค่า % recovery อยู่ในช่วง 35-46% ซึ่งปริมาณที่ตรวจวิเคราะห์ได้คลาดเคลื่อนจากปริมาณ RAC ที่เติมลงไปในตัวอย่างเป็นเนื้อหมู ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากวิธีและขั้นตอนการสกัดสารจากตัวอย่างเนื้อหมูต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดในงานวิจัยนี้ โดยที่บริษัท Central lab ใช้ 0.01 M HCl ในการสกัด RAC จากตัวอย่างเนื้อหมู และนำสารที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างด้วยคอลัมน์ SPE ก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ซึ่งการนำสารละลายตัวอย่างผ่านคอลัมน์อาจจะเกิดการสูญหายของสารในระหว่างขั้นตอนการสกัดจึงทำให้ปริมาณสารลดลง

ตารางที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อหมูด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค LC-MS/MS

ครั้งที่	ปริมาณ RAC ที่เติมลงไป ในตัวอย่างเนื้อหมู (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=5)		เทคนิค LC-MS-MS บริษัท Central lab ประเทศไทย	
		ปริมาณที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% RV	ปริมาณที่วัดได้ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	% RV
1	1	0.88±0.02	88	0.46±0.03	46
	5	5.70±0.24	114	1.78±0.23	36
2	5	4.73±0.40	95	1.73	35
	20	21.26±1.71	106	8.87	44

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้นำไฮบริโดมาเซลล์รหัสโคลน 10A4 ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ RAC ได้ เมื่อนำเซลล์ไฮบริโดมาทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณ แอนติบอดีแล้วผ่านขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรสแล้วนำ แอนติบอดีมาตรวจสอบความบริสุทธิ์หามวลโมเลกุลของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า แอนติบอดีมีน้ำหนักโมเลกุลของ heavy chain และ light chain ขนาด 69 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นนำแอนติบอดีมาศึกษาและพัฒนาชุดตรวจ RAC ด้วยวิธี ELISA 3 รูปแบบได้แก่ Direct competitive ELISA (RAC-HRP) , Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) และ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อทำการหาค่าความไวของชุดตรวจสอบทั้ง 3 รูปแบบพบว่าชุด ตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ให้ค่าความไวดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 0.23 และ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาคือชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (GAM-HRP) โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 0.60 และ 0.09 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ และลำดับสุดท้ายคือชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA มีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 21.0 และ 5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังนั้นจึงได้เลือกชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ

เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมและสะดวกแก่ผู้ใช้ในการตรวจวัด RAC โดยการแปรค่าอุณหภูมิและเวลาในการบ่ม ELISA พบว่า เมื่อทำการบ่ม ELISA เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้องพบว่าต้องใช้เวลาในเคลือบพื้นผิวงานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้แอนติบอดีเข้มข้น 0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำชุด ตรวจสอบต้นแบบมาหาช่วงของกราฟมาตรฐานพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบมีค่ากราฟมาตรฐานของ RAC อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.05-5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชุดตรวจสอบต้นแบบมีความไวในการ ตรวจวัดปริมาณ RAC ต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 0.024 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจวัด RAC ได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่ม เบตาอะโกนิสต์ เมื่อทดสอบความแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยคำนวณจากค่าร้อยละของ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra - variation assay และ inter - variation assay อยู่ในช่วง

7.1-14.7% และ 9.4-18.2% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาทำการตรวจวัดปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ทำการเติม RAC ลงไปในตัวอย่างพบว่าความแม่นยำและความถูกต้องของชุดตรวจสอบต้นแบบอยู่ในช่วง 3.2-14.7% และ 85-101% ตามลำดับ ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้ศึกษาจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณ RAC ในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูงและใช้เวลาในการทดสอบสั้น สะดวกต่อการใช้งาน

อย่างไรก็ตามงานนี้ยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในหลายๆด้านหากจะมีการนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงการค้า เช่น ศึกษาอายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ พัฒนาประสิทธิภาพของแอนติบอดีให้มีความเสถียรมากขึ้นเพื่อให้เหมาะกับการเก็บชุดตรวจสอบเพื่อให้ใช้งานได้ในระยะยาว พร้อมกับการเตรียมเอนไซม์และสับสเตรตที่สามารถใช้งานได้ทันที เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบ RAC ที่สามารถผลิตจำหน่ายได้ในประเทศ ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของอาหารสัตว์ที่ไม่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อขาย และกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด ลักษณะ คุณสมบัติและส่วนประกอบของวัตถุดิบที่เติมในอาหารสัตว์ที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ พ.ศ. 2545. [ออนไลน์]. 2545. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/certify/th/images/stories/project/B-Agonist/b017.pdf>. [12 สิงหาคม 2555]

นิตยสารหมอชาวบ้าน เล่มที่: 112. คอลัมน์ 108 ปัญหา [ออนไลน์]. 2547. แหล่งที่มา: <http://www.doctor.or.th/article/detail/6550>. [17 สิงหาคม 2555]

พรรัตน์ คงคาวิฑูร. 2551. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแร็กโทพามีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Anong Kitjaroentham. 1997. Production and characterization of monoclonal antibody against quinine. Master's Thesis, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.

Anonymous. 2001. Feedstuffs 73: 19.

Antignac, J.P., Marchand, P. and Bizec, B.L. 2002. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultratrace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 774: 59-66.

Barnes, R.J. 1997. Effect of beta-agonist on airway effector cells. Lung Biology in Health and Disease 106: 35-64.

Bhattacharya, D., Bhattacharya, R. and Dhar, T.K. 1999. A novel signal amplification technology for ELISA based on catalyzed reporter deposition. Demonstration of its applicability for measuring aflatoxin B1. Journal of Immunological Methods 230: 71-86.

- Bocca, B., Fiori, M., Cartoni, C. and Brambilla, G. 2003. Simultaneous determination of zilpaterol and other beta agonists in calf eye by gass chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of AOAC International 86: 8-14.
- Bracher, J.A., Stoll, P. and Blum, J.W. 1990. Effects of a p-adrenoceptor agonist on growth performance, nitrogen balance, body composition and retention of nitrogen, fat and energy of finishing pigs during restricted and ad libitum feeding. Livestock Production Science 25: 231-246.
- Churchwell, M.I., Holder, C.L., Little, D., Preece, S., Smith, D.J. and Doerge, D.R. 2002. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residue in livestock tissue. Rapid Communications in Mass Spectrometry 16: 1261-1265.
- Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Schacht, E. and Goddeeris, B.M. 2003. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analytica Chimica Acta 494: 21-28.
- Clouse, A.K., Riedel, J.E., Hieble, P. and Westfall, T.D. 2007. The effects and selectivity of β -adrenoceptor agonists in rat myometrium and urinary bladder. European Journal of Pharmacology 573: 184-189.
- Elliott, C.T., Thompson, C.S., Crooks, S.R., Baak, M.J., Verheij, E.R. and Baxter, G.A. 1998. Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the beta-agonist. Analyst 123: 1103-1107.
- European Food Safety Authority. 2009. Safty evaluation of ractopamine: scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed. European Food Safety Authority 1041: 1-52. Journal of Association of Official Analytical Chemists 88: 61-69.
- FDA. 2003. New animal drugs; ractopamine. Federal Register 68: 54658-54659.
- Guesdon, J.L., Ternynck, T. and Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochem. Cytochem 27: 1131-1132.
- He, P., Zhang, L. and Yang, T. 2008. Determination of ractopamine in swin feed and urin using an indirect competitive immunoassay. Journal of Animal and Veterinary Advances 7(3): 268-275.

- Hofstetter, O., Hofstetter, H., Then, D. Schurig, V. and Green, B.S. 1997. Direct binding of low molecular weight haptens to ELISA plates. Journal of Immunological Methods 210: 89–92.
- Huang, J.C., Maria, L., Garcia, J.P., Reuben and Gregory J. 1993. Inhibition of/3-adrenoceptor agonist relaxation of airway smooth muscle by CaZ+-activated K + channel blockers. European Journal of Pharmacology 235: 37-43.
- Jinqing, J., Haitang, Z. and Ziliang, W. 2011. Preparation and identification of anti-ractopamine monoclonal antibody. Energy Procedia 11: 2660-2665.
- 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(12): 2065–2088.
- Kuiper, H.A., Noordam, M.Y. and Van Dooren-Flipsen, M.H. 1998. Illegal use of beta-adrenergic agonist. Journal of Animal Sci 76: 195-207.
- Li, X., Zhang, G., Denga, R., Yanga, Y., Liua, Q., Xiaoa, Z., Yanga, J., Xinga, G., Zhaoa, D. and Caia, S. 2010. Development of rapid immunoassays for the detection of ractopamine in swine urine. Food Additives and Contaminants 27(8): 1096–1103.
- Limin, H., Yijuan, S., Zhenling, Z., Yahong, L. and Xianhui, H. 2007. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography–mass spectrometry. Animal Feed Science and Technology 132: 316–323.
- Martinez-Navarro, J.F. 2007. Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. Lancet 336 (8726): 1311-1318.
- Mazzanti, G., Daniele, C., Boatto, G., Manca, G., Brambilla, G. and Loizzo, A. 2003. New beta-adrenergic agonists used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. Toxicology 187: 91-99.
- Michell, A.D., Solomon, M.B. and Steele, N.C. 1990. Response of low and high proten select lines of pigs to the feeding of the beta-adrenergic agonist ractopamine(phenethanolamine). Journal of Animal Science 68: 3226-3232.
- Philipson, L.H., MD, PhD. 2002. Agonists and metabolism. Journal of Allergy and Clinical Immunology 110: 313-317.

- Pleadin, J., Persi, N., Vulic, A., Milic, D. and Vahcic, N. 2012. Determination of residual ractopamine concentrations by enzyme immunoassay in treated pig's tissue on days after withdrawal. *Meat Science* 90: 755-758.
- Sakai, T., Hitomi, T., Sugaya, K., Kai, S., Murayama, M. and Maitani, M. 2008. Determination method for ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 48: 144-147.
- Sauer MJ, Morris BA. 1987. A simple procedure for enzyme labeling of progesterone derivatives: application of active ester formed using N,N'-Disuccinimidyl carbonate. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 26: 165-167.
- Sheu, S.Y., Lei, Y.C., Tai, Y.T., Chang, T.H. and Kuo, T.F. 2009. Screening of salbutamol residues in swine meat and animal feed by an enzyme immunoassay in Taiwan. *Analytica Chimica Acta* 654: 148-153.
- Shi, Y.S., Yi, C.L., Yung, T.T., Tong, H.C. and Tzong, F.K. 2009. Screening of salbutamol residues in swine meat and animal feed by an enzyme immunoassay in Taiwan. *Analytica Chimica Acta* 654: 148-153.
- Shishani, E., Chai, S.C., Jamokha, S., Aznar, G. and Hoffman, M.K. 2003. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 483: 137-145.
- Skai, T. Tomomi, H., Kyoko, S.J., Shigemi, K., Mitsunori, M.J. and Tamio, M .J. 2007. Determination method for ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 48: No. 5.
- Turberg, M.P., Macy,T.D., Lewia, J.J. and Coleman, M.R. 1994. Determination of ractopamine hydrochloride in swine, cattle and turkey feeds by liquid chromatography with coulometric detection. *Journal of AOAC International* 77: 840-847.
- Veenhuizen, E.L., Schmiegel, K.K., Waitt, W.P. and Anderson, D.B. 1987. Lipolytic, growth, feed, efficiency and carcass response to phenethanolamines in swine. *Journal of Animal Science* 65: 130-133.

- Waldeck, B. 2002. Beta-adrenoceptor agonists and asthma—100 years of development. European Journal of Pharmacology 445: 1-12.
- Wang, J.P., Zhang, S.X. and Shen, J.Z. 2006. Technical Note: A monoclonal antibody-based immunoassay for determination of ractopamine in swine feeds. Journal of Animal Science 84: 1248-1251.
- Weilin, L. Shelver and Smith, D. J. 2002. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2742-2747.
- Weilin, L., Shelver and Smith, D. J. 2003. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor . Analysis: Comparative Study with HPLC and ELISA . Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3715-3721.
- Xiao, R.J., Xu, R.Z., Chen, H.L. 1999. Effects of ractopamine at different dietary protein levels on growth performance and carcass characteristics in finishing pigs. Animal Feed Science and Technology 79: 119-127.
- Zhang, M., Cong, Y., Sheng, Y. and Liu, B. 2010. A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay by antibody coated for diethyl phthalate analysis. Analytical Biochemistry 406: 24–28.
- Zhang, H.Y. and Wang, S. 2009. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. Journal of Immunological Methods 350: 1-7.
- Zhang, H.Y., Wang, S. and Fang, G. 2011. Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays. Journal of Immunological Methods 368: 1-23.
- Zhang, Q., Ni, Y. and Kokot, S. 2010. Molecular spectroscopic studies on the interaction between Ractopamine and bovine serum albumin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 52: 280–288.
- Zhigang, X., Yufei, H., Yuling, H. and Gongke, L. 2010. Investigation of ractopamine molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of 2-agonists in complex samples. Journal of Chromatography A 1217: 3612–3618.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของสารจากการทำ TLC

ช่องที่	จุดสาร	ระยะเคลื่อนที่ของสาร (cm)	R _f
1	pyridine	7.0	1.0
2	RAC ที่ละลายใน pyridine	5.5	0.8
3	Succinic anhydride ที่ละลายใน pyridine	0.5	0.07
4	ผลิตภัณฑ์ก่อนกำจัด pyridine	1.3	0.2
5	ผลิตภัณฑ์หลังกำจัด pyridine	1.3	0.2

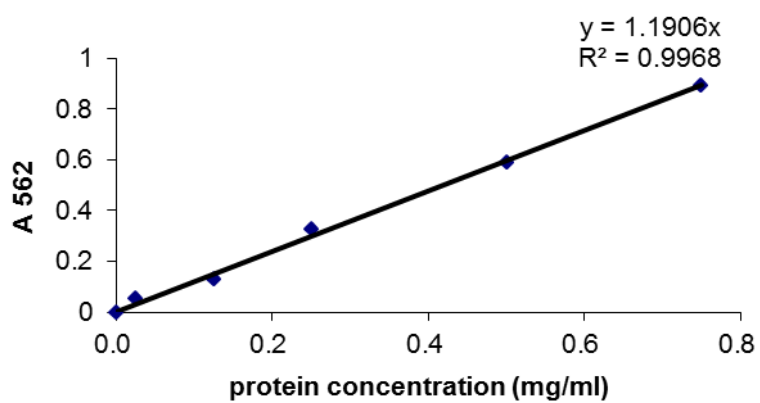
ตัวอย่างการคำนวณค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

$$R_f = \frac{5.5}{7} = 0.78$$

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA

ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
0	0
0.025	0.055
0.12	0.130
0.25	0.327
0.50	0.587
0.75	0.891



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA

ตารางที่ ก.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA

อัตราส่วนการเจือจาง RAC-BSA (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 562 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
2	0.665	1.12
4	0.415	1.39
8	0.288	1.93
เฉลี่ยค่าความเข้มข้นของโปรตีน		1.48 ± 0.42

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีน RAC-BSA

จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

$$y = 1.1906x$$

$$0.665 = 1.1906x$$

$$x = \frac{0.665}{1.1906} = 0.56$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณโปรตีนของ RAC-BSA} &= \text{ปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน} \times \text{dilution factor} \\ &= 0.56 \times 2 \\ &= 1.12 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ตารางที่ ก.4 ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate ด้วยวิธี TNBS

ความเข้มข้นโปรตีน	A ₃₃₅ ของ BSA	A ₃₃₅ ของ RAC-BSA	ค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ
1.00	1.821	0.932	49
0.50	1.687	0.717	58
0.25	1.221	0.672	45
เฉลี่ยค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อของ RAC-BSA			50 ± 6.5

ตัวอย่างการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อ BSA กับ ractopamine-hemisuccinate

$$\begin{aligned}
 \text{เปอร์เซ็นต์หมู่เอมีนที่ถูกใช้ไป} &= \frac{(A_{335} \text{ ของ BSA} - A_{335} \text{ ของ RAC-BSA})}{A_{335} \text{ ของ BSA}} \times 100 \\
 &= \frac{(1.821 - 0.932)}{1.82} \\
 &= 49 \%
 \end{aligned}$$

ตารางที่ ก.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

หลอดทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำ ELISA
1	0.201	0.130
2	0.287	-
3	0.212	0.197
4	0.240	-
5	0.216	0.176
6	0.227	-
7	0.477	0.598
8	1.695	2.143
9	1.805	2.017
10	1.183	1.868
11	0.807	1.592
12	0.540	0.968
13	0.409	0.780
14	0.361	0.484
15	0.292	-
16	0.273	0.275
17	0.249	-
18	0.280	0.122
19	0.244	-
20	0.233	0.085
21	0.218	-
22	0.207	0.084

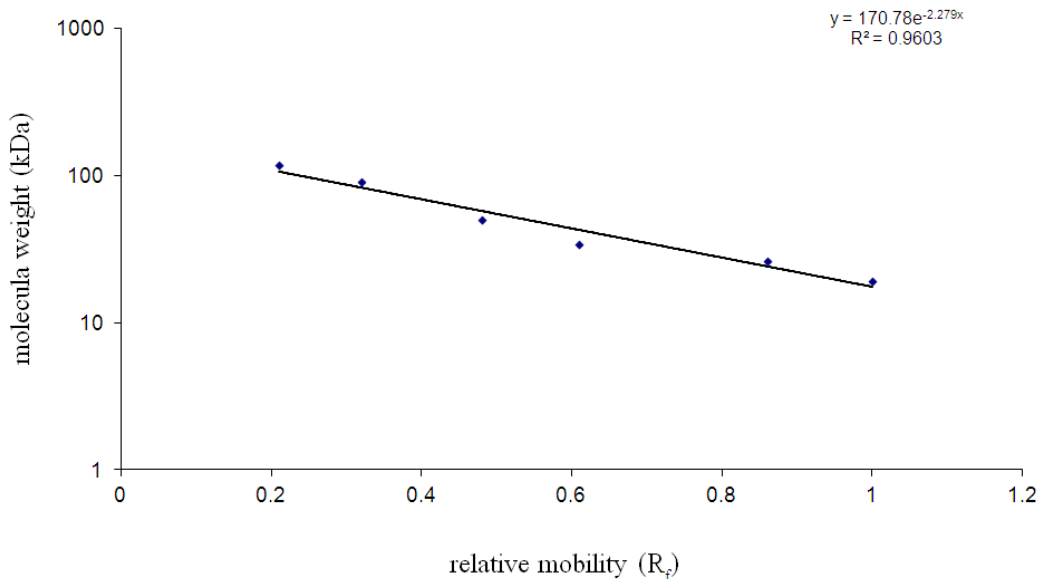
หมายเหตุ เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง

หลอดทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทำให้ ELISA
23	0.225	-
24	0.215	0.077
25	0.240	-
26	0.221	0.077
2	0.232	-
28	0.210	0.075
29	0.239	-
30	0.228	0.067

หมายเหตุ เครื่องหมาย - หมายถึงไม่ได้ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ ก.6 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและระยะทางในการเคลื่อนที่จากการทำ SDS-PAGE

โปรตีนมาตรฐาน	มวลโมเลกุล (kDa)	ระยะทางที่แถบโปรตีน เคลื่อนที่ได้ (cm)	Relative mobility (R_f)
β -galactosidase	118	1.1	0.21
Bovine serum albumin	90	1.7	0.32
Ovalbumin	50	2.5	0.48
Carbonic anhydrase	34	3.2	0.61
β -lactoglobulin	26	4.5	0.86
Lysozyme	19	5.2	1.0
mAb 10A4 heavy chain	69	2.1	0.40
mAb 10A4 light chain	25	4.4	0.85



รูปที่ ก.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างมวลโมเลกุลและค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานจากการทำ SDS-PAGE เพื่อใช้ในการเทียบหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างแสดงการคำนวณหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีจากกราฟมาตรฐาน

$$\text{Relative mobility } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ได้ (cm)}}{\text{ระยะทางที่สีย้อมเคลื่อนที่ (cm)}}$$

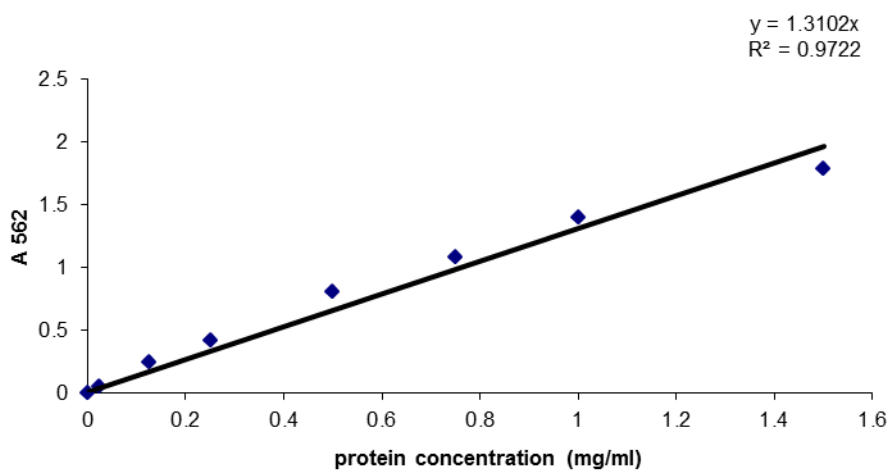
$$= \frac{2.1}{5.2} = 0.40$$

$$\begin{aligned} y &= 170.78e^{-2.279x} \\ &= 170.78 \times \text{EXP}(-2.279 \times 0.40) \\ &= 69 \end{aligned}$$

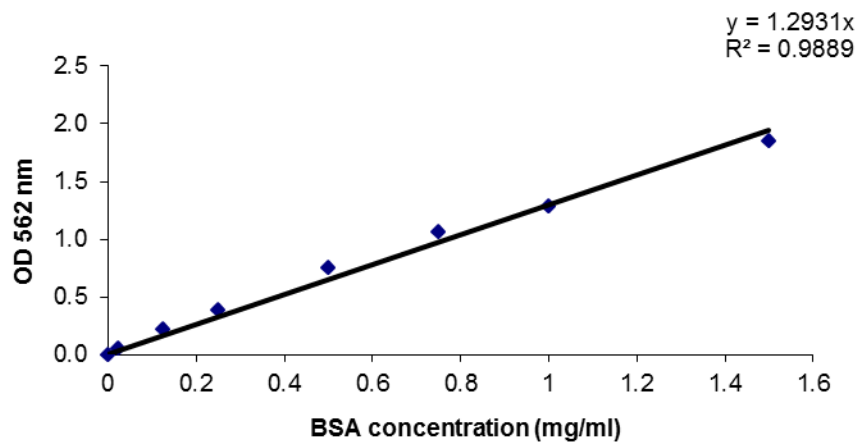
$$\text{มวลโมเลกุล} = 69 \text{ kDa}$$

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี

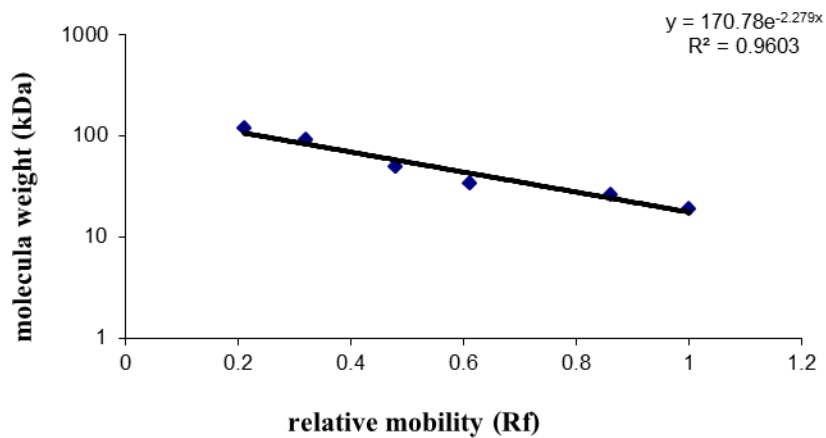
ความเข้มข้นของสารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร
0	0
0.025	0.045
0.125	0.240
0.250	0.417
0.500	0.805
0.750	1.082
1.000	1.393
1.500	1.789



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดี



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ด้วยวิธี BCA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนของ RAC-HRP



รูปที่ ก.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน) ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของแอนติบอดีและ RAC-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 1	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.5	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.25
0	2.093	1.413	0.821
0.00001	1.923	1.272	0.768
0.00005	1.788	1.254	0.723
0.0001	1.876	1.205	0.723
0.0005	1.831	1.237	0.763
0.001	1.846	1.203	0.716
0.005	1.798	1.127	0.617
0.010	1.844	1.078	0.590
0.050	1.982	1.090	0.472
0.10	1.026	0.567	0.276
0.50	0.470	0.260	0.139
1.0	0.324	0.198	0.139
5.0	0.202	0.128	0.097
10	0.149	0.102	0.081
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	127	56.0	28.2
LOD	31.5	5.4	9.7

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ
ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของแอนติบอดีและ RAC-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 1	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.5	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.25
0	2.152	1.519	0.928
0.00001	2.087	1.374	0.867
0.00005	2.204	1.367	0.890
0.0001	2.076	1.389	0.839
0.0005	1.991	1.320	0.816
0.001	2.041	1.429	0.821
0.005	1.966	1.364	0.765
0.010	1.913	1.180	0.631
0.050	1.831	1.015	0.479
0.10	1.109	0.571	0.309
0.50	0.313	0.198	0.152
1.0	0.366	0.175	0.117
5.0	0.175	0.116	0.094
10	0.139	0.092	0.081
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	106	56.3	27.3
LOD	18.8	10	4.8

ตารางที่ ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระ
ด้วยวิธี Direct competitive ELISA ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของแอนติบอดีและ RAC-HRP (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 1	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.5	แอนติบอดี 1 RAC-HRP 0.25
0	1.839	1.181	0.753
0.00001	1.548	1.085	0.643
0.00005	1.650	1.128	0.649
0.0001	1.633	1.065	0.572
0.0005	1.551	0.953	0.614
0.001	1.710	1.037	0.587
0.005	1.594	0.958	0.511
0.01	1.511	0.910	0.467
0.05	1.330	0.545	0.299
0.10	0.842	0.361	0.194
0.50	0.325	0.172	0.117
1.0	0.298	0.146	0.101
5.0	0.143	0.091	0.089
10	0.122	0.093	0.079
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	75.1	27.2	8.3
LOD	15.7	7.4	1.2

ตารางที่ ก.11 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 แอนติบอดี 0.0625	RAC-BSA 1 แอนติบอดี 0.125	RAC-BSA 0.5 แอนติบอดี 0.250
0	1.486	1.427	1.336
0.0061	1.277	1.470	1.426
0.012	1.235	1.327	1.271
0.024	1.100	1.241	1.226
0.048	0.923	0.936	0.919
0.097	0.749	0.745	0.776
0.195	0.540	0.521	0.565
0.391	0.344	0.350	0.307
0.781	0.242	0.231	0.219
1.56	0.171	0.175	0.164
3.13	0.141	0.142	0.132
6.25	0.120	0.117	0.124
12.5	0.114	0.113	0.115
25.0	0.103	0.105	0.108
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	0.57	0.70	0.74
LOD	0.11	0.20	0.16

ตารางที่ ก.12 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 แอนติบอดี 0.0625	RAC-BSA 1 แอนติบอดี 0.125	RAC-BSA 0.5 แอนติบอดี 0.250
0	0.851	0.906	0.678
0.0061	0.831	0.957	0.726
0.012	0.845	0.947	0.736
0.024	0.832	0.908	0.735
0.048	0.765	0.868	0.719
0.097	0.714	0.784	0.644
0.195	0.650	0.695	0.594
0.391	0.547	0.623	0.529
0.781	0.384	0.458	0.427
1.56	0.289	0.307	0.281
3.13	0.197	0.200	0.180
6.25	0.136	0.131	0.127
12.5	0.097	0.098	0.103
25.0	0.085	0.082	0.083
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	0.53	0.53	0.74
LOD	0.10	0.06	0.10

ตารางที่ ก.13 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (GAM-HRP) ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 แอนติบอดี 0.0625	RAC-BSA 1 แอนติบอดี 0.125	RAC-BSA 0.5 แอนติบอดี 0.250
0	1.580	1.803	1.544
0.0061	1.664	1.868	1.683
0.012	1.563	1.817	1.683
0.024	1.477	1.769	1.532
0.048	1.435	1.678	1.474
0.097	1.383	1.555	1.332
0.195	1.357	1.573	1.272
0.391	1.161	1.323	1.166
0.781	0.931	1.026	0.963
1.56	0.692	0.776	0.717
3.13	0.411	0.450	0.409
6.25	0.257	0.256	0.240
12.5	0.160	0.158	0.151
25.0	0.158	0.106	0.109
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	0.70	0.82	0.73
LOD	0.07	0.10	0.09

ตารางที่ ก.14 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 Ab-biotin 0.0625	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.125
0	0.892	2.310	1.669
0.0012	0.967	2.279	1.566
0.0024	0.693	1.805	1.203
0.0048	0.886	2.188	1.655
0.0097	0.981	2.145	1.584
0.0195	0.869	2.082	1.448
0.0390	0.871	2.120	1.413
0.0781	0.856	2.072	1.357
0.156	0.779	1.756	1.172
0.312	0.647	1.420	0.852
0.625	0.577	1.255	0.727
1.25	0.470	0.838	0.569
2.50	0.357	0.537	0.351
5.00	0.273	0.358	0.230
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	0.34	0.40	0.26
LOD	0.06	0.04	0.03

ตารางที่ ก.15 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 Ab-biotin 0.0625	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.125
0	0.712	2.178	1.661
0.0012	0.730	2.211	1.677
0.0024	0.672	2.034	1.728
0.0048	0.715	2.161	1.615
0.0097	0.731	2.221	1.691
0.0195	0.674	1.991	1.498
0.0390	0.665	1.727	1.280
0.0781	0.584	1.663	1.216
0.156	0.499	1.391	1.010
0.312	0.420	0.990	0.675
0.625	0.346	0.715	0.497
1.25	0.273	0.471	0.360
2.50	0.227	0.301	0.291
5.00	0.178	0.202	0.264
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC ₅₀	0.47	0.39	0.26
LOD	0.25	0.07	0.06

ตารางที่ ก.16 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระด้วยวิธี
Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 2 Ab-biotin 0.0625	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.125
0	1.009	2.067	1.321
0.0012	1.030	2.080	1.319
0.0024	0.959	2.028	1.382
0.0048	0.955	2.017	1.331
0.0097	0.913	1.849	1.146
0.0195	0.934	1.703	1.134
0.0390	0.857	1.569	0.942
0.0781	0.730	1.323	0.857
0.156	0.614	0.980	0.601
0.312	0.448	0.715	0.378
0.625	0.327	0.426	0.261
1.25	0.256	0.300	0.208
2.50	0.188	0.208	0.157
5.00	0.146	0.140	0.131
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC₅₀	0.31	0.23	0.17
LOD	0.09	0.04	0.02

ตารางที่ ก.17 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	1.258	1.396	1.184
0.0024	1.237	1.270	1.088
0.0048	1.236	1.363	1.100
0.0097	1.265	1.384	1.020
0.0195	1.195	1.233	0.979
0.0390	1.133	1.218	0.880
0.0781	1.096	1.310	1.138
0.156	1.078	1.130	0.924
0.312	0.992	1.050	0.811
0.625	0.782	0.717	0.587
1.25	0.526	0.629	0.451
2.50	0.385	0.417	0.306
5.00	0.254	0.257	0.210
10.0	0.166	0.160	0.154
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร)		
IC₅₀	0.69	0.62	0.43
LOD	0.20	0.20	0.12

ตารางที่ ก.18 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	1.201	1.304	1.075
0.0024	1.228	1.301	1.009
0.0048	1.186	1.261	0.963
0.0097	1.252	1.281	1.013
0.0195	1.129	1.118	0.963
0.0390	1.058	1.220	0.820
0.0781	1.004	1.118	0.917
0.156	0.867	1.065	0.868
0.312	0.842	0.981	0.721
0.625	0.707	0.838	0.572
1.25	0.438	0.515	0.413
2.50	0.334	0.368	0.301
5.00	0.202	0.228	0.191
10.0	0.141	0.155	0.147
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC₅₀	0.43	0.63	0.43
LOD	0.06	0.19	0.15

ตารางที่ ก.19 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	0.874	1.111	0.786
0.0024	0.883	1.036	0.707
0.0048	0.881	1.134	0.640
0.0097	0.920	0.965	0.733
0.0195	0.851	1.024	0.719
0.0390	0.789	0.959	0.551
0.0781	0.671	0.905	0.655
0.156	0.721	0.858	0.673
0.312	0.663	0.764	0.544
0.625	0.539	0.612	0.352
1.25	0.361	0.487	0.248
2.50	0.266	0.306	0.222
5.00	0.191	0.216	0.165
10.0	0.147	0.160	0.119
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)		
IC ₅₀	0.45	0.42	0.36
LOD	0.08	0.11	0.25

ตารางที่ ก.20 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	1.286	1.384	1.295
0.0024	1.304	1.298	1.212
0.0048	1.172	1.341	1.189
0.0097	1.268	1.350	1.282
0.0195	1.212	1.298	1.145
0.0390	1.272	1.282	1.190
0.0781	1.058	1.193	1.165
0.156	1.079	1.150	1.003
0.312	0.921	0.896	0.783
0.625	0.772	0.654	0.612
1.25	0.481	0.474	0.429
2.50	0.274	0.303	0.274
5.00	0.178	0.218	0.246
10.0	0.118	0.163	0.159
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC₅₀	0.58	0.44	0.40
LOD	0.15	0.13	0.20

ตารางที่ ก.21 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้องครั้งที่ 2

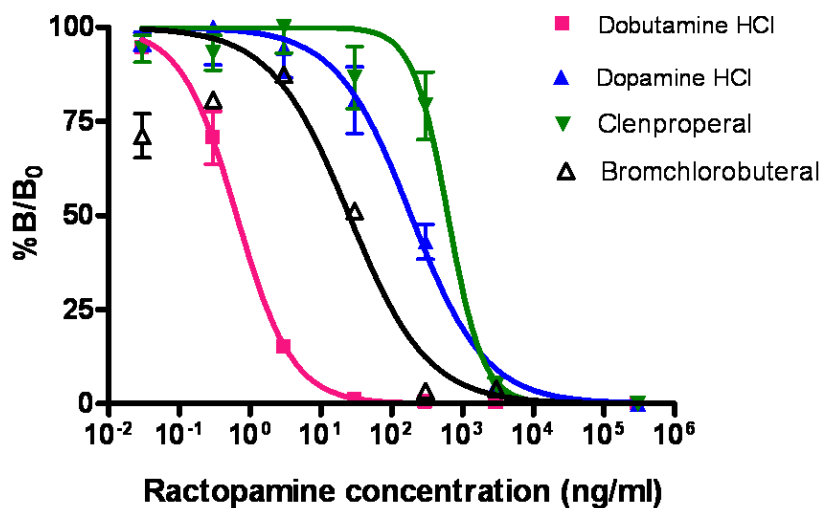
ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	1.135	1.152	1.094
0.0024	0.949	1.020	1.000
0.0048	1.071	0.904	0.959
0.0097	1.039	0.959	1.047
0.0195	1.064	0.952	0.868
0.0390	1.125	0.829	0.885
0.0781	0.941	0.842	0.839
0.156	0.871	0.797	0.762
0.312	0.744	0.650	0.567
0.625	0.526	0.423	0.435
1.25	0.355	0.255	0.320
2.50	0.218	0.171	0.239
5.00	0.138	0.121	0.141
10.0	0.098	0.084	0.102
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC₅₀	0.44	0.20	0.25
LOD	0.13	0.03	0.09

ตารางที่ ก.22 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อ RAC ในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ RAC อิสระ (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	ความเข้มข้นของ RAC-BSA และ Ab-biotin (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	RAC-BSA 0.25 Ab-biotin 0.125	RAC-BSA 0.5 Ab-biotin 0.075	RAC-BSA 1 Ab-biotin 0.05
0	1.095	1.122	0.847
0.0024	0.981	1.048	0.787
0.0048	1.018	1.050	0.812
0.0097	1.025	0.966	0.785
0.0195	1.028	1.020	0.815
0.0390	1.018	0.935	0.740
0.0781	0.902	0.902	0.689
0.156	0.836	0.757	0.621
0.312	0.699	0.623	0.496
0.625	0.487	0.460	0.379
1.25	0.360	0.297	0.279
2.50	0.206	0.191	0.205
5.00	0.146	0.148	0.171
10.0	0.105	0.114	0.155
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		
IC₅₀	0.40	0.27	0.28
LOD	0.16	0.05	0.09

ตารางที่ ก.23 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อสาร Dobutamine HCl, Dopamine HCl, Clenproporal และ Bromchlorobuterol เมื่อทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (streptavidin-HRP) เมื่อใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการคำนวณหา % CR

ความเข้มข้นของ สารที่ทดสอบ (นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			
	สารที่ทดสอบ			
	Dobutamine HCl	Dopamine HCl	Clenproporal	Bromchlorobuterol
0	1.220	1.226	1.236	1.221
0.03	1.164	1.188	1.179	0.921
0.3	0.895	1.229	1.167	1.022
3	0.268	1.170	1.243	1.093
30	0.110	1.018	1.093	0.710
300	0.104	0.610	1.009	0.206
3,000	0.100	0.199	0.174	0.212
30,000	0.098	0.143	0.120	0.171
	ค่าความไว (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)			
IC₅₀	0.645	188	625	25.2
LOD	0.139	0.121	0.377	0.067



รูปที่ ก. 6 กราฟแสดงความไวของสาร Dobutamine HCl, Dopamine HCl, Clenproperal และ Bromchlorobuteral เพื่อใช้ในการคำนวณหา % CR

ตัวอย่างการคำนวณ % CR

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม} &= \frac{\text{IC}_{50} \text{ ของ RAC}}{\text{IC}_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100 \\ &= \frac{0.313}{0.645} \times 100 \end{aligned}$$

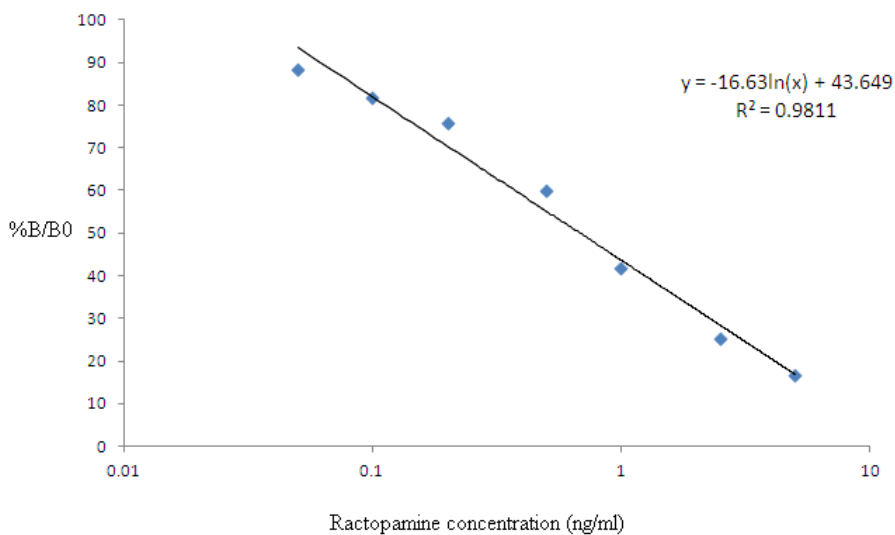
$$\text{การเกิดปฏิกิริยาข้าม Dobutamine HCl} = 48.5\%$$

ตารางที่ ก.24 แสดงค่าความเข้มข้นของ RAC และค่า % B/B0 จากการศึกษาผลกระทบบของแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมูต่อการวัด ELISA

ความเข้มข้นของ RAC (นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร)	PBS		ตัวอย่างที่ไม่มีเนื้อหมู		ตัวอย่างที่มีเนื้อหมู	
	ค่าการ ดูดกลืนแสง	% B/B0	ค่าการ ดูดกลืนแสง	% B/B0	ค่าการ ดูดกลืนแสง	% B/B0
0	1.304	100	1.31	100	1.312	100
0.050	1.221	93.7	1.201	91.7	1.306	99
0.10	1.160	89.0	1.154	88.1	1.277	98
0.20	1.054	81.0	1.043	79.6	1.190	93
0.50	0.689	52.8	0.773	59.0	1.055	89
1.0	0.542	41.6	0.552	42.1	0.942	89
2.5	0.386	29.6	0.437	33.4	0.693	74
5.0	0.322	25.0	0.298	22.7	0.510	74

ตารางที่ ก.25 แสดงค่าความเข้มข้นของ RAC และค่า % B/B0 ในการศึกษาระดับการเจือจางแมทริกในตัวอย่างเนื้อหมู

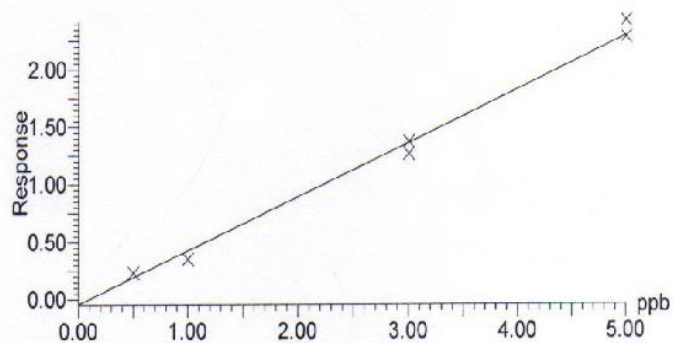
ความเข้มข้น ของ RAC (นาโนกรัม ต่อมิลลิเมตร)	PBS		1:10		1:20		1:40	
	ค่าการ ดูดกลืน แสง	% B/B0	ค่าการ ดูดกลืน แสง	% B/B0	ค่าการ ดูดกลืน แสง	% B/B0	ค่าการ ดูดกลืน แสง	% B/B0
0	1.294	100	1.084	100	1.212	100	1.304	100
0.050	1.258	97	1.082	100	1.172	97	1.405	108
0.10	1.135	88	1.065	98	1.105	91	1.179	90
0.20	1.009	78	0.988	91	0.957	79	1.144	88
0.50	0.764	59	0.794	73	0.763	63	1.034	79
1.00	0.542	42	0.748	69	0.586	48	0.709	54
2.50	0.436	34	0.434	40	0.378	31	0.402	31
5.00	0.272	21	0.460	42	0.231	19	0.353	27



รูปที่ ก. 7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ RAC ในตัวอย่างเนื้อหมูเพื่อเปรียบเทียบกับวิธี LC-MS/MS

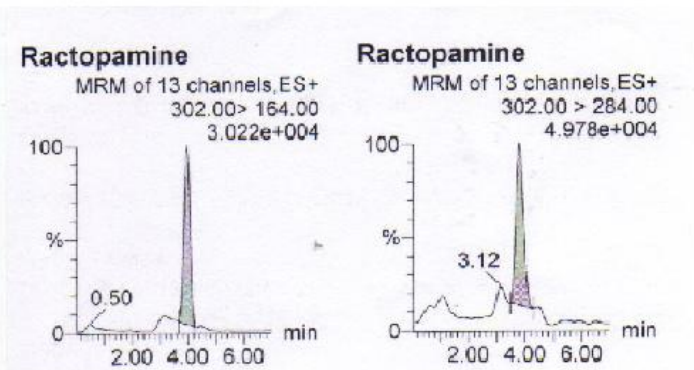
Method: D:\MassLynx Data\Beta_agonist.PRO\MethDB\Beta_030755.mdb 09 Aug 2012 08:28:42
Calibration: 24 Aug 2012 14:08:50

Compound name: Ractopamine
Correlation coefficient: $r = 0.995953$, $r^2 = 0.991923$
Calibration curve: $0.466567 * x + -0.0418106$
Response type: Internal Std (Ref 7), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

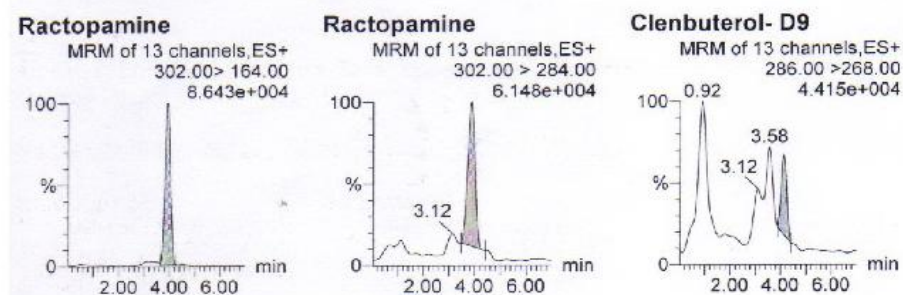


รูปที่ ก. 8 แสดงกราฟมาตรฐานของ RAC ที่ความเข้มข้นที่ 0.1-5.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
โดยวิธี LC-MS/MS ของบริษัท Central lab

Name: 240855_b0194, Date: 24-Aug-2012, Time: 12:00:35, ID: , Description: 55/15998-001



Name: 240855_b0195, Date: 24-Aug-2012, Time: 12:08:42, ID: , Description: 55/15998-002



รูปที่ ก. 9 แสดงโครมาโตแกรมของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี RAC เข้มข้น 5 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ตัวอย่าง 55/15998-001 เป็นตัวอย่างเนื้อหมูที่เติม RAC 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ ตัวอย่าง 55/15998-002 เป็นตัวอย่างเนื้อหมูที่เติม RAC 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Method: D:\MassLynx Data\Beta_agonist.PRO\MethDB\Beta_030755.mdb 09 Aug 2012 08:28:42
 Calibration: 24 Aug 2012 14:08:50

Compound name: Ractopamine

Correlation coefficient: $r = 0.995953$, $r^2 = 0.991923$

Calibration curve: $0.466567 * x + -0.0418106$

Response type: Internal Std (Ref 7), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

	Name	Sample Text	Type	Std. C...	RT	Area	1° Area	IS RT	IS Area	ppb	%R...	S/N	1° S/N	1° R...
1	240855_b0178	std 0 ppb	Standard	0.00				4.14	8795					
2	240855_b0179	std 0.10 ppb	Standard	0.10										
3	240855_b0180	std 0.50 ppb	Standard	0.50	3.95	2409	12025	4.14	10427	0.58	117	40	4	0.20
4	240855_b0181	std 1.00 ppb	Standard	1.00	3.95	3511	9489	4.14	10039	0.84	84	122	15	0.37
5	240855_b0182	std 3.00 ppb	Standard	3.00	3.95	14893	16250	4.14	11793	2.80	93	294	8	0.92
6	240855_b0183	std 5.00 ppb	Standard	5.00	3.95	22339	22757	4.14	9804	4.97	99	795	16	0.98
7	240855_b0184	reagent blank	Blank					4.14	12853					
8	240855_b0185	rec.1	QC	0.50	3.95	1905	11971	4.14	11432	0.45	89	38	33	0.16
9	240855_b0186	ACN	Blank											
10	240855_b0194	55/15998-001	Analyte		3.95	7278	13320	4.14	9533	1.73		143	8	0.55
11	240855_b0195	55/15998-002	Analyte		3.95	22374	18022	4.14	5459	8.87		16	48	1.24
12	240855_b0196	ACN	Blank					4.49	1704					
13	240855_b0197	std 3.00 ppb	Standard	3.00	3.95	14629	15269	4.14	10689	3.02	101	628	5	0.96
14	240855_b0198	std 5.00 ppb	Standard	5.00	3.95	23023	21064	4.14	9501	5.28	108	493	12	1.09

รูปที่ ก. 10 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติม RAC เข้มข้น 5 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

ซัง	RPMI 1640	10.4	กรัม
	NaHCO ₃	2	กรัม
	L-glutamin	0.1	กรัม
	Glucose	2	กรัม
	Pyruvic acid	0.11	กรัม
	น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง แบ่งใส่ขวดแก้วปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (Freezing medium)

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

3. การเตรียมสารสำหรับการทำ TLC

Methanolic NH₄OH (10%) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

Methanol	5.4	มิลลิลิตร
NH ₄ OH	0.6	มิลลิลิตร

เตรียมระบบตัวทำละลายปริมาตร 40 มิลลิลิตรโดยตวง dichloromethane 34 มิลลิลิตร + Methanolic NH₄OH (10%) 6 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารสำหรับใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

Bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ BCA protein assay ด้วยชุดทดสอบ BCATM Protein Assay Kit เพื่อสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

BCATM Reagent A และ BCATM Reagent B (BCATM Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE)

ก่อนใช้ทดสอบปริมาณ โปรตีนต้องเตรียมสารทดสอบก่อน โดยผสม Reagent A: B ในอัตราส่วน 50:1

5. การเตรียมสารสำหรับใช้วัดค่าเปอร์เซ็นต์การเชื่อมต่อด้วย TNBS

5.1 0.1 M Carbonate buffer, pH 8.5

Na ₂ CO ₃	3.18	กรัม
NaHCO ₃	5.86	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับ pH ด้วย 3 M HCl หรือ 3 M NaOH ให้ได้ pH 8.5

5.2 สารละลาย 0.01% TNBS

เริ่มจากเตรียม stock 5% TNBS (w/v) ที่ละลายในเมทานอล

TNBS	5	กรัม
เมทานอล	100	มิลลิลิตร

ก่อนการใช้งานให้เจือจาง 5% TNBS ด้วย 0.1 M Carbonate buffer, pH 8.5 ให้มีความเข้มข้น 0.01% TNBS

5.3 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

5.4 1 N HCl

Conc.HCl	7.7	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

5.5 BSA มาตรฐาน

เตรียม stock BSA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

BSA	5	มิลลิกรัม
-----	---	-----------

0.1 M Carbonate buffer, pH 8.5	1	มิลลิลิตร
--------------------------------	---	-----------

ทำการเจือจาง BSA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.1 M Carbonate buffer, pH 8.5 ให้มีความเข้มข้น 1, 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อม RAC กับ BSA และ HRP

0.2 M Carbonate buffer, pH 9.5

Na_2CO_3	1.06	กรัม	ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
--------------------------	------	------	------------------------------

NaHCO_3	0.84	กรัม	ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
------------------	------	------	------------------------------

นำสารละลาย Na_2CO_3 และ NaHCO_3 มาไตเตรตปรับให้ได้ pH 9.5

7. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

7.1 20 mM Sodium phosphate pH 7.0

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.77	กรัม
---	------	------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69	กรัม
--	------	------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

ไตเตรตต่างด้วยกรดจนได้ pH 7.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

7.2 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 2.7

Glycine	7.5	กรัม
---------	-----	------

Conc.HCl	2.42	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

น้ำกลั่น	1	ลิตร
----------	---	------

ไตเตรตต่างด้วยกรดจนได้ pH 2.7 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

7.3 1 M Tris HCl buffer pH 9.0

Trisma base	121.14	กรัม
Conc.HCl	6.41	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรดจนได้ pH 9.0 แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

8. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

8.1 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

8.2 10% APS

Ammonium persulfate (APS)	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

8.3 1 M Tris-HCl pH 6.8

Trisma base	12.110	กรัม
-------------	--------	------

เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อให้ Trisma base ละลายแล้วปรับ pH ด้วย 1 N HCl จนมี pH 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8.4 1 M Tris-HCl pH 8.8

Trisma base	18.170	กรัม
-------------	--------	------

เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อให้ Trisma base ละลายแล้วปรับ pH ด้วย 1 N HCl จนมี pH 8.8 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8.5 SDS-dye

1 M Tris-HCl pH 6.8	1	มิลลิลิตร
10% SDS	4	มิลลิลิตร
Glycerol (87%)	2.29	มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

8.6 SDS staining dye

SDS-dye	900	ไมโครลิตร
β -mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม Stracking gel and Separating gel

5% Stacking gel (2 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	1.204	มิลลิลิตร
สารละลาย 40% Acrylamide และ Bis-acrylamide	0.25	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCl pH 6.8	0.504	มิลลิลิตร
10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
10% APS	0.02	มิลลิลิตร
TEMED	0.002	มิลลิลิตร

12% Separating gel (8 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.436	มิลลิลิตร
สารละลาย 40% Acrylamide และ Bis-acrylamide	2.4	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2	มิลลิลิตร
10% SDS	0.08	มิลลิลิตร
10% APS	0.08	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

8.7 Running buffer

Trisma base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
SDS	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

8.8 staining solution

Coomassie Brilliant blue R-250	2.5	กรัม
Methanol	500	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นในมีปริมาตรสุดท้าย	1,000	มิลลิลิตร

8.9 Destaining solution

Methanol	500	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

9. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

9.1 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 (Stock reagent)

ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรต Na_2HPO_4 ด้วย NaH_2PO_4 จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

9.2 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 1 ลิตร

NaCl 175.2 กรัม

น้ำกลั่น 18 ลิตร

ผสมให้เข้ากัน

9.3 0.05% PBS-Tween 20

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

9.4 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

9.5 Substrate TMB

0.2 M Citrate buffer pH 4.0

Potassium citrate	66.5	กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร
Citric acid	43.08	กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

ไตเตรตกรดด้วยเบสให้มี pH 4.0

ขั้นตอนการเตรียม

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	3	มิลลิกรัม
ละลาย TMB ด้วย DMSO	300	ไมโครลิตร
200 mM Sodium Citrate buffer, pH 4.0	9.9	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

9.6 1 M H₂SO₄ (Stopping reagent)

H ₂ SO ₄ (96%)	55.53	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกกร คงอาษา เกิดเมื่อวันที่ 9 ตุลาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดหนองบัวลำภู สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 และได้นำเสนอผลงานเรื่อง Development of ractopamine test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique ในรูปแบบการ oral presentation ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติในระดับบัณฑิตศึกษา ในงาน The 1st Asean plus three (AGRC) ณ โรงแรมดิอิมเพรส จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 1-2 มีนาคม 2555