รายงานการวิจัย

(ปีที่ 1 ของโครงการ 2 ปี)

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจวัดอะฟลาทอกซินเอ็ม1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนท์แอสเสย์

Production of monoclonal antibody for aflatoxin M_1 detection based on enzyme-linked immunosorbent assay

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

นายอณุมาศ บัวเขียว

รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2557

บทคัดย่อภาษาไทย

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin, AF) เป็นกลุ่มสารพิษที่เกิดจากราซึ่งอาจปนเปื้อนอยู่ในพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ อะฟลาทอกซินหลักที่พบได้แก่ อะฟลาทอกซินบี1 อะฟลาทอกซินบี2 อะฟลาทอกซินจี1 และอะฟลาทอกซินจี2 เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินชนิด บี1 (AFB_1) เข้าสู่ร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนรูปเป็นอะฟลาทอกซินชนิด เอ็ม1 (AFM_1) ที่บริเวณตับและหลั่งออกมายังต่อมน้ำนม ซึ่งสารนี้เป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง ดังนั้นการตรวจหาปริมาณของ AFM_1 ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นมจึงมีความจำเป็น ในการตรวจวัดปริมาณ AFM_1 นั้นทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่นิยมใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้แก่วิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนท์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ในปัจจุบันชุดตรวจ AFM_1 ด้วยวิธี ELISA นี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีเป้าประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 สำหรับใช้ในการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี ELISA โดยทำการฉีดแอนติเจน AFM_1 ที่เชื่อมต่อกับอัลบูมินในซีรัมของวัว เพื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว พบว่าหนูทุกตัวตอบสนองต่อแอนติเจน โดยสร้างแอนติบอดีที่มีค่าระดับแอนติบอดีในเลือดระหว่าง 1:8,192,000 และ 1:32,768,000 เมื่อทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูไมซ์กับเซลล์มัยอีโลมา P3X เพื่อเตรียมโมโนโคลน พบว่าได้โมโนโคลนจำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 โมโนโคลแอนติบอดี (MAb) จากโคลนเหล่านี้มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG_1 ทั้งหมด เมื่อทดสอบความไวของMAb ซึ่งวัดในรูปของค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) มีค่าเท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (MRL) ที่ได้มีการกำหนดไว้ในน้ำนมและนมเด็กทารกได้ไม่เกิน 50 และ 25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น MAb ที่ได้จึงมีความไวสูงเพียงพอต่อการศึกษาต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Aflatoxins (AFs) are the group of toxin produced from fungi which may contaminate animal feeds. The major AFs found are B_1 (AFB_1), B_2, G_1 and G_2. After AFB_1 enters into the animals, it is transformed to aflatoxin M_1 (AFM_1) at the liver and is secreted into the milk gland. AFM_1 is known to be a carcinogenic agent. Therefore, detection of AFM_1 presented in dairy products is essential. Detection of AFM_1 can be performed by several methods but the most widely used method suitable for screening a large number of samples is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Currently, ELISA kit for AFM_1 must be imported. Therefore, this research aims to produce monoclonal antibody (MAb) against AFM_1 for development of ELISA. Mice (BALB/c) were immunized with AFM_1-bovive serum albumin conjugate. All mice responded to the injected antigen by producing antibody at the titer level between 1:8,192,000 and 1:32,768,000. Conventional cell fusion between splenocytes and P3X myeloma cells was performed to obtain 5 monoclones assigned as AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 and AFM_1-17. Isotype of monoclonal antibody from these monoclones was found to be IgG_1. The sensitivity of each MAb, measured in term of the lowest concentration that can be detected called limit of detection, LOD) was found to be 16, 15, 5, 7 and 9 pg/ml, respectively. These values are lower than the maximum residual limit (MRL) set for milk and infant milk at 50 and 25 pg/ml, respectively. Consequently, the obtained MAbs are sensitive enough for uses in further investigation.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ซ
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)	5
2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย	5
2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	5
2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	6
2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1	8
2.5 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	8
2.6 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1	9
2.7 ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	9
2.8 ทดสอบความไวของแอนติบอดี	10
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	11
3.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1	11
3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ	12
3.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1	12
3.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	13
3.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ	14

หน้า

4. สรุปงานวิจัย 16
บรรณานุกรม 17
ประวัติผู้วิจัย 20

สารบัญตาราง (List of tables)

หน้า

ตารางที่ 1 สรุประดับแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFM_1-BSAจำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี Indirect ELISA 12

ตารางที่ 2 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM_1 อิสระ 13

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA 14

ตารางที่ 4 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA 15

สารบัญภาพ (List of llustration)

หน้า

ภาพที่1 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM_1-BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA 11

ภาพที่ 2 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 15

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

A	Absorbance
Ab	Antibody
AFB_1	Aflatoxin B_1
AFB_2	Aflatoxin B_2
Ag	Antigen
AFG_1	Aflatoxin G_1
AFG_2	Aflatoxin G_2
AFM_1	Aflatoxin M_1
AP	Alkaline phosphatase
AFs	Aflatoxins
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
C	Constant region
CDRs	Complementarity determining region
Da	Dalton (g/mol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DON	Deoxynivalenol
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
FI-IA	Flow-injection immunoassay
FRs	Framework region
H	Heavy chain
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phoepnoribossyl transferase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HWE	Hot water extraction
IAC	Immunoaffinity column
IC_{50}	50% of inhibition concentration

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

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ ทุติยภูมิ ของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ที่มีการปนเปื้อนอยู่ในพืช และผลผลิตที่สำคัญทางการเกษตร อะฟลาทอกซินแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซินบี (AFB_1, AFB_2) อะฟลาทอกซินจี (AFG_1, AFG_2) และอะฟลาทอกซินเอ็ม (AFM_1, AFM_2) ซึ่ง *A. flavus* จะผลิตเฉพาะอะฟลาทอกซินชนิดบีเท่านั้น ส่วน *A. parasiticus* จะผลิตทั้งอะฟลาทอกซินชนิดบี และอะฟลาทอกซินชนิดจี เมื่อสัตว์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของ AFB_1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น AFM_1 ที่บริเวณตับและจะถูกหลั่งออกมายังต่อมน้ำนมของสัตว์ โดย AFM_1 นี้มีสมบัติทนความร้อนได้สูง จึงมีความเสถียรเมื่อผ่านกระบวนการถนอมอาหารด้วยความร้อน AFM_1 เป็นสารที่มีพิษต่อตับและเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับสูงเป็นระยะเวลานานหลายวันจะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันได้ โดยจะมีอาการไข้สูง มีดีซ่านเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แขนขาบวม ปวดเมื่อย อาเจียน ตับบวม และถึงเสียชีวิตในรายที่รุนแรง ส่วนการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำถึงปานกลางเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง ดังนั้นการบริโภคนมหรือผลิตภัณฑ์นมที่มีการปนเปื้อนของ AFM_1 ในปริมาณน้อยก็สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กซึ่งเป็นผู้บริโภคหลัก จากอันตรายดังกล่าว จึงได้มีการกำหนดให้มีปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limit, MRL) ของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกไว้ที่ 0.05 และ 0.025 ppb ตามลำดับ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ AFM_1 ที่ปนเปื้อนในนมและผลิตภัณฑ์นม โดยการตรวจด้วยวิธีทางเคมี เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) มีความถูกต้องและความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ส่วนการตรวจโดยการใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาจะเป็นวิธีที่ตรวจสอบง่าย สะดวก ได้ผลเร็ว แม่นยำ ค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และเหมาะที่จะใช้ในการตรวจคัดกรอง (Screening Test) ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิคทางเคมี ในปัจจุบันชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA นี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อAFM_1 และนำแอนติบอดีที่คัดเลือกได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจด้วยวิธี ELISA

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AFM_1

1.2.2 พัฒนา ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ได้สำหรับตรวจวัด AFM_1 ในน้ำนม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 กระตุ้นหนูทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

1.3.2 หลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูทดลองและเซลล์ไมอีโลมาเพื่อสร้างเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี

1.3.3 คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาการตรวจด้วย ELISA

1.3.4 วิเคราะห์ AFM_1 มาตรฐานในน้ำนมดิบด้วย ELISA ที่พัฒนาขึ้น

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins; AFs) เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสมบัติเป็นพิษต่อคน พืช และสัตว์ อะฟลาทอกซินที่สำคัญมี 4 ชนิด คือ บี1 บี2 จี1 และจี2 ส่วนอะฟลาทอกซินเอ็ม1 จะพบได้ในน้ำนม ซึ่งเกิดจากการเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซินชนิดบี1 ที่เกิดขึ้นในบริเวณตับของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี1 และจะหลั่งออกมายังต่อมน้ำนมของสัตว์

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

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

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

โดยวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารเพื่อคัดกรองจากตัวอย่างมากในปัจจุบันวิธีหนึ่งคือ ELISA ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการตรวจวัดสารตกค้างชนิดต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ทำให้มีชุดตรวจ ELISA สำเร็จรูปทางการค้าอยู่จำนวนมาก โดยวัตถุดิบที่สำคัญในการเตรียม ELISA คือ แอนติบอดี เพราะเป็นปัจจัยสำคัญต่อความไวและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจ โดยแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจเพื่อใช้งานในระยะยาวคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เพราะมีสมบัติคงที่ สามารถเก็บโมโนโคลนสำหรับนำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในระยะยาวได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่พบว่ามีการผลิตชุดตรวจ ELISA สำหรับตรวจ AFM_1

1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

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

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

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและจำเพาะต่อ AFM_1

1.6.2 ได้วิธี ELISA ที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจวัด AFM_1 ในน้ำนม

1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ระยะเวลา			
	ปีที่ 1		ปีที่ 2	
	เดือน 1-6	เดือน 7-12	เดือน 1-6	เดือน 7-12
กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1	●√			
เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี	●√	●√		
คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1		●√		
ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี		●√		
ทดสอบความไวของแอนติบอดี		●√	●	
ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี			●	
ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวัด AFM_1 ด้วย ELISA			●	●
เขียนรายงาน	●√	●√	●	●
เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์		√		●

หมายเหตุ ● หมายถึงจะดำเนินการ และ √ หมายถึงได้ดำเนินการแล้ว

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

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

2.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

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

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

2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
Aflatoxin B_1 (AFB_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin G_1 (AFG_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M_1 (AFM_1)	Fermentek, Israel
Aflatoxin M_1-BSA (AFM_1-BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate $(NH_4)_2S_20_8$; APS	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase	Sigma-Aldrich, USA
Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	Jackson Immuno research
BCA™ protein assay kit	laboratories, USA
	Pierce, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Cinoxacin	Sigma-Aldrich, USA
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	Merck, Germany
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA

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

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

2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

ทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ โดยการฉีด AFM_1 ที่เชื่อมกับโปรตีนพาหะ (AFM_1-BSA; Sigma -Aldrich) เข้าภายในช่องท้องหนู โดยในการฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะผสม Freund's complete adjuvant (FCA) กับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาณแอนติเจนที่ฉีด 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) และฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 เช่นกัน หลังจากฉีดกระตุ้น 3-4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังฉีด 7 วัน เพื่อนำไปทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ AFM_1 อิสระได้หรือไม่ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

2.5 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

นำเซลล์มัยอีโลมา P3X เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีซีรัมจากลูกวัว (fetal calf serum; FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) โดยทำการเลี้ยงเซลล์มัยอีโลมาให้อยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียลประมาณ 4-5 วันก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ ในวันหลอมรวมเซลล์ควรมีเซลล์ที่มีชีวิตในจำนวนที่มากกว่า 10^7 เซลล์ และนำเซลล์มัยอีโลมามาปั่นล้างด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้าม เตรียมเซลล์ม้ามโดยทำการสลบหนูด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อเก็บซีรัม จากนั้นทำการเปิดช่องท้องโดยวิธีปลอดเชื้อเพื่อนำม้ามออกมา ใช้กรรไกรตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กๆ บนตะแกรงลวดตาถี่ แล้วใช้ด้ามของหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร บดม้ามเบาๆ ให้ละเอียด แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้ไปปั่นล้างใน RPMI 1640 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำเซลล์ของม้ามหนูที่ได้มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีโลมา P3X ในอัตราส่วนเซลล์ม้ามต่อเซลล์มัยอีโลมาเป็น 1:3 ผสมให้เข้ากันเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเขย่าเบาๆ ให้เซลล์ทั้งสองรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆ หยด 50% PEG ที่มีมวลโมเลกุล 3000-3700 ดาลตัน ที่เป็นสารช่วยหลอมเซลล์ลงไป โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร โดยควบคุมการหยดของ PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้หมดภายใน 1 นาที พร้อมกับการหมุนหลอดช้าๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี gentamycin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ดูดขึ้นลงเบาๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 380 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้าง PEG ออกจากเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งเป็นอาหารที่เติมสาร hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) จากนั้นปิเปตลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลี้ยงเซลล์ไว้ 10-14 วัน ดูการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา เมื่อเซลล์เจริญได้ประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุม ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมไปทดสอบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1 หรือไม่

2.6 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

2.6.1 คัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบพื้นหลุมของจานชนิด 96 หลุมด้วย AFM_1-BSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย 0.01M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่มี tween20 (PBS-T) เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) เข้มข้น 5% (w/v) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T เติมตัวอย่าง (เลือดหนูหรืออาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มี horse redish peroxidase (GAM-HRP) เชื่อมอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้งเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย 3,3'5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 1M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.6.2 คัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี indirect competitive ELISA

เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่สามารถจับกับ AFM_1 ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยทำการเคลือบหลุมเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์หรือซีรัมหนู จากหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกในข้อ 2.6.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย AFM_1 ลงไปผสม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการแอสเสย์เอนไซม์เช่นเดียวกับ 2.6.1 ถ้าหลุมที่เติม AFM_1 ในรูปอิสระให้การดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า หลุมที่ไม่มีการเติม AFM_1 แสดงว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มาจากหลุมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับสาร AFM_1 ในรูปอิสระได้ นำเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมนั้นมาแยกให้ได้โคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution โดยการเจือจางเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์เดี่ยวนี้ให้เจริญประมาณ 25% ของพื้นที่ก้นหลุมแล้วตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ด้วยวิธี **indirect competitive ELISA**

2.7 ตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการตรวจสอบไอโซไทป์โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Isotyping kit โดยทำการเตรียมแอนติบอดี ที่จำเพาะกับไอโซไทป์ชนิดต่าง ๆ คือ IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgA และ IgM จาก isotyping kit มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:6,000 เท่าใน PBS เติม ลงในจาน ELISA ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติม

แอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบไอโซไทป์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ IgG ของหนูที่มีเอนไซม์ HRP เชื่อมอยู่ (โดยที่แอนติบอดีทุติยภูมิมีความจำเพาะกับส่วน Fab (HRP-Rabbit anti mouse IgG Fab specific) ของ IgG ของหนู ที่เจือจาง 1:2,000 ใน PBS บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างออกด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายสับสเตรตที่ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.2 M citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

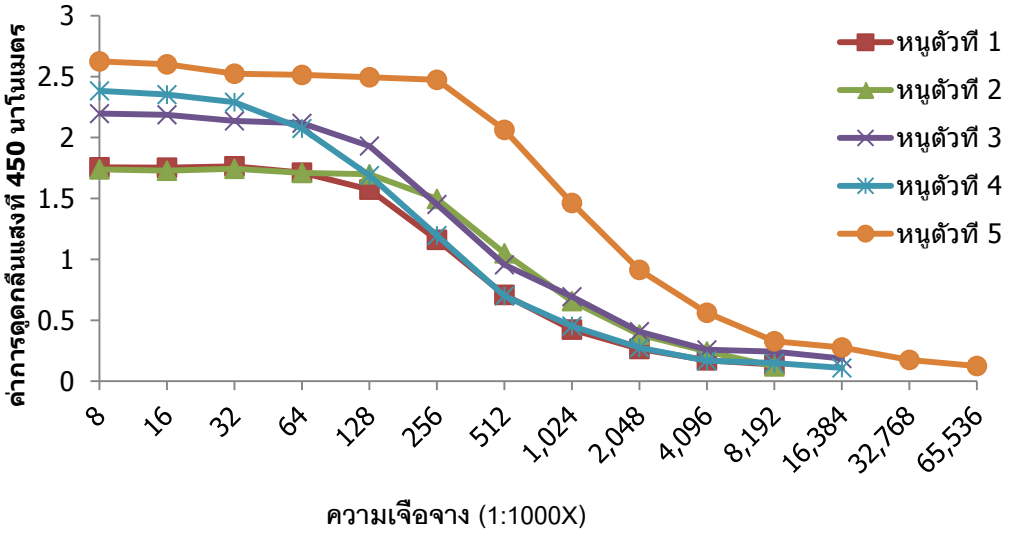
2.8 ทดสอบความไวของแอนติบอดี

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 50% (50% of inhibition concentration; IC_{50}) เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เทียบกับที่ไม่ใส่สารแข่งขัน และค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) ซึ่งทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการเติมลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.0048-4 นาโนกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเกิดการแย่งจับกันของสารที่ต้องการทดสอบในรูปอิสระในสารละลาย และ สารที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม graph pad prism 4 โดยแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$ และ แกน X เป็นค่า ล็อกกาลิทึมของความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและคำนวณค่า LOD โดยคำนวณจากค่าความเข้มข้นที่ B_0-3SD เมื่อ B และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ของหลุมที่มีการเติมแอนติเจนและไม่เติม แอนติเจนตามลำดับ และ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์ให้สร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

ทำการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM_1-BSA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของหนูไมซ์ในวันที่ 7 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 และแยกซีรัมมาหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังภาพที่ 1 พบว่าหนูทั้ง 5 ตัว มีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป โดยสามารถผลิตแอนติบอดีต่อ AFM_1-BSA ได้ ทำการระบุระดับแอนติบอดีโดยพิจารณาจากความเจือจางของซีรัม ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.1 (Liddle และ Cryer, 1991) พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวให้ระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1-BSA อยู่ในช่วง 8,192,000 – 32,768,000 โดยหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีต่ำที่สุด คือ หนูตัวที่ 1และ2 ให้ระดับแอนติบอดี 8,192,000 ส่วนหนูที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงที่สุด คือ หนูตัวที่ 5 โดยให้ระดับแอนติบอดี 32,768,000



ภาพที่ 1 ระดับแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ที่ฉีดกระตุ้นด้วย AFM_1-BSA จำนวน 5 ตัว ด้วยวิธี indirect ELISA

3.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ

เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองนั้นอยู่ในรูปของ AFM_1 ที่เชื่อมติดกับโปรตีน ซึ่งแอนติบอดีอาจจดจำส่วนที่เชื่อมติดนี้ได้จึงให้ผลบวกในการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA ในข้อ 3.1 ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูไมซ์ทั้ง 5 ตัวสามารถจับกับ AFM_1ในรูปอิสระได้ โดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรลดลง เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมที่ไม่มีการแย่งจับของ AFM_1 อิสระ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันในการแย่งจับของ AFM_1 ในรูปอิสระอยู่ในช่วง 53 - 86 % ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในซีรัมในการจับกับแอนติเจนในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

หนูตัวที่	ระดับความเจือจางของซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร(n=3)		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM_1	AFM_1 (2µg/ml)	
1	1: 256,000	1.258	0.541	57
2	1: 512,000	0.927	0.410	56
3	1:512,000	0.956	0.185	81
4	1:256,000	1.196	0.169	86
5	1:1,024,000	0.808	0.380	53

3.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อ AFM_1

ทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูไมซ์กับเซลล์มัยอีโลมาและเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ที่ผ่านการหลอมรวมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ซึ่งเซลล์มัยอีโลมาจะไม่สามารถเจริญได้และเซลล์ม้ามจะมีอายุขัยที่จำกัด ดังนั้นจะมีเฉพาะเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดนี้เท่านั้นที่เจริญได้ ตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับหลังจากการหลอมรวมประมาณ 10 วัน เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มมีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT หลังจากที่มีการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาเซลล์ประมาณ 1 ใน 4 ของหลุม นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่มีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาเจริญขึ้นมาตรวจการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA หลังจากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ให้ผลบวก (ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 450 นาโนเมตร มากกว่าหรือเท่ากับ 0.7) มาทำการทดสอบต่อไป เพื่อดูว่าแอนติบอดีที่เซลล์ไฮบริโดมาผลิตได้ สามารถจับกับ AFM_1 ในรูปอิสระได้หรือไม่ โดยใช้วิธี indirect competitive ELISA

จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 1 สัปดาห์พบว่าในหลุมมีเซลล์ไฮบริโดมาเจริญเพียงเล็กน้อยเป็นโคโลนีอยู่ในหลุม แต่พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเซลล์ไฮบริโดมา และมีเจริญอย่างรวดเร็วจึงส่งผลให้ไปบดบังการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AFM_1-BSA ที่ใช้เคลือบพื้นหลุมของจาน ELISA จากการทำ indirect ELISA แต่ไม่สามารถจับกับ AFM_1 อิสระจากการทำ indirect competitive ELISA จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM_1 อิสระ จำนวน 2 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution หลังจากขั้นตอนนี้รอให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญ แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบว่าเซลล์ยังสามารถผลิตแอนติบอดีและจับกับสารอิสระได้หรือไม่ แต่พบว่าเซลล์ได้สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไป จึงไม่นำมาใช้ในการวิจัยต่อไป

จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดี และมีความสามารถในการจับกับสาร AFM_1 อิสระ จำนวน 11 หลุม นำแต่ละหลุมมาแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ทำการคัดเลือกโคลนที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับ AFM_1 อิสระได้ดี โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect competitive ELISA โดยหลุมที่ใส่ AFM_1 อิสระแล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากกว่า 90% เมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่ใส่ AFM_1 พบว่ามีทั้งหมด 5 โคลนที่มีสมบัติดังกล่าว จึงทำการกำหนดรหัสของเซลล์ไฮบริโดมา ได้แก่ AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และAFM_1-17 ดังตารางที่ 2 ทำขยายเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำเซลล์ไปเก็บรักษาโดย แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ใช้ในการตรวจสอบลักษณะสมบัติต่อไป

ตารางที่ 2 เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและสามารถจับกับสาร AFM_1 อิสระ

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n=3)		% การแข่งขัน
		ไม่มี AFM_1	AFM_1 (2µg/ml)	
AFM_1-1	130/1F/5G/11E/10F	2.737	0.088	97
AFM_1-3	130/1F/6F/10B/6H	2.838	0.075	97
AFM_1-9	131/11D/9D/10H/7G	2.992	0.277	91
AFM_1-15	70/3F/8H/11C	2.900	0.091	97
AFM_1-17	151/7B/12F/9H	2.756	0.118	96

3.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบไอโซไทป์เพื่อที่จะได้เลือกชนิดของคอลัมน์ให้เหมาะสมในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์หลังจากการผลิต เนื่องจากกลุ่มย่อยของ IgG แต่ละชนิด มีความสามารถในการจับกับ โปรตีนเอ หรือ โปรตีนจี ด้วย affinity ต่างกัน จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 (แสดงในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

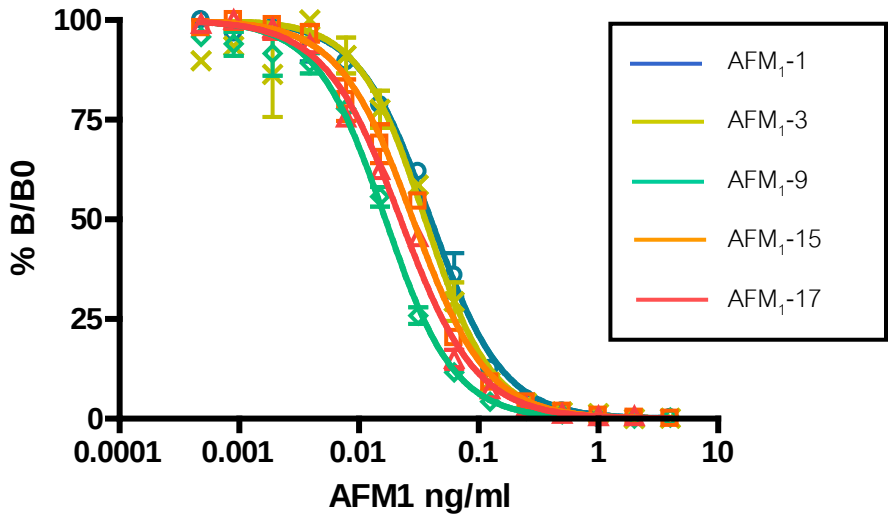
รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n=3)					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
AFM_1-1	1.087	0.071	0.086	0.085	0.073	0.216
AFM_1-3	1.098	0.073	0.071	0.088	0.072	0.221
AFM_1-9	1.124	0.074	0.086	0.09	0.07	0.219
AFM_1-15	1.034	0.071	0.084	0.087	0.074	0.225
AFM_1-17	1.051	0.072	0.083	0.09	0.071	0.226

3.5 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AFM_1 ในรูปอิสระ

เนื่องจากในแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างกัน จึงทำให้ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาระดับการเจือจางที่เหมาะสมกับแอนติเจนที่ใช้เคลือบหลุมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติเจน AFM_1-BSA ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเคลือบหลุม เลือกค่าความเจือจางที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรมีค่าใกล้เคียง 1.000 พบว่าระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมของโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-15 และ AFM_1-17 คือ 1:3,200 และโคลน AFM_1-9 คือ1:1,600

เมื่อทราบค่าความเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนแล้ว จากนั้นหาค่าความไวของแอนติบอดีซึ่งรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของแอนติเจนแข่งขันที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีตัวแข่งขันลดลงครึ่งหนึ่ง (50% inhibition concentration, IC_{50}) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ (limit of detection, LOD) ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ AFM_1 ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้น 4.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (0.0048 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จนถึง 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 40, 36, 17, 28 และ 23 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 และตารางที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในงานวิจัยนี้กับแอนติบอดีที่รายงานโดย Pei และคณะ (2009) ซึ่งมีค่า LOD อยู่ที่ 0.04 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (40 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 มีความไวสูงกว่า และมีความไวสูงเพียงพอต่อการนำไปพัฒนาการตรวจ AFM_1 ในระดับที่ต่ำกว่าค่าที่คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) ได้กำหนดไว้ว่าให้มีปริมาณของ AFM_1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารกได้ไม่เกิน 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.025 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนการดูดกลืนแสงและปริมาณ AFM_1 ในการแข่งขันเมื่อทดสอบด้วย indirect competitive ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 (n=3)

ตารางที่ 4 IC_{50} และ LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (n=3)

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)
AFM_1-1	40	16
AFM_1-3	36	15
AFM_1-9	17	5
AFM_1-15	28	7
AFM_1-17	22	8

4. สรุปงานวิจัย

จากการฉีดกระตุ้นหนูไมซ์ทั้งหมด 5 ตัว ด้วยแอนติเจน AFM_1-BSA พบว่าหนูทั้ง 5 ตัวมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดโดยสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ AFM_1ในรูปอิสระได้ จากการหลอมรวมเซลล์ 5 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อ AFM_1 จำนวน 5 โคลน ได้แก่ AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 เมื่อทำการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 โคลน มีไอโซไทป์เป็น IgG_1 เมื่อทดสอบความไวของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ AFM_1 ในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขัน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน AFM_1-1, AFM_1-3, AFM_1-9, AFM_1-15 และ AFM_1-17 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 39.8, 35.8, 16.7, 28.3 และ 22.3 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่า LOD เท่ากับ 16, 15, 5, 7 และ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความไวสูงเพียงพอที่จะใช้พัฒนาการตรวจต่อไป

บรรณานุกรม

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. 2545. ความปลอดภัยของอาหารสัตว์. วารสารข่าวปศุสัตว์ 25(212) : 16-9.

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ และอดิลักข์ เล็บนาค. 2538. ผลการตรวจสารพิษอะฟลาทอกซินในสัตว์. สาส์นไก่และการเกษตร 43(10) : 47-53.

ชัยวัธน์ วิทูระกูล, นัฐวุฒิ อินคำเชื้อ และวิชาญ สุขประเสริฐ. 2551. การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมและนมโคในฟาร์มโคนมจังหวัดลำพูน.ข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ 16(4) : 44-50.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหาร และอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 161-166.

เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2544. การหาชนิดวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ผสมในอาหารข้น และชนิดของอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนมที่มีผลกระทบต่ออัตราการขับออกของสารพิษอะฟลาทอกซินทางน้ำนมของแม่โครีดนม. การสัมมนาเรื่องการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจร. ชลบุรี.

ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง และ ปกรณ์ จาละ. 2549. การตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) งานตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา. นครปฐม: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.

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

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

วิทยา สังข์ทอง. 2543. การปนเปื้อนของสารพิษเชื้อราอะฟลาทอกซินในน้ำนม. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหาร และอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วนรับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : 123-129.

ศุภกิจ อังศุภากร. 2526. ผลของอะฟลาทอกซินต่อสุขภาพของคนและสัตว์ในประเทศไทย. สัตวแพทยสาร 34(3) : 285-303.

สุทธิพร พิริยายน. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารสัตว์. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจรในส่วน รับผิดชอบของกรมปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2539-2543. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์ : 158-160.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2529. ประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 98 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ตามพระราช บัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Badea, M., Micheli, L., Messia, M. C., Candigliota, T., Marconi, E., Mottram, T., Velasco-Garcia, M., Moscone, D and Palleschi, G. 2004. Aflatoxin M_1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. Analytica Chemica Acta 520 : 141-148.

Cavaliere, C., Foglia, P, .Guarini, C., Marzioni, F., Nazzari, M., Samperi, R., and Lagana, A. 2006. Aflatoxin M_1 determination in cheese by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography 1135 : 135–141.

Cathey, C. G., Huang, A. G., Sarr, A. B., Clement, B. A and Phillips, T. D. 1994.Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M_1 in milk. Journal of Dairy Science 77 : 1223–1231.

Creepy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127 : 19–28.

Curits, L.R. and Zhang, Q. 1995. Temperature modulated incidence of aflatoxin B_1- initiated liver cancer in rainbow trout. Fundamental and Applied Toxicology 25 : 146-159.

Diaz, S., Dominguez, L., Prieta, J., Blanco, J. L., and Moreno, M. A. 1995. Application of a diphasic dialysis membrane produce for surveying occurrence of aflatoxin M_1 in commercial milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 : 2678-2680.

European Commission Regulation, No. 683/2004/EC of 13 April 2004, Amending Regulation (EC) No. 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for Infants and Young Children, Official Journal of European Communities L106 : 3-5.

Gallagher, E. P., and Eaton, D. L. 1995. In vitro biotransformation of aflatoxin B_1 in channel catfish liver. Toxicology and Applied Pharmacology 132 : 82-90.

Goryacheva, I. Y., Karagusheva, M. A., Peteghem, C. V., and Sibanda, L. 2009. Immunoaffinity pre-concentration combined with on-column visual detection as a tool for rapid aflatoxin M_1 screening in milk. Food Control 20 : 802–806.

Kim, E. K.,Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J., and Kim, Y. B. 2000. Occurance of aflatoxin M_1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminants 17 : 59-64.

Lee, J. E., Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Jeon, T. H. 2009. Occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control 20 : 136–138.

Manetta, A.C., Giammarco, M., Giuseppe, L.D., Gramenzi, A., Formigoni, A., and Lambertini, L. 2009. Distribution of aflatoxin M_1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. Food Chemistry 113 : 595–599.

Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., and Palleschi, G. 2005. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M_1 determination in milk using screen-printed electrodes. Biosensors and Bioelectronics 21 : 588–596.

Pei, S. C., Zhang, Y. Y., Eremin, S. A., and Lee, W. J. 2009. Detection of aflatoxin M_1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. Food Control 20 : 1080–1085.

Radoi, A., Targa, M., Prieto-Simon, B., and Marty, J. L. 2008. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M_1 detection. Talanta 77 : 138-143.

Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K., and Das, M. 2004. Detection of aflatoxin M_1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control 15 : 287–290.

Reddy, S. V., and Waliyar, F. Properties of aflatoxin and its producing fungi [Online]. 2005. Available from:http://www.aflatoxin.info/Aflatoxin.asp [2011, July 24]

Shundo, L., and Sabino, M. 2006. Aflatoxin M_1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. Brazillian Journal of Microbiology 37 : 164-167.

Tekinsen, K. K., and Tekinsen, O. C. 2005. Aflatoxin M1 in white pickle and van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern in Turkey. Food Control 16 : 565–568.

Wilson, D. A.,and Payne, G. A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In D. L. Eaton and J. D.Groopman (Eds.), The toxicology of aflatoxins. New York Academic Press: 309-326.

Woychik, N. A., Hinadill, R. D., and Chu, S. F. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M_1. Applied and Environmental Microbiology 48 : 1096-1099.

Yang C, C., Jiun L, W., and Yao P, K. 2005. Determination of aflatoxin M_1 in Milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53 : 8474-8480.

ประวัติคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

1.1 ชื่อ-นามสกุล (ไทย) นายกิตตินันท์ โกมลภิส

1.2 ชื่อ-นามสกุล (อังกฤษ) Mr.Kittinan Komolpis

1.3 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

1.4 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ A4

1.5 หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330
โทรศัพท์ 02-218-8078 (ทำงาน) 089-664-6266 (มือถือ)
โทรสาร 02-253-3543 e-mail: kittinan.k@chula.ac.th

1.6 ประวัติการศึกษา

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

1.7 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
เทคโนโลยีชีวภาพ (การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี การวิเคราะห์ด้วย ELISA และแถบทดสอบ)

1.8 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

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

1.8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

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

1.8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1.8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Umarphorn Chadseesuwan, U., Puthong, S., Gajanandana, O., Palaga, T. and **Komolpis, K.** 2013 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. Journal of AOAC International 96: 1-8

(แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project-3-954 1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

2. Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S. and **Komolpis, K**. 2013. A Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 69-75

(แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

3. **Komolpis, K.**, Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16: 567-571

4. Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K**., Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

(แหล่งทุน – สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

5. Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K**. and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 14: 202-206

6. **Komolpis K**., Srivannavit, O. and Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. Biotechnology Progress, 18:641-646.

7. Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (Glycine max). Biotechnology Progress; 17:421-430.

8. Wu E., **Komolpis K**., Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from Indigofera tinctoria while attaining biological integrity. Biotechnology Techniques, 13:567-569.

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

1.8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

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

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

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

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

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

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

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

8. Kaewviset, S., **Komolpis, K.,** Palaga, T. Development of progesterone test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185

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

1.8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

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

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

1.8.4.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (70%) (แหล่งทุน – สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

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

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

6. ประวัติการศึกษา

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

7. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

8.2.1 สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

8.2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลิน เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีที่ 1)

2.8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

2.8.3.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. 2011. Nutitional composition of farmed and wild sandworms, Perinereis nuntia. Animal Feed Science. 169:265-269

2. Khamjing W, **Khongchareonporn** N and Rengpipat S. 2011.Detection by using monoclonal antibodies of *Yersinia enterocolitica* in artificially-contaminated pork. Microbiology and Immunology. 55: 605-615.

3. **Panchan N**, Sithigorngul P, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. ScienceAsia. 31: 29-35.

4. **Panchan N**, Bendena WG, Browser P, Lungchukiet P, Tobe SS, Sithigorngul W, Chaivisurhangkuru P, Rangsiruji A, Pewnim T and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Peptide. 24(10):1563-1570.

5. Sithigorngul P, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P, Longyant S, Sithigorngul W and Petsom A. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Peptide. 23: 1934-1952

6.Sithigorngul P, Pupurm J, Krungkasem C, Longyant S, **Panchan N**, Chaivisurhangkuru P and Sithigorngul W. 2002. Four novel PYFs: members of NPY /PP peptide superfamily from the the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Peptide. 23: 1895-1906.

7.Sithigorngul P, Saraithongkum W, Longyant S, **Panchan N**, Sithigorngul W and Petsom A. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the giant freshwater prawn *Macrobachium rosenbergii*. Peptide. 22 : 191-197.

8. Sithigorngul P, **Panchan N**, Vilaivan T, Sithigorngul W and Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the giant freshwater prawn *Macrobachium rosenbergii*. Comp Biochem Physiol B. 124 : 73-80.

2.8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1. Noiprapai K, Khongchareonporn N and Rengpipat S. 2011. Production of monoclonal antibodies against Vibrio parahaemolyticus. The 23 Annual

Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand

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

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

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

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

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

7. Khamjing W, **Khongchareonporn N** and Rengpipat. Production of monoclonal antibodies against Yersinia enterocolitica. 9th National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 120.

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

9. Saneewong S, Khongchareonporn N and Komolpis K. Development of norfloxacin test kit using enyme-linked immunosorbent assay technique. The 20th Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14th-

17th,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129

10. Techaprempreecha S, **Khongchareonporn N**, Chaicharoenpong C, Aranyakananda P, Chunhabandit S and Petsom A. Proximate composition of farmed and wild sandworms (*Perinereis nantia* Savigny). 4th International Greek Biotechnology Forum. 2-3 February 2008. Zappeio, Megaro, Athens.

2.8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

2.8.4.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกโตปามีนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 70

2.8.4.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ELISA) แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 70

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางทรงจันทร์ ภู่ทอง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Songchan Puthong
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0
4. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย (ชำนาญการพิเศษ)
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
E-mail songchan.p@chula.ac.th

6. ประวัติการศึกษา
   พ.ศ. 2540 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   พ.ศ. 2529 วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (anti-hepatoma, anti- α-fetoprotein (AFP), anti-carcinoembryonic antigen (CEA))
7. ผลงานวิจัย
   7.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1) **Puthong, S.**, Gamnarai, P., Roitrakul, S., Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Rojpibulstit P. (2011). Hep88 mAb Induced Ultrastructural Alteration Through Apoptosis Like Program Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. Journal of the Medical Association of Thailand. 94(12): 109 - 116.

2) Graisuwan, W., Wairachai, O., Ananthanawat, C., **Puthong, S.**, Soogarun, S., Kaitkamjornwong, S., and Voravee P.Hoven. (2012). Multilayer film assembled from charged derivatives of chitosan : Physical characteristics and biological responses. Journal of Colloid and Interface Science. 376 : 177 – 188.

3) Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and Chanchao, C. (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complementary and Alternative Medicine. 12:27.

4) Sangthong, S., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.**, Chandchawan, S., and Muangsin, N. (2011). Synthesis of rotenoid derivatives with

cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.

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

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

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

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

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

7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

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

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

3) Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochan, S., Gamnarai, P., Kangsadalampai, S., Roytrakul, S., and Rojpibulstit, P. (2011). Proteomic study of tumor antigen recognized by Hep88 mAb: A novel harmful mAb to hepatocellular carcinoma. Proceeding in The 3rd Biochemistry and Molecular biology (BMB) conference "From Basic to Translational Research for a Better Life". April 6-8 ,2011 ,The Empress Convention Centre ,Chiang Mai ,Thailand.

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

7.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

7.3.1 โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์”

7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจแร็กโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”

7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์”

7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์”

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

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Umaporn Pimpitak
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 91 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
E-mail tikchula@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา
   พ.ศ. 2549 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   พ.ศ. 2542 วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี
7. ผลงานวิจัย
   7.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
   1) **Pimpitak, U.**, Puthong, S., Komolphis, K., Petsom, A., and Palaga, T. (2009). Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimps samples. Food Chemistry. 116: 785-791.

   7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
   1) Sangdokmai, A., **Pimpitak, U.,** Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M_1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.
   2) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U.**, and Buakeaw, A. Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

7.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

7.3.1 โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์”

7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจแร็กโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”

7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์”

7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์”

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

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 4

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอณุมาศ บัวเขียว
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Anumart Buakeaw
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
   โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543
   E-mail anumart.b@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
   พ.ศ. 2545 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   พ.ศ. 2541 วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี
7. ผลงานวิจัย
   7.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
   1) Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from Salacia verrucosa. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.
   7.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
   1) Sangdokmai, A., Pimpitak, U.**,** **Buakeaw, A.**, Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M_1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.
   2) Khongarsa, K., Khongchareonporn, N., Komolpis, K., and **Buakeaw, A.** (2012). 1st ASEAN PLUS THREE GRADUATE RESEARCH CONGRESS. 1 – 2 March 2012 Chaing Mai ,Thailand.
   3) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., Pimpitak, U., and **Buakeaw, A.** Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.
   7.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่
   7.3.1 โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์”

7.3.2 โครงการ “พัฒนาชุดตรวจแร็กโทพามีนโดยอาศัยพอลิเมอร์ชีวภาพ”

7.3.3 โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์”

7.3.4 โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์”

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

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 5

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายธนาภัทร ปาลกะ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Tanapat Palaga
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100602876498
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท
แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 02-218-5070 โทรศัพท์มือถือ 081-454-9295 โทรสาร 02-252-7576
e-mail: tanapat.p@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุลและจุลชีววิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

- โครงการ วิถีสัญญาณ Notch ในแมคโครฟาจและผลต่อการตอบสนองของทีลิมโฟไซท์ (แหล่งทุน สกว.)
- โครงการ ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับแอนติเจน LipL32 จากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคโดยใช้อนุภาคนาโนไคโทซานดัดแปร (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)
- โครงการ Notch and TLR crosspath in innate immune cells (Fogarty International Research Collaboration Award, NIH, USA)

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

(1) Boonyatecha, N, Sangphech, N, Wongchana, W, Kueanjinda, P, **Palaga, T**. (2012) Involvement of Notch signaling pathway in regulating IL-12 expression via c-Rel in activated macrophages. Mol. Immunol. 51, 255-62. (IF=2.960)

(2) Wisutsitthiwong, C, Buranaruk, C, Pudhom, K, **Palaga, T**. (2011) The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun. 415, 361-366. (IF=2.595)

(3) Wongchana, W, **Palaga, T**. (2011) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. Cell. Mol. Immunol. 8, 1-8. (IF=2.026)

(4) Yorsangsukkamol, J, Chaiprasert, A, **Palaga, T**, Prammananan, T, Faksri, K, Palittapongarnpim, P, Prayoonwiwat, N. (2011) Apoptosis, production of MMP9, VEGF, TNF-alpha and intracellular growth of M. tuberculosis for different genotypes and different pks15/1 genes. Asia. Pac. J. Aller. Immunol. 29, 1-13. (IF=0.76)

(6) Ravangpai, W, Sommit, D, Teerawatananond, T, Sinpranee, N, **Palaga, T**, Pengpreecha, S, Muangsin, N, Pudhom, K. (2011) Limonoids from seeds of Thai Xylocarpus moluccensis. Bioorg. Med. Chem. Lett. 21, 4485-4489. (IF=2.661)

(7) Kuncharin, Y, Sangphech, N, Kueanjinda, P, Bhattarakosol, P**, Palaga, T.** (2011) MAML1 regulates cell viability via the NF-kappa B pathway in cervical cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* **317**, 1830-1840. (IF=3.589)

(8) Puwipirom, H, Hirankarn, N, Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Wongpiyabovorn, J, **Palaga, T.** (2010) Increased interleukin-23 receptor+ T cells in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, R215. (IF=4.25)

(9) Kammarnjesadakul, P, **Palaga, T**, Sritunyalucksana, K, Mendoza, L, Krajaejun, T, Vanittanakom, N, Tongchusak, S, Denduangboripant, J, Chindamporn, A. (2010) Phylogenetic analysis of Pythium insidiosum Thai strains using cytochrome oxidase II (COXII) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). *Med. Mycol.* (in press) (IF = 2.133)

(10) Wangthong, S, **Palaga, T**, Rengpipat, S, Wanichwecharungruang, SP, Chanchaisak, P and Heinrich, M. (2010) Biological activities and safety of Thanaka (Hesperethusa crenulata) stem bark. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 466-472. (IF=2.322)

(11) Wittayasuporn, M, Rengpipat, S, **Palaga, T**, Asawanonda, P, Anumansirikul, N, and Wanichwecharungruang, SP. (2010) Chitosan derivative nanocarrier: Safety evaluation,

antibacterial property and ascorbyl palmitate encapsulation. *J. Microencapsul*. **27**, 218-225. (IF=1.314)

(12) Pimpitak, U, Putong, S, Komolpis, K, Petsom, A, and **Palaga, T**. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chem.* **116**, 785-791. (IF=2.696)

(13) **Palaga, T**. (2009) Update on the Immunology of Tuberculosis. *Siriraj Med. J.* **61**, 37-41.

(14) Rengpipat, S, Wongtangprasert, N, and **Palaga, T**. (2008) The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr*. 15, 297-305. (IF=1.398)

(15) Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Hirankarn, N, and **Palaga, T**. (2008). Defects in Notch1 upregulation upon activation of T cells from patients with systemic lupus erythematosus are related to lupus disease activity. *Lupus* **17**, 645-653. (IF=2.244)

(16) Suwanjunee, S, Wongchana, W, and **Palaga, T**. (2008) Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anticancer Drug* **19**, 477-486. (IF=2.358)

(17) **Palaga, T**, Buranaruk, C, Rengpipat, R, Fauq, AH, Golde, TE, Kaufmann, SHE, and Osborne, BA. (2008). Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* **38**, 174-183. (IF=4.865)

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย

- โครงการ ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับแอนติเจน LipL32 จากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคโดยใช้อนุภาคนาโนไคโทซานดัดแปร (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

สถานภาพในการทำวิจัยได้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 50%

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

สถานภาพในการทำวิจัยได้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 60%