สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเททระไซคลิน รหัส 12-3F ไอโซไทป์ชนิด IgG_{2a} ที่พัฒนาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon Corporation, Japan
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง	D.S.C. group Co., Ltd, Taiwan
- เครื่องกวนแม่เหล็ก	Corning, USA
- เครื่องชั่งหยาบและละเอียด	Mettler Toledo Co., Ltd, Switzerland
- เครื่องผสมด้วยแรงหมุน	Scientific Industries, Inc, USA
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส	Mettler Toledo Co., Ltd, Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ	M.S.E. Ltd, England
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท	Titertek multiskan, Finland

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
- ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน ขนาด 1 ลิตร	Techne, USA
- ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Rad, USA
- ถังแช่แข็งเซลล์ในโตรเจนเหลว	Tayloy-Wharton, USA
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato Scientific Co., Ltd, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ	Scientific Supply Co., Ltd, Thailand
- ตู้เย็น	Toshiba, Thailand
- ปั๊มสุญญากาศ	Iwaki, Japan
- ตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)	Sanyo, Thailand
- ตู้แช่แข็ง (-70 องศาเซลเซียส)	Sanyo, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany
2. อุปกรณ์ต่างๆ	
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	Boro, Germany
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nipro, Thailand
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Costar, USA
- ทิป ขนาด 10, 200, 300, 1000 ไมโครลิตร	Axygen, USA
- ปิเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	HBG, Germany
- ปิเปตต์อัตโนมัติ	Discovery, Poland
- ปิเปตต์มัลติชาเนล ขนาด 300 ไมโครลิตร	Discovery, Poland
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
- หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	CLP, USA
- หลอดสำหรับแช่แข็งเซลล์	Corning Incoporated, Mexico

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Acetonitrile	เฟสเคลื่อนที่ใน HPLC	Sigma-Aldrich, USA
Acrylamide gel	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
Aminohexanoyl-biotin-*N*- hydroxy succinimide	เชื่อมต่อTC กับแอนติบอดี	Zymed, USA
Ammoniumpersulfate (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol (CAP)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Fluka, China
Coomassie brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce, USA
Dimethyl sulfoxide	ละลายสับสเตรท TMB	Fluka, Switzerland
Disodium hydrogenphosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carloerba, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Doxycycline (DC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	ตัวทำละลาย	BDH, England
Fetal calf serum (FCS)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	PAA, Austria
Furazolidone (FZD)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	Fluka, Switzerland
Hydrochloric acid	ใช้ปรับค่ากรด-เบส	Sigma-Aldrich, USA
L-Glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Merck, Germany
Sodium chloride (NaCl)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
Sulfuric acid (H_2SO_4)	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck, Germany
RPMI 1640	อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา	Biochrome , Germany
Tetracycline hydrochloride (TC)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB)	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	Sigma-Aldrich, USA
N, N, N, N-Tetramethyl-Ethylenediamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Pierce, USA
Thimerosal	สารป้องกันการปนเปื้อน	Sigma-Aldrich, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trisma base)	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	สารลดแรงตึงผิว	Riedel-de Haën, UK
	สำหรับล้างจานหลุม	Sigma-Aldrich, USA

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดี

3.4.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 12-3F ที่มีความจำเพาะต่อเททระไซคลิน [15] ออกมาจากไนโตรเจนเหลว นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมด จึงถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เพื่อล้างน้ำยาแช่แข็งออกจากเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20 % FCS โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เลี้ยงไว้ประมาณ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด จากนั้นทำการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร 2 ขวด โดยส่วนแรกแบ่งไปเก็บอย่างถาวรในไนโตรเจนเหลว อีกส่วนนำไปใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปริมาตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 % เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.1.2 การแช่แข็งเก็บเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะเวลานาน

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FCS โดยปริมาตร มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยปริมาตรผสมอยู่ ขณะเย็น ลงไป 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในหลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็งขนาด 2 มิลลิลิตร นำไป

เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว เขียนบันทึกเกี่ยวกับเซลล์ลงในแฟ้มประจำถังเพื่อให้ง่ายต่อการค้นหา

3.4.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างเททระไซคลินกับ OVA

3.4.2.1 การเชื่อมต่อเททระไซคลินกับ OVA โดยใช้ปฏิกิริยา Mannich [39]

ทำการเชื่อมต่อเททระไซคลินกับ OVA โดยเริ่มจากการนำ OVA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลาย 0.1 M MES, pH 4.7 ที่มี 0.15 M sodium chloride ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 37 % formaldehyde (v/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิสด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.2.2 การหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมติดระหว่าง TC กับ OVA โดยวิธี MALDI- TOF MS

คำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง TC กับ OVA โดยคำนวณจากมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เปลี่ยนไปโดยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร

$$\text{จำนวนโมเลกุลของ TC ที่เชื่อมติด} = \frac{(\text{มวลโมเลกุล TC-OVA}) - (\text{มวลโมเลกุลของ OVA})}{\text{มวลโมเลกุลของTC}}$$

3.4.2.3 การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการหาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ OVA ที่เชื่อมต่อกับเททระไซคลิน โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ protein assay kit (PIERCE) โดยเริ่มจากเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับรีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50: 1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน OVA ที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (เททระไซคลินเชื่อมต่อกับ OVA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS

ที่ความเจือจาง 10 และ 20 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจาน ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจาน ELISA ชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำจาน ELISA ชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.4.3 การตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TC

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 มาทดสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TC ด้วยวิธี indirect ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย TC-OVA ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (PBST) 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 % หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเจือจางที่ความเข้มข้น1: 100 – 1: 1,600 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1: 10,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein G affinity chromatography

นำโปรตีนจีเซฟาโรส (protein G sapharose) 5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในเอทานอลเข้มข้น 20% (w/v) มาล้างเอทานอลออกด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ

3.4.1.2 (ปริมาตร 600 มิลลิลิตร) ที่กรองผ่านกระดาษกรอง ลงในคอลัมน์โปรตีนจี ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ควรวางแอนติบอดีในลังน้ำแข็งหรือที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน ล้างโปรตีนที่ไม่จับกับกับโปรตีนจีในคอลัมน์ออกด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับโปรตีนจี ด้วย 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.7 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ในหลอดที่มี 1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่าความเป็นกรดเป็นเบสของสารละลายให้เป็นกลาง ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เพื่อนำมาวาดโครมาโตแกรม แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีแอนติบอดีมารวมกัน เพื่อนำไปไดอะไลซิส ใน PBS ที่มี 0.01% thymerosal เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์วันละ 2 ครั้ง [40] หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน

3.4.5 การหาปริมาณแอนติบอดี

การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยนำแอนติบอดีที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

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

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35 [41] และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน

3.4.6 การทดสอบความไวของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อเททระไซคลิน ในรูปอิสระ

เตรียมสารเททระไซคลินที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 – 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยทำการเติมเททระไซคลินที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ในอัตราส่วน 1: 1 แทนอาหารเลี้ยงเซลล์

3.4.7 การทดสอบความบริสุทธิ์และการหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate -Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.4.7.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียม 15% separating gel ที่มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.2 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบโดยเติมน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเตรียม 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel และใส่หวีเพื่อเป็นแม่พิมพ์ของหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว 30 นาที

3.4.7.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

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

3.4.7.3 การทำ electrophoresis

ทำการแยกแอนติบอดีโดยนำเจลที่เตรียมไว้ไปประกอบเข้ากับ electrophoresis chamber ที่มี SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (Tris-glycine-HCL) (running buffer) ทั้งส่วนบนและส่วนล่างของเครื่อง นำสารละลายตัวอย่างมาปิเปตในหลุมเจลไม่เกินหลุมละ 20 ไมโครลิตร ส่วนหลุมของโปรตีนมาตรฐาน ให้ปิเปตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ต่อขั้วไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จนแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย coomassie blue (staining solution) ข้ามคืนและล้างในสารละลายของเอทานอลและกรดอะซิติก (destaining solution) จนกว่าเจลจะใสและเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

3.4.8 การเตรียมชุดตรวจสอบ

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบทั้งหมด 4 แบบ คือ

- Ag- captured direct competitive ELISA
- Ag- captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์
- Ab- captured indirect competitive ELISA
- Ab- captured direct competitive ELISA

3.4.8.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA

ชุดตรวจสอบแบบ Ag- captured direct competitive ELISA เตรียมโดยเริ่มจากการเคลือบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเททระไซคลินบนจาน ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมเททระไซคลิน ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆใน PBS หลุมละ 50 ไมโครลิตร ลงไปพร้อมกับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer pH, 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.8.1.1 การเชื่อมต่อเททระไซคลินกับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (TC-HRP) [39]

การเชื่อมต่อเททระไซคลินเข้ากับ HRP โดยเริ่มจากการนำ HRP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลาย MES, pH 4.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TC ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้น 37 % (v/v) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปไดอะไลซ์ด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA แล้วทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยวิธี Ag- captured direct ELISA

3.4.8.1.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP

เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.5, 1, 2.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ PBS แทนเททระไซคลินในรูปอิสระ แล้วทำการทดลองด้วยวิธี Ag- captured direct ELISA

3.4.8.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag -captured direct competitive ELISA

ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมบนจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเททระไซคลินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 ไมโครลิตร กับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 25 ไมโครลิตร และแอนติบอดีหลุมละ 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2

ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.8.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อ กับ HRP

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เหมาะสมโดยเคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 1, 2.5, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ TC-HRP ที่ 0.25-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ PBS แทนเททระ-ไซคลินในรูปอิสระ แล้วทำการทดลองด้วยวิธี Ag- captured direct ELISA

3.4.8.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA

ชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.2.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเททระไซคลินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1: 10,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายที่ใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.8.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA และแอนติบอดี

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA โดยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA 0.1- 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ PBS แทนเททระไซคลินในรูปอิสระ แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.8.3 และทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.4.8.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured direct competitive ELISA

ทำการเคลือบเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA บนพื้นผิวในของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเททระไซคลินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป หลุมละ 50 ไมโครลิตรพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน จากข้อ 3.4.8.4.1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1: 4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer, pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.8.4.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน (Ab-biotin)

การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับไบโอติน เริ่มจากนำแอนติบอดี 1.5 มิลลิกรัมไปทำไดอะไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer, pH 8.4 ข้ามคืน แล้วทำการเติมไบโอติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO กวนเบาเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิส

ด้วย PBS เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

3.4.8.4.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน โดยการแปรความเข้มข้นของเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA 0.1- 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 0.01-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Ab-captured direct ELISA เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.8.4 และทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบต่อไป

3.4.9 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเคลือบเททระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนพื้นผิวในของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมเททระไซคลินในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1: 4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่า ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM potassium citrate buffer pH 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.10 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบทำโดยชั่งน้ำผึ้งปริมาณ 1 กรัม ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด แล้วเติมเททระไซคลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาเจือจางด้วย PBST ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตรวจสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ Ab-captured direct competitive ELISA เปรียบเทียบความเข้มข้นของเททระไซคลินที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน

3.4.11 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.4.11.1 หาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

นำอัตราส่วนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่ได้ จากชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบ มาทดสอบกับเททระไซคลินในรูปอิสระตั้งแต่ 0-1,000 ppb โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีเททระ-ไซคลินในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีเททระไซคลินที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 และคำนวณเป็นค่า LOD และ LOQ โดยค่า IC_{50} หาได้จาก 50% B/B_0 คือ

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

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีเททระไซคลินที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีเททระไซคลินที่คลิน

หาค่า LOD และ LOQ (Limit of Quantitation) จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n = 9) ที่ไม่มีเททระไซคลิน (B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ โดยนำค่าความเข้มข้นของเททระไซคลิน มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของเททระไซคลินและแกน Y เป็นค่า % B/B_0

LOD : B_0 - 3SD

LOQ : B_0 - 10SD

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยที่ไม่มีเททระไซคลิน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

LOD คือ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้

LOQ คือ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง

3.4.11.2 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) ของชุดตรวจสอบ

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มเททระไซคลิน และนอกกลุ่มเททระไซคลินของชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA โดยสารในกลุ่มเททระไซคลินที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เททระไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl), คลอเททระไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl), โรลิเททระไซคลิน (RTC), ออกซีเททระไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl) และด็อกซีเททระไซคลิน (DC) ส่วนยาปฏิชีวนะนอกกลุ่มเททระไซคลินได้แก่ เพนิซิลลิน จี (penicllin G), ฟูราโซลิโดล (furasolidole) นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin) และคลอแรมฟินิคอล (chloramphinicol) รวมถึงเคลนบูเทรอล (clenbuterol) ที่เป็นสารเร่งเนื้อแดง

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดจาก 50% B/B_0 แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณดังนี้

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

3.4.11.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

นำตัวอย่างที่มีการเติมเททระไซคลิน ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ppb มาหาค่า % recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของเททระไซคลินที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเททระไซคลินจากกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณหาค่า % rRecovery จากสูตรดังนี้

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

3.4.11.4 การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ

หาได้จากการศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (inter-variation assay) ดังนี้

3.4.11.4.1 intra-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย standard deviation (SD) และ % coeffecient of variation (% CV) ของการวิเคราะห์ตัวอย่าง 9 ซ้ำจากชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured direct % CV ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

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

โดยที่ % CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

μ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี Ab- captured direct competitive ELISA

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

3.4.11.4.2 Inter-variation assay

ทำการหาค่าเฉลี่ย μ, ค่า standard deviation (SD) และ % coeffecient of variation (% CV) ของการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน 8 ครั้ง ที่เวลาต่างกันด้วยวิธี Ab-captured direct competitive ELISA แต่ทำการทดสอบโดยที่แต่ละครั้งทำ 9 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 72 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า μ, SD และ % CV

3.4.12 การวิเคราะห์เททระไซคลินในน้ำผึ้งที่มีจำหน่ายของไทย

ชั่งน้ำผึ้งปริมาณ 1 กรัม จาก 9 แหล่ง ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 9 หลอด มาเจือจางด้วย PBST ปริมาณ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของเททระไซคลินที่ได้กับสารละลายมาตรฐานเททระไซคลิน

3.4.13 การส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS- MS

โดยส่งตรวจตัวอย่างที่ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย จำกัด (Central lab) และบริษัทแอนาไลติคอล ลาบอราทอรีส์ เซอร์วิส จำกัด (ALS)