รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST SEMICARBAZIDE

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นายอณุมาศ บัวเขียว **หัวหน้าโครงการ**

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

ผศ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

ร.ศ.ดร.พลกฤษ์ แสงวณิช **ที่ปรึกษาโครงการ**

31 มีนาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2555

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) เป็นยาในกลุ่มสารไนโตรฟูแรนที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารในสัตว์เพื่อการบริโภค ได้แก่ โค ,สุกร ,ไก่ ,ปลา และกุ้ง ยานี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอไลต์ คือ เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM) ติดกับเนื้อเยื่อ อาจเป็นสารก่อมะเร็งและก่อให้เกิดกลายพันธุ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร SEM หรือ สารอนุพันธ์ NPSEM ซึ่งเป็นรูปสารสำหรับการตรวจหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยอนุพันธ์ CPSEM ที่เชื่อมต่อด้วย BSA (CPAOZ-BSA) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า CPSEM-BSA สามารถที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง เพราะสามารถผลิตไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดี ซึ่งมีความสามารถในการจับกับสาร NPSEM และ NFZ ในรูปอิสระได้ จากการคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อสาร NPSEM มีจำนวน 22 โคลน โดยเป็นโคลนจากเซลล์หลุมต้น 11/10G และ 12/1A ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้ ทุกโคลนสามารถจับกับ NFZ ซึ่งเป็นยาตั้งต้น และ NPSEM ในรูปอนุพันธ์ สำหรับใช้ตรวจหาสารตกค้าง โคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 11/10G จะสามารถจับกับ NPSEM ได้ดีกว่าโคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 12/1A และแอนติบอดีที่ได้เป็นชนิด IgG_3 ส่วนโคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 12/1A เป็นชนิด IgG_3 และ IgM จากโคลนที่ได้เหล่านี้จึงทำการคัดเลือกโคลน 3 โคลน จากเซลล์หลุมต้น 11/10G และ 12/1A โดยเลือกจากโคลนที่สามารถจับกับ NPSEM ได้ดี คือ มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ได้แก่ โคลนหมายเลข 8 และ 43 จากเซลล์หลุมต้น 11/10G ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.9 และ 13.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเลือกโคลนหมายเลข 25 จากเซลล์หลุมต้น 12/1A ซึ่งจับกับ NFZ ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 145.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ซึ่งโคลนทั้ง 3 หมายเลข มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.17 ,0.99 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบหาความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ต่อสาร NPSEEM และ NFZ อีกครั้ง ได้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่อสาร NPSEM ของโคลนหมายเลข 8 เท่ากับ 56.77 และ 2.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โคลนหมายเลข 25 เท่ากับ 134.90 และ 4.57 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และโคลนหมายเลข 43 เท่ากับ 23.75 และ 0.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า IC_{50} และค่า LOD ต่อสาร NFZ นั้น โคลนหมายเลข 8 มีค่าเท่ากับ 572.90 และ 8.11 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โคลนหมายเลข 25 มีค่าเท่ากับ 903.60 และ 15.52 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และโคลนหมายเลข 43 มีค่าเท่ากับ 142.10 และ 0.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อดูจากค่า IC_{50} และค่า LOD ของโคลนทั้ง 3 หมายเลข พบว่าทั้ง 3 โคลนมีความจำเพาะต่อสาร NPSEM มากกว่า NFZ โดยโคลนหมายเลข 43 มีความไวมากที่สุด

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Nitrofurazone (NFZ) is a nitrofuran drug which is widely used in prevention and treatment of animals such as cattle, swine, chicken, fish and shrimp, for consumption. When NFZ enters the body, it is metabolized to semicarbazide (SEM) which attached to the tissue and is considered to be a carcinogen and mutagen.

In this research, monoclonal antibody against SEM or its nitrophenyl derivative (NPSEM) which is the stabilized form for residue detection was produced. Immunization of mice was performed by using the carboxyphenyl derivative-bovine serum albumin conjugate (CPSEM-BSA) as the antigens. The results suggested that CPSEM-BSA could induce hybridoma clone which produce antibodies with binding ability to NPSEM, and NFZ. After screening, twenty-two hybridomas which produce antibody against NPSEM were selected from the originated well no. 11/10G and 12/1A. All antibodies could bind to NFZ and NPSEM. Clones from well no. 11/10G were better than those from well no. 12/1A in NPSEM-binding ability. After characterization, the isotype of antibody from well no. 11/10G and 12/1A was found to be IgG_3 and IgM, respectively. Three monoclones were selected based on their ability to bind with NPSEM as quantified in term of the 50% inhibition concentration value. Clone no. 8 and no. 43 were obtained from the originated well no. 11/10G while clone no. 25 was from the well no. 12/1A. Their IC_{50} values were 13.9, 13.1 and 145.2 nanogram per millilitre, respectively. Proteins were purified by affinity chromatography yielding protein content at 1.17, 0.99 and 1.20 mg/ml, respectively. Subsequently, the specificities of antibody from clone no. 8, 25 and 43 to NPSEM and NFZ were reanalyzed. The IC_{50} and LOD for NPSEM of clone no. 8 were 56.77 and 2.96 ng/ml while those of clone no. 25 were 134.90 and 4.57 ng/ml and those of clone no. 43 were 23.75 and 0.50 ng/ml. The IC_{50} and LOD for NFZ of clone no. 8 were found to be 572.90 and 8.11 ng/ml while those of clone no.25 were 903.60 and 15.52 ng/ml and those of clone no.43 were 142.10 and 0.83 ng/ml. From these IC_{50} and LOD values, it was found that antibodies of all three clones are were more specific to NPSEM than to NFZ and clone no.43 was the most sensitive clone.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฎ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2. วิธีดำเนินการวิจัย	6
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ในการวิจัย	6
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	6
2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	7

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง(CPSEM-BSA) และแอนติเจนสำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPSEM-OVA) 11

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร SEM เป็น CPSEM 11

2.2.2 การเชื่อมต่อ CPSEM กับ BSA และ CPSEM กับ OVA 12

2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร SEM และ NPSEM 12

2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง 12

2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA 12

2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ SEM และ NPSEM ในซีรัม โดยวิธี Indirect competitive ELISA 13

2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร SEM และ NPSEM 13

2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization) 13

2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์ 13

2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ SEM และ NPSEM โดยวิธี indirect ELISA 14

2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution 14

2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 15

2.5.1 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA 15

2.5.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA 15

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2.5.3 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 15

2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ 16

2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ 16

2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A หรือ protein G affinity chromatography 16

2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ SEM และ NPSEM ในรูปอิสระ 17

3. ผลการวิจัย 18

3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPSEM-BSA) และแอนติเจน สำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPSEM-OVA) 18

3.1.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร SEM ให้เป็น CPSEM 18

3.1.2 การเชื่อมต่อ CPSEM กับ BSA และ CPSEM กับ OVA 19

3.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดี 20

3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM 24

3.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 26

3.4.1 การหาความเข้มข้นแอนติบอดีที่เหมาะสมโดยวิธี indirect ELISA 28

3.4.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA 31

3.4.3 การทดสอบ ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA 36

3.4.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 40

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography 42

3.4.6 การหาปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography 44

3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography 47

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 50

บรรณานุกรม 51

ภาคผนวก 53

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย 54

สารบัญตาราง (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1 ค่าเปอร์เซนต์การเชื่อมติดระหว่าง CPSEM กับ BSA และ OVA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 20

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบระดับแอนติบอดี ในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA 21

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบความสามารถ ของแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA 23

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} จากการทดสอบความไวในการจับกับสาร SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระ 24

ตารางที่ 5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA 25

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบแอนติบอดีในอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเก็บแช่แข็งเซลล์ โดยวิธี indirect ELISA 27

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการหาความเข้มข้นของแอนติบอดี ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยวิธี indirect ELISA 29

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน 32

ตารางที่ 9 แสดงค่า IC_{50} และเปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อสาร NPSEM และ NFZ 39

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA 40

ตารางที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบโคลน หมายเลข 8 ,25 และ 43 โดยวิธี indirect ELISA 43

ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 45

ตารางที่ 13 แสดงค่าปริมาณโปรตีนของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ที่ได้จากวิธี BCA 46

ตารางที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบโคลน หมายเลข 8 ,25 และ 43 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA 47

ตารางที่ 15 แสดงค่า IC_{50} และค่า LOD จากการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM 49

สารบัญภาพ (List of Illustration)

หน้า

รูปที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPSEM เมื่อดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน 19

รูปที่ 2 กราฟแสดงระดับแอนติบอดีของหนูทดลอง 3 ตัว ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CPSEM-BSA โดยวิธี Indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย CPSEM-OVA 22

รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NFZ 37

รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NFZ (ต่อ) 37

รูปที่ 5 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPSEM 38

รูปที่ 6 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPSEM (ต่อ) 38

รูปที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 8 43

รูปที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 25 44

รูปที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 43 44

รูปที่ 10 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA 45

รูปที่ 11 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM 48

รูปที่ 12 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 25 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM 48

รูปที่ 13 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 43 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM 49

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

AOZ	3-amino-2-oxazolidinone
NFZ	Nitrofurazone
NFT	Nitrofurantoin
FZD	Furazolidone
FTD	Furaltadone
SEM	Semicarbazide
AHD	1-Aminohydantoin
AMOZ	3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
MRPL	minimum required performance limit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectometry/ Mass Spectometry
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
CPSEM	3-{[(3-carboxyphenyl)methylene]-hydrazinecarboxamide
NPSEM	2-nitrobenzaldehyde semicarbazone
NBA	2-Nitrobenzoic aldehyde
CBA	3-Carboxybenzaldehyde
TLC	Thin Layer Chromatography
BCA	Bicinchoninic acid assay
TNBS	Trinitrobenzene sulphonic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
FCA	Freund's complete adjuvant
FICA	Freund's incomplete adjuvant
DMF	Dimethyl Sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide
OVA	Ovalbumin
CO_2	Carbondioxide
FCS	Fetal calf serum
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

HT	Hypoxanthine และ Thymidine
HRP	Horseradish peroxidase
IC_{50}	inhibitory concentration 50%
LOD	limit of detection
MW	Molecular weight
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	phosphate buffer saline with tween20
PEG	polyethylene glycol
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
H_2O_2	Hydrogenperoxide
H_2SO_4	Sulfuric acid
ppb	part per billion
ppm	part per million

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไนโตรฟูแรนเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ เมื่อไนโตรฟูแรนได้แก่ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน และ ฟูรัลทาโดน เข้าสู่ร่างกายของสัตว์จะถูกเมทาบอไลท์เป็นเซมิคาร์บาไซด์ (SEM) ,1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (AHD) ,3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (AMOZ) ตามลำดับ สารดังกล่าวจัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ที่บริโภคอาหารที่มีการตกค้างของสารดังกล่าว ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและของประเทศไทยและสหภาพ ยุโรป จึงออกประกาศห้ามมิให้มีการตกค้างของสารเหล่านี้ ในปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญและความสนใจอย่างมาก ในด้านความปลอดภัยของอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตกค้างของสารหรือยาที่เกิดจากการใช้ที่ไม่ถูกวิธีหรือผิดวัตถุประสงค์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคและสัตว์ที่ได้รับสารนั้น ดังนั้นหน่วยงานที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารในประเทศต่างๆ จึงได้ออกข้อกำหนดห้ามใช้สารต่างๆ ปริมาณสูงสุดของสารต่างๆ ที่สามารถตกค้างได้ (maximum residual limit, MRL)ในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค ทำให้การส่งออกหรือนำเข้าผลิตภัณฑ์ต้องมีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างต่างๆ ด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คือวิธีทางเคมี ได้แก่ LC-MS/MS ถึงแม้ว่าวิธีดังกล่าวจะให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ แต่เป็นวิธีที่จะต้องผ่านขั้นตอนที่ซับซ้อนและจำเป็นจะต้องมีเครื่องมือราคาแพงในการวิเคราะห์ผล ดังนั้นวิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เช่น Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จึงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีจุดเด่นในเรื่องของความจำเพาะ ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ และสามารถตรวจตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยผู้นำในการพัฒนาและจำหน่ายชุดตรวจสอบเหล่านี้จะอยู่ในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นผู้ออกข้อกำหนดที่ส่งผลให้ผู้ส่งออกของไทยต้องใช้ชุดตรวจสอบจากกลุ่มประเทศเหล่านั้น ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถที่จะพัฒนาและผลิตชุดตรวจสอบที่มีมาตรฐานเทียบเท่ากับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบัน จะเป็นการลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และอาจลดผลกระทบของข้อกำหนดของปริมาณสารสูงสุดของสารตกค้างเนื่องจากผู้ส่งออกมีทางเลือกใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ไม่ต้องพึ่งแต่ชุดตรวจกลุ่มประเทศเหล่านั้น นอกจากนี้จะทำให้สามารถตรวจสารตกค้างในตัวอย่างอาหารสำหรับบริโภคในประเทศได้ครอบคลุมมากขึ้น ไม่จำเป็นต้องสุ่มตัวอย่างจำนวนน้อยจากสินค้าจำนวนมาก ทำให้การเฝ้าระวังสินค้าอาหารปลอดภัยสำหรับประชากรของประเทศไทยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งประเทศไทยต้องใช้เงินจำนวนมากในการนำเข้าชุดตรวจสอบสารเมแทบอไลท์ของไนโตรฟูแรนจากต่างประเทศมาเพื่อใช้ภายในประเทศ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาชุดตรวจสอบสารเซมิคาร์บาไซด์ ด้วยวิธี ELISA เพื่อทดแทนการนำเข้า และเป็นทางเลือกในการตรวจตัวอย่างจำนวนมากก่อนการตรวจยืนยันด้วยวิธีทางเคมี

1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ SEM

- ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

- เปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร SEM ให้อยู่ในรูป 3-{[(3-carboxyphenyl) methylene]- hydrazinecarboxamide (CPSEM) และเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

- ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ สาร SEM และ NPSEM

- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

- คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ SEM และ NPSEM โดยวิธี ELISA

- ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

- การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ SEM โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich ,USA)

- การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และสารนอกกลุ่มด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

- การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง ทำรายงานฉบับสมบูรณ์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

ไนโตรฟูแรนมีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ ประกอบด้วยสาร 4 กลุ่มคือ ฟูราโซลิโดน (furazolidone, N-[5-nitro-2-furfurylidene]-3-amino-2-oxazolidone ,FZD) ฟูรัลทาโดน (furaltadone, 5-morpholinomethyl-3-[5-nitrofurfurylideneamino]-2-oxazolidinone ,FTD) ไนโตรฟูแรนโทอิน (nitrofurantoin, N-[5-nitro-2-furfurylidene]-1-aminohydantoin ,NFT) และ ไนโตรฟูรา

โซน (nitrofurazone, 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone ,NFZ) สารกลุ่มนี้ใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ Escherichia coli และ Salmonella spp. อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นสารในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น โค หมู เป็ด และไก่ เป็นต้น แต่เนื่องจาก NFZ ,NFT ,FZD และ FTD มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายจะถูกเมแทบอไลต์เปลี่ยนเป็น เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide, SEM) 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1- aminohydantoin, AHD) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (3- amino -2- oxazolidinone ,AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (3- amino -5-morpholinomethyl -2- oxazolidinone ,AMOZ) ตามลำดับ (Kumar et al. ,1994) ดังนั้นในการตรวจสารตกค้างจึงเป็นการตรวจหาสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ดังกล่าว สารในกลุ่มไนโตรฟูแรนนี้จัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะถูกเมแทบอไลต์เร็วมากหลังจากการใช้ ภายใน 2-3 ชั่วโมง ก็ไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ในทางตรงกันข้ามสารเมแทบอไลต์จะอยู่ในรูปที่ติดอยู่ที่เนื้อเยื่อ ซึ่งจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ (Hoogenboom et al. ,1991 ;Hoogenboom et al. ,1992 ;Gottschall et al.,1995) ในการใช้ยาและสารเหล่านี้จะใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆของร่างกายสัตว์ เช่น ในนม เนื้อ หรือ ไข่ เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Bryan G.T. ,1978) จากอันตรายของสารในกลุ่มนี้ทำให้เกิดความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้ ดังนั้นบางประเทศจึงห้ามไม่ให้ใช้ยากลุ่มนี้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อใช้สำหรับการบริโภค เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป, สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา โดยทางกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปได้กำหนดนโยบายไม่ให้มีการตรวจพบการตกค้าง (zero tolerance) ของสารดังกล่าว และได้กำหนดเกณฑ์สำหรับการตรวจวัดในรูปของค่า Minimum Required Performance Limits (MRPLs) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้เพิกถอนทะเบียนตำหรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ที่มีตัวยากลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน และฟูราโซลิโดน นอกจากนี้ยังห้ามนำเข้ายา เภสัชเคมีภัณฑ์ และเกลือของเภสัชเคมีภัณฑ์เหล่านี้ และมีข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สาร สารเมแทบอไลต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหารโดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ที่ระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOZ และ AMOZ และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ,2551) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบนำสารเหล่านี้เข้าภายในประเทศได้ในรูปของอาหารสัตว์ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้าเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อน แต่การวัดปริมาณยาตกค้างดังกล่าวสามารถทำได้ในขีดจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีราคาแพงมาก ดังนั้น ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับตรวจวัดสารตกค้างโดยอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อทางเคมีกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว

ดังนั้นเพื่อให้ต้นทุนในการตรวจสารดังกล่าวลดต่ำลง และเอื้อให้ผู้ส่งออกหรือหน่วยงานต่างๆ สามารถเข้าถึงการตรวจตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น จึงควรมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ SEM เพื่อใช้พัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบหาสารตกค้างดังกล่าวขึ้นเองภายในประเทศ และการพัฒนานี้ยังสามารถใช้เป็นแม่แบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารอื่นๆ ด้วยวิธี ELISA ต่อไปได้ในอนาคต จากการพิจารณาศักยภาพของพื้นฐานความรู้ อุปกรณ์ บุคลากรและความร่วมมือจากภายนอกที่จำเป็นในการพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธี ELISA นั้น ทางคณะผู้วิจัยมีความพร้อมและสามารถที่จะทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้ ดังนั้นทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้สนใจทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ SEM เพื่อใช้พัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออกต่อไปได้

1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ในการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของ SEM นี้สามารถตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางเคมีได้หลายวิธี เช่น high-performance liquid chromatography (HPLC)(Hoogenboom et al. ,1991) liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (McCracken et al. ,1997) และ LC-MS/MS (Leitener et al. ,2001) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเมแทบอไลต์ของไนโตรฟูแรน ในระดับความเข้มข้นหนึ่งส่วนในพันล้านส่วนในเนื้อเยื่อ แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำสูง แต่เป็นวิธีที่จำเป็นต้องใช้บุคคลากรที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างมีราคาสูง อีกทั้งในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวิเคราะห์เท่านั้น จึงเป็นเหตุให้มีการศึกษาการตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว ด้วยความถูกต้องแม่นยำ และมีต้นทุนการตรวจที่ต่ำกว่า สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องอ่านผล ELISA และในภาคสนามเมื่อมีการพัฒนาชุดตรวจสอบในรูปแบบของแถบ จากการศึกษาการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ของสาร SEM โดยการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ SEM ด้วย 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ได้เป็น 3-{[(3-carboxyphenyl) methylene]-hydrazinecarboxamide (CPSEM) แล้วทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ bovine thyroglobulin ซึ่งถูกนำไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถเตรียมพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ NPSEM โดยสามารถตรวจพบ NPSEM ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมได้ ซึ่งเมื่อคำนวณความไวในการวัดในรูปของค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 0.86 ไมโครกรัมต่อลิตร และไม่เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารเมแทบอไลต์ของไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในสัตว์อื่นๆ (Cooper et al. ,2007)

ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ด้วยหลักการ ELISA สำหรับตรวจ SEM ในรูปของ NPSEM ออกมาจำหน่ายโดยมีชื่อทางการค้าว่า SEM ELISA TEST KITS ผลิตโดยบริษัท Shenzhen Lvsiyuan Biotechnology (China) ซึ่งสามารถตรวจติดตาม SEM ในเนื้อกุ้ง ไก่ ปลา นม น้ำผึ้ง แล่ไข่ไก่ โดยสกัดสารตกค้างออกจากเนื้อสัตว์ด้วยกรด

ไฮโดรคอริก และเปลี่ยนอนุพันธุ์สาร SEM ด้วย 2-Nitrobenzoic aldehyde (NBA) โดยพบว่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อยู่ที่ 0.1 ppb และให้ค่าเปอร์เซนต์ของปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนกับสาร AOZ AHD และ SEM เป็น 0.1 เปอร์เซนต์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสาร SEM หรือ NPSEM

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ในการวิจัย

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

หนูขาว (swiss mice) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
เซลล์มัยอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI)	ATCC No: TIB 18
กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
ขวดแก้ว	Boro (Germany)
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
เข็มฉีดยาขนาด 18G, 21Gและ 22G	Nipro (Thailand)
หลอดฉีดยาขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร	Nipro (Thailand)
เครื่องชั่งน้ำหนัก AG204	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องชั่งน้ำหนัก PG4002-5	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับเลี้ยงเซลล์	Nunc (Denmark)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA	Nunc (Denmark)
จานชนิด 24 หลุม	Nunc (Denmark)

ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตอัตโนมัต	Gilson (France)
ไมโครปิเปต	Biohit (Finland)
ปั๊มสูญญากาศ	Iwaki (Japan)
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige (Thaialnd)
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1-aminohydantoin (AHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-(2-Nitrobenzylidenamino)-2, 4-imidazolidinedione (NPAHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride (EDC)	Sigma-Aldrich	USA
2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)	Pierce	USA
2-Nitrobenzaldehyde semicarbazone(NPSEM)	Sigma-Aldrich	USA

3-{[(2-nitrophenyl)methylene] amino}-2-oxazolidinone) (NPAOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-carboxybezaldehyde (CBA)	Sigma-Aldrich	USA
5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidenamino)-2-oxazolidinone (NPAMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
5-morpholinomethyl-3-amino-oxazolidinone (AMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich	USA
Aminopterine	Sigma-Aldrich	USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	USA
Butanol	Merck	Germany
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	USA
Citric monohydrate	Merck	Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich	USA
Copper sulfate	Fluka	Switzerland
D-glucose	Sigma-Aldrich	USA
Diethyl ether	Sigma-Aldrich	USA
Dimethyl sulfoxide	Fluka	Switzerland

Disodium carbonate	Fluka	Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich	USA
Fetal bovine serum	Invitromex	USA
Folin-Ciocalteu Phenol reagent	Sigma-Aldrich	USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich	USA
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	USA
Hydrogen peroxide	Fluka	Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich	USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich	USA
Methanol	BDH	England
N-hydroxysuccimide ester (NHS)	Fluka	Switzerland
Non-fat dry milk	Mission health food	Thailand
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich	USA
Ovalbumin (OVA)	Ovalbumin (OVA)	USA
Oxytetracycline	Fluka	Switzerland
Penicllin G	Sigma-Aldrich	USA
Peroxidase Goat anti-mouse IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	USA

Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	Zymed	USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich	USA
Potasium chloride	Sigma-Aldrich	USA
Potasium dihydrogen phosphate	Sigma-Aldrich	USA
Pyridine	Carlo Erba	USA
Pyruvic acid	Invitromex	USA
RPMI 1640 medium	Invitromex	USA
Salbutamol	Sigma-Aldrich	USA
Semicarbazide (SEM)	Sigma-Aldrich	USA
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	USA
Sodium cabonate	Merck	Germany
Sodium chloride	Merck	Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Sodium dodecyl sulphate	Merck	Germany
Sodium hydrogen carbonate	Merck	Germany
Sodium hydroxide	Merck	Germany
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich	USA

Sulfamethazine	Sigma-Aldrich	USA
Sulfuric acid	Merck	Germany
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	USA
Trisodium citrate	Fluka	Switzerland
Tween 20	Sigma-Aldrich	USA

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง(CPSEM-BSA) และแอนติเจนสำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPSEM-OVA)

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร SEM เป็น CPSEM

นำ เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide; SEM) มาทำปฏิกิริยากับ 3-คาร์บอกซิเบนแซลดีไฮด์ (3-carboxybenzaldehyde; CBA) โดยวิธีการกลั่นไหลกลับในไพริดีนปราศจากน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 3-{[(3-carboxyphenyl) methylene]-hydrazinecarboxamide (CPSEM) โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ใช้ 10 เปอร์เซนต์ เมธานอล ใน คลอโรฟอร์ม เป็นโมบายเฟส ทำให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้วิธี TLC ดูแถบของสาร CPSEM ด้วยแสงยูวี และดูแถบของสาร SEM โดยย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน

2.2.2 การเชื่อมต่อ CPSEM กับ BSA และ CPSEM กับ OVA

ทำการเชื่อมสาร CPSEM กับ BSA ได้เป็น CPSEM-BSA ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง และทำการเชื่อมสาร CPSEM กับ OVA ได้เป็น CPSEM-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยนำสาร CPSEM ละลายใน DMF เติม EDC หลังจากนั้นค่อยๆเติม BSA หรือ OVA ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ BCA Protein Assay Kit และหาเปอร์เซนต์ของการเชื่อมติดสาร CPSEM-BSA และ CPSEM-OVA ด้วยวิธี TNBS

2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร SEM และ NPSEM

2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.2 (CPSEM-BSA) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 4-6 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FICA) จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบดูระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูทดลองหนึ่งตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วันถัดไป

2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน CPSEM-OVA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS พีเอช 7.4 ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (ซีรัมหนู หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase เชื่อมติดอยู่ (GAM-HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer ,พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำจานทดสอบชนิด 96 หลุม ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ SEM และ NPSEM ในซีรัม โดยวิธี Indirect competitive ELISA

นำซีรัมหนูมาทดสอบดูว่าหนูมีแอนติบอดีต่อสาร NPSEM หรือไม่ ถ้าหนูมีแอนติบอดีต่อ SEM และ NPSEM แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมจะจับกับ SEM และ NPSEM ที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับซีรัมที่ไม่

มี SEM และ NPSEM โดยเตรียมสาร SEM NPSEM และ BSA ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับซีรัมหนูที่เจือจางใน PBS โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA

2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร SEM และ NPSEM

2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)

โดยนำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน CPSEM-BSA และสร้างแอนติบอดีที่ต้องการ และเซลล์มัยอีโลมา ในอัตราส่วน 1:2 โดยที่เซลล์ทั้งสองจะถูกนำมาเลี้ยงให้อยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัว มารวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 แล้วค่อยๆ หยด 50 เปอร์เซนต์ พอลิเอทิลีนไกลคอล (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุนหลอดช้าๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 เปอร์เซนต์ FCS เพื่อล้าง 50 เปอร์เซนต์ PEG ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซนต์ FCS ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5 เปอร์เซนต์ CO_2

2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซนต์ FCS ทุก 3-4 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 6-7 วัน สังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วจะต้องเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะให้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซนต์ FCS ประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20 เปอร์เซนต์ FCS โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ถ้ามีสีเหลืองให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

นำแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาซึ่งให้ผลบวก โดยวิธี indirect ELISA (ตามข้อ 2.3.2) มาทดสอบการจับกับ NPSEM ในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการเคลือบจานทดสอบ 96 หลุม ด้วยแอนติเจน CPSEM-OVA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างจานทดสอบ จำนวน 3 ครั้ง ด้วย PBS ที่เติม tween 20 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซนต์ เติม

สารละลาย NPSEM ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับหลุมที่เติม PBS และอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างจานทดสอบ จากนั้นเติม goat anti mouse igG-HRP ที่การเจือจาง 1:10,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจานหลุมทดสอบ เติมสารละลายสับเสตรท TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ CPSEM ในรูปอิสระ โดยหลุมที่เติม CPSEM จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่เติม PBS จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ย้ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 24 หลุม และทำการแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว โดยวิธี limiting dilution ในจานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เมื่อเซลล์มีการเจริญและผลิตแอนติบอดี ทำการทดสอบซ้ำว่าเซลล์ไฮบริโดมายังคงผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM และเก็บเซลล์ที่เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากที่คัดเลือกจนได้เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ต้องการแล้วเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ละเซลล์มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียว ซึ่งวิธี limiting dilution ทำได้โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20 เปอร์เซนต์ FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) จะได้เซลล์ไฮบริโดมาปริมาณ 8 เซลล์ 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5 เปอร์เซนต์ ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเซลล์เพียงเซลล์เดียว

2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

2.5.1 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมาก เมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA จะทำให้มีสัญญาณรบกวนส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ และยังเป็นการสิ้นเปลืองแอนติเจน

และแอนติบอดีด้วย จึงต้องหาความเข้มข้นและความเจือจางที่เหมาะสมทั้งของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ประมาณ 1.0 เพื่อนำความเข้มข้นและความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป ซึ่งจะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน CPSEM-OVA ความเข้มข้นต่างๆ และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA

2.5.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเมแทบอไลต์ SEM ,NPSEM และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนเพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะและความไวต่อสาร SEM ,NPSEM ปริมาณเท่าได และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารดังกล่าว ก็จะทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าวที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้นำสารดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา ทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA โดยจะคิดเป็นค่า inhibition concentration (IC_{50}) และ limit of detection (LOD) ซึ่งค่า IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสารแข่งขัน และค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

2.5.3 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จะทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยนำ Isotyping specific antibody ชนิด IgG_1 ,IgG_{2a} ,IgG_{2b} ,IgG_3 ,IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS นำไปเติมในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (พีเอช 7.4) ที่มี 0.05 เปอร์เซนต์ Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างส่วนที่ไม่จับออก เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ F_{ab} (HRP-Rabbit anti-mouse IgG [F_{ab} specific]) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ SEM และ NPSEM มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A หรือ protein G affinity chromatography

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ SEM และ NPSEM โดยจะใช้ protein A หรือ protein G sepharose ขึ้นอยู่กับไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่ได้ โดยนำโปรตีน A หรือ G sepharose แช่ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 โมลาร์ citrate buffer, พีเอช 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ พีเอช สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 โมลาร์ Tris buffer ,พีเอช 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer ,พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ SEM และ NPSEM ในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับ SEM และ NPSEM ในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบ

คือ เคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม ด้วย CPSEM ที่เชื่อมต่อกับ OVA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลาย BSA 1 เปอร์เซนต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม SEM และ NPSEM ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer ,พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3. ผลการวิจัย (Results)

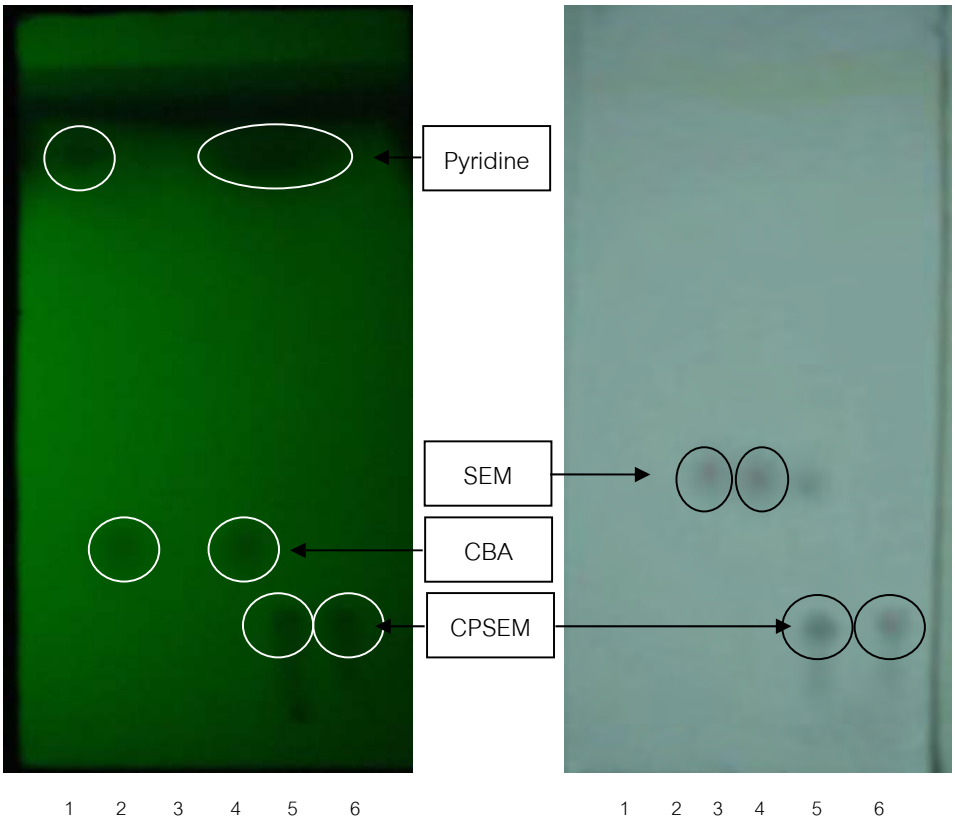
3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPSEM-BSA) และแอนติเจนสำหรับเคลือบจาน 96 หลุม (CPSEM-OVA)

เนื่องจากสาร SEM ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ของไนโตรฟูราโซน โมเลกุลของสารมีขนาดเล็ก ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีได้ และไม่สามารถเคลือบหลุมในการทดสอบ ELISA ได้อีกด้วย จึงต้องทำการเชื่อมติดสารเข้ากับโปรตีนพาหะ BSA หรือ OVA แต่เนื่องจากโครงสร้างของ SEM มีโครงสร้างไม่พร้อมจับกับโปรตีน จึงต้องเปลี่ยน SEM ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ CPSEM แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับโปรตีน BSA หรือ OVA

3.1.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ของสาร SEM ให้เป็น CPSEM

จากการนำสาร SEM และสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยามาทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ผลปรากฏดังแสดงในรูปที่ 1 จากการดูโครมาโทแกรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า เห็นแถบของสาร Pyridine ในช่องที่ 1 ซึ่งเป็นสารตัวกลางช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา ,ช่องที่ 2 เป็นแถบของ CBA ,ช่องที่ 4 เป็นแถบของสารผสมก่อน derivertization ,ช่องที่ 5 และ 6 เป็นแถบของสาร CPSEM หลังทำปฏิกิริยา ส่วนสาร SEM ในช่องที่ 3 นั้นไม่สามารถมองเห็นได้ ดังนั้นจึงต้องย้อมแผ่น TLC ด้วยสารละลายนินไฮดริน ปรากฏแถบของ SEM ในช่องที่ 3 ,4 และ 5 เป็น SEM ที่เหลือบางส่วน ส่วนช่องที่ 5 และ 6 เป็นแถบของ CPSEM

ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPSEM เมื่อดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน

ช่องที่ 1 = pyridine

ช่องที่ 2 = CBA

ช่องที่ 3 = SEM

ช่องที่ 4 = ตัวอย่างก่อนรีฟลักซ์

ช่องที่ 5 = ตัวอย่างหลังรีฟลักซ์

ช่องที่ 6 = ตัวอย่างหลังรีฟลักซ์และทำให้แห้ง

3.1.2 การเชื่อมต่อ CPSEM กับ BSA และ CPSEM กับ OVA

จากการเชื่อมต่อ CPSEM กับ BSA และ CPSEM กับ OVA ด้วยสาร EDC หลังจากทำปฏิกิริยา นำ CPSEM-BSA และ CPSEM-OVA มาตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA เทียบกับโปรตีน BSA มาตรฐาน พบว่า CPSEM-BSA และ CPSEM-OVA ที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.63 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นตรวจหาเปอร์เซนต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีน โดยวิธี TNBS ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า เมื่อตรวจวัด BSA และ OVA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.878 และ 0.585 ตามลำดับ สำหรับ CPSEM-BSA และ CPSEM-OVA มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.674 และ 0.543 ตามลำดับ และเมื่อทำการคำนวณตามสูตร [(ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน – ค่าการดูดกลืนแสงของสารติดกับโปรตีน) / ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน] X 100 ซึ่งสามารถคิดเป็นค่าเปอร์เซนต์การเชื่อมติดเป็น 23.23 และ 7.18 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่าเปอร์เซนต์การเชื่อมติดระหว่าง CPSEM กับ BSA และ OVA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สาร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร	เปอร์เซนต์การเชื่อมติด
BSA	0.878	-
OVA	0.585	-
CPSEM-BSA	0.674	23.23
CPSEM-OVA	0.543	7.18

3.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดี

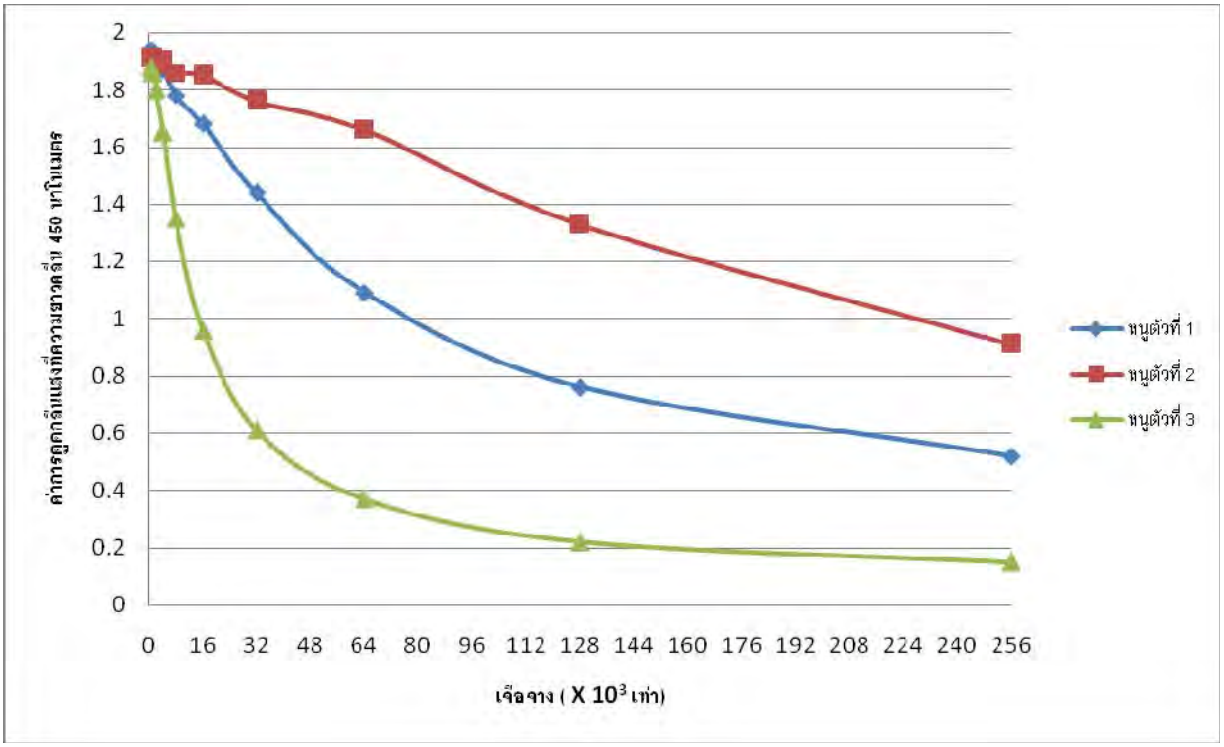
ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วย CPSEM-BSA ปริมาณสาร 50 ไมโครกรัมต่อครั้ง โดยครั้งแรกผสมแอนติเจนกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 4 – 6 ครั้ง โดยผสมแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (FICA) หลังฉีดกระตุ้น 7 -10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูแยกซีรัมมาทดสอบระดับแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย CPSEM-OVA และเจือจางซีรัมหนูด้วย 1 เปอร์เซนต์ BSA/PBS โดยเจือจางที่ความเข้มข้น 1:500 ถึง 1:256,000 เท่า จากการฉีดกระตุ้นหนูจำนวน 3 ตัว และทดสอบหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมหนู ได้ผลดังตารางที่ 2 ซีรัมหนูทั้ง 3 ตัวที่เจือจางด้วย 1 เปอร์เซนต์ BSA/PBS ไม่ทำปฏิกิริยากับหลุมที่เคลือบด้วย BSA และ OVA แต่จะทำปฏิกิริยากับหลุมที่เคลือบด้วย CPSEM-

OVA ในระดับสูง ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สูงสุดในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1.9 หนูตัวที่ 1 และ 2 ให้ระดับแอนติบอดีสูงกว่า 1:256,000 สำหรับหนูตัวที่ 3 ให้ระดับไตเตอร์ อยู่ที่ 1:128,000 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2 หนูทั้ง 3 ตัว มีระดับแอนติบอดีที่สูง

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบระดับแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA

เจือจางซีรัมหนู (X 10^3 เท่า)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร**											
	CPSEM-OVA (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				BSA (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				OVA (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	หนู 1	**หนู 2**	**หนู 3**	NMS	**หนู 1**	**หนู 2**	**หนู 3**	NMS	**หนู 1**	**หนู 2**	**หนู 3**	NMS
0.5	1.94	1.91	1.88	0.17	0.38	0.27	0.24	0.16	0.35	0.38	0.29	0.22
1	1.91	1.91	1.86	0.13	0.23	0.20	0.16	0.12	0.25	0.30	0.21	0.17
2	1.89	1.89	1.80	0.10	0.16	0.14	0.12	0.10	0.18	0.20	0.15	0.13
4	1.87	1.90	1.65	0.09	0.12	0.11	0.10	0.08	0.15	0.14	0.12	0.10
8	1.78	1.86	1.35	0.09	0.11	0.08	0.08	0.08	0.12	0.12	0.12	0.11
16	1.68	1.85	0.96	0.09	0.09	0.07	0.07	0.09	0.13	0.11	0.10	0.10
32	1.44	1.76	0.61	0.08	0.09	0.07	0.07	0.09	0.14	0.11	0.10	0.10
64	1.09	1.66	0.37	0.08	0.09	0.06	0.07	0.09	0.13	0.09	0.10	0.10
128	0.76	1.33	0.22	0.07	0.10	0.07	0.08	0.10	0.13	0.09	0.09	0.10
256	0.52	0.91	0.15	0.09	0.11	0.08	0.08	0.09	0.15	0.10	0.09	0.12
1%BSA	0.17	0.10	0.10	0.09	0.14	0.12	0.12	0.10	0.17	0.14	0.13	0.10
PBS	0.08	0.07	0.07	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07	0.10	0.09	0.10	0.08

NMS = **ซีรัมหนูปกติ**



รูปที่ 2 กราฟแสดงระดับแอนติบอดีของหนูทดลอง 3 ตัว ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CPSEM-BSA โดยวิธี indirect ELISA เคลือบหลุมด้วย CPSEM-OVA

จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย CPSEM-OVA เจือจางซีรัมหนูตัวที่ 1 ,2 และ 3 ด้วย 1 เปอร์เซนต์ BSA/PBS ที่ความเข้มข้น 1:32,000 ,1:64,000 และ 1:4,000 เท่า ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับ SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3 แอนติบอดีในซีรัมหนูทั้ง 3 ตัว สามารถจับกับ NPSEM ได้ มีค่า IC50 เท่ากับ 1.5 ,5.7 และ 20.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถจับกับ SEM และ CPSEM ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ประมาณ 30 – 50 เปอร์เซนต์ ค่า IC_{50} มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4 แอนติบอดีในซีรัมหนูทั้ง 3 ตัว สามารถจับกับ NPSEM ได้ดีกว่า SEM และ CPSEM

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบความสามารถของแอนติบอดี ในซีรัมหนูในการจับกับ SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร								
	ตัวที่ 1			ตัวที่ 2			ตัวที่ 3		
	SEM	CPSEM	NPSEM	SEM	CPSEM	NPSEM	SEM	CPSEM	NPSEM
0	1.48	1.49	1.49	1.40	1.39	1.47	1.18	1.44	1.38
0.003	1.48	1.50	1.48	1.43	1.42	1.37	1.47	1.43	1.44
0.006	1.44	1.48	1.47	1.41	1.42	1.46	0.99	1.51	1.48
0.012	1.44	1.46	1.43	1.43	1.44	1.46	1.40	1.51	1.49
0.024	1.45	1.44	1.32	1.42	1.41	1.42	1.41	1.49	1.46
0.049	1.43	1.47	1.29	1.34	1.44	1.38	1.41	1.35	1.41
0.098	1.44	1.45	1.23	1.38	1.42	1.35	1.42	1.44	1.35
0.196	1.45	1.36	1.16	1.36	1.46	1.29	1.37	1.44	1.31
0.391	1.44	1.48	1.04	1.41	1.46	1.24	1.45	1.46	1.29
0.781	1.49	1.47	0.87	1.38	1.36	1.10	1.44	1.46	1.29
1.563	1.49	1.46	0.61	1.36	1.40	1.06	1.40	1.43	1.25
3.125	1.44	1.45	0.43	1.35	1.39	0.89	1.33	1.34	1.13
6.25	1.37	1.39	0.25	1.23	1.26	0.62	1.30	1.32	0.96
12.5	1.34	1.32	0.16	1.14	1.23	0.40	1.12	1.20	0.73
25	1.26	1.20	0.13	1.07	1.03	0.25	0.92	0.94	0.49
50	1.03	1.03	0.11	0.84	0.92	0.16	0.65	0.69	0.32

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} จากการทดสอบความไวในการจับกับสาร SEM ,CPSEM และ NPSEM ในรูปอิสระ

ซีรัมหนูตัวที่	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	SEM	CPSEM	NPSEM
1	> 50	> 50	1.5
2	> 50	> 50	5.7
3	> 50	> 50	20.6

3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM

จากการหลอมรวมเซลล์ Myeloma NSI กับ B-Cell จากม้ามหนู ทั้ง 3 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมามากกว่า 90 เปอร์เซนต์ แต่ในการหลอมรวมเซลล์หนูตัวที่ 1 เมื่อทำการคัดเลือก ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี 4 หลุม แต่ไม่จับกับ NPSEM สำหรับการหลอมรวมเซลล์หนูตัวที่ 2 และหนูตัวที่ 3 ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA จากการทดสอบเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมด 2,304 หลุม ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี จำนวน 480 หลุม และเมื่อนำไปทดสอบหาเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่จับกับ NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้เซลล์ไฮบริมาที่ผลิตแอนติบอดีจับกับ NPSEM ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 61 หลุม ดังตารางที่ 5 และเซลล์ยังคงผลิตแอนติบอดีแต่ไม่จับกับสาร NPSEM จำนวน 16 หลุม ส่วนเซลล์อีก 403 หลุม ไม่ผลิตแอนติบอดี นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM ทั้ง 61 หลุมไปทำให้เป็นโคลนเดี่ยว

ตารางที่ 5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร NPSEM ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

หลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		หลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		หลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		หลุม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	
	PBS	NPSEM		PBS	NPSEM		PBS	NPSEM		PBS	NPSEM
4/5A	0.61	0.13	11/10G	1.23	0.15	12/1A	0.89	0.12			
1/4A	0.82	0.12	1/6H	0.64	0.16	1/10B	0.76	0.16	2/8F	0.79	0.11
2/11B	0.93	0.23	2/11F	0.51	0.07	3/3A	0.73	0.13	3/3F	0.53	0.08
3/5A	0.53	0.07	3/9H	0.53	0.08	4/3A	0.88	0.21	4/10B	0.60	0.09
7/1A	0.78	0.12	7/2A	0.71	0.10	7/2B	0.66	0.09	7/3C	1.08	0.15
7/5C	0.75	0.12	7/6A	0.97	0.15	7/6C	0.71	0.13	7/7A	0.63	0.09
7/7D	0.68	0.13	7/8A	1.39	0.32	7/8B	0.69	0.14	7/9B	1.32	0.17
7/9C	0.73	0.12	7/10B	0.79	0.11	7/10C	0.85	0.18	7/11A	0.70	0.11
7/11C	0.60	0.17	7/11D	0.86	0.14	7/12C	0.53	0.11	7/12D	0.52	0.12
8/3D	1.10	0.19	10/4D	0.61	0.15	10/5C	0.61	0.14	10/6C	0.93	0.10
10/7H	1.05	0.25	10/8H	0.61	0.11	10/10B	1.04	0.18	10/10F	0.56	0.08
10/10H	0.93	0.12	10/11H	0.96	0.10	11/1D	0.60	0.12	11/1E	0.54	0.08
11/1G	0.60	0.16	11/3H	0.81	0.11	11/5H	0.80	0.11	11/6H	0.63	0.12
11/7H	1.24	0.32	11/8G	0.81	0.14	11/9G	1.06	0.21	11/10E	1.08	0.15
11/10F	0.79	0.35	11/10G	0.66	0.15	11/10H	0.73	0.12	11/11H	0.88	0.14
11/12H	0.66	0.16	12/2B	0.87	0.14						

จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีและจับกับ NPSEM ในรูปอิสระ มาทำ Subclone โดยวิธี Limiting dilution จำนวน 3 ครั้ง และทำการคัดเลือกโคลนที่ยังคงผลิตแอนติบอดี และจับได้กับ NPSEM ในรูปอิสระไว้จำนวน 40 โคลน จากเซลล์หลุมต้น 3 หลุม คือ 11/10G ,12/1A และ 4/5A ดังแสดงในภาคผนวก ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้ เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ทำการทดสอบคุณสมบัติต่อไป

3.4 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อทำการเก็บเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 40 โคลน แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้มาทดสอบความสามารถในการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ โดยวิธี indirect ELISA พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาบางโคลนหยุดการผลิตแอนติบอดี ดังแสดงผลในตารางที่ 6 โคลนที่ยังคงผลิตแอนติบอดี จำนวน 27 โคลน ได้แก่ หมายเลข 1 ,2 ,3 ,4 ,5 ,6 ,7 ,8 ,14 ,15 ,16 ,18 ,20 ,21 ,22 ,25 ,26 ,37 ,38 ,39 ,40 ,41 ,42 ,43 ,47 ,48 และ 49 จึงนำโคลนเหล่านี้ไปทดสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆต่อไป

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเก็บแช่แข็งเซลล์ โดยวิธี indirect ELISA

โคลนไฮบริโดมา หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	โคลนไฮบริโดมา หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	โคลนไฮบริโดมา หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
1	1.36	2	1.20	3	1.41
4	1.40	5	1.49	6	1.39
7	1.42	8	1.53	14	0.87
15	0.90	16	1.10	17	0.12
18	1.08	19	0.21	20	1.08
21	0.90	22	0.74	23	0.19
24	0.42	25	1.06	26	1.23
27	0.11	28	0.10	29	0.07
30	0.14	31	0.12	32	0.51
33	0.10	35	0.10	36	0.11
37	1.51	38	1.41	39	1.46
40	1.45	41	1.52	42	1.53
43	1.43	47	1.58	48	1.53
49	1.44				

3.4.1 การหาความเข้มข้นแอนติบอดีที่เหมาะสมโดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากไฮบริโดมาแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกัน และในขั้นตอนนี้ไม่สามารถหาความเข้มข้นแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้อย่างแม่นยำ จึงทำการเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 24 โคลน มาทำการเจือจาง 2 ,5 ,10 ,20 และ 40 เท่า ตามลำดับ (ด้วยอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ถูกเจือจาง ทำการทดสอบโดยวิธี indirect ELISA เลือกค่าการเจือจางมากที่สุดที่ยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับอาหารที่ไม่ถูกเจือจาง แสดงว่าแอนติบอดีเจือจางมากที่สุดแต่ยังคงให้ค่าการทำปฏิกิริยาสูงสุด จากผลการทดสอบ พบว่า ค่าการเจือจางที่เหมาะสมมีดังนี้คือ โคลนที่ไม่เจือจาง ได้แก่ หมายเลข 14 ,15 ,16 ,18 ,20 และ 25 โคลนที่เจือจาง 5 และ 10 เท่า ได้แก่ หมายเลข 26 และ 38 ตามลำดับ โคลนที่เจือจาง 40 เท่า ได้แก่ หมายเลข 1 ,2 ,3 ,4 ,5 ,6 ,7 ,8 ,39 ,40 ,41 ,42 ,43 ,47 ,48 และ 49 ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยวิธี indirect ELISA

โคลนไฮบริโดมา หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร / เจือจาง (เท่า)					
	ไม่เจือจาง	2	5	10	20	40
1	1.29	1.40	1.44	1.43	1.37	1.35
2	1.38	1.39	1.38	1.38	1.37	1.28
3	1.46	1.44	1.54	1.49	1.43	1.27
4	1.07	1.49	1.55	1.53	1.56	1.48
5	1.45	1.62	1.61	1.66	1.56	1.44
6	1.60	1.69	1.70	1.70	1.65	1.58
7	1.57	1.60	1.57	1.54	1.45	1.35
8	1.44	1.57	1.56	1.57	1.48	1.37
14	1.73	1.45	0.83	0.56	0.12	0.11
15	1.74	1.32	0.65	0.32	0.13	0.12
16	1.82	1.51	0.76	0.45	0.22	0.10
18	1.23	0.94	0.41	0.25	0.13	0.11

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยวิธี indirect ELISA

โคลนไฮบริโดมา หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร / เจือจาง (เท่า)					
	ไม่เจือจาง	2	5	10	20	40
20	1.16	1.04	0.84	0.67	0.45	0.27
25	1.04	0.97	0.82	0.62	0.39	0.29
26	1.28	1.22	1.12	0.98	0.84	0.59
38	1.22	1.22	1.19	1.20	1.11	0.92
39	1.41	1.41	1.43	1.45	1.43	1.42
40	1.45	1.53	1.41	1.51	1.47	1.69
41	1.55	1.58	1.67	1.67	1.61	1.57
42	1.54	1.59	1.58	1.59	1.58	1.51
43	1.56	1.53	1.57	1.57	1.57	1.43
47	1.64	1.60	1.62	1.60	1.58	1.57
48	1.56	1.53	1.47	1.47	1.45	1.32
49	1.20	1.21	1.33	1.41	1.46	1.39

3.4.2 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA กับสารอื่นที่อยู่ในกลุ่มไนโตรฟูแรน ทั้งที่อยู่ในรูปยาตั้งต้น ได้แก่ FZD ,FTD ,NFZ และ NFT สารรูปเมแทบอไลท์ ได้แก่ AOZ ,AMOZ ,SEM และ AHD สารรูปอนุพันธ์ ได้แก่ NPAOZ ,NPAMOZ ,NPSEM และ NPAHD สารนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนที่นำมาทดลอง คือ CBA ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์สาร SEM เป็น CPSEM สารในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล ,ซิโพรฟลอกซาซิน ,ออกซีเตตราไซคลิน ,เตตราไซคลิน ,ดอกซีไซคลิน และสารในกลุ่มบีตา-อะโกนิสต์ ได้แก่ เคลนบูเทอรอล และซัลบูทามอล โดยทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางตามข้อ 3.4.1 กับสารเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 22 โคลน มีความสามารถในการจับกับ NFZ และ NPSEM ในรูปอิสระได้ ซึ่งการทำปฏิกิริยาได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเหลือประมาณ 0.1 – 0.3 ส่วนการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆนั้นให้ค่าใกล้เคียงกับแอนติบอดีที่ไม่เติมตัวแข่งขันมีแต่สารละลาย PBS มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ประมาณ 1.2 – 2.0 ดังแสดงในตารางที่ 8 แสดงว่า แอนติบอดีทุกตัวไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอื่น แต่ทำเฉพาะกับ NFZ และ NPSEM เท่านั้น

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร										
	1	2	3	4	5	6	7	8	14	15	16
FZD	1.75	1.75	1.55	1.72	1.64	1.94	1.45	1.70	1.75	1.72	1.82
AOZ	1.77	1.64	1.35	1.66	1.62	1.83	1.38	1.62	1.62	1.60	1.70
NPAOZ	1.72	1.62	1.40	1.66	1.61	1.83	1.40	1.61	1.67	1.72	1.77
CPAOZ	1.65	1.68	1.43	1.75	1.65	1.84	1.43	1.68	1.61	1.75	1.79
FTD	1.79	1.74	1.48	1.77	1.71	2.00	1.43	1.71	1.68	1.61	1.64
AMOZ	1.74	1.75	1.54	1.75	1.68	1.86	1.42	1.69	1.77	1.77	1.82
NPAMOZ	1.76	1.76	1.49	1.72	1.70	1.88	1.48	1.68	1.76	1.78	1.80
CPAMOZ	1.76	1.72	1.48	1.72	1.69	1.87	1.45	1.73	1.75	1.71	1.79
NFZ	0.13	0.14	0.13	0.13	0.12	0.14	0.11	0.13	0.26	0.25	0.43
SEM	1.67	1.63	1.40	1.58	1.55	1.74	1.35	1.66	1.68	1.65	1.81
NPSEM	0.11	0.10	0.12	0.10	0.11	0.09	0.10	0.10	0.14	0.13	0.14
CPSEM	1.65	1.74	1.51	1.78	1.69	1.92	1.45	1.74	1.77	1.77	1.89

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร										
	1	2	3	4	5	6	7	8	14	15	16
NFT	1.62	1.61	1.40	1.58	1.52	1.72	1.34	1.58	1.56	1.57	1.62
AHD	1.67	1.66	1.40	1.64	1.64	1.80	1.35	1.65	1.62	1.61	1.67
NPAHD	1.70	1.75	1.52	1.70	1.63	1.83	1.30	1.64	1.62	1.66	1.72
3-Carboxy benzaldehyde	1.73	1.74	1.47	1.76	1.67	1.85	1.38	1.67	1.70	1.74	1.71
Salbutamol	1.72	1.67	1.48	1.74	1.65	1.88	1.40	1.69	1.73	1.73	1.74
Clenbuterol	1.71	1.69	1.40	1.70	1.68	1.85	1.41	1.67	1.72	1.74	1.75
Chloramphenicol	1.76	1.58	1.34	1.60	1.55	1.79	1.28	1.58	1.34	1.39	1.47
Ciprofloxacin	1.77	1.72	1.52	1.75	1.68	1.85	1.32	1.64	1.56	1.52	1.61
Oxytetracycline – HCl	1.78	1.68	1.37	1.71	1.69	1.90	1.43	1.66	1.58	1.59	1.67
Tetracycline - HCl	1.76	1.71	1.49	1.74	1.70	1.93	1.40	1.68	1.63	1.63	1.71
Doxycycline hydrate	1.78	1.74	1.50	1.77	1.77	2.00	1.48	1.68	1.64	1.63	1.76
DMF (1:50)	1.58	1.80	1.59	1.72	1.72	1.85	1.50	1.70	1.75	1.75	1.85
PBS	1.73	1.68	1.51	1.72	1.70	1.89	1.47	1.71	1.73	1.74	1.82

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร										
	18	20	25	26	38	39	40	43	47	48	49
FZD	1.13	1.26	1.31	1.64	1.59	1.84	1.45	1.44	1.86	1.43	1.77
AOZ	1.35	1.43	1.39	1.56	1.50	1.80	1.34	1.26	1.66	1.29	1.60
NPAOZ	1.48	1.54	1.52	1.68	1.54	1.84	1.36	1.35	1.77	1.38	1.64
CPAOZ	1.49	1.60	1.58	1.76	1.55	1.88	1.40	1.33	1.78	1.38	1.65
FTD	1.32	1.56	1.39	1.79	1.76	2.11	1.58	1.64	2.06	1.64	1.90
AMOZ	1.50	1.62	1.61	1.77	1.57	1.94	1.42	1.38	1.80	1.37	1.66
NPAMOZ	1.43	1.58	1.59	1.78	1.59	1.95	1.41	1.37	1.77	1.37	1.61
CPAMOZ	1.40	1.54	1.52	1.70	1.48	1.87	1.35	1.29	1.73	1.30	1.61
NFZ	0.16	0.16	0.15	0.30	0.16	0.27	0.17	0.14	0.21	0.17	0.25
SEM	1.18	1.28	1.22	1.51	1.51	1.85	1.23	1.33	1.81	1.35	1.67
NPSEM	0.16	0.15	0.14	0.16	0.13	0.14	0.13	0.18	0.20	0.14	0.18
CPSEM	1.21	1.34	1.27	1.63	1.64	1.97	1.37	1.42	1.84	1.44	1.75

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรน

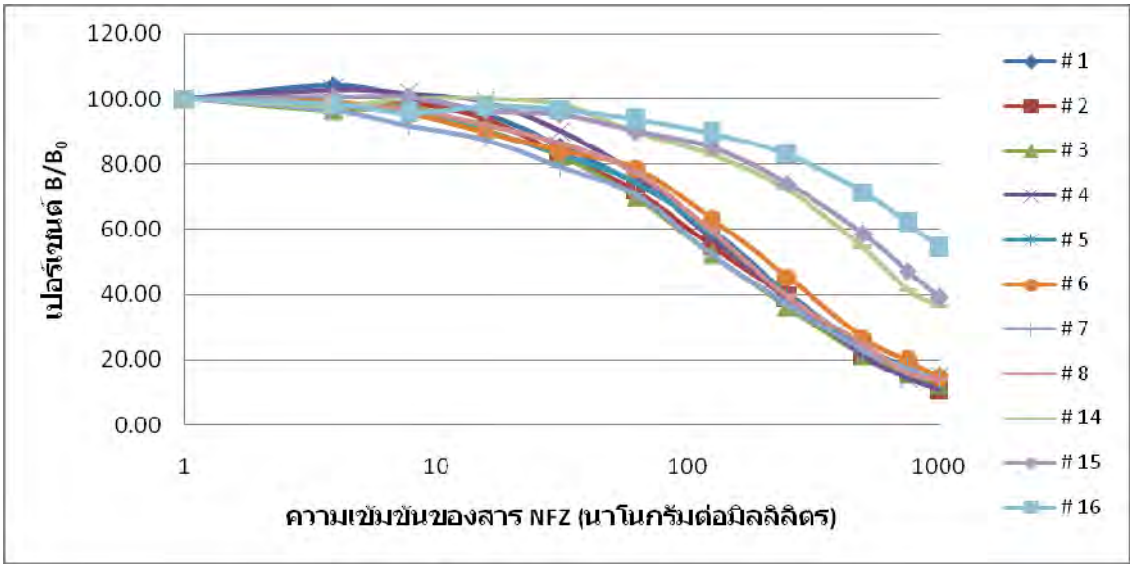
สาร / แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร										
	18	20	25	26	38	39	40	43	47	48	49
NFT	1.69	1.35	1.27	1.51	1.66	1.92	1.46	1.47	1.88	1.59	1.82
AHD	1.32	1.38	1.31	1.53	1.73	1.95	1.50	1.56	1.89	1.56	1.89
NPAHD	1.35	1.47	1.43	1.73	1.76	2.01	1.59	1.56	2.00	1.62	1.97
3-Carboxy benzaldehyde	1.36	1.47	1.53	1.74	1.79	2.03	1.61	1.59	2.09	1.62	1.96
Salbutamol	1.32	1.46	1.45	1.75	1.80	2.05	1.58	1.53	2.02	1.55	1.88
Clenbuterol	1.28	1.46	1.42	1.72	1.75	2.04	1.56	1.58	2.02	1.16	1.94
Chloramphenicol	1.20	1.25	1.21	1.62	1.50	2.09	1.34	1.44	2.01	1.64	1.76
Ciprofloxacin	1.18	1.39	1.29	1.54	1.75	1.93	1.47	1.52	2.02	1.55	1.85
Oxytetracycline – HCl	1.34	1.38	1.32	1.65	1.77	1.98	1.49	1.58	2.09	1.67	2.00
Tetracycline - HCl	1.40	1.41	1.38	1.64	1.77	2.04	1.58	1.59	1.97	1.66	1.93
Doxycycline hydrate	1.30	1.46	1.35	1.77	1.73	2.07	1.53	1.50	1.99	1.60	1.86
DMF (1:50)	1.16	1.23	1.21	1.50	1.52	1.83	1.36	1.34	1.72	1.30	1.65
PBS	1.23	1.29	1.22	1.44	1.51	1.79	1.45	1.40	1.77	1.43	1.71

3.4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect competitive ELISA

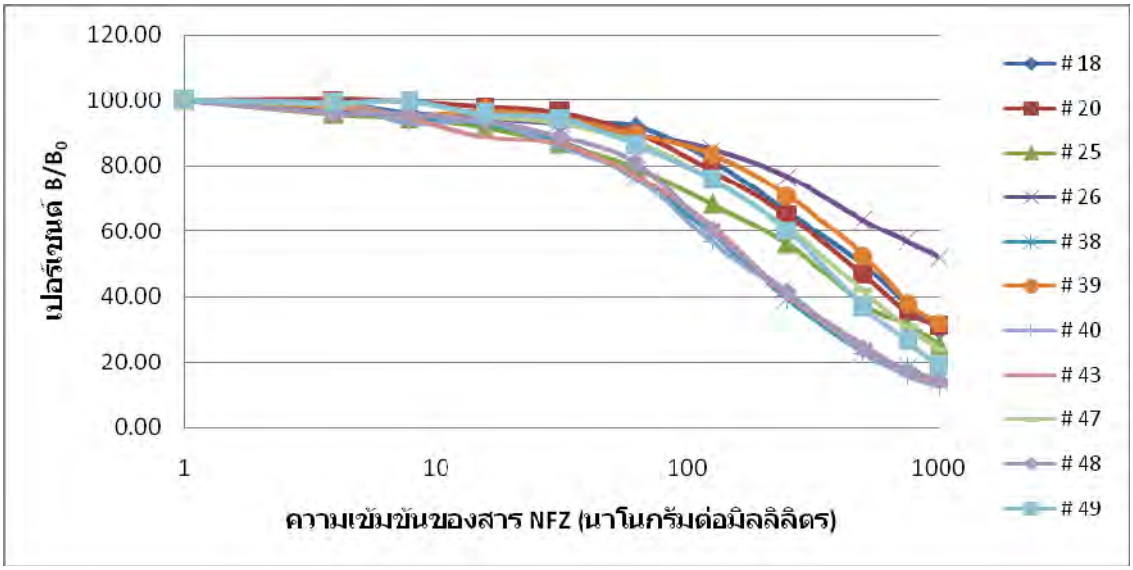
จากการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 22 โคลน ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ NFZ และ NPSEM ในรูปอิสระ จึงนำโคลนเหล่านั้นมาทดสอบความไวต่อสารทั้ง 2 ตัว ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยแปรความเข้มข้นของสารเป็น 1,000 ,750 ,500 ,250 ,125 ,62.5 ,31.25 ,15.63 ,7.8 ,3.9 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจาง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 3 – 6 จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า โคลนหมายเลข 1 – 8 ,38 – 40 ,43 และ 47 – 49 ซึ่งเป็นโคลนที่ได้มาจากเซลล์หลุมต้น 11/10G มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 13 – 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าโคลนหมายเลข 14 – 16 ,18 ,20 ,25 และ 26 ที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 12/1A คือ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 50 – 113 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำค่า IC_{50} ที่ได้ของทั้ง 2 สารมาคำนวณหาค่าเปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม (% cross Reaction) ตามสูตร

เปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม = (IC_{50} ของสาร NPSEM / IC_{50} ของสาร NFZ) x 100

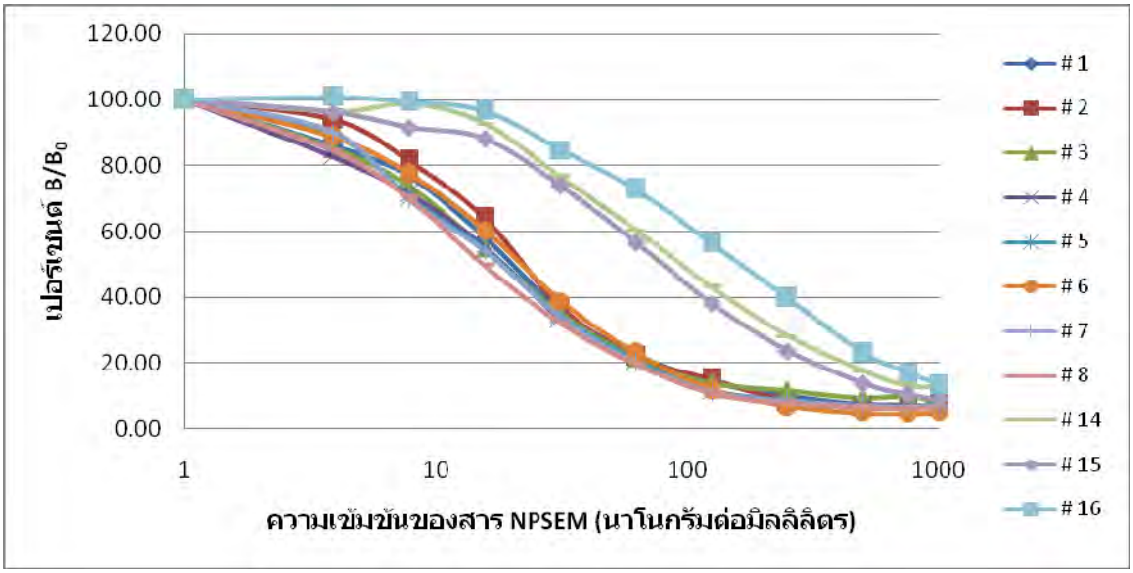
พบว่าค่าเปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของสาร NFZ อยู่ที่ประมาณ 10 – 60 เปอร์เซนต์



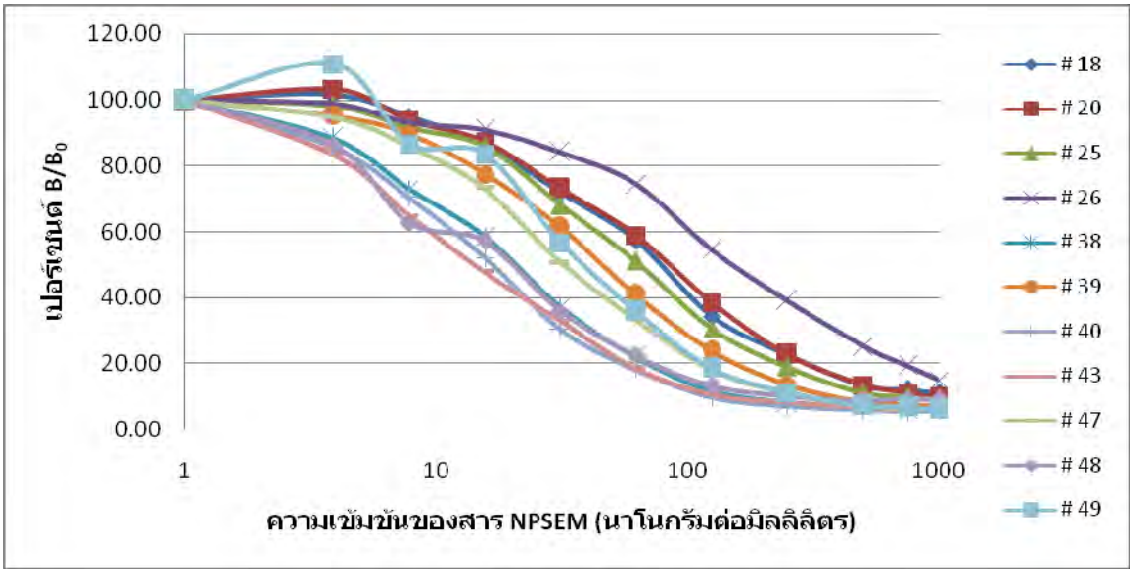
รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NFZ



รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NFZ (ต่อ)



รูปที่ 5 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPSEM



รูปที่ 6 กราฟแสดงการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร NPSEM (ต่อ)

ตารางที่ 9 แสดงค่า IC_{50} และเปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อสาร NPSEM และ NFZ

แอนติบอดี หมายเลข	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม	แอนติบอดี หมายเลข	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม
	NPSEM	NFZ			NPSEM	NFZ	
1	18.7	113.5	16.5	18	56.0	237.7	23.6
2	19.8	119.0	16.6	20	61.5	199.4	30.8
3	16.1	99.9	16.1	25	50.3	145.2	34.6
4	15.4	124.4	12.4	26	108.9	176.0	61.9
5	16.3	113.7	14.3	38	17.5	124.6	14.0
6	20.2	134.0	15.1	39	39.9	249.3	16.0
7	14.3	94.8	15.1	40	15.2	120.5	12.6
8	13.9	121.5	11.4	43	13.1	131.1	10.0
14	75.8	236.9	32.0	47	30.9	199.6	15.5
15	71.2	253.5	28.1	48	13.3	133.8	9.9
16	113.1	278.6	40.6	49	29.9	218.5	13.7

3.4.4 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 22 โคลน โคลนที่ได้มาจากเซลล์หลุมต้น 11/10G ซึ่งได้แก่ หมายเลข 1 – 8 ,38 – 40 ,43 และ 47 – 49 จำนวน 15 โคลน แอนติบอดีเป็นชนิด IgG_3 ส่วนโคลนจากเซลล์หลุมต้น 12/1A จำนวน 7 โคลน ได้แก่ หมายเลข 14 -16 ,18 ,20 ,25 และ 26 ตรวจพบว่า แอนติบอดีเป็นชนิด IgG_3 และ IgM ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

แอนติบอดี หมายเลข	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร**					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
1	0.11	0.19	0.12	1.02	0.12	0.23
2	0.11	0.18	0.11	0.94	0.11	0.22
3	0.11	0.17	0.11	0.84	0.12	0.22
4	0.05	0.05	0.05	0.75	0.05	0.05
5	0.11	0.17	0.11	0.85	0.12	0.21
6	0.11	0.18	0.11	0.98	0.13	0.22
7	0.11	0.17	0.11	0.79	0.12	0.22
8	0.11	0.16	0.12	0.88	0.13	0.17
14	0.11	0.23	0.13	0.74	0.21	2.32
15	0.09	0.23	0.13	0.69	0.23	2.41
16	0.10	0.26	0.13	0.88	0.25	2.57

ตารางที่ 10 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

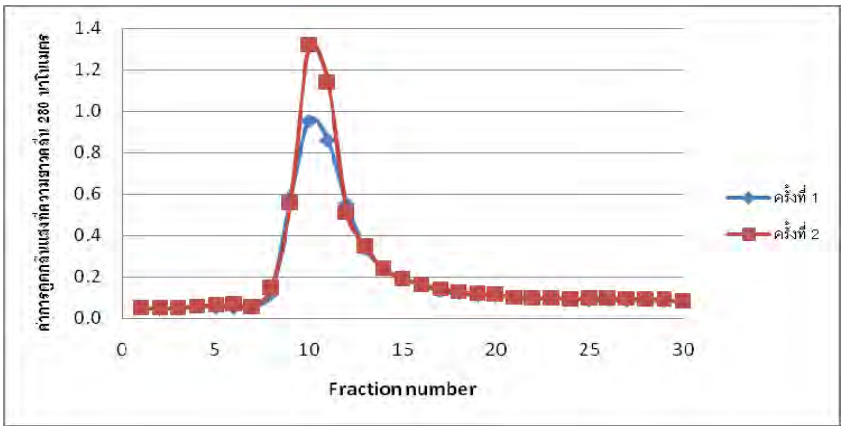
แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					
	IgG_1	IgG_{2a}	IgG_{2b}	IgG_3	IgA	IgM
18	0.11	0.24	0.13	0.58	0.21	2.44
20	0.10	0.17	0.12	0.44	0.13	1.31
25	0.10	0.24	0.14	0.63	0.22	2.50
26	0.11	0.19	0.12	0.80	0.15	1.13
38	0.11	0.17	0.12	0.75	0.12	0.25
39	0.12	0.21	0.12	1.08	0.11	0.24
40	0.10	0.17	0.10	0.81	0.10	0.21
43	0.10	0.16	0.10	0.80	0.10	0.22
47	0.09	0.19	0.10	1.02	0.11	0.22
48	0.12	0.17	0.10	0.85	0.10	0.21
49	0.10	0.21	0.11	1.03	0.12	0.24

3.4.5 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

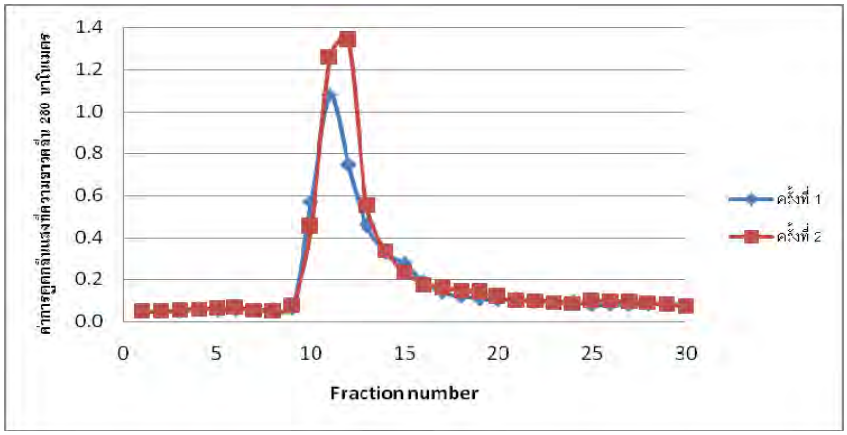
จากการเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ SEM ทั้งสาม ได้แก่ หมายเลข 8 ,25 และ 43 จะทำการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 โคลน เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และแอนติบอดี โดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1,100 มิลลิลิตร แบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน (ประมาณ 550 มิลลิลิตร) และได้ทำการทดสอบโคลนทั้ง 3 ก่อนว่าสามารถผลิตแอนติบอดีอยู่หรือไม่ โดยทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 จากนั้นเริ่มการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยทำการล้างคอลัมน์ protein G sepharose ด้วย 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านคอลัมน์ โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง เนื่องจากคอลัมน์สามารถจับกับแอนติบอดีได้ดีเมื่อใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งละประมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ elute คอลัมน์ ด้วย glycine pH 2.7 และเก็บส่วนใสที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 30 อัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ดังแสดงในรูปที่ 7 ,8 และ 9 ตามลำดับ จากนั้นรวมส่วนใสของการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูงเข้าด้วยกัน โดยโคลนหมายเลข 8 ได้ปริมาตร ครั้งที่ 1 = 13 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 2 = 18 มิลลิลิตร รวมเป็น 31 มิลลิลิตร โคลนหมายเลข 25 ครั้งที่ 1 = 15 มิลลิลิตร , ครั้งที่ 2 = 18 มิลลิลิตร รวมเป็น 33 มิลลิลิตร และโคลนหมายเลข 43 ครั้งที่ 1 = 16 มิลลิลิตร ,ครั้งที่ 2 = 12 มิลลิลิตร รวมเป็น 28 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA ต่อไป

ตารางที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 โดยวิธี indirect ELISA

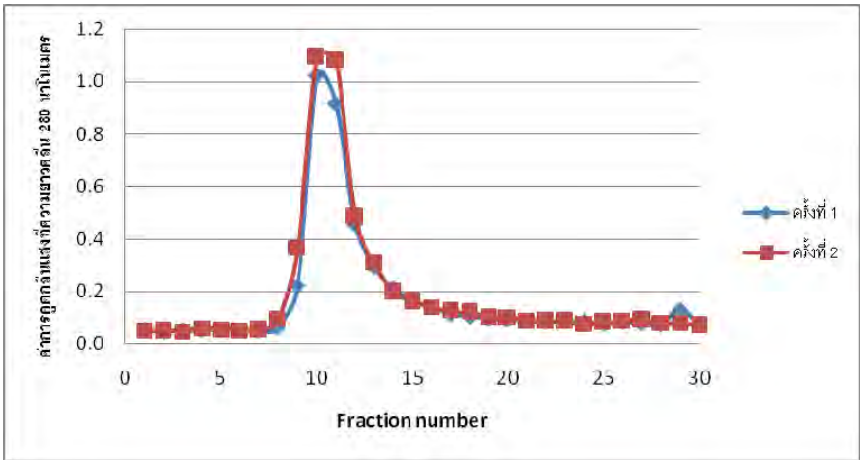
เจือจาง/ แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			เจือจาง/ แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	8	25	43		8	25	43
-	1.89	1.70	1.94	1:64	1.74	1.11	1.66
1:2	1.76	1.60	1.91	1:128	1.56	0.97	1.61
1:4	1.76	1.55	1.88	1:256	1.36	0.76	1.47
1:8	1.81	1.47	1.81	1:512	1.12	0.54	1.14
1:16	1.80	1.41	1.78	1:1,024	0.75	0.36	0.79
1:32	1.76	1.29	1.71	media	0.07	0.07	0.06



รูปที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 8



รูปที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 25



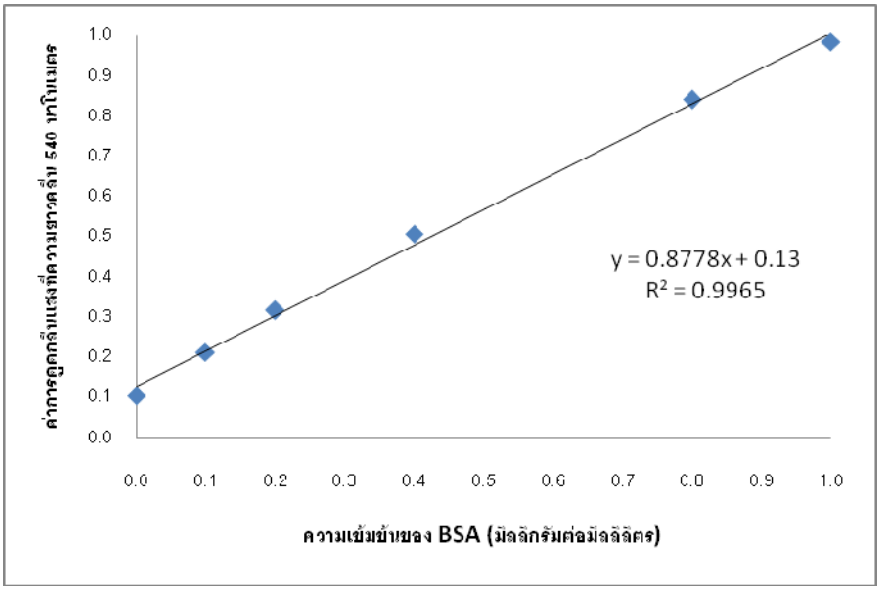
รูปที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของโคลนหมายเลข 43

3.4.6 การหาปริมาณโปรตีนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี BCA หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

หาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีโดยวิธี BCA โดยใช้สารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน สำหรับทำกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 10 และทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างเป็น 1:2 ,1:4 และ 1:8 เพื่อนำค่า A_{540} มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 และได้ทำการทดสอบหา dilution ที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA

ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.106	0.104	0.105
0.1	0.217	0.210	0.214
0.2	0.322	0.314	0.318
0.4	0.508	0.510	0.509
0.8	0.829	0.857	0.843
1.0	1.005	0.967	0.986



รูปที่ 10 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA

ตารางที่ 13 แสดงค่าปริมาณโปรตีนของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ที่ได้จากวิธี BCA

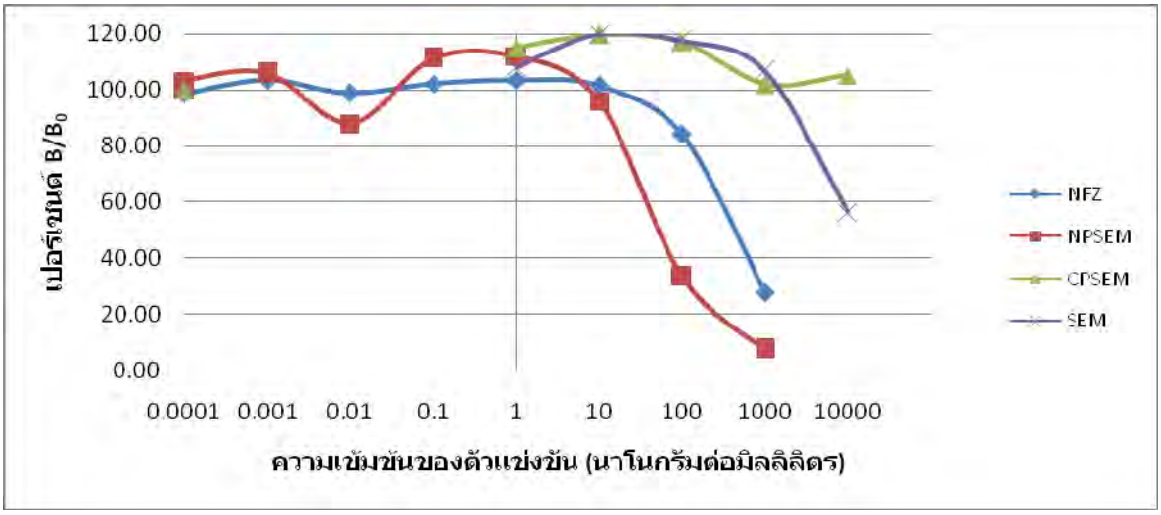
แอนติบอดีหมายเลข	**เจือจาง**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ค่าเฉลี่ย**	**ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**	**ค่าเฉลี่ย**
8	1:2	0.683	0.697	0.690	1.28	**1.17**
	1:4	0.388	0.386	0.387	1.17	
	1:8	0.247	0.247	0.247	1.07	
25	1:2	0.562	0.573	0.568	1.00	**0.99**
	1:4	0.350	0.351	0.351	1.00	
	1:8	0.236	0.233	0.235	0.96	
43	1:2	0.704	0.693	0.699	1.30	**1.20**
	1:4	0.396	0.396	0.396	1.21	
	1:8	0.250	0.245	0.248	1.08	

ตารางที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA

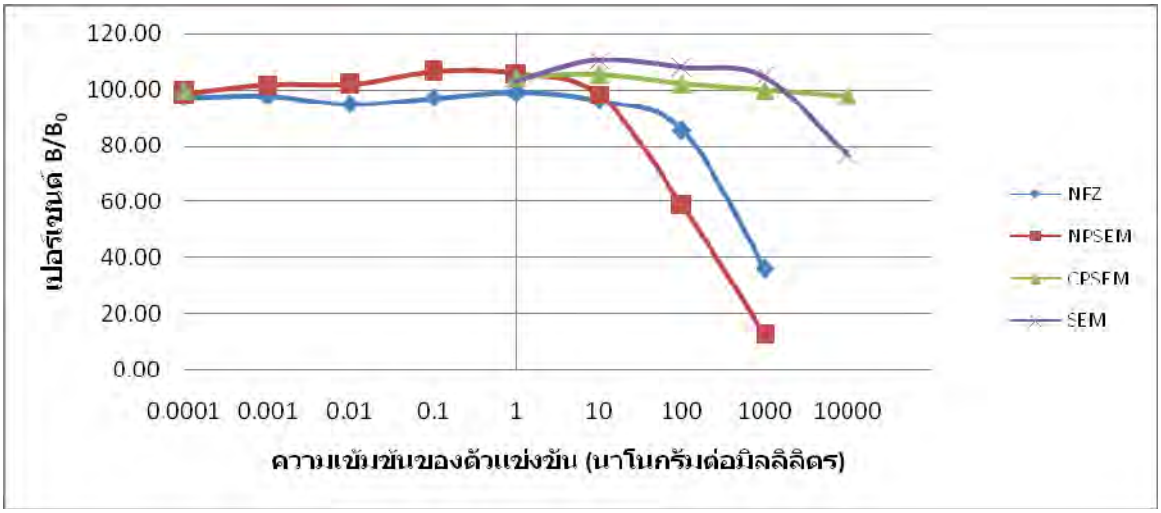
เจือจาง/ แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			เจือจาง/ แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร		
	8	25	43		8	25	43
1:500	1.54	1.31	1.17	1:16,000	0.18	0.14	0.11
1:1,000	1.28	0.86	0.66	1:32,000	0.10	0.11	0.09
1:2,000	0.86	0.51	0.37	1:64,000	0.09	0.09	0.09
1:4,000	0.58	0.32	0.23	1:128,000	0.11	0.07	0.09
1:8,000	0.31	0.20	0.15	1:256,000	0.08	0.07	0.08

3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

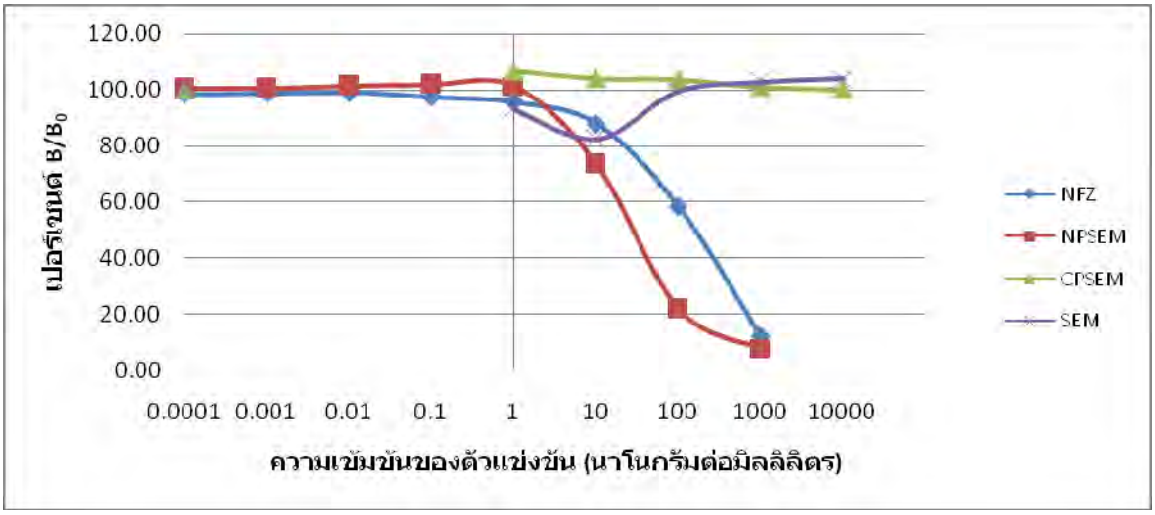
นำโคลนทั้ง 3 หมายเลข คือ 8 ,25 และ 43 มาทดสอบความจำเพาะต่อสาร 4 ตัว คือ NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยแปรความเข้มข้นของสารเป็น 10,000 ,1,000 ,100 ,10 ,1 ,0.1 ,0.01 ,0.001 ,0.0001 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจาง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ ดังแสดงในรูปที่ 11 – 13 จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15



รูปที่ 11 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM



รูปที่ 12 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 25 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM



รูปที่ 13 แสดงการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 43 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM

ตารางที่ 15 แสดงค่า IC_{50} และค่า LOD จากการทดสอบความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ต่อสาร NFZ ,NPSEM ,CPSEM และ SEM

แอนติบอดี หมายเลข	NFZ		NPSEM		CPSEM		SEM	
	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC_{50} (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
8	572.90	8.11	56.77	2.96	> 10,000	-	> 10,000	-
25	903.60	15.52	134.90	4.57	> 10,000	-	> 10,000	-
43	142.10	0.83	23.75	0.50	> 10,000	-	> 10,000	-

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

ในการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง และใช้สำหรับเคลือบจาน 96 หลุม ในการทดสอบ ELISA โดยการเปลี่ยน SEM ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ CPSEM และเชื่อมเข้ากับโปรตีนพาหะคือ BSA และ OVA ให้เป็น CPSEM-BSA และ CPSEM-OVA จากนั้นตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี BCA มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.63 และ 2.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย CPSEM-BSA ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อครั้ง หลังการฉีดกระตุ้น 4 ครั้ง ทำการตรวจวัดระดับการสร้างแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งเคลือบจาน 96 หลุม ด้วย CPSEM-OVA พบว่าหนูมีการสร้างแอนติบอดีในระดับสูง เมื่อทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับ NPSEM ในรูปอิสระได้ดี หลังทำการหลอมรวมเซลล์ม้ามกับมัยอิโลมาเซลล์ ทั้ง 3 ครั้ง ได้ไฮบริโดมาเซลล์ถึง 90 เปอร์เซนต์ และคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ NPSEM ได้ 61 หลุม ทำการ subclone เพื่อให้ได้โมโนโคลน โดยวิธี limiting dilution จำนวน 3 รอบ คัดเลือกโคลนที่ยังคงผลิตแอนตบอดีต่อ NPSEM ไว้ จำนวน 22 โคลน จากเซลล์หลุมต้น 11/10G และ 12/1A โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้ ทุกโคลนสามารถจับกับ NFZ ซึ่งเป็นยาตั้งต้น และ NPSEM ในรูปอนุพันธ์ สำหรับใช้ตรวจหาสารตกค้าง โคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 11/10G จะสามารถจับกับ NPSEM ได้ดีกว่าโคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 12/1A และแอนติบอดีที่ได้เป็นชนิด IgG_3 ส่วนโคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 12/1A เป็นชนิด IgG_3 และ IgM

จากโคลนที่ได้เหล่านี้จึงทำการคัดเลือกโคลน 3 โคลน จากเซลล์หลุมต้น 11/10G และ 12/1A โดยเลือกจากโคลนที่สามารถจับกับ NPSEM ได้ดี คือ มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ได้แก่ โคลนหมายเลข 8 และ 43 จากเซลล์หลุมต้น 11/10G ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.9 และ 13.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจับกับ NFZ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 121.5 และ 131.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับโคลนหมายเลข 25 จากเซลล์หลุมต้น 12/1A ซึ่งจับกับ NPSEM และ NFZ ได้ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.3 และ 145.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำโคลนทั้ง 3 โคลน ได้แก่ โคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography และหาปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 1.17 ,0.99 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และทำการทดสอบหาความจำเพาะของโคลนหมายเลข 8 ,25 และ 43 ต่อสาร NPSEEM และ NFZ อีกครั้ง ได้ค่า IC_{50} และค่า LOD ต่อสาร NPSEM ของโคลนหมายเลข 8 เท่ากับ 56.77 และ 2.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โคลนหมายเลข 25 เท่ากับ 134.90 และ 4.57 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และโคลนหมายเลข 43 เท่ากับ 23.75 และ 0.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า IC_{50} และค่า LOD ต่อสาร NFZ นั้น โคลนหมายเลข 8 มีค่าเท่ากับ 572.90 และ 8.11 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โคลนหมายเลข 25 มีค่าเท่ากับ 903.60 และ 15.52 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และโคลนหมายเลข 43 มีค่าเท่ากับ 142.10 และ 0.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อดูจากค่า IC_{50} และค่า LOD ของโคลนทั้ง 3 หมายเลข พบว่าทั้ง 3 โคลนมีความจำเพาะต่อสาร NPSEM มากกว่า NFZ โดยโคลนหมายเลข 43 มีความไวมากที่สุด

บรรณานุกรม (Bioliography)

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มอกช.9007-2548).2551.เรื่องข้อกำหนดด้าน ความ ปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.2546.หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร

Bryan, G. T. 1978. Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. RavenPress, New York ; 3-9.Commission Regulation(EC)1442(1995). Official Journal of the European Communities, No.L143:26.

Commission Decision 2003/181, Official Journal of the European Communities, 2003,L71:17.

Cooper, K. M.,Caddell, A.,Elliott, T. C.,and Kennedy, D.G.2004. Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofuran furazolidone. *Analytica Chimica Acta*., 520 : 79-86.

Diblikova, I., Cooper, K.M., Kennedy, D.G., Franek, M. 2005. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofuran metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 540: 285-292.

Gottschall, D.W.,and Wang, R.1995. Depletion and Bioavailability of [14C] Furazolidone Residues in Swine Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 : 2520-5.

Hermanson, G.T. 1996. Bioconjugate techniques.,1 st edition, Academic Press : San Diego Hoogenboom, L.A.P.,Kammen, van M.,Berghmans, M.C.J.,Koeman, J.H.,and Kuiper, H.A.1991. The use of pig hepatocytes to study the nature of protein-bound metabolites of furazolidone: a new analytical method for their detection. *Food and Chemical Toxicol*ogy., 29 : 321-8.

Hoogenboom, L.A.P.,Tomassini, O.,Oorsprong, M.B.M.,and Kuiper, H.A.1991. Use of pig hepatocytes to study the inhibition of monoamine oxidase by furazolidone. *Food and Chemical Toxicol*ogy, 29 : 185-91.

Hoogenboom, L.A.P.,Berghmans, M.C.J.,Polman, T.H.G.,Parker, R.,and Shaw, I.C.1992. Depletion of protein-bound furazolidone metabolites containing the 3-amino-2-oxazolidinone side-chain from liver, kidney and muscle tissues from pigs. *Food Additives and Contaminants*, 9 : 623.

Kohler, M.,and Milstein, C.1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature,* 256 : 495-7.

Kumar, L.; Toothill, J. R.; and Ho, K. B. 1994. Determination of nitrofuran residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. J. AOAC Int . 77(3); 591-595.

Leitner, A.,Zollner, P.,and Lindner, W.2001. Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 939 : 49-58.

McCracken, R.J.,and Kennedy, D.G.1997. Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *Journal of Chromatography B*, 691: 87-94.

ภาคผนวก (Appendix)

ไฮบริโดมาโคลนที่ทำการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

ชื่อโคลน	หมายเลข	ชื่อโคลน	หมายเลข
11/10G/6H/7D/3C	1	12/1A/12B/5E/12E	26
11/10G/6H/7D/4B	2	12/1A/12B/5E/12G	27
11/10G/6H/7G/8D	3	4/5A/1H/3H/2B	28
11/10G/6H/7G/8G	4	4/5A/1H/8C/7B	29
11/10G/6H/7H/10B	5	4/5A/1H/8C/7D	30
11/10G/6H/7H/10F	6	4/5A/1H/8C/7E	31
11/10G/6H/8D/3C	7	4/5A/1H/8C/8B	32
11/10G/6H/8D/3D	8	4/5A/1H/11B/9G	33
12/1A/12B/3E/4A	14	4/5A/1H/11B/10C	35
12/1A/12B/3E/4B	15	4/5A/1H/11B/11E	36
12/1A/12B/3G/7B	16	11/10G/5C/6A/2G	37
12/1A/12B/3G/8D	17	11/10G/5C/6A/$3F_1$	38
12/1A/12B/4C/11B	18	11/10G/5C/6F/5D	39
12/1A/12B/4C/12C	19	11/10G/5C/10F/5E	40
12/1A/12B/4F/2G	20	11/10G/5C/2F	41
12/1A/12B/4F/3G	21	11/10G/8E/4E	42
12/1A/12B/4G/6B	22	11/10G/5C/$4D_1$	43
12/1A/12B/4G/6D	23	11/10G/7D/1G	47
12/1A/12B/5B/9D	24	11/10G/7D/12H	48
12/1A/12B/5B/9F	25	11/10G/7D/3E	49

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

1. **หัวหน้าโครงการ**

1.1 ชื่อ-สกุล นายอณุมาศ บัวเขียว

Mr. Anumart Buakeaw

1.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3

1.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

1.4 หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail anumart.b@chula.ac.th

1.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2541

1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

1.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Puthong, S., Rojpibulstit, P. and **Buakeaw, A.** (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.

2. Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from Salacia verrucosa. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ-สกุล นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

Mrs.Songchan Puthong

2.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

2.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย ระดับ ชำนาญการพิเศษ

2.4 หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail songchan.p@chula.ac.th

2.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2539
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2529

2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเตรียมและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยังยั้งเซลล์มะเร็ง

2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับโดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Nilaivan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth, C. and **Puthong, S.** (2001) Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Phytochemistry 56: 103 – 107.

2. Chaichantipyuth, C., Tiyaworanon, S., Mekaroonreung, S., Ngamrojnavanich, N., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, Petsom, A. and Ishikawa, T. (2001) Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. Phytochemistry 58: 1311 – 1315.

3. Roengsumran, S., Musikul, K., Petsom, A., Vilaivan, T., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., **Puthong, S.**, Chaichantipyuth, C., Jaiboon, N., Chaichit, N. (2002) Croblonhifolin, a new anticancer Clerodane from *Croton oblongifolius*. Planta Medica 68: 274 – 277.

4. Ngamrojnavanich, N., Tonsiengsom, S., Lertpratchya, P., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, and Petsom, A. (2003) Diterpenoids from the Stem Barks of *Croton robustus*. Archives of Pharmacal Research 26(11): 898 – 901.

5. Roengsumran, S., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Sangvanich, P., Nhujak, T., Singtothong, P., Chaichit, N., **Puthong, S.**, Petsom, A. (2004) New Halimane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Planta Med 70:1 - 3.

6. Chaichantipyuth , C., Taweechotipatr, P., Petsom, A., **Puthong, S.**, Roengsumran,S., Watanabe, T. and Ishikawa, T. Chemical constituents of *Croton Oblongifolis*. เอกสาร Proceeding ของ JSPS-NRCT.

7. Tungpradabkul, S., Sandee, D., **Puthong, S.** and Laohathai, K. (2005) Construction of scFv derived from a tumor-associated monoclonal antibody having tumorical activity on human hepatocellular carcinoma. Molecular Immunology 42: 713 – 719.

8. Chaichatipyuth, C., Petsom, A., Taweechotipatr, P., Muangsin, N., Chaichit, N. **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Kawahata, M., Watanabe, T. and Ishikawa, T.(2005) New labdane-type diterpenoids from *Croton oblongifolius* and their cytotoxic activity. HETEROCYCLES 65(4): 809 – 822.

9. Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2006) Cytotoxic Activity of Four Xanthones from *Emericella variecolor* an Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. Archives of Pharmacal Research 29(2): 140 – 144.

10. Mattanavee, W., Suwantong, O., **Puthong, S.**, Bunaprasert, T., Hoven, P.V. and Supaphol, P. (2009) Immobilization of Biomolecules on the Surface of Electrospun Polycaprolactone Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. ACS APPLIED Materials & Interfaces 1(5): 1076 – 1085.

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

12. **Puthong, S.**, Rojpibulstit, P. and Buakeaw, A. (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.

13. Umthong, S., **Puthong, S.** and Chanchao, C. (2009) *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand : Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. The American Journal of Chinese Medicine. 37(5): 855 – 865.

14. Roengsumran, S., Pata, P., Ruengraweewat, N., Tummatorn, J., Pornpakakul, S.,Sangvanich, P., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2009) New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-seco-Cleistanthane Diterpenoids from *Croton cblongifolius*. Chemistry of Natural Compounds. 45(5): 641 – 646.

15. Komolpis, K., Udomchokmongkol, 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.

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

3. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

3.1 ชื่อ-สกุล นายกิตตินันท์ โกมลภิส

Mr. Kittinan Komolpis

3.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

3.3 ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3.4 หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail kittinan.k@chula.ac.th

3.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาเอก	Chemical Engineering	2545
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาโท	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2532

3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ตรึงควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549)

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจละตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2548 และ 2549)

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลนบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay (ได้รับทุดอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549-2551)

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน และ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2550-2552)

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **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

2.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

3.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

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

5.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.

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

7.**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.

3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2.การพัฒนาชุดตรวจสารแคลบูทารอลด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

4. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3

4.1 ชื่อ-สกุล ดร. นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)

Dr. Nanthika Khongchareonporn (Panchan)

4.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 6399 00091 73 5

4.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

4.4 หน่วยงาน สถาบันเวิจัยทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail nanthika.k@chula.ac.th

4.5 ประวัติการศึกษา

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

4.6 สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

4.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

4.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุด

ตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

4.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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.

Proceeding

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, Pimpitak 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.

Poster

1. 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.

4.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

2.การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ELISA) แหล่งทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 50

5. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 4

5.1 ชื่อ-สกุล นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

Ms. Umaporn Pimpitak

5.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 911

5.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

5.4 หน่วยงาน สถาบันเวิจัยทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail umaporn.p@chula.ac.th

5.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล	ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542

5.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

5.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

5.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

5.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

5.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **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

5.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์