

รายงานการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์เอสเสย์  
ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3 - อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน และ  
3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน

DEVELOPMENT OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TEST  
KITS FOR NITROFURAN DERIVATIVES: 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE  
AND 3-AMINO-5-MORPHOLINOMETHYL-2-OXAZOLIDINONE

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นางทรงจันทร์ ภูทอง

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนาภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายงานการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์  
ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3 - อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน และ  
3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน

DEVELOPMENT OF ENZYME-LINKED IMMOSORBENT ASSAY TEST  
KITS FOR NITROFURAN DERIVATIVES: 3-AMINO-2-OXAZOLIDINONE  
AND 3-AMINO-5-MORPHOLINOMETHYL-2-OXAZOLIDINONE

## คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร

นางทรงจันทร์ ภูทอง

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทคัดย่อ

3-อะมีโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (AOZ) และ 3-อะมีโน-5-เมอร์ฟอติโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (AMOZ) เป็นสารเมแทบอลิต์ของฟูราโซลิโคนและฟูรัลทาโคนตามลำดับ ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มสารไนโตรฟูแรน ใช้สำหรับป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ อย่างไรก็ตามสารเมแทบอลิต์ทั้งสองถูกจัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจะเป็อันตรายต่อผู้บริโภคได้ ทำให้ต้องมีการตรวจการตกค้างของสารทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่างๆ ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ออสเสย์เป็นวิธีที่เหมาะสมแก่การตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ และ AMOZ และนำแอนติบอดีที่เหมาะสมไปพัฒนาเป็นชุดตรวจ ELISA โดยได้ทำการกระตุ้นหนูทดลองเพื่อสร้างแอนติบอดีต่อสารทั้งสองพบว่า หนูทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้ จึงได้ทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ในกรณีของ AMOZ ได้ทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมดจำนวน 5 ครั้งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 21 โคลน จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนที่คัดเลือกมา 5 โคลนพบว่าไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1F22 E5.1 5A7 และ 7H8 เป็น IgG2b และโคลน 4F1 เป็น IgG2a โดยโคลนที่มีความไวสูงสุดคือ 2E5.1 ซึ่งให้ค่า IC<sub>50</sub> และ LOD ต่อสารอิสระ AMOZ เท่ากับ 14.98 ppb และ 1.42 ppb ตามลำดับ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อสารอิสระ CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารไนโตรฟูแรนตัวอื่นๆ และยาปฏิชีวนะตัวอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ เมื่อนำแอนติบอดีไปเตรียมชุดตรวจ ELISA ในรูปแบบต่างๆ พบว่า รูปแบบของ Antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) ให้ค่า I<sub>OD</sub> (0.06 ppb) ต่ำที่สุดและต่ำกว่าค่า MRPL (0.3 ppb) จึงเลือกรูปแบบนี้มาทำการประเมินประสิทธิภาพโดยใช้ตัวอย่างเนื้อกึ่งที่เดิมสาร AMOZ ลงไปพบว่า สำหรับ intra-variation assay จะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 16.1 - 0.03 % และ % recovery อยู่ในช่วง 80.4 - 124 % แต่เมื่อความเข้มข้นของสารที่เดิมลงไปต่ำกว่า 0.3 ppb (ค่า MRPL) ค่า %CV จะมีค่าสูงกว่า 20% ในส่วนของ inter-variation assay จะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01 - 7.43 % และ % recovery อยู่ในช่วง 72.5 - 157 % และจากการวิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบโดยใช้ชุดตรวจ ELISA ดันแบบและ LC/MS-MS พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.9809 แสดงว่าชุดตรวจสอบดันแบบสามารถใช้วิเคราะห์ AMOZ ได้อย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ ส่วนในกรณีของ AOZ สามารถเตรียมโมโนโคลนได้ 2 โคลนจากการหลอมรวม 5 ครั้ง แต่จากการศึกษาลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่ได้พบว่าแอนติบอดีต่อ AOZ ที่ได้มีความไวไม่เพียงพอต่อการใช้งาน จึงไม่เหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจดันแบบ

เลขหมู่

เลขทะเบียน 017747

วัน เดือน ปี 11 มิ.ย. 61

## Abstract

3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ) and 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (AMOZ) are metabolites of furazolidone and furaltadone, respectively, nitrofuran antibiotics widely used in veterinary practices both to prevent and treat infectious diseases in animals. However, both metabolites are classified as carcinogenic and mutagenic agents which pose a potential health hazard for human consumers, leading to an essential monitoring of both residues in meat products. Detection with enzyme-linked immunosorbent assay is a suitable method for screening a large number of samples. Therefore, the objectives of this research are to produce monoclonal antibodies specific to AOZ and AMOZ and to develop ELISA test kits using the obtained antibodies. Mice were immunized to produce antibodies against both metabolites and found that all immunized mice produced antibodies which are capable of binding to free metabolites. Then, cell fusions were performed to prepare hybridoma cells. In case of AMOZ, five fusions were performed to obtain 21 monoclones. Characterization studies of five selected monoclones revealed that isotype of mAb 1F2, 2E5.1, 5A7 and 7H8 was IgG2b and that of mAb 4F1 was IgG2a. The monoclonal with highest sensitivity was 2E5.1, yielding  $IC_{50}$  and LOD for free AMOZ of 14.98 ppb and 4.42 ppb, respectively. This obtained mAb was specific to CPAMOZ, NPAMOZ, AMOZ and FTD with no cross-reactivity to both tested other nitrofurans and antibiotics. The mAb was used to prepare ELISA test kits in different format. It was found that antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) gives the lowest LOD (0.06 ppb) which was lower than the MRPL value (0.3 ppb). Therefore, the efficiency of this format was evaluated using fortified shrimp samples. For intra-variation assay, %CV was in the range of 16.1–0.03% and the %recovery was in the range of 80.4-124%. However, the %CV higher than 20% was obtained when the samples were spiked at the concentration lower than 0.3 ppb. In case of inter-variation assay, the obtained %CV was 0.01-7.43% and %recovery was 72.5-157%. The comparative analysis between the prototype ELISA and LC/MS-MS showed that both methods yielded approximate values with  $r^2$  of 0.9809. These results indicated that the ELISA prototype can be used to accurately and precisely analyze AMOZ. In case of AOZ, two mAbs were obtained from five cell fusions. Unfortunately, characterization studies of these mAbs showed that they were not sensitive enough to be used. Therefore, they were not suitable for the prototype development.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551 และ 2552 และได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	3
กิตติกรรมประกาศ.....	4
สารบัญ.....	5
สารบัญตาราง.....	7
สารบัญภาพ.....	8
คำย่อและสัญลักษณ์.....	9
บทที่	
1  บทนำ	
1.1  ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	11
1.2  วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	12
1.3  ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	12
1.4  ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย.....	13
1.5  การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	13
1.6  ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	15
2  สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และสารเคมี	
2.1  สัตว์ทดลองและเซลล์.....	16
2.2  เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์.....	16
2.3  สารเคมี.....	17
3  ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1  เตรียมอนุพันธ์ของ AOZ และ AMOZ.....	21
3.2  เชื่อมสาร CPAOZ กับ โปรตีนพาหะ cBSA และ OVA.....	21
3.3  กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี.....	21
3.4  เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี.....	22
3.5  การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ โดยวิธี indirect ELISA.....	22

## สารบัญ

	หน้า
3.6 ทดสอบลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีที่ได้.....	22
3.7 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในระดับขวดเขย่า.....	24
3.8 การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	24
3.9 การเตรียมชุดตรวจสอบสารAOZ และ AMOZ โดยหลักการ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ .....	25
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
4.1 การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี.....	29
4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี.....	32
4.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	34
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA ดั้งแบบสำหรับตรวจ AMOZ.....	37
4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ AMOZ ดั้งแบบ.....	38
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	42
เอกสารอ้างอิง.....	44
ภาคผนวก.....	46
ประวัติผู้วิจัย.....	49

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ด้วยวิธี indirect ELISA.....	30
4.2	การทดสอบความสามารถในการจับสาร AMOZ และอนุพันธ์ในรูปอิสระของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	30
4.3	การทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ CPAOZ ด้วยวิธี indirect ELISA.....	31
4.4	การทดสอบความสามารถในการจับสาร AOZ และอนุพันธ์ในรูปอิสระของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	31
4.5	การทดสอบแอนติบอดีของโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่ออนุพันธ์ของ AMOZ.....	32
4.6	การทดสอบแอนติบอดีของโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่ออนุพันธ์ของ AMOZ.....	33
4.7	การทดสอบแอนติบอดีของโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่ออนุพันธ์ของ AOZ.....	34
4.8	ค่าการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AMOZ.....	36
4.9	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี ELISA แบบต่างๆ ต่อสาร AMOZ และ NPAMOZ.....	38
4.10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจในเพลตเดียวกันของชุดตรวจ antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP).....	40
4.11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจต่างเพลตกันของชุดตรวจ antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP).....	40
4.12	การวัดปริมาณสาร AMOZ ด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบและ LC-MS/MS....	41



## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	การทดสอบความไวเบื้องต้นของโม โคลนอนลแอนติบอดี AOZ#1, 4, 7 และ12 ต่อสาร CPAOZ.....	37
4.2	กราฟเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิเคราะห์สาร AMOZ ด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบกับ LC-MS/MS.....	41

## สัญลักษณ์และคำย่อ

AHD	1-Aminohydantoin
AMOZ	3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
AOZ	3-Amino-2-oxazolidone
APS	Ammoniumpersulfat
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine Serum Albumin
cBSA	Cationize Bovine Serum Albumin
CAP	Chloramphenicol
CBA	3-Carboxybenzaldehyde
CPAMOZ	3-[[[(3-Carboxyphenyl)methylene]amino]-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FTD	Furaltadone
FZD	Furazolidone
HAT	Hypoxanthine, aminopiter และ thymidine
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradise peroxidase
LC-MS	Liquid Chromatography/Mass spectrometry
LC-MS-MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LOD	Limiting of detection
M	Molar
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
mAb	Monoclonal antibody

MRPL	Minimum required performance limit
NBA	2-Nitrobenzaldehyde
NFT	Nitrofurantoin
NFZ	Nitrofurazone
NPAHD	1-[(2-Nitro-benzylidene)-amino]-imidazolidin-2,4-dione
NPAMAZ	5-Morpholin-4-ylmethyl-3-[(2-nitro-benzylidene)-amino]-oxazolidin-2-one
NPAOZ	3-[(2-Nitro-benzylidene)-amino]-oxazolidin-2-one
NPSCA	2-Nitro-benzaldehydesemicarbazone
OPD	O-Phenylenediamine
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffer saline
PEG	Polyethylene glycol
ppb	Part per billion
ppm	Part per million
Rf	Relative mobility
SCA	Semicarbazide
v	Volume
w	Weight
%	Percent

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูแรนโทอิน และฟูราโซลิโดน และฟูรลทาโดน มีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการป้องกัน และรักษาโรคระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นยากระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภค เช่น โค หมู เป็ด และไก่ ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม สารดังกล่าวเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและการกลายพันธุ์ ซึ่งหากมีการใช้สารนี้และเกิดการตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ทั้งในแง่ของการดูดซับของเชื้อและการเกิดมะเร็ง ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจึงออกประกาศห้ามมิให้มีการในเปื้อนหรือตกค้างของสารและอนุพันธ์ของสารดังกล่าวในอาหาร ในทำนองเดียวกันทางสหภาพยุโรปก็ได้ออกประกาศเกี่ยวกับข้อกำหนดควบคุมปริมาณการตกค้างของสารและอนุพันธ์ของสารดังกล่าวไว้ ดังนั้นในการส่งสินค้าในกลุ่มเนื้อสัตว์เพื่อการบริโภคออกไปยังต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสหภาพยุโรป ซึ่งเข้มงวดเกี่ยวกับคุณภาพของสินค้ามาก จะต้องมีการตรวจการตกค้างของสารดังกล่าวก่อน อย่างไรก็ตามเมื่อสารไนโตรฟูราโซน ไนโตรฟูแรนโทอิน ฟูราโซลิโดน และ ฟูรลทาโดนเข้าสู่ร่างกายจะถูก เมแทบอลไลต์เป็น เซมิคาร์บาไซด์ (SEM) 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (AHD) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (AMOZ) ตามลำดับ ดังนั้นในการตรวจสารตกค้างจึงเป็นการตรวจหาสารเมแทบอลไลต์ต่างๆ ดังกล่าว

ในปัจจุบัน แม้ว่าหน่วยงานรัฐบาลได้ออกข้อกำหนดควบคุมเข้มต่างๆ ในการนำเข้าและการใช้สารเคมีดังกล่าวมาข้างต้น การลักลอบใช้อย่างผิดกฎหมายก็ยังไม่หมดสิ้นไปอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นผู้ผลิตอาหารแช่แข็งส่งออกต่างๆ จึงต้องทำการตรวจวัดหาปริมาณสารที่ตกค้างอยู่ก่อนที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งกรรมวิธีในการตรวจสอบจำเป็นต้องใช้เทคนิคและวิธีการที่เฉพาะเจาะจงและเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีต้นทุนสูง ดังนั้นในการที่จะช่วยส่งเสริมการส่งออกสินค้า สินค้าที่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบสารตกค้างจึงต้องมีค่าการลงทุนในส่วนนี้ในปริมาณที่มาก และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ เทคนิคการตรวจสอบที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันสำหรับการตรวจวัดสารตกค้างคือ high performance liquid chromatography (HPLC) , liquid chromatography – mass spectroscopy (LC-MS), LC-MS-MS, gas chromatography – mass spectroscopy (GC-MS) และ enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) ซึ่งการตรวจวัดด้วยวิธี HPLC, LC-MS, LC-MS-MS และ GC-MS นั้นสามารถระบุปริมาณสารตกค้างได้อย่างถูกต้องและมีความแม่นยำสูง แต่ขั้นตอนในการตรวจวัดค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนทำการตรวจวัด การวิเคราะห์ใช้เวลานานและเครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูงมาก ดังนั้นวิธีการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ความถูกต้องสูง ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาสูงมากจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบเฝ้าระวัง ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อคัดตัวอย่างเบื้องต้น (screening test) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน ด้วยวิธี ELISA สำหรับใช้ในประเทศ เพื่อทดแทนการนำเข้า และเป็นทางเลือกในการตรวจตัวอย่างจำนวนมากก่อนการตรวจยืนยันด้วยวิธี HPLC หรือ MS

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

### 1.2.1 วัตถุประสงค์เชิงจุดมุ่งหมาย

เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนนด้วยวิธี ELISA

### 1.2.2 วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม

1.2.2.1 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน

1.2.2.2 การทดสอบสมบัติเบื้องต้นและคัดเลือกแอนติบอดีที่เหมาะสม สำหรับใช้เตรียมชุดตรวจสอบ

1.2.2.3 การเตรียมชุดตรวจสอบสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน โดยหลักการ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 เตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน

1.3.2 หลอมรวมเซลล์เพื่อเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการ

1.3.3 ศึกษาสมบัติของแอนติบอดี ผลิตแอนติบอดีปริมาณมากและทำให้บริสุทธิ์

1.3.4 ศึกษาการเตรียมชุดตรวจสอบสารด้วยวิธี ELISA แบบต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะ

1.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ และเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

#### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญและความสนใจอย่างมาก ในด้านความปลอดภัยของอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตกค้างของสารหรือยาที่เกิดจากการใช้ที่ไม่ถูกวิธีหรือผิดวัตถุประสงค์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคและสัตว์ที่ได้รับสารนั้น ดังนั้นหน่วยงานที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารในประเทศต่างๆ จึงได้ออกข้อกำหนดเกี่ยวกับห้ามใช้สารต่างๆ ปริมาณสูงสุดของสารต่างๆ ที่สามารถตกค้างได้ (maximum residual limit, MRL) ในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค ทำให้การส่งออกหรือนำเข้าผลิตภัณฑ์ต้องมีการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างต่างๆ ซึ่งวิธีที่นิยมมากที่สุดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมากเบื้องต้นได้แก่การใช้ชุดตรวจในรูปแบบ ELISA ทั้งที่เป็นแบบจานหลุม (titer plate) หรือแถบทดสอบ (strip test) โดยผู้นำในการพัฒนาและจำหน่ายชุดตรวจสอบเหล่านี้จะอยู่ในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศผู้นำเข้าสินค้าที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นผู้ออกข้อกำหนดที่ส่งผลให้ผู้ส่งออกของไทยต้องใช้ชุดตรวจสอบจากกลุ่มประเทศเหล่านั้น ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถที่จะพัฒนาและผลิตชุดตรวจสอบที่มีมาตรฐานเทียบเท่ากับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบัน จะเป็นการลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และอาจลดผลกระทบของข้อกำหนดของปริมาณสารสูงสุดของสารตกค้างเนื่องจากผู้ส่งออกมีทางเลือกใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้น ไม่ต้องพึ่งแต่ชุดตรวจกลุ่มประเทศเหล่านั้น

กลุ่มของสารตกค้างที่มีความสำคัญได้แก่ กลุ่มที่สามารถใช้เป็นยาปฏิชีวนะและให้ผลข้างเคียงในการกระตุ้นการเจริญ เช่น กลุ่มเบตาอะ โคนิสต์ กลุ่มไนโตรฟูแรน ซึ่งโครงการวิจัยได้สนใจที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบสาร 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนนและ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิท์ของ ฟูราโซลิโดน และ ฟูรัลทาโดนซึ่งอยู่ในกลุ่มไนโตรฟูแรน เนื่องจากชุดตรวจสอบ ELISA ของสารดังกล่าวมีราคาสูง ทำให้การตรวจสอบปัจจุบันต้องใช้วิธีตรวจด้วยวิธี mass spectrometry เป็นหลัก จึงมีหน่วยงานเพียงไม่กี่แห่งเท่านั้นที่สามารถทำการตรวจสอบได้ ดังนั้นเพื่อให้ต้นทุนในการตรวจสารดังกล่าวลดต่ำลง และเอื้อให้ผู้ส่งออกหรือหน่วยงานต่างๆ สามารถเข้าถึงการตรวจตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น จึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจสอบดังกล่าวขึ้นเองภายในประเทศ และการพัฒนานี้ยังสามารถใช้เป็นแม่แบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารอื่นๆ ด้วยวิธี ELISA ต่อไปได้ในอนาคต

#### 1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไนโตรฟูแรนมีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ ประกอบด้วยสาร 4กลุ่มคือ 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 ไนโตรฟิว

ราโซน (nitrofurazone, 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone, NFZ) สารกลุ่มนี้ใช้ในการป้องกันและรักษาโรกระบบทางเดินอาหารซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นสารในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค เช่น โค หมู เป็ด และไก่ เป็นต้น แต่เนื่องจาก NFZ, NFT, FZD และ FTD มีสมบัติที่ไม่เสถียร ไวต่อแสง และถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน ดังนั้นเมื่อสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายจะถูกเมแทบอลิซึมเปลี่ยนเป็น เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide, SEM) 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin, AHD) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, AMOZ) ตามลำดับ (Kumar *et al.*, 1994) ดังนั้นในการตรวจสอบสารตกค้างจึงเป็นการตรวจหาสารเมแทบอลิซึมต่างๆ ดังกล่าว สารในกลุ่มไนโตรฟูแรนนี้จัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะถูกเมแทบอลิซึมเร็วมากหลังจากการใช้ ภายใน 2-3 ชั่วโมงก็ไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ในทางตรงกันข้ามสารเมแทบอลิซึมจะอยู่ในรูปที่ติดอยู่ที่เนื้อเยื่อ ซึ่งจะคงอยู่นานหลายสัปดาห์ (Hoogenboom *et al.*, 1991 ; Hoogenboom *et al.*, 1992 ; Gottschall *et al.*, 1995) ในการใช้ยาและสารเหล่านี้จะใช้โดยการผสมรวมกับอาหารสัตว์ในปริมาณน้อย แต่ให้สัตว์กินติดต่อกันเป็นเวลานาน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสะสมของยาและสารเคมีในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายสัตว์ เช่น ไนวม เนื้อ หรือ ไข่ เกิดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Bryan G.T., 1978)

จากอันตรายของสารในกลุ่มนี้ทำให้เกิดความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากสารตกค้างเหล่านี้ ดังนั้นบางประเทศจึงห้ามไม่ให้ใช้ยาในกลุ่มนี้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อใช้สำหรับการบริโภค เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป, สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา ส่งผลทำให้ประเทศต่างๆ ได้ออกข้อกำหนดควบคุมไม่ให้มีการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยทางกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปได้กำหนดค่า Minimum Required Performance Limit (MRPL) ของสาร AOZ, AMOZ, AHD และ SEM ไว้ที่ 0.3- 1.0 ppb) แต่แต่ละประเทศจะแตกต่างกัน (ส่วนสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยได้กำหนดค่าไว้ที่ 0.3ppb จากการกำหนดดังกล่าวจึงต้องมีการตรวจวัดสารเมแทบอลิซึมต่างๆ ในอาหารเพื่อการบริโภคทั้งในประเทศและเพื่อการส่งออก โดยในการศึกษาการตรวจวัดต่างๆ เหล่านี้ยังอยู่ในวงจำกัด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาการตรวจด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากสาร AOZ เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กมากซึ่งไม่สามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตได้ และถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารนี้ได้จึงจำเป็นต้องนำสารมาเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ให้อยู่ในรูป -2-ไนโตรเบนแซลดีไฮด์-3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (2-nitrobenzaldehyde-3-amino-2-oxazolidinone; NPAOZ) เสียก่อน (Leitener *et al.*, 2001) ในการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของ AOZ 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) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเมแทบอลิต์ของไนโตรฟูแรนในระดับความเข้มข้นหนึ่งในพันล้านส่วนในเนื้อเยื่อ แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำสูง แต่เป็นวิธีที่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ ส่งผลให้การตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างมีราคาสูง อีกทั้งในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวิเคราะห์เท่านั้น จึงเป็นเหตุให้มีการศึกษาการตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อคัดกรองตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว ด้วยความถูกต้องแม่นยำ และมีต้นทุนการตรวจที่ต่ำกว่า สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องอ่านผล ELISA และในภาคสนาม เมื่อมีการพัฒนาชุดตรวจสอบในรูปแบบของแถบ จากการศึกษาคอลิโคคลอนแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ของสาร AOZ โดยการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ AOZ ด้วย 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ได้เป็น 3-([(3-carboxyphenyl) methylene]amino)-2-oxazolidinone (CPAOZ) แล้วทำการเชื่อมต่อกับ โปรตีนพาหะ human serum albumin (HSA) ซึ่งถูกนำไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถเตรียมพอลิโคลนอสแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ NPAOZ โดยสามารถตรวจพบ NPAOZ ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตรได้ ซึ่งเมื่อคำนวณความไวในการวัดในรูปของค่า  $IC_{50}$  ได้เท่ากับ 0.065 ไมโครกรัมต่อลิตร และไม่เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารเมแทบอลิต์ของไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในสัตว์อื่นๆ (Cooper *et al.*, 2004) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ด้วยหลักการ ELISA สำหรับตรวจ AOZ ในรูปของ NPAOZ ออกมาจำหน่ายโดยมีชื่อทางการค้าว่า RIDASCREEN® Nitrofurantoin (AOZ)

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ชุดตรวจสอบที่สามารถนำมาใช้ทดแทนชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง ทำให้เกษตรกรและผู้ประกอบการสามารถลดต้นทุนการผลิตและลดการนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นการช่วยลดการขาดดุลทางการค้า

1.6.2 สามารถใช้ตรวจสอบหาสารตกค้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ

1.6.3 องค์ความรู้ ประสบการณ์และอุปกรณ์ต่างๆ ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมและผลิต โมโนโคลนอสแอนติบอดี การพัฒนาชุดตรวจสอบที่มีคุณภาพสูงต่อสารอื่นๆ ต่อไป

1.6.4 ผลงานที่ได้สามารถนำไปจัดสิทธิบัตรและ/หรือเผยแพร่ในวารสารหรืองานประชุมวิชาการได้



## บทที่ 2

### สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และสารเคมี

#### 2.1 สัตว์ทดลองและเซลล์

2.1.1 หนูขาว (swiss mice) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2.1.2 หนูขาว สายพันธุ์ ICR เพศเมีย	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2.1.3 เซลล์มียอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI)	ATCC No: TIB 18

#### 2.2 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

กระบอกฉีดขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon, Japan
ขวดแก้ว	Boro, Germany
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
เข็มฉีดขนาด 18G, 21G และ 22G	Nipro, Thailand
หลอดฉีดขนาด 5, 1 และ 10 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
เครื่องชั่งน้ำหนัก AG204	Mettler, USA
เครื่องชั่งน้ำหนัก PG4002-5	Mettler, USA
เครื่องระเหยแห้งด้วยความเย็น	Yamato, Japan
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
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
ไมโครปิเปต	Biohit, Finland

ไม้สุญญากาศ	Iwaki, Japan
ตูบ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Japan
ตูปลอดเชื้อ	Cambrige, Thailand
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen, USA
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII, Japan
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

### 2.3 สารเคมี

Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
1-Aminohydantoin (AHD)	Sigma-Aldrich, USA
3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone (AMOZ)	Sigma-Aldrich, USA
3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich, USA
Ammoniumpersulfate	Sigma-Aldrich, USA
BCA protein assay kit	Sigma-Aldrich, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Butanol	Merck, Germany
3-Carboxybezaldehyde (CBA)	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Citric acid	Merck, Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich, USA
Copper sulfate	Sigma-Aldrich, USA
D-glucose	Sigma-Aldrich, USA
Diethyl ether	Sigma-Aldrich, USA
Dimethyl sulfoxide	Fluka, Switzerland
Disodium carbonate	Fluka, Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo Erba, USA
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich, USA

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride (EDC)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich, USA
Fetal bovine serum	Invitromex, USA
Flumequine	Sigma-Aldrich, USA
Folin-Ciocalteu Phenol reagent	Sigma-Aldrich, USA
Furaltadone (FTD)	Sigma-Aldrich, USA
Furazolidone (FZD)	Sigma-Aldrich, USA
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycine	Merck, Germany
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide	Fluka, Switzerland
N-hydroxysuccinimide ester (NHS)	Fluka, Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich, USA
L-lysine	Sigma-Aldrich, USA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	BDH, England
5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidnamino)-2- oxazolidinone (NPAMOZ)	Sigma-Aldrich, USA
5-morpholinomethyl-3-amino-oxazolidinone (AMOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Ninhydrin	Pierce, USA
2-Nitrobenzaldehyde semicarbazone(NPSCA)	Sigma-Aldrich, USA
1-(2-Nitrobenzylidnamino)-2, 4-imidazolidinedione (NPAHD)	Sigma-Aldrich, USA
Nitrofurantoin (NFT)	Sigma-Aldrich, USA
Nitrofurazone (NFZ)	Sigma-Aldrich, USA
3-[[2-Nitrophenyl)methylene] amino}-2,4- imidazolidinone (NPAHD)	Sigma-Aldrich, USA

3-[[[(2-Nitrophenyl)methylene] amino]-2-oxazolidinone) (NPAOZ)	Sigma-Aldrich, USA
Non-fat dry milk	Mission health food, Thailand
Norfloracin	Sigma-Aldrich, USA
O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD)	Sigma-Aldrich, USA
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, USA
Oxytetracycline	Fluka, Switzerland
Penicillin G	Sigma-Aldrich, USA
Peroxidase Goat anti-mouse IgG (H+I.)	Jackson Immunoresearch
Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	Zymed, USA
Picrylsulfonic acid	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich, USA
Potassium chloride	Sigma-Aldrich, USA
Potassium dihydrogen phosphate	Sigma-Aldrich, USA
Potassium tartrate	Merck, Germany
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 carbonate	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
Tetracycline	Sigma-Aldrich, USA
Thymidine	Sigma-Aldrich, USA
2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)	Pierce, USA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma-Aldrich, USA
Trisodium citrate	Fluka, Switzerland
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 เตรียมอนุพันธ์ของ AOZ และ AMOZ

นำ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-2-oxazolidinone; AOZ) และ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone; AMOZ) มาทำปฏิกิริยากับ 3-คาร์บอกซิเบนแซลดีไฮด์ (-3carboxybenzaldehyde; CBA) โดยวิธีการกลั่นไหลกลับในโพรีตินปราศจากน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 3-(3-คาร์บอกซิฟีนิลเมทิลอะมิโน)-2-ออกซาโซลิดิโนน (-3{-3}carboxyphenyl methylene]amino}-2-oxazolidinone, CPAOZ) และ (3-{{3-carboxyphenyl methylene]amino}-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, CPAMOZ) โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ใน คลอโรฟอร์ม เป็นโมบายเฟส ทำให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้วิธี TLC ใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ใน คลอโรฟอร์ม เป็นโมบายเฟส

#### 3.2 เชื่อมสาร CPAOZ กับโปรตีนพาหะ cBSA และ OVA

ทำการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีนพาหะให้เป็นหมู่เอมีนปฐมภูมิ โดยนำโปรตีน bovine serum albumin (BSA) มาเติมสารเอทิลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (EDA) ที่มากเกินไป และ สาร -1เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล-คาร์โบไดอิมิด - ไฮโดรคลอไรด์ (-1Ethyl-3-(dimethylaminopropyl) - carbodiimide hydrochloride; EDC) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกชั้นผ่านเยื่อบางและใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline; PBS) ในการทวน จะได้โปรตีนประจุสุทธิเป็นบวก (cationized BSA; cBSA) (Hermanson *et al.*, 1996) จากนั้นนำโปรตีน cBSA หรือ ovalbumin (OVA) มาทำการเชื่อมกับสาร CPAOZ และ CPAMOZ โดยใช้สาร EDC ในการเชื่อม ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกชั้นผ่านเยื่อบางและใช้ PBS ในการทวน ตรวจสอบการเชื่อมสารกับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS

#### 3.3 กระบวนการสร้างแอนติบอดี

นำ cBSA-CPAOZ หรือ cBSA-CPAMOZ 50 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งโดยปริมาตร และฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของหนูสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นหนูซ้ำโดยใช้ปริมาณแอนติเจนเท่าเดิมแต่

ผสม cBSA-CPAOZ หรือ cBSA-CPAMOZ กับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในวันที่ 14 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และฉีดเว้นอย่างน้อย 2 อาทิตย์อีก 2-3 ครั้ง เก็บเลือดหลังฉีด 7-10 วัน เก็บซีรัมจากเลือดที่แข็งตัว และนำไปตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน โดยวิธี indirect ELISA

### 3.4. เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

นำเซลล์ม้ามของหนูที่ฉีดกระตุ้นที่ให้ปริมาณแอนติบอดีสูงสุดจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอิโลมา P3/NS1/1-Ag4-1 ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยใช้ สารพอลิเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) 50 เปอร์เซนต์ เป็นสารช่วยในการหลอม เซลล์เข้าด้วยกันและใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโพแซนทีน อะมิโนอพเทอรีน ไทมิดีน (hypoxanthine aminopterin thymidine; HAT medium) ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งเซลล์มัยอิโลมาจะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารนี้ ส่วนเซลล์ม้ามจะตายเองเมื่อหมดอายุขัยประมาณ 2 อาทิตย์. เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ ตรวจหาแอนติบอดีต่อ CPAOZ หรือ CPAMOZ โดยวิธี indirect ELISA จากอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม นำเซลล์ไฮบริโดมาเฉพาะที่ให้ผล indirect ELISA เป็นบวก มาทำการเจือจางให้ได้ประมาณ 1 เซลล์ต่อหลุม เพื่อให้ได้กลุ่มเซลล์ที่เกิดจากเซลล์เดียว และตรวจหาแอนติบอดีที่ได้อีกครั้ง โดยวิธี indirect ELISA

### 3.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ โดยวิธี indirect ELISA

นำ OVA-CPAOZ หรือ OVA-CPAOZ มาเคลือบบนพื้นหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ล้างด้วยบัฟเฟอร์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากแต่ละหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เติมน้ำแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti-mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) เชื่อมอยู่ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ และเติมสารละลายสับสเตรคของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ละลายใน citrate buffer ที่ pH 7 เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดซัลฟิวริก เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำจาน ELISA ชนิด 96 หลุมมาวัดการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

### 3.6 ทดสอบลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีที่ได้

#### 3.6.1 หาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยทำการทดลองตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม Isotyping

specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในงาน ELISA ชนิด 96 หลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-12 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำงานสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HRP-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำงานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ  $H_2O_2$  ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5M  $H_2SO_4$  หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำงาน FLISA ชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA reader

### 3.6.2 การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

ทำการทดสอบคุณสมบัติลักษณะของแอนติบอดีได้โดยวิธี competitive ELISA โดยใช้สารในกลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (3-amino-2-oxazolidinone; AOZ), 5-เมทิลมอร์โฟลิโน-3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน (5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone; AMOZ), 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin; AHD), เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide; SEM), 3-(2-ไนโตรเฟนิลเมธิลีนอะมิโน-2-(ออกซาโซลิดิโนน (3-[[2-(2-nitrophenyl) methylene] amino/-2-oxazolidinone; NPAOZ), NPAMOZ, NPAHD, NPSEM และสารนอกกลุ่มจำพวกยาปฏิชีวนะต่างๆ เช่น เอนโรฟลอร์กซาซิน นอร์ฟลอร์กซาซิน คลอแรมเฟนิคอล เพนิซิลลิน เตตราไซคลิน ซัลฟาเมทาซีน และ สเตราปโตมัยซิน เป็นสารแข่งจับ เตรียมสารต่างๆ ที่ความเข้มข้น 10-0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน PBS โดยทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.5

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

$$\text{โดย } IC_{50} = 50\% B/Bo$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ



$B_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของสาร} \times 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบการแย่งจับ}}$$

### 3.6.3 การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี competitive indirect ELISA โดยคิดเป็น limit of detection (LOD) โดย LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

$$\text{โดย } LOD = B_0 - 3SD$$

เมื่อ  $B_0$  คือ ค่าดูดกลืนแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ผสมเซลล์นูเทอรอล  
SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## 3.7 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในระดับขวดเขย่า

### 3.7.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

ใช้อาหาร RPMI 1640 ที่นำมาเติม Sodium bicarbonate, Glucose, L-Glutamine และ Sodium pyruvate แล้วกรองผ่านเครื่องกรองที่มี membrane ขนาด  $0.22\mu\text{m}$

### 3.7.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มต้น

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกมาเลี้ยงใน T-flasks ขนาด 175cm<sup>2</sup> โดยใส่ media ปริมาตร 200ml ที่มี fetal calf serum (FCS) %10 (บ่มในตู้ที่ อุณหภูมิ 37 เซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

### 3.7.3 การศึกษาลักษณะการเจริญของไฮบริโดมา

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน T-flasks ขนาด 75 cm<sup>2</sup> เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บ culture media ทุกวัน นำไปนับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี

## 3.8 การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโปรตีน เอ เซฟาโรส 1.5 กรัม มาทำให้พองตัว (swell) โดยแช่ใน PBS 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเติมใส่คอลัมน์ จากนั้นทำคอลัมน์ให้สมดุลโดยเติม 0.1M phosphate buffer, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอเซฟาโรส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีให้เท่ากับ pH 8.1 โดยใช้บัฟเฟอร์ 1 M Tris, pH 9 ก่อนนำมาเติมลงในคอลัมน์โปรตีน เอ โดยให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติม

0.1M phosphate buffer, pH 8 ลงในคอลัมน์โปรตีน เอเซฟาโรส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วทำการชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ โดยการเติม 0.1M citrate buffer, pH 3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมกับการใช้หลอดทดลองที่มี 4M Tris ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โปรตีน เอ เซฟาโรส โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีค่าดูดกลืนแสงมารวมกันก่อนนำไปโคแอลิซิสใน PBS โดยเปลี่ยน PBS 4 ครั้ง

### 3.9 การเตรียมชุดตรวจสอบสารAOZ และ AMOZ โดยหลักการ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

#### 3.9.1.1 เตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยอาศัยหลักการ ELISA 3 แบบ

##### 3.9.1.1.1 Antibody captured indirect competitive ELISA (rabbit anti-mouse IgG-HRP)

หาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน CPAMOZ-OVA ความเข้มข้น 3, 2, 1, 0.5, 0.250, 0.125 และ 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเติมใน จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางที่ความเข้มข้น 1.5 - 0.024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HRP-Rabbit anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:10000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของแอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ  $H_2O_2$  ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาแอนไซม์ โดยเติม 1M  $H_2SO_4$  หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader พิจารณาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาทำ competitive indirect ELISA โดยทำตามขั้นตอน indirect ELISA เบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว แต่จะเติมสารอิสระ AMOZ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ NPAMOZ ที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปพร้อมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 0.1875 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีของ AOZ นั้นก็ทำในทำนองเดียวกัน

### 3.9.1.2 Antigen captured direct competitive ELISA

หาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมด้วยวิธี direct ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96หลุมด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AMOZ เจือจางที่ความเข้มข้น 1.5-15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมนสารละลาย 1%BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม AMOZ เชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP ที่ความเข้มข้น 0.425 – 3.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST เติมนสารละลายสับสเตรทของเอ็นไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอ็นไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 7.5 และ 0.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาทำ competitive direct ELISA โดยทำตามขั้นตอน direct ELISA เบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว แต่จะเติมนสารอิสระ AMOZ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ NPAMOZ ที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมนลงไปพร้อมกับ AMOZ เชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP 0.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีของ AOZ นั่นก็ทำในทำนองเดียวกัน

### 3.9.1.3 Antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP)

หาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมด้วยวิธี direct ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96หลุมด้วยแอนติเจน AMOZ-OVA ที่ความเข้มข้น 0.156-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาล้างด้วย PBST เติมนสารละลาย 1%BSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST เติม โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AMOZ เชื่อมติดกับไบโอตินเจือจางที่ความเข้มข้น 1:1000 – 1:128000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST เติมนสารละลาย Streptavidin ที่มี HRP เชื่อมอยู่ 1:2000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBST เติมนสารละลายสับสเตรทของเอ็นไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอ็นไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1:4000 ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาทำ competitive direct ELISA โดยทำตามขั้นตอน direct ELISA เบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว แต่จะเติมนสารอิสระ AMOZ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ NPAMOZ ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมนลงไปพร้อมกับ แอนติบอดีต่อ AMOZ เชื่อมติดกับไบโอติน 1:4000 ในกรณีของ AOZ นั่นก็ทำในทำนองเดียวกัน

### 3.9.2 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

วิเคราะห์ความไวของการตรวจวัด (sensitivity) หรือปริมาณของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถวัดได้ (lower limit of detection) ของชุดตรวจ 3 แบบที่เตรียมในข้อ 3.9.1 ทำการเลือกรูปแบบที่เหมาะสมหรือให้ความไวสูงสุดในการตรวจวัดมาทำการประเมินความถูกต้องและความแม่นยำของผลการตรวจวัด และทำการเปรียบเทียบกับผลการตรวจสอบโดยชุดตรวจสอบต้นแบบผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS และนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ

#### 3.9.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกึ่ง

ชั่งเนื้อกึ่งบดละเอียดขนาด  $1 \pm 0.05$  กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 100 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน AMOZ ที่ละลายใน methanol ความเข้มข้นต่างกัน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.125 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ (หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก ) HCl) ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10 มิลลิโมลาร์ ของ 2-NBA (2-Nitrobenzaldehyde; ละลายใน DMSO) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้) (ปิดฝาหลอด นำมาปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที นำไปปั่นที่ 35 – 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Overnight) ใน water bath เขย่าที่ 80 รอบต่อนาที หลังจากนั้น วางให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง เติม 0.1 โมลาร์ ของ  $K_2HPO_4$  ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 1 นอร์มอล ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม ethyl acetate 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายที่เป็นชั้น ethyl acetate (ชั้นด้านบน ( ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายส่วนที่เหลือในหลอดด้วย เฮกเซน (n-hexane) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กับ สารละลายบัฟเฟอร์ (0.01 โมลาร์ PBS) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาส่วนบน (ชั้น Hexane) ออก เอาส่วนล่างที่เป็นชั้นของ บัฟเฟอร์ที่มีสารในรูป NP-AMOZ ไปทำ ELISA ต่อไป

#### 3.9.2.2 ประเมินความแม่นยำของการวิเคราะห์ด้วยชุด ELISA ต้นแบบ

การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบ จะได้จากการศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (intra-variation assay (และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง) inter-variation assay (

โดย intra-variation assay ได้จากการหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน(%CV) ของการวิเคราะห์ 12 ซ้ำ โดย %CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งคำนวณได้จาก

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

mean

โดยที่ mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร  
SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

ส่วน inter-variation assay นั้น ได้จากทดสอบตัวอย่างเดียวกัน 4 ครั้ง ที่เวลาต่างกัน โดยที่แต่ละครั้งทำ 12 ชั่วโมง เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า %CV ของทั้ง 48 ชั่วโมง

### 3.9.2.3 ประเมินความถูกต้องของการวิเคราะห์ด้วยชุด ELISA ดันแบบ

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า %recovery โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมสารปริมาณต่างๆ ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาหาค่า %recovery จากสูตรดังนี้

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ปริมาณของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณของสารที่เติมลงไป}} \times 100$$

### 3.9.2.4 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี ELISA กับ LC-MS

ซึ่งเนื้อกึ่งบดละเอียดขนาด  $1 \pm 0.05$  กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง นำมาเติม 100 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน AMOZ ที่ละลายใน methanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 2.5, 1, 0.6, 0.3 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชุดที่ 1 จะนำมาสกัดเพื่อนำไปตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจ ELISA ดันแบบ และชุดที่ 2 นำส่งไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เติมด้วยวิธี LC-MS/MS ที่ ห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

#### 4.1. การกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี

ทำการกระตุ้นหนูทดลองโดยใช้ CPAOZ-cBSA หรือ CPAMOZ-cBSA จำนวน 4 ครั้ง แล้วเก็บซีรัมไปตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า จากการทดสอบ indirect ELISA ของตัวอย่างซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CPAMOZ-cBSA ทั้ง 5 ตัวจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าตัวอย่างซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้น แสดงว่าหนูทดลองทุกตัวสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ได้ (ตารางที่ 4.1) จึงได้ทำการตรวจความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ CPAMOZ, NPAMOZ และ AMOZ ในรูปอิสระ (ไม่ได้ทำการเชื่อมต่อ) ด้วยวิธี competitive indirect ELISA โดยอาศัยหลักการแข่งขันของสารในรูปอิสระที่เติมลงไป แข่งขันกับสารที่เชื่อมต่อกับ OVA ที่เคลือบอยู่บนก้นหลุมในการจับกับแอนติบอดี ถ้าแอนติบอดีสามารถจับกับสารในรูปอิสระได้จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA ลดต่ำลง เนื่องจากเมื่อแอนติบอดีจับกับสารในรูปอิสระแล้วจะถูกล้างออกไป เหลือแอนติบอดีน้อยลงในการไปจับกับสารที่ก้นหลุม ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอิสระในการแข่งขัน จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลงแสดงว่าแอนติบอดีสามารถจับกับสารในรูปอิสระได้ (ตารางที่ 4.2) จึงใช้หนูทั้ง 5 ตัวในการหลอมรวมเซลล์เพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

ในกรณีของ AOZ ได้ทำการกระตุ้นหนูทดลอง 6 ตัวด้วย CPAOZ-cBSA เมื่อทำการตรวจการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า หนูทุกตัวสร้างแอนติบอดีต่อ CPAOZ (ตารางที่ 4.3) (หลังจากนั้นทำการตรวจความสามารถของแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 4-1 ในการจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระ (ไม่ได้ทำการเชื่อมต่อ) ด้วยวิธี competitive indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับ CPAOZ ในรูปอิสระได้ ส่วนในการทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 5 และ 6 นั้นได้ทำการทดสอบกับ CPAOZ, NPAOZ และ AOZ พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับทุกอนุพันธ์ในรูปอิสระได้ (ตารางที่ 4.4) ดังนั้นจึงใช้หนูทดลองทั้ง 6 ตัวในการหลอมรวมเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.1 การทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ CPAMoz ด้วยวิธี indirect ELISA

ความเจือจางของซีรัม	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร					
	ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (ตัวควบคุมลบ)	หนูตัวที่ 1	หนูตัวที่ 2	หนูตัวที่ 3	หนูตัวที่ 4	หนูตัวที่ 5
1:500	0.136	2.654	2.060	2.273	2.090	2.694
1:1000	0.117	2.653	1.239	2.112	1.592	2.701
1:2000	0.092	1.929	0.776	1.752	1.391	2.434
1:4000	0.131	1.313	0.450	1.654	1.106	2.145
1:8000	0.171	0.840	0.314	1.276	0.753	1.362
1:16000	0.141	0.509	0.255	0.956	0.645	0.847
1:32000	0.138	0.314	-	0.750	0.437	0.491
1:64000	0.088	0.255	-	0.498	0.339	0.347

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการจับสาร AMoz และอนุพันธ์ในรูปอิสระของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ซีรัม (ความเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร									
	ไม่เติมสารอิสระ	เติมสารอิสระ CPAMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			เติมสารอิสระ NPAMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			เติมสารอิสระ AMoz (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
หนูตัวที่ 1 (1:8000)	0.840	0.778	0.248	0.148	0.361	0.180	0.130	0.673	0.589	0.554
หนูตัวที่ 2 (1:2000)	0.775	0.463	0.349	0.279	0.404	0.184	0.144	0.500	0.511	0.620
หนูตัวที่ 3 (1:4000)	1.276	0.717	0.258	0.122	0.220	0.175	0.140	0.825	0.860	0.810
หนูตัวที่ 4 (1:4000)	1.106	0.352	0.205	0.143	0.383	0.258	0.130	0.551	0.531	0.508
หนูตัวที่ 5 (1:8000)	1.315	0.995	0.291	0.252	1.046	0.904	0.297	1.190	1.046	1.044
*ตัวควบคุมลบ	0.195	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*ตัวควบคุมลบคือซีรัมของหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (เจือจาง 1:2000 ใน PBS)

ตารางที่ 4.3 การทดสอบการสร้างแอนติบอดีต่อ CPAOZ ด้วยวิธี indirect ELISA

ความเจือจางของซีรัม	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร						
	ซีรัมหนูที่ไม่ได้ รับการกระตุ้น (ตัวควบคุมลบ)	หนูตัวที่ 1	หนูตัวที่ 2	หนูตัวที่ 3	หนูตัวที่ 4	หนูตัวที่ 5	หนูตัวที่ 6
1:500	0.070	2.384	1.373	2.653	2.575	2.264	1.672
1:1000	0.090	1.269	0.953	1.787	1.817	1.631	0.926
1:2000	0.110	0.871	0.534	1.205	1.235	1.420	0.665
1:4000	0.140	0.489	0.430	0.603	0.837	1.067	0.459
1:8000	0.120	0.286	0.256	0.409	0.488	0.859	0.355
1:16000	0.115	0.144	0.226	0.380	0.316	0.657	0.242
1:32000	0.080	0.094	0.097	0.073	0.215	0.501	0.194

ตารางที่ 4.4 การทดสอบความสามารถในการจับสาร AOZ และอนุพันธ์ในรูปอิสระของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ซีรัม (ความเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร									
	ไม่เติม สารอิสระ	เติมสารอิสระ CPAMAZ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			เติมสารอิสระ NPAMAZ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			เติมสารอิสระ AMAZ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		
		1	10	100	1	10	100	1	10	100
หนูตัวที่ 1 (1:1000)	1.214	-	0.345	0.193	-	-	-	-	-	-
หนูตัวที่ 2 (1:1000)	1.313	-	0.385	0.297	-	-	-	-	-	-
หนูตัวที่ 3 (1:1000)	1.692	-	0.578	0.268	-	-	-	-	-	-
หนูตัวที่ 4 (1:1000)	2.275	-	0.984	0.807	-	-	-	-	-	-
หนูตัวที่ 5 (1:4000)	0.839	0.329	0.184	0.127	0.448	0.353	0.165	0.588	0.518	0.489
หนูตัวที่ 6 (1:4000)	0.756	0.267	0.187	0.121	0.338	0.226	0.194	0.486	0.429	0.385
*ตัวควบคุมลบ	0.081	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*ตัวควบคุมลบคือซีรัมของหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้น



## 4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

### 4.2.1 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาต่อ AMOZ

ในการเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CPAMOZ ด้วยการหลอมรวมเซลล์ 5 ครั้งโดยใช้หนูทั้ง 5 ตัวที่ได้รับการกระตุ้น พบว่าในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 และ 2 สามารถเลือกเซลล์ไฮบริโดมาได้ 54 และ 4 หลุม (จากทั้งหมด 576 หลุม) ตามลำดับ แต่ในขั้นเตรียมเซลล์ให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวต่อมาพบว่าเซลล์เหล่านี้สูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่จับกับ CPAMOZ ไป ส่วนในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 พบว่ามีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขึ้นจำนวนมากซึ่งรบกวนการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ทำให้เซลล์ไฮบริโดมาไม่สามารถเจริญได้ และตายในที่สุด ต่อมาในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 สามารถเลือกเซลล์ไฮบริโดมาได้ 20 หลุม จากทั้งหมด 672 หลุม และการทดสอบความสามารถในการจับกับ CPAMOZ พบว่าสามารถเตรียมเป็นเซลล์เดี่ยวได้ 1 โคลน คือ 4G1 (ตารางที่ 4.5) และจากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 สามารถคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาได้ 88 หลุม จากทั้งหมด 768 หลุม หลังจากการทดสอบการสร้างแอนติบอดีและคัดเลือกซ้ำสามารถเตรียมเป็นเซลล์เดี่ยวได้ 20 โคลน (ตารางที่ 4.6) ซึ่งแบ่งได้ออกเป็นสองกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 7 โคลน ได้แก่ โคลน 2E9 4F1 4H3 5A7 7G4 7H8 และ 8B1.1 ซึ่งจะสามารถจับกับ CPAMOZ-OVA ได้ดีแต่จับกับ AMOZ-OVA ได้ไม่ดี ส่วนกลุ่มที่ 2 มี 13 โคลน ได้แก่ 1F2 2E5.1 2H6 5F1 5G10.2 5G10.3 5H7 6B3.1 6B3.2 6B3.3 6G2 8B4 และ 8E2 ซึ่งสามารถจับกับทั้ง CPAMOZ-OVA และ AMOZ-OVA ได้ดี

ตารางที่ 4.5 การทดสอบแอนติบอดีของ โคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ต่ออนุพันธ์ของ AMOZ

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
4G11	2.469	2.649	2.589
*ตัวควบคุมบวก	1.583	1.655	1.241
*ตัวควบคุมลบ	0.113	0.172	0.154

\* ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ที่ความเจือจาง 1:4000

\* ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้นที่ความเจือจาง 1:4000

ตารางที่ 4.6 การทดสอบแอนติบอดีของโคสนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่ออนุพันธ์ของ AMOZ

รหัสเซลล์ ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร					
	แอนติเจน CPAM0Z-OVA			แอนติเจน AMOZ-OVA		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
2E9	2.048	2.042	1.863	0.354	0.423	0.521
4F1	2.284	2.258	1.278	0.828	0.523	0.426
4H3	1.830	2.109	2.063	0.679	0.316	0.348
5A7	0.856	0.479	0.425	0.250	0.131	0.122
7G4	1.989	1.821	1.765	0.546	0.430	0.350
7H8	2.211	2.043	1.861	0.493	0.475	0.419
8B1.1	1.907	2.199	2.165	1.024	1.151	1.007
1F2	2.444	2.337	2.364	1.088	1.548	1.732
2E5.1	2.397	1.988	2.077	1.387	1.324	1.127
2H6	1.499	0.924	1.598	0.844	0.520	0.804
5F1	1.241	1.468	1.790	0.708	0.546	0.979
5G10.2	2.001	1.727	2.037	1.095	1.371	1.055
5G10.3	2.331	2.239	1.945	0.913	0.925	1.030
5H7	2.512	2.073	1.620	0.987	1.109	0.625
6B3.1	1.571	1.730	1.832	0.463	0.721	0.775
6B3.2	1.935	1.878	1.630	0.744	0.484	0.975
6B3.3	1.820	1.555	1.018	0.625	0.804	0.567
6G2	2.016	1.631	1.939	1.269	1.137	1.219
8B4	2.154	2.438	2.250	1.129	1.266	1.330
8E2	2.442	2.518	1.941	1.387	1.183	1.024
*ตัวควบคุมบวก	1.223	1.107	1.382	0.830	0.842	0.715
*ตัวควบคุมลบ	0.119	0.080	0.146	0.150	0.172	0.187

\* ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่ความเจือจาง 1: 8000

\* ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้น ที่ความเจือจาง 1: 8000

#### 4.2.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาต่อ A0Z

ในการเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CPA0Z ด้วยการหลอมรวมเซลล์ 5 ครั้งโดยใช้หนูตัวที่ 1,2 และ 4-6 (หนูตัวที่ 3 เกิดเสียชีวิตระหว่างการเลี้ยง) พบว่าในการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4-1 ไม่สามารถเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อ CPA0Z เนื่องจากเซลล์จากการหลอมรวมไม่สามารถรอดชีวิตในอาหารที่ใช้คัดเลือกได้ แต่ในการหลอมรวมครั้งที่ 5 สามารถเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาได้ 2 โคลน คือ 2/H11 และ 9/C7 (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 การทดสอบแอนติบอดีของ โคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ต่ออนุพันธ์ของ A0Z

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร	
	แอนติเจน CPA0Z-OVA	แอนติเจน A0Z-BSA
2/H11	1.299	1.654
9/C7	1.092	0.594
*ตัวควบคุมบวก	1.030	1.554
*ตัวควบคุมลบ	0.068	0.087

\* ตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูที่นำม้ามมาหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 ที่ความเจือจาง 1: 4000

\* ตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูทดลองก่อนฉีดกระตุ้น ที่ความเจือจาง 1: 4000

#### 4.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.3.1 ลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ A0Z

###### 4.3.1.1 การตรวจสอบไอโซไทป์

จากผลการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 และ 5 จำนวน 1 และ 20 โคลน (ภาคผนวก ตาราง ก) ด้วยการใช้ Isotyping test kit ซึ่งอาศัยหลักการของ ELISA พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 จำนวน 1 โคลน ได้แก่ 4G11 มีไอโซไทป์เป็นชนิด IgG1 สำหรับการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 5 จำนวน 20 โคลนมีไอโซไทป์หลากหลายซึ่งแบ่งได้ 3 ไอโซไทป์ ได้ดังนี้ IgG2b มีทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ 1F2, 2H5.1, 5A7, และ 7H8 IgG2a มีทั้งหมด 1 โคลน ได้แก่ 4F1 และอีก 15 โคลนที่เหลือ มีไอโซไทป์ เป็น IgG1 ได้แก่ 2E9, 2H6, 4H3, 5F1, 5G10.2, 5G10.3, 5H7, 6B3.1, 6B3.2, 6B3.3, 6G2, 7G4, 8B1.1, 8B4 และ 8F2

#### 4.3.1.2 การทดสอบความจำเพาะ

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้มีจำนวนทั้งสิ้น 21 โคลนจึงได้ทำการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียง 5 โคลน ได้แก่ 2E5.1, 2H6, 4F1, 7H8 และ 8B 1.1 มาทำการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยแสดงค่าความจำเพาะในรูปของเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม (% cross-reactivity) กับสารต่างๆ ที่สนใจ จากการทดลองพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 2E5.1 และ 2H6 สามารถจับกับสาร CPAMOZ (ใช้ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง) NPAMOZ (อนุพันธ์ที่ใช้สำหรับตรวจหาสารตกค้างชนิดนี้ด้วยเทคนิคทางเคมี) AMOZ (สารแม่แบบไฮโดรไลต์) และ FTD (parent drug) ได้ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 4F1, 7H8 และ 8B1.1 ไม่สามารถจับกับ AMOZ ได้และที่สำคัญคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลนที่คัดเลือกมาไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในโตรฟูแรนตัวอื่นๆ หรือสารนอกกลุ่มตัวอื่นๆ ที่ทำการทดสอบ ซึ่งจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามน้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากทั้ง 5 โคลนมีศักยภาพในการใช้พัฒนาชุดตรวจแบบจำเพาะได้

#### 4.3.1.3 การทดสอบความไว

ทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร CPAMOZ NPAMOZ AMOZ และ FTD ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยแสดงค่าความไวอยู่ในรูปของค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ (limit of detection, LOD) และ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดปริมาณได้ (limit of quantification, LOQ) จากการทดลองพบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก 2 โคลน ได้แก่ 2E5.1 และ 8B1.1 ที่ให้ค่า LOD ต่อ NPAMOZ เท่ากับ 0.135ppb ซึ่งต่ำกว่าค่า MRPL (0.3 ppb) ที่กำหนดไว้ (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก ตาราง ข) จึงได้นำโคลน 2E5.1 และ 8B1.1 ไปทำการผลิตแอนติบอดีเพื่อเพิ่มปริมาณและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 4.3.2 ลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ

##### 4.3.2.1 การตรวจสอบไอโซไทป์

จากการหลอมรวมเซลล์สามารถคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดได้จาก 2 หลุมคือ 9/C7 และ 2/H11 เมื่อนำมาทำให้เป็นโคลนสามารถเตรียมได้ 12 โมโนโคลน โดยที่โมโนโคลนรหัส AOZ#1-AOZ#6 เป็นโคลนที่มาจากหลุม 9/C7 ส่วนโมโนโคลนรหัส AOZ#7-AOZ#12 เป็นโคลนที่มาจากหลุม 2/H11 เมื่อนำโมโนโคลนทั้งหมดไปทำการหาไอโซไทป์พบว่าทุกโคลนเป็นชนิด IgG<sub>1</sub> (ภาคผนวก ตาราง ค)

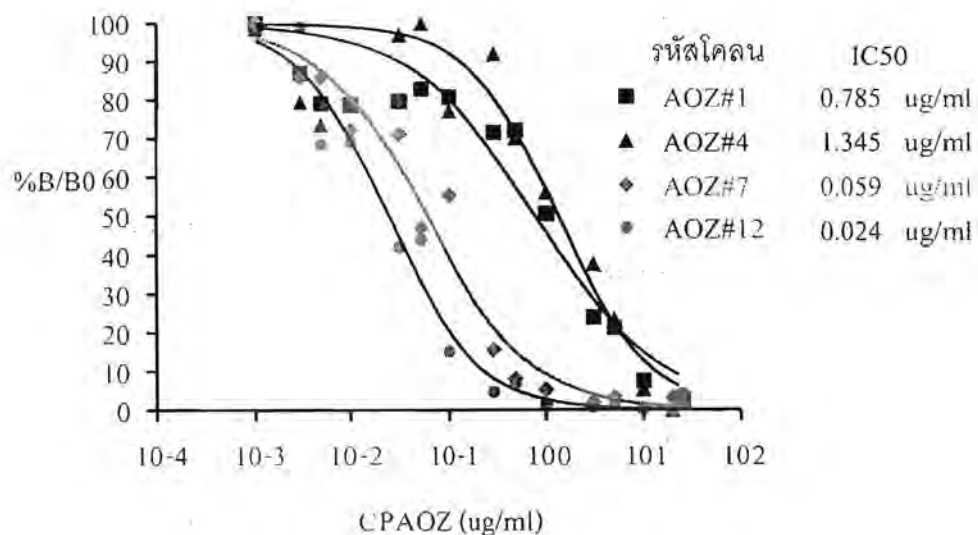
127968984

ตารางที่ 4.8 ค่าการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity ; CR) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AMOZ

Competitors		2E5.1		2H6		4F1		7H8		8B1.1	
		CR (%)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	CR (%)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	CR (%)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	CR (%)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	CR (%)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)
Nitrofurans	CPAMOZ (Derivative form)	100.00	1.185	100.00	15.320	100.00	43.380	100.00	150.900	100.00	1.196
	NPAMOZ (Derivative form)	74.34	1.594	336.48	4.553	75.37	57.560	208.60	72.340	9.37	12.770
	AMOZ (Metabolite form)	7.91	14.980	16.90	90.630	-	-	-	-	-	-
	Furaltadone (FTD;parent drugs)	333.80	0.355	2061.91	0.743	1981.73	2.189	859.34	17.560	202.37	0.591
	Furazolidone (FZD)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	AOZ (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	NPAOZ (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Nitrofurantcin (NFT)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	AHD (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	NPAHD (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Nitrofurazone (NFZ)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	SCA (Metabolite form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	NPSCA (Derivative form)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
β-agonists	Clenbuteral	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Salbutamal	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
Antibiotics	Chloramphenicol (CAP)	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Norfloracin	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	PenicilinG	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Flumequine	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000
	Oxytetracycline	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000	< 0.01	>10,000

#### 4.3.2.2 การทดสอบความไว

โมโนโคลน AOZ#1 ถึง AOZ#6 มาจากเซลล์หลุมต้นแบบ 9/C7 และมีไอโซไทป์ เป็น IgG1 เช่นเดียวกันจึงคาดว่า AOZ#1 ถึง AOZ#6 เป็นโมโนโคลนมาจากหลุมต้นแบบเดียวกันจึง ทำการเลือกมา 2 โคลน คือ AOZ#1 และ AOZ#4 ส่วนโมโนโคลน AOZ#7 ถึง AOZ#12 มาจาก เซลล์หลุมต้นแบบ /2III1 และมีไอโซไทป์ IgG1 ทั้งหมดเช่นเดียวกันจึงคาดว่า AOZ#7 ถึง AOZ#12 เป็นโมโนโคลนมาจากหลุมต้นแบบเดียวกันจึงทำการเลือกมา 2 โคลน คือ AOZ#7 และ AOZ#12 สำหรับทำการทดสอบหาความไวเบื้องต้นด้วยวิธี indirect ELISA โดยดูที่ค่า  $IC_{50}$  พบว่าแอนติบอดี จากโคลน AOZ#12 มีแนวโน้มที่จะมีความไวสูงเนื่องจากให้ค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.024 ppm (รูปที่ 10.3) จากนั้นจึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี AOZ#12 มาทำการหาความไวต่อ AOZ และ อนุพันธ์พบว่า ค่า LOD ของ NPAOZ มีค่าสูงถึง 55.46ppb ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่า MRPL ที่มี การกำหนดไว้ที่ 0.3ppb มาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในการพัฒนาเป็นชุดตรวจต่อไป



รูปที่ 4.1 การทดสอบความไวเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AOZ#1, 4, 7 และ 12 ต่อสาร CPaoZ

#### 4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบสำหรับตรวจ AMOZ

ทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยอาศัยหลักการ ELISA 3 แบบ คือ

- Antibody captured indirect competitive ELISA (rabbit anti-mouse IgG-HRP)
- Antigen captured direct competitive ELISA
- Antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP)

โดยในการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบจะทำการหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับเตรียมจานหลุมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์แบบต่างๆ โดยจะใช้ค่าความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA สูงกว่า 1 จากนั้นจึงทำการเตรียมจานหลุมด้วยความเข้มข้นของแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่เหมาะสม ทำการวิเคราะห์เพื่อหาค่า LOD ของชุดต้นแบบทั้ง 3 แบบ ) ได้ผลสรุปดังตารางที่ 4.9 (พบว่า ชุดต้นแบบในรูปแบบที่ 3 จะมีค่า LOD (0.06 ppb) ต่ำที่สุดและต่ำกว่าค่า MRPL (0.3 ppb) จึงเลือกรูปแบบนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานต่อไป

ตารางที่ 4.9 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี ELISA แบบต่างๆ ต่อสาร AMOZ และ NPAMOZ

ชุดตรวจสอบต้นแบบ	AMOZ		NP-AMOZ	
	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Antibody captured indirect competitive ELISA (rabbit anti-mouse IgG-HRP)	5.33	0.50	2.09	0.11
Antigen captured direct competitive ELISA	16.20	1.24	3.70	0.45
Antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP)	1.62	0.13	0.63	0.06

#### 4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ AMOZ ต้นแบบ

ทำการเตรียมชุดตรวจ AMOZ ต้นแบบโดยอาศัยหลักการ antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) แล้วทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ ELISA โดยทำการเติม AMOZ ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปในตัวอย่างเนื้อกึ่ง ทำการสกัดสารและเปลี่ยนอนุพันธ์ให้เป็น NPAMOZ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารที่ได้โดยใช้ชุดตรวจ ELISA ต้นแบบเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS-MS (ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลางมหาวิทยาลัยเกษตร (โดยในส่วนของกรวิเคราะห์ด้วย ELISA นั้นจะพิจารณาค่าความแม่นยำของการตรวจทั้งแบบ intra-variation และ inter-variation ซึ่งจะบอกถึงความแปรปรวนของการตรวจในเพลตเดียวกันและต่างเพลตกันตามลำดับ โดยแสดงอยู่ในรูปของค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย หรือ %CV (percent coefficient of variation) ซึ่งค่าที่ยอมรับได้โดยทั่วไปนั้นจะต้องไม่เกิน 20%

และพิจารณาค่าความถูกต้องของการตรวจโดยแสดงอยู่ในรูปของค่า %recovery ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณสารที่เติมลงไปและปริมาณสารที่วัดได้ โดย % recovery ที่ได้ควรอยู่ในช่วง 80 - 120 % จากผลการทดลองพบว่า เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ในเฟลตเดียวกันโดยเมื่อเติมสาร AMOZ ที่ทราบปริมาณในช่วงความเข้มข้น 10- 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) จะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 16.1-0.03 % และ % recovery อยู่ในช่วง 80.4 - 124 % แต่เมื่อความเข้มข้นของสารที่เติมลงไปต่ำกว่า 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ค่า MRPL) ค่า %CV จะมีค่าสูงกว่า 20% (ตารางที่ 4.10) และเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ระหว่างเฟลตจะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01- 7.43 % และ % recovery อยู่ในช่วง 72.5 - 157 % (ตารางที่ 4.11) จากผลการวิเคราะห์ความแม่นยำของชุดตรวจ ELISA ต้นแบบโดยภาพรวมได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าจะมีผลการทดสอบบางค่าที่ไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ ประสิทธิภาพของเครื่องอ่านผลซึ่งอ่านค่าการดูดกลืนแสงในทุกๆ หลุมของเฟลตนั้นได้ไม่เท่ากัน และความเข้มข้นของสารที่วัดนั้นแม้ว่าจะสูงกว่าค่า LOD (0.06 ppb) แต่ก็ใกล้เคียงกับค่า LOQ ของชุดทดสอบซึ่งเท่ากับ 0.2ppb

นอกจากนี้ได้ทำการประเมินความถูกต้องของการวัดโดยการเติมสาร AMOZ ในปริมาณที่ทราบแน่นอนลงในตัวอย่างเนื้อกุ้ง ทำการสกัดและเปลี่ยนอนุพันธ์สารให้อยู่ในรูป NPAMOZ แล้ววิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบโดยใช้ชุดตรวจ ELISA ต้นแบบและ LC/MS-MS พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่ากำลังสองของความแตกต่าง ( $\Delta^2$ ) เท่ากับ 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) และเมื่อนำผลการวิเคราะห์ไปวาดกราฟเพื่อดูความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ (รูปที่ 4.2) จะได้ค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.9809 แสดงว่าการวิเคราะห์ปริมาณ AMOZ โดยการใชชุด ELISA ต้นแบบที่เตรียมขึ้นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS-MS



ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจในเพลตเดียวกันของชุดตรวจ antibody captured indirect competitive EI ISA (Streptavidin-HRP)

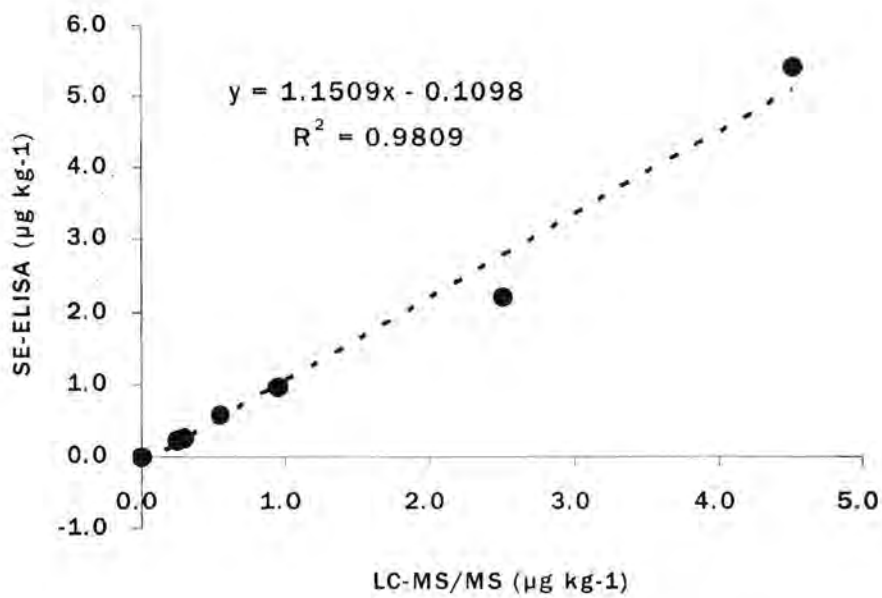
Fortified conc. ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Number of sample	Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)	Recovery (%)
10	6	11.4 $\pm$ 0.00	0.03	114.0
5	19	6.18 $\pm$ 0.02	0.25	124.0
3	19	3.30 $\pm$ 0.07	1.32	110.0
2.5	6	2.23 $\pm$ 0.01	0.26	89.1
1	19	0.81 $\pm$ 0.09	8.14	81.3
0.6	19	0.48 $\pm$ 0.13	15.30	80.4
0.5	6	0.50 $\pm$ 0.02	4.05	100.0
0.3	19	0.27 $\pm$ 0.07	16.10	90.7
0.25	6	0.24 $\pm$ 0.06	25.60	97.2
0.125	6	0.12 $\pm$ 0.06	51.20	98.4

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจต่างเพลตกันของชุดตรวจ antibody captured indirect competitive EI ISA (Streptavidin-HRP)

Fortified conc. ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Number of sample	Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV (%)	Recovery (%)
10	10	8	10.2 $\pm$ 0.00	0.01
5	5	8	6.47 $\pm$ 0.02	0.07
3	3	8	4.71 $\pm$ 0.00	0.03
2.5	2.5	8	3.00 $\pm$ 0.02	0.17
1	1	8	1.11 $\pm$ 0.04	1.31
0.6	0.6	8	0.66 $\pm$ 0.02	0.83
0.5	0.5	8	0.63 $\pm$ 0.00	0.12
0.3	0.3	8	0.36 $\pm$ 0.02	1.99
0.25	0.25	8	0.18 $\pm$ 0.02	4.17
0.125	0.125	8	0.15 $\pm$ 0.03	7.43

ตารางที่ 4.12 การวัดปริมาณสาร AMOZ ด้วยชุดตรวจ ELISA ดัชนีแบบและ LC-MS/MS

Fortified Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Measured Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	FLISA		LC-MS/MS	
	Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\Delta^2$	Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\Delta^2$
5.00	5.41	0.1700	4.54	0.2116
2.50	2.21	0.0855	2.50	0.0000
1.00	0.97	0.0009	0.95	0.0025
0.60	0.59	0.0002	0.54	0.0036
0.30	0.26	0.0014	0.29	0.0001
0.25	0.22	0.0009	0.24	0.0001
SUM	-	0.26	-	0.22



รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการวิเคราะห์สาร AMOZ ด้วยชุดตรวจ ELISA ดัชนีแบบกับ LC-MS/MS

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการเตรียมอนุพันธ์ของ AMOZ และ AOZ ให้อยู่ในรูปของ CPAMOZ และ CPAOZ และนำไปเชื่อมต่อกับ cBSA นำสารเชื่อมต่อดังกล่าวฉีดกระตุ้นหนูเพื่อให้สร้างแอนติบอดี ซึ่งหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นสามารถสร้างแอนติบอดีและจับกับสารอนุพันธ์ในรูปอิสระได้ ต่อมาได้ทำการหลอมรวมเซลล์เพื่อเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา และทำการคัดเลือกให้ได้เป็นโมโนโคลนที่สามารถสร้างแอนติบอดีและจับกับอนุพันธ์ในรูปสารอิสระได้ โดยในกรณีของ CPAMOZ สามารถเตรียมได้ 20 โคลน ส่วนของ CPAOZ สามารถเตรียมได้ 2 โคลน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสมบัติของแอนติบอดีที่ได้พบว่าแอนติบอดีต่อ AMOZ มีความจำเพาะและความไวสูงเพียงพอต่อการพัฒนาชุดตรวจ แต่แอนติบอดีต่อ AOZ ที่ได้มีความไวไม่เพียงพอต่อการใช้งาน นำแอนติบอดีต่อ AMOZ มาทำการเตรียมชุดตรวจ ELISA ใน 3 รูปแบบพบว่าชุดต้นแบบในรูปแบบของ Antibody captured indirect competitive ELISA (Streptavidin-HRP) จะมีค่า LOD (0.06 ppb) ต่ำที่สุดและต่ำกว่าค่า MRPL (0.3 ppb) จึงเลือกรูปแบบนี้มาทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจต้นแบบโดยใช้ตัวอย่างเนื้อกึ่งที่เติมสาร AMOZ ลงไปพบว่าสำหรับ intra-variation assay จะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 16.1-0.03 % และ % recovery อยู่ในช่วง 80.4 - 124 % แต่เมื่อความเข้มข้นของสารที่เติมลงไปต่ำกว่า 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ค่า MRPL) ค่า %CV จะมีค่าสูงกว่า 20% ในส่วนของ inter-variation assay จะได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01- 7.43 % และ % recovery อยู่ในช่วง 72.5 - 157 % จากผลการวิเคราะห์ความแม่นยำของชุดตรวจ ELISA ต้นแบบโดยภาพรวมได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แม้ว่าจะมีผลการทดสอบบางค่าที่ไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ได้ทำการประเมินความถูกต้องของการวัดโดยการวิเคราะห์ปริมาณเปรียบเทียบโดยใช้ชุดตรวจ ELISA ต้นแบบและ LC/MS-MS พบว่าการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่ากำลังสองของความแตกต่าง ( $\Delta^2$ ) เท่ากับ 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ และเมื่อนำผลการวิเคราะห์ไปวาดกราฟเพื่อดูความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์จะได้ค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.9809 แสดงว่าการวิเคราะห์ปริมาณ AMOZ โดยการใชชุดตรวจ ELISA ต้นแบบที่เตรียมขึ้นนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS-MS แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถใช้วิเคราะห์ AMOZ ได้อย่างมีความถูกต้องและแม่นยำ

อย่างไรก็ตามในการวิจัยนี้ไม่สามารถคัดเลือกโมโนโคลนที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความไวสูงต่อ AOZ ได้จึงไม่ได้มีการพัฒนาชุดตรวจต้นแบบสำหรับวิเคราะห์ AOZ ดังนั้นจึงควรดำเนินการทดลองเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาใหม่ ซึ่งวิธีการเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายโดยทั่วไป โอกาสของความสำเร็จในการเตรียมเซลล์นี้นอกจากจะขึ้นกับความชำนาญ

ของผู้วิจัยแล้วยังขึ้นกับสภาพของหนูทดลองอีกด้วย นอกจากนี้ในการหลอมรวมเซลล์ยังเป็นการเกิดแบบ  
สุ่ม ดังนั้นการควบคุมความสำเร็จของการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สาม เรดสร้างแอนติบอดีที่มี  
ประสิทธิภาพจึงทำได้ยาก

## เอกสารอ้างอิง

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.2546.หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร

Bryan, G. T. 1978. Nitrofurans: chemistry, metabolism, mutagenesis, and carcinogenesis. Raven Press, 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 nitrofurantoin furazolidone. *Analytica Chimica Acta*, 520 : 79-86

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., 1st 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 Toxicology*, 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 Toxicology*, 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 nitrofurantoin residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77(3); 591-595.

Leitener, A., Zollner, P. and Lindner, W. 2001. Determination of the metabolites of nitrofurantoin 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

ตาราง ก ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร ในการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ AMOZ โดยวิธี Indirect ELISA

รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492นาโนเมตร					
	อิมมูโนโกลบูลิน ไอโซไทป์					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
4G11	<b>0.621</b>	0.062	0.081	0.080	0.083	0.068
1F2	0.065	0.056	<b>2.492</b>	0.107	0.168	0.215
2E5.1	0.085	0.061	<b>2.801</b>	0.120	0.113	0.106
2E9	<b>0.882</b>	0.086	0.106	0.116	0.108	0.078
2H6	<b>0.823</b>	0.087	0.114	0.103	0.100	0.063
4F1	0.070	<b>1.074</b>	0.098	0.110	0.268	0.071
4H3	<b>0.724</b>	0.074	0.108	0.093	0.110	0.102
5A7	0.138	0.131	<b>0.388</b>	0.295	0.272	0.157
5F1	<b>0.727</b>	0.065	0.120	0.082	0.080	0.082
5G10.2	<b>0.741</b>	0.071	0.092	0.086	0.085	0.078
5G10.3	<b>0.804</b>	0.081	0.098	0.090	0.086	0.085
5H7	<b>0.710</b>	0.067	0.130	0.096	0.129	0.076
6B3.1	<b>0.662</b>	0.063	0.146	0.083	0.079	0.068
6B3.2	<b>0.733</b>	0.077	0.135	0.084	0.086	0.163
6B3.3	<b>0.689</b>	0.070	0.123	0.082	0.082	0.110
6G2	<b>0.934</b>	0.080	0.102	0.203	0.182	0.057
7G4	<b>0.711</b>	0.073	0.084	0.082	0.090	0.086
7H8	0.102	0.058	<b>2.664</b>	0.117	0.106	0.090
8B1.1	<b>0.649</b>	0.062	0.086	0.080	0.077	0.069
8B4	<b>0.677</b>	0.070	0.092	0.089	0.086	0.068
8E2	<b>0.728</b>	0.067	0.096	0.089	0.088	0.054
ตัวควบคุมบวก (IgG3)	0.091	0.273	0.280	<b>1.332</b>	0.184	0.078

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

ตารางที่ ข ค่า IC50, LOD และ LOQ ในการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AMOZ

รหัสโมโนโคลน	ตัวแข่งขันในรูปอิสระ(Competitors)											
	CPAMOZ			NPAMOZ			AMOZ			FTD		
	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	IC50 (ng/ml)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
2E5.1	1.185	0.170	0.561	1.594	0.135	0.446	14.980	1.420	4.686	0.355	0.118	0.389
2H6	15.320	1.350	4.455	4.553	0.376	1.241	90.630	4.710	15.542	0.743	0.190	0.627
4F1	43.380	2.420	7.986	57.560	4.570	15.081	-	-	-	2.189	0.502	1.657
7H8	150.900	22.450	74.085	72.340	3.761	12.411	-	-	-	17.560	2.550	8.415
8B1.1	1.196	0.200	0.660	12.770	0.135	0.446	-	-	-	0.591	0.122	0.403



ตาราง ค ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492นาโนเมตร ในการตรวจหาไอโซโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ โดยวิธี Indirect ELISA

รหัสเซลล์ ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492นาโนเมตร					
	อิมมูโนโกลบูลิน ไอโซโทป					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
AOZ#1	0.595	0.063	0.075	0.068	0.074	0.082
AOZ#2	0.599	0.068	0.066	0.065	0.073	0.077
AOZ#3	0.615	0.069	0.064	0.061	0.072	0.066
AOZ#4	0.641	0.065	0.082	0.067	0.080	0.071
AOZ#5	0.641	0.067	0.070	0.066	0.077	0.057
AOZ#6	0.645	0.069	0.067	0.067	0.076	0.065
AOZ#7	0.771	0.123	0.154	0.086	0.244	0.117
AOZ#8	0.827	0.138	0.102	0.086	0.262	0.107
AOZ#9	0.786	0.124	0.140	0.103	0.268	0.088
AOZ#10	0.797	0.126	0.095	0.083	0.249	0.094
AOZ#11	0.835	0.132	0.082	0.077	0.248	0.082
AOZ#12	0.828	0.130	0.081	0.074	0.243	0.082
ตัวควบคุม บวก	0.067	0.186	0.168	1.099	0.121	0.058

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าที่ให้ผลบวก

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ นายกิตตินันท์ โกมลภิส

Mr. Kittinan Komolpis

1.2 เลขประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

1.3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

1.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์,  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน  
กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 0-2218-8078 โทรสาร: 0-2253-3543

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

### 1.5 ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก (Chemical Engineering)	2545	University of Michigan สหรัฐอเมริกา
ปริญญาโท (Chemical Engineering)	2539	University of Michigan สหรัฐอเมริกา
ปริญญาโท (ชีวเคมี)	2535	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
ปริญญาตรี (ชีวเคมี)	2532	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

### 1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ

### 1.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ไม่มี

#### 1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ดัดแปลงควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน)

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลือบบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay (ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

### 1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

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

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

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.

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

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

การผลิตกรดอะมิโนโดยยีสต์ที่ตรงควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส

### 1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบโพรงสเตอโรนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay

การพัฒนาชุดตรวจสอบแรกโทปามี้นด้วยวิธี Enzyme-linked  
Immunosorbent Assay

2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ นายธนาภัทร ปาลกะ

Mr. Tanapat Palaga

2.2 เลขประจำตัวประชาชน

2.3 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2.4 หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
พญาไท กทม 10330. โทร 5093-2218-0 .โทรสาร 5070-2253-0

2. 5 ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก (Microbiology) 2545 University of Massachusetts at Amherst สหรัฐอเมริกา

ปริญญาโท (Biotechnology) 2539 Tokyo Institute of Technology ญี่ปุ่น

ปริญญาตรี (Bioengineering) 2537 Tokyo Institute of Technology ญี่ปุ่น

2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Cell Apoptosis ,Immunology

2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย - ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

การคัดกรองสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้  
เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอโตซิส

กลไกการยับยั้งการตายของเซลล์ไมอิตอซด์โดย ATP

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Pimpitak, U, Putong , S, Komolpis, K, Petsom, A, and **Palaga, T.** (2009).

Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked  
immunosorbent assay for detection of the fulraltadobe metabolite,  
AMAZ, in fortified shrimp samples. *Food Chem. (in press)* (IF=3.001)

Rengpipat, S, Wontangprasert, N, and **Palaga, T.** (2009). The use of green  
fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus S11*  
in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aqua. Nutri.* 15, 297-305.

**Palaga, T.** (2009). An update on the immunology of tuberculosis. *Siriraj Med. J.*  
61, 37-41. (Review Article)

- Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Hirankarn, N, and **Palaga, T.** (2008). Defects in Notch1 upregulation upon activation of T cells from patients with systemic lupus erythematosus are related to lupus disease activity. *Lupus* 17, 645-653.
- Suwanjune, S, Wongchana, W, and **Palaga, T.** (2008) Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anticancer Drugs* 19, 477-486.
- Palaga, T,** Buranaruk, C, Rengpipat, R, Fauq, AH, Golde, TE, Kaufmann, SHE, and Osborne, BA. (2008). Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* 38, 174-183.
- Monhaphol, T, Yibchok-anun, S, Banlunara, W, Wittayasuporn, M, **Palaga, T,** Asawanonda, P and Wanichweacharunguang, S. (2008) Cytotoxicity, acute oral toxicity and skin irritation of 2-ethylhexyl-2,4,5-trimethoxycinnamate and di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzal-malonate. *Drug. Chem. Toxicol.* 31, 289-301.
- Minter, LM, Turley, DM, Das, P, Shin, IIM, Joshi, I, Lawlor, RG, Cho, OH, **Palaga, T,** Gottipati, S., Telfer, JC, Kostura, L, Fauq, AH, Simpson, K, Such, KA, Miele, L, Golde, TE, Miller, SD, and Osborne BA. (2005). Inhibition of  $\gamma$ -secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat. Immunol.* 6, 680-688.
- Palaga, T.** (2004). Nuclear Hormone Receptor, Apoptosis and Notch: A lesson from an immune system. *Sci. Res. Chula.* 29, 129-144. (Review Article)
- Palaga, T,** Kataoka, T, and Nagai, K. (2004). Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin 4. *Int. Immunopharmacol.* 4, 953-961.
- Palaga, T,** Miele, L, Golde, TE and Osborne, BA. (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN- $\gamma$  production in peripheral T cells. *J. Immunol.* 171, 3019-3024.

Palaga, T, and Osborne, BA. (2002). The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nat Cell Biol.* 4, E149-151.

Palaga, T, Kataoka, T, Woo, J-I, and Nagai, K. (1996). Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell lines by ER/SR  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. *Exp. Cell Res.* 228, 92-97.

#### 2.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลือบเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay

การพัฒนาชุดตรวจสอบ โพรเจสโตโรนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การคัดกรองสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพอโตซิส กลไกการยับยั้งการตายของเซลล์ไมออสโตยด์โดย ATP

### 3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

3.1 ชื่อ นางทรงจันทร์ ภูทอง

Mrs. Songchan Phuthong

3.2 เลขประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

3.3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

3.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 0-2218-8078 โทรสาร: 0-2253-3543

3.5 ประวัติการศึกษา

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) พ.ศ. 2539 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) พ.ศ. 2529 มหาวิทยาลัยบูรพา

3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียม โมโนโคลนอลแอนติบอดี

### 3.7 ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจสอบ โพรเจสโตอโรนด้วยวิธี Enzyme-linked  
Immunosorbent Assay (ELISA)

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

**Puthong S.,** Rojpibulstit, P., Buakeaw, A. 2009. Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 14(1): 95 – 104.

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

Mattanavee, W., Suwantong, O., **Puthong, S.**, Bunaprasert, T., Hoven, P.V.,

Supaphol, P. (2009) Immobilization of Biomolecules on the Surface of Electrospun Polycaprolactone Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *ACS APPLIED Materials & Interfaces*, 1: 1076 – 1085.

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

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

Chaichantipyuth, C., Petsom, A., Taweechoitipatr, P., Muangsin, N., Chaichit,

**N., Puthong, S.**, Roengsumran, S., Kawahata, M., Watanabe, T., Ishikawa, T. 2005. New labdane-type diterpenoids from *Croton Oblongifolius* and their cytotoxic activity. *HETEROCYCLES* 65(4): 809 – 822.

- 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.
- C. Chaichantipyuth, S. Tiaworanon, S. Mekaroonreung, N. Ngamrojnavanich, S. Roengsumran, **S. Puthong**, A. Petsom, T. Ishikawa. 2001 Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry* 58: 1311 - 1315.
- S. Roengsumran, A. Petsom, N. Kuptiyanuwat, T. Nilaiwan, N. Ngamrojnavanich, C. Chaichantipyuth, **S. Puthong**. 2001 Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* 56: 103 - 107.
- P. Moongkarndi, A. Srivattana, N. Bunyapraphatsara, **S. Puthong**, K. Loahathai. Cytotoxicity assay of Hispidulin and Quercetin using colorimetric technique. *วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ก.ค. - ธ.ค. 2534 ปีที่ 18 เล่มที่ 2*

#### 3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคตนบูเทอรอล ชัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay

#### 4. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3

4.1 ชื่อ นางสาวนันท์กา คงเจริญพร (ปานจันทร์)

Mrs. Nanthika Panchan

3.2 เลขประจำตัวประชาชน 3 6399 00091 73 5

3.3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

3.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน  
กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์: 0-2218-8078 โทรสาร: 0-2253-3543



### 3.5 ประวัติการศึกษา

วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	พ.ศ. 2547	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	พ.ศ. 2542	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วท.บ. (ชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวเคมี)	พ.ศ. 2539	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### 3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

อิมมูโนโลยี การผลิตแอนติบอดี การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

### 3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อ่าน ราชการแผนงานวิจัย – ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตระไซคลิน

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

**Panchan N.**, Sithigorngul P., Chaivisuthangkura P., Sithigorngul W., 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.

**Panchan N.**, Bendena W., Bowser P., Lungchukeit P., Tobe S.S., Sithigorngul W., Chaivisuthangkura P., Rangsiruji A., Petsom A., Pewnim and Sithigorngul P. 2003. Immunolocalization of allastatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalks of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Peptides* 24: 1563-1570

Sithigorngul, P., Pupuem, J., Krungkasem, C., Longyant, S., **Panchan, N.**, Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Petsom, A. 2002. Four novel PYFs: members of NPY/PP peptide superfamily from eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptides*, 23 : 1985-1906

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

3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคานบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (EI ISA) และ Immunochromatographic Assay

การพัฒนาชุดตรวจสอบ โพรเจสเทอโรนด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อยาปฏิชีวนะออกซีเตตระไซคลิน (ทุนพัฒนานักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช)

#### 5. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 4

- 5.1 ชื่อ นางสาวอุมพร พิมพิทักษ์  
Ms. Umaporn Pimpitak
- 5.2 เลขประจำตัวประชาชน 39 00658 8099 3
- 5.3 ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าหน้าที่บริการการศึกษา(วิจัย)
- 5.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์,  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน  
กรุงเทพฯ 10330  
โทรศัพท์: 0-2218-8078 โทรสาร: 0-2253-3543
- 5.5 ประวัติการศึกษา
- |                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) พ.ศ. 2549 | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  |
| วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) พ.ศ. 2542 | สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล |
- 5.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ  
การเพาะเลี้ยงเซลล์ , การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 5.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- 5.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย - ไม่มี
- 5.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย - ไม่มี
- 5.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

**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

การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน

#### 5.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

การพัฒนาชุดตรวจเตตราซัยคลินด้วยวิธี ELISA

---

