

การพัฒนาดีออกซิมีมูโนโกลด์ฟิลเทรชันแอสเสย์สำหรับการตรวจวัดโอวัลบูมิน

นายสุชุม งามพร้อมพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

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

DEVELOPMENT OF DOT-IMMUNOGOLD FILTRATION ASSAY
FOR DETECTION OF OVALBUMIN

Mr.Sukum Ngamprompong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียฟิลเทรชันแอสเสย์
สำหรับการตรวจวัดโอวัลบูมิน

โดย

นายสุชุม งามพร้อมพงศ์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.วีณา เสียงเพราะ)

สุขุม งามพร้อมพงศ์ : การพัฒนาดีดอตอิมมูโนโกลด์ฟิลเทรชันแอสเสย์สำหรับการตรวจวัดโอวัลบูมิน (Development of Dot-immunogold filtration assay for detection of ovalbumin) อ. ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก : ศ.ดร.อรรพรรณ ชัยลภากุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, 101 หน้า.

โอวัลบูมินสามารถปนเปื้อนในวัคซีนที่ผลิตจากไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิและก่อให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง ในผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ ในปัจจุบันมีการเผยแพร่งานวิจัยมากมายที่มีการใช้อณูภาคทองคำขนาดนาโนเมตร ในการตรึงและติดฉลากสำหรับการตรวจวัดสารตัวอย่าง เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ในงานวิจัยนี้ได้อธิบาย ถึงการผลิตและการติดฉลากของอนุภาคทองคำด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโอวัลบูมิน อาหารเลี้ยงเซลล์ จากโคลนของไฮบริโดมาถูกนำมาตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค in direct ELISA จากผลการทดลองพบว่า OVA8 ให้ผลการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะสำหรับโอวัลบูมินดีที่สุด โคลนของไฮบริโดมา OVA8 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงและ ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ของ protein-G แต่ละแฟคชันจะนำไป ตรวจสอบคุณลักษณะด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry ELISA และ SDS-PAGE จากผลการทำ SDS-PAGE พบแถบที่ขนาด 55 และ 25 กิโลดาลตัน ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของโปรตีนสายยาวและโปรตีนสายสั้น หลังจากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร พบว่าขนาดของอนุภาคคือ 12.5 นาโนเมตร จากการหา ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่ออนุภาคทองคำกับแอนติบอดี ซึ่งภาวะที่ได้จะถูกใช้ในการเชื่อมต่ออนุภาค ทองคำขนาดนาโนเมตรกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และนำไปทดสอบด้วย indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีสามารถเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำได้ อนุภาคทองคำที่ติดฉลากแล้วมีความเสถียรในการถูกเชื่อมต่อ และสามารถนำมาตรวจวัดด้วย indirect ELISA เมื่อผ่านไปแล้ว 56 วัน เทคนิค DIGFA ควบคู่กับการตรวจวัด ทางแสงเป็นอีกเทคนิคทางเลือกสำหรับการตรวจวัดโอวัลบูมินอย่างรวดเร็ว กระดาษกรองเบอร์ 1 ถูกนำมาเป็น วัสดุพยางแบบใหม่ สำหรับเทคนิค solid phase labeled immunoassay โดยมีอนุภาคทองคำเป็นตัวติดฉลาก เทคนิค DIGFA ที่พัฒนาในงานวิจัยนี้ได้แสดงถึงศักยภาพในการใช้งาน เช่น ใช้ได้ง่าย รวดเร็ว เป็นวิธีการที่ นำเชื่อถือโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงและเป็นเครื่องมือคัดกรองที่ราคาถูกลงสำหรับการตรวจ OVA ใน วัคซีนภายใน 15 นาที โดยไม่มีขั้นตอนที่ซับซ้อน

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

5272582323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : CONJUGATE, GOLD NANOPARTICLE, OVALBUMIN, MONOCLONAL ANTIBODY,
DIGFA

SUKUM NGAMPROMPONG: DEVELOPMENT OF DOT- IMMUNOGOLD FILTRATION ASSAY
FOR DETECTION OF OVALBUMIN. ADVISOR: PROF. ORAWON CHAILPAKUL, Ph.D.,
CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., 101 pp.

Ovalbumin (OVA) can be contaminated in vaccines, which are produced in fertilized eggs and cause allergic reactions with symptoms of skin inflammation (atopic dermatitis) in allergic patients. Recently, the gold nanoparticles (GNPs) have been reported in many publications for using as immobilization platforms or labels for detection of analyses, such as proteins and nucleic acids. In this thesis, the production and labeling of gold nanoparticle with anti-ovalbumin monoclonal antibody were described. Culture supernatant from hybridomas was screened by indirect ELISA. From the results, it was found that OVA8 was the best producer of antibody specific for OVA. The hybridoma clone OVA8 was cultured and the culture supernatant was harvested. After purification using protein G column, each fraction was characterized by UV-vis spectrophotometry, ELISA and SDS-PAGE. The results from SDS-PAGE showed that there were 2 bands at 55 and 25 kDa corresponding to the heavy and light chain. After synthesis of gold nanoparticles (GNPs), it was found that size of the particle was 12.5 nm. An appropriate condition for generating the GNPs conjugated antibody was investigated. This condition was used to conjugate GNPs with monoclonal antibody and subjected to test with indirect ELISA, which was found that antibody can be conjugated with GNPs. Colloidal gold probe was stable to conjugate and reactive to use for detection by indirect ELISA after 56 days. The DIGFA coupled with optical detection is an alternative technique for rapid detection of ovalbumin. Whatman No.1 was used as a support material for the solid phase labeled immunoassay. Colloidal golds were all so use as the label. DIGFA developed in this study exhibits a potential use as a simple, rapid, reliable method without expensive equipment and cost-effective screening tool for the determination of OVA in vaccine within 15 min without complicated steps.

Field of Study : Biotechnology

Student's Signature

Academic Year : 2012

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์. ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณา
ให้คำปรึกษา แนวทางการทำการวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดย
สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. วรินทร์ ชวศิริ ประธานกรรมการสอบ
วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์. ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย อาจารย์. ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และ
อาจารย์. ดร. วิภา เสียงเพราะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำใน
การจัดวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. สีนาท ประสงค์สุข ที่เอื้อเฟื้อสถานที่
เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนางทรงจันทร์ ภูทอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนวทางในการทำการวิจัย
เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพี่ๆเพื่อนๆและน้องๆในห้องปฏิบัติการ สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้
ในทุกๆเรื่อง ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาผู้ให้กำเนิด คุณยาย และทุกคนในครอบครัวที่
ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอด ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูป.....	ฑ
สารบัญสัญลักษณ์และอักษรย่อ.....	ถ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 การแพ้อาหาร (Food allergy).....	4
2.1.1 สาเหตุของอาหารแพ้.....	4
2.1.2 การแพ้และอาการของการแพ้.....	5
2.1.2.1 แอนติเจน (antigen, Ag).....	5
2.1.2.2 แอนติบอดี (antibody, Ab).....	6
2.1.2.3 อาการของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune symptom).....	8
2.1.3 การแพ้ไข่.....	9
2.1.4 โครงสร้างและคุณลักษณะของโอวัลบูมิน.....	10
2.1.5 การแพ้ไข่กับวัคซีน.....	11
2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยอาศัยเทคนิคของ somatic hybridization.....	12
2.3 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity Chromatography).....	15
2.4 Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	16
2.4.1 รูปแบบของ ELISA.....	17
2.4.1.1 Indirect ELISA.....	17

	หน้า
2.4.1.2 Sandwich ELISA.....	18
2.4.1.3 Competitive ELISA.....	18
2.5 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	19
2.6 อนุภาคขนาดนาโนเมตร (Nanoparticle).....	20
2.6.1 คุณลักษณะของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร.....	21
2.6.2 การสังเคราะห์และการเกิดรูปแบบของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร.....	23
2.6.3 การติดฉลากด้วยโลหะ (Metal label).....	24
2.7 การวิเคราะห์โดยอาศัยการวิเคราะห์บนกระดาษ (paper-based device)...	25
2.8 Optical detection.....	25
2.9 Dot-immunogold filtration assay (DIGFA).....	27
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ DIGFA.....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
3.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OVA โดยวิธี Indirect ELISA.....	34
3.4 การผลิตโมโนโคลนอล.....	35
3.5 การเก็บรักษาเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen).....	35
3.6 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง.....	36
3.7 การทำโมโนโคลนอลให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี.....	36
3.8 การทำไดอะไลซิส (Dialysis).....	36
3.9 การทดสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอล.....	36
3.9.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น.....	36
3.9.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง.....	36
3.9.3 การทำอิเล็กโทรฟอเรซิส.....	37

	หน้า
3.10 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของโมโนโคลนอลหลังทำให้บริสุทธิ์....	37
3.11 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของโมโนโคลนอล.....	39
3.12 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำ.....	39
3.13 การเตรียมอนุภาคทองคำสำหรับการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล.....	39
3.13.1 ปัจจัยของ pH ในสารละลายอนุภาคทองคำ.....	39
3.13.2 ปัจจัยของ pH ในสารละลายอนุภาคทองคำ.....	40
3.14 การเชื่อมต่อของอนุภาคทองคำกับโมโนโคลนอลภายใต้สภาวะที่ เหมาะสม.....	40
3.15 การศึกษาความเสถียรของอนุภาคทองคำ.....	40
3.16 การเตรียมกระดาษสำหรับการตรวจวัดบนกระดาษ.....	41
3.16.1 ขั้นตอนการเตรียมกระดาษ.....	41
3.16.2 ขั้นตอนการออกแบบวงรอบหลุมที่ใช้สำหรับการทดสอบ.....	41
3.16.3 การพิมพ์ลายลงบนกระดาษ.....	41
3.17 การทำดอตอิมมูโนโกลด์ฟิลเทรชันแอสเสย์ (Dot-immunogold filtration assay, DIGFA).....	41
3.17.1 การตรึงแอนติเจนลงบนกระดาษ.....	41
3.17.2 การศึกษาภาวะ Blocking และไม่ Blocking.....	42
3.17.3 การศึกษาปัจจัยของการชะล้างและไม่ชะล้างของสารบน กระดาษ.....	42
3.18 การตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนในวัคซีน.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง.....	44
4.1 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OVA โดยวิธี Indirect ELISA.....	44
4.2 การหาปริมาณโปรตีนจากสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค BCA assay.....	48

	หน้า
4.3 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้ บริสุทธิ์.....	48
4.4 การศึกษาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากที่ทำให้บริสุทธิ์....	50
4.5 การศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากที่ทำให้ บริสุทธิ์.....	51
4.6 การสังเคราะห์อนุภาคของค่าขนาดนาโนเมตร.....	52
4.7 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่ออนุภาคของค่ากับแอนติบอดี.	57
4.7.1 ปัจจัยของ pH ต่อการเชื่อมต่อของอนุภาคของค่ากับแอนติบอดี....	57
4.7.2 ปัจจัยของปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับการเชื่อมต่อกับ อนุภาคของค่า.....	58
4.8 การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคของค่าที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี.....	60
4.8.1 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคของค่าที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm.....	60
4.8.2 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคของค่าที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	62
4.8.3 ความเสถียรของสารละลายอนุภาคของค่าหลังจากเชื่อมต่อกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	62
4.9 การตรวจวัดบนกระดาษโดยอาศัยหลักการ direct ELISA.....	64
4.9.1 การตรึงแอนติเจน (OVA) บนกระดาษ.....	64
4.9.2 การศึกษาสภาวะ Blocking และไม่ Blocking.....	65
4.9.3 การศึกษาปัจจัยของการชะล้างของสารบนกระดาษ.....	66
4.10 การตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนในวัคซีน.....	68
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	72
สรุปผลการวิจัย.....	72
ข้อเสนอแนะ.....	74

	หน้า
รายการอ้างอิง.....	75
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก	84
ก.1 ระดับของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ hybridoma cell ของ OVA1 OVA2 OVA8 และ OVA9 ที่นำมาคัดกรองด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 450nm.....	84
ก.2 การคัดกรองในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ hybridoma cell ในกลุ่มของ OVA8 จำนวน 6 โคลนด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ค่าการดูดกลืน แสง 450nm.....	84
ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 nm และค่าการดูดกลืนแสงจาก การทำ indirect ELISA ที่ 450 nm.....	85
ก.4 การหาปริมาณโปรตีนของสารละลาย BSA และโมโนโคลนอล แอนติบอดีด้วยวิธี BCA assay.....	87
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 nm และค่าการดูดกลืนแสงจาก การทำ indirect ELISA ที่ 450 nm.....	88
ก.6 ค่าความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำ บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm.....	89
ก.7 ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลาย อนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 4 จนถึง 11 ที่มีการเติมสารละลาย โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 µg/mL.....	90
ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm – ค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm ของ สารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโน โคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 µg/mL จนถึง 30 µg/mL	91
ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโน โคลนอลแอนติบอดีเทียบกับสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระ โดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm.....	92

ก.10 ความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 37 °C ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นระยะเวลา 56 วัน.....	93
ก.11 mean intensity ของ OVA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 µg/mL ถึง 1000 µg/mL ที่ตั้งบนกระดาษแล้วทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ.....	94
ก. 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีน รวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม.....	95
ก. 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีน ใช้ขวดใหญ่.....	96
ภาคผนวก ข การเตรียมสาร.....	97
ข.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์.....	97
ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA.....	98
ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ บริสุทธิ์.....	99
ข.4 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทำ SDS-PAGE.....	99
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารประกอบโปรตีนในอาหารที่ก่อให้เกิดการแพ้.....	5
2.2	แสดงถึงโปรตีนหลักในการก่อให้เกิดการแพ้ไข่.....	10
3.1	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	31
3.2	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
3.3	แสดงรายชื่อของเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดกรองด้วย indirect ELISA.....	35
4.1	แสดงรายชื่อโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดกรองด้วยวิธี indirect ELISA....	44
4.2	แสดงรายชื่อโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจับโคลนในกลุ่ม OVA 8 ที่นำมาคัดกรองด้วยวิธี indirect ELISA จำนวน 6 โคลน.....	45
4.3	การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติเจนของ OVA ที่ใช้ในการเคลือบกันหลุมของเพลท ELISA ด้วยวิธี indirect ELISA.....	50

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของ Ig ที่ประกอบด้วยโปรตีนสองสายและมีโครงสร้างเป็นลักษณะ Y-shape.....	7
2.2	แอนติบอดี Ig ในแต่ละคลาส ประกอบด้วย IgA IgD IgE IgG และ IgM.....	7
2.3	กลไกของการแพ้อาหาร.....	8
2.4	การบวมและผื่นจากการแพ้อาหารในบริเวณต่างๆของร่างกาย.....	9
2.5	แสดงโครงสร้างของ ovalbumin.....	11
2.6	ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง.....	14
2.7	การสังเคราะห์ nucleotide โดยอาศัยวิถีของ De novo และ Salvage pathway.....	14
2.8	ขั้นตอนของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	18
2.9	หลักการของ Affinity chromatography.....	16
2.10	ขั้นตอนของเทคนิค indirect ELISA.....	17
2.11	ขั้นตอนของเทคนิค sandwich ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนโดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบบน solid phase และแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์.....	18
2.12	การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	20
2.13	การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล.....	20
2.14	ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับขนาดของอนุภาค	22
2.15	ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับรูปร่างของอนุภาค	22
2.16	ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด.....	23
2.17	ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Optical detection.....	26
2.18	แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป.....	27
2.19	ส่วนประกอบของเทคนิค DIGFA กระดาษ.....	28

รูปที่	หน้า	
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ของระดับแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดมาของโคลน OVA1 OVA2 OVA8 และ OVA9 ที่นำมาคัดกรองด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	45
4.2	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ของการคัดกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดมาชั้นโคลนในกลุ่มของ OVA8 จำนวน 6 โคลนด้วยเทคนิค indirect ELISA.....	46
4.3	กราฟจากการทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน OVA 8-7H-8F-4H บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีเซฟาไรส จากนั้นชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 3) โดยอัตราการไหลของการชะที่ 1 mL/min เก็บตัวอย่างทั้งหมด 28 แฟรคชัน แฟรคชันละ 500 μ L จากนั้นนำแต่ละแฟรคชันมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280nm และนำไปวัดหาปริมาณแอนติบอดีด้วย ELISA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm.....	47
4.4	กราฟมาตรฐานของ BSA ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 1000 μ g/mL.....	48
4.5	ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจีเซฟาไรสโดยนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยที่ เลนที่ 1 คือ ไม่มี ตัวอย่างเลนที่ 2 คือ โปรตีนมาตรฐาน (marker protein) เลนที่ 3 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนที่จะผ่านคอลัมน์เพื่อทำให้บริสุทธิ์ เลนที่ 4 คือ สารที่ได้จากขั้นตอนการล้างคอลัมน์ก่อนการชะแอนติบอดี เลนที่ 5 คือ สารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์.....	49
4.6	ผลความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ OVA ที่ความเข้มข้น 3.90625 μ g/mL เคลือบที่ก้นหลุมของเพลท ELISA และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1:4000 แข่งจับกับ OVA อิสระที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-3} - 10^4 μ g/mL.....	51

รูปที่	หน้า	
4.7	ผลความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ lysozyme, ovotransferrin, ovomucoid, และ ovalbumin ที่ความเข้มข้น 50,000 µg/mL ถึง 0.00005 µg/mL และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1:4000.....	52
4.8	การเปลี่ยนแปลงสีของสารในระหว่างการทำปฏิกิริยาของสารละลาย chlorauric acid ที่ผสมกับ sodium citrate.....	53
4.9	สีของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำ โดยหมายเลข 1 คือน้ำกลั่น ที่ใช้ในการสังเคราะห์ หมายเลข 2 คือ สาร chlorauric acid ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ และหมายเลข 3 คือ sodium citrate ที่ใช้เป็นรีดิวซิ่ง เอเจนต์ และหมายเลขที่ 4 คือ สารละลายอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการสังเคราะห์.....	54
4.10	ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 5.....	55
4.11	รูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำที่ได้จากภาพถ่ายด้วยเทคนิค TEM.....	55
4.12	จำนวนของอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการศึกษาด้วยเทคนิค TEM.....	56
4.13	สารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 56 วัน หมายเลข 1 คือ สารละลายอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการสังเคราะห์ และหมายเลข 2 คือสารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน.....	56
4.14	ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 nm ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 56 วัน โดยทำการวัดทุก 7 วัน.....	57
4.15	การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 4 ถึง 11 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 µg/mL	58
4.16	กราฟผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 4 ถึง 11 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 µg/mL.....	58

รูปที่	หน้า
4.17	การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30 $\mu\text{g/mL}$ 59
4.18	กราฟผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30 $\mu\text{g/mL}$ 60
4.19	สีของสารละลายอนุภาคทองคำก่อนการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีในหมายเลขที่ 1 ซึ่งเป็นสีแดงดำและสารละลายอนุภาคทองคำหลังการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีในหมายเลขที่ 2 ซึ่งเป็นสีม่วง..... 61
4.20	ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำก่อนการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และหลังการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 61
4.21	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเทียบกับสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระโดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm..... 62
4.22	ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 56 วัน โดยทำการวัดทุก 7 วัน..... 63
4.23	ความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 37 °C ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นระยะเวลา 56 วัน..... 63
4.24	การวิเคราะห์ปริมาณ OVA ที่ตรึงบนกระดาษที่ความเข้มข้นของ OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ..... 64
4.25	ความสัมพันธ์ของค่า mean intensity และลอการิทึมของความเข้มข้นของ OVA ตั้งแต่ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ 65
4.26	การป้องกันและไม่ป้องกันบริเวณทดสอบด้วย blocking solution ที่ความเข้มข้นของ BSA ร้อยละ 3..... 66

รูปที่	หน้า
4.27 สารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 10 ที่ใช้เป็น blocking solution.....	66
4.28 การชะล้างและไม่ชะล้างของสารบนกระดาษด้วย PBST ที่ผสมระหว่าง PBS pH 7.4 และ Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% ลงบนบริเวณทำการทดลอง.....	67
4.29 ความเข้มสีที่ได้จากการใช้ Tween-20 ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึง 10 โดยใช้ PBS pH 7.4 เป็นตัวทำละลายเพื่อใช้ในการชะล้าง.....	68
4.30 ความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัด OVA ที่ความตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม แล้วตรึงบนกระดาษด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ.....	69
4.31 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม.....	70
4.32 ความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัด OVA ที่ความตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนไข้หวัดใหญ่ แล้วตรึงบนกระดาษด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ.....	71
4.33 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนไข้หวัดใหญ่.....	71

สารบัญสัญลักษณ์และอักษรย่อ

cm	เซนติเมตร
g	กรัม
kDa	กิโลดาลตัน
μ g	ไมโครกรัม
μ L	ไมโครลิตร
μ m	ไมโครเมตร
kv	กิโลโวลต์
L	ลิตร
M	โมลาริตี
min	นาที
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมล
MW	น้ำหนักมวลโมเลกุล
ng	นาโนกรัม

nm	นาโนเมตร
OD	Optical Density
rpm	อัตราเร็วรอบต่อนาที
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
°C	องศาเซลเซียส
/	ต่อ
:	อัตราส่วน
%	เปอร์เซ็นต์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำ

การแพ้ไข่จัดเป็นภาวะที่ภูมิคุ้มกันไวเกิน (Hypersensitivity) ต่อสารที่ประกอบอยู่ในไข่แดง (yolk) และไข่ขาว (white of egg) เป็นสาเหตุให้เกิดการแสดงออกของปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งในเด็กอาจก่อให้เกิดการแสดงออกของอาการทางร่างกาย โดยโปรตีนที่ประกอบในไข่ขาว อาทิเช่น โอวัลบูมิน (Ovalbumin, OVA) โอโพรทรานเฟอริน (Ovotransferin) โอโวมูคอยด์ (Ovomucoid) และไลโซไซม์ (Lysozyme) ซึ่งคนที่มีอาการแพ้ไข่จะมีแอนติบอดี (Antibody) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ได้ โดย OVA จัดเป็นโปรตีนที่พบได้มากในไข่ขาวประมาณร้อยละ 65-68 ของโปรตีนทั้งหมดและยังจัดเป็นสารหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้ ดังนั้นในการตรวจหา OVA จึงมีความสำคัญเพื่อหลีกเลี่ยงการได้รับโปรตีน OVA สำหรับผู้ที่มีอาการแพ้ไข่

การพัฒนาเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์ตรวจหาโปรตีน OVA ที่ผ่านมา อาทิเช่น High performance liquid chromatography (HPLC) Near infrared spectroscopy (NIRS) Electrochemical immunosensor (ECIS) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry เป็นต้น ซึ่งเทคนิคที่กล่าวมาต้องอาศัยเวลาและจำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือที่เหมาะสม รวมทั้งบุคลากรที่มีความรู้และความสามารถในการปฏิบัติการ ดังนั้น Immunoassay จึงเป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางเลือกที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนเป้าหมาย (target antigen) เทคนิคที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Immunoassay ประกอบด้วย Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) Immunochemistry (IC) Immunofiltration assay (IFA) Amperometric immunosensors Dot-blot ELISA และ Metalloimmunoassay เป็นต้น

หลังจาก ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา ได้มีการพัฒนาเทคนิคของ Immunoassay อย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยหลักการของ ELISA การพัฒนาได้เริ่มจากการปรับปรุงเทคนิค solid phase labeled immune-filtration assay (IFA) โดยประกอบด้วยกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane NCM) ที่ใช้เป็นตัวพุง (supporter) และตัวติดฉลาก ตัวติดฉลากที่นิยมใช้ใน Immunoassay เช่น เอนไซม์ (enzyme) หรืออนุภาคโลหะขนาดนาโนเมตร (metal nanoparticle labels) โดยอนุภาคโลหะขนาดนาโนเมตรที่ใช้ติดฉลากได้แก่ อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

(gold nanoparticle) และอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร (silver nanoparticle) โดยอนุภาคดังกล่าวได้รับความนิยมใช้เป็นทางเลือกสำหรับการติดฉลากกับโปรตีน เพื่อปรับปรุงความเสถียรและความไวของ Immunoassay ซึ่งอนุภาคทองคำถูกใช้อย่างใช้อย่างกว้างขวางมากกว่าในเทคนิคของ Immunoassay และได้พัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการติดฉลากด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี เนื่องจากอนุภาคทองคำง่ายต่อการควบคุมการกระจายของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มีความเสถียรสามารถเก็บอนุภาคได้นาน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (friendly biocompatibility) กับแอนติเจน แอนติบอดี โปรตีน (protein) ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำและโปรตีนอาศัยแรงระหว่างอนุภาคทองคำกับโปรตีนหลายแรงด้วยกัน อาทิเช่นพันธะไฮโดรเจน แรงไฟฟ้าสถิต แรงแวนเดอร์วาลส์ และ zwitterion force ของอนุภาคทองคำได้อย่างแข็งแรงเมื่อทั้งคู่จับกันอย่างเหมาะสม ทำให้มีความเสถียรในการเก็บในรูปแบบของของเหลว ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำกับโปรตีนส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

เทคนิค Dot-immunogold filtration assay (DIGFA) จัดอยู่ในกลุ่มของเทคนิค IFA ที่ประกอบด้วยตัวพวงและตัวติดฉลาก ในเทคนิคนี้ตัวติดฉลากที่ใช้คืออนุภาคทองคำ ซึ่งผลจากการทดลองในเทคนิค DIGFA พบว่าสามารถประเมินได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังสามารถนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) โดยอาศัยหลักการของ Optical detection เทคนิคของ Optical detection เป็นเทคนิคที่อาศัยการวิเคราะห์สี โดยอาศัยเครื่องสแกนหรือกล้องดิจิทัล ในการจับภาพของผลการทดลองที่เกิดขึ้นและความเข้มข้นของสารที่นำมาวิเคราะห์จะถูกวัดโดยการวิเคราะห์ความเข้มของสีในบริเวณที่ทำการตรวจสอบ โดยเทคนิค DIGFA มีข้อดี เช่น ราคาถูก ใช้งานง่าย ใช้เวลาน้อยในการทดลอง มีความปลอดภัย และสามารถเก็บภาพของผลการทดลองได้นาน ดังนั้นได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมของ DIGFA เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในหลายแขนง อาทิเช่น การตรวจหา alpha fetoprotein (AFP) สำหรับคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งตับ การตรวจหา anti-HAV IgM สำหรับคัดกรองผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี การตรวจการปนเปื้อนของ carbaryl ที่อยู่ในยาฆ่าแมลง การตรวจคัดกรอง HIV การตรวจ anti-WSSV (White Spot Syndrome Virus) ของกุ้ง และการตรวจคัดกรองโรคพยาธิใบไม้ในเลือดจากเชื้อ *Schistosoma japonicum*.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำมาศึกษาคุณลักษณะของแอนติบอดี รวมทั้งความไวของแอนติบอดี (sensitivity of antibody) และความจำเพาะของแอนติบอดี (cross-reaction of antibody) จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำ

การเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรที่ได้จากการสังเคราะห์ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เช่น pH และความเข้มข้นของแอนติบอดี จึงทำให้ได้ตัวตรวจวัดที่มีความจำเพาะต่อ OVA โดยเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกพัฒนาขึ้นให้ไวและง่ายต่อการตรวจวัด ซึ่ง DIGFA อาศัยหลักการพื้นฐานของ indirect ELISA และสุดท้ายทำการตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด คางทูม และหัดเยอรมัน (MMR vaccine) และวัคซีนไข้วัดใหญ่

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยวัตถุประสงค์สามหัวข้อใหญ่ดังต่อไปนี้

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาวัดความจำเพาะโดยอาศัยเทคนิค ELISA
2. สังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรแล้วนำอนุภาคทองคำมาเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีภายใต้ภาวะที่เหมาะสม
3. หาภาวะที่เหมาะสมของ DIGFA สำหรับการตรวจวัด OVA ในวัคซีนตัวอย่างโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำและตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค optical detection

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ค้นหาและศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ การสังเคราะห์อนุภาคทองคำ หลักการของ DIGFA และเทคนิคของ optical detection
2. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการวัดค่าโปรตีนทั้งหมดโดยอาศัยเทคนิค BCA assay รวมทั้ง การวัดความไวและความจำเพาะของแอนติบอดีโดยอาศัยเทคนิค ELISA
3. เตรียมอนุภาคทองคำและกระดาษสำหรับการทดลอง
4. หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อของอนุภาคทองคำกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี
5. ทำการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค DIGFA เพื่อทำการตรวจวัด OVA
6. วิเคราะห์และวิจารณ์ผลการทดลอง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การแพ้อาหาร (Food allergy)

การแพ้อาหารที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากภาวะที่ร่างกายตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไวเกินต่ออาหารที่เกิดจากสารประกอบในอาหาร (allergens) ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งเรียกสภาวะดังกล่าวว่า ภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity disease หรือ allergy) จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติในร่างกายและในบางคนที่มีอาการแพ้อย่างรุนแรงอาจส่งผลให้ถึงแก่ชีวิต ซึ่งการแพ้อาหารที่ก่อให้เกิดเสียชีวิตเรียกว่าการแพ้แบบนี้ว่า anaphylaxis การแพ้ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากโปรตีนในอาหารไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายให้หลั่งฮีสตามีน (histamine) และส่งผลให้เกิดการแพ้ การแพ้สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ การแพ้อาหารที่เกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน IgE (IgE mediated) ส่วนอีกกลุ่มคือ การแพ้อาหารที่เกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดอื่น (non-IgE mediated) อาทิเช่น IgG4 ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการแพ้ไข่หรือแพ้โปรตีนจากนมวัวในเด็กเล็ก ระบบภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตของเด็กวัยทารกยังไม่เต็มที่ จึงทำให้เกิดการแพ้อาหารได้มากกว่าเด็กโตหรือผู้ใหญ่ นอกจากนี้ในเด็กเล็กจะมีปริมาณของกรดในกระเพาะอาหารน้อยและเอนไซม์ในลำไส้และตับอ่อนมีความพร่อง ทำให้เกิดการกระตุ้นทางภูมิคุ้มกันได้ง่าย [สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์, 2550, Anderson, J.A. 1986, Sicherer, S.H. และ Sampson, H.A. 2009, Cianferoni, A. และ Spergel, J.M. 2009].

2.1.1 สาเหตุของอาหารแพ้อาหาร

ในการแพ้อาหารเกิดได้จากหลายสาเหตุ อาทิเช่น เหตุเกิดจากพันธุกรรม หรือ ปัจจัยของระบบสรีระทางร่างกาย โดยผู้ป่วยที่มีอาการแพ้อาหารจะมีความสัมพันธ์กับโรคภูมิแพ้ ส่งผลให้ผู้ป่วยเป็นโรคภูมิแพ้อยู่แล้วมีโอกาสแพ้อาหารได้มากกว่าคนที่ไม่ได้เป็นโรคภูมิแพ้ ในการแพ้อาหารมีสาเหตุที่สำคัญโดยเกิดจากการแพ้ต่อสารธรรมชาติที่ประกอบอยู่ในอาหารและส่วนมากเป็นสารพวกโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 [สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์, 2550]

ตารางที่ 2.1 สารประกอบโปรตีนในอาหารที่ก่อให้เกิดการแพ้

อาหาร (Food)	โปรตีน (Allergenic Proteins)
นมวัว (Cow milk)	Casein β -lactoglobulins α -lactalbumins Others
ไข่ขาว (Egg whites)	Ovomucoid Ovalbumin
ไข่แดง (Egg yolk)	Ovotransferrin (conalbumin) Lipoprotein
ถั่วลิสง (Peanuts)	Livetin Peanut I Lectin-reactive glycoprotein Arachin
ถั่วเหลือง (Soybeans)	Conarachin β -Conglycinin Glycinin Kunitz trypsin inhibitor Unidentified 20kD protein
ปลาเค็ม (Codfish)	Allergen M (parvalbumin)
กุ้ง (Shrimp)	Antigen II
ถั่วลันเตา (Green peas)	Albumin fraction
ข้าว (Rice)	Glutelin fraction Globulin fraction
เมล็ดฝ้าย (Cottonseed)	Glycoprotein fraction
มะเขือเทศ (Tomato)	Several glycoproteins

2.1.2 การแพ้อาหารและอาการของการแพ้

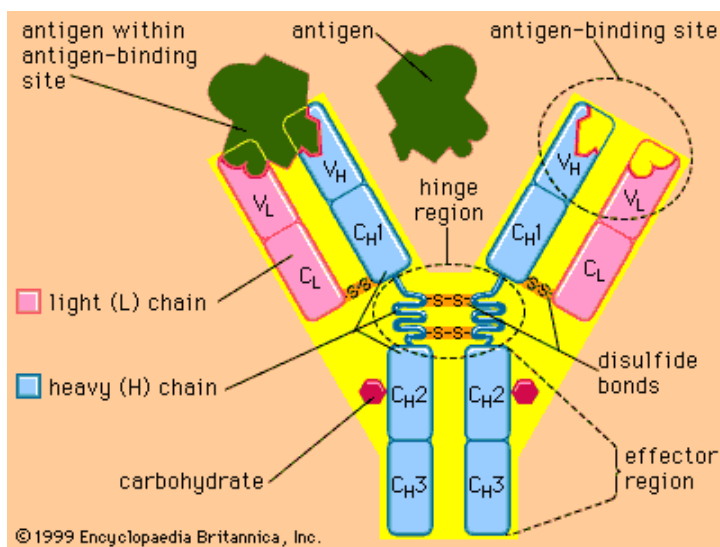
2.1.2.1 แอนติเจน (antigen, Ag)

แอนติเจนเป็นโมเลกุลของสารแปลกปลอมหรือไม่มีอยู่ในร่างกาย เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วก่อให้เกิดการกระตุ้นและการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือ T lymphocyte ที่จำเพาะแล้วส่งผลทำให้เกิดการแสดงออกทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ซึ่งเป็นความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีหรือ T lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น อาทิเช่น ฝุ่น เกสรดอกไม้ เชลล์แบคทีเรีย เชื้อไวรัสและโปรตีน เป็นต้น โดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เป็นแอนติเจนจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 KDa ขึ้นไป ยกเว้นสารที่มีโมเลกุลเล็กที่เรียกว่า hepten (แฮปเทน) เนื่องจากแฮปเทนมีเฉพาะสมบัติของแอนติเจนแต่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการตอบสนองได้ [Lydyard P.M. 2004, Guyton, และ Hall. 2006, Peter, P., 2009, Kuby. 2006, Lydyard P.M. 2004]




2.1.2.2 แอนติบอดี (antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นโปรตีนชนิด glycoprotein ที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซท์ (B-lymphocyte) ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ (plasma cell) หลังจากที่เกิดแอนติบอดีและหลั่งเข้าสู่กระแสโลหิตทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบ humeral immunity โดยแอนติบอดีที่หลั่งออกมาสามารถจับกับแอนติเจนในบริเวณที่มีความจำเพาะซึ่งกันและกัน เรียกบริเวณดังกล่าวว่า epitope

โครงสร้างของแอนติบอดีมีลักษณะคล้ายโครงสร้างแบบ Y-shape (รูปที่ 2.1) ซึ่งจะประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (polypeptide) สองสาย ได้แก่ โปรตีนสายสั้น (L chain) ซึ่งมีขนาดของโปรตีนประมาณ 24-25 KDa และโปรตีนสายยาว (H chain) ซึ่งมีขนาดของโปรตีนประมาณ 55-70 KDa ทั้งสองสายของโปรตีนสายสั้นและสายยาวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ covalent disulfide โดยโปรตีนสายสั้นและสายยาวสามารถแบ่งบริเวณออกเป็น 2 ส่วนคือ บริเวณ V และบริเวณ C ในโปรตีนสายสั้นจะประกอบด้วย 2 domains โดยประกอบด้วยหน่วยของกรดอะมิโนตั้งแต่ 100-110 หน่วยที่มีความแปรปรวนมากจึงเรียกบริเวณนี้ว่าบริเวณแปรปรวน (variable domain, VL) จะมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของแอนติบอดี ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่ทางด้านปลายของอะมิโน (N terminal) จึงเป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และส่วนบริเวณที่เป็นบริเวณคงที่ (constant domain, CL) จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน ซึ่งในสายสั้นมี 2 ชนิดคือ λ หรือ K ส่วนสายยาวเป็นชนิด μ , γ , α , δ , หรือ ϵ ส่วนโปรตีนสายยาวประกอบด้วยบริเวณแปรปรวน (variable domain, VH) จะมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของแอนติบอดี ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่ทางด้านปลายของอะมิโน และส่วนบริเวณที่เป็นบริเวณคงที่ โดยบริเวณคงที่ประกอบด้วย 4 บริเวณคือ CH1, CH2, CH3 และ CH4 โดยจะขึ้นอยู่กับ isotype ของแอนติบอดี (รูปที่ 2.1) โดยไอโซไทป์ (isotype) หรือคลาส (class) ของ Ig ประกอบด้วย IgA, IgD, IgE, IgG และ IgM โดยในแต่ละคลาสของแอนติบอดีเป็นผลมาจากความแตกต่างกันในส่วนของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของโปรตีนสายยาวบริเวณคงที่ จึงทำให้แอนติบอดีมีโครงสร้างและบทบาทของการทำงานที่แตกต่างกันไป ในแต่ละบทบาทของการทำงานของแต่ละไอโซไทป์เกิดจากปฏิกริยาระหว่างส่วนของโปรตีนสายยาวกับองค์ประกอบต่างๆของโปรตีนที่อยู่ในซีรัม (รูปที่ 2.2) [Charles, A.J. 2001, Litman, G.W., et al. 1993, Borghesi, L.,ans Milcarek, C. 2006, Lydyard P.M. 2004, Woof, J.M., และ Burton, D.R. 2004, Arruebo, M., et al., 2009].



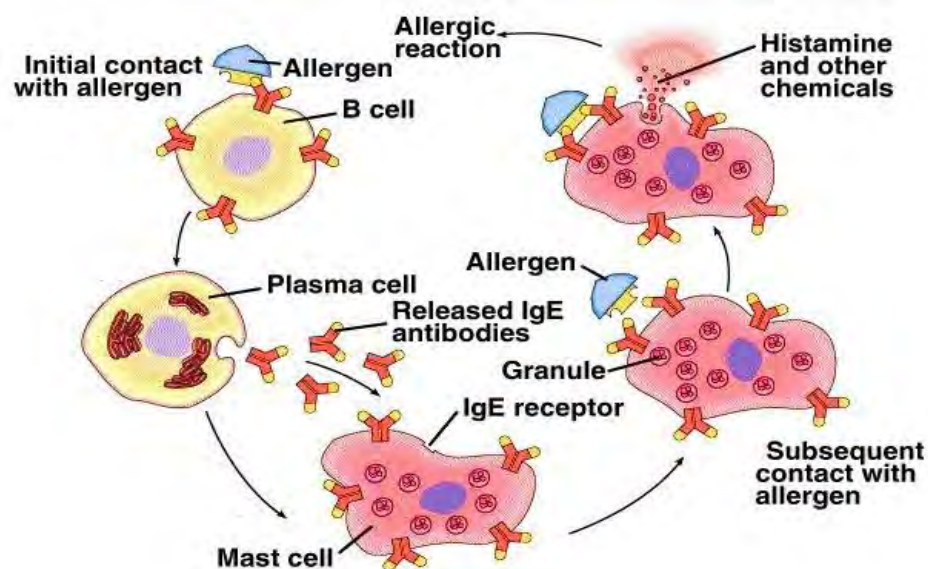
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Ig ที่ประกอบด้วยโปรตีนสองสายและมีโครงสร้างเป็นลักษณะ Y-shape

Name	Types	Description	Antibody Complexes
IgA	2	Found in mucosal areas, such as the gut, respiratory tract and urogenital tract, and prevents colonization by pathogens. Also found in saliva, tears, and breast milk.	 Monomer IgD, IgE, IgG
IgD	1	Functions mainly as an antigen receptor on B cells that have not been exposed to antigens. It has been shown to activate basophils and mast cells to produce antimicrobial factors.	
IgE	1	Binds to allergens and triggers histamine release from mast cells and basophils, and is involved in allergy. Also protects against parasitic worms.	 Dimer IgA
IgG	4	In its four forms, provides the majority of antibody-based immunity against invading pathogens. The only antibody capable of crossing the placenta to give passive immunity to fetus.	
IgM	1	Expressed on the surface of B cells and in a secreted form with very high avidity. Eliminates pathogens in the early stages of B cell mediated (humoral) immunity before there is sufficient IgG.	 Pentamer IgM

รูปที่ 2.2 แอนติบอดี Ig ในแต่ละคลาส ประกอบด้วย IgA IgD IgE IgG และ IgM

2.1.2.3 อาการของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune symptom)

ปฏิกิริยาของอาการแพ้อาหารเป็นผลมาจากกลไกภายในระบบของภูมิคุ้มกันของร่างกาย การแพ้อาหารที่เกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน IgE เรียกว่า IgE mediated allergies หรือ Type I reaction จะมีสารก่อให้เกิดการแพ้หลายชนิด อาทิเช่น ผุ่นอาหาร เกสรดอกไม้ เป็นต้น โดยกลไกการแพ้เริ่มจากสารที่ประกอบอยู่ในอาหาร จะไปกระตุ้นให้ B-lymphocytes และจะพัฒนาไปเป็น Plasma cell แล้วจะสร้าง specific IgE ต่อแอนติเจนนั้น จากนั้นแอนติบอดีของ IgE ดังกล่าวที่ถูกปล่อยออกมาจะไปจับที่บนผิวของ mast cell หรือ basophil เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มี IgE Fc-receptor จำนวนมากอยู่บนผิว ต่อจากนั้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือ allergens ชนิดเดิมในครั้งต่อๆมา allergen จะไปจับกับ IgE ที่ติดอยู่บนผิวของ mast cell 2 โมเลกุล ทำให้เกิดการกระตุ้นของ mast cell และปลดปล่อย mediators ที่ทำให้เกิดอาการแพ้ต่างๆออกมา ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยฮีสตามีนจัดเป็น mediator ที่ออกฤทธิ์และตอบสนองอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการอักเสบ (inflammation) การเป็นผื่นคัน (pruritis) (รูปที่ 2.4) มีการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในหลอดเลือด กระเพาะลำไส้ และระบบทางเดินหายใจ เส้นเลือดฝอยขยายตัว ถ้ามีการแพ้เกิดขึ้นมากมีผลทำให้ชีพจรเต้นเร็ว ความดันโลหิตต่ำ [สกุรัตน์ อุษณาวรงค์, 2550, Donald, Y. M., Leung. 2010, Leslie, C.G., และ Paul, A.G. 2009, Lawrence, T.C., et al. 1988].



รูปที่ 2.3 กลไกของการแพ้อาหาร



รูปที่ 2.4 การบวมและผื่นจากการแพ้อาหารในบริเวณต่างๆของร่างกาย

2.1.3 การแพ้ไข่

การแพ้ไข่จัดเป็นหนึ่งในของการแพ้อาหารประเภทหนึ่งที่พบได้บ่อย การแพ้ชนิดนี้จัดเป็นการแพ้อันดับสองรองจากการแพ้ในนมที่พบได้ในเด็กทารกจนถึงเด็กที่มีอายุน้อย สาเหตุส่วนใหญ่ของการแพ้ไข่เป็นผลมาจากโปรตีนที่ประกอบในไข่แดง (yolks) หรือไข่ขาว (egg whites) ซึ่งกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน ยังผลให้มีอาการต่างๆที่สามารถพบได้ตามร่างกายของเด็ก โดยส่วนมากการแพ้จะเกิดจากการแพ้โปรตีนในไข่ขาวมากกว่าการแพ้โปรตีนในไข่แดง เนื่องจากโปรตีนบางชนิดในไข่ขาวจัดเป็นสารหลักที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ที่ประกอบในไข่ขาวคือ ovomucoid (Gal d 1) ovalbumin (Gal d 2) ovotransferrin (Gal d 3) และ lysozyme (Gal d 4) โดยพบเป็นร้อยละ 10 54 12 และ 3.5 ของโปรตีนในไข่ขาวตามลำดับ และโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ในไข่แดงคือ chicken serum albumin (alpha-livetin, Gal d 5) ในการแพ้ไข่มีความสัมพันธ์กับอายุในเด็กและพบการแพ้ไข่ได้ยากในผู้ใหญ่ แต่สำหรับผู้ใหญ่ที่แพ้ไข่อาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนหรือเป็นผื่นคันหลังจากที่รับประทานไข่หรืออาหารที่มีส่วนประกอบของไข่ นอกจากนี้การแพ้ไข่ยังมีความสัมพันธ์กับโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic

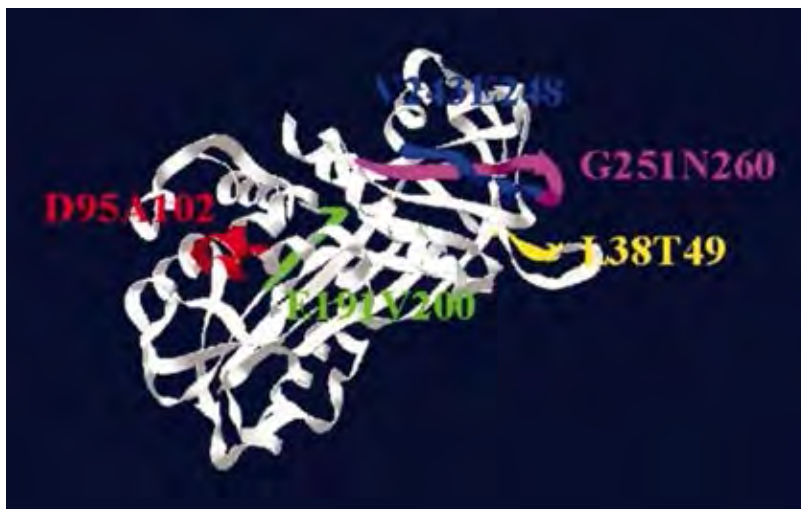
dermatitis) ภาวะภูมิไวเกินชนิดที่ 1 (type I hypersensitivity) และอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ (respiratory symptoms) ในช่วงแรกของการแพ้ไข่อาจเป็นเครื่องบ่งชี้การแพ้ต่อไปในอนาคต ซึ่งรวมถึงการแพ้ต่อสารก่อภูมิแพ้ในอากาศ (aeroallergens) และพัฒนาต่อไปจนเป็นโรคหอบหืด (asthma) ได้ สามารถพบการแพ้แบบนี้ชัดเจนในเด็กที่มาอายุน้อยกว่า 2 ปี และพบได้ในบางรายของเด็กจนถึงอายุ 6 ปี [Savage, J.H., *et al.* 2007, Montesinos, E., *et al.* 2010, Čelakovská, J., *et al.* 2010, Heine, R.G., *et al.* 2006, Diéguez, M.C., *et al.* 2009, Eggesbo, M., *et al.* 2001, Jarvinen, K.M., *et al.* 2007, Poulsen, L.K., *et al.* 2001]

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงโปรตีนหลักในการก่อให้เกิดการแพ้ไข่

Protein	Abbreviation	Mass (kDa)	Amino acids (n)
Egg white			
Ovomucoid	Gal d 1	28	186
Ovalbumin	Gal d 2	45	385
Ovotransferrin	Gal d 3	78	686
Lysozyme	Gal d 4	14	129
Egg yolk			
Chicken serum albumin	Gal d 5	70	592

2.1.4 โครงสร้างและคุณลักษณะของโอวัลบูมิน

Ovalbumin (OVA) จัดเป็นโปรตีนหลักในการก่อให้เกิดการแพ้ไข่ โดยเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 65-68 ของโปรตีนทั้งหมด มีจำนวนของกรดอะมิโนทั้งหมด 385 อะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลคือ 45 KDa (รูปที่ 2.5) นอกจากนั้น OVA จัดอยู่ในกลุ่มของ serpin แต่ไม่มีคุณสมบัติเหมือนโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ serpin ทั่วไป เนื่องจากไม่พบ serine protease inhibition และยังไม่ทราบบทบาทที่แท้จริงของ OVA [Huntington, J.A. และ Stein, P.E. 2001, Heine, R.G., *et al.* 2006, Hu, H.Y., และ Du, H.N. 2000, Gettins, P.G. 2002]



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของ ovalbumin

2.1.5 การแพ้ไข่กับวัคซีน

วัคซีนหลายชนิดประกอบด้วย active component หรือแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารที่ได้เติมลงไปในวัคซีน อาทิเช่น additives adjuvants preservatives และอื่นประกอบอื่น ๆ เป็นต้น ในวัคซีนบางชนิดสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของโปรตีนไข่ได้ อาทิเช่น วัคซีนไข้วัดใหญ่ (influenza vaccine) วัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม (MMR) และ วัคซีนไข้วัดเหลือง (yellow fever vaccine) เป็นต้น วัคซีนไข้วัดใหญ่สามารถผลิตได้จากไข่ที่ปฏิสนธิ (embryonated chicken eggs, ECE) และจากการสำรวจวัคซีนที่ขายเชิงพาณิชย์ พบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนที่เป็นสารก่อการแพ้ในวัคซีน เป็นปริมาณ 1 จนถึง 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยความเข้มข้นที่พบเป็นความเข้มข้นที่มีความเสี่ยงอาจก่อให้เกิดภาวะ anaphylaxis ในผู้ที่มีอาการแพ้ไข่ได้ [Gagnon, R., et al. 2010, O'Brien, T.C., et al. 1971, Romero, G.L., และ Kumar, S. 2006]

สถาบันของ Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology (CSACI) มีข้อเสนอแนะว่าสามารถฉีดวัคซีน pH1N1 โดยปราศจากการทดสอบทางผิวหนัง (skin prick tests, SPTs) ได้ ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนจากไข่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แต่ผู้ป่วยที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการแพ้ไข่ควรฉีดแบบวิธี 2-dose โดย dose แรกฉีดร้อยละ 10 ของวัคซีนทั้งหมดแล้วทิ้งระยะห่างเป็นเวลา 30 นาที เพื่อดูผลจากการฉีด dose แรกเข้าไป ถ้าไม่มีอาการที่มาจากวัคซีนปรากฏขึ้น ทำการฉีดวัคซีน dose ที่สองเป็นปริมาตรร้อยละ 90 ของวัคซีน นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันว่ามีภาวะการแพ้ไข่ไม่มีและประวัติที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ (respiratory) หรือเกี่ยวกับหลอดเลือดของหัวใจ (cardiovascular) หลังจากฉีดวัคซีนไป 2-dose

ที่ร้อยละ 10 และ 90 ของปริมาณวัคซีนและทิ้งระยะห่างเป็นเวลา 30 นาที แม้ว่าภาวะ anaphylaxis หลังจากการฉีดวัคซีนไข้หวัดใหญ่จะเป็นความเสี่ยงที่เกิดขึ้นได้ตามหลักวิชาการ แต่จากการฉีดวัคซีนในผู้ป่วยที่มีภาวะแพ้ไข่ด้วย adjuvant monovalent pH1N1 influenza vaccine พบว่าไม่ปรากฏภาวะ anaphylaxis ในผู้ที่ฉีดวัคซีน [Gagnon, R., *et al.* 2010]

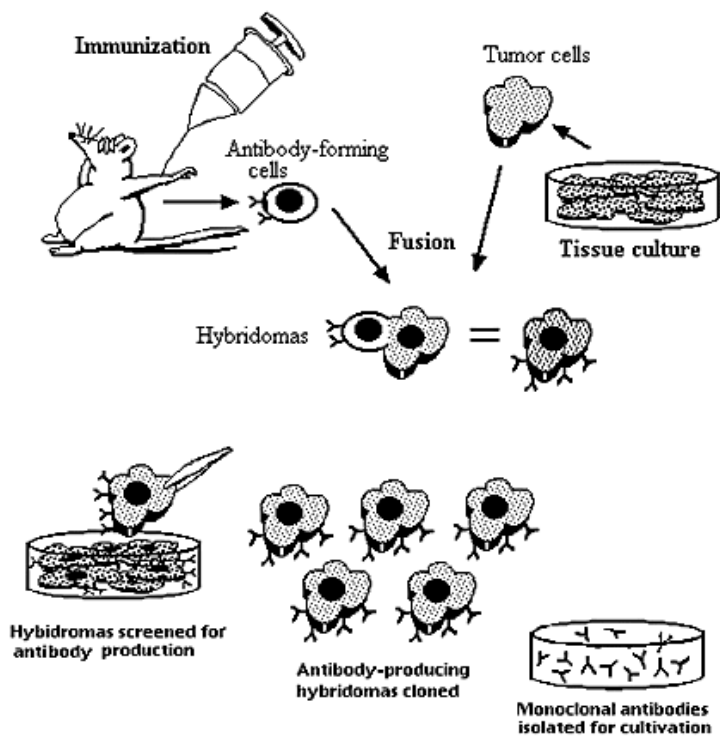
นอกจากนี้ในการฉีดวัคซีนไข้หวัดใหญ่ในเด็กและผู้ใหญ่ที่มีภาวะการแพ้ไข่เป็นจำนวน 83 คน โดยมีอายุเฉลี่ยตั้งแต่ 1 ปีจนถึง 46 ปี และผู้ที่ไม่มีภาวะการแพ้ไข่เป็นจำนวน 124 คน โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนจากไข่ในวัคซีนมีค่าน้อยกว่า 1.2 µg/mL สามารถฉีดให้กับผู้ที่มีภาวะแพ้ไข่ได้ในการฉีดแบบ 2-dose ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการได้รับวัคซีนไข้หวัดใหญ่ ระหว่าง ค.ศ. 2002-2003 และ 2006-2007 โดยอายุเฉลี่ยของผู้ที่ได้รับวัคซีนตั้งแต่ 6 ปี จนถึง 18 ปี โดยผลที่พบคือผู้ที่มีภาวะการแพ้ไข่และได้รับการฉีดวัคซีนไม่พบอาการ anaphylaxis และสามารถรับวัคซีนใน 2-dose โดยปราศจากการทดสอบที่ผิวหนัง [James, J.M., *et al.* 1998, Chung, E.Y., *et al.*, 2010]

2.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยอาศัยเทคนิคของ somatic hybridization

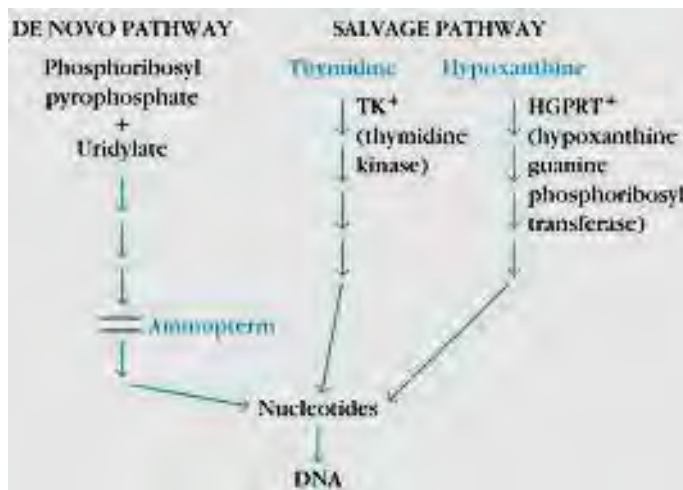
เทคโนโลยีของเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma) เป็นเทคโนโลยีที่อาศัยหลักการของ cell fusion หรือ somatic cell hybridization (รูปที่ 2.6) โดยเซลล์ที่ใช้คือ B lymphocyte ของ spleen cell ที่เป็นเซลล์ปกติแล้วมีความสามารถสร้างแอนติบอดี แต่อายุของเซลล์ไม่ยาวนาน ส่วนเซลล์อีกชนิดที่ใช้คือ myeloma cell หรือ plasmacytomas ที่เป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี ดังนั้นผลที่ได้จากการ fusion เป็นเซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการและมีอายุของเซลล์ยืนยาวไม่ตายตามคุณสมบัติของ myeloma cell เรียกเซลล์ที่ได้นี้ว่าเซลล์ไฮบริโดมา โดยอาศัยสารที่ช่วยให้เกิดการ fusion ของเซลล์ อาทิเช่น polyethylene glycol-PEG และแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมา เรียกว่า monoclonal antibodies เนื่องจากแอนติบอดีที่นี้สร้างจากเซลล์ที่มาจาก clone เดียวกันและมีความจำเพาะสูงต่อ epitope ที่สารชักนำให้สร้างแอนติบอดีชนิดนั้นชนิดเดียวและไม่มีปัญหาของปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) [Bretton, P.R., *et al.*, 1994, Arruebo, M., *et al.* 2009, Harlow, E. และ Lane, D. 1988]

สำหรับการเตรียมเซลล์ของ myeloma cell ให้สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่จำเพาะเพราะขาด functional gene ที่สำคัญต่อการสร้าง gene ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะที่นิยมใช้คือ HAT medium ซึ่งมีการเติมสาร

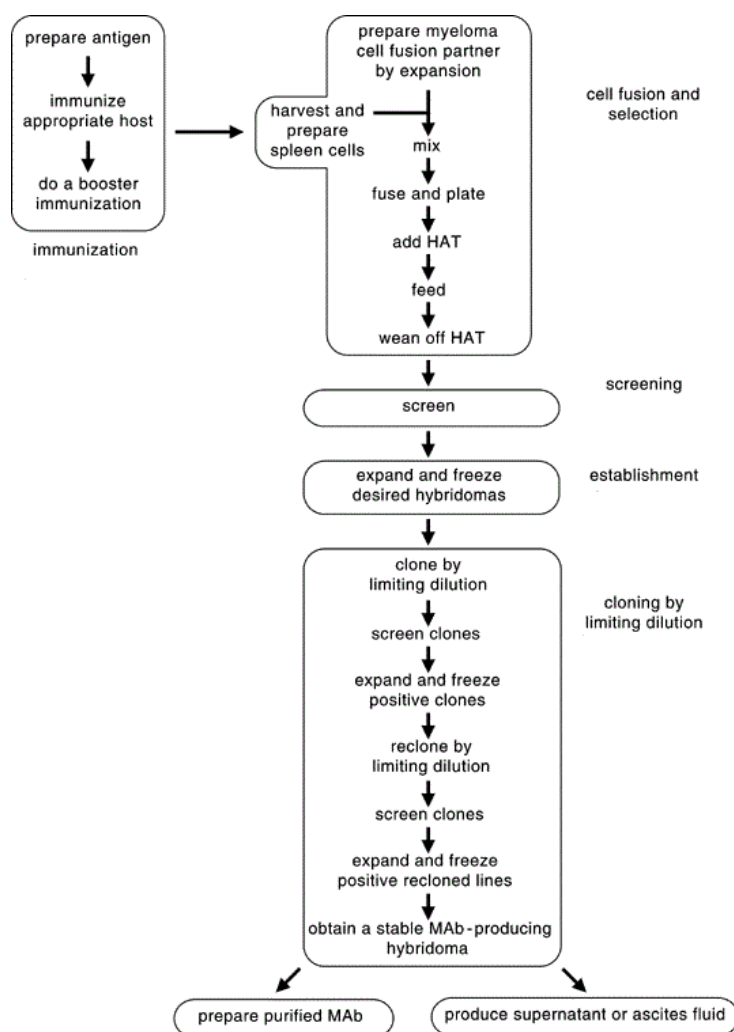
hypoxanthine, aminopterin และ thymidine ลงไปในอาหารเพื่อให้อาหารมีคุณสมบัติของอาหารที่จำเพาะ โดยสาร aminopterin จะขัดขวางการสร้าง nucleotide ตามวิธีการตามปกติแบบ *De novopathway* (รูปที่ 2.7) ส่งผลให้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ต้องมีการปรับเปลี่ยนการสร้าง nucleotide ด้วยวิธีอื่น โดยวิธีที่เซลล์ใช้ในการสร้าง nucleotide คือ Salvage pathway ในขั้นตอนการสร้าง nucleotide เซลล์ได้อาศัยสารและเอนไซม์ในการสร้าง 2 ชนิดคือ hypoxanthine โดยอาศัยเอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) และ thymidine โดยอาศัยเอนไซม์ thymidine kinase (TK) แต่เนื่องจาก myeloma cell ที่ใช้นั้นขาดเอนไซม์ของ HGPRT และ TK ทำให้ myeloma cell ไม่สามารถสร้าง nucleotide ได้จากวิธีของ salvage pathway จึงทำให้ myeloma cell ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ในอาหาร HAT medium แต่ในขณะที่ hybrid cell นั้น สามารถเจริญเติบโตและอยู่ใน HAT medium ได้เนื่องจากเอนไซม์ HGPRT ของ B cell ในการสร้าง nucleotide และ myeloma cell ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างยาวนาน จากนั้นเมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมามาแล้ว จำเป็นต้องมีการคัดเลือกเซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมี เซลล์ไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ วิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยทั่วไปอาศัยเทคนิคของ และ immunoassay ต่างๆ อาทิเช่น ELISA เป็นต้น หลังจากการพิสูจน์ถึงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการแล้ว จึงทำการโคลนซ้ำเพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์นั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เดียวจริงและมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนที่ต้องการ จากนั้นขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลแอนติบอดีที่ต้องการต่อไปให้มีจำนวนมาก (รูปที่ 2.8) [Nelson, P.N., *et al.* 2000, Shivanand, P. 2010, Harlow, E. และ Lane, D. 1988, Sikora, K., และ Smedley, H.M. 1984, Tijssen, P. 1985].



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง



รูปที่ 2.7 การสังเคราะห์ nucleotide โดยอาศัยวิธีของ De novo และ Salvage pathway

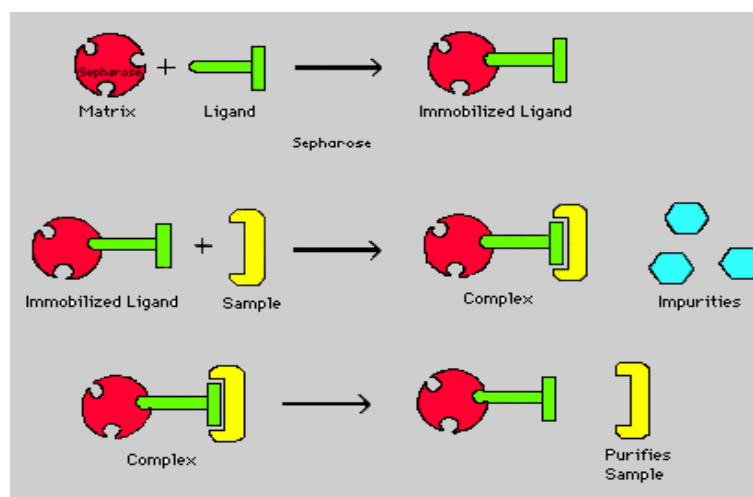


รูปที่ 2.8 ขั้นตอนของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

2.3 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity Chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) เป็นเทคนิคใช้ในการแยกโมเลกุลขนาดใหญ่ของทางชีวเคมีและทำให้บริสุทธิ์ที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะกับสารที่ต้องการแยก เช่น ปฏิกริยาระหว่างอินดิเจนกับแอนติบอดีหรือเอนไซม์กับสารตั้งต้น ประสิทธิภาพในการแยกสิ่งที่ต้องการจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่า ลิแกนด์ (biospecific ligand) ที่ตรึงให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) หรือเมทริกซ์ (matrix) ด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนลิแกนด์ที่ยึดติดกับเมทริกซ์นี้เรียกว่า ลิแกนด์ตรึง (immobilized ligand) จะมีคุณสมบัติที่มีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจ หลังจากที่จะล้างคอลัมน์ สารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์จะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ โดยการเคลื่อนที่ผ่านลงมาตามคอลัมน์แล้วออกไป คงเหลือแต่สารที่ต้องการแยกอยู่

ภายในคอลัมน์ หลังจากนั้นก็ทำการปรับภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากการยึดติดกับลิแกนด์ (รูปที่ 2.9) [Alexander, J.N. และ David P.B. 1998, Pingoud, A., *et al.* 2002, David, J.H., และ Hazel, P. 1998, David, S.H., 1999, Dancette, O.P., *et al.* 1999, Yan, Z., และ Huang, J. 2000. Firer, M.A. 2001]



รูปที่ 2.9 หลักการของ Affinity chromatography

2.4 Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

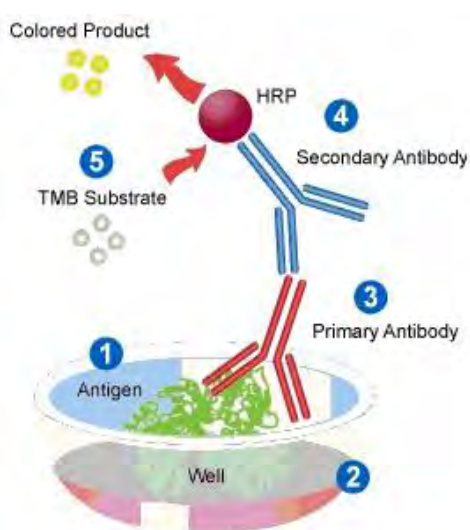
Enzyme Immunoassay (EIA) หรือ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์ทางชีวเคมีแบบเปียก (wet-lab) โดย EIA และ ELISA มีความคล้ายกับ radioimmunoassay (RIA) แต่ได้มีการพัฒนาตัวตรวจจากสารกัมมันตรังสี (radioactive) มาเป็นการติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme) โดยเทคนิคของ ELISA สามารถตรวจสอบสารที่ปนเปื้อนอยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวหรือสารตัวอย่างที่เปียกและเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น สารตั้งต้น (substrate) ซึ่งถูกเรียกว่า chromogenic substrate นอกจากนี้เอนไซม์ที่ถูกใช้สำหรับการติดฉลากกับแอนติบอดีมีด้วยกันหลายชนิด อาทิเช่น alkaline phosphatase (ALP), horseradish peroxidase (HRP) และ β -galactosidase ในการเลือกสารตั้งต้น (substrate) ขึ้นอยู่กับความไวที่ต้องการการวิเคราะห์และความสามารถของเครื่องมือเพื่อการตรวจวัด อาทิเช่น สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorometer) หรือ เครื่องวัดแสงลูมิเนสเซนซ์ (luminometer) จึงทำให้เทคนิค ELISA มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเทคนิค RIA ในด้านของความปลอดภัยและค่าใช้จ่ายที่น้อยลง

2.4.1 รูปแบบของ ELISA

2.4.1.1 Indirect ELISA

เทคนิค indirect ELISA เป็นวิธีที่เลือกใช้สำหรับการตรวจวัดหรือการตรวจสอบเชิงปริมาณ (quantitative determination) ของแอนติบอดี อาทิเช่น การตรวจสอบแอนติบอดีของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (human immunodeficiency virus, HIV) ในซีรัม (serum) เป็นต้น

โดยเริ่มจากการเติมสารละลายของแอนติเจนลงในแต่ละหลุม (well) ของไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) สารละลายโปรตีน อาทิเช่น BSA (bovine serum albumin) ถูกเติมลงในแต่ละหลุมเพื่อสำหรับการป้องกันพื้นที่ที่ไม่ได้มีแอนติเจนเคลือบ จากนั้นเติมซีรัมหรือสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ลงในแต่ละหลุมที่มีแอนติเจนเคลือบอยู่ ซึ่งจะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดีปฐมภูมิ หลังจากนั้นทำการล้างแอนติบอดีที่ไม่เกิดการจับกับแอนติเจนและเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติบอดีปฐมภูมิและแอนติบอดีทุติยภูมิ จากนั้นล้างแอนติบอดีทุติยภูมิส่วนเกินที่ไม่จับกับแอนติบอดีปฐมภูมิออกเมื่อล้างเสร็จแล้วทำการเติมสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ ในขณะนั้นจะค่อยๆเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ที่ติดกับแอนติบอดีทุติยภูมิและสารตั้งต้นที่เติมลงไป แล้วนำไมโครไตเตอร์เพลทที่เกิดสีมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)



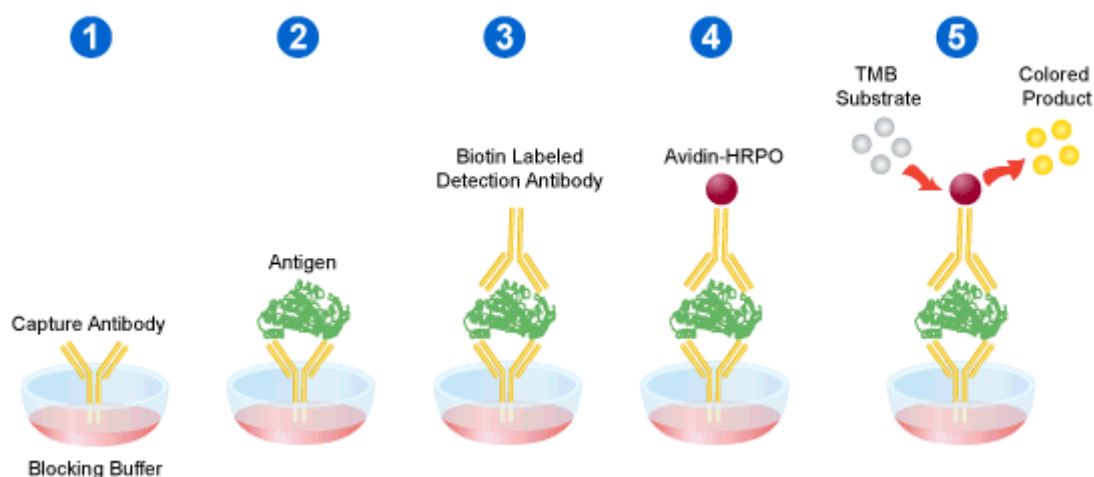
รูปที่ 2.10 ขั้นตอนของเทคนิค indirect ELISA

1. เคลือบแอนติเจนลงบนเพลท
2. เติมสารละลายป้องกันลงในเพลทเพื่อป้องกันบริเวณที่ไม่มีแอนติเจนเคลือบอยู่
3. จากนั้นเติมแอนติบอดีปฐมภูมิลงในเพลท
4. ทำการเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ ซึ่งเหมาะสมกับแอนติบอดีปฐมภูมิ
5. ทำการเติมสารตั้งต้นที่เหมาะสมกับเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีทุติยภูมิจะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้น

2.4.1.2 Sandwich ELISA

เทคนิค sandwich ELISA หรือ อาจเรียกเทคนิคนี้ว่า two site capture assay หรือ antibody capture assay เป็นวิธีที่เลือกใช้สำหรับการตรวจวัดหรือการตรวจสอบเชิงปริมาณของแอนติบอดีหรือแอนติเจน อาทิเช่น การตรวจสอบแอนติบอดีของ HBsAg, tumor marker และ IgM ต่อโรคติดต่อเชื้อต่าง ๆ เป็นต้น

ในขั้นตอนของการตรวจหาแอนติเจนทำได้โดยการเคลือบผิวของหลุมด้วยแอนติบอดี แล้วจากนั้นเติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบลงไปในแต่ละหลุม ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน จากนั้นล้างส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากโดยใช้ตัวเดียวกับที่เคลือบบนหลุมหรือจะใช้แอนติบอดีที่สามารถจับกับ epitope ที่ต่างกันของแอนติเจนชนิดนั้น ซึ่งเทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยาสูงขึ้น



รูปที่ 2.11 ขั้นตอนของเทคนิค sandwich ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนโดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบบน solid phase และแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

2.4.1.3 Competitive ELISA

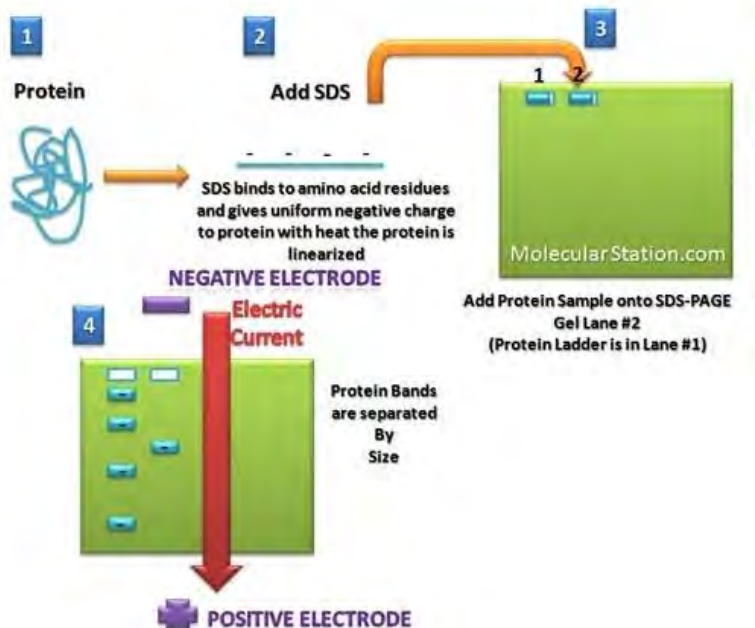
เทคนิค competitive ELISA เป็นวิธีที่เลือกใช้สำหรับการตรวจวัดหรือการตรวจสอบเชิงปริมาณของแอนติบอดีหรือแอนติเจน

ในการตรวจหาแอนติเจน จะทำการเคลือบหลุมด้วยแอนติบอดี จากนั้นนำแอนติบอดีที่ทราบชนิดและทราบปริมาณความเข้มข้นผสมเข้ากับสิ่งที่ต้องการตรวจลงไปหลุม ถ้าในสิ่งตรวจมีแอนติเจนอยู่ จะเกิดการแย่งจับกันระหว่างแอนติเจนที่อิสระที่ผสมลงไปกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่ที่พื้นหลุม โดยผลที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ทราบชนิดและปริมาณความเข้มข้น ถ้ามีปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีสูง ทำให้มี

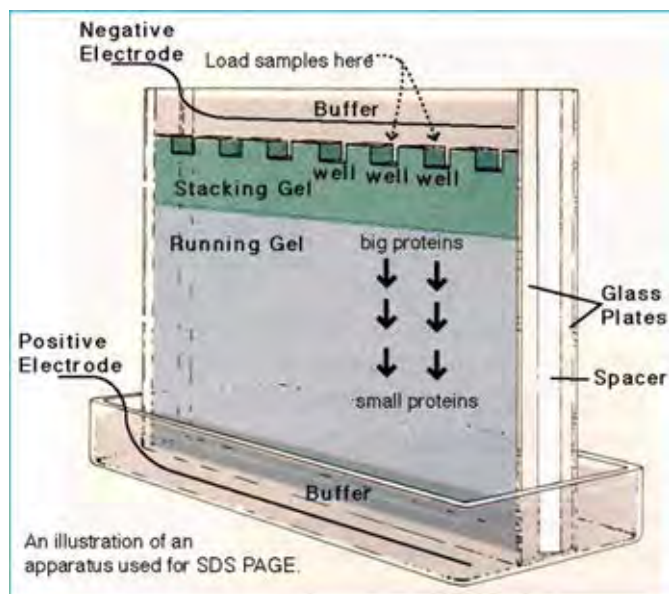
แอนติบอดีในรูปอิสระแย่งจับกับแอนติเจนในสิ่งตรวจ ส่งผลให้มีปริมาณแอนติเจนเหลืออยู่น้อยใน การที่จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ที่หลุม [Richard, A.G, *et al.* 2002]

2.5 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยโดยอาศัยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE เริ่มจากการนำตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการศึกษามาสวมในสารละลาย SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล (thiol) อาทิเช่น 2-Mercaptoethanol แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ โดยการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนจากทรงกลมไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง ซึ่งในสภาวะดังกล่าว SDS ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุลบจะไปเกาะกับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักคงที่ ทำให้โปรตีนมีค่าความหนาแน่นของประจุเท่ากัน ส่งผลให้โปรตีนมีประจุลบ จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างใส่ในแต่ละช่องของแผ่นเจลและนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าโดยจะเป็นการเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ดังนั้นโปรตีนจึงเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (รูปที่ 2.12) ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วนำมาย้อมด้วยสีเช่น coomassie blue หรือ silver stain ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสามารถหาได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักแล้ว (รูปที่ 2.13) นอกจากนี้การปรากฏของแถบสีโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน [Sambrook, *et.al.* 1989, Harlow, E., และ Lane, D. 1988, Olsen, I., และ Wiker, H.G. 1998, Wu, X., และ Koiwa, H. 2012]



รูปที่ 2.12 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE



รูปที่ 2.13 การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล

2.6 อนุภาคนาโนเมตร (Nanoparticle)

อนุภาคนาโนเมตรจัดเป็นความรู้ด้านหนึ่งของนาโนเทคโนโลยี โดยอนุภาคนาโนเมตรจะมีความหลากหลายทางรูปร่าง ขนาด และ ส่วนประกอบ ในการวัดขนาดของอนุภาคนิยมวัดในหน่วย นาโนเมตร (nanometer) งานวิจัยและสิ่งตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องทางด้าน bioanalysis

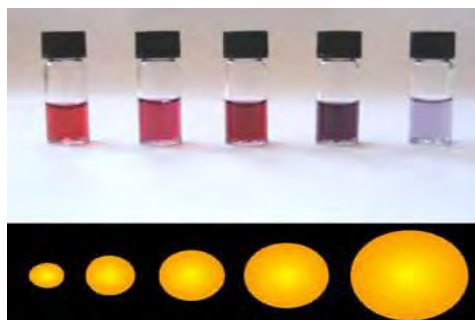
ได้นำความรู้ของอนุภาคนาโนเมตรมาตั้งหรือการติดฉลากเพื่อสำหรับใช้เป็นตัววิเคราะห์ อนุภาคขนาดนาโนเมตรที่นิยมใช้เพื่อเป็นตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ อนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร (silver nanoparticle, AuNPs) และ อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร (gold nanoparticle, AuNPs)

อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรเป็นทองคำที่อยู่ในสารละลายที่มีความหลากหลายทางรูปร่าง ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางและสีของสารละลาย อาทิเช่น สารละลายที่มีสีแดง อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 100 nm สามารถประยุกต์ใช้อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งเกี่ยวข้องกับนาโนเทคโนโลยี และวัสดุศาสตร์ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ในงานทางด้านชีววิทยา และทางการแพทย์เนื่องจากอนุภาคทองคำง่ายต่อการควบคุมการกระจายของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มีความเสถียรสามารถเก็บอนุภาคได้นาน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ กับแอนติเจน แอนติบอดี โปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ

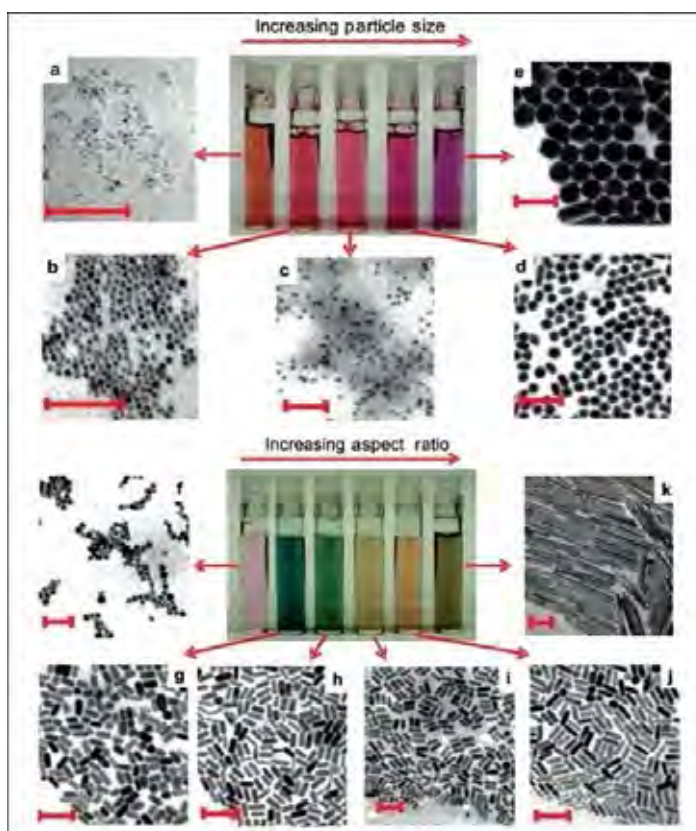
2.6.1 คุณลักษณะของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

- สมบัติทางแสงของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรจะขึ้นอยู่กับขนาด (รูปที่ 2.14) และรูปร่างของอนุภาค (รูปที่ 2.15)
- Surface plasmon band (SPB) จะปรับเปลี่ยนไปตามขนาด รูปร่างและฟังก์ชันการทำงานที่พื้นผิว (surface functionalities.)
- สีของสารละลายของอนุภาคทองคำจะขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างอนุภาคทองคำกับอนุภาคทองคำ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายอนุภาคทองคำจากสีแดงเป็นสีฟ้าเมื่ออนุภาคทองคำเกิดการรวมตัวของอนุภาคทองคำที่ใกล้กันเข้าด้วยกัน
- ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำจะอยู่ในช่วงการดูดกลืนแสงที่ 510 จนถึง 550 nm ซึ่งในสีแต่ละสีจะมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ไม่เหมือนกัน อาทิเช่น สีของสารละลายอนุภาคทองคำเป็นสีแดง จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดประมาณ 520 nm เป็นต้น (รูปที่ 2.16)

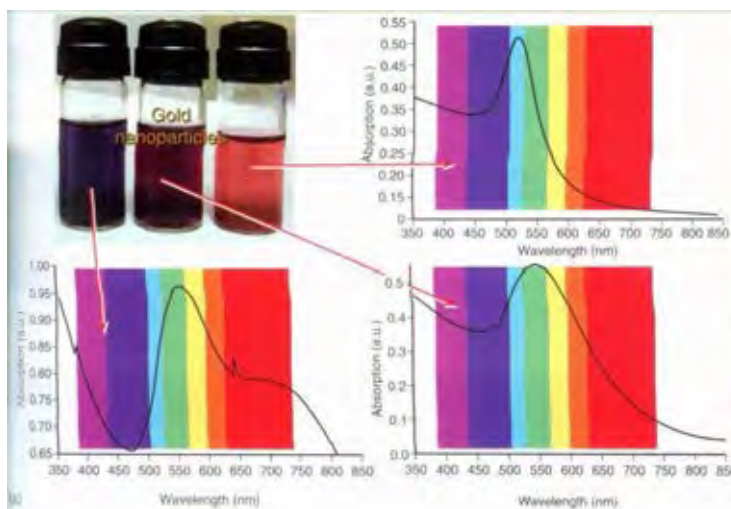
ขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำสามารถเห็นได้ด้วยอาศัย transmission electron microscopy (TEM) scanning electron microscopy (SEM) หรือ atomic force microscopy (AFM).



รูปที่ 2.14 ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับขนาดของอนุภาค



รูปที่ 2.15 ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับรูปร่างของอนุภาค



รูปที่ 2.16 ความสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายอนุภาคทองคำกับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

2.6.2 การสังเคราะห์และการเกิดรูปแบบของอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำสามารถสังเคราะห์ได้จากหลายเทคนิค อาทิเช่น การสังเคราะห์โดยอาศัยทางกายภาพ และการสังเคราะห์ด้วยสารเคมี ซึ่งการสังเคราะห์ด้วยสารเคมีจัดเป็นหนึ่งในเทคนิคที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและปลอดภัย เช่นเทคนิคของ turkevich-frens method เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 จนถึง 60 nm สารที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์คือ chloroauric acid โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction) ของสารเคมีที่เป็นรีดิวซ์เอเจนต์ (reducing agent) อาทิเช่น sodium citrate ascorbic acid sodium boron hydrid หรือ block copolymers ในการรีดิวซ์อนุภาคทองคำ แต่ sodium citrate จัดเป็นสารเคมีที่เป็นรีดิวซ์เอเจนต์ที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์ ในเปลี่ยนแปลงปริมาณของ sodium citrate ในการสังเคราะห์ ส่งผลให้ได้อนุภาคทองคำที่มีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาค จะเป็นการรีดิวซ์อนุภาคทองคำจาก Au(III) ไปเป็น Au(0) ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอนุภาคทองคำสามารถพบสารตัวกลาง (precursor) ของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำได้หลายรูปแบบ อาทิเช่น AuCl_4^- , $\text{AuCl}_3(\text{OH})^-$, $\text{AuCl}_2(\text{OH})_2^-$, $\text{AuCl}(\text{OH})_3^-$ หรือ $\text{Au}(\text{OH})_4^-$ โดยสารตัวกลางที่พบจะขึ้นอยู่กับ pH และรูปแบบของ forms clusters เมื่อสิ้นปฏิกิริยาจะได้อนุภาคทองคำที่มีปะจุโดยรอบอนุภาคเป็นลบ [Ma, L.N., et al., 2010, Polte, J. T., et al., 2010, Kimling, J., et al., 2006 Zhu, J., et al., 2008, Bhattacharya, S. และ Srivastava, A., 2003, Chithrani, B.D., et al., 2009].

2.6.3 การติดฉลากด้วยโลหะ (Metal label)

การติดฉลากด้วยโลหะถูกใช้อย่างมากในงานทางด้าน immunoassay โดยเฉพาะอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร เนื่องจากง่ายในการควบคุมขนาดของอนุภาค มีความเสถียรและสามารถเก็บรักษาได้นาน และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จึงได้เลือกอนุภาคทองคำมาใช้ในการติดฉลาก รวมทั้งอนุภาคทองคำมีประจุโดยรอบอนุภาคเป็นลบ จึงทำให้จับกับโมเลกุลที่มีประจุเป็นบวกได้ ซึ่งในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำและโปรตีนอาศัยแรงระหว่างอนุภาคทองคำกับโปรตีนหลายแรงด้วยกัน อาทิเช่นพันธะไฮโดรเจน แรงไฟฟ้าสถิต แรงแวนเดอร์วาลส์ และ zwitterion force ของอนุภาคทองคำได้อย่างแข็งแรงเมื่อทั้งคู่จับกันอย่างเหมาะสม ทำให้มีความเสถียรในการเก็บในรูปของของเหลว ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำกับโปรตีนส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) [Ma, L.N., Liu, D.J., และ Wang, Z.X., 2010, Norde, W., 1986, Hayat, M.A., 1989, Hermanson, G., 1995, Hou, S.Y., et al., 2007]

สารละลายของอนุภาคทองคำที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับโมเลกุลโปรตีน จะเกิดสภาวะที่ไม่เสถียรเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายของอนุภาคทองคำที่ได้เชื่อมต่อกับโมเลกุลโปรตีน เนื่องจาก electrolytes อาทิเช่น sodium chloride เป็นต้น ทำให้ประจุบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำมีความไม่สมดุลระหว่าง attractive forces และ repulsive ส่งผลให้เมื่ออนุภาคทองคำเกิดการจับกับอนุภาคทองคำที่ใกล้เคียงแล้วเกิดการตกตะกอน โดยความเสถียรที่เกิดขึ้นของสารละลายของอนุภาคทองคำที่ได้เชื่อมต่อกับโมเลกุลโปรตีนต้องพิจารณาในหลายปัจจัย คือ ค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีน ค่า pH ของปฏิกิริยาที่ใช้ในการเชื่อมต่อ ความเข้มข้นของโปรตีนที่เพียงพอที่ใช้ในการเชื่อมต่อ โดยภาวะที่เหมาะสมของอนุภาคทองคำและโมเลกุลโปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันได้ [Derjaguin, B.V. และ Landau.L., 1941, Verwey, E.J.W. และ Overbeek, J.T.G., 1948]

เทคนิคที่ใช้การติดตามการเชื่อมต่อและความเสถียรของอนุภาคทองคำกับโมเลกุลโปรตีนได้ด้วยหลายวิธี อาทิเช่น UV-vis absorption fluorescence spectroscopy transmission electron microscopy (TEM) dynamic light scattering (DLS) enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) และ electrochemistry measurements

2.7 การวิเคราะห์โดยอาศัยการวิเคราะห์บนกระดาษ (paper-based device)

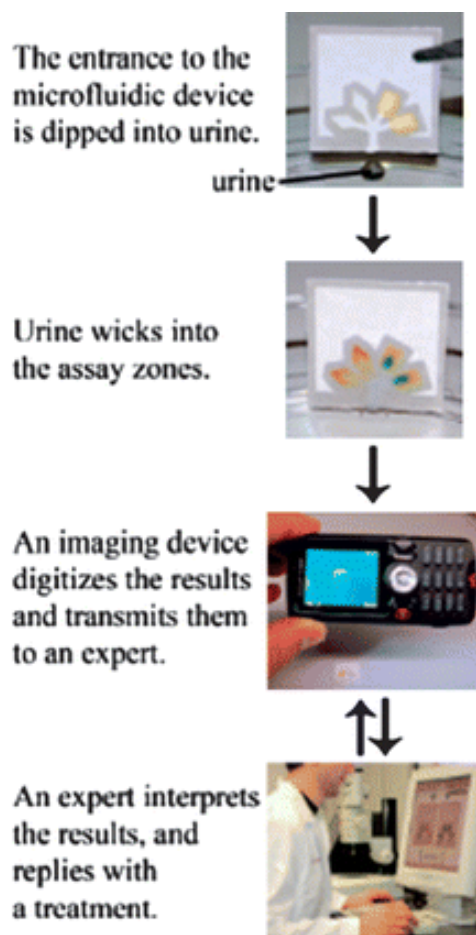
หลังจาก ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา ได้มีการพัฒนาเทคนิคของ immunoassay อย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยหลักการของ ELISA การพัฒนาได้เริ่มจากการปรับปรุงเทคนิค solid phase labeled immune-filtration assay (IFA) ประกอบด้วยกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, NCM) ที่ใช้เป็นตัวพยุง (supporter) และตัวติดฉลาก ตัวติดฉลากที่นิยมใช้ Immunoassay เช่น เอนไซม์ (enzyme) หรืออนุภาคโลหะขนาดนาโนเมตร (metal nanoparticle labels) โดยอนุภาคโลหะขนาดนาโนเมตรที่ใช้ติดฉลาก ได้แก่ อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร (gold nanoparticle) และอนุภาคเงินขนาดนาโนเมตร (silver nanoparticle) โดยอนุภาคดังกล่าวได้รับความสนใจใช้เป็นทางเลือกสำหรับการติดฉลากกับโปรตีน เพื่อปรับปรุงความเสถียรและความไวของ immunoassay ซึ่งอนุภาคทองคำถูกใช้อย่างใช้กันอย่างกว้างขวางมากกว่าในเทคนิคของ immunoassay และได้พัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการติดฉลากด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี [Ye, Y., et al., 2010, Martinez, A.W., et al., 2007].

ข้อดีของการวิเคราะห์บนกระดาษ [Pelton, R., 2009] มีดังนี้

1. กระดาษเป็นวัสดุที่มีราคาถูก สามารถใช้ในงานอย่างกว้างขวาง มีน้ำหนักที่เบา มีความยืดหยุ่นและสะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้ในภาคสนาม รวมทั้งง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนย้าย
2. การไหลของสารบนกระดาษ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยปราศจากการใช้เครื่องมือในการไหล
3. สามารถปรับปรุงกระดาษให้มีความเหมาะสมในการเชื่อมต่อกับโปรตีน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ
4. กระดาษที่ใช้ในการวิเคราะห์มีสีขาว ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสีของกระดาษกับสีที่เกิดจากปฏิกิริยาที่วิเคราะห์

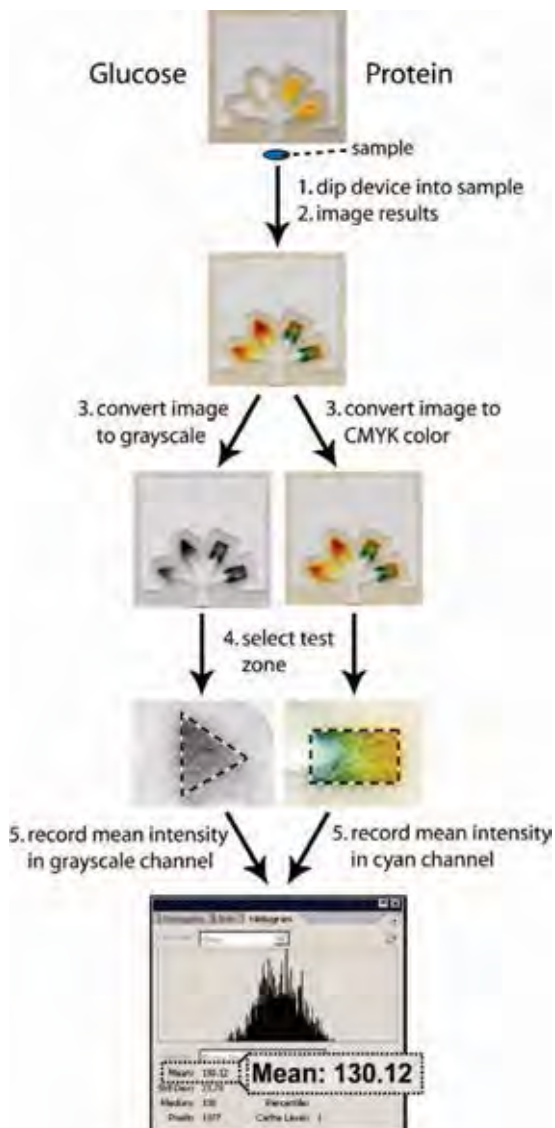
2.8 Optical detection

เทคนิค optical detection เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสีโดยอาศัยเครื่องสแกนหรือกล้องดิจิทัลในการจับภาพในบริเวณที่วิเคราะห์ รูปที่ได้จากการวิเคราะห์จากภายในห้องปฏิบัติการหรือภาคสนามสามารถนำมาวิเคราะห์ (รูปที่ 2.17) และทราบผลของการวิเคราะห์หลังจากการวิเคราะห์ทันที ข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้คือ มีราคาที่ถูก ง่าย และ ไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ผล



รูปที่ 2.17 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Optical detection

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสามารถทำการวิเคราะห์ได้ โดยเริ่มจากการจับภาพ ในบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสแกนหรือกล้องดิจิทัล จากนั้นทำการเปลี่ยนสีที่อยู่ในรูป ในบริเวณที่วิเคราะห์เป็น gray scale หรือ CMYK เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ แล้วนำ รูปภาพที่ทำการเปลี่ยนแปลงแล้วมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป อาทิเช่น adobe photoshop program เพื่อทำการวัดค่า mean intensity ที่ได้ทำการวิเคราะห์ (รูปที่ 2.18)

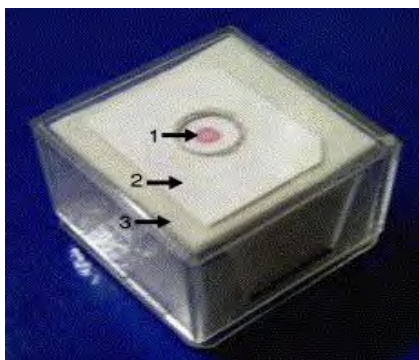


รูปที่ 2.18 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.9 Dot-immunogold filtration assay (DIGFA)

เทคนิค Dot-immunogold filtration assay (DIGFA) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจาก immunofiltration assay (IFA) ซึ่งประกอบด้วยกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่ใช้เป็นตัวพุง และตัวติดฉลาก ตัวติดฉลากที่ใช้คือ อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร โดยสามารถใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการติดฉลากด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีเพื่อปรับปรุงความเสถียรและความไวของ immunoassay ส่วนประกอบของเทคนิค DIGFA ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ตัวพุง (หมายเลข 2 ของรูปที่ 2.19) ตัวติดตามที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่าในบริเวณวิเคราะห์ (หมายเลข 1 ของรูปที่

2.19) และวัสดุชุดสารส่วนเกิน (หมายเลข 3 ของรูปที่ 2.19) [Ye, Y., *et al.* 2010, Mansour, W.A., *et al.* 2009].



รูปที่ 2.19 ส่วนประกอบของเทคนิค DIGFA กระดาษ

ตัวอย่างหลักการของเทคนิค DIGFA เริ่มจากการหยดสารละลายแอนติเจนของ HAV IgM ในซีรัมลงบนกระดาษในบริเวณที่วิเคราะห์ จากนั้นหยด anti-HAV IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร ถ้ามีแอนติเจนอยู่บนกระดาษ ตัวติดตามจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแล้วจะเกิดเป็นสีแดง โดยสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า [Wu, W., *et al.* 1999]

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ DIGFA

Huang และคณะ (1996) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อการตรวจวัด reaginic antibody ในซีรัมของผู้ป่วยโรค syphilitic โดย 350 ตัวอย่างของซีรัมที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA แล้วเทียบด้วยเทคนิค rapid regain test และเทคนิค fluorescent treponemal antibody-absorption test จากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ reaginic antibody ในซีรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA เป็นร้อยละ 100 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเทคนิค rapid regain และ ร้อยละ 98 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเทคนิค fluorescent treponemal antibody-absorption test โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA สามารถเห็นผลภายใน 2 นาทีและปราศจากการใช้เครื่องมืออื่น

Wu และคณะ (1999) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อการตรวจวัด hepatitis A virus specific immunoglobulin M (IgM) antibody ในซีรัม โดย 264 ตัวอย่างของซีรัมที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA แล้วเทียบด้วยเทคนิค ELISA ผลที่ได้จากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ hepatitis A virus specific immunoglobulin M (IgM) antibody ในซีรัมที่วิเคราะห์ด้วย

เทคนิค DIGFA และเทคนิค ELISA เป็นจำนวน 88 ตัวอย่าง โดยความไวและความจำเพาะของเทคนิค DIGFA เป็นจำนวนร้อยละ 86.27 และตรวจไม่พบ hepatitis A virus specific immunoglobulin M (IgM) antibody เป็นจำนวน 146 ตัวอย่าง โดยความไวและความจำเพาะของเทคนิค DIGFA ร้อยละ 90.12 ดังนั้นสามารถใช้เทคนิค DIGFA ในการตรวจวิเคราะห์ได้

Wen และคณะ (2005) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อสำหรับการตรวจวัด anti-Schistosoma japonicum antibody ในซีรัม โดย 1091 ตัวอย่างของซีรัมที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA เทคนิค ELISA และเทคนิค indirect haemagglutination assay จากผลการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ anti-Schistosoma japonicum antibody ในซีรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA เป็นร้อยละ 9.3 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA เป็นร้อยละ 11.5 และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค indirect haemagglutination assay เป็นร้อยละ 11.0 ดังนั้นสามารถใช้เทคนิค DIGFA ในการตรวจวิเคราะห์ anti-Schistosoma japonicum antibody จาก *S. japonicum* ได้

Li และคณะ (2006) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อสำหรับการตรวจวัด ToRCH-related antibodies Toxoplasma gondii rubella virus cytomegalovirus และ herpes simplex virus type 1 และ 2 ในซีรัม โดย 186 ตัวอย่างของซีรัมที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA และเทียบกับเทคนิค ELISA ผลจากการทดลองพบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Wang และคณะ (2006) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อสำหรับการตรวจวัด white spot syndrome virus (WSSV) โดยใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นตัวพุง WSSV และ anti-WSSV monoclonal antibody (mAbs) 1D5 และ 6A4 ที่ติดฉลากกับอนุภาคทองคำ ผลจากการทดลองพบว่า เทคนิค DIGFA สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassay (DB-NC-EIA)

Sui และคณะ (2000) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อการตรวจวัดสารในกลุ่มของ fluoroquinolones (FQs) ได้แก่ enrofloxacin (ENR) ciprofloxacin (CIP) และ norfloxacin (NOR) ซึ่งผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นน้อยที่สุดของเทคนิค DIGFA ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้สำหรับ ENR และ CIP คือ 20 µg/kg และสำหรับ NOR คือ 50 µg/kg ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA สามารถเห็นผลด้วยตาเปล่าภายใน 30 นาที

Mansour และคณะ (2009) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อการตรวจวัด antigenaemia ในซีรัมของผู้ป่วยโรค schistosomiasis โดยนำตัวอย่างของซีรัมที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA, เทคนิค dot-ELISA, และเทคนิค dipstick ELISA เพื่อเปรียบเทียบความไวและ

ความจำเพาะกับการวิเคราะห์ด้วย DIGFA ผลจากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบ antigenaemia ในซีรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA เป็นร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sandwich ELISA วิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot-ELISA เป็นร้อยละ 89.7 และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dipstick ELISA เป็นร้อยละ 91.2 นอกจากนี้มีความไวเป็นร้อยละ 95.8 และมีความจำเพาะเป็นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถใช้เทคนิค DIGFA ในการตรวจวิเคราะห์ antigenaemia ในซีรัมของผู้ป่วยโรค schistosomiasis

Ye และคณะ (2010) ได้พัฒนาเทคนิค DIGFA เพื่อสำหรับการตรวจวัด aflatoxin B(1) (AFB(1)) โดยใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็นตัวพยุง aflatoxin B(1) และใช้ตัวติดฉลากที่เป็น anti-aflatoxin B(1) กับอนุภาคทองคำ ซึ่งผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้น 2 ng/mL เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA นอกจากนี้ผลจากการตรวจวิเคราะห์สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 15 นาที

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระดาษกรองเบอร์ 1	Whatman [®] , England
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด	Nunc, Denmark
เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน	IKA [®] C-MAG HS10
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Universal 32R, Hettich
เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ	Benchtop laboratory centrifuge Universal 320 R, Hettich lab technology, UK
เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (vortex)	Scientific Industries, Inc., USA
เครื่องพิมพ์ที่ใช้ในการพิมพ์ลาย	Color Qube 8570, Xerox
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	2800 UV-VIS spectrophotometer, Unico, China
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo, USA
เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์	Biochrom Anthos 2010 Microplate Reader, UK

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
เครื่อง Transmission electron microscopy	JEM-2100 Transmission Electron Microscope, Japan
จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Corning Incorporated, USA
ชุดอิเล็กโทรฟอเรซิส	Bio-Red, USA
ตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Scientific Forma Direct Heat CO ₂ Incubators
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
ทิป (tip) ขนาด 0.01, 0.2 และ 1 mL	Axygen, USA
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	HICLAVE™ HVE-50, HIRAYAMA, JAPAN
หลอดทดลองขนาด 1.5 mL	Axygen, USA
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 mL	Corning Incorporated, USA
หลอดสำหรับแช่แข็งเชื้อ (cryotube)	Nunc, Denmark
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert, Germany

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich, USA
BCA™ protein assay kit	Pierce, USA
Beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สารเคมี	แหล่งที่มา
Citric acid	Merek, Germany
Coomassie brilliant blue R-250	Pierce, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka, Switzerland
di-Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4)	Merek, Germany
Fetal calf serum	Invitromax, USA
Glycine	Sigma-Aldrich, USA
Goat anti-mouse IgG horse redish peroxidase	Amersham Biosciences, UK Sigma-Aldrich, USA
Hydrochloric acid (HCl)	Fluka, Switzerland
Hydrogenperoxide (H_2O_2)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen tetrachloroaurate	Vaxigrip, Sanofi Pasteur SA, France
Influenza vaccine	BDH,UK
Methanol	Priorix, GlaxoSmithKline Biologicals SA, Belgium
Measles, mumps, rubella vaccine	
Lysozyme	Sigma-Aldrich, USA
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, USA
Ovomucoid	Sigma-Aldrich, USA
Ovotransferrin	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin G	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 medium	Sigma-Aldrich, USA
Skim milk	Thermo Scientific,
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merek, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Merek, Germany
Sodium dihydrogen phosphate(NaH_2PO_4)	Carlo Erba, USA
Sodium dodecyl sulfatate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สารเคมี	แหล่งที่มา
Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Merek, Germany
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	Pierce, USA
Tween-20	Riedel-de Haen, UK

3.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OVA โดยวิธี Indirect ELISA

เซลล์ไฮบริโดมาได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. นันทิกา คงเจริญพร (สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (IBGE) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ (ตาราง 3.1) ที่ได้รับมา ถูกนำมาคัดกรองโดยอาศัยเทคนิค indirect ELISA เพื่อหาโคลน (clone) ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ปริมาณสูงสุด หลังจากนั้นนำโคลนนั้นมาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 (ตารางที่ ข.1 ภาคผนวก ข) ขั้นตอนในการดำเนินการของเทคนิค indirect ELISA มีดังนี้ ทำการเคลือบพื้นหลุมของ plate ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย OVA ซึ่งเป็นแอนติเจน (antigen) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 12-18 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้ว นำมาล้างด้วย PBST (phosphate buffer (PBS) ที่มีการเติม Tween-20) ในความเข้มข้น 0.05% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (Skim milk) ที่ละลายอยู่ใน PBST หลุมละ 200 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.1 ลงในหลุมละ 100 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายแอนติบอดีทุติยภูมิ (goat anti-mouse IgG) ที่มีเอ็นไซม์ horse redish peroxidase (HRP) เชื่อมต่ออยู่ในความเข้มข้น 1:10000 หลุมละ 100 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต (Substrate) TMB หลุมละ 100 µL เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) เข้มข้น 1 M หลุมละ 100 µL เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (micro plate reader) ที่ความยาวคลื่น 450 nm

ตาราง 3.3 แสดงรายชื่อของเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดกรองด้วย indirect ELISA

ลำดับ	รายชื่อของเซลล์ไฮบริโดมา
1	OVA 1-1H-10A-8H
2	OVA 2-7G-4B-4B
3	OVA 8-7H-8F-6F
4	OVA 9-1E-8D

3.4 การผลิตโมโนโคลนอล

เซลล์ไฮบริโดมาที่ใช้คือ OVA 8-7H-8F-4H ซึ่งเป็นโคลนในกลุ่มของ OVA 8 ที่ได้ผ่านการคัดกรอง พบว่า สามารถผลิตโมโนโคลนอลได้ในปริมาณปริมาณใกล้เคียงกันกับโคลนอื่นๆ ในกลุ่มของ OVA8 นำมาเพาะเลี้ยงในฟลาสค์ (flasks) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหาร RPMI 1640 ที่มีการเติมกลูโคส 1 g/mL หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงที่ตู้บ่ม ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในตู้บ่มเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในฟลาสค์เทใส่หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วปั่นเหวี่ยง 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงใหม่แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หลังจากนั้นทำการดูดส่วนของเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในปริมาตร 100 µL ใส่ลงในอาหาร RPMI 1640 ที่มีการเติม กลูโคส 1 g/mL จากนั้นนำฟลาสค์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงที่ตู้บ่ม ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.5 การเก็บรักษาเซลล์ไฮบริโดมาในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)

เริ่มโดยการดูดเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ใส่หลอดเก็บและน้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (freezing medium) (ตารางที่ ข.1 ภาคผนวก ข) จากนั้นใช้พลาสติกเจอร์รี่เปต (pasteur pipette) ดูดขึ้นลงเบาๆ จนสารทั้งสองผสมเข้ากันดีและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 °C ซ้ำมคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 °C

3.6 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกจากถังไนโตรเจนเหลวมาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C ทันที เมื่อสารผสมละลายแล้วให้ถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้วทำการแยกออกการเก่าออกจากเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี Fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 20% (v/v) และนำไปปั่นเพาะเลี้ยง

3.7 การทำโมโนโคลนอลให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี

นำโปรตีนจีเซฟาไรส (protein G sepharose) ที่ปริมาตร 5 mL ที่อยู่ในสถานะที่มี PBS pH 7.4 เทลงในคอลัมน์แล้วทำการปรับสภาวะสมดุลด้วยไซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 โดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำมาละลายและนำมากรองผ่านด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman® No.1) ซึ่งมีโมโนโคลนอลที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำอาหารปริมาตร 500 mL ที่ผ่านการกรองลงในคอลัมน์โปรตีนจี ทำการล้างโปรตีนที่ไม่ได้จับกับคอลัมน์ออกด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) pH 8 ที่ความเข้มข้น 100 mM และล้างด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8 ที่ความเข้มข้น 10 mM ซึ่งปริมาตรการล้างเป็นปริมาตร 5 เท่าของขนาดคอลัมน์ที่ใช้ จากนั้นทำการชะโมโนโคลนอลออกจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine-HCl) pH 3 ที่ความเข้มข้น 100 mM พร้อมเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 500 µL ซึ่งในหลอดที่เก็บมีทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 8 ปริมาตร 50 µL ความเข้มข้น 1 M อยู่ภายในหลอดเก็บ แล้วทำการผสมให้เข้ากันเพื่อทำการปรับค่า pH ให้เป็นกลาง หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิล สเปกโทรสโคปี (UV-vis spectrophotometer) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm และทำ indirect ELISA เพื่อนำมาวาดเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ fraction ของสาร จากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองที่มีโมโนโคลนอลมารวมกัน เพื่อนำไปทำไดอะไลซิส จากนั้นทำ SDS-PAGE

3.8 การทำไดอะไลซิส (Dialysis)

เริ่มต้นด้วยการนำหลอดไดอะไลซิสใส่ในสถานะที่มีสารละลายของ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ที่ความเข้มข้น 5 mM และ sodium bicarbonate ที่ความเข้มข้น 200 mM แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เมื่อต้มเสร็จนำมาล้างทั้งภายในและภายนอกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปไปต้มและล้างอีกครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นและทำการปิดฝาด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

(aluminum foil) และนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave) เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากการอบฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว นำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 4 °C ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ในกรณีที่ต้องการใช้หลอดไตอะไมเลสควรรีไบลูมก่อนการสัมผัสกับหลอดไตอะไมเลส จากนั้นทำการวัดและตัดหลอดไตอะไมเลสตามความยาวที่เหมาะสมในการใช้งาน ทำการล้างทั้งภายนอกและภายในด้วยน้ำกลั่น แล้วมัดที่ปลายข้างหนึ่งของหลอดด้วยเส้นด้ายให้แน่น จากนั้นใช้พลาสติกเจอรี่ปิดจุดศรที่ต้องการทำไตอะไมเลสใส่ลงในหลอด และทำการผูกปลายของหลอดอีกข้างด้วยเส้นด้ายให้แน่น นำหลอดไตอะไมเลสที่บรรจุด้วยสารละลายที่ต้องการทำไตอะไมเลสแล้ว มาวางใส่ในภาชนะที่บรรจุด้วย PBS ปริมาณ 1 L โดยที่ก้นของภาชนะมีแท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (magnetic stirring) นำไปไว้ในที่ห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาข้ามคืน พร้อมกับทำการหมุนอย่างช้าๆของแท่งแม่เหล็กกวนสาร เมื่อครบเวลาทำการเปลี่ยนสารละลายของ PBS ใหม่ และทำการหมุนอย่างช้าๆเป็นระยะข้ามคืน หลังจากนั้นทำการดูศรละลายที่อยู่ในหลอดไตอะไมเลสออกมาด้วยพลาสติกเจอรี่ปิดเก็บใส่ภาชนะ

3.9 การทดสอบความบริสุทธิ์และหาปริมาณโมเลกุลของโมโนโคลนอล

3.9.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

ในการทดสอบความบริสุทธิ์และหาปริมาณโมเลกุลของโมโนโคลนอลสามารถทำได้ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยการเตรียมแผ่นเจล (gel) สำหรับการแยก (separating gel) ที่ความเข้มข้น 8% ความกว้างประมาณ 5 cm ยาว 8 cm และหนา 0.75 cm ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยการเติมน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้จนเจลเกิดการแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำการเทน้ำกลั่นส่วนเกินออก จากนั้นทำการเทสารละลายเจลสำหรับการทำช่องเพื่อใส่ตัวอย่าง (stacking gel) ที่ความเข้มข้น 5% และใส่หวี (comb) ที่เป็นแม่พิมพ์หลุมเจล ตั้งทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็งตัว (ตารางที่ ข.4 ภาคผนวก ข)

3.9.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 5 mg ต่อหลุมของเจล ผสมกับสารละลายสีย้อมที่ประกอบด้วย SDS, β -mercaptoethanol และ bromophenol blue (SDS staining dye) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปดูไตในหลุมเจล (ตารางที่ ข.4 ภาคผนวก ข)

3.9.3 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิส

เริ่มจากการนำเจลที่เตรียมไว้มาประกอบเข้ากับเครื่องทำอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis chamber) ที่มี SDS ในไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (running buffer) ทั้งส่วนด้านบนและด้านล่างภายในเครื่อง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างดูดีใส่ในหลุมเจล หลุมละ 15 μL ในส่วนของ marker ให้ดูดีใส่ปริมาตร 2.5 μL หลังจากดูดีสารต่างๆใส่หลุมเจลแล้ว ทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีค่าความต่างศักย์คงที่ที่ 100 V เป็นเวลา 90 นาที จนเมื่อพบแถบสีของสีย้อมเคลื่อนไปถึงขอบปลายของเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า จากนั้นนำเจลที่ได้มาย้อมสีด้วย staining solution เป็นระยะเวลา 30 นาที และล้างในสารละลาย destaining solution จนกว่าจะเห็นแถบแบนของโปรตีนชัดเจน (ตารางที่ ข.4 ภาคผนวก ข)

3.10 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของโมโนโคลนอลหลังทำให้บริสุทธิ์

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลสามารถทำได้ด้วยวิธี indirect competitive ELISA เริ่มจากการดูดีสารละลายโมโนโคลนอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นปริมาตร 90 μL ผสมเข้ากับ สารละลาย OVA ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ถึง 0.0001192 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำการผสมในแต่ละส่วนของสารละลายให้เข้ากัน แล้วจากนั้นดูดีในแต่ละหลุมของเพลท ELISA ปริมาตร 100 μL ที่ผ่านการเคลือบด้วย OVA แล้วการเติมสารละลายนมพร่องมันเนย และ ล้างด้วย PBST และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นขั้นตอนในการทดลองเช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA ดังที่ได้กล่าวมาแล้วใน 3.1

ความไวของโมโนโคลนอลสามารถรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) ซึ่งได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งเกิดจากการแย่งจับระหว่างแอนติเจนที่เคลือบที่ก้นหลุมกับแอนติเจนอิสระที่ทำการผสมลงไปจับกับโมโนโคลนอลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนกราฟโดยแกน Y จะเป็นค่าร้อยละของค่าการดูดกลืนแสงจากผล ELISA ที่มีแอนติเจนหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงจากผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน ($\%B/B_0$) และแกน X เป็นค่าของล็อกการิทึมของความเข้มข้นของแอนติเจนที่ทดสอบและสามารถคำนวณค่า LOD ได้จากสูตรเพื่อนำมาเทียบกับกราฟได้เป็นความเข้มข้น

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

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.11 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของโมโนโคลนอล

โดยขั้นแรกเริ่มจากการเคลือบหลุมเพลทของ ELISA ด้วยแอนติเจน โดยแอนติเจนที่ใช้มีดังต่อไปนี้ ovomucoid, ovotransferrin, lysozyme และ Ovalbumin ซึ่งละลายใน PBS pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 50,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ถึง 0.00005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลุมละ 100 μL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นขั้นต่อนในการทดลองเช่นเดียวกับวิธี indirect ELISA ดังที่ได้กล่าวมาแล้วใน 3.1

3.12 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำ

อนุภาคทองคำที่ได้สามารถสังเคราะห์ได้จากสารละลาย chloroauric acid ซึ่งเตรียมได้จาก 1 g ของ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ละลายในน้ำกลั่นที่มีปริมาตร 100 mL ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย chloroauric acid ที่มีความเข้มข้น 0.01% (w/v) ดูดสารละลาย chloroauric acid ที่มีความเข้มข้น 0.01% ปริมาณ 100 μL ใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำกลั่น 10 mL จากนั้นใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 $^{\circ}\text{C}$ บนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน ในขณะที่ต้มเปิดการหมุนของแท่งแม่เหล็กอย่างรวดเร็ว แล้วทำการเติมสารละลายไซเตียมซิติเรท ในปริมาณ 1.5 mL ลงไปในภาชนะที่ทำการต้มอยู่ ทำการต้มเป็นเวลา 15 นาที ในระหว่างการต้มจะเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจนสุดท้ายได้สารละลายสีแดงดำ แล้วนำสารละลายดังกล่าวมากรองที่อุณหภูมิห้องอีก 15 นาที อนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ สารละลายอนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้นำไปดูคุณลักษณะด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ทำการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm รวมทั้งนำไปศึกษาขนาดรูปร่างด้วยเครื่อง Transmission electron microscopy (TEM)

3.13 การเตรียมอนุภาคทองคำสำหรับการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล

การเชื่อมต่อของอนุภาคทองคำกับโมโนโคลนอลนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ pH ของสารละลายอนุภาคทองคำ และ ความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอล

3.13.1 ปัจจัยของ pH ในสารละลายอนุภาคทองคำ

นำสารละลายอนุภาคทองคำมาปรับ pH ให้มีค่า ตั้งแต่ 4 ถึง 11 โดยใช้ HCl ที่ความเข้มข้น 1 M และ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M จากนั้นทำการเติมสารละลายโมโนโคลนอลที่มีความเข้มข้น 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงในสารละลายอนุภาคทองคำ 100 μL ซึ่งที่มีค่า pH ที่แตกต่างกัน ทำการผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากผ่านไป 15 นาทีแล้ว ทำ

การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 10% ในปริมาตร 20 μL แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที ผลที่จะได้จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm

3.13.2 ปัจจัยของ pH ในสารละลายอนุภาคทองคำ

นำสารละลายอนุภาคทองคำมาปรับ pH ให้มีค่า 7 โดยใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M จากนั้นทำการเติมสารละลายโมโนโคลนอลที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงในสารละลายอนุภาคทองคำ 100 μL ทำการผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจากนั้นขั้นตอนในการทดลองเช่นเดียวกับวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วใน 3.10.1

3.14 การเชื่อมต่อของอนุภาคทองคำกับโมโนโคลนอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

สารละลายอนุภาคทองคำปริมาตร 1 mL อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการปรับ pH ให้เหมาะสมในการเชื่อมต่อ ซึ่ง pH ที่เหมาะสมในการเชื่อมต่ออยู่ที่ pH 7 จากนั้นนำสารละลายโมโนโคลนอลที่ละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 300 μL แล้วทำการผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมงแล้วทำการเติมสารละลาย BSA (bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 3% (w/v) ใน PBS pH 7.4 หลังจากนั้นทำการผสมเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 4 °C ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ออกและทำการละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 3% ใน PBS pH 7 เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จ จึงนำสารละลายส่วนใสออกและละลายตะกอนด้วย PBS pH 7.4 แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิล สเปกโทรสโคปี ที่ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm และการทำ indirect ELISA จากนั้นทำการเก็บสารละลายมาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.15 การศึกษาความเสถียรของอนุภาคทองคำ

อนุภาคทองคำที่ไม่ได้ทำการเชื่อมต่อโมโนโคลนอลและอนุภาคทองคำที่ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล จะถูกนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 7 วัน โดยจะทำการวันตั้งแต่วันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 และ วันที่ 56

3.16 การเตรียมกระดาษสำหรับการตรวจวัดบนกระดาษ

3.16.1 ขั้นตอนการเตรียมกระดาษ

ในการทดลองนี้ได้ใช้วัสดุกระดาษคือ กระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman no.1 filter paper) โดยจะทำการตัดกระดาษกว้างขนาด 21 cm และ ยาวขนาด 29.7 cm ซึ่งขนาดของกระดาษนี้ มีความเหมาะสมกับภาดใส่กระดาษของเครื่องพิมพ์สำหรับการพิมพ์

3.16.2 ขั้นตอนการออกแบบวงรอบหลุมที่ใช้สำหรับการทดสอบ

ในการออกแบบและขั้นตอนการวาดจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop สำหรับการออกแบบและวาดเส้นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางคือ 0.5 cm ใช้สำหรับป้องกันสารแพร่ออกนอกบริเวณการทดสอบ

3.16.3 การพิมพ์ลายลงบนกระดาษ

ในการทดลองครั้งนี้ เครื่องพิมพ์ที่ใช้ในการพิมพ์ลายคือ Xerox Color Qube 8570 เนื่องจากเครื่องพิมพ์รุ่นนี้สามารถพิมพ์ออกมาในลักษณะเป็นแว็กซ์ (wax) โดยที่หัวพิมพ์ของเครื่องจะมีความร้อน จึงทำให้แว็กซ์ละลายเป็นของเหลวแล้วพิมพ์ลงบนผิวหน้าของกระดาษ เมื่อตั้งกระดาษไว้ทิ้งที่อุณหภูมิห้องหมึกที่พิมพ์ลงบนกระดาษจะแข็งตัว จากนั้นนำกระดาษที่ผ่านการพิมพ์แล้ว มาวางบนเตาให้ความร้อน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้คือ 140 °C เป็นเวลา 40 วินาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำกระดาษมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายก็จะได้กระดาษพร้อมใช้ในการทดสอบ ซึ่งกระดาษที่ผ่านการพิมพ์ลายและให้ความร้อนแล้ว ยังคงมีคุณสมบัติเป็นกระดาษ ซึ่งสามารถทดสอบได้ในบริเวณนี้ และ มีการป้องกันการแพร่กระจายของสารออกนอกบริเวณทดสอบด้วยแว็กซ์ที่ได้ทำการพิมพ์ลงบนกระดาษ

3.17 การทำดอตอิมมูโนโกลด์ฟิลเทรชันแอสเสย์ (Dot-immunogold filtration assay, DIGFA)

การทำดอตอิมมูโนโกลด์ฟิลเทรชันแอสเสย์ หรือ DIGFA มีส่วนประกอบ 3 ส่วนดังต่อไปนี้ อนุภาคทองคำที่ผ่านการเชื่อมต่อด้วยโมโนโคลนอลแล้ว กระดาษกรองเบอร์ 1 และวัสดุสำหรับการดูดซับสารส่วนเกิน (absorbent pad)

3.17.1 การตรึงแอนติเจนลงบนกระดาษ

หยด OVA ซึ่งละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ลงบนกระดาษในบริเวณทำการทดสอบ ซึ่งความเข้มข้นของแอนติเจนที่ใช้อยู่ในระหว่าง 0.05 ng/mL ถึง 1 mg/mL หลังจากนั้นทำให้แห้งหมาด แล้วเติมสารละลายป้องกัน (blocking solution) โดยประกอบด้วย PBS pH 7.4 BSA ความเข้มข้น 3% และ Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% แล้ววางทิ้งไว้จนหมาด จากนั้นหยด

สารละลายทองคำที่ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลปริมาตร 3 μL และทิ้งกระดาษให้แห้งหมด จากนั้นทำการหยุด PBST เพื่อล้างส่วนที่ไม่สามารถจับกันระหว่าง OVA และอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล และทิ้งกระดาษไว้ให้แห้ง นำกระดาษที่แห้งเรียบร้อยแล้ว สแกนภาพด้วยเครื่องสแกน หลังจากนั้นนำรูปที่ได้ไปวัดค่า mean intensity ของกระดาษในแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop

3.17.2 การศึกษาภาวะ Blocking และไม่ Blocking

ทำการกระดาษให้ชุ่มด้วย PBS pH 7.4 หลังจากนั้นหยุด OVA ซึ่งละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ลงบนกระดาษในบริเวณทำการทดลอง ซึ่งความเข้มข้นของ OVA ที่ใช้คือ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ หลังจากนั้นทำวางให้แห้งหมด จากนั้นแบ่งการทดลองเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกจะทำการเติม blocking solution โดยประกอบด้วย PBS pH 7.4 Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ BSA โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 1% 3% 5% และ 10% อีกกลุ่มหนึ่งไม่หยุดสารละลาย blocking solution จากนั้นนำทั้งสองกลุ่มมาวางทิ้งไว้จนแห้งหมด และหยุดสารละลายทองคำที่ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลปริมาตร 3 μL และทิ้งกระดาษให้แห้งหมด จากนั้นทำการหยุด PBST เพื่อล้างส่วนที่ไม่สามารถจับกันระหว่าง OVA และอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล และทิ้งกระดาษไว้ให้แห้ง นำกระดาษที่แห้งเรียบร้อยแล้ว มาสแกนภาพด้วยเครื่องสแกน หลังจากนั้นนำรูปที่ได้ไปวัดค่า mean intensity ของกระดาษในแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop

3.17.3 การศึกษาปัจจัยของการชะล้างและไม่ชะล้างของสารบนกระดาษ

หยุด OVA ซึ่งละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ลงบนกระดาษในบริเวณทำการทดสอบ ซึ่งความเข้มข้นของ OVA ที่ใช้คือ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ หลังจากนั้นทำวางให้แห้งหมด แล้วทำการเติมสารละลายป้องกัน โดยประกอบด้วย PBS pH 7.4 Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ BSA โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 3% วางทิ้งไว้จนแห้งหมด และหยุดสารละลายทองคำที่ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลปริมาตร 3 μL และทิ้งกระดาษให้แห้งหมด จากนั้นการทดลองจะแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกจะทำการหยุด PBST เพื่อล้างส่วนที่ไม่สามารถจับกันระหว่าง OVA และอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอล และทิ้งกระดาษไว้ให้แห้งและอีกส่วนจะไม่ทำการหยุด PBST จากนั้นนำมาสแกนภาพด้วยเครื่องสแกน แล้วนำรูปที่ได้ไปวัดค่า mean intensity ของกระดาษในแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop

3.18 การตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนในวัคซีน

หยดสารละลาย OVA ที่ละลายอยู่ใน PBS pH 7.4 ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ng/mL ถึง 1 mg/mL เติมลงในแต่ละวัคซีน โดยวัคซีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม (measles, mumps, rubella vaccine) วัคซีนอีกกลุ่มที่ใช้คือ วัคซีนไขหวัดใหญ่ ทำการหยดลงบนกระดาษในบริเวณทำการทดลอง หลังจากนั้นนำมาวางให้แห้งหมาด แล้วทำการเติมสารละลายป้องกัน โดยประกอบด้วย PBS pH 7.4 Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ BSA โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 3% วางทิ้งไว้จนแห้งหมาด และหยดสารละลายทองคำที่ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลปริมาณ 3 μ L และทิ้งกระดาษให้แห้งหมาด จากนั้นหยด PBST และทิ้งกระดาษไว้ให้แห้ง แล้วนำกระดาษมาสแกนภาพด้วยเครื่องสแกนและนำรูปที่ได้ไปวัดค่า mean intensity ของกระดาษในแต่ละความเข้มข้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop

บทที่ 4

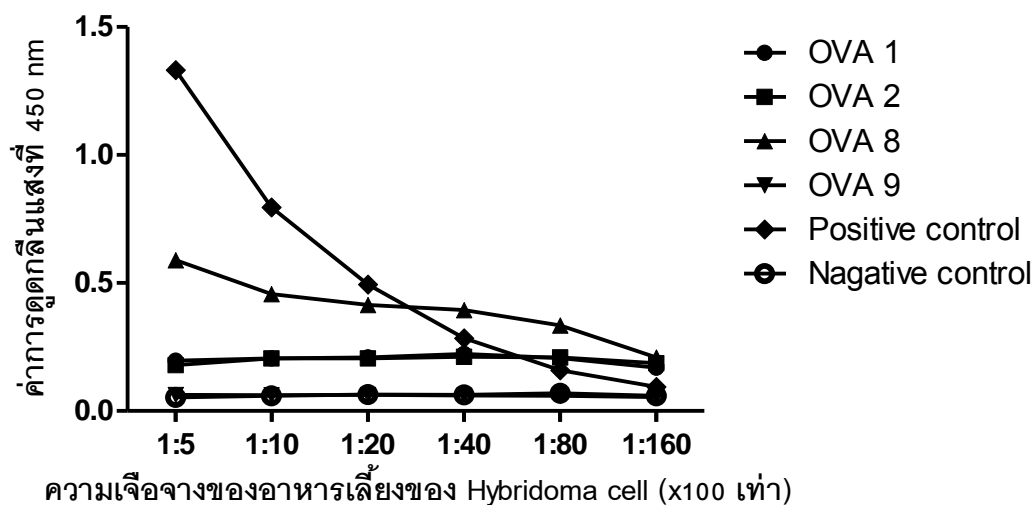
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง

4.1 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ OVA โดยวิธี Indirect ELISA

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มาจากโคลนทั้ง 4 โคลน (ตารางที่ 4.1) มาคัดกรองโดยอาศัยเทคนิค indirect ELISA เพื่อหาโคลนที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณสูงสุด จากผลการคัดกรองพบว่า เซลล์ไฮบริโดมาโคลน OVA8 มีการผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่มากกว่าโคลนอื่นๆ (รูปที่ 4.1) จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาของชั้นโคลนในกลุ่ม OVA8 จำนวน 6 โคลน (ตารางที่ 4.2) มาคัดกรองโดยอาศัยเทคนิค indirect ELISA จากผลการคัดกรองพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาชั้นโคลนในกลุ่มของ OVA8 มีการผลิตแอนติบอดีในปริมาณที่ใกล้เคียงกันทั้งหมด 6 โคลน (รูปที่ 4.2)

ตาราง 4.1 แสดงรายชื่อโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดกรองด้วยวิธี indirect ELISA

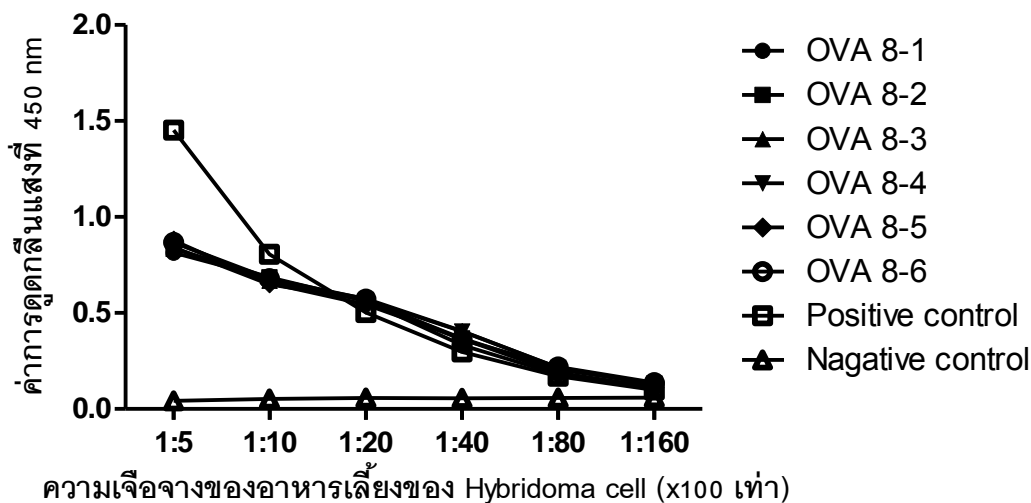
ลำดับ	รายชื่อของเซลล์ไฮบริโดมา
1	OVA 1-1H-10A-8H
2	OVA 2-7G-4B-4B
3	OVA 8-7H-8F-6F
4	OVA 9-1E-8D



รูปที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ของระดับแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดมาของโคลน OVA1 OVA2 OVA8 และ OVA9 ที่นำมาคัดกรองด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตาราง 4.2 แสดงรายชื่อโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาซึ่งโคลนในกลุ่ม OVA 8 ที่นำมาคัดกรองด้วยวิธี indirect ELISA จำนวน 6 โคลน

ลำดับ	รายชื่อของเซลล์ไฮบริโดมา
1	OVA 8 - 7H - 8F - 6F
2	OVA 8 - 7H - 8F - 2G
3	OVA 8 - 7H - 8F - 4H
4	OVA 8 - 7H - 9F - 8H
5	OVA 8 - 7H - 9F - 10F
6	OVA 8 - 7H - 9F - 11F



รูปที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ของการคัดกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ไฮบริโดมาซ้ำโคลนในกลุ่มของ OVA8 จำนวน 6 โคลนด้วยเทคนิค indirect ELISA

จึงนำเซลล์ไฮบริโดมาของ OVA 8-7H-8F-4H มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาปริมาตร 500 mL มาทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography ด้วยโปรตีนจีเซฟาโรส เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จะได้จากโคลน OVA 8-7H-8F-4H มีไอโซไทป์เป็น IgG₁ ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีนจี ทำให้เกิดปฏิกิริยาจับกันระหว่างแอนติบอดีและโปรตีนจีอย่างจำเพาะที่ อยู่ในคอลัมน์ จากนั้นชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โดยใช้ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 3) และทำการเก็บแฟรคชัน (fraction) จากนั้นนำแต่ละแฟรคชันที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และนำแต่ละแฟรคชันมาตรวจสอบการมีแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยทำการเจือจางของแต่ละแฟรคชันเท่ากับ 1:100 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm (ตารางที่ ก.1 ภาคผนวก ก) ได้ดังรูปที่ 4.3 ผลที่ได้พบว่า แฟรคชันที่ 8-15 มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 และ 450 nm สูงสอดคล้องกัน แสดงว่าเป็นช่วงที่แอนติบอดีถูกชะออกมาจากคอลัมน์ แต่จะมีช่วงของค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ แฟรคชันที่ 9-13 จึงนำแฟรคชันเหล่านั้นมาผสมรวมกันและนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ [Johnstone, A. และ Thorpe, R., 1987] ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของ Immunoglobulin} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm} / 1.35$$

เมื่อ 1.35 เป็นค่าสัมประสิทธิ์คงที่ (extinction coefficients) ของ Immunoglobulin

ดังนั้น จากสมการจึงได้ว่า

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของ Immunoglobulin} &= 2.9038 / 1.35 \\ &= 2.150 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

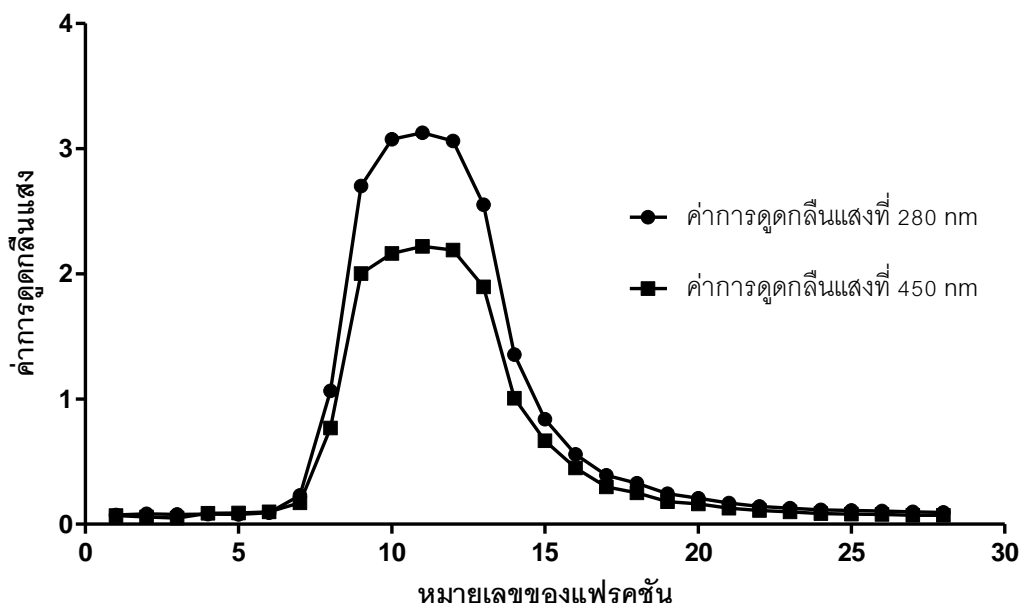
เมื่อ 2.9038 เป็นค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ของแฟรคชัน 9-13 จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของ Immunoglobulin มาใช้ในการคำนวณหาความบริสุทธิ์ได้จากสมการ

$$\begin{aligned} \text{ความบริสุทธิ์ของ Immunoglobulin} &= (100 \times \text{ปริมาณของ Immunoglobulin}) / \text{ค่าการ} \\ &\quad \text{ดูดกลืนแสงที่ 280 nm} \end{aligned}$$

ดังนั้น จากสมการจึงได้ว่า

$$\begin{aligned} \text{ความบริสุทธิ์ของ Immunoglobulin} &= (100 \times 2.150) / 2.9038 \\ &= 74.040 \% \end{aligned}$$

จากนั้นนำสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปทำไดอะไลซิสเพื่อขจัดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะแอนติบอดีออกและทำให้แอนติบอดีละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4

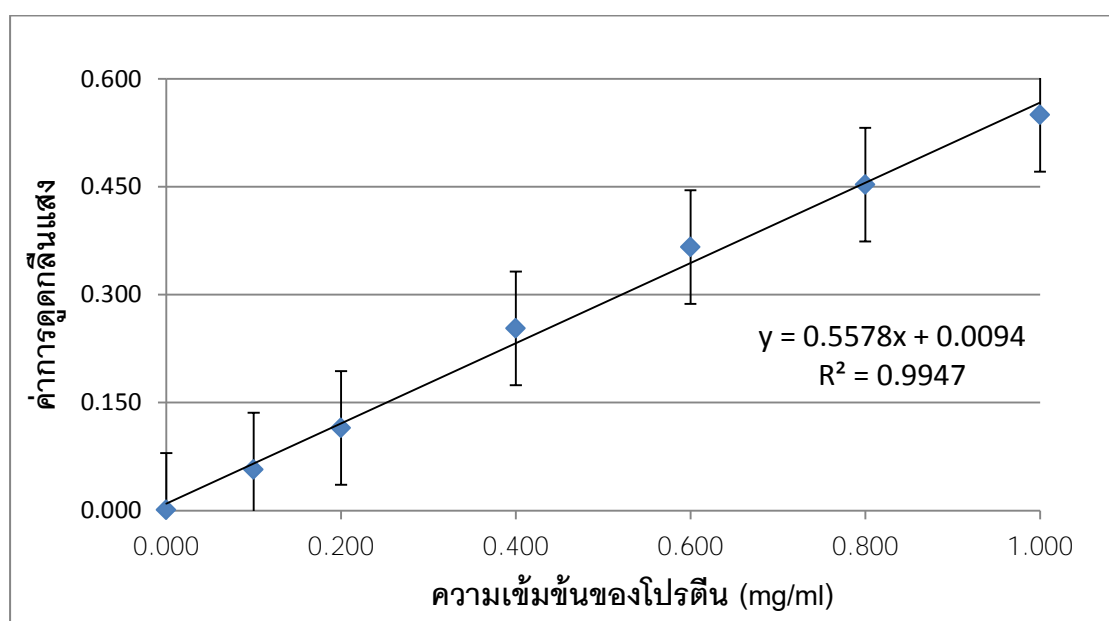


รูปที่ 4.3 กราฟจากการทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน OVA 8-7H-8F-4H บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจีเซฟาโรส จากนั้นชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วยไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 3) โดยอัตราการไหลของการชะที่ 1 mL/min เก็บตัวอย่างทั้งหมด 28

แฟรคชัน แฟรคชันละ 500 μL จากนั้นนำแต่ละแฟรคชันมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และนำไปวัดหาปริมาณแอนติบอดีด้วย ELISA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm

4.2 การหาปริมาณโปรตีนจากสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค BCA assay

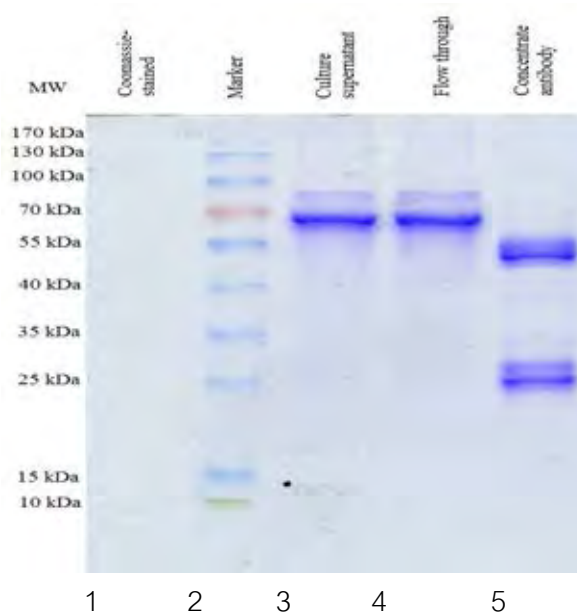
นำสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์และแฟรคชันที่มีปริมาณแอนติบอดีสูงที่ผสมรวมกันเรียบร้อยแล้ว มาหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี BCA assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm นำค่าที่ได้เทียบกับค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (รูปที่ 4.4) ซึ่งได้สมการเส้นตรงของค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลาย BSA คือ $y = 0.5578x + 0.0094$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9947 เมื่อนำปริมาณของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์มาเปรียบเทียบกับสมการพบว่า ในแฟรคชันที่นำมารวมกันมีความเข้มข้นของโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 5,695.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ตารางที่ ก.2 ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.4 กราฟมาตรฐานของ BSA ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4.3 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์

หามวลโมเลกุลของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยเทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 4.5) โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่โปรตีนที่ได้ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์เคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่โปรตีนมาตรฐาน (marker protein) ที่รู้มวลโมเลกุลเคลื่อนที่ ทำให้รู้ถึงมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยของสายพอลิเพปไทด์ของแอนติบอดี (รูปที่ 4.4) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ข้างต้นมาวิเคราะห์ มีปรากฏแถบของโปรตีนที่ได้ลดลงเหลือเพียงสองแถบซึ่งคาดว่าประกอบด้วย แถบของโปรตีนสายยาวของแอนติบอดี (heavy chain) ที่ขนาดมวลโมเลกุล 55 kDa และแถบของโปรตีนสายสั้น (light chain) ที่มีขนาดมวลโมเลกุล 25 kDa แสดงว่าแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับแอนติบอดี รวมทั้งพบการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นในแอนติบอดีที่ได้ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์น้อยมาก



รูปที่ 4.5 ผลของการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์

ด้วยโปรตีนจีเซฟาไรสโดยนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยที่

เลนที่ 1 คือ ไม่มีตัวอย่าง

เลนที่ 2 คือ โปรตีนมาตรฐาน (marker protein)

เลนที่ 3 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนที่จะผ่านคอลัมน์เพื่อทำให้บริสุทธิ์

เลนที่ 4 คือ สารที่ได้จากขั้นตอนการล้างคอลัมน์ก่อนการชะแอนติบอดี

เลนที่ 5 คือ สารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์

4.4 การศึกษาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากที่ทำให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี indirect ELISA ได้ผลดังตารางที่ 4.3 จากผลที่ได้ทำการเลือกความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่มีค่าใกล้เคียง 1 ทำให้ได้อัตราการเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ 1:400 และ OVA คือ 3.906 µg/mL

ตารางที่ 4.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติเจนของ OVA ที่ใช้ในการเคลือบกันหลุมของเพลท ELISA ด้วยวิธี indirect ELISA

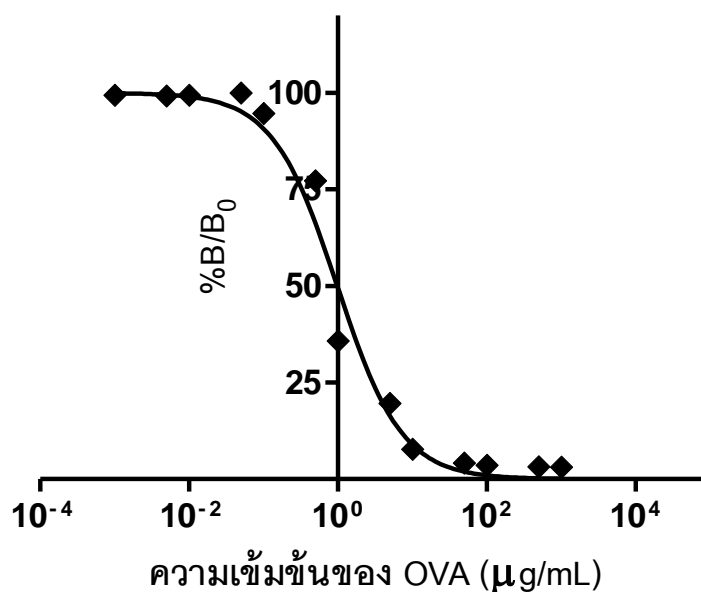
แอนติบอดี	OVA (µg/mL)							
	125	62.5	31.25	15.625	7.812	3.906	1.953	0.976
1:100	3.349	3.349	3.349	3.349	2.687	1.965	1.374	0.800
1:500	3.349	3.349	3.349	3.349	2.360	1.698	1.201	0.771
1:1000	3.349	3.349	3.349	2.985	1.938	1.491	1.036	0.615
1:2000	3.349	3.240	2.843	2.353	1.608	1.161	0.929	0.608
1:4000	3.349	3.134	2.599	2.024	1.476	1.101	0.722	0.428
1:8000	3.349	2.843	2.174	1.653	1.166	0.760	0.580	0.339
1:16000	3.123	2.494	1.832	1.221	0.812	0.515	0.341	0.240
1:32000	2.746	1.963	1.398	0.964	0.576	0.293	0.209	0.151
1:64000	1.964	1.278	0.821	0.654	0.354	0.233	0.166	0.107
1:128000	1.370	0.932	0.585	0.295	0.229	0.190	0.127	0.113
1:256000	0.900	0.553	0.384	0.253	0.146	0.144	0.108	0.112
1:512000	0.455	0.298	0.228	0.198	0.144	0.137	0.098	0.103

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการตรวจสอบความไวในการตรวจหา OVA ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA ได้ผลดังรูปที่ 4.6 (ตารางที่ ก.3 ภาคผนวก ก) พบว่ามีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.9577 µg/mL และมีค่า LOD เท่ากับ 0.079 µg/mL ซึ่งคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$LOD = B_0 - 3SD$$

เมื่อ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนแข่งขัน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

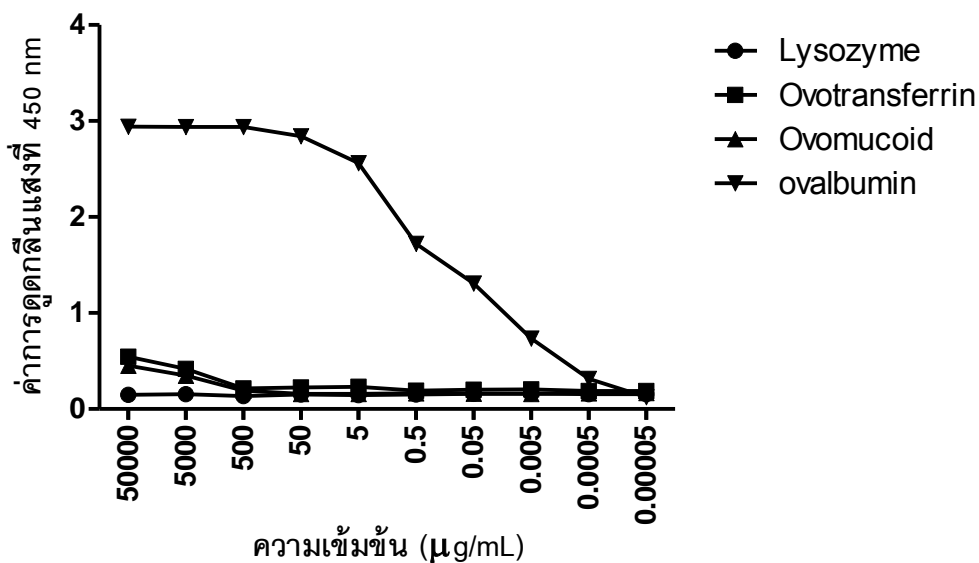


รูปที่ 4.6 ผลความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี

indirect competitive ELISA โดยใช้ OVA ที่ความเข้มข้น 3.90625 µg/mL เคลือบที่ก้น หลุมของเพลท ELISA และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1:4000 แข่งจับกับ OVA อิสระที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10⁻³ - 10⁴ µg/mL

4.5 การศึกษาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากที่ทำให้บริสุทธิ์

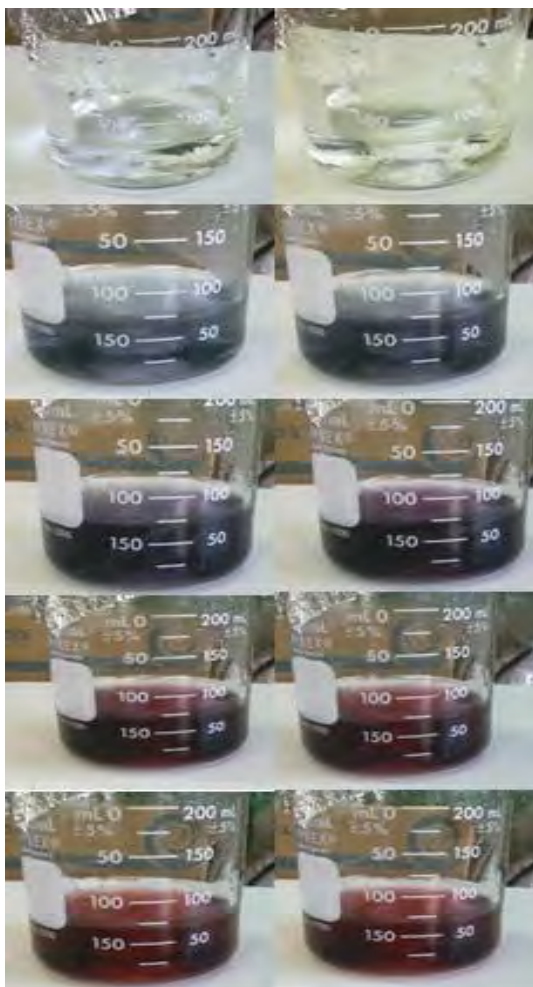
การศึกษาคความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ต่อ แอนติเจนชนิดอื่นที่สามารถพบได้ในไข่ขาว ซึ่งประกอบด้วย lysozyme ovotransferrin ovomucoid และ ovalbumin โดยทำการเคลือบหลุมก้นหลุมของเพลท ELISA ด้วยแอนติเจนชนิดต่างๆ จากนั้นทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค indirect ELISA จากผลการทดสอบพบว่า แอนติบอดีที่ได้ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อ lysozyme ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์สามารถทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนที่เคลือบที่ก้นหลุมของเพลท ELISA ได้ 2 ชนิด คือ ovotransferrin และ ovomucoid ที่ความเข้มข้นมากกว่า 500 µg/mL แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนที่เกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ที่ทำปฏิกิริยากับ OVA ที่ความเข้มข้นมากกว่า 500 µg/mL (รูปที่ 4.7) จึงสามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์มีความจำเพาะกับ OVA สูง



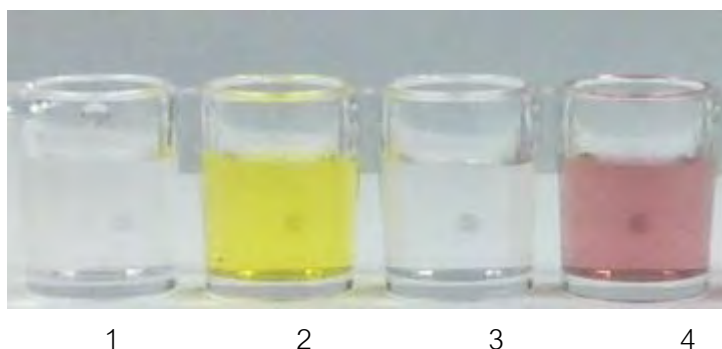
รูปที่ 4.7 ผลความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ lysozyme, ovotransferrin, ovomucoid, และ ovalbumin ที่ความเข้มข้น 50,000 µg/mL ถึง 0.00005 µg/mL และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1:4000

4.6 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตร

อนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีจากสาร chloroauric acid หรือ hydrogen tetrachloroaurate (III) (HAuCl_4) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารที่เป็นรีดิวซิ่ง เอเจนต์ ได้แก่ sodium citrate ในระหว่างการทำปฏิกิริยาของสารละลาย chloroauric acid ที่ผสมกับ sodium citrate แล้วให้ความร้อน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายผสม (รูปที่ 4.8) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะเกิดอนุภาคทองคำขนาดนาโนเมตรที่อยู่ในสารละลายสีแดงดำ (รูปที่ 4.9)

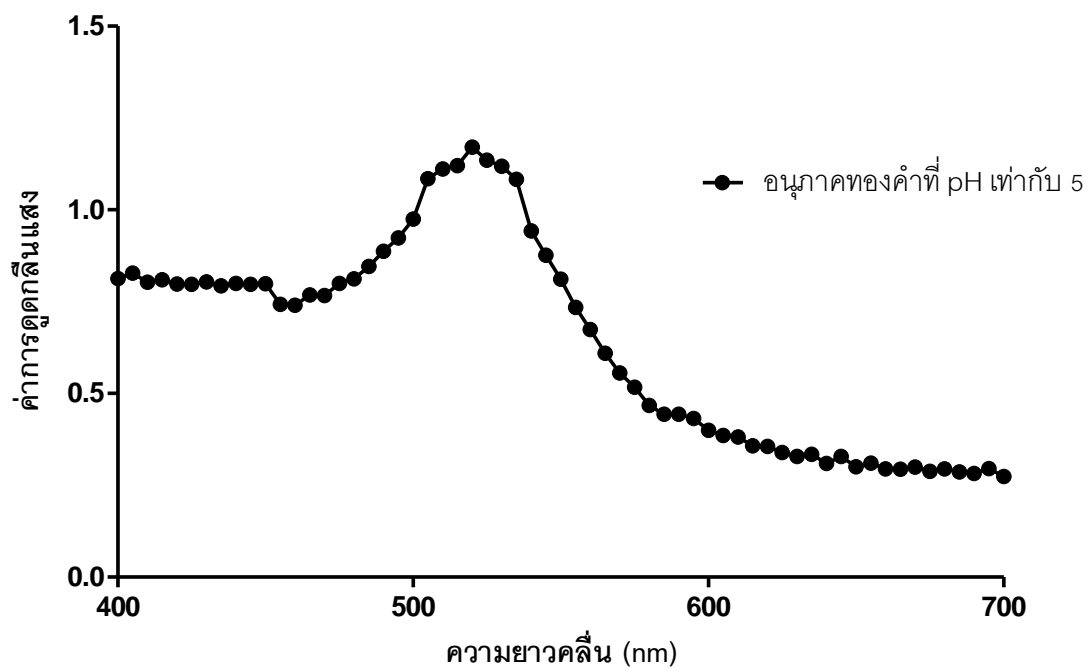


รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงสีของสารในระหว่างการทำปฏิกิริยาของสารละลาย chloroauric acid ที่ผสมกับ sodium citrate

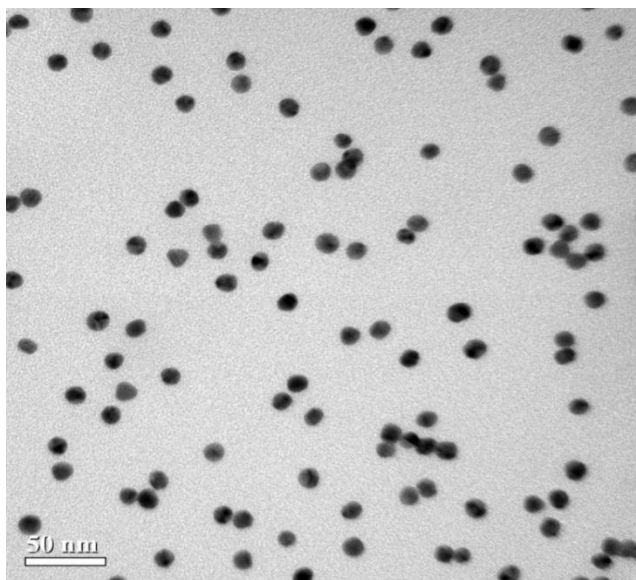


รูปที่ 4.9 สีของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำ โดยหมายเลข 1 คือ น้ำกลั่น ที่ใช้ในการสังเคราะห์ หมายเลข 2 คือ สาร chloroauric acid ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์และหมายเลข 3 คือ sodium citrate ที่ใช้เป็นรีดิวซ์เอเจนต์ และหมายเลขที่ 4 คือ สารละลายอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการสังเคราะห์

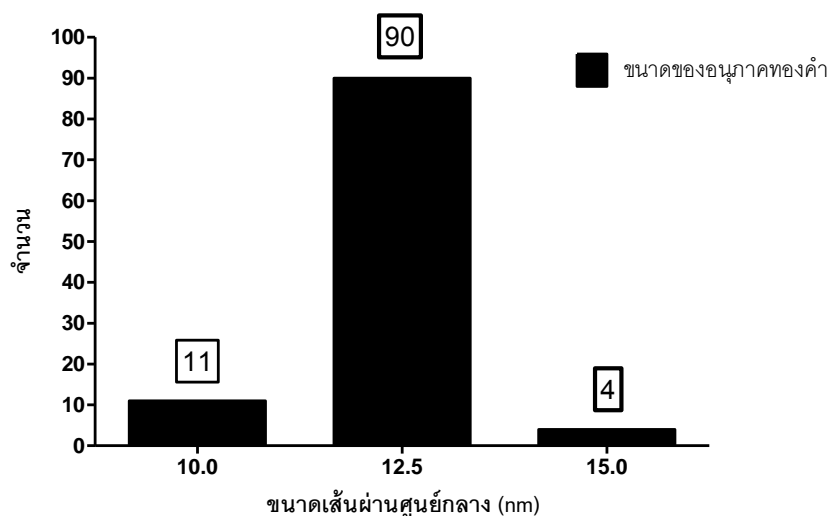
สารละลายอนุภาคทองคำที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 5 จากนั้นนำสารละลายอนุภาคทองคำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm จากรูปที่ 4.10 พบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm แล้วนำสารละลายอนุภาคทองคำไปศึกษาขนาดรูปร่างด้วยเครื่อง TEM พบว่าอนุภาคคำมีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเท่ากับ 12.5 nm (รูปที่ 4.11) โดยจากภาพพบอนุภาคทองคำขนาด 12.5 nm เป็นจำนวน 90 อนุภาค จาก 105 อนุภาค ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 86 ของอนุภาคทั้งหมดที่สังเคราะห์ได้ (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคของค่าที่ pH เท่ากับ 5



รูปที่ 4.11 รูปร่างและขนาดของอนุภาคของค่าที่ได้จากภาพถ่ายด้วยเทคนิค TEM



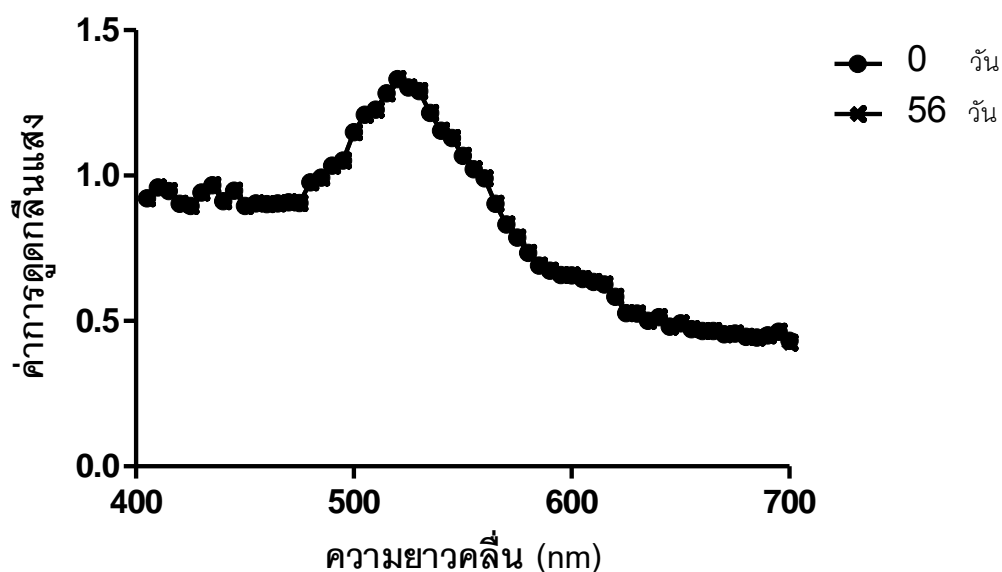
รูปที่ 4.12 จำนวนของอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการศึกษาด้วยเทคนิค TEM

จากการเก็บรักษาสารละลายอนุภาคทองคำที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 56 วัน พบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายอนุภาคทองคำและตะกอนของอนุภาคทองคำ (รูปที่ 4.13) นอกจากนี้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ทุก 7 วันเป็นระยะเวลา 56 วัน จากรูปที่ 4.14 พบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคทองคำและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเมื่อผ่านไป 56 วัน โดยพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 520 nm



1 2

รูปที่ 4.13 สารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 56 วัน หมายเลข 1 คือ สารละลายอนุภาคทองคำที่ได้หลังจากการสังเคราะห์ และหมายเลข 2 คือสารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน

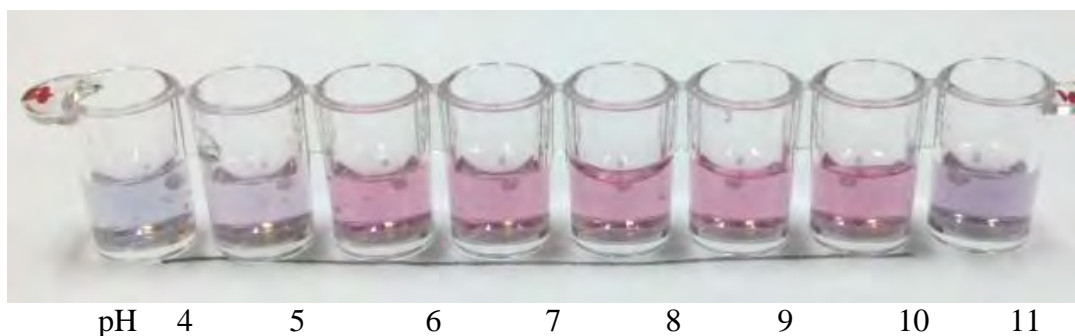


รูปที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 nm ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 56 วัน โดยทำการวัดทุก 7 วัน

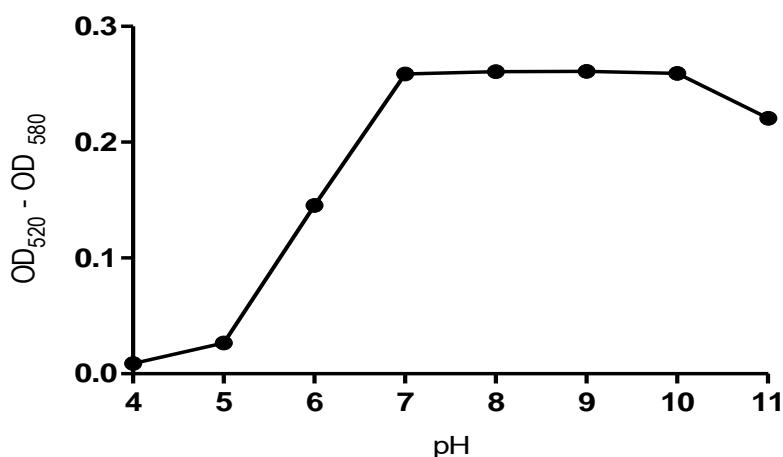
4.7 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่ออนุภาคทองคำกับแอนติบอดี

4.7.1 ปัจจัยของ pH ต่อการเชื่อมต่อของอนุภาคทองคำกับแอนติบอดี

สารละลายอนุภาคทองคำถูกนำมาปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 4 ถึง 11 หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงไปในสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH ต่างๆ แล้วทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า สารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 6 ถึง 10 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทองคำ ดังรูปที่ 4.15 จากนั้นนำไปวัดผลต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ($OD_{520} - OD_{580}$) พบว่า ที่สารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 7 ถึง 10 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 4.16 (ตารางที่ ก.7 ภาคผนวก ก) ดังนั้นจึงเลือกสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 7 เพื่อนำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีเนื่องจากที่ pH เท่ากับ 7 เหมาะสมกับแอนติบอดีและไม่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางโปรตีน



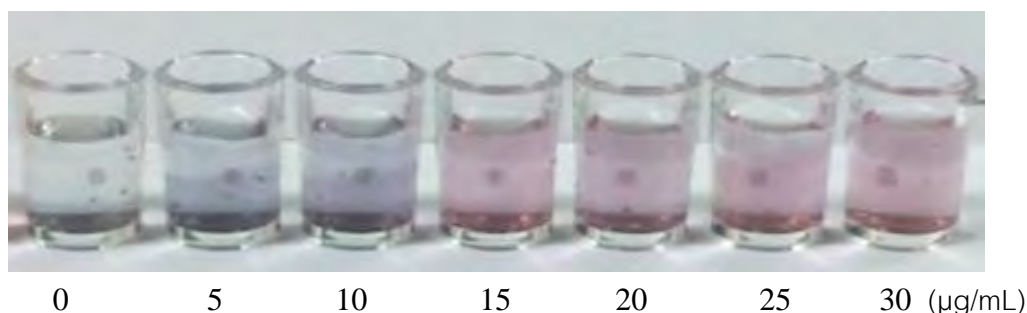
รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 4 ถึง 11 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$



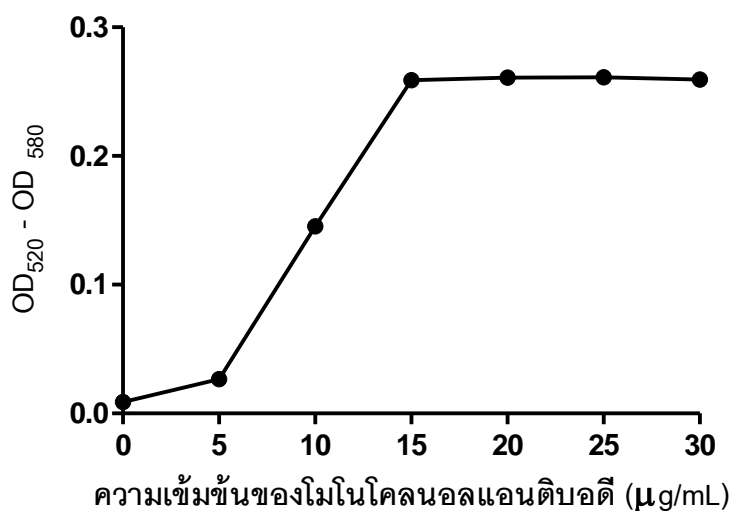
รูปที่ 4.16 กราฟผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 4 ถึง 11 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4.7.2 ปัจจัยของปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ สารละลายอนุภาคทองคำถูกนำมาปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7 หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0 - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลงไปในแต่ละสารละลายอนุภาคทองคำตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่าเท่ากับ 15 - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทองคำ (รูปที่ 4.17) จากนั้นนำไปวัดผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ($\text{OD}_{520} - \text{OD}_{580}$) จากรูปที่ 4.18 พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่าเท่ากับ 15 ถึง 30

$\mu\text{g/mL}$ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ ก.8 ภาคผนวก ก) เนื่องจากในระหว่างการรวมตัวของ Au(0) จนได้เป็นอนุภาคทองคำ ต้องอาศัยแรง electrostatic repulsion หรือ hydrophobic interaction และแรง London-van der Waals attraction ถ้ามีการเติม electrolytes อาทิเช่น chloride bromide และ iodide ลงในสารละลายอนุภาคทองคำ ทำให้แรงของ electrostatic repulsion ลดลง ก่อให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคทองคำแล้วตกตะกอนลงมา โดยเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยเปลี่ยนจากเดิมที่ 520 nm ที่เป็นสีแดงไปเป็น 580 nm ที่เป็นสีฟ้า เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Bathochromic shift หรือ red shift ซึ่งสามารถป้องกันการตกตะกอนของอนุภาคทองคำที่มีผลจาก electrolytes ได้โดยการเชื่อมต่ออนุภาคทองคำกับโมเลกุลของโปรตีน อาทิเช่น แอนติบอดี หรือ ดีเอ็นเอ เป็นต้น โดยปริมาณของโมเลกุลโปรตีนต้องเพียงพอกับปริมาณของอนุภาคทองคำ [Ye, Y., *et al.*, 2010, Kumar, R., *et al.*, 2010, Link, S. and El-Sayed, M.A. 1999] ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 15 $\mu\text{g/mL}$ ในการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ



รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH เท่ากับ 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30 $\mu\text{g/mL}$

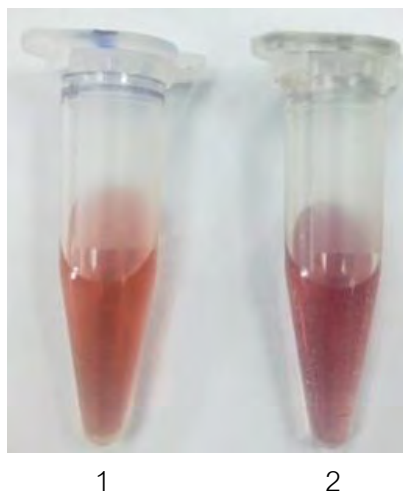


รูปที่ 4.18 กราฟผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30 $\mu\text{g/mL}$

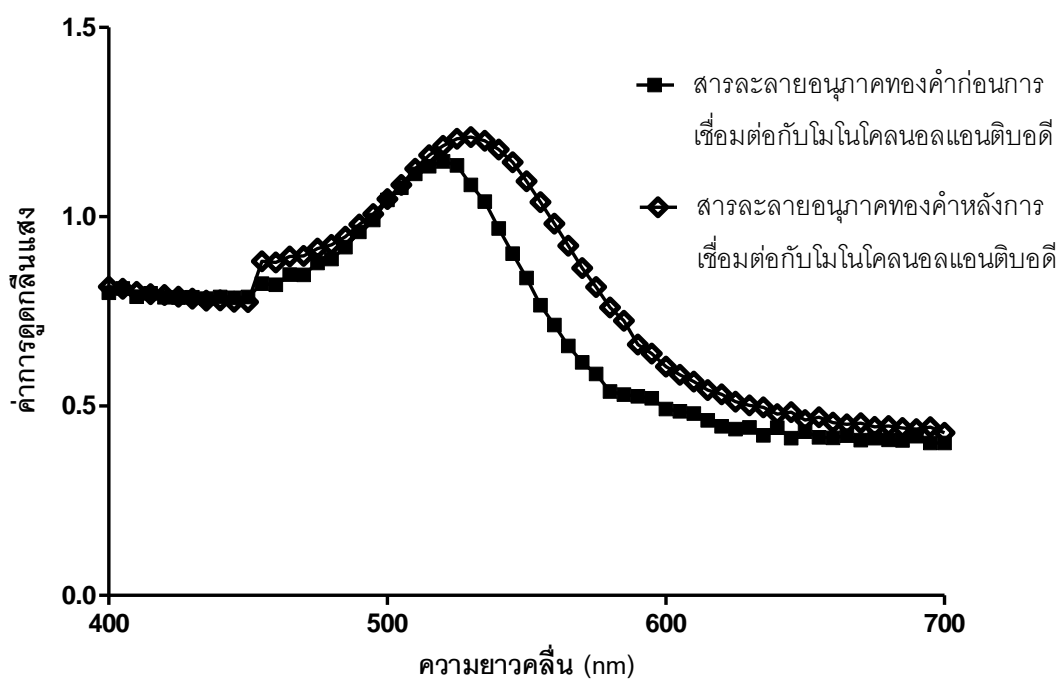
4.8 การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.8.1 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm

อนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งได้จากการเชื่อมต่อในภาวะที่เหมาะสมคือ สารละลายอนุภาคทองคำปริมาณ 1 mL ที่ pH เท่ากับ 7 และความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเท่ากับ 150 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนสีแล้วได้สารละลายอนุภาคทองคำที่มีสีม่วง (รูปที่ 4.19) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm พบว่าเมื่อสารละลายอนุภาคทองคำเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี แล้วค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงจาก 520 nm เป็น 530 nm เมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงก่อนการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (รูปที่ 4.20)



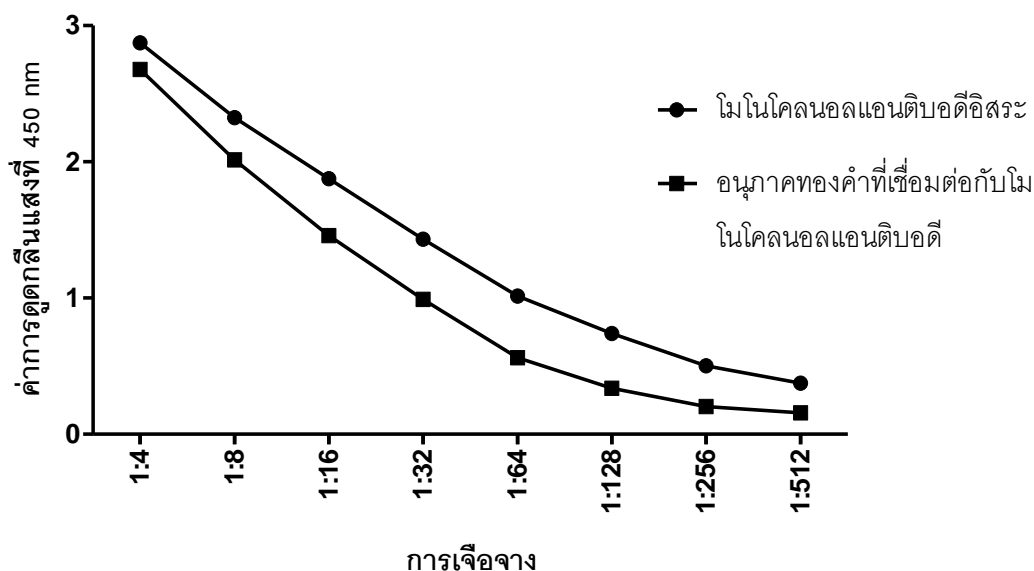
รูปที่ 4.19 สีของสารละลายอนุภาคทองคำก่อนการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีในหมายเลขที่ 1 ซึ่งเป็นสีแดงดำและสารละลายอนุภาคทองคำหลังการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีในหมายเลขที่ 2 ซึ่งเป็นสีม่วง



รูปที่ 4.20 ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำก่อนการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และหลังการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.8.2 ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อนี้ระหว่างสารละลายอนุภาคทองคำกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อาศัยวิธี indirect ELISA โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ จากรูปที่ 4.21 พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำได้โดยไม่บดบังตำแหน่งที่จับกับแอนติเจนของ OVA ที่เคลือบที่ก้นเพลท ELISA นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ มีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระที่ 450 nm (ตารางที่ ก.9 ภาคผนวก ก)

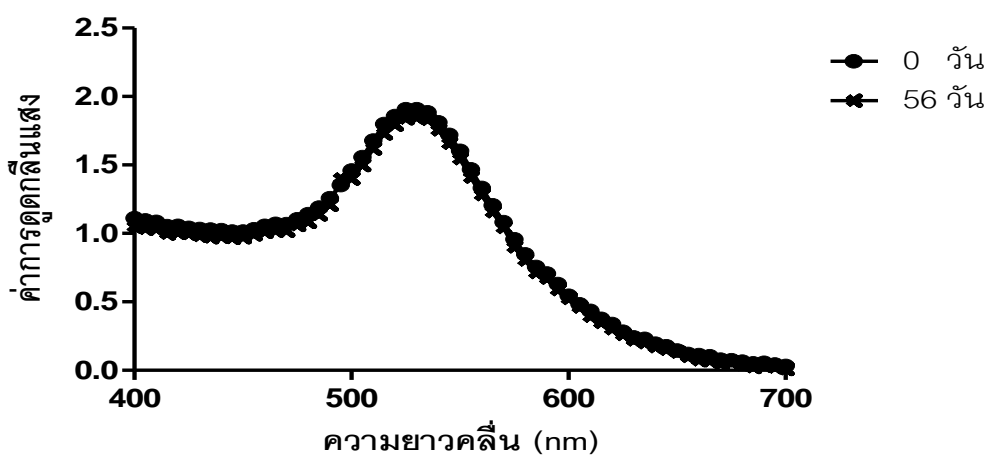


รูปที่ 4.21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเทียบกับสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระโดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm

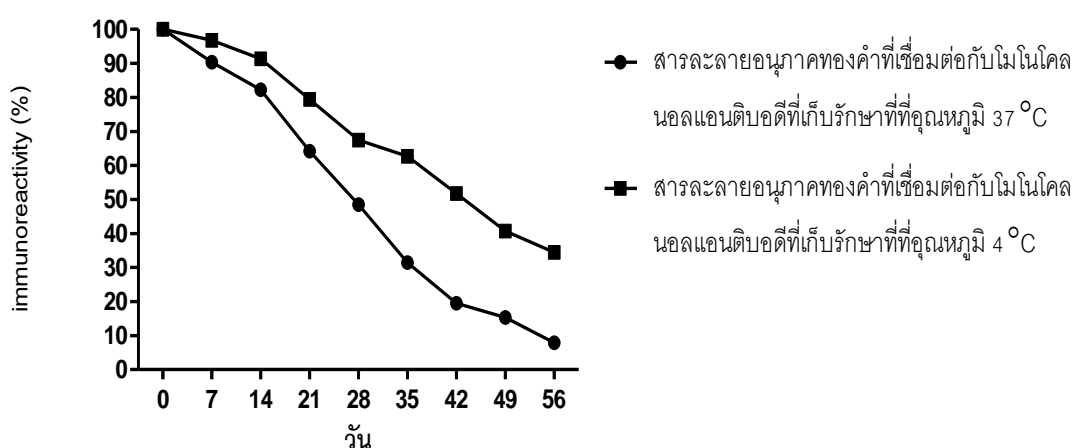
4.8.3 ความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำหลังจากเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เทคนิคของ indirect ELISA และค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ถูกนำมาศึกษาความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเมื่อผ่านไป 56 วัน โดยรูปที่ 4.22 เป็นผลที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ทุก 7 วันเป็นระยะเวลา 56 วัน ผลที่ได้พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายอนุภาค

ทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีและพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 530 nm เมื่อผ่านไป 56 วัน นอกจากนี้รูปที่ 4.23 เป็นผลที่ได้จากการทดลองของ indirect ELISA พบว่า สารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เกิดการสูญเสียของ immunoreactivity น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 °C (ตารางที่ ก.10 ภาคผนวก ก) เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถลดความเสียหายและการสลายตัวของโปรตีนได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ 37 °C



รูปที่ 4.22 ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 400 ถึง 700 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 56 วัน โดยทำการวัดทุก 7 วัน

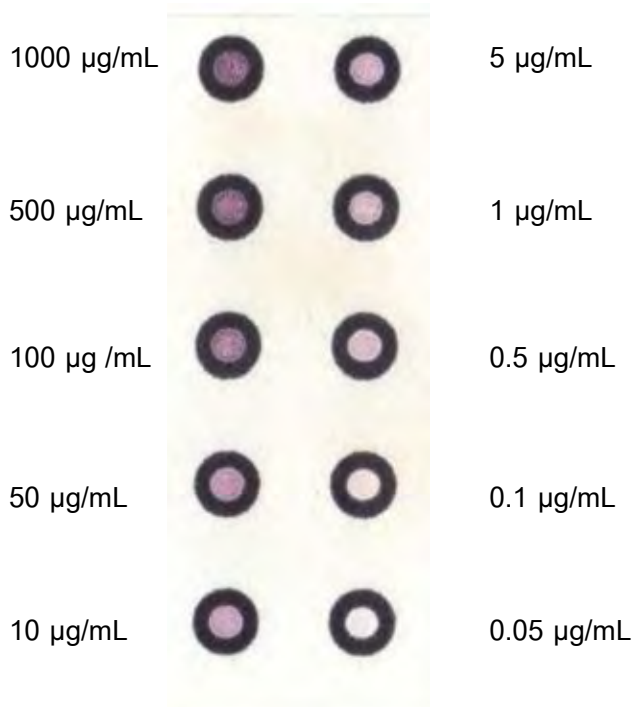


รูปที่ 4.23 ความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 37 °C ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นระยะเวลา 56 วัน

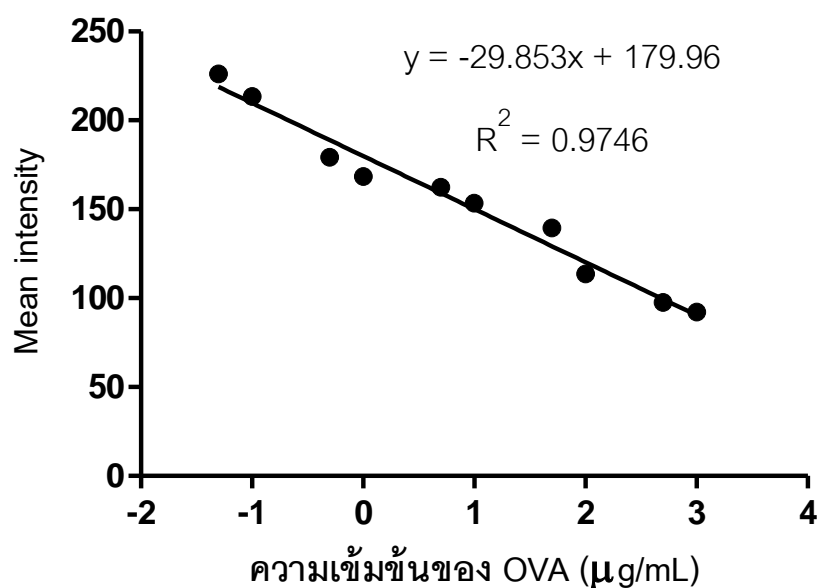
4.9 การตรวจวัดบนกระดาษโดยอาศัยหลักการ direct ELISA

4.9.1 การตรึงแอนติเจน (OVA) บนกระดาษ

การตรวจวัด OVA ที่ความเข้มข้นของ OVA ตั้งแต่ 0.05 ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่อาศัยหลักการของ DIGFA โดยตรวจวัด OVA ที่ตรึงบนกระดาษด้วยสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ พบว่าเมื่อหยดสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำลงบนกระดาษที่มี OVA จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีแดง ซึ่งสามารถเห็นด้วยตาเปล่า จากรูปที่ 4.24 พบว่า ความเข้มข้นของ OVA ที่ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถเห็นด้วยตาเปล่า จากนั้นนำรูปที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดค่า mean intensity (ตารางที่ ก.11 ภาคผนวก ก) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop แล้วนำค่า mean intensity มาเขียนกราฟดังรูปที่ 4.25 ได้สมการเส้นตรงของความสัมพันธ์ของค่า mean intensity และลอการิทึมของความเข้มข้นของ OVA คือ $y = -29.853x + 179.96$ และค่า $R^2 = 0.9746$



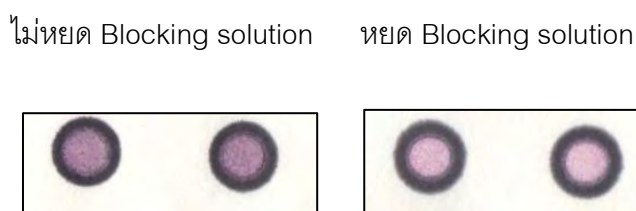
รูปที่ 4.24 การวิเคราะห์ปริมาณ OVA ที่ตรึงบนกระดาษที่ความเข้มข้นของ OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ



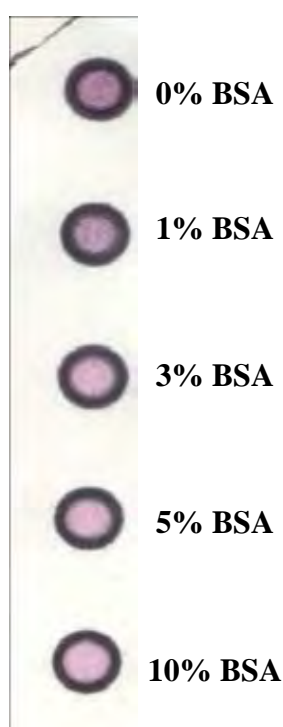
รูปที่ 4.25 ความสัมพันธ์ของค่า mean intensity และลอการิทึมของความเข้มข้นของ OVA ตั้งแต่ 0.05 µg/mL ถึง 1000 µg/mL

4.9.2 การศึกษาสถานะ Blocking และไม่ Blocking

ขั้นตอนของการป้องกันการจับกันอย่างไม่จำเพาะของ OVA กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ จัดเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญกับการทดลอง จากรูปที่ 4.26 เป็นผลที่ได้จากการไม่หยุด blocking solution และการหยุด blocking solution โดยการหยุดสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนบริเวณทำการทดลอง ทิ้งให้แห้งหมดและหลังจากนั้นหยุดสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี แล้วจากนั้นทำให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C โดยพบว่า ในบริเวณทำการทดลองที่มีการหยุด blocking solution จะช่วยป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะระหว่าง OVA กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ ทำให้ได้ความเข้มของสีที่ถูกต้องตามความเป็นจริง หลังจากนั้นทำการทดลองความเข้มข้นของ BSA ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 10 จากรูปที่ 4.27 พบว่า ที่ความเข้มข้นของ BSA ที่ร้อยละ 3 ถึง 10 สีของบริเวณทดสอบไม่เกิดความแตกต่าง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ BSA ที่ร้อยละ 3 เป็น blocking solution นอกจากนี้ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับค่า mean intensity ที่วัดได้ จากรูปที่ 4.28พบว่า ที่ความเข้มข้นของ BSA ที่ร้อยละ 3 ถึง 10 ค่า mean intensity ไม่เกิดความแตกต่าง (ตารางที่ ก.12 ภาคผนวก ก)



รูปที่ 4.26 การป้องกันและไม่ป้องกันบริเวณทดสอบด้วย blocking solution ที่ความเข้มข้นของ BSA ร้อยละ 3



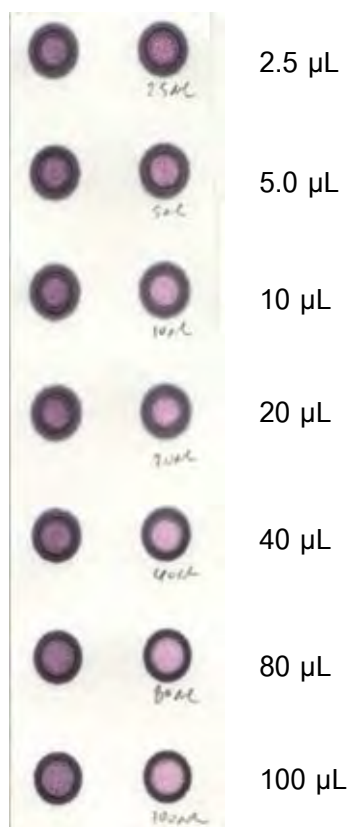
รูปที่ 4.27 สารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 10 ที่ใช้เป็น blocking solution

4.9.3 การศึกษาปัจจัยของการชะล้างของสารบนกระดาษ

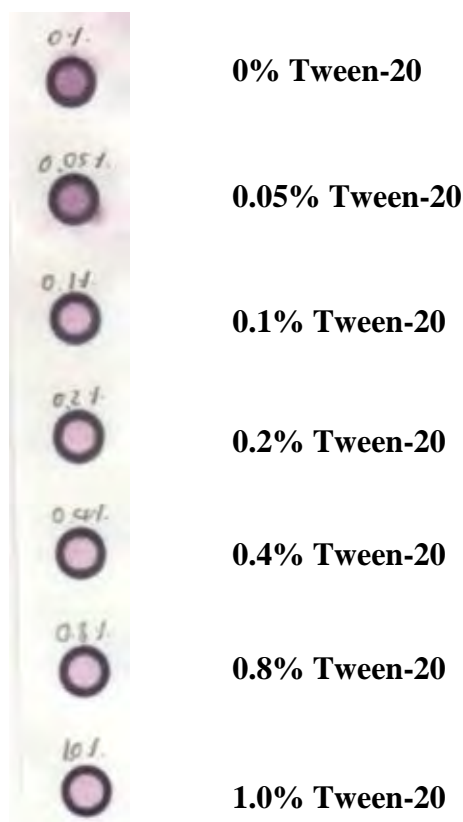
ขั้นตอนของการชะล้างสารบนกระดาษ เพื่อชะล้างส่วนเกินของ OVA กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ จัดเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญกับการทดลองจากรูปที่ 4.29 เป็นผลที่ได้จากการไม่ชะล้างและชะล้างของสารบนกระดาษ โดยการหยุด PBST ที่ผสมระหว่าง PBS pH 7.4 และ Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% ลงบนบริเวณทำการทดลองทิ้งให้แห้งหมด โดยพบว่า ในบริเวณทำการทดลองที่มีการชะล้าง จะช่วยชะล้างส่วนเกินของ OVA และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ ปริมาณของการชะล้างที่ 40 μL ก็

เพียงพอต่อการชะล้างส่วนเกินออกซึ่งสอดคล้องกับค่า mean intensity ที่ได้จากรูปที่ 4.30 ทำให้ได้ความเข้มข้นสีที่ถูกต้องตามความเป็นจริง หลังจากนั้นทำการทดลองความเข้มข้นของ Tween-20 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 10 แต่พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Tween-20 ที่ร้อยละ 0.1 ถึง 10 (รูปที่ 4.31) สีของบริเวณทดสอบไม่เกิดความแตกต่าง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ Tween-20 ที่ร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดและเพียงพอต่อการชะล้างสารบนกระดาษ โดยสามารถเห็นด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับค่า mean intensity ที่วัดได้จากรูปที่ 4.32

ไม่ชะล้าง ชะล้าง



รูปที่ 4.28 การชะล้างและไม่ชะล้างของสารบนกระดาษด้วย PBST ที่ผสมระหว่าง PBS pH 7.4 และ Tween-20 ที่ความเข้มข้น 0.05% ลงบนบริเวณทำการทดลอง

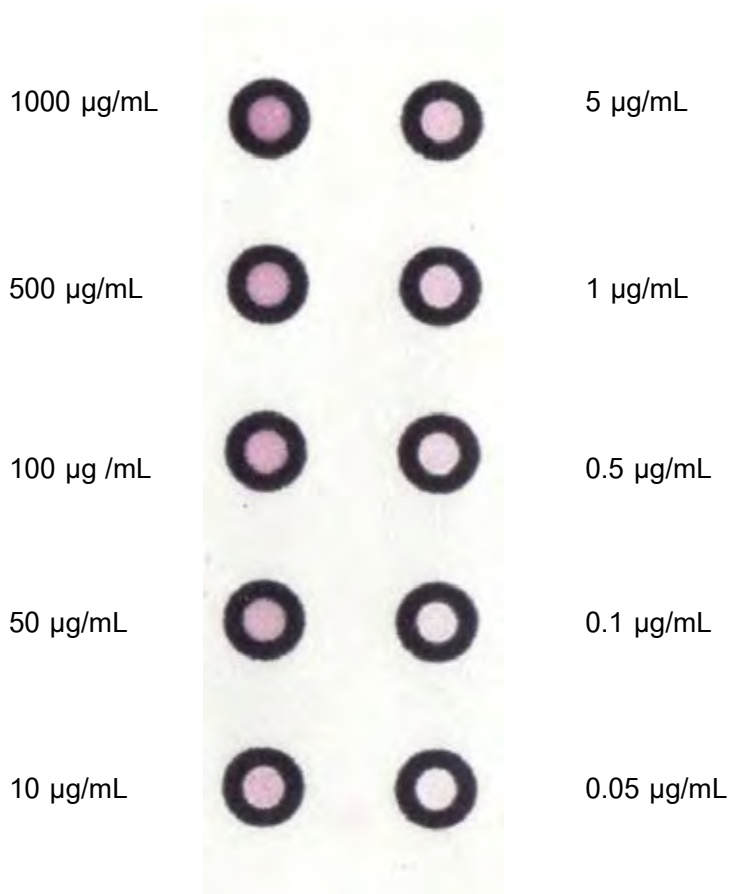


รูปที่ 4.29 ความเข้มสีที่ได้จากการใช้ Tween-20 ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.1 ถึง 10 โดยใช้ PBS pH 7.4 เป็นตัวทำละลายเพื่อใช้ในการชะล้าง

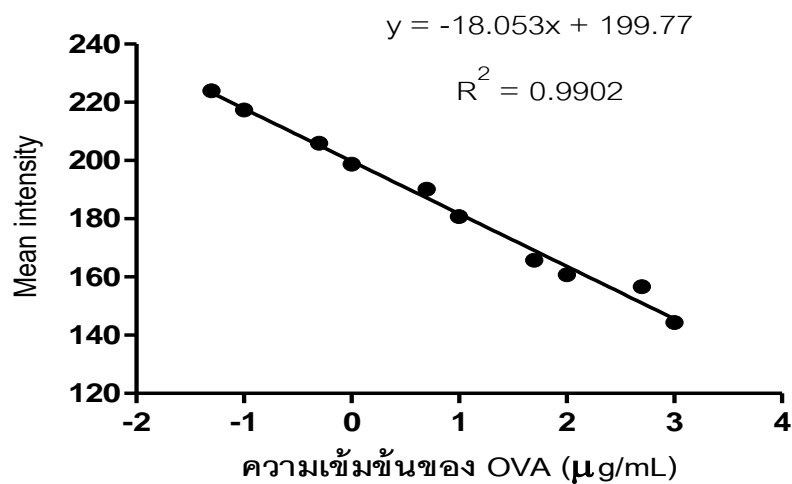
4.10 การตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนในวัคซีน

เทคนิค DIGFA ถูกนำมาตรวจวัด OVA ที่ปนเปื้อนในวัคซีนตัวอย่าง วัคซีนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม (measles, mumps, rubella vaccine) วัคซีนอีกกลุ่มที่ใช้คือ วัคซีนไขหวัดใหญ่ (influenza) โดยทำการผสม OVA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ถึง 1000 µg/mL ลงในวัคซีนตัวอย่าง แล้วทำการตรึงบนกระดาษและใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำเป็นตัวตรวจวัด OVA ผลจากการเกิดปฏิกิริยาจะปรากฏสีแดงบนกระดาษและสามารถเห็นด้วยตาเปล่า จากรูปที่ 4.33

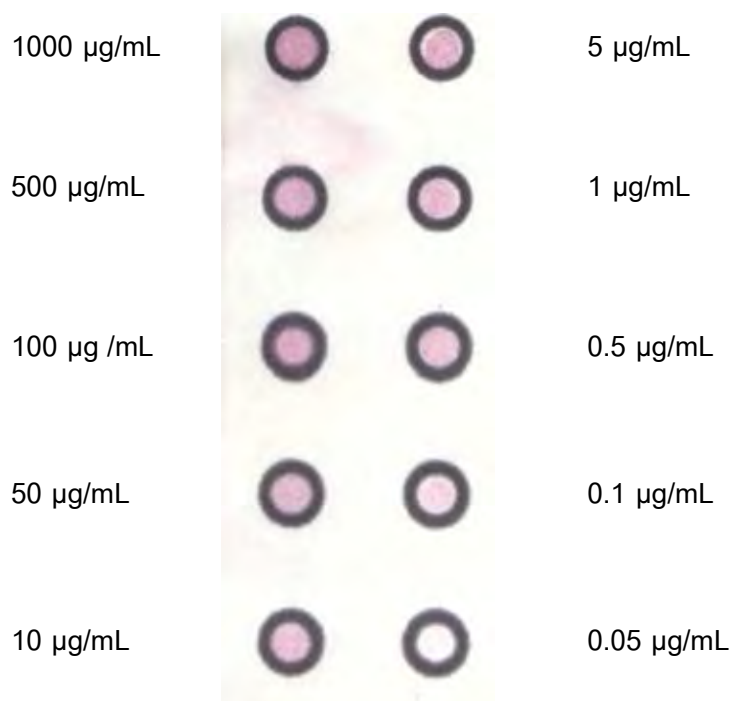
และ 4.34 พบว่า ความเข้มข้นของ OVA ที่ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ปรากฏสีแดงบนกระดาษและสามารถเห็นด้วยตาเปล่าในวัคซีนทั้งสองชนิด จากนั้นนำรูปที่ได้ไปสแกนเพื่อวัดค่า mean intensity ของวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม (ตารางที่ ก.12 ภาคผนวก ก) และวัคซีนไข้หวัดใหญ่ (ตารางที่ ก.13 ภาคผนวก ก) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป adobe photoshop แล้วพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity ที่ได้กับล็อกกาลีทึมของความเข้มข้นของ OVA ดังรูปที่ 4.35 และ 4.36 ได้สมการเส้นตรงของความสัมพันธ์ของค่า mean intensity และลอการิทึมของความเข้มข้นของ OVA ที่ผสมในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูมคือ $y = -18.053x + 199.77$ และค่า $R^2 = 0.9902$ และสมการเส้นตรงของความสัมพันธ์ของค่า mean intensity และลอการิทึมของความเข้มข้นของ OVA ที่ผสมในวัคซีนไข้หวัดใหญ่คือ $y = -18.878x + 197.26$ และ $R^2 = 0.9791$



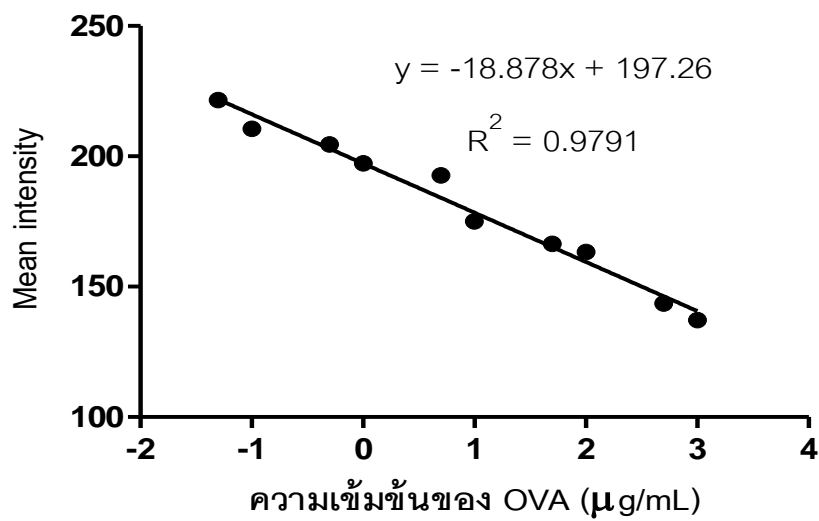
รูปที่ 4.30 ความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัด OVA ที่ความตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่ผสมลงในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม แล้วตรึงบนกระดาษด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ



รูปที่ 4.31 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และคางทูม



รูปที่ 4.32 ความเข้มสีที่ได้จากการตรวจวัด OVA ที่ความตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนไข้วัดใหญ่ แล้วตรึงบนกระดาษด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ



รูปที่ 4.33 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 µg/mL ที่ผสมลงในวัคซีนไข้หวัดใหญ่

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

อาหารเลี้ยงเซลล์ของไฮบริโดมา OVA1 OVA2 OVA8 และ OVA9 ที่ได้ผ่านการคัดกรองด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า OVA8 มีปริมาณของโมโนโคลนอลแอนติบอดีสูงที่สุดเมื่อเทียบกับ OVA1 OVA2 และ OVA9 ดังนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในกลุ่มของ OVA8 ทั้งหมด 6 โคลน มาทำการคัดกรองด้วย indirect ELISA พบว่า OVA8 ทั้ง 6 โคลน สามารถผลิตและมีปริมาณของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใกล้เคียงกัน จึงนำโคลนของ OVA 8-7H-8F-4H มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่ทำการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 g/mL เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ไฮบริโดมาและเพื่อให้ได้ปริมาณของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมากขึ้น จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ที่ -20 °C เมื่อปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์มีปริมาณมากพอ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยโปรตีนจี จากนั้นนำสารละลายในแต่ละส่วนที่ได้ทำการเก็บจากการทำให้บริสุทธิ์มาคัดกรองด้วย indirect ELISA เมื่อทราบว่าสารละลายส่วนใดที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี นำแต่ละส่วนของสารละลายที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณสูง มาผสมรวมกัน จนได้สารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความบริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำเทคนิค SDS-PAGE โดยผลของ SDS-PAGE พบว่ามีแถบ 2 แถบ คือ ที่ 25 KDa และ 55 KDa จึงสรุปได้ว่าสารละลายดังกล่าวเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพราะมีความสัมพันธ์กับขนาดของโปรตีนที่ประกอบอยู่ในโครงสร้างของโมโนโคลนอลแอนติบอดี นอกจากนี้ผลของการทำ BCA assay จากสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 5,695.67 µg/mL และผลจากการทำ indirect competitive ELISA พบว่า มี IC₅₀ คือ 0.9577 µg/mL และ LOD คือ 0.079 µg/mL นอกจากนี้ผลการทำ cross-reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์สามารถจับกับแอนติเจนของ ovomucoid และ ovotransferrin โดยสามารถตรวจพบที่ความเข้มข้นมากกว่า 500 µg/mL แต่ค่าของ cross-reaction ของ ovomucoid และ ovotransferrin มีค่าน้อยกว่ามาก เมื่อเทียบกับแอนติเจนของ OVA จึงสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์นั้น มีความจำเพาะเจาะจงต่อ OVA

อนุภาคทองคำที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาของกรดคลอโรอิกกับไซเตียมซีเตรท โดยจะได้สารละลายอนุภาคทองคำเป็นสีแดงดำ มี pH เท่ากับ 5 จากนั้นเมื่อนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm และตรวจวัดด้วย TEM มีขนาดของอนุภาคโดยเฉลี่ยคือ 12.5 nm ทำการปรับ pH ของสารละลายอนุภาคทองคำจนมี pH เท่ากับ 7 แล้ว จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm เช่นเดียวกับก่อนการปรับ pH ส่วนในการเก็บรักษาสารละลายอนุภาคทองคำควรเก็บรักษาที่ 4 °C เนื่องจากไม่พบการตกตะกอนและสีของสารละลายไม่เปลี่ยนไปจากเดิม แม้ในวันที่ 56 ของการเก็บรักษา ก็ยังพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 520 nm และไม่พบการเปลี่ยนแปลง

อนุภาคทองคำที่ได้ทำการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ OVA โดยต้องมีภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อ ซึ่งปัจจัยที่มีผลในการเชื่อมต่อก็คือ pH ของสารละลายอนุภาคทองคำและความเข้มข้นของสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองคือ pH ตั้งแต่ pH 4 ถึง 11 โดยพบว่า pH 7 จนถึง pH 10 สีของสารละลายอนุภาคทองคำไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจาก pH เท่ากับ 7 มีสภาวะเป็นกลางทำให้อนุภาคทองคำมีความเหมาะสมในการจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่า และการวัดผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ($OD_{520\text{ nm}} - OD_{580\text{ nm}}$) นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ พบว่าที่ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็น 15 $\mu\text{g/mL}$ เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถป้องกันการเกิดการตกตะกอนของอนุภาคทองคำได้ โดยสามารถเห็นผลได้ด้วยตาเปล่าและการวัดผลต่างค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{520\text{ nm}} - OD_{580\text{ nm}}$) หลังจากนั้นนำสารละลายของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 530 nm ซึ่งต่างไปจากก่อนการเชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พบที่ 520 nm นอกจากนี้ทำการศึกษาความเสถียรของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 4 °C

ในการพัฒนาเทคนิค DIGFA ร่วมกับเทคนิค optical detection ซึ่งเป็นการวัดความเข้มของสี (mean intensity) โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายและมีความรวดเร็วในการตรวจวัดการปนเปื้อนของ OVA โดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ จึงทำให้เห็นสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษด้วยตาเปล่าภายในระยะเวลา 15 นาที ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่อนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับ OVA บนกระดาษในการทดลองที่ได้คือ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษา

ปัจจัยในการใช้ blocking solution (BSA) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญไม่ให้เกิดการจับกันอย่างไม่จำเพาะ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BSA คือ 3% ในส่วนของปัจจัยของการชะล้างบริเวณทดสอบที่อยู่บนกระดาษ ปริมาตรที่เพียงพอต่อการชะล้างคือ 40 μL สำหรับหนึ่งหลุมที่ทดสอบ และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Tween-20) ที่เหมาะสมคือ 0.1% นำภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาทดสอบกับการปนเปื้อนของ OVA ที่เติมลงในวัคซีนของ MMR และวัคซีนไขหวัดใหญ่ โดยความเข้มข้นของ OVA ที่เติมลงไปตั้งแต่ 0.05 ng/ml - 1 mg/ml โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DIGFA พบว่า ความเข้มข้นของ OVA น้อยสุดของอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเท่ากับ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในวัคซีนทั้งสองชนิด

ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาและปรับปรุงโดยการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีไวสูงกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้อาจทำให้อนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับ OVA ได้ที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ รวมทั้งการพัฒนารูปแบบจาก indirect ELISA เป็น sandwich ELISA อาจทำให้มีความจำเพาะในการจับกันของแอนติเจนและอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีมากขึ้น ทำให้ผลที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าความถูกต้อง แม่นยำ และเที่ยงตรงมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์. 2550. การแพ้อาหาร. วารสารศูนย์บริการวิชาการ.15(3)
(กรกฎาคม - กันยายน 2550) : 19-24.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, J.N., David, P.B. 1998. Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Bethesda, Md : Fitzgerald Science Press.

Anderson, J.A. 1986. The Establishment of a Common Language Concerning Adverse Reactions to Foods and Food Additives. Journal of Allergy Clin. Immunol, 78: 140 - 143.

Arruebo, M., Valladares, M., and Africa, G.F. 2009. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. Journal of Nanomaterials. 1- 24.

Bhattacharya, S., and Srivastava, A. 2003. Synthesis of gold nanoparticles stabilised by metal-chelator and the controlled formation of close-packed aggregates by them. Journal of Chemical Sciences, 115: 613-619.

Borghesi, L., Milcarek, C. 2006. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. Immunol.Rew, 36(1-3): 27-32.

Bretton, P.R., Melamed, M.R., Fair, W.R., Cote, R.J. 1994. Detection of occult micrometastases in the bone marrow of patients with prostate carcinoma. Prostate, 25(2): 108-114.

Carmen, D.A. 2009. Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens: Case 1-Egg. Food Analytical Methods, 3: 351-356.

Celakovská, J., Ettlerová, K., Ettler, K., Krcmová, I. 2010. Food allergy to egg with the onset at adult age. Revue Française d'Allergologie, 50(8): 628-633.

Chaloupka, I., Schuler, A., Marschall, M., Meier-Ewert, H. 1996. Comparative analysis of six European influenza vaccines. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 15(2): 121-127.

- Charles, A., Janeway, J.r., Paul, T., Mark, W., and Mark, J. Shlomchik. 2001. Immunobiology (5th Ed). The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science.
- Chithrani, B.D., Stewart, J., Allen, C. Jaffray, D.A. 2009. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. Nanomedicine, 5 (2): 118-127.
- Chung, E.Y., Huang, L., Schneider, L. 2010. Safety of influenza vaccine administration in egg-allergic patients. Pediatrics, 125(5): 1024 - 1030.
- Cianferoni, A., and Spergel, J.M. 2009. Food allergy: review, classification and diagnosis. Allergy International, 58(4): 457-466.
- Dancette, O.P., Taboureau, J.L., Tournier. E., Charcosset, C., Blond, P.P. 1999. Urification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography. Journal of Chromatogram B Biomed Sci Appl, 723(1-2): 61-8.
- David , S.H. 1999. Affinity Chromatography : A Review of Clinical Applications . Clinical Chemistry, 45:5593–5615.
- David, J. H., and Hazel, P. 1998. Analytical Biochemistry (3rdEd). Addison Wesley Longman : Pearson Education.
- Diéguez, M.C., Cerecedo. I., Muriel, A., Zamora, J., Abraira, V., Camacho, E., Antón , M., dela, Hoz, B. 2009. Utility of diagnostic tests in the follow-up of egg-allergic children. Clinical & Experimental Allergy, 39(10):1575-1584.
- Derjaguin, B.V., and Landau. L. 1941 Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. ActaPhysiochim. URRS 14, 633 S.
- Donald, Y., M., Leung, Hugh, S., Raif, G., Stanley, J. S. 2010. Pediatric Allergy: Principles and Practice (2nd Ed). Philadelphia: Saunders.
- Eggesbo, M., Botten, G., Halvorsen, R., Magnus, P. 2001. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. Allergy, 56: 403 - 411.
- Firer, M.A. 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. Journal of BiochemBiophys Methods, 49 (1-3): 433-442.

- Gagnon, R., Primeau, M.N., D.E.S., Roches, A., Lemire, C., Kagan, R., Carr, S., Ouakki, M., Benoît, M., D.e., Serres, G. 2010. PHAC-CIHR Influenza Research Network. Safe vaccination of patients with egg allergy with an adjuvanted pandemic H1N1 vaccine. Journal of Allergy Clin Immunol. 126(2): 317-323.
- Gettins, P.G. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. Chemical Reviews, 102(12): 4751-4804.
- Gómez - Hens, A., Fernández-Romero, J.M., Aguilar-Caballos, M.P. 2008. Nanostructures as analytical tools in bioassays. Trends Anal Chemistry, 27: 394 - 406.
- Guyton, and Hall. 2006. Textbook of Medical Physiology (11th Ed). Elsevier, Inc. Philadelphia, PA.
- Harlow, E., and Lane, D. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Spring Harbor (New York) : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hayat, M.A. 1989. Colloidal Gold : Principles, Methods and Application. Vol. 1. New York :.Academic Press Inc.
- Heine, R.G., Laske, N., Hill, D.J. 2006. The diagnosis and management of egg allergy. Curr Allergy Asthma Rep, 6(2): 145-152.
- Hermanson, G., 1995. Bioconjugate Techniques. San Diego : Academic Press Inc.
- Hou, S.Y., Chen, H.K., Cheng, H.C., Huang, C.Y. 2007 Development of zeptomole and attomolar detection sensitivity of biotin-peptide using a dot-blot gold nanoparticle immunoassay. Analytical Chemistry. 79: 980-985.
- Hu, H.Y., and Du, H.N. 2000. Alpha to Beta Structural Transformation of Ovalbumin: Heat and pH Effects. Journal of Protein Chemistry, 19(3): 177–183.
- Huang, Q., Lan, X., Tong, T., Wu, X., Chen, M., Feng ,X., Liu, R., Tang, Y., Zhu. Z. 1996. Dot-immunogold filtration assay as a screening test for syphilis. Journal of Clinical Microbiology, 34 (8): 2011-2013.
- Huntington, J.A., and Stein, P.E. 2001. Structure and properties of ovalbumin. Journal of Chromatography B, 756(1-2):189–198.

- James, J.M., Zeiger, R.S., Lester, M.R., Fasano, M.B., Gern, J.E., Mansfield, L.E., Schwartz, H.J., Sampson, H.A., Windom, H.H., Machtiger, S.B., Lensing, S. 1998. Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. Journal of Pediatr, 133(5): 624-628.
- Jarvinen, K.M., Beyer, K., VilaL, Bardina, L., Mishoe M., Sampson, H.A. 2007. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. Allergy, 62: 758-765.
- Johnstone, A., and Thorpe, R. 1987. Immunochemistry in Practice (2nd Ed). Oxford : Blackwell Scientific.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. Plech, A. 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. Journal of PhysChem B, 110:15700.
- Kuby. 2006. Immunology (6th Ed). Palgrave Macmillan U.K : Palgrave Macmillan.
- Kumar, R., Chandra, K., Singh, Suchitra, Kamle, Rajeshwar P., Sinha, Raj, K., Bhatnagar, Devendra, N., Kachru. 2010. Development of nanocolloidal gold based immunochromatographic assay for rapid detection of transgenic vegetative insecticidal protein in genetically modified crops. Food Chemistry, 122 (4): 1298-1303.
- Lawrence, T.C., Arlene, S., T.S., Fima, L. 1988. Food allergy: a practical approach to diagnosis and management. New York : Marcel Dekker.
- Lequin, R.M., 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry, 51: 2415-2418.
- Leslie, C.G., and Paul, A.G. 2009. Patterson's Allergic Diseases (7th Ed). Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Li, D., Yang, H., Zhang, W.H., Pan, H., Wen, D.Q., Han, F.C., Guo, H.F., Wang, X.M., Yan, X.J. 2006. A simple parallel analytical method of prenatal screening. Gynecol Obstet Invest, 62 (4): 220 - 225.

- Link, S., and El-Sayed, M.A. 1999. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry B, 103 : 4212-4217.
- Litman, G.W., Rast, J.P., Shablott, M.J., Haire, R.N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R.T., Hinds-Frey, K.R., Zilch, A., Amemiya, C.T. 1993. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. Mol. Biol. Evol, 10(1): 60–72.
- Lydyard P.M., Whenlan, A., Fanger, M.W. 2004. Instant Note: Immunology (2nd Ed). London : Bios scientific.
- Ma, L.N., Liu, D.J., and Wang, Z.X.2010. Synthesis and Applications of Gold Nanoparticle Probes. Chinese journal of analytical chemistry. 38: 1-7.
- Mansour, W.A., El-Assal, F., El-Mahdy, M.M., Hendawy, M.A., Salem, R., and Demerdash, Z.A. 2009. A monoclonal antibody-based dot immunogold filtration assay: A rapid field applicable technique for immunodiagnosis of active Schistosomiasis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3:784-789.
- Martinez, A.W., Phillips, S.T., Butte, M.J., Whitesides, G.M. 2007. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angew ChemInt Ed. 46(8):1318-20.
- Martinez ,A.W., Phillips, S.T., Carrilho, E., Thomas, S.W. 3rd, Sindi, H., Whitesides, G.M. 2008. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. Anal Chem. 80: 3699-707.
- Montesinos, E., Martorell, A., Fe'lix, R., Cerda', J.C. 2010. Egg white specific Ige levels in serum as clinical reactivity predictors in the course of egg allergy follow-up. Pediatric Allergy and Immunology, 21: 634–639.
- Nelson, P.N., Reynolds. G.M., Waldron, E.E., Ward, E., Giannopoulos , K., Murray, P.G. 2000. Monoclonal antibodies. Molecular pathology, 53(3):111-117.
- Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J.G., Fothergill, L.A., Fothergill, J.E. 1981. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. European Journal of Biochemistry, 115(2): 335.

- Norde, W., 1986. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. AdvColloid Interface Sci. 25(4): 267-340.
- O'Brien, T.C., Maloney, C., Tauraso, N.M. 1971. Quantitation of residual host protein in chicken embryo-derived vaccines by radial immunodiffusion. ApplMicrobiol, 21: 780-782.
- Olsen, I., and Wiker, H.G. 1998. Diffusion blotting for rapid production of multiple identical imprints from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on a solid support. Journal of Immunological Methods, 220: 77–84.
- Pelton, R., 2009. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics, Trends Analyt. Chem. 28: 925-942.
- Peter, P. 2009. The Immune System (3rd Ed). Garland Science: Taylor and Francis Group, LLC.
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., Jeltsch, A. 2002. Biochemical Methods: A Concise Guide for Students and Researchers. Germany : Wiley-VCH Verlag Gmbh Hardback.
- Polte, J.T., Torsten, Ahner, Friedmar, Delissen, Sergey, Sokolov, Franziska, Emmerling, Andreas, F. Thunemann and Ralph Kraehnert 2010. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ Xanes and Saxs Evaluation. Journal of the American Chemical Society. 132(4): 1296–1301.
- Poulsen, L.K., Hansen, T.K., Norgaard, A., Vestergaard, H., Skov, P.S. Bindslev-Jensen, C., 2001. Allergens from fish and egg. Allergy. 56: 67: 39–42.
- Richard, A.G., Thomas, J.K., Janis, K., Barbara, A.O. 2002. Immunology (5th Ed). New York : W. H. Freeman and company.
- Robinson, A., Meredith, C., Austen, B.M. 1986. Isolation and properties of the signal region from ovalbumin. FEBS Letters. 203(2): 243-246.
- Romero, G.L., Kumar, S. 2006. Case 1: The case of the cookie, the rash and the flu vaccine. Paediatr Child Health. 11(10): 675–677.

- Sambrook, J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed). New York: Cold Spring Harbor Press.
- Savage, J.H., Matsui, E.C., Skripak, J.M., Wood, R.A. 2007. The natural history of egg allergy. Journal of Allergy Clin Immunol, 120(6): 1413-1417.
- Shivanand, P. 2010. Hybridoma Technology for Production of Monoclonal Antibodies. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 1(2): 88-94.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. 2009. Food allergy. Journal of Allergy Clin. Immunol, 125:116-125
- Sikora, K., and Smedley, H.M. 1984. Monoclonal antibodies. Oxford : Blackwell Scientific Publications.
- Stadlmann, J., Pabst, M., Kolarich, D., Kunert, R., Altmann, F. 2008. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. Proteomics. 8(14): 2858–2871.
- Sui, H.L., Cao, L.M., Li, Z.X., 2009. Dot-immunogold filtration assay for rapid screening of three fluoroquinolones. Food and Agricultural Immunology, 20(2): 125-137
- Tijssen, P. 1985. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol.5 Burdon Publisher : Elsevier Science Ltd.
- Verwey, E.J.W. and Overbeek, J.T.G., 1948. The free energy of a double layer system. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. New York: Elsevier.
- Wang, X., Zhan, W., and Xing, J. 2006. Development of dot-immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp. Journal of Virol Methods. 132(1-2): 212-215.
- Wang, Z., and M.a, L. 2009. Gold nanoparticle probes. Coordination Chemistry Reviews. 253: 1607–1618.
- Wen, L.Y., Chen, J.H., Ding, J.Z., Zhang, J.F., Lu, S.H., Yu, L.L., Shen, L.Y., Wu, G.L., Zhou, X.N., Zheng, J. 2005. Evaluation on the applied value of the dot immunogold filtration assay (DIGFA) for rapid detection of anti-Schistosomajaponicum antibody. Acta Trop, 96 (2-3): 142-147.

- Woof, J.M., and Burton, D.R. 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. Nat Rev Immunol. 4(2): 89–99.
- Wu, W., Xu, D.Z., Yan, Y.P., Zhang, J.X., Liu, Y., Li, R.L. 1999. Evaluation of dot immunogold filtration assay for anti-HAV IgM antibody World. Journal of Gastroenterol. 5(2): 132-134.
- Wu, X., and Koiwa, H. 2012. One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel. Analytical Biochemistry. 421: 347–349.
- Xiulan, S., Xiaolian, Z., Jian, T., Zhou, J., Chu, F.S. 2005. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. Int Journal of Food Microbiol, 99(2):185-194.
- Yan, Z., and Huang, J. 2000. Chromatographic behavior of mouse serum immunoglobulin G in protein G perfusion affinity chromatography. Journal of Chromatogr B Biomed Sci Appl, 738(1): 149-154.
- Ye, Y., Zhou, Y., Mo, Z., Cheng, W., Yang, S., Wang, X., Chen, F. 2010. Rapid detection of aflatoxinB (1) on membrane by dot-immunogold filtration assay. Talanta.15; 81(3): 792-8.
- Zeiger, R.S., 2002. Current issues with influenza vaccination in egg allergy. J Allergy ClinImmunol. 110: 834-40.
- Zhu, J., Chen, W., Lu, Y., Cheng, G. 2008. Development of an immune-chromatographic assay for the rapid detection of bromoxynil in water. Environmental Pollution. 156 (1): 136-142.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ระดับของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ hybridoma cell ของ OVA1 OVA2 OVA8 และ OVA9 ที่นำมาคัดกรองด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 nm

การเจือจาง	OVA 1	OVA 2	OVA 8	OVA 9	Positive control	Negative control
1:5	0.1963	0.1796	0.5900	0.0630	1.3320	0.0530
1:10	0.2060	0.2053	0.4566	0.0613	0.7960	0.0590
1:20	0.2093	0.2060	0.4143	0.0633	0.4945	0.0645
1:40	0.2236	0.2123	0.3946	0.0610	0.2840	0.0625
1:80	0.2063	0.2096	0.3346	0.0600	0.1595	0.0695
1:160	0.1693	0.1873	0.2100	0.0550	0.0945	0.0590

ตารางที่ ก.2 การคัดกรองในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ hybridoma cell ในกลุ่มของ OVA8 จำนวน 6 โคลนด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 nm

การเจือจาง	OVA 8-1	OVA 8-2	OVA 8-3	OVA 8-4	OVA 8-5	OVA 8-6	Positive control	Negative control
1:5	0.8145	0.8336	0.8686	0.8430	0.8780	0.8674	1.4520	0.0432
1:10	0.6800	0.6853	0.6690	0.6490	0.6556	0.6790	0.8060	0.0531
1:20	0.5620	0.5636	0.5750	0.5686	0.5440	0.5723	0.5032	0.0578
1:40	0.3323	0.3673	0.4050	0.4043	0.3650	0.3613	0.2967	0.0563
1:80	0.1816	0.2066	0.2143	0.2166	0.1896	0.2190	0.1705	0.0575
1:160	0.1130	0.1326	0.1263	0.1320	0.1130	0.1380	0.0995	0.0590

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 nm และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 nm

หมายเลขของ fraction	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 nm	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 450 nm
1	0.074	0.069
2	0.082	0.057
3	0.079	0.048
4	0.080	0.087
5	0.078	0.089
6	0.092	0.099
7	0.229	0.169
8	1.065	0.768
9	2.702	2.002
10	3.075	2.164
11	3.127	2.220
12	3.062	2.190
13	2.553	1.895
14	1.355	1.006
15	0.838	0.666
16	0.559	0.449
17	0.391	0.298
18	0.327	0.249
19	0.243	0.181
20	0.206	0.160
21	0.168	0.127

หมายเลขของ fraction	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 280 nm	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 450 nm
22	0.141	0.108
23	0.127	0.097
24	0.114	0.084
25	0.110	0.080
26	0.105	0.077
27	0.098	0.071
28	0.094	0.070

ตารางที่ ก.4 การหาปริมาณโปรตีนของสารละลาย BSA และโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี
BCA assay

	ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm			ค่าเฉลี่ย ของการ ดูดกลืน แสงที่ 540 nm - Blank	ความเข้มข้น ของโปรตีน (mg/mL)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
Blank		0.087	0.088	0.088	0.001	0.000
BSA	1000 µg/mL	0.636	0.64	0.638	0.550	1.000
	800 µg/mL	0.542	0.54	0.541	0.453	0.800
	600 µg/mL	0.453	0.454	0.454	0.366	0.600
	400 µg/mL	0.34	0.342	0.341	0.253	0.400
	200 µg/mL	0.204	0.202	0.203	0.115	0.200
	100 µg/mL	0.146	0.144	0.145	0.057	0.100
โมโน โคลนอล แอนติบอดี	1 : 2	1.677	1.671	1.674	1.587	5.660
	1 : 4	0.901	0.872	0.886	0.800	5.666
	1 : 8	0.511	0.486	0.498	0.412	5.761

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 nm และค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ indirect ELISA ที่ 450 nm ที่ 450 nm

ความเข้มข้น ของ OVA ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1000	0.091	0.094	0.101	0.095
500	0.095	0.096	0.103	0.098
100	0.102	0.108	0.109	0.106
50	0.118	0.112	0.119	0.116
10	0.223	0.227	0.213	0.221
5	0.622	0.624	0.638	0.628
1	0.979	0.995	0.996	0.990
0.5	2.235	2.238	2.243	2.238
0.1	2.768	2.703	2.734	2.735
0.05	2.913	2.903	2.917	2.911
0.01	2.953	2.876	2.868	2.899
0.005	2.872	2.878	2.951	2.900
0.001	2.863	2.907	2.917	2.895
0	2.949	2.855	2.905	2.903

ตารางที่ ก.6 ค่าความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	Lysozyme	Ovotransferrin	Ovomucoid	ovalbumin
50000	0.149	0.545	0.450	2.941
5000	0.154	0.417	0.348	2.937
500	0.135	0.214	0.191	2.939
50	0.150	0.225	0.159	2.840
5	0.145	0.233	0.158	2.561
0.5	0.150	0.190	0.164	1.722
0.05	0.159	0.200	0.162	1.307
0.005	0.161	0.204	0.159	0.735
0.0005	0.153	0.188	0.163	0.314
0.00005	0.154	0.187	0.169	0.126

ตารางที่ ก.7 ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm ของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 4 จนถึง 11 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 $\mu\text{g/mL}$

pH ของสารละลายอนุภาคทองคำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm	ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 580 nm
4	1.146	1.137	0.008
5	1.152	1.125	0.026
6	1.148	1.003	0.145
7	1.151	0.892	0.258
8	1.148	0.887	0.260
9	1.149	0.888	0.261
10	1.148	0.888	0.259
11	1.147	0.927	0.220

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm – ค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm ของสารละลาย
อนุภาคทองคำที่ pH มีค่า 7 ที่มีการเติมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความ
เข้มข้นตั้งแต่ 0 $\mu\text{g/mL}$ จนถึง 30 $\mu\text{g/mL}$

ความเข้มข้นของโม โนโคลนอล แอนติบอดี ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm – 580 nm
4	1.15721	1.14844	0.00877
5	1.159891	1.133191	0.02670
6	1.15621	1.01091	0.14530
7	1.157327	0.898427	0.25890
8	1.154308	0.893408	0.26090
9	1.153425	0.892325	0.26110
10	1.158406	0.899006	0.25940
11	1.15721	1.14844	0.00877

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีเทียบกับสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระโดยวิธี indirect ELISA ที่ 450 nm

การเจือจาง	สารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีอิสระ	สารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี
1:4	2.874	2.677
1:8	2.323	2.013
1:16	1.875	1.459
1:31	1.432	0.990
1:64	1.013	0.560
1:128	0.738	0.338
1:256	0.501	0.202
1:512	0.375	0.158

ตารางที่ ก.10 ความเสถียรของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 37 °C ด้วยเทคนิค indirect ELISA เป็นระยะเวลา 56 วัน

วัน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm	ร้อยละของ immunoreactivity ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm	ร้อยละของ immunoreactivity ของสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมต่อกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 °C
0	3.090	100	3.090	100
7	2.792	90.336	2.992	96.820
14	2.542	82.260	2.824	91.374
21	1.983	64.160	2.453	79.377
28	1.498	48.468	2.084	67.438
35	0.972	31.449	1.937	62.688
42	0.603	19.510	1.600	51.778
49	0.475	15.368	1.257	40.686
56	0.245	7.927	1.064	34.442

ตารางที่ ก.11 mean intensity ของ OVA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่ตั้งบนกระดาษแล้วทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทองคำ

Antigen ($\mu\text{g/mL}$)	Mean intensity			Average	SD
	1	2	3		
1000	92.16	92.20	91.89	92.083	0.17
500	97.60	97.57	97.62	97.596	0.03
100	113.68	113.70	113.65	113.676	0.03
50	139.54	139.51	139.53	139.526	0.02
10	153.54	153.49	153.53	153.520	0.03
5	162.52	162.50	161.99	162.336	0.30
1	168.52	168.51	168.55	168.526	0.02
0.5	179.39	178.98	179.20	179.190	0.21
0.1	213.36	213.45	213.30	213.370	0.08
0.05	226.23	226.30	224.99	226.173	0.16

ตารางที่ ก. 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่ผสมลงในวัคซีนรวมป้องกันโรคหัด หัดเยอรมัน และ คางทูม

Antigen ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Mean intensity 1	Mean intensity 2	Mean intensity 3	Average	SD
1000	144.80	144.23	143.89	144.3067	0.46
500	156.62	156.58	156.68	156.6267	0.05
100	160.50	159.78	162.10	160.7933	1.19
50	165.34	166.89	164.89	165.7067	1.05
10	180.84	179.64	181.63	180.7033	1.00
5	194.47	187.42	188.62	190.1700	3.77
1	197.73	199.87	198.51	198.7033	1.08
0.5	206.84	206.21	204.81	205.9533	1.04
0.1	216.24	218.42	217.54	217.4000	1.10
0.05	224.74	223.09	224.10	223.9767	0.83

ตารางที่ ก. 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง mean intensity กับความเข้มข้น OVA ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 - ถึง 1000 $\mu\text{g/mL}$ ที่ผสมลงในวัคซีนไข้วัดใหญ่

Antigen ($\mu\text{g/mL}$)	Mean intensity 1	Mean intensity 2	Mean intensity 3	Average	SD
1000	137.43	136.99	137.21	137.2100	0.22
500	143.67	143.01	143.87	143.5167	0.45
100	162.06	162.15	165.79	163.3333	2.13
50	166.78	166.09	166.31	166.3933	0.35
10	175.50	174.31	175.43	175.0800	0.67
5	192.31	192.74	192.91	192.6533	0.31
1	197.43	197.38	197.16	197.3233	0.14
0.5	204.78	204.13	204.88	204.5967	0.41
0.1	210.70	210.12	210.87	210.5633	0.39
0.05	221.98	221.05	221.71	221.5800	0.48

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	80 mL
Fetal Bovine Serum (FBS)	20 mL
10^6 U/mL Penicillin G	10 μ L
500 mg/mL Streptomycin	50 μ L
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	1 mL
100 mM Sodium pyruvate	1 mL
1 g/mL Glucose	100 μ L

ละลายสารทุกอย่างใน RPMI 1640 และผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ขวดละ 100 mL และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2) น้ำยาเก็บเซลล์แช่แข็งไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70 mL
Fetal bovine serum	20 mL
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10 mL

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 °C (ใช้งานขณะเย็นประมาณ 4 °C)

ข.2 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1) Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

ไตเตรตด้วย 1 M HCl จนได้ pH 7.4 แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L

2) 0.05% Tween-20 ใน PBS (PBST)

PBS	1 L
Tween-20	500 µL

3) 3% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย	3 g
PBST	100 mL

ละลายนมพร่องมันเนยใน PBST (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

4) 0.15 M Phosphate Citrate buffer. pH 5.0

Na ₂ HPO ₄ (MW 141.96)	9.5 g
Citric acid (MW 192.13)	7.3 g
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1 L

ไตเตรตต่างด้วยกรดจนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

5) Substrate TMB

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	2.5 mg
DMSO	250 µL
0.15 M Phosphate Citrate buffer. pH 5.0	9746.5 µL
H ₂ O ₂	3.5 µL

6) 1 M H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (95%)	5.6 mL
น้ำกลั่น	94.4 mL

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

ข.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

- 1) 20 mM Sodium phosphate pH7.0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.77 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69 g
ละลายในน้ำกลั่น	1 L

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μM

- 2) 0.1 M glycine pH 3

Glycine-HCl	7.51 g
Conc.HCl	2.42 mL
ละลายในน้ำกลั่น	1 L

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 3.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μM

- 3) 1 M Tris HCl buffer pH 8.0

Trizma base	121.14 g
Conc.HCl	6.41 mL
ละลายในน้ำกลั่น	1 L

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 8.0 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 μM

ข.4 การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ SDS-PAGE

- 1) 8% Separating gel (1 แผ่น ปริมาตร 8 mL)

น้ำกลั่น	4.236 mL
40% Acrylamide/Bis	1.6 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.0 mL
10% Ammonium persulfate	80 μL
10% Sodium dodecyl sulfate	80 μL
TEMED	40 μL

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการแข็งตัวของแผ่นเจล

2) 5.0% Stacking gel (1 แผ่น ปริมาตร 2 mL)

น้ำกลั่น	1.204 mL
40% Acrylamide/Bis	0.25 ml
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.504 mL
10% Ammonium persulfate	20 μ L
10% Sodium dodecyl sulfate	20 μ L
TEMED	2 μ L

ผสมให้เข้ากันโดยเติม TEMED เป็นอย่างสุดท้ายเพื่อให้เกิดการแข็งตัวของแผ่นเจล

3) SDS staining dye

SDS dye	900 μ L
β -mercaptoethanol	100 μ L

4) Running buffer

Trizma base	15.1 g
Glycine	94 g
SDS	5 g
น้ำกลั่น	1 L

5) Staining solution

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	5 g
95% Ethanol	450 mL
น้ำกลั่น	450 mL
Glacial Acetic Acid	100 mL

6) Destaining solution

Methanol	250 mL
Glacial Acetic Acid	70 mL
น้ำกลั่น	680 mL

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุชุม งามพร้อมพงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดกำแพงเพชร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 เสนอผลงานเรื่องการผลิตและการติดฉลากอนุภาคทองคำกับ anti-ovalbumin monoclonal antibody (Production and labeling of gold nanoparticle with Anti-Ovalbumin Monoclonal Antibody) ในการประชุม The 1st AGRC and the 1st Forum of the Deans of ASEAN Plus Three Graduate Schools ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 1-2 มีนาคม 2555