1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันเกษตรกรรมเลี้ยงโคนมเป็นอาชีพหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรไทย ปัญหาที่พบในเกษตรกรที่เลี้ยงโคนมส่วนมากเกิดจากประสิทธิภาพด้านการขยายพันธุ์มักมีความผิดพลาดหรือล่าช้าอันเนื่องมาจาก การหาระยะเวลาการเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ และการตรวจสอบการตั้งท้อง ของเกษตรกรได้มาจากการสังเกตอาการของแม่โคและการตรวจท้องเพื่อดูว่าแม่โคได้รับการผสมติดจนตั้งท้องจริงหรือไม่นั้น สามารถทำได้โดยการคลำตรวจดูมดลูกและรังไข่ผ่านทางทวารหนักตั้งแต่แม่โคตั้งท้องได้ 2 ถึง 3 เดือนขึ้นไป โดยต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์เป็นผู้ตรวจให้เท่านั้นจึงจะมีความถูกต้องแม่นยำสูง ดังนั้นการหาระยะเวลาการเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ และการตรวจสอบการตั้งท้องจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรกรรมเลี้ยงโคนมเป็นอย่างมากซึ่งปัจจุบัน สามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (Progesterone) ในกระแสเลือดหรือน้ำนม โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด และหลังวันที่ 17 จะลดลงเรื่อยๆ จนต่ำสุดเมื่อถึงวงรอบการเป็นสัดใหม่ ซึ่งระดับโพรเจสเทอโรนในช่วงนี้จะให้ค่าต่ำสุด ทำให้สามารถกำหนดเวลาในการผสมเทียมได้ถูกต้องแม่นยำ หากมีการตั้งท้องระดับของโพรเจสเทอโรนยังคงสูงอยู่ใกล้เคียงกับวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัดและจะคงระดับเช่นนี้ตลอดการตั้งท้องโดยประมาณวันที่ 20-30 ก่อนคลอดจะเริ่มมีระดับลดลงอย่างช้าๆ และมีระดับต่ำสุดในวันที่คลอด ซึ่งจะให้ผลดีในการวิเคราะห์หาระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมเพื่อตรวจการตั้งท้องและทำนายวันที่แม่โคจะคลอดได้อย่างถูกต้อง โดยวิธีการวัดระดับโพรเจสเทอโรนนั้นทำได้หลายวิธีเช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) แต่วิธีนี้ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูงจึงไม่เหมาะแก่การใช้ในระดับกลุ่มเกษตรกรทั่วไป อีกวิธีหนึ่งได้แก่การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยการใช้ความสามารถของแอนติบอดีที่จับกับโพรเจสเทอโรนได้อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติเป็นหน่วยงานที่พัฒนานำ Radioimmunoassay มาใช้ในการวิเคราะห์ แต่เนื่องจากมีการใช้สารกัมมันตรังสีจึงต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพิเศษเท่านั้น ในปัจจุบันทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวะกรรมพันธุศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับโพรเจสเทอโรนได้อย่างจับเพาะและได้พัฒนาเป็นชุดทดสอบโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธี ELISA จึงได้มีการพัฒนาชุดตรวจด้วยหลักการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แต่เนื่องจากชุดตรวจสอบดังกล่าวสามารถใช้ได้ในระดับห้องปฏิบัติการจึงทำให้การตรวจด้วยวิธีนี้ยังอาจไม่เป็นที่นิยมในการนำไปใช้ในระดับภาคสนาม ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงพัฒนางานวิจัยต่อให้เป็นชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปหรือ Strip test (ลักษณะเดียวกับการแถบทดสอบการตั้งครรภ์ของคน) เพื่อนำไปใช้ตรวจหาระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ในน้ำนมโคในระดับภาคสนามร่วมกับ กรมปศุสัตว์ และเกษตรกรสามารถนำแถบทดสอบดังกล่าวไปใช้งานได้จริงในการหาระยะเวลาการเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ และการตรวจสอบการตั้งท้องได้อย่างแม่นยำ เพื่อให้การผลิตน้ำนมโคเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปสำหรับตรวจระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโค โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น ในห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบและประสิทธภาพของชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบแบบวิธีเอนไซม์ลิงก์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์ ที่พัฒนาขึ้น

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคในระดับภาคสนามได้จริง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 เตรียม สาร และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการทำชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูป

1.3.2 เตรียมชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูป (Strip test) โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ

1.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปต้นแบบ

1.3.4 ทดสอบการใช้งานของแถบทดสอบในการตรวจระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคร่วมกับกรมปศุสัตว์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การผลิตน้ำนมและการสืบพันธ์ของโคนม จะมีประสิทธิภาพได้โดยการเพิ่มอัตราการผสมติด ซึ่งสามารถทำได้โดยการผสมเทียมในช่วงระยะที่แม่โคเป็นสัดดังนั้นการทราบระยะการเป็นสัดและการตรวจยืนยันการตั้งท้องที่ถูกต้องจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อให้แม่โคผลิตน้ำนมได้เกษตรกรจึงจำเป็นต้องทำให้โคนมมีระยะการตั้งท้องถึงคลอดลูก โดยการผลิตน้ำนมจะเริ่มขึ้นตั้งแต่คลอดลูกจนกระทั่งถึงระยะที่ลูกโคไม่ต้องการนม และเมื่อแม่โคคลอดลูกครบ 60 วันเกษตรกรควรทำการตรวจความเป็นสัด และผสมเทียมในระยะที่แม่โคเป็นสัด หลังจากนั้น 21-24 วันให้ตรวจการตั้งท้องเพื่อให้การผลิตน้ำนมเป็นไปอย่างต่อเนื่อง จนกว่าแม่โคจะไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ การตรวจดังกล่าวสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (progesterone)ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการควบคุมทำงานของระบบสืบพันธุ์จัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone)มีชื่อทางเคมี คือ 4-pregnene-3,20-dione เป็นฮอร์โมนที่ผลิตที่คอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum)ของรังไข่ ในช่วงที่แม่โคเป็นสัด (estrous) โพรเจสเทอโรนในกระแสเลือดและน้ำนมจะมีปริมาณต่ำมาก และจะมีปริมาณสูงสุดในช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด ถ้าโคนมไม่ได้รับการผสมพันธุ์หรือผสมพันธุ์ไม่ติดระดับโพรเจสเทอโรนจะลดลงในช่วง 2-3 วัน ก่อนช่วงเป็นสัดต่อไป หากการผสมพันธุ์ติด คอร์ปัสลูเทียม ยังคงทำงานต่อ ทำให้ระดับโพรเจสเทอโรนมีค่าสูงตลอดการตั้งท้อง ดังนั้น การวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจึงเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ เพื่อหาระยะเวลาเป็นสัดของแม่โคได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ทำให้สามารถกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้องเป็นการเพิ่มโอกาสการตั้งท้องของแม่โค และสามารถใช้ตรวจสอบระยะเป็นสัดและการตั้งท้องของโคนมได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจุบันได้นิยมนำเอาการวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะแก่การวัดตัวอย่างจำนวนมากในระดับห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่เพื่อความรวดเร็วในการตรวจสอบผลในระดับภาคสนามจึงทำให้ชุดตรวจสอบดังกล่าวอาจจะยังไม่รวดเร็วและสะดวกพอที่จะนำไปใช้งานได้จริงในระดับภาคสนาม ดังนั้นทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้มีโครงการที่ต่อเนื่องทั้งการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนโดยนำมาพัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบต้นแบบที่ใช้หลักการ ELISA เพื่อหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโคในระดับห้องปฏิบัติการ และทำโครงการต่อเนื่องในการพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปให้เหมาะแก่การใช้งานในระดับภาคสนามของเกษตรกรพร้อมทั้งทดลองใช้งานร่วมกับกรมปศุสัตว์เพื่อสนองความต้องการของงานทางด้านเกษตรกรรมการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรให้สามารถนำแถบทดสอบดังกล่าวไปใช้งานได้จริงต่อไป

1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ในปัจจุบันมีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยอาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunological method) ได้แก่ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay, RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) สำหรับหลักการของ RIA คืออาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี แล้วติดตามปริมาณ โพรเจสเทอโรนจากเครื่องนับปริมาณรังสี เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะ (Specificity) สูง เนื่องจากอาศัยการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี (Capezzuto, 2006) แต่เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัดสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการใช้และการจัดการของเสียปนเปื้อนจากสารกัมมันตภาพรังสี (Yalow และ Berson, 1978) ส่วนหลักการของเทคนิค ELISA นั้นอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนซึ่งมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนสารกัมมันตภาพรังสี โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (Solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับกันของเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น จึงเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว ความจำเพาะสูง และมีความเหนียวแน่นในการจับ (Affinity) เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันมีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการปกติได้ ให้ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย (Nakao และคณะ 1980) หลักการของปฏิกิริยาในเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีหลักๆแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบ Double antibody sandwich assay (DAS) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้กับการตรวจแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่และมี antigenic sites หลายชนิด และแบบ competitive inhibition วิธีนี้นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและมี antigenic sites เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้น หลักการของวิธีนี้คล้ายกับแบบ DAS แต่ที่แตกต่างคือตำแหน่งของ test line จะถูกตรึงด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่มากพอแอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนในตัวอย่างจนหมด และไม่เหลือพอที่จะจับกับแอนติเจนที่ test line ดังนั้นตำแหน่ง test line จะไม่เกิดแถบสีให้เห็นทั้งนี้ผลที่อ่านได้จะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่าง จากผลการตรวจสอบที่นอกจากสามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่า (yes/no) ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว สะดวกต่อการพกพาและการใช้งาน จึงทำให้วิธีการตรวจสอบโดยใช้หลักการโครมาโทกราฟีได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบในงานทางด้านการแพทย์ สัตว์แพทย์ และการเกษตร (Van Weeman and Schuurs, 1971)

การตรวจติดตามฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้ชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปจะใช้หลักการ Competitive lateral flow immunoassay (LFIAs) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ 1. nitrocellulose membrane ที่มีเส้น test line และ control line เกิดจากนำเอา โปรเจสเตอโรนที่ติดกับโปรตีนพาหะและแอนติบอดีที่จำเพาะกับบริเวณ Fc (secondary antibody, 2° Ab) มาตรึงไว้ตามลำดับ 2.บริเวณ conjugate pad นำเอาแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับ colloidal carbon (complex) มาตรึงไว้ แล้วใช้หลักการให้ของเหลวไหลซึมผ่านเยื่อแผ่นดูดซับพาเอาแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับ colloidal carbon วิ่งไปหา โปรเจสเตอโรนที่บริเวณเส้น test line โดยใช้บิเวณ Fab ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะจับและแอนติบอดีส่วนที่เหลือจะนำส่วนบริเวณ Fc ไปจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับบริเวณ Fc เกิดเป็นแถบสีของ colloidal carbon บนบริเวณเส้น test line และ control line ตามลำดับ แถบสีจะแปรผันตามปริมาณปริมาณโปรเจสเตอโรนที่พบในตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก

complex หรือแอนติบอดีที่เหลือจากการจับกันตรงตำแหน่ง test line ที่จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนไปถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (Posthuma-Trumpie และคณะ 2008)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจติดตามโปรเจสเตอโรนในน้ำนมดิบได้

1.6.2 ผลงานวิจัยสามารถเผยแพร่ในวารสารระดับชาติได้ 1 เรื่อง

1.6.3 หน่วยงานที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กรมปศุสัตว์ สามารถนำชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปไปใช้ตรวจติดตามระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคในระดับภาคสนามเพื่อให้การผลิตน้ำนมโคเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1 เตรียมสารต่างๆ ที่จำเป็นในการเตรียมแถบทดสอบ

2.1.1 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA

เนื่องจากโพรเจสเทอโรนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นแฮปเทน (hapten) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและใช้ในการเคลือบจาน 96 หลุมที่ผลิตจากพลาสติกได้ ต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำโพรเจสเทอโรน คาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ (P3cmo) NHS และ EDC ละลายใน DMF เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ใน 0.5 M carbonate buffer pH 9.6 ลงไปทีละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป ไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการหาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ (Bicinchoninic Acid Assay ;BCA assay) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) เริ่มจากเตรียม Working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA เจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (โพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ซึ่งสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเจือจาง 2, 4, และ 8 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

2.1.2 เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนให้บริสุทธิ์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลน 5/G7-F4 ที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนซึ่งผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.1.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจะเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง มีไอโซไทป์เป็น IgG2a ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีน เอ (โปรตีน เอ 1 โมเลกุล สามารถจับกับแอนติบอดีได้ 2 โมเลกุล) จึงเลือกใช้คอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส (protein A sepharose) ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีน เอ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* สามารถเกิดอันตรกิริยากับแอนติบอดีได้โดยมีสัมพรรคภาพสูงที่ค่า pH 8.0 เมื่อค่า pH ต่ำลง อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน เอ กับแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพต่ำลง จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกได้โดยมีวิธีการทำดังนี้

โดยนำโปรตีน เอ เซฟาโรส 0.5 กรัม มาทำให้พองตัว โดยแช่ใน PBS 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.4.1.4 ให้เท่ากับ 8.1 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 แล้วเติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 M citrate buffer, pH 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ pH สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

2.1.4 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

เตรียมได้จากสารประกอบ $HAuCl_4.3H_2O$ โดยหาสัดส่วนและเวลาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย $HAuCl_4.3H_2O$ กับสารละลาย Sodium citrate จนได้สารละลาย Colloidal Gold เปลี่ยนเป็นสี cherry red นำไปสแกนหาค่าดูดกลืนแสดงที่สูงที่สุด (Maximum Wavelength) คัดเลือกอนุภาคที่ต้องการ และดูขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy)

2.1.5 ติดฉลากแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนกับอนุภาคทอง

นำแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน มาเจือจางสองเท่าในน้ำปราศจากไอออนทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ดูดมาปริมาณ 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Colloidal gold ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร ที่เตรียมได้ ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 10% ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปสแกนดูการเปลี่ยนแปลงของสี ตั้งแต่ช่วง 500-600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เลือกความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตรนำแอนติบอดีที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาเชื่อมติดกับอนุภาคทอง ปรับค่า pH ของแอนติบอดีและอนุภาคทอง ด้วย 20 mM sodium borate buffer pH 8.2 และ 0.2 M K_2CO_3 ให้ได้ pH 8.2 ตามลำดับ กันก่อนที่จะทำการเติมแอนติบอดีลงบนสารละลาย Colloidal glod ที่สังเคราะห์ได้ โดยการกวนเบาๆ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 10%BSA ที่ละลายใน 20 mM sodium borate buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสออกละลายตะกอนด้วย 20 mM sodium borate buffer ที่มี 1%BSA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิม ทั้งหมด 3 ครั้ง รอบสุดท้ายละลายตะกอนให้ได้

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปดูภาพการติดของ Au กับแอนติบอดีด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy)

2.1.6 เตรียมส่วนประกอบบนแถบทดสอบ

ทำการคัดเลือกชนิดของเมมเบรนและส่วนประกอบบนแถบทดสอบ เพื่อหาระบบที่เหมาะสมในการไหลของสารละลายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน ไม่เร็วเกินไปจนเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ชัดเจน โดยจากการศึกษาข้อมูลได้คัดเลือกองค์ประกอบที่อยู่บน strip test ได้ดังนี้

- บริเวณ Sample pad ใช้เป็น CF4 ของ Whatman®

- บริเวณ Conjugate pad ใช้เป็น GF33 ของ Whatman®

- บริเวณ Reaction pad ประกอบด้วยส่วนที่เป็นTest line และ Control line ใช้ AE100 ของ Whatman®

- บริเวณ Adsorption pad ใช้เป็น CF7 ของ Whatman®

2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ

นำส่วนประกอบบนแถบทดสอบที่เตรียมในข้อ 2.1.6 ซึ่งแถบทดสอบประกอบด้วย 4 ส่วนหลักๆ คือ 1. Sample pad 2. Conjugate pad 3. Reaction pad (Test line และ Control line) 4. Adsorption pad โดยจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบของสารต่างๆที่บ่งบอกการทำงานของแถบทดสอบ องค์ประกอบของสารต่างๆที่อยู่บนแถบทดสอบประกอบไปด้วย 1. แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทองตรึงอยู่บนบริเวณ Conjugate pad 2. แอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ ตรึงอยู่บนบริเวณ test line 3. Goat anti-mouse อยู่บนบริเวณ control line โดยจะทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้เครื่องขีดเส้น control line และ test line พร้อมทั้งทดสอบความไว้และความชัดเจนในการแสดงผลที่เหมาะสม

2.3 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เตรียม

ทำการทดสอบความไวของการวัด (sensitivity) ปริมาณสารต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (lower limit of detection) ความถูกต้องของการวัดในรูปของค่า %recovery ทดสอบความแม่นยำของการวัดโดยการทดสอบความแปรปรวนในสองรูปแบบ คือ intra variation assay และ inter variation assay โดยการใช้ตัวอย่างที่เป็นสารละลายและตัวอย่างน้ำนมโคที่มีการเติมสารที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปอ่านค่าด้วยอุปกรณ์ในการวัดความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นที่ได้จากการพัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ วิเคราะห์ค่าความถูกต้องแม่นยำเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

2.4 ทดสอบการใช้งานของแถบทดสอบในการตรวจระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโค

สกัดตัวอย่างน้ำนมโคให้เหมาะสมกับการใช้งานกับแถบทดสอบ ทำการทดลองโดยนำน้ำนมโคปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนบนที่เป็นชั้นไขมันมาสกัด โดยนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองแบ่งหลอดละ 10 ไมโครลิตร เติม P4 ที่ละลายอยู่ใน 5% Methanolใน PBST ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 ปริมาตรต่อปริมาตร นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ

(Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส ละลายกลับด้วย 0.5 ไมโครลิตรของ 5% Methanolใน PBST จากนั้นนำไปทดสอบกับแถบทดสอบต้นแบบที่เตรียมได้ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

3. ผลการวิจัย (Results)

3.1 เตรียมสารต่างๆ ที่จำเป็นในการเตรียมแถบทดสอบ

3.1.1 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA

เมื่อทำการเชื่อมโพรเจสเทอโรนกับ BSA นำไปวัดหาปริมาณโปรตีน โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ ด้วยวิธี bicinchoninic acid assay (BCA assay ; PIERCE) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวนหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานพบว่า โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA มีปริมาณโปรตีนเป็น 1.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

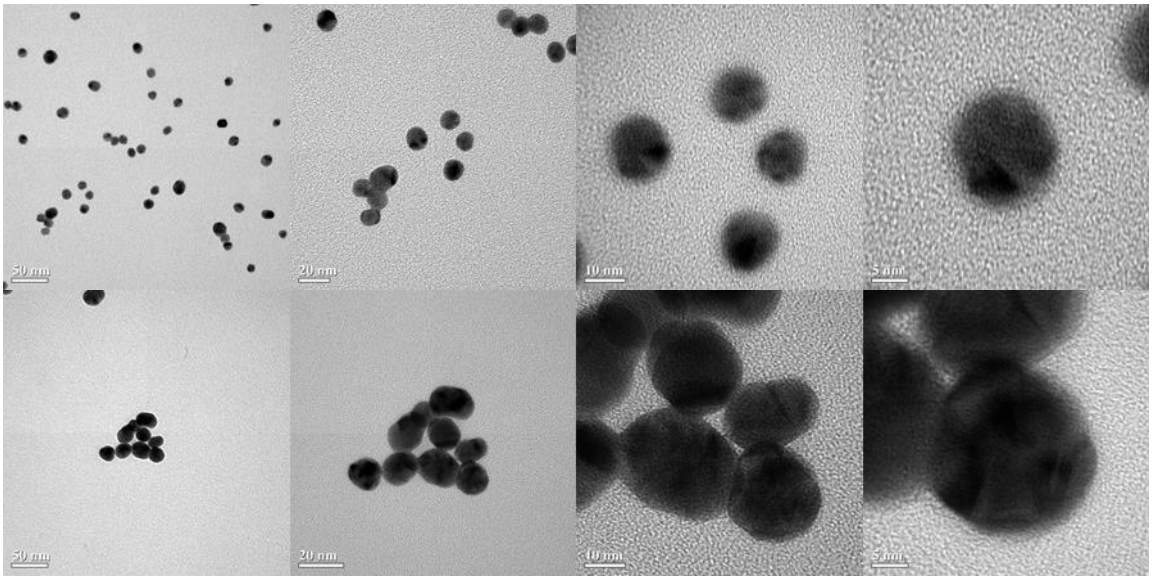
นำไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม (FCS) ร้อยละ 10 เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (spinner flask) ขนาด 1 ลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ได้แอนติบอดีในปริมาณที่เข้มข้น จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์ไฮบริโดมาออก เก็บเอาส่วนอาหารเลี้ยงเพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่าน คอลัมน์ protein A sepharose หลังจากนั้นชะเอาส่วนแอนติบอดีด้วย 0.1 M glycine buffer pH 2.7 เก็บส่วนแอนติบอดีที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี bicinchoninic acid assay (BCA assay) แล้วนำส่วนที่มีปริมาณโปรตีนสูงรวมกันนำไป dialysis ด้วย บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 นำไปวัดปริมาณโปรตีนหลังจากรวมแล้วได้ปริมาณรวมเป็น 45 มิลลิกรัม และหาปริมาณแอนติบอดี (IgG) รวมได้เป็น 29.6 มิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 66 หลังจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี indirect ELISA

3.1.3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

เตรียมได้จากสารประกอบ HAuCl4.3H2O โดยหาสัดส่วนและเวลาที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย HAuCl4.3H2O กับสารละลาย Sodium citrate จนได้สารละลาย Colloidal Gold เปลี่ยนเป็นสี cherry red นำไปสแกนหาค่าดูดกลืนแสดงที่สูงที่สุด (Maximum Wavelength) คัดเลือกอนุภาคที่ต้องการ และดูขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy) ดังรูปที่ 1

(A)

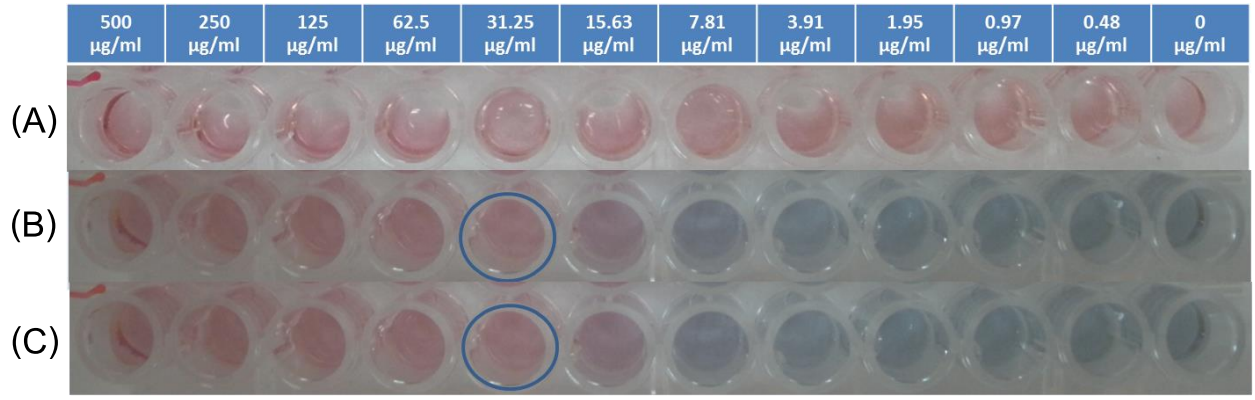
(B)



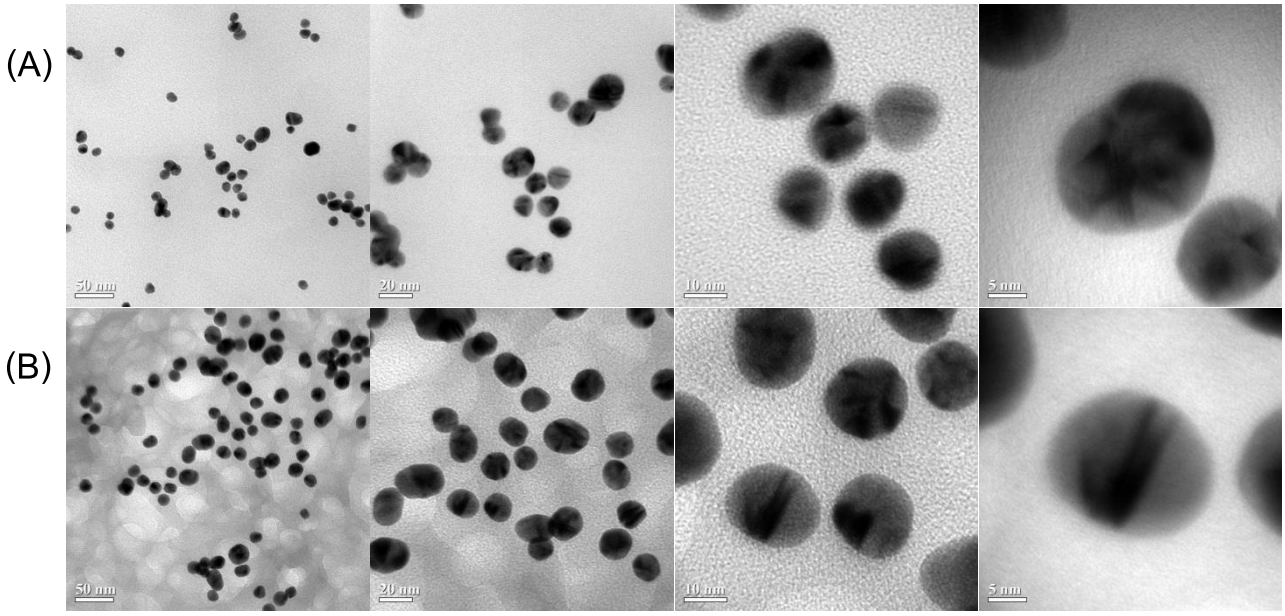
รูปที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคของ Colloidal Gold ที่สังเคราะห์ได้โดยดูด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy)ได้จากการสังเคราะห์อนุภาค Colloidal Gold รูป (A) และ (B) ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร ตามลำดับ แสดงกำลังขยายภาพ 50, 20, 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

3.1.4 ติดฉลากแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนกับอนุภาคทอง

คัดเลือกหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมกับอนุภาคทอง และ ติดฉลากแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนด้วยอนุภาคทอง เพื่อใช้ประกอบบนบริเวณ Conjugate pad นำแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน มาเจือจางสองเท่าในน้ำปราศจากไอออนทั้งหมด 10 ความเข้มข้น ดูดมาปริมาณ 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Colloidal gold ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร ที่เตรียมได้ ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 10% ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สังเกตุสีที่เกิดขึ้น ถ้าสีของสารละลายมีการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าปริมาณแอนติบอดีที่ติดกับอนุภาคทองมีปริมาณน้อยไป ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีเมื่อติดกับอนุภาคทอง จะต้องเลือกความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่ทำให้สารละลายที่ทดสอบเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี นำสารละลายที่ได้ไปสแกนดูการเปลี่ยนแปลงของสี ตั้งแต่ช่วง 500-600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เลือกความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร ได้เป็น 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 2 นำแอนติบอดีที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาเชื่อมติดกับอนุภาคทอง นำไปดูภาพการติดของ Au กับแอนติบอดีด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงสีของสารละลาย Colloidal gold เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในการคัดเลือกหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมกับอนุภาคทอง แถว (A) Control (B) แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มเข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับอนุภาคทองขนาด 10 นาโนเมตร (C) แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มเข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับอนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร



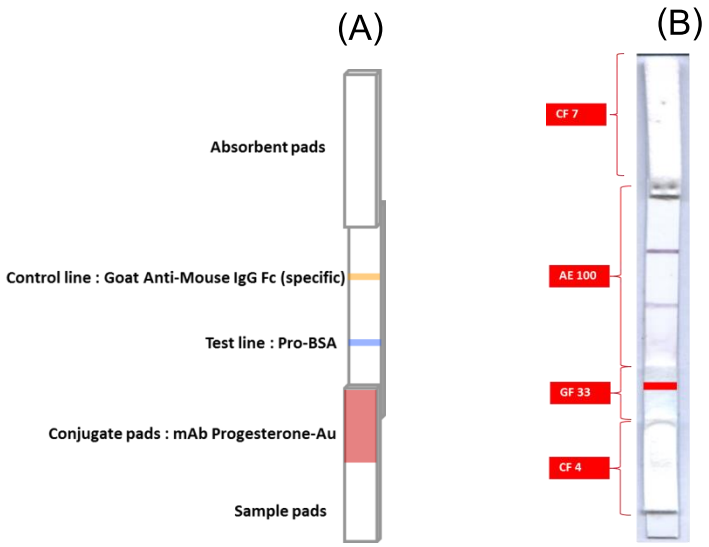
รูปที่ 3 แสดงอนุภาคของ Colloidal Gold โดยดูด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy) รูป (A) แสดงภาพ Colloidal Gold ที่ได้จากการสังเคราะห์มีขนาด 20 นาโนเมตร รูป (B) แสดงภาพแอนติบอดีที่จำเพาะกับโพรเจสเทอโรน ติดฉลากกับ Colloidal Gold ขนาด 20 นาโนเมตร โดยใช้กำลังขยายภาพเป็น 50, 20, 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

3.1.5 เตรียมส่วนประกอบบนแถบทดสอบ

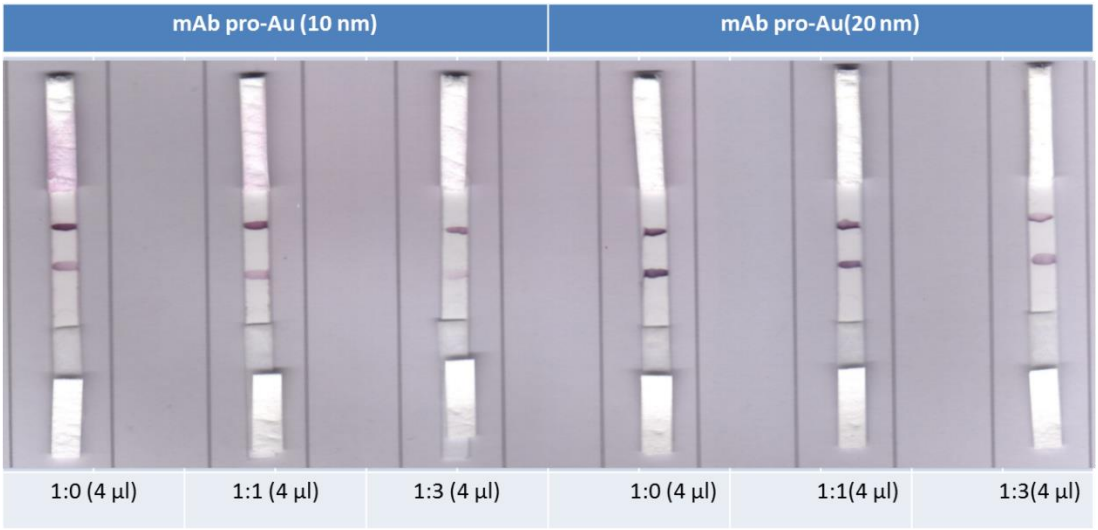
เลือกชนิดของเมมเบรนและส่วนประกอบบนแถบทดสอบ เพื่อหาระบบที่เหมาะสมในการไหลของสารละลายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน ไม่เร็วเกินไปจนเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ชัดเจน โดยจากการศึกษาข้อมูลได้คัดเลือกองค์ประกอบที่อยู่บนแถบทดสอบ (strip test) ได้ดังนี้

1. บริเวณของ Test line และ Control line ใช้ Membrane AE100 ของ Whatman®
2. บริเวณ Conjugate pad ใช้เป็น GF33 ของ Whatman®
3. บริเวณ Sample pad ใช้เป็น CF4 ของ Whatman®
4. บริเวณ Absorbent pad ใช้เป็น CF7 ของ Whatman®

โดยบนแผ่น Membrane AE100 บริเวณ Control line จะตรึงด้วย Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ Test line เคลือบด้วยโพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA ที่เตรียมได้ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ Conjugate pad นำแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมด้วยอนุภาคทองที่เตรียมได้ นำไปเจือจางที่ 1:0, 1:1 และ 1:3 ด้วย 0.01 M PB-T ที่มี 3% Sucrose นำไปเคลือบบน GF33 ปริมาณ 4 ไมโครลิตร นำส่วนประกอบต่างๆ ประกอบกัน ดังรูปที่ 4 เพื่อทดสอบสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณ Control line และ Test line เพื่อเลือกระบบที่เหมาะสม ผลที่ได้ดังรูปที่ 5 พบว่าแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร เลือกที่ติดกับอนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เนื่องจากให้สีของแถบทดสอบบริเวณแถบควบคุมและบริเวณทดสอบชัดเจนและมีปริมาณสีที่เท่ากันเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า



รูปที่ 4 (A) แสดงภาพจำลองส่วนประกอบบนแถบทดสอบต้นแบบ (B) แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่เตรียมได้โดยมีองค์ประกอบตามที่ได้ทำการคัดเลือก



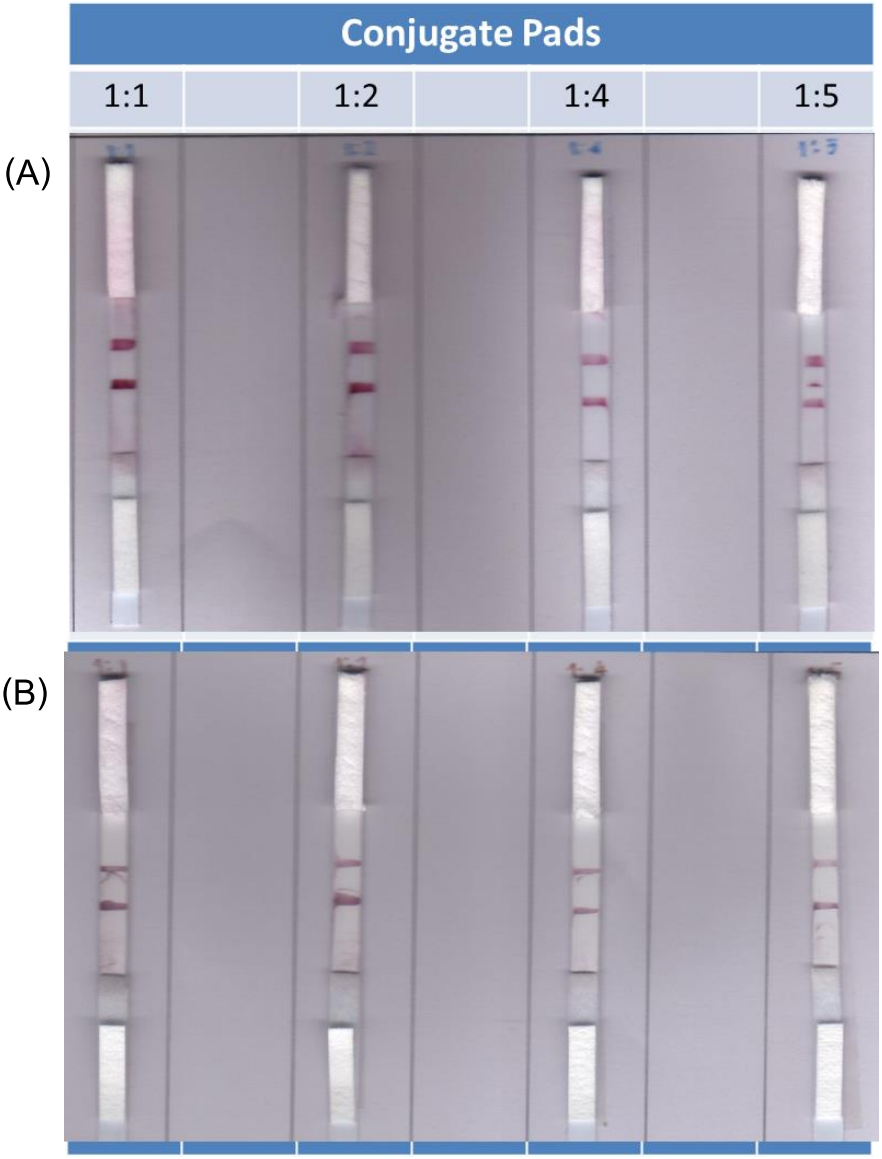
รูปที่ 5 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ทดสอบสีของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมด้วยอนุภาคทองขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร โดยเจือจางที่ 1:0, 1:1 และ 1:3 เพื่อคัดเลือกสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณ Control line และ Test line ที่เหมาะสม

3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ

หาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบของสารต่างๆที่บ่งบอกการทำงานของแถบทดสอบองค์ประกอบของสารต่างๆที่อยู่บนแถบทดสอบได้แก่

3.2.1 แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง อยู่บนบริเวณ Conjugate pad

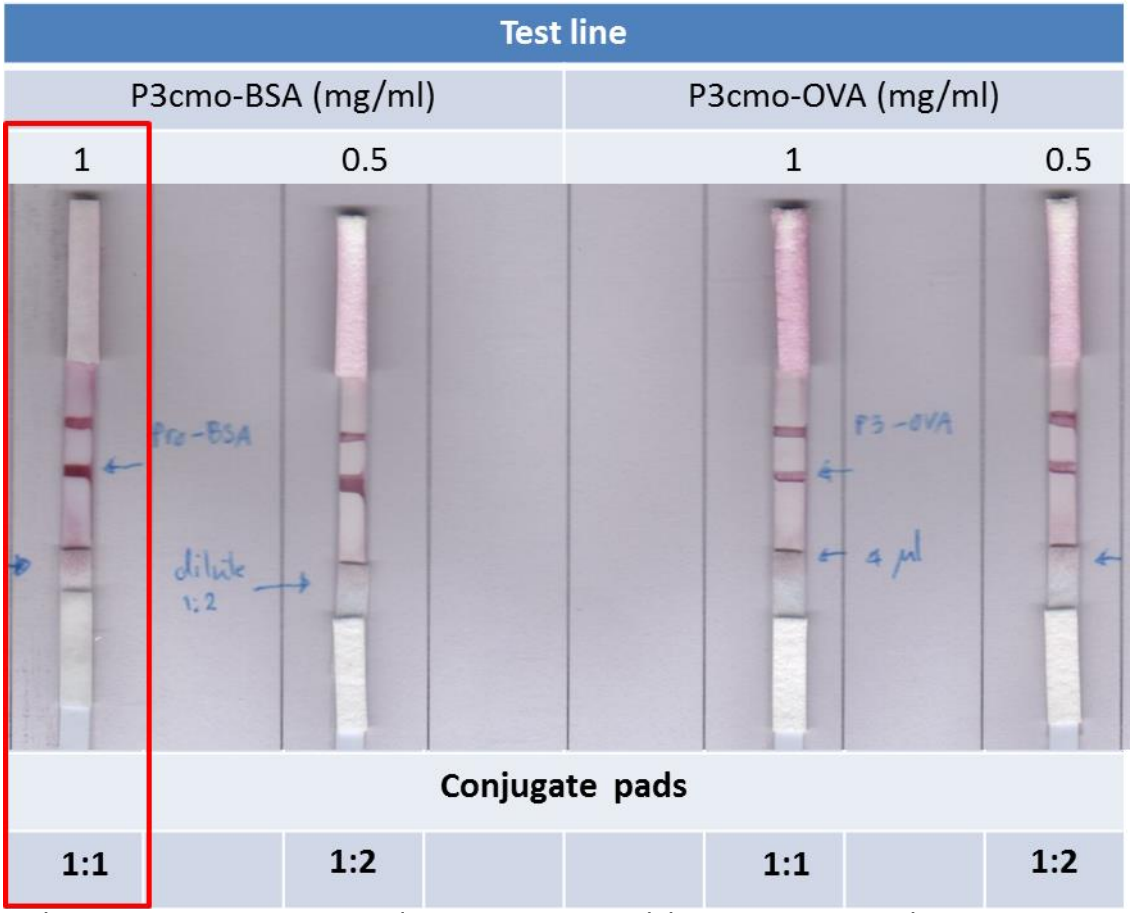
นำแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 20 นาโนเมตร(mAb-P4-Au) มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาลอยู่ร้อยละ 3 ด้วยอัตราส่วน 1:1 1:2 1:4 และ 1:5 ปริมาตร 4 ไมโครลิตรต่อ 1 แถบทดสอบ(10 ไมโครลิตรต่อ 1 เซนติเมตร) และทำการศึกษาผลของขนาดความกว้างของเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ดังรูปที่ 6 โดยรูป (A) และ (B) ตรึง IgG Fc (specific) บนเส้น Control line และ P3cmo-BSA บนเส้น Test line ด้วยกระจกสไลด์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรต่อ 1 แถบทดสอบ (1ไมโครลิตรต่อ 1 เซนติเมตร) และด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อ 1 แถบทดสอบ (0.5 ไมโครลิตรต่อ 1 เซนติเมตร) ตามลำดับ พบว่าแถบทดสอบที่ใช้ mAb-P4-Au อัตราส่วน 1:1 จะให้สีบนเส้นทดสอบและเส้นควบคุมชัดเจนและสีใกล้เคียงกันที่สุด โดยรูป (B) จะมีเส้นที่มีความกว้างน้อยกว่าทำให้สามารถดูความแตกต่างได้ดีกว่าถ้านำไปทดสอบกับตัวอย่างที่มีแอนติเจนในปริมาณน้อยๆแต่เนื่องจากวัสดุที่ใช้ปั๊มแอนติเจนและแอนติบอดีตรึงลงบนเมมเบรนเป็นแผ่นปิดกระจกสไลด์ซึ่งมีขนาดบางมากทำให้อุปกรณ์ดังกล่าวจึงยังไม่สะดวกที่จะใช้งานต่อ



รูปที่ 6 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ทดสอบสีของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมด้วยอนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร โดยเจือจางที่ 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:5 โดยปั๊มแถบเส้น Control line และ Test line ด้วยกระจกสไลด์ และแผ่นปิดกระจกสไลด์ดังรูปภาพ (A) และ (B) ตามลำดับ เพื่อคัดเลือกขนาดของแถบสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณ Control line และ Test line ที่เหมาะสม

3.2.2 แอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะตรึง อยู่บนบริเวณ test line

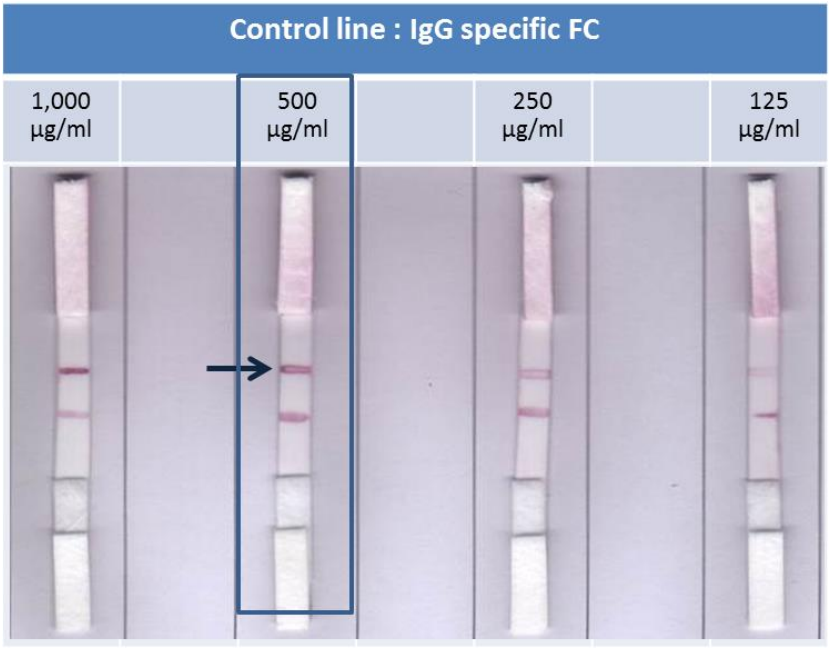
เมื่อตรึงแอนติเจน P3cmo-BSA หรือ P3cmo-OVA บน test line ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราการเจือจางของ mAb-P4-Au บนบริเวณ Conjugate pad เป็น 1:1 และ 1:2 เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่ตรึงบน test line และอัตราการเจือจาง mAb-P4-Au ที่เหมาะสมได้แถบสีดังรูปที่ 7 พบว่าแอนติเจนที่เหมาะสมคือ P3cmo-BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย mAb-P4-Au เจือจางที่ 1:1 จะได้แถบสีที่ชัดเจนทั้งบริเวณ Test line และ Control line โดยสีทั้งสองเส้นจะมีความเข้มที่ใกล้เคียงกันเมื่อสังเกตด้วยตา



รูปที่ 7 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ศึกษาปริมาณแอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะที่ตรึงอยู่บนบริเวณ test line และการเจือจาง

3.2.3 หาปริมาณของ Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) ตรึงอยู่บนบริเวณ control line

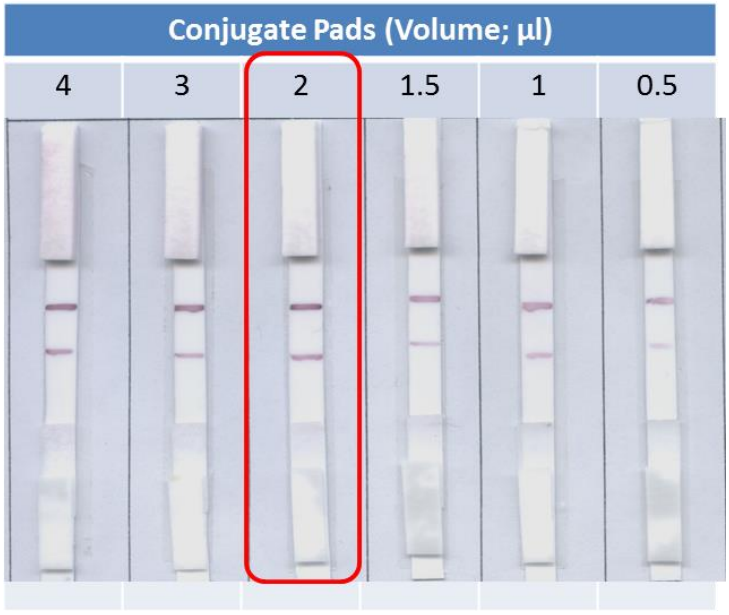
เมื่อทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะบริเวณปลาย FC ของแอนติบอดี (Goat Anti-Mouse IgG Fc specific) โดยตรึงบนแถบ Control line ที่ความเข้มข้นต่างๆได้แก่ 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบริเวณ Test line ตรึงแอนติเจน P3cmo-BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร ต่อแถบทดสอบ และบริเวณ Conjugate pad ใช้ mAb-P4-Au เจือจาง 1:1 พบว่าเมื่อเติมบัฟเฟอร์ PB-T 150 ไมโครลิตร ลงไปบริเวณ Sample pad แถบสีของ Control line และ Test line จะมีสีชัดเจนและใกล้เคียงกันเมื่อสังเกตด้วยสายตาเมื่อใช้ Goat anti-mouse แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่แปรปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดี IgG specific FC ที่ตรึงบนเส้น Control line

3.2.4 การหาปริมาตรของ mAb-P4-Au ที่เติมลงบนบริเวณ Conjugate pad

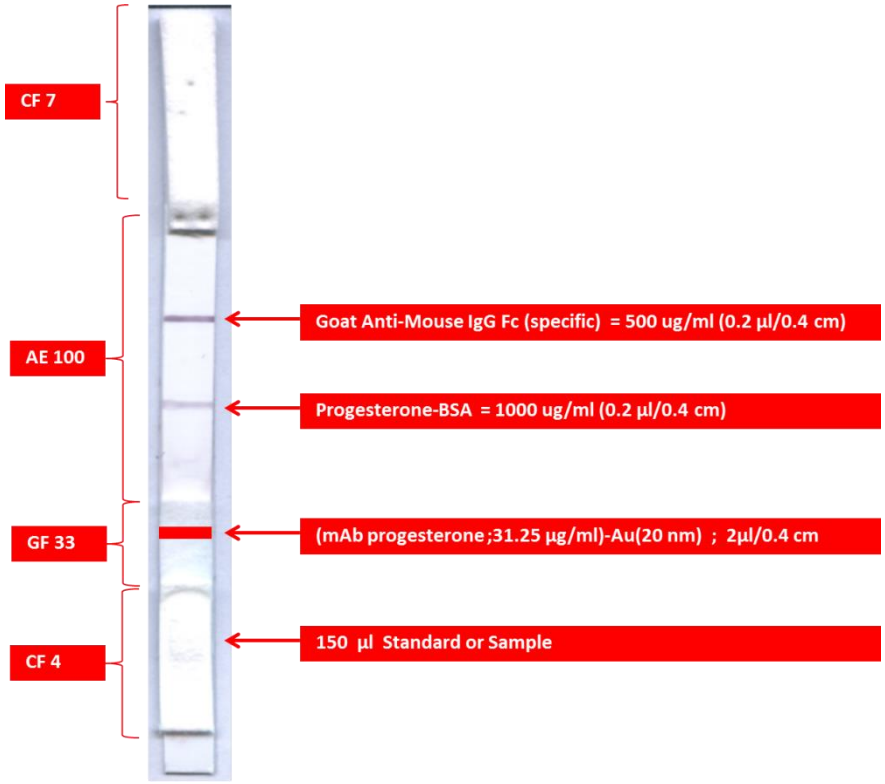
นำสภาวะที่ได้จากข้อ 3.2.1-3.2.3 มาหาปริมาตรของ mAb-P4-Au โดยไม่เจือจาง แปรปริมาตรที่ใช้เป็น 4, 3, 2, 1.5, 1 และ 0.5 ไมโครลิตร ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 9 พบว่าเมื่อใช้ mAb-P4-Au ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ก็ให้แถบสีที่จัดเจนและสม่ำเสมอกันใกล้เคียงกับใช้ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงเลือกที่ปริมาตร 2 ไมโครลิตร



รูปที่ 9 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ศึกษาปริมาตรของ mAb-P4-Au ที่เติมลงบนบริเวณ Conjugate pad

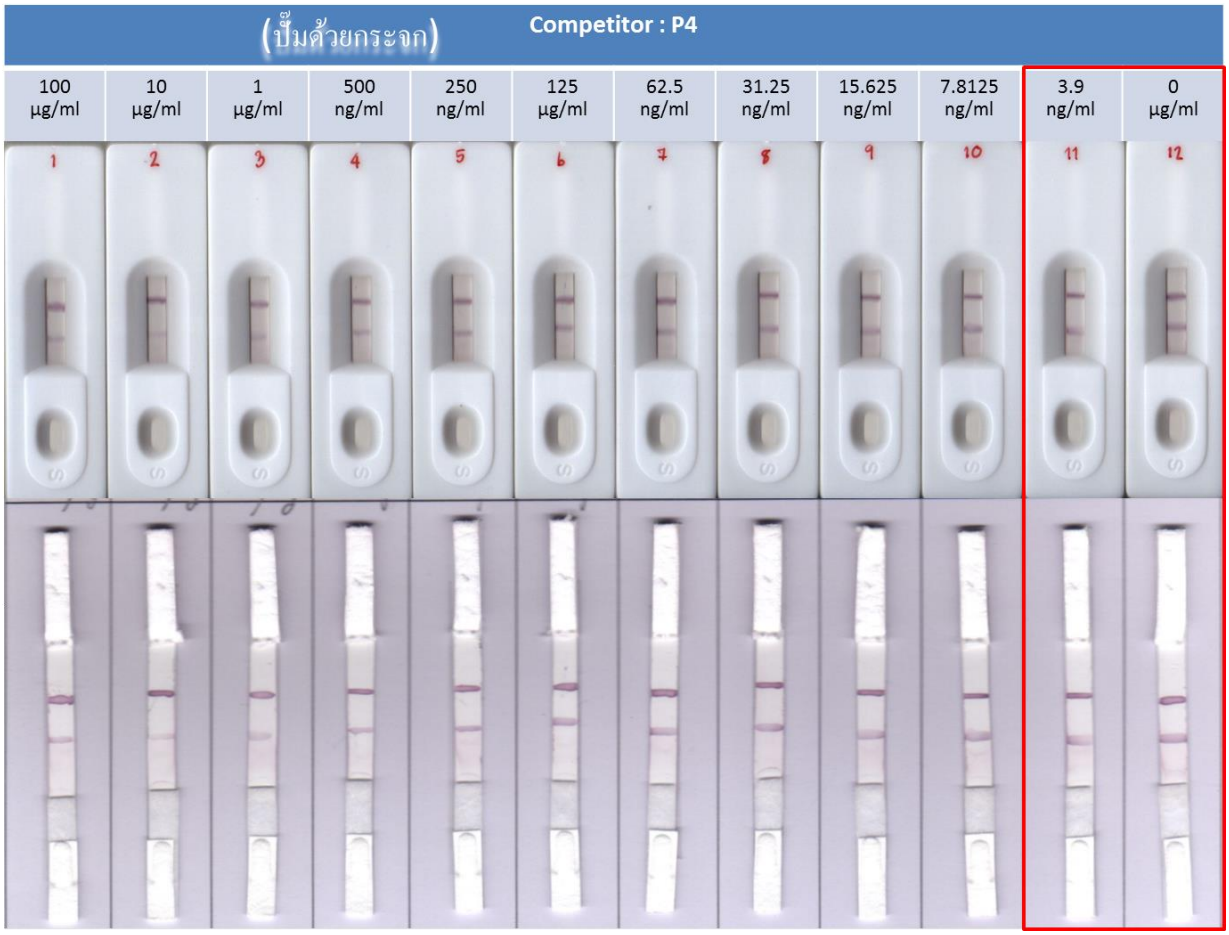
3.2.5 ทดสอบอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบที่เหมาะสม

นำสภาวะที่เลือกได้คือ บริเวณที่เกิดสีของแถบทดสอบใช้ Membrane AE100 บริเวณ Control line จะตรึงด้วย Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณ Test line ตรึงด้วยโพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA ที่เตรียมได้ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อแถบทดสอบ(0.5 ไมโครลิตรต่อ1 เซนติเมตร) บริเวณ Conjugate pad นำแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เชื่อมด้วยอนุภาคทอง ขนาด 20 นาโนโมตร (mAb-P4-Au)นำไปเคลือบบน GF33 ปริมาณ 2 ไมโครลิตร นำส่วนประกอบต่างๆประกอบกันดังรูปที่ 10 เพื่อทดสอบอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับขีดเส้น Control line และ Test line เพื่อตรึง แอนติบอดีและแอนติเจน ได้อย่างเหมาะสมให้เส้นชัดเจนและดูด้วยตาเปล่าได้ง่าย โดยอุปกรณ์ที่ใช้ตรึงได้แก่ กระจกสไลด์ ปากกาหมึกซึม และเครื่อง Dispense workstation รุ้น BD-XYZ3000 ยี่ห้อBiodot



รูปที่ 10 แสดงส่วนประกอบ ปริมาณแอนตอเจนและแอนติบอดี ที่ตรึงบนแถบทดสอบ และปริมาตรของแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบต้นแบบสำหรับตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนม

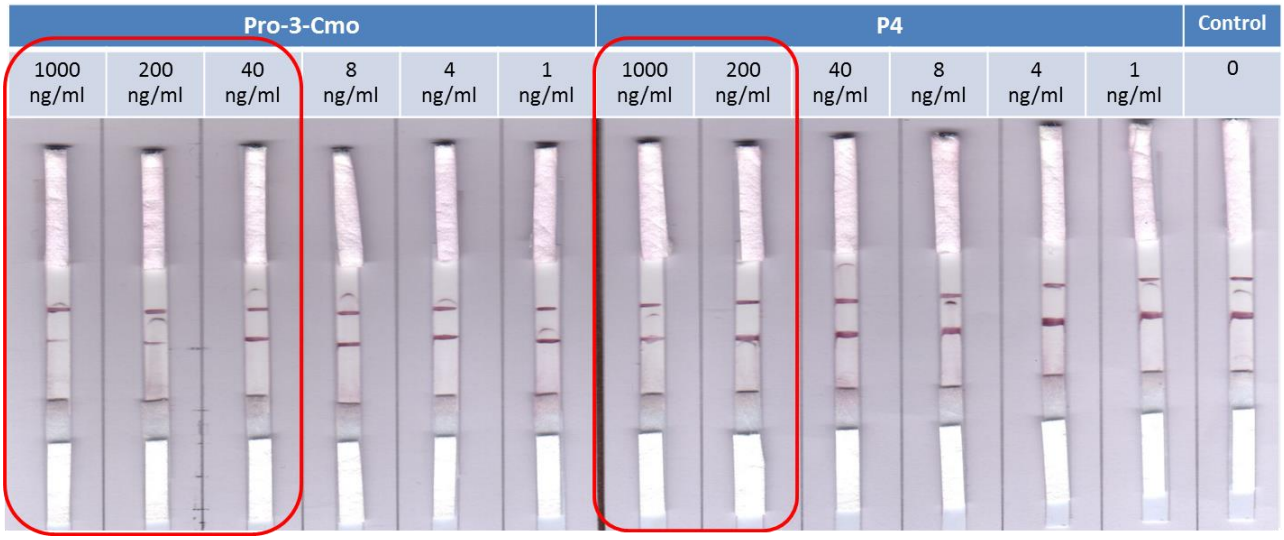
เมื่อใช้กระจกสไลด์เป็นอุปกรณ์สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีโพรเจสเทอโรน P4 ความเข้มข้น $1x10^5$, $1x10^4$, $1x10^3$, $5x10^2$, $2.5 x10^2$, $1.25 x10^2$, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าบริเวณ Test line สีของแถบจางลงที่ความเข้มข้น 3.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับที่ไม่เติม P4 (Control) ดังรูปที่ 11 แต่เนื่องจากแถบสีมีขนาดใหญ่และปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ที่ต้องการตรวจสอบมีปริมาณน้อยจึงทำให้เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะมีแตกต่างกันอย่างไม่ชัดเจน



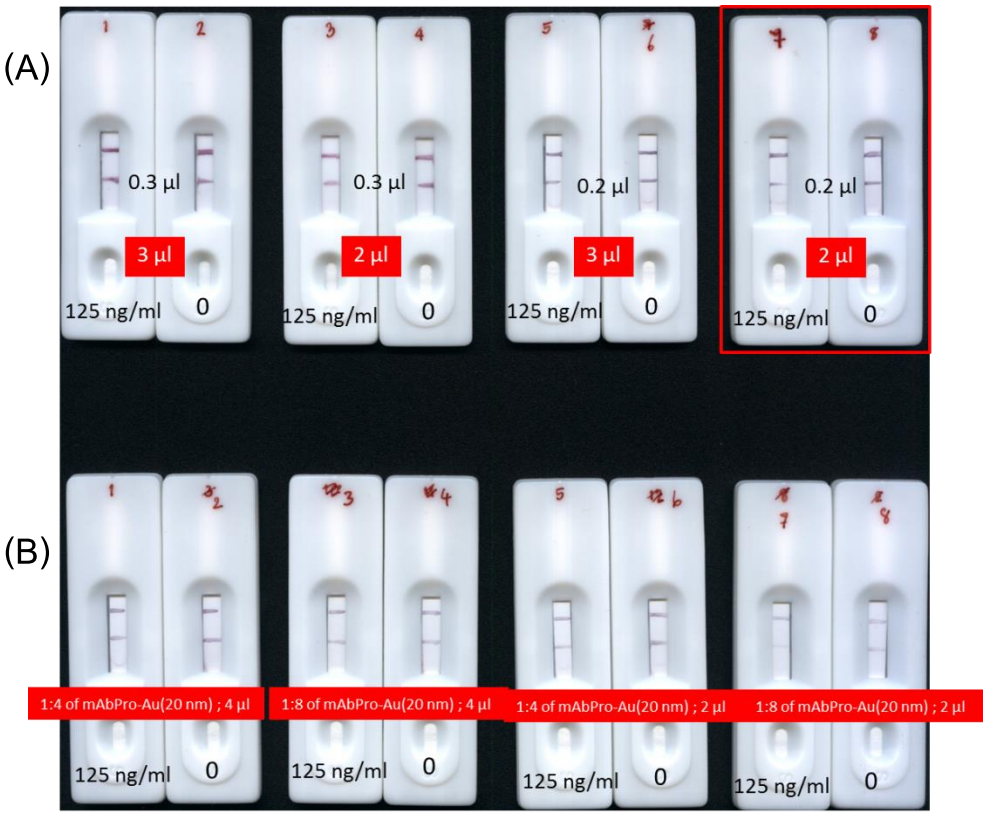
รูปที่ 11 แสดงแถบสีของแถบทดสอบเมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติม โพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นกระจกสไลด์

เมื่อใช้ปากกาหมึกซึมเป็นอุปกรณ์สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ โดยทดสอบกับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน P3cmo และ P4 ที่ความเข้มข้น $1x10^3$, $2x10^2$, 40, 8, 4 และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าช่วงที่เห็นความแตกต่างของเส้น Test line เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน P3cmo และ P4 เป็น 40-1000 และ 200-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 12 ซึ่งสำหรับ สารมาตรฐาน P4 ยังเป็นช่วงที่สูงอยู่ เมื่อเทียบกับแถบทดสอบที่ใช้กระจกสไลด์เป็นอุปกรณ์ช่วยตรึง อาจเนื่องมาจากปากกาหมึกซึมที่ใช้ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีลงบนแถบทดสอบนั้นไม่สามารถควบคุมปริมาณได้จึงทำให้ปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ตรึงบนแถบทดสอบมีปริมาณมากเกินกว่า 0.2 ไมโครลิตรต่อแถบทดสอบ ทำให้แถบสีที่ได้เข้มกว่าแถบทดสอบที่ใช้กระจกสไลด์ช่วยตรึงเมื่อทดสอบกับสารอิสระความเข้มข้นที่เท่ากัน ดังนั้นจึงได้ปรับปริมาตรและความเข้มข้นของ mAb-P4-Au ให้น้อยลงแล้วนำไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน P4 ที่ความเข้มข้น 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเทียบ กับสารละลายที่ไม่เติมสารอิสระโพรเจสเทอโรน จากรูปที่ 13 จะพบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับแถบทดสอบที่ใช้วัสดุช่วยตรึงเป็นกระจกสไลด์ รูป 13 (A) ซึ่งจะทราบปริมาตรของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ตรึงอยู่บนแถบคือ 0.3 และ 0.2 ไมโครลิตรต่อแถบทดสอบ โดยใช้ mAb-P4-Au ที่ไม่เจือจางปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะให้แถบสีบริเวณ Test line จางลงเมื่อเติมสารละลาย P4 ที่ความเข้มข้น 125 นาโนกรัมต่อ

มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับรูป 13 (B) ซึ่งใช้วัสดุช่วยตรึงเป็นปากกาหมึกซึม ต้องทำการเจือจาง mAb-P4-Au เป็น 1:8 จึงจะทำให้แถบสีบริเวณ Test line จางหายไปเมื่อเทียบกับแถบทดสอบที่ไม่ได้เติมสารละลายในรูปอิสระ



รูปที่ 12 แสดงแถบสีของแถบทดสอบเมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติม โพรเจสเทอโรน P3cmo และ P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปากกาหมึกซึม

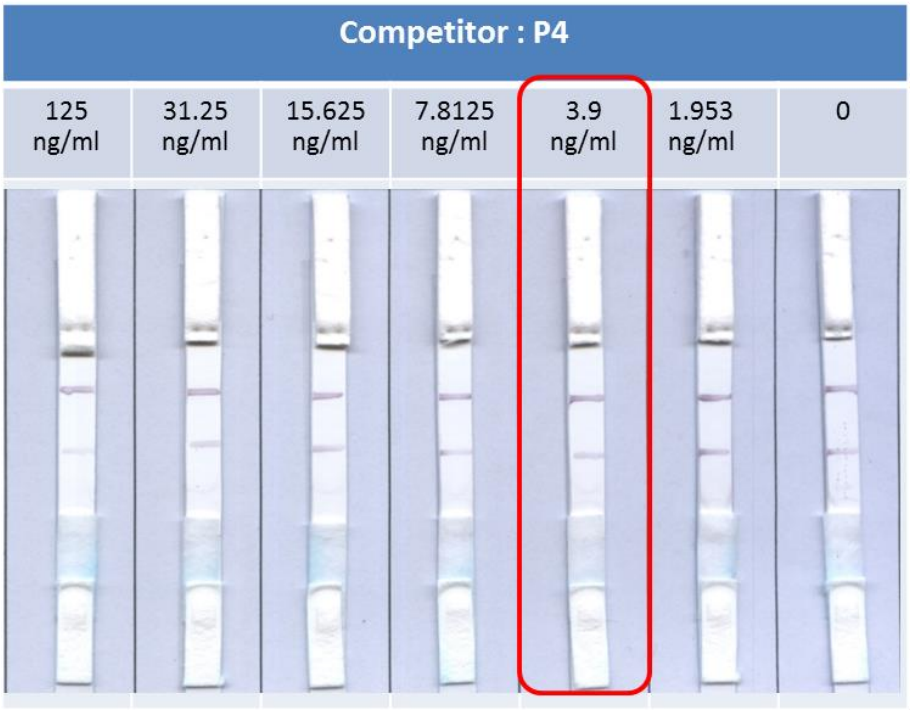


รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดแถบสีเมื่อทดสอบกับสารละลายที่มีโพรเจสเทอโรน P4อิสระกับไม่มี เทียบ ระหว่าง รูป (A) แถบทดสอบที่ใช้กระจกสไลด์และรูป (B) ใช้ปากกาหมึกซึมเป็นวัสดุช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ

เมื่อใช้อุปกรณ์ที่ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นเครื่อง Dispense workstation รุ้น BD-XYZ3000 ยี่ห้อBiodot ดังรูปที่ 14 (A) โดยพบว่าเมื่อนำแถบทดสอบที่ได้ไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน โพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้น 125, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9 และ 1.953 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้คือสีของเส้นทดสอบจะเริ่มจางลงเมื่อทดสอบกับสารละลายที่มี P4 ปริมาณ 3.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแถบสีจะจางหายไปเกือบหมดที่ ปริมาณ 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

(A)

(B)



รูปที่ 14 (A) แสดงรูปเครื่องมือ Dispense workstation รุ้น BD-XYZ3000 ยี่ห้อBiodot ที่ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ (B) แสดงแถบสีของเส้นทดสอบที่ได้เมื่อทดสอบกับสารละลายโพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

เมื่อทำการพัฒนาแถบทดสอบต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน โดยใช้หลักการ Immunochromatographic Assay test strip (ICA) เป็นรูปแบบ Competitive inhibition โดยเยื่อเลือกผ่านที่ใช้มี 4 ส่วนได้แก่ (1) ส่วนบริเวณ Absorbance pad ซึ่งเป็นส่วนดูดซับตัวอย่างส่วนเกินใช้เป็น CF7 ของ Whatman® (2) ส่วนบริเวณ Reaction pad เป็นส่วนที่เกิดการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีใช้เป็น Membrane AE100 ของ Whatman® ประกอบด้วยบริเวณของ Control line ตรึงด้วย Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) และ Test line ตรึงด้วยโพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อแถบทดสอบหรือ 0.5 ไมโครลิตรต่อความกว้าง 1 เซนติเมตร (3) บริเวณ Conjugate pad ใช้ แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 20 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เคลือบบน GF33 ของ Whatman® จะให้สีที่ชัดเจนไม่หนาแน่นเกินไปและได้แถบสีของเส้นบน Reaction pad ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการศึกษาวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบพบว่า กระจกสไลด์จะทำให้แถบสีที่ได้มีขนาดใหญ่เมื่อนำแถบทดสอบที่เตรียมได้ไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน P4 สีของเส้นทดสอบจะจางลงที่ความเข้มข้น 3.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับตัวควบคุมแต่เนื่องจากแถบสีที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่จึงทำให้เมื่อดูด้วยสายตาจะเห็นความต่างไม่ชัดเจนจึงไม่เหมาะกับการทดสอบกับสารปริมาณน้อยๆ แต่สามารถใช้สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมก่อนนำไปผลิตแถบทดสอบในปริมาณมากด้วยเครื่องมือ Dispense workstation ได้ สำหรับวัสดุที่เป็นปากกาหมึกซึมจะช่วยให้เส้นทดสอบมีขนาดเล็กแต่ไม่สามารถควบคุมปริมาตรของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ตรึงลงบนแถบทดสอบทำให้มีปริมาณเยอะเกินมีผลให้เมื่อทำการทดสอบแบบ Competitive immunoassay แถบทดสอบที่เตรียมได้จึงสามารถตรวจหาโพรเจสเทอโรน P4 ได้ที่ความเข้มข้นสูงเป็น 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมของแถบทดสอบที่ศึกษาได้ไปเตรียมแถบทดสอบในปริมาณมากด้วยเครื่องมือ Dispense workstation พบว่าสีของเส้นทดสอบจะจางลงเมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน P4 ความเข้มข้น 3.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นแถบทดสอบต้นแบบที่เตรียมได้จึงสามารถนำไปทดสอบการใช้งานในการตรวจระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนจากตัวอย่างน้ำนมโคได้ ต่อไป

บรรณานุกรม (Bioliography)

ธารารัชต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บางกอกบล็อก.

นภาธร บานชื่น. 2536. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. ครั้งที่ 2. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปราจีน วีรกุล. 2546. ความรู้โคนม 2003. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โลกปศุสัตว์และสุกร.

วิไลวรรณ ตันจ้อย. 2547. พัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์โพรเจสเตอโรนในน้ำนมโค. กรุงเทพฯ: กองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ.

Comin, A., Renaville, B., Marchini, E., Maiero, S., Cairoli, F., and Prandi, A. 2005. Direct Enzyme Immunoassay of Progesterone in Bovine Milk Whey. American Dairy Science Association. 88 : 4239-4242.

Drofman, I.R. 1975. Syntex research, Standard industrial park, Palo Alto. Steroid hormones. California. 385-395.

Hong, J.Y., and Choi, M., J. 2002. Development of one-step fluorescence polarization immunoassay for progesterone. Biological Pharmaceutical Bulletin. 25(10): 1258-1262.

Hudson, L. and Hay, F. C. 1980. Practical immunology. London: Blackwell Scientific publication.

Johnstone, A. and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge: Cambridge university press.

Mcdonald, L.E. 1975. Veterinary Endocrinology and Reproduction. 2nd edition. Philadelphia: Lea and Febiger. 42: 158-172.

Munro, C., and Stabenfeldt, G. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. Endocrinology. 101: 41–49.

Nakao, T. 1980. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. Acta Endocrinol. 93(2): 223-7.

Posthuma-Trumpie, G.A. 2008. Development of a competitive lateral flow immunoassay for progesterone : influence of coating conjugates and buffer components. Anal Bioanal Chem. 392: 1215-1223.

Romagnolo, D., and Nebe, R.L. 1993. The accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination progesterone test for the validation of estrus and early pregnancy diagnosis in dairy cattle. Theriogenology. 39: 112 -128.

Van Weemen, B.K. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Letters. 15: 232-236

Yalow, R.S, and Berson, S.A. 1978. A probe for the fine structure of biologic systems. Radioimmunoassay. 200: 1236-45.

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ-สกุล นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

Ms. Umaporn Pimpitak

1.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 911

1.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

1.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

1.5 ประวัติการศึกษา

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

1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การพัฒนาชุดตรวจแบบ ELISA การพัฒนาชุดตรวจโดยใช้หลักการ Immunochromatographic strip assay

1.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

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

Wongtangprasert, T., Natakuathung, W., **Pimpitak, U**., Buakeaw, A., Palaga, T., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 15(2) : 165 – 172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

Sangdokmai, A., **Pimpitak, U**., Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011).Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U**., and Buakeaw, A. Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

โครงการวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1) การพัฒนาแถบทดสอบสำหรับตรวจสารฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

(แหล่งทุน–โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติคลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง(Project954-1023)สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

2)โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเสย์” (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 55-56 (ผู้ร่วมโครงการ)

3) โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน” (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 56-57 (หัวหน้าโครงการ)

4) โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซมิคาร์บาไซด์” (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 56-57 (ผู้ร่วมโครงการ)

โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

โครงการ การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโค (80%) (แหล่งทุน – งบประมาณแผ่นดิน) ปี 57-58 (หัวหน้าโครงการ)

2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ-สกุล นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

Mrs.Songchan Puthong

2.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

2.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย ระดับ ชำนาญการพิเศษ

2.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

2.5 ประวัติการศึกษา

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

2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเตรียมและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยังยั้งเซลล์มะเร็ง

2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับโดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

3. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

3.1 ชื่อ-สกุล นายกิตตินันท์ โกมลภิส
Mr. Kittinan Komolpis

3.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

3.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

3.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

3.5 ประวัติการศึกษา

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

3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ตรึงควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549)

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจลาตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2548 และ 2549)

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

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

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

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

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

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

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

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

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

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

3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2.การพัฒนาชุดตรวจสารแคลบูทารอลด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

4. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3

4.1 ชื่อ-สกุล ดร. นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)

Dr. Nanthika Khongchareonporn (Panchan)

4.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 6399 00091 73 5

4.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

4.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

4.5 ประวัติการศึกษา

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

4.6 สาขาวิชาที่มีความชำนาญ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Immunology: Monoclonal Antibody Production, Protein Purification

4.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย – ไม่มี

4.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตตราไซคลินเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยวิธี เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ปีที่ 1)

4.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

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

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

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

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

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

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

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

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

Proceeding

1. Noiprapai K, **Khongchareonporn N** and Rengpipat S. 2011. Production of monoclonal antibodies against Vibrio parahaemolyticus. The 23 Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February 1-2, 2012. Bangkok, Thailand.

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

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

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

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

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

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

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

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

Poster

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

4.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

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

2.การพัฒนาชุดตรวจสอบเตตราไซคลิน โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ (ELISA) แหล่งทุน

งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 การวิจัยลุล่วงไปแล้วประมาณร้อยละ 50

5. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 4

5.1 ชื่อ-สกุล นายอณุมาศ บัวเขียว

Mr. Anumart Buakeaw

5.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3

5.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

5.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

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

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

5.5 ประวัติการศึกษา

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

5.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

5.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

5.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

5.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

5.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

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

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

5.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

.....