

รายงานการวิจัย ปีที่ 1

เรื่อง

การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจติดตามระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค

(Development of Immunochromatographic strip test for progesterone detection in bovine milk)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์	หัวหน้าโครงการ
นางทรงจันทร์ ภูทอง	ผู้ร่วมโครงการ
ผศ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส	ผู้ร่วมโครงการ
อ.ดร.นันทิกา คงเจริญพร	ผู้ร่วมโครงการ
นายอนุมาศ บัวเขียว	ผู้ร่วมโครงการ
ร.ศ.ดร.พลกฤษ์ แสงวณิช	ที่ปรึกษาโครงการ

31 มีนาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุน
ทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2557

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้
คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา โดย นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ นุสสรာ วัฒนกุล
กลุ่มวิจัยการผสมเทียมและความสมบูรณ์พันธุ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้การ
อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโคในการทำโครงการวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม
พันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆ ให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

การผลิตน้ำนมและการสืบพันธุ์ของโคนม จะมีประสิทธิภาพได้โดยการเพิ่มอัตราการผสมติด ซึ่งสามารถทำได้โดยการผสมเทียมในช่วงระยะที่แม่โคเป็นสัด เพื่อให้แม่โคผลิตน้ำนมเป็นไปอย่างต่อเนื่องการตรวจดังกล่าวสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมน โปรเจสเทอโรน (progesterone) เพื่อให้สามารถกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้องและเป็นการเพิ่มโอกาสการตั้งท้องของแม่โคให้ต่อเนื่อง พบว่าปัจจุบันได้นิยมนำเอาการวัดระดับโปรเจสเทอโรนในน้ำนมด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมแก่การวัดตัวอย่างจำนวนมากในระดับห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่เพื่อความรวดเร็วในการตรวจสอบผลในระดับภาคสนาม ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาปริมาณฮอร์โมน โปรเจสเทอโรน ให้เหมาะสมแก่การใช้งานในระดับภาคสนามของเกษตรกรโดยใช้หลักการ Immunochromatographic Assay test strip (ICA) เป็นรูปแบบ Competitive inhibition จากการทดลองพบว่าแถบทดสอบต้นแบบประกอบด้วย 4 ส่วนได้แก่ (1) ส่วนบริเวณ Absorbance pad ซึ่งเป็นส่วนดูดซับตัวอย่าง ส่วนเกินเหลือใช้ CF7 ของ Whatman® (2) ส่วนบริเวณ Reaction pad เป็นส่วนที่เกิดการจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีใช้ Membrane AE100 ของ Whatman® ประกอบด้วยบริเวณของ Control line ตรึงด้วย Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) และ Test line ตรึงด้วยโปรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อแถบทดสอบหรือ 0.5 ไมโครลิตรต่อความกว้าง 1 เซนติเมตร (3) บริเวณ Conjugate pad ใช้ แอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรน 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดกับอนุภาคทอง ขนาด 20 นาโนเมตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เคลือบบน GF33 ของ Whatman® เมื่อทำการศึกษาวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบได้แก่ กระจกสไลด์ ปากกาหมึกซึม และเครื่องมือ Dispense workstation เมื่อนำแถบทดสอบที่เตรียมได้ไปทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน P4 ผลที่ได้คือสีของเส้นทดสอบจะลดลงเมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน P4 ที่ความเข้มข้น 3.9, 125 และ 3.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้เครื่อง Dispense workstation พบว่าแถบสีที่ได้มีความคมชัด เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน P4 ที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถมองเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับตัวควบคุม โดยแถบสีจะแปรผันตามปริมาณ โปรเจสเทอโรน ดังนั้นแถบทดสอบต้นแบบที่เตรียมได้จึงสามารถนำไปทดสอบการใช้งานในการตรวจระดับฮอร์โมน โปรเจสเทอโรน จากตัวอย่างน้ำนมโคได้ ต่อไป

Abstract

Milk production and reproduction of dairy cows are effective by increasing the rate of fertility. This can be done by artificial insemination of cows during estrus cycle. To cows milk is constantly checking can be done by measuring progesterone hormone production and function. In order to determine the correct mating and increases the chance of getting pregnant cows to continue. Found that the current level of progesterone in milk by ELISA, which is an ideal way to measure samples in the laboratory. In this study, we have developed the prototype test strip to detect the hormone progesterone that is suitable for use in the field of farmers using principles for easy and quick to use to determine the amount of progesterone in the field. Immunochromatographic Assay test strip (ICA) is a form Competitive inhibition. The results showed that the test strip prototype consists of four parts: (1) the area which is part Absorbance pad absorbs excess sample selection of CF7 Whatman® (2) the Reaction pad as part of an antigen capture antibody use of Membrane AE100 Whatman® Control line consists of a fixation with Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) and Test line consists of a fixation with P3cmo-BSA concentrations of 0.5 and 1 mg / ml, respectively, using 0.2 µl volume of test strips (0.5 ul per width of 1 cm): (3) the Conjugate pad using antibodies to progesterone 31.25 µg / ml with a particle size of 20 nm gold coating on the GF33 Volume 2 ul of Whatman®. For the study materials and tools to help immobilized antigens and antibodies on the test strips are sliding glass, fountain pen and Dispense workstation when the test strip are prepared to experiment with a standard solution P4. The result, the color of the test strip is reduced when tested with a standard solution at a concentration of P4 3.9,125 and 3.9 nanograms per milliliter, respectively, when using Dispense workstation that has the color contrast, when tested with a standard P4 at low concentrations. Its can clearly see the difference compared with the control. The column was proportional to the amount of progesterone, so the test strip can be prepared prototype test used to detect the hormone progesterone from milk samples further.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ช
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย	5
2.1 เตรียมสารต่างๆ ที่จำเป็นในการเตรียมแถบทดสอบ	5
2.1.1 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโปรเจสเทอโรนกับ BSA	5
2.1.2 เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนให้บริสุทธิ์	5
2.1.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography	6
2.1.4 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)	6
2.1.5 ติดฉลากแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนกับอนุภาคทอง	6
2.1.6 เตรียมส่วนประกอบบนแถบทดสอบ	7
2.2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ	7
2.3 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เตรียม	7
2.4. ทดสอบการใช้งานของแถบทดสอบในการตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในน้ำนมโค	7
3. ผลการวิจัย	9
3.1 เตรียมสารต่างๆ ที่จำเป็นในการเตรียมแถบทดสอบ	9
3.1.1 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโปรเจสเทอโรนกับ BSA	9
3.1.2 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์	9
3.1.3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)	9
3.1.4 ติดฉลากแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนกับอนุภาคทอง	10
3.1.5 เตรียมส่วนประกอบบนแถบทดสอบ	12

สารบัญเรื่อง (Table of Contents) ต่อ

3.2	หาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบ	13
3.2.1	แอนติบอดีที่ติดฉลากอนุภาคทอง อยู่บนบริเวณ Conjugate pad	13
3.2.2	แอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะตรึง อยู่บนบริเวณ test line	14
3.2.3	หาปริมาณของ Goat Anti-Mouse IgG Fc (specific) ตรึงอยู่บนบริเวณ control line	15
3.2.4	การหาปริมาตรของ mAb-P4-Au ที่เติมลงบนบริเวณ Conjugate pad	16
3.2.5	ทดสอบอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบที่เหมาะสม	17
4.	สรุปและอภิปรายการทดลอง	21
	บรรณานุกรม	22
	ภาคผนวก	
	ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย	23

สารบัญภาพ (List of Illustration)

หน้า

<p>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</p>	10
<p>รูปที่ 2 แสดงสีของสารละลาย Colloidal gold เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในการคัดเลือหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมกับอนุภาคทอง แถว (A) Control (B) แอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำปฏิกิริยากับอนุภาคทองขนาด 10 นาโนเมตร (C) แอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่างๆทำปฏิกิริยากับอนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร</p>	11
<p>รูปที่ 3 แสดงอนุภาคของ Colloidal Gold โดยดูด้วยเครื่อง TEM (Transmission electron microscopy) รูป (A) แสดงภาพ Colloidal Gold ที่ได้จากการสังเคราะห์มีขนาด 20 นาโนเมตร รูป (B) แสดงภาพแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรเจสเทอโรน ติดจลากับ Colloidal Gold ขนาด 20 นาโนเมตร โดยใช้กำลังขยายภาพเป็น 50, 20, 10 และ 5 นาโนเมตร ตามลำดับจากซ้ายไปขวา</p>	11
<p>รูปที่ 4 (A)แสดงภาพจำลองส่วนประกอบบนแถบทดสอบต้นแบบ (B) แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่เตรียมได้โดยมีองค์ประกอบตามที่ได้ทำการคัดเลือก</p>	12
<p>รูปที่ 5 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ทดสอบสีของแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนที่เชื่อมด้วยอนุภาคทองขนาด 10 และ 20 นาโนเมตร โดยเจือจางที่ 1:0, 1:1 และ 1:3 เพื่อคัดเลือกสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณ Control line และ Test line ที่เหมาะสม</p>	13
<p>รูปที่ 6 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ทดสอบสีของแอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนที่เชื่อมด้วยอนุภาคทองขนาด 20 นาโนเมตร โดยเจือจางที่ 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:5 โดยป้อนแถบเส้น Control line และ Test line ด้วยกระดาษกลิต์ และแผ่นปิดกระดาษกลิต์ดังรูปภาพ (A) และ (B) ตามลำดับ เพื่อคัดเลือกขนาดของแถบสีที่เกิดขึ้นบนบริเวณ Control line และ Test line ที่เหมาะสม</p>	14
<p>รูปที่ 7 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ศึกษาปริมาณแอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนพาหะที่ตรึงอยู่บนบริเวณ test line และการเจือจาง</p>	15
<p>รูปที่ 8 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่แปรปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดี IgG specific FC ที่ตรึงบนเส้น Control line</p>	16

สารบัญภาพ (List of Illustration) ต่อ

	หน้า
รูปที่ 9 แสดงภาพแถบทดสอบต้นแบบที่ศึกษาปริมาณของ mAb-P4-Au ที่เติมลงบนบริเวณ Conjugate pad	16
รูปที่ 10 แสดงส่วนประกอบ ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ตรึงบนแถบทดสอบ และปริมาณของแอนติบอดีที่ติดคลากกับอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเตรียมแถบทดสอบต้นแบบสำหรับตรวจหาปริมาณโปรเจสเทอโรนในน้ำนม	17
รูปที่ 11 แสดงแถบสีของแถบทดสอบเมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติม โปรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นกระจกสไลด์	18
รูปที่ 12 แสดงแถบสีของแถบทดสอบเมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เติม โปรเจสเทอโรน P3cmo และ P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปากกาหมึกซึม	19
รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดแถบสีเมื่อทดสอบกับสารละลายที่มีโปรเจสเทอโรน P4อิสระกับไม่มี เทียบ ระหว่าง รูป (A) แถบทดสอบที่ใช้กระจกสไลด์และรูป (B) ใช้ปากกาหมึกซึมเป็นวัสดุช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ	19
รูปที่ 14 (A) แสดงรูปเครื่องมือ Dispense workstation รุ่น BD-XYZ3000 ยี่ห้อBiodot ที่ช่วยตรึงแอนติเจนและแอนติบอดีบนแถบทดสอบ (B) แสดงแถบสีของเส้นทดสอบที่ได้เมื่อทดสอบกับสารละลายโปรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	20

ตัวย่อและคำย่อ

Ab	Antibody
Ag	Antigen
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine Serum Albumin
CMO	Carboxy-methyl-oxime
CV	Coefficient of
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradise peroxidase
IC50	half maximal inhibitory concentration
LOD	limiting of detection
M	molar
ml	milliliter
MRLs	maximum residue limits
ng	nanogram
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
OVA	Ovalbumin
P3	P-3-O-Carboxymethyloxime
P4	Pregn-4-ene-3, 20-dione
PBS	phosphate buffer saline
PBSCTT	Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal
PBST	phosphate buffer saline tween
RIA	Radioimmunoassay
RT	Room temperature
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid