บทที่ 3 วิธีการทดลอง/ระเบียบการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนท์

(Fluorescent microscope, Nikon Model Eclipese E600, Japan)

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(Scanning Electron Microscope, Leo Model 145CVP,Germany)

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

(Transmission Electron Microscope, Jeol Model JEM- 1230, USA)

- เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด

(Fourier Transformed Infarad Spectrophotometer,Perkin Elmer Model Spectrum One,USA)

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Hitachi Model U2010, USA)

- เครื่องวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนท์

(Spectrofluorometer, Bruker Model D8 Advance, Germany)

- เครื่องอบสุญญากาศ (Vaccuum evaporater, Jeol Model JEE-4X ,USA)

- เครื่องสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงแบบอ่าง (Ultrasonic bath, Aris model ULT-2000, Thailand)

- เครื่องสั่นด้วยคลื่นความถี่สูงแบบโพรบ

(Ultrasonic probe, Sonics& Materials Model VCX 600,USA)

- ตู้บ่มเชื้อจำเพาะ (Incubator, Jeio Tech Model IB-15G, Korea)

- ตู้อบ(Hot air oven,Jeio Tech Model OF-12F,Korea)

- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter, Hanna model HI22,Thailand)

- ตู้เขี่ยเชื้อ (Biosafety cabinet, Biohazard larminar flow Model 25 Manometer, USA)

- อ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

(Shaking water bath ,Vision sciencetific Model KMC-1205W1,Korea)

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

(Balance, Mettler Toledo Model AB 204- S, Switzerland)

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, Model GF 3000, Japan)

- เครื่องแม่เหล็กกวนสารละลาย (Magnetic stirrer, Diligent Model ST-EC, Thailand)

- เครื่องหมุนเหวี่ยงศูนย์กลาง (Centrifuge, Hitachi Model Rotanta 46 R, Germany)

- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer, Vortex genie-2 Model G-560E, USA)

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- บีกเกอร์ (Beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlemeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- หลอดทดลอง (Tube)
- หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)
- จานเพาะเชื้อ (Petridish)
- ปิเปตแก้ว (Glass pipette)
- แท่งแก้วสำหรับใช้กวยสารละลาย (Dropper)
- ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- สไลด์ (Slide)
- กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
- ขวดบรรจุซีรัมขนาดกลางและขนาดเล็ก (Serum Bottle; size s, m)
- ฝาจุกยางสำหรับปิดขวดบรรจุซีรัม (Rubber Cap)
- ที่ปิดฝาขวดบรรจุซีรัม (Trump)
- เข็มฉีดยาแบบยาว (Long Syringe)
- เข็มฉีดยาแบบสั้น (Short Syringe)
- สายยางซิลิโคลน (Silicone Tube)
- แผ่นกรอง (Membrane: pore size 1.2 um)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- กระดาษฟอล์ย (Foil)
- แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
- คิวเวทแก้ว (Quart cuvette)
- ถาดหลุม 96 หลุม (Microtiter plate)
- กล่องเก็บความชื้น (Moist chamber)
- ไมโครปิเปต (Micropipett) (แบบปรับขนาดได้ 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร)
- Tips สำหรับปริมาตร 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Cyclohexane (Fisher Scientific, UK)
- n-Hexanol (Fluka, Germany)
- Polyoxyethylene octyl phenyl ether (Triton X-100) (Fisher Scientific, UK)
- Tris (2, 2 -bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate (Rubpy dye) (Fluka,Germany)
- Tetraethylorthosilicate (TEOS) (Fluka, Germany)
- Ammonuim hydroxide; NH_3 30% (Carlo Erba, Italy)
- Acetone (Carlo Erba, Italy)
- Acetic acid (1 mM) (BHD, Malaysia)
- Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) (Fluka, USA)
- (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTS) (Fluka, USA)
- N, N-dimetylformamide (Lab Scan, Thailand)
- Succinic anhydride (Fluka, Switzerland)
- 1-ethyl-3-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) (Fluka, Switzerland)
- Z-morpholinoethanesulfonic acid (Mes) (Acros, USA)
- N-hydroxysuccinamide (Fluka, China)
- Glutaraldehyde (Fluka, USA)
- Bovine serum albumin (BSA) (Fluka, Switzerland)
- Phosphate buffer saline (PBS buffer)
-Quenching solution
-Storage buffer
-N_2 gas
- 95 % Ethanol
- Deionize water

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

- Modified Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (mCCDA) (Merck, Germany)
- CCDA selective supplement (SR55E) (Merck, Germany)
- Brucella broth (Merck, Germany)
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar (Merck, Germany)
- Trypticase (Tryptic) Soy Broth (Merck, Germany)
- Hippurate broth (Merck, Germany)
- Peptone 0.1%
- Ninhydrin solution 3.5%
- McFarland Barium Sulfate Standard No. 0.5, 1, 2, 4
- Campylobacter gas pack (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2)

3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์

- *Campylobacter jejuni*

จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.1.6 แอนติบอดี

Mouse anti- *Campylobacter jejuni* (purchase from: Abcam campany)

Type: monoclonal antibody (mAb) **Grade**: Affinity Purified **Isotype**: IgG1 **Clone**: 5E229

Concentration: 0.1 mg/ml **Purity**: Purified by Protein a Affinity Chromatography

Form: Supplied as a liquid in PBS, pH 7.2, 0.1% sodium azide

Immunogen: *C. jejuni*

Specificity: *C. jejuni* via whole cell ELISA. Non-reactive with *H. pylori, E.coli, Salmonella, Shigella, Yersinia, Citrobacter*

Application: Suitable for use in ELISA and Western Blot

Recommended dilution : ELISA Whole cell : 1:20-1:200

: Western Blot : 1:10-1:50

Storage and Stability : Stored at 4°C for short time

: Stored at -20°C for long time

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

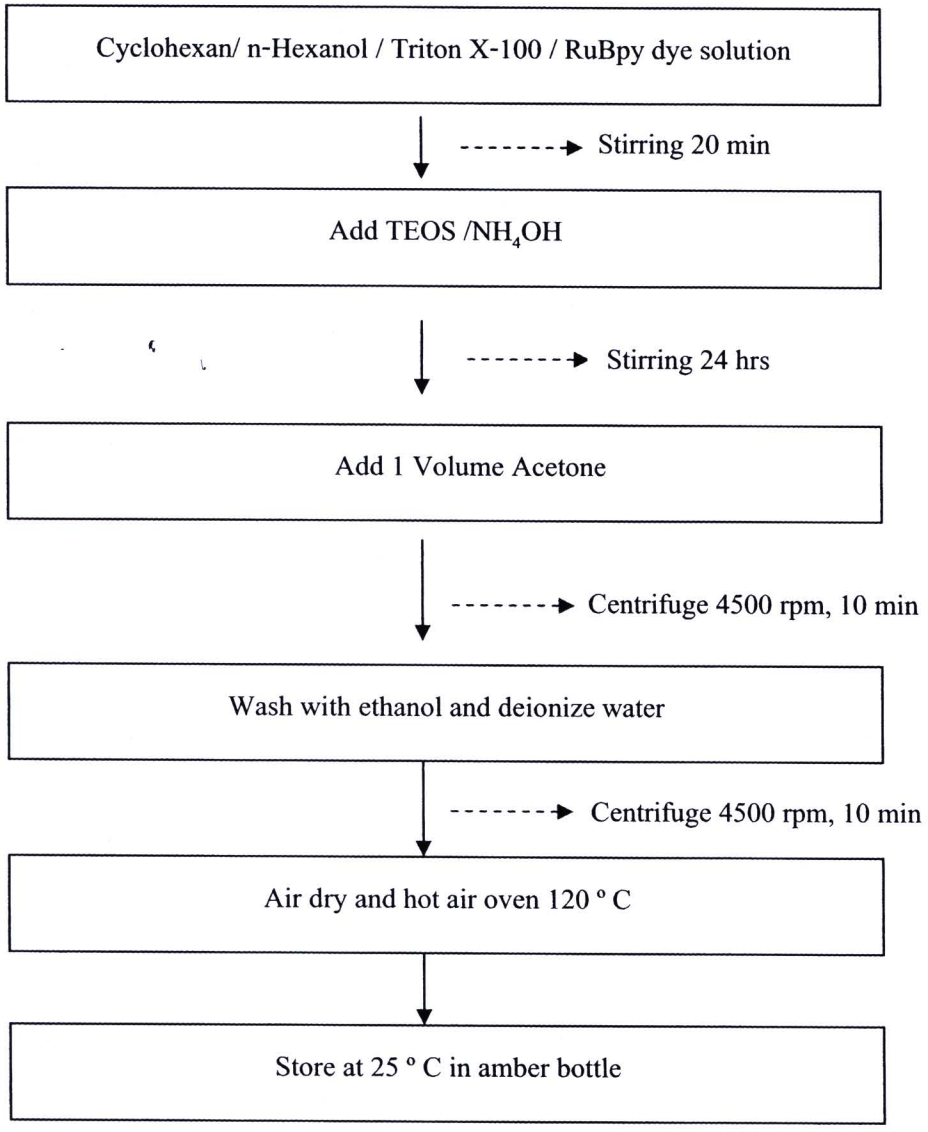
3.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

การสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs ด้วยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันร่วมกับเทคนิคโซลเจล ซึ่งประกอบด้วยสารละลายสีฟลูออเรสเซนท์ (Fluorescent dye solution) ในงานวิจัยนี้ใช้สี Rubpy dye solution เป็นเฟสของน้ำ (Water phase), Cyclohexane เป็นเฟสของน้ำมัน (oil phase), Triton X-100 เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactant), n-hexanol เป็นตัวช่วยสารลดแรงตึงผิว (Co-surfactant), Tetraethylorthosilicate (TEOS) เป็นสารตั้งต้น (procurser) ในการสังเคราะห์ซิลิกา และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของน้ำ (hydrolysis)และปฏิกิริยาการรวมตัวด้วยน้ำ (Condensation)

ในงานวิจัยนี้สังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ร่วมกับเทคนิคโซลเจล โดยดัดแปลงวิธีของ (Santra, 2001; ธัญภัค สุวรรณชาติ, 2551) ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในระบบไมโครอิมัลชันประกอบด้วย cyclohexane, n-Hexanol, Triton X-100 ,20 mM RuBpy dye solution, TEOS และ NH_4OH (NH_3 30 ; wt%) ขั้นตอนการทดลองแสดงในรูปที่ 3.1 ดังนี้

1) นำ Cyclohexane, n-hexanol และ Triton X-100 มาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer หลังจากนั้นค่อยๆเติม 20 mM RuBpy dye solution (เตรียมสารละลายโดยใช้ deionized water) และกวนอย่างสม่ำเสมอโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที
2) เติม TEOS (ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูขนาด 1.2 μm) ในขณะที่มีการกวนอยู่บนเครื่อง Magnetic stirrer อย่างสม่ำเสมอ
3) ค่อยๆ เติม NH_4OH (NH_3; 30wt %) ในขณะที่มีการกวนอยู่บนเครื่อง Magnetic stirrer หลังจากนั้นกวนต่อไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงอย่างสม่ำเสมอ และต้องมีการปิดภาชนะให้มิดชิดเพื่อป้องกันปริมาตรของสารเคมีในระบบไมโครอิมัลชันเปลี่ยนแปลง
4) หลังจากนั้นตกตะกอนอนุภาคโดยใช้ acetone ปริมาตร 1 เท่าของสารเคมีทั้งหมดใน ระบบ
5) นำอนุภาคที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ที่มีความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ° C และล้างอนุภาคด้วย 95 % ethanol 3 ครั้ง, deionize water 2 ครั้ง เพื่อล้างสี และสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินออก ซึ่งการล้างอนุภาคทุกครั้งจะใช้ เครื่อง vortex mixer และเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10-15 นาที ควบคู่ด้วยจนกระทั่งอนุภาคกระจายออกจากกัน
6) ทำให้อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนแห้งในอากาศ และนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 ° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7) นำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้มาบดให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้แท่งแก้ว ใส่ในขวดสีชา หรือขวดที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยด์เก็บที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

3.2.2 การวิเคราะห์อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

หลังจากสังเคราะห์อนุภาค FDS-NPs และผ่านการทำอนุภาคให้แห้งแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ (Charecterization) ดังนี้

3.2.2.1 รูปร่าง และขนาดของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

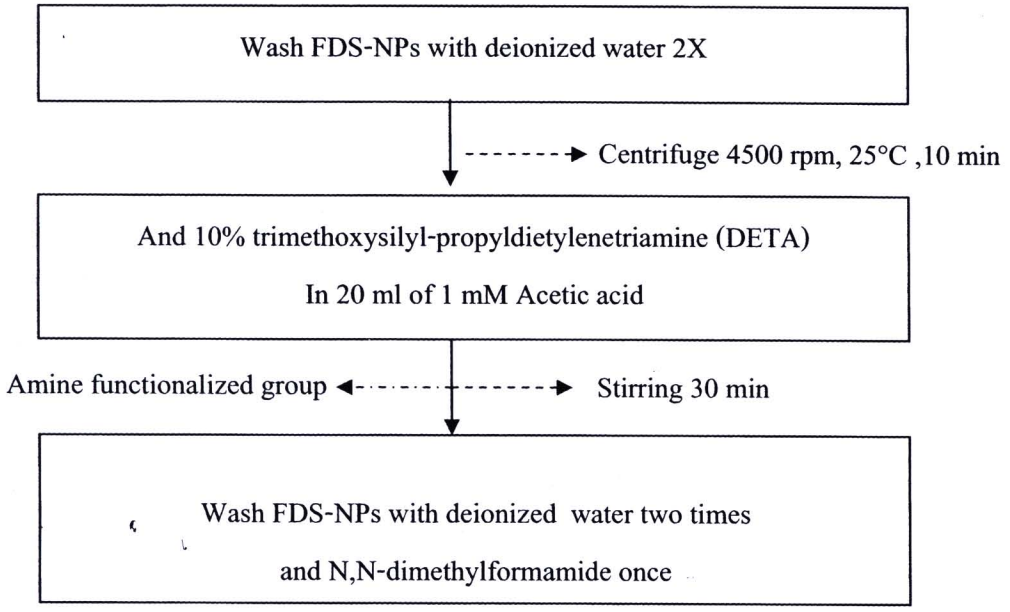
1. นำอนุภาค FDS-NPs ที่สังเคราะห์ได้มาทำให้กระจาย (disperse) ใน 95% เอธานอลโดยใช้เครื่อง ultrasonicator เป็นเวลา 15 นาที (เปิด 7 วินาที ปิด 2 วินาที)
2. นำส่วนใสที่อยู่อย่างเสถียรด้านบนหยดลงบน formvar carbon coated copper grid และปล่อยให้แห้งในอากาศ หลังจากนั้นถ่ายภาพภายใต้กล้อง TEM
3. ตรวจวิเคราะห์รูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค FDS-NPs โดยวัดขนาดของอนุภาคอย่างน้อย 30 อนุภาค จากภาพถ่าย TEM (Jeol Model JEM-1230, USA) เพื่อหาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของขนาดอนุภาค FDS-NPs และสร้างแผนภาพการกระจายตัวของขนาดอนุภาค โดยใช้ Program Origin 7 (USA, 1991-2002)

3.2.3 การดัดแปลงพันธะเคมีเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชัน

ในการทดลองนี้ทำการทดลองดัดแปลงพันธะเคมีเพื่อให้เกิดหมู่ฟังก์ชัน และติดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ด้วยวิธีการใช้รีเอเจนต์ควบคู่ N-hydroxysuccinimide (NHS) และ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)

3.2.3.1 การดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่เอมีน (รูปที่ 3.2)

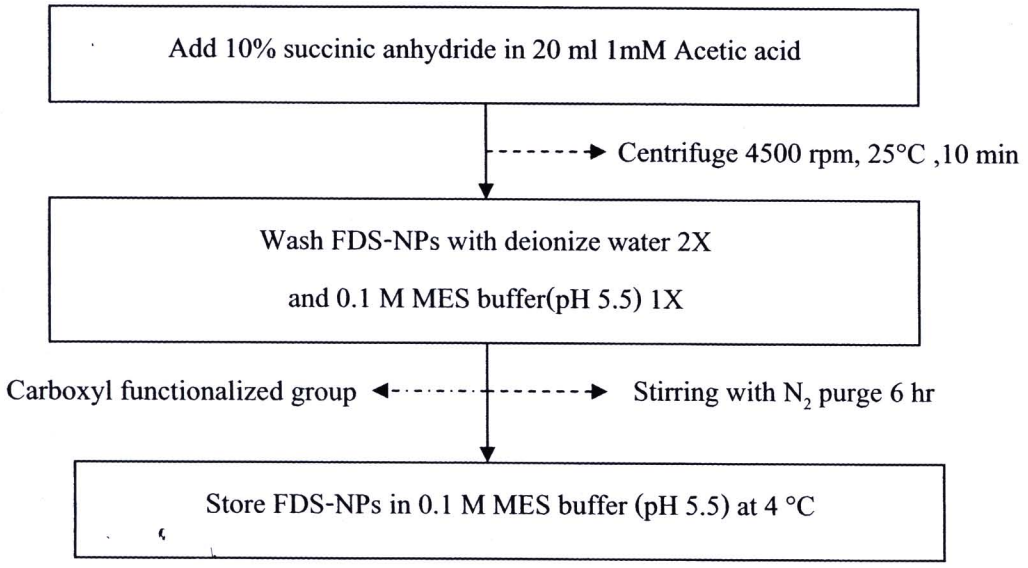
1. นำอนุภาค FDS-NPs 32 mg ล้างด้วย deionized water 2 ครั้ง และ 1 mM acetic acid 1 ครั้ง (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิ 25 °C)
2. หลังจากการล้างอนุภาคแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายทั่วกันโดยใช้ ultrasonic bath ใน 20 ml ของ 1 mM acetic acid ที่มี 10% Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดหมู่เอมีน
3. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ผิวทำให้เกิดหมู่เอมีนแล้ว ด้วย deionized water 2 ครั้งและ N,N-dimethylformamide 1 ครั้ง



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ให้เกิดหมู่เอมีน

3.2.3.2 การดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล (รูปที่ 3.3)

1. หลังจากการล้างอนุภาค ทำให้อนุภาคกระจายทั่วกันใน 20 ml ของ N,N- dimethylformamide ที่มี 10% succinic anhydride และกวนอย่างสม่ำเสมอ ภายใต้แก๊สไนโตรเจน (N_2 purge) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่บริเวณผิวทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแล้ว ด้วย deionized water 2 ครั้ง และ 0.1 M MES buffer (pH 5.5) 1 ครั้ง
3. เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลแล้วใน 0.1 M MES buffer (pH 5.5) ที่อุณหภูมิ 4 °C
4. วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง FTIR ที่อินฟราเรดช่วงกลาง (450-4500 cm^{-1})

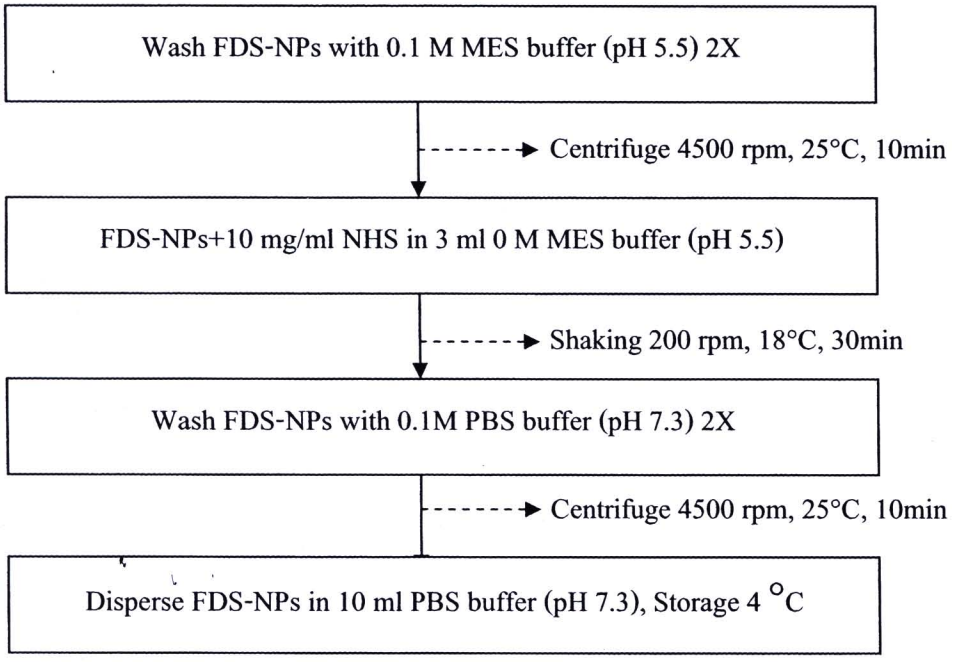


รูปที่ 3.3ขั้นตอนการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาค FDS-NPs ให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล

3.2.4 การติดแอนติบอดี

3.2.4.1 การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล (รูปที่ 3.4)

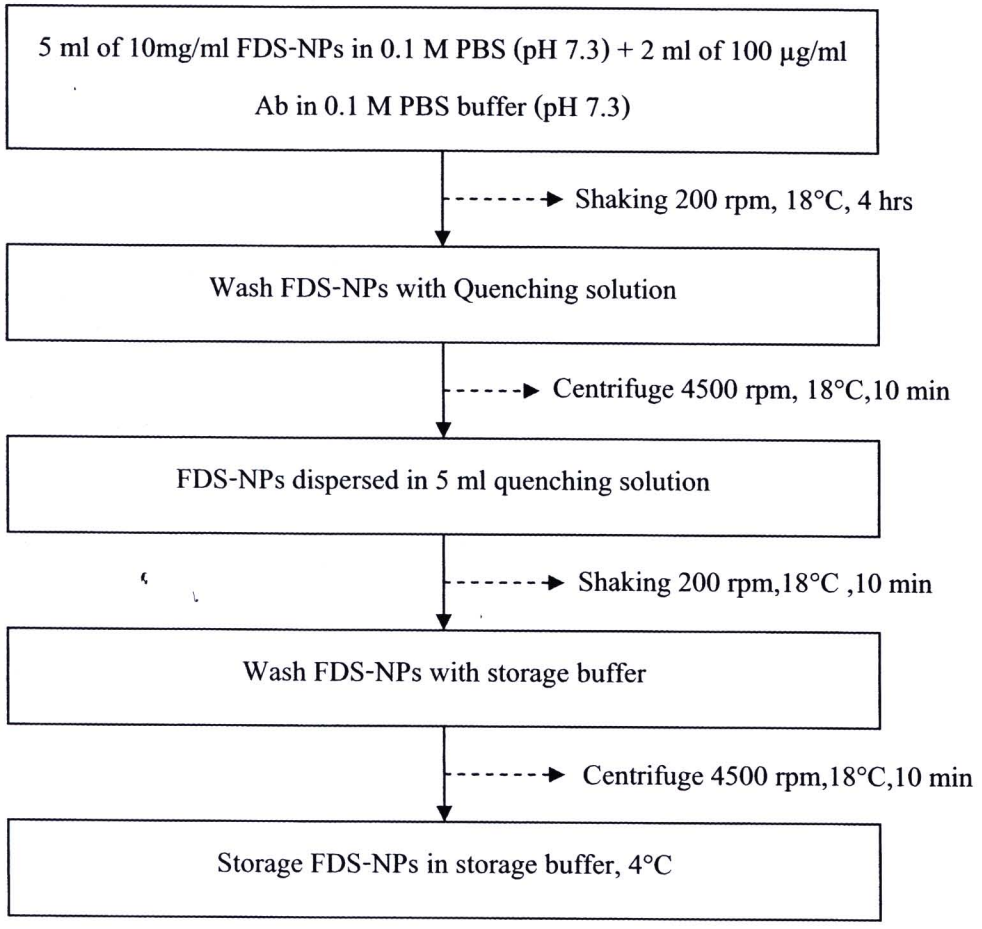
1. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลด้วย 0.1 M MES buffer (pH 5.5) 2 ครั้ง (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C)
2. หลังจากการล้างอนุภาคแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายใน 3 ml 0.1 M MES buffer (pH 5.5) ที่มี 10 mg/ml ของ EDC และ 10 mg/ml ของ N-hydroxysuccinamide (ความเข้มข้นของอนุภาคเท่ากับ 10 mg/ml) และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อเป็นการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล
3. ล้างอนุภาคด้วย 0.1 M PBS buffer 2 ครั้ง (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18 °C)
4. กระจายอนุภาคใน 10 ml 0.1M PBS buffer(pH 7.3) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิล

3.2.4.2 การติดแอนติบอดีบนพื้นผิวอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน (รูปที่ 3.5)

1. เจือจางแอนติบอดีความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 2 ml ลงใน 5 ml ของ 10 mg/ml อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ด้วย Quenching solution 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18°C
3. กระจายอนุภาคใน 5 ml Quenching solution และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ Shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 30 นาที
4. ล้างอนุภาคด้วย Storage buffer 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18 °C
5. เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ใน 3 ml storage buffer (ความเข้มข้นของอนุภาคเท่ากับ 10 mg/ml)



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการติดแอนติบอดีบนผิวอนุภาค FDS-NPs ที่มีหมู่คาร์บอกซิล

3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนที่มีแอนติบอดีจำเพาะติดอยู่

3.2.5.1 การตรวจสอบการจับกัน (Conjugation) กับเชื้อ *Campylobacter jejuni*

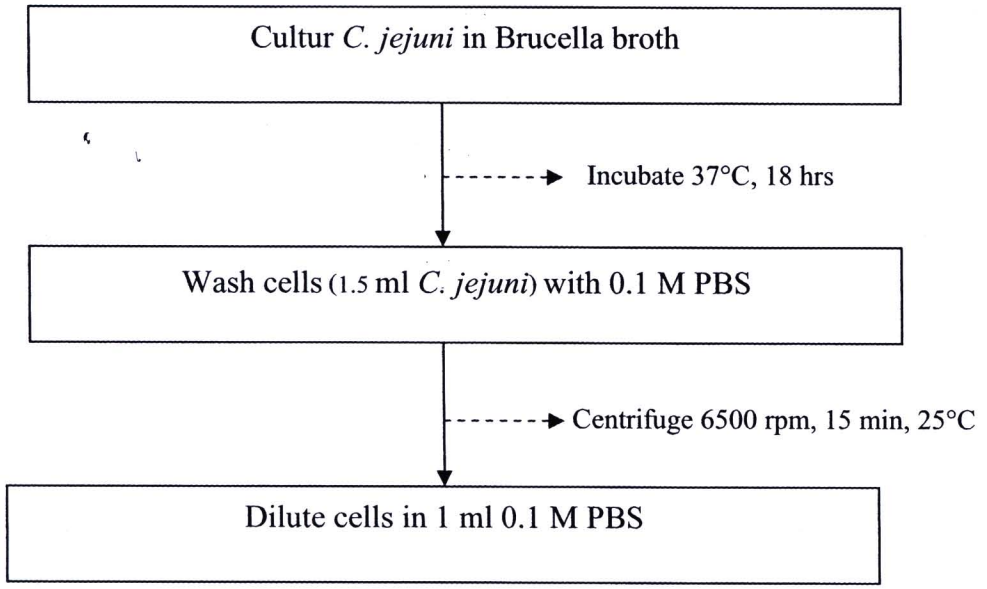
การตรวจสอบการจับกัน (Conjugation) ของอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีจำเพาะติดอยู่กับเชื้อ *C. jejuni* โดยมีขั้นตอนดังนี้ (รูปที่ 3.6และ รูปที่ 3.7)

1. นำเชื้อ *C. jejuni* ที่ผ่านการล้างเซลล์เจือจาง 5 เท่าด้วย 0.1 M PBS
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ด้วย 0.1 M PBS ก่อนนำมาใช้ (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18°C) และเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วย 0.1 M PBS
3. นำเชื้อ *C. jejuni* จากข้อ 1. มาทำปฏิกิริยากับอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่จากข้อ 2 เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

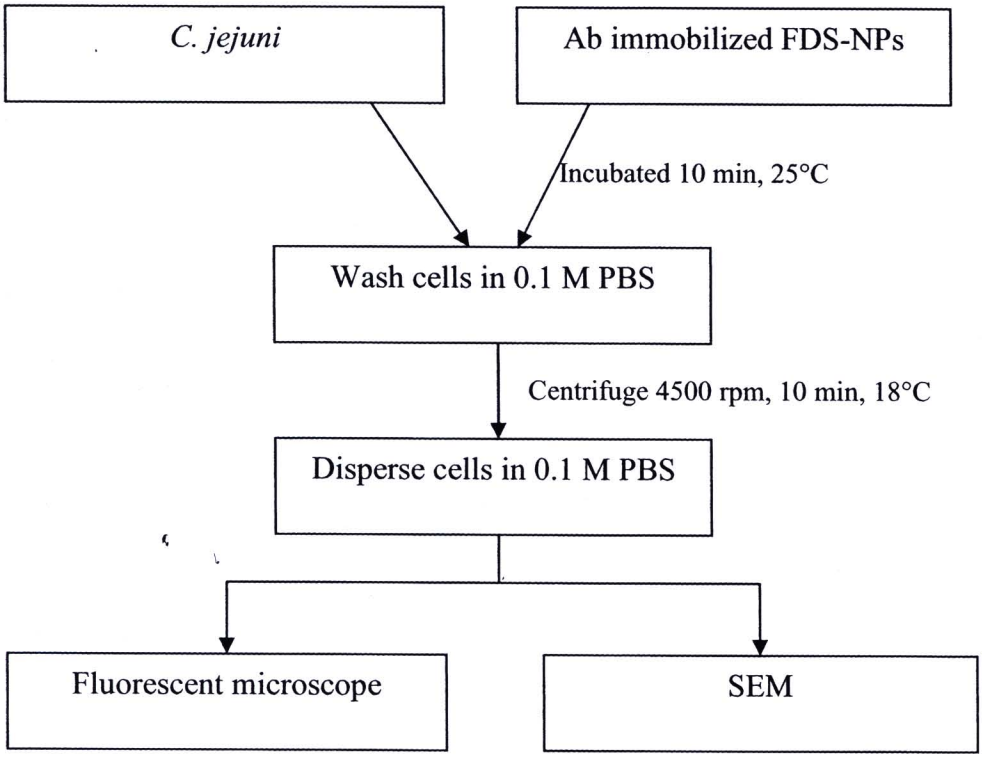
4. ล้างเซลล์ *C. jejuni* ที่มีอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนเกาะอยู่ ด้วย 0.1 M PBS (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง)

5. นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4 . หยดลงบนสไลด์ ตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้กล้อง fluorescent microscope (Nikon Model Eclipse E600,Japan) โดยเลือกช่วง excitation wavelength

6. นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4. ตรวจสอบการเกาะของอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนที่ผิวของเชื้อ *C. jejuni* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Leo Model 145 CVP, Germany)



รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *C. jejuni*

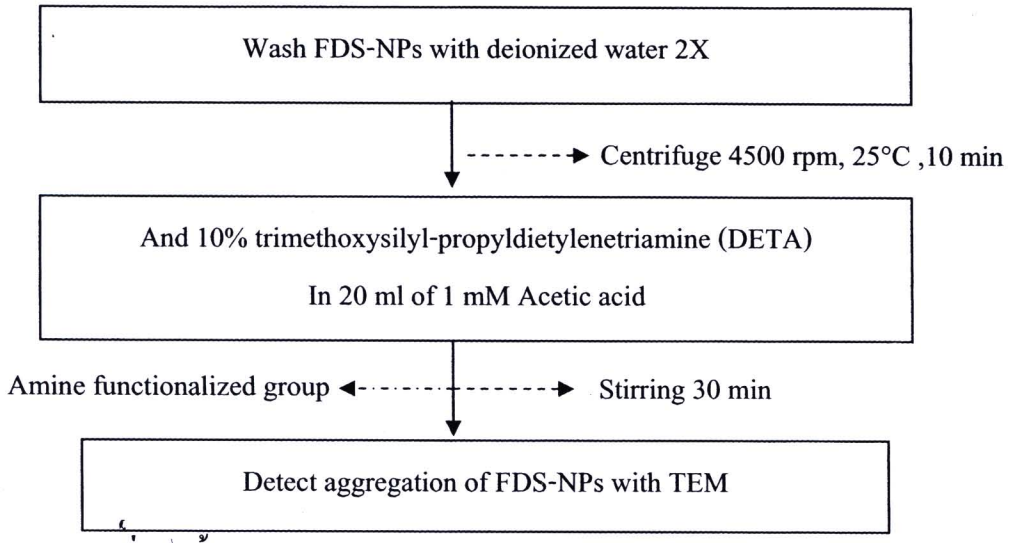


รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการตรวจสอบการจับกัน (Conjugation)

3.2.6 การตรวจสอบการเกาะตัวกันระหว่างอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน

3.2.6.1 การตรวจสอบการเกาะตัวในขั้นตอนดัดแปลงหมู่เอมีน (รูปที่ 3.8)

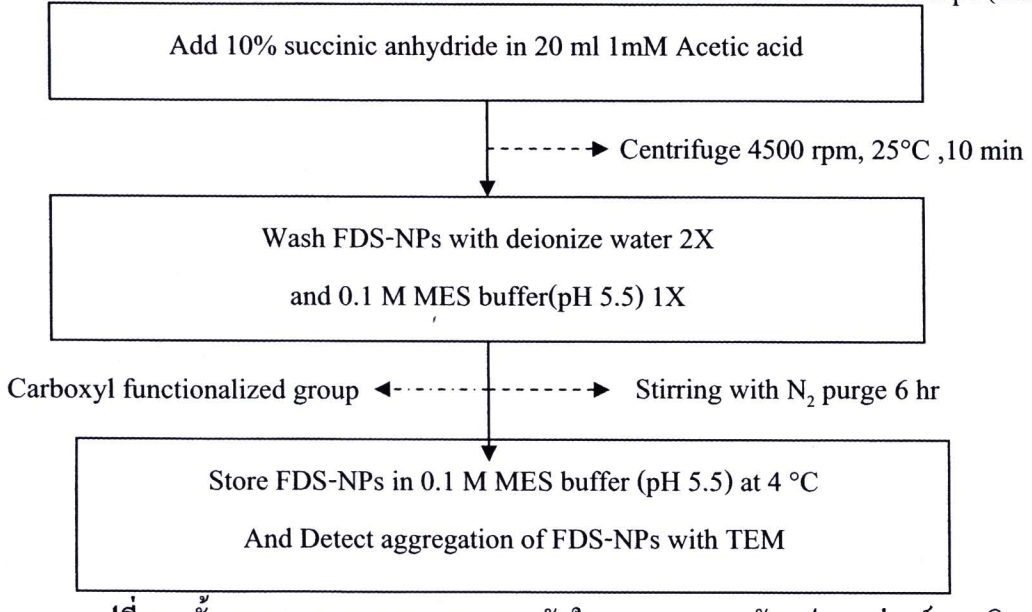
1. นำอนุภาค FDS-NPs 32 mg ล้างด้วย deionized water 2 ครั้ง และ 1 mM acetic acid 1 ครั้ง (โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิ 25 °C)
2. หลังจากการล้างอนุภาคแล้ว ทำให้อนุภาคกระจายทั่วกันโดยใช้ ultrasonic bath ใน 20 ml ของ 1 mM acetic acid ที่มี 10% Trimethoxysilyl-propyldiethylenetriamine (DETA) และกวนอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดหมู่เอมีน
3. ทำการส่งตรวจโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Transmission electron microscope (TEM)



รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการตรวจสอบการเกาะตัวในกระบวนการดัดแปลงหมู่เอมีน

3.2.6.2 การตรวจสอบการเกาะตัวในขั้นตอนดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิล (รูปที่ 3.9)

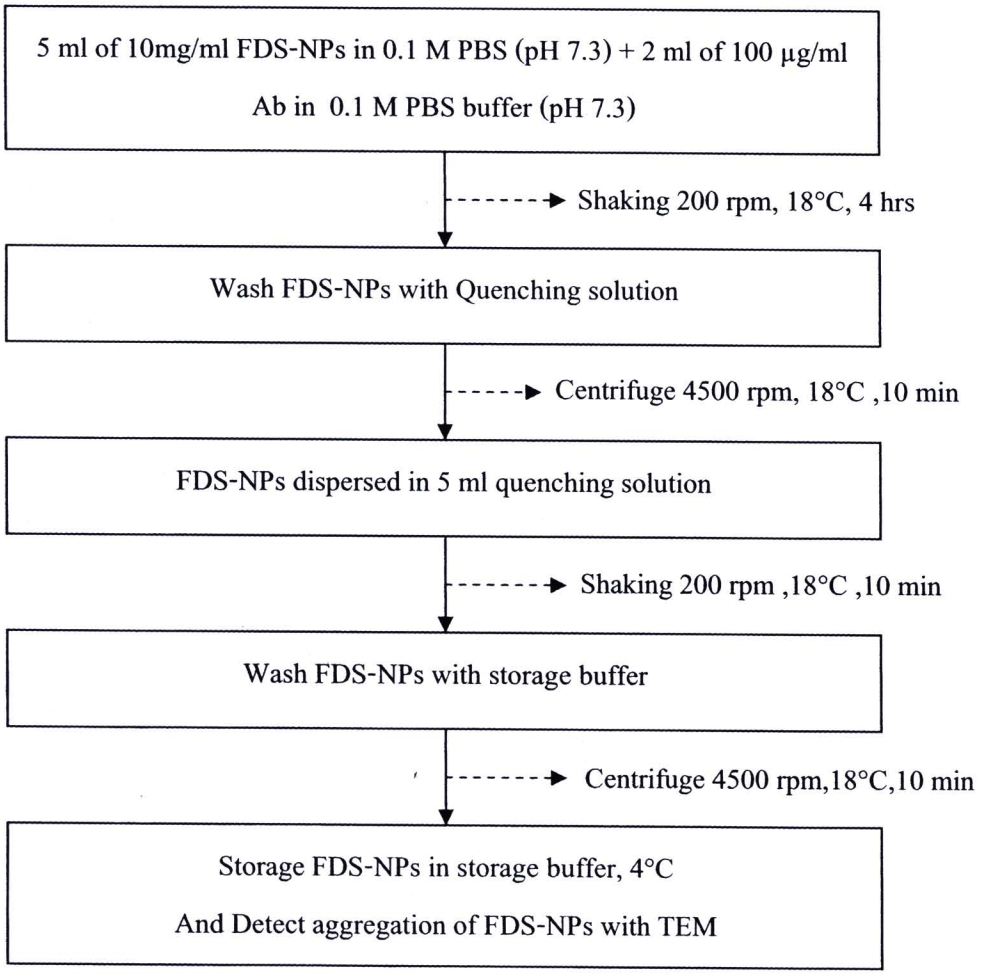
1. หลังจากการล้างอนุภาค ทำให้อนุภาคกระจายทั่วกันใน 20 ml ของ N,N- dimethylformamide ที่มี 10% succinic anhydride และกวนอย่างสม่ำเสมอ ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (N_2 purge) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิล
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่บริเวณผิวทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลแล้ว ด้วย deionized water 2 ครั้ง และ 0.1 M MES buffer (pH 5.5) 1 ครั้ง
3. เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลแล้วใน 0.1 M MES buffer (pH 5.5) ที่อุณหภูมิ 4 °C
4. ทำการส่งตรวจโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Transmission electron microscope (TEM)



รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการตรวจสอบการเกาะตัวในกระบวนการดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิล

3.2.6.3 การตรวจสอบการเกาะตัวในขั้นตอนการติดแอนติบอดี (รูปที่ 3.10)

1. เจือจางแอนติบอดีความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 2 ml ลงใน 5 ml ของ 10 mg/ml อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ด้วย Quenching solution 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18°C
3. กระจายอนุภาคใน 5 ml Quenching solution และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ Shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 30 นาที
4. ล้างอนุภาคด้วย Storage buffer 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18 °C
6. เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ใน 3 ml storage buffer (ความเข้มข้นของอนุภาคเท่ากับ 10 mg/ml)

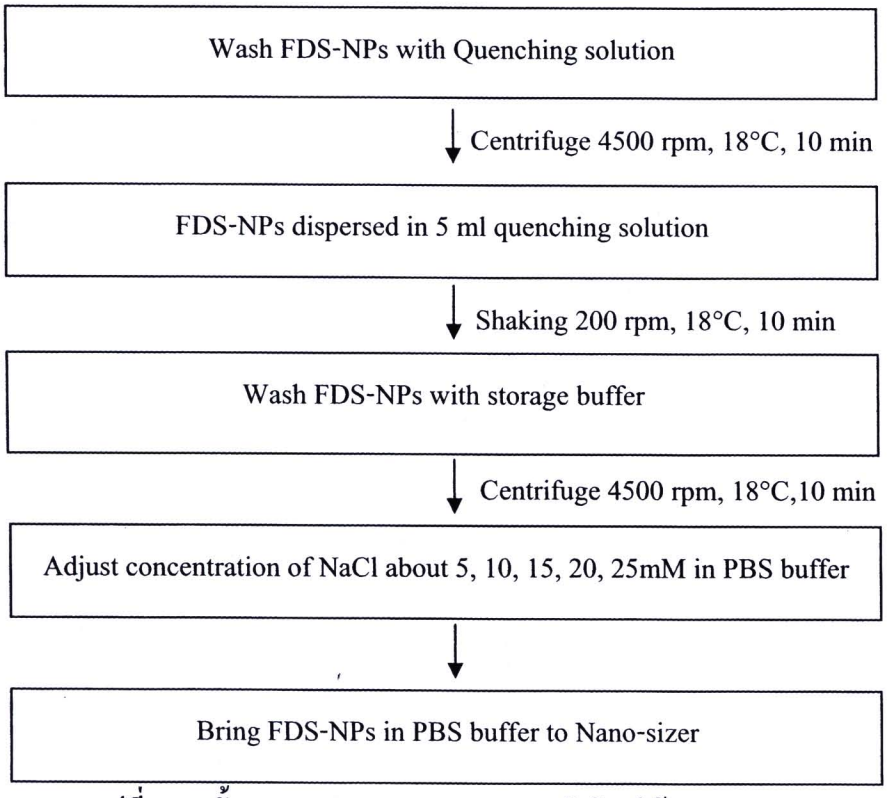


รูปที่ 3.10 ขั้นตอนการตรวจสอบการเกาะตัวในกระบวนการติดแอนติบอดี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2.7 การตรวจสอบการเกาะตัวโดยใช้ zeta potential

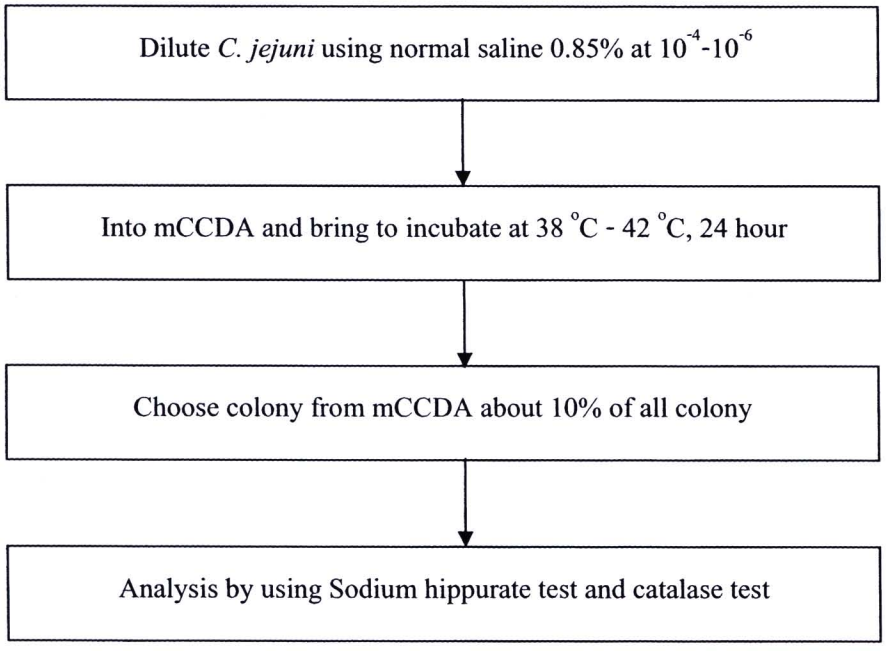
1. เจือจางแอนติบอดีความเข้มข้น 100 μg/ml ปริมาตร 2 ml ลงใน 5 ml ของ 10 mg/ml อนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอที่ 200 รอบต่อนาทีโดยใช้ shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
2. ล้างอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ด้วย Quenching solution 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18°C
3. กระจายอนุภาคใน 5 ml Quenching solution และมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอโดยใช้ Shaking water bath ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C เป็นเวลา 30 นาที
4. ล้างอนุภาคด้วย Storage buffer 1 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18 °C
5. เก็บอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีติดอยู่ใน 3 ml storage buffer (ความเข้มข้นของอนุภาคเท่ากับ 10 mg/ml)
6. ปรับความเข้มข้นของ NaCl ให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25mM ใน PBS buffer ในทุกสารละลายที่มี PBS buffer เกี่ยวข้อง



รูปที่ 3.11 ขั้นตอนการตรวจสอบการเกาะตัวโดยใช้ Zeta potential

3.2.8 วิธีการตรวจหาเชื้อ *C. jejuni* โดยวิธีการ spread plate

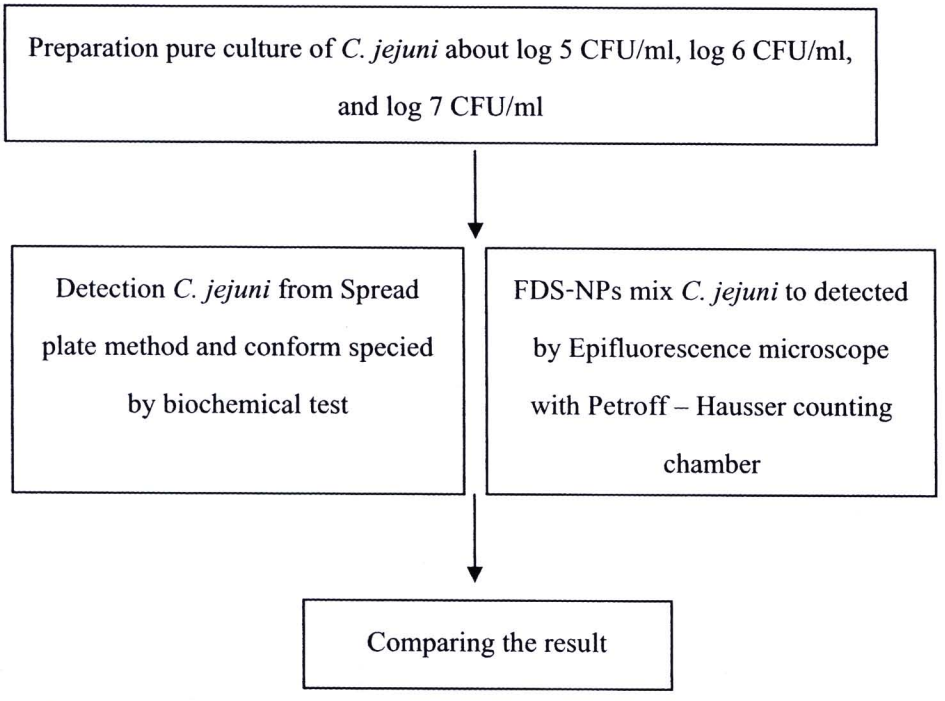
1. ทำการเจือจางเชื้อ *C. jejuni* โดยใช้ normal saline 0.85%
2. ในการทดลองจะใช้ระดับความเจือจางที่ 10^{-4}-10^{-6}
3. ทำการถ่ายเชื้อที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-4}-10^{-6} ลงใน mCCDA ระดับความเจือจางละ 3 plate รวมได้ 9 plate
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 °C - 42 °C ในสภาวะไร้ออกซิเจน (ใส่ไนโตรเจนแทน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. ทำการเลือกโคโลนีที่นับได้ โดยเลือกที่ 10% ของทั้งหมด
6. นำโคโลนีที่เลือกทั้ง 10% ไปทดสอบทางชีวะเคมีโดยใช้วิธี Sodium hippurate test และ catalase test
7. นำผลที่ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *C. jejuni* ไปคำนวณกลับเป็นปริมาณเชื้อ *C. jejuni* ที่แท้จริง



รูปที่ 3.12 ขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate

3.2.9 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และวิธี spread plate กับตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

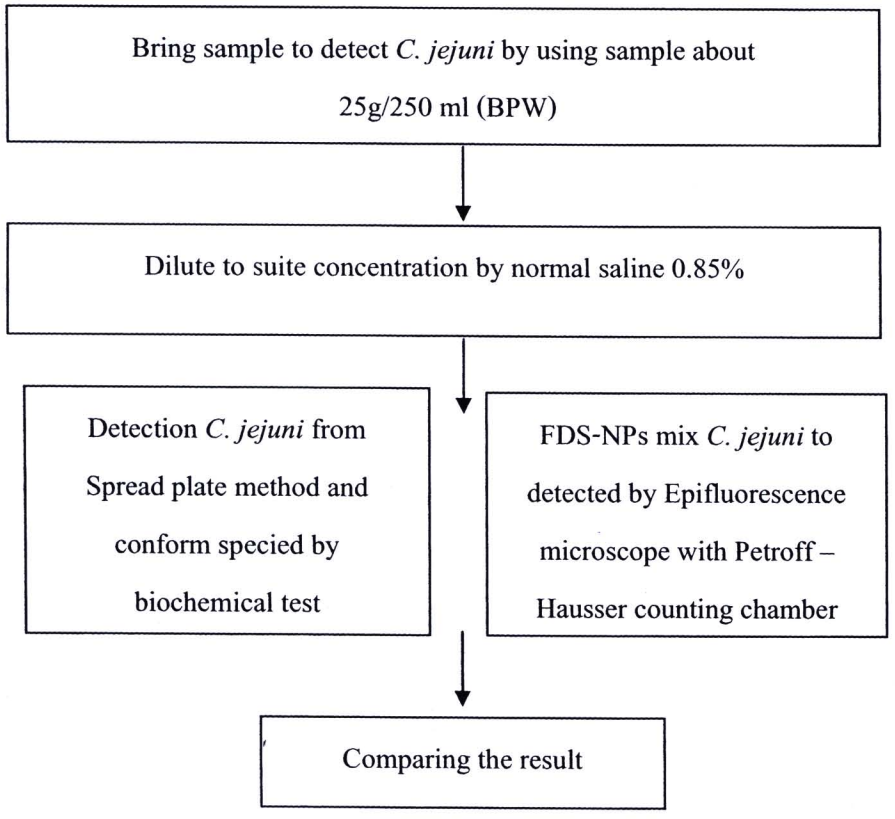
1. ทำการดำเนินการเตรียมปริมาณเชื้อ *C. jejuni* เริ่มต้นที่ log 5 CFU/ml, log 6 CFU/ml, และlog 7 CFU/ml ตามลำดับ
2. ทำการตรวจนับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้โดยใช้วิธี Spread plate และใช้วิธี biochemical test ในการยืนยันสายพันธ์ของ *C. jejuni* (3.2.8)
3. นำอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ เข้าไปผสมกับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้ แล้วทำการตรวจนับจำนวนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber
4. นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate โดยใช้กราฟแสดงความสัมพันธ์ความคลาดเคลื่อน



รูปที่ 3.13 ขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate

3.2.10 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโน และวิธี spread plate กับเชื้อ *C.jejuni* ในตัวอย่างไก่ในห้องปฏิบัติการ

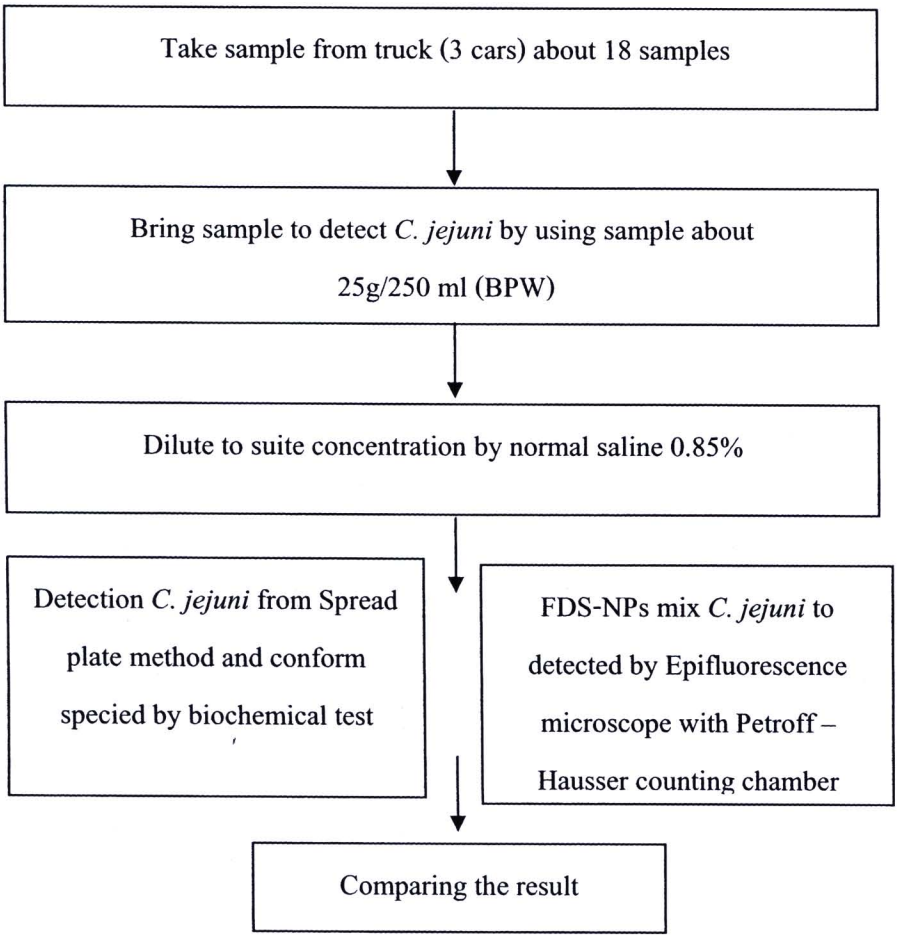
1. นำตัวอย่างไก่สดมา 3 ตัว มาทำการตรวจปริมาณเชื้อ *C. jejuni* โดยนำตัวอย่างไก่มา 25g ต่อ buffer peptone water (BPW) 250 ml
2. นำไปเจือจางตามความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย normal saline 0.85%
3. ทำการตรวจนับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้โดยใช้วิธี Spread plate และใช้วิธี biochemical test ในการยืนยันสายพันธ์ของ *C. jejuni* (3.2.8)
4. นำอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ เข้าไปผสมกับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้ แล้วทำการตรวจนับจำนวนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber
5. ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate โดยใช้T-test ในการเปรียบเทียบ



รูปที่ 3.14 ขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate ในตัวอย่างไก่ 3 ตัว

3.2.11 การตรวจประสิทธิภาพอนุภาคฟลูออเรสเซนท์ซิลิกานาโนกับเชื้อ *C.jejuni* ในตัวอย่างไก่ในโรงงานอุตสาหกรรม

1. ทำการเก็บตัวอย่างไก่บนรถบรรทุกจำนวน 3 คัน คันละ 18 ตัวอย่าง โดยจะทำการเก็บที่ตำแหน่ง บน, กลาง, ล่าง, หน้า, กลาง และหลัง (แนวตั้ง และแนวนอน) ของรถบรรทุกไก่ ทั้งหมด 3 คัน
2. นำตัวอย่างไก่มาทำการตรวจปริมาณเชื้อ *C. jejuni* โดยนำตัวอย่างไก่มา 25g ต่อ buffer peptone water (BPW) 250 ml
3. นำไปเจือจางตามความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย normal saline 0.85%
4. ทำการตรวจนับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้โดยใช้วิธี Spread plate และใช้วิธี biochemical test ในการยืนยันสายพันธ์ของ *C. jejuni* (3.2.8)
5. นำอนุภาค FDS-NPs ที่มีแอนติบอดีอยู่ เข้าไปผสมกับเชื้อ *C. jejuni* ที่เตรียมไว้ แล้วทำการตรวจนับจำนวนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Epifluorescence ร่วมกับ Petroff – Hausser counting chamber



รูปที่ 3.15 ขั้นตอนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาค FDS-NPs กับวิธี Spread plate ในตัวอย่างไก่ในโรงงานอุตสาหกรรม