รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย:** การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากรา

2. **โครงการวิจัย:** การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

   กิจกรรม: พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี): -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Production of Antiserum against Ochratoxin A for Utilization in Developing Rapid method for Ochratoxin A Detection

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง: ศุภรา อัคคะสาระกุล
หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน : เนตรา สมบูรณ์แก้ว
หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
สุพี วนศิรากุล
หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
อัจฉราพร ศรีจุดานุ
หน่วยงานต้นสังกัด กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

โอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อราบางชนิดในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นสารพิษที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นอันตรายที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง สารพิษโอคราทอกซิน เอ พบปนเปื้อนได้ในธัญพืช กาแฟ องุ่น โกโก้ และผลิตภัณฑ์ วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบที่แม่นยำและรวดเร็ว เป็นสิ่งที่จำเป็นมาก งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการผลิตแอนติซีรัมต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ แบบ polyclonal antibody ในกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand White จำนวน 4 ตัว ตกตะกอนแอนติซีรั่มด้วยวิธี Ammonium precipitation ได้แอนติซีรั่มบริสุทธิ์ (IgG-OTA) 320 มิลลิลิตร ทดสอบคุณสมบัติแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ด้วยวิธี Ouchterlony double diffusion test พบว่า แอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ และเมื่อทดสอบความเข้มข้นด้วยวิธี Indirect competitive ELISA พบว่า ใน

สัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัว มีความเข้มข้นสูง 1:1024000 และทดลองการเชื่อมต่อ ochratoxin A กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) 3 วิธี พบว่า เอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate) ที่เตรียมตามวิธีการที่ 1 โดยใช้ Dimethylformamide (DMF) จะมีค่าความเข้มข้นสูงกว่าวิธีการที่ 2 ที่ใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ วิธีการที่ 3 ซึ่งใช้ 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) โดยหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม OTA-HRP ความเข้มข้น 1:100 เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1 ใช้ DMF มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.871

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a major mycotoxin produced by some species in *Aspergillus* and *Penicillium* group that is harmful to human and animal. OTA is often found as contaminant in grains, coffee, grapes, cacao and products. Rapid and accurate method for detection of mycotoxins is very necessary. Therefore, the purpose of this research was designed to produce antiserum against OTA for developing rapid detection method of OTA by immunological assay. Polyclonal antibody against OTA were produced by 4 rabbits (New Zealand White). Ammonium precipitation was used to purify antiserum and 320 ml of IgG-OTA was obtained. Ouchterlony double diffusion test was used to evaluate and confirm the specificity of antiserum against OTA. In addition, the concentrations of OTA antiserum were tested by Indirect Competitive ELISA. It was observed that in the week 8 and 9 of antiserum production of 4 rabbits gave the highest concentration at 1:1024000. Furthermore, three conjugation methods of OTA with Horseradish Peroxidase (HRP) were tested. OTA-HRP conjugate of method 1 using Dimethylformamide (DMF) gave the high concentration than method 2 using Dimethyl sulfoxide (DMSO) and method 3 using 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) with the optical density (O.D.) at 3.871 when the microwell was coated with 6 µg/ml of IgG-OTA and OTA-HRP concentration 1:100.

6. คำนำ

โอคราทอกซิน เป็นกลุ่มของสารพิษจากเชื้อรา เป็นสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* เมื่อเชื้อราเหล่านี้เจริญภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สารโอคราทอกซินประกอบด้วย ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB), Ochratoxin C (OTC) และ ochratoxin α (OTα) ซึ่งโอคราทอกซิน เอ จัดว่ามีความเป็นพิษมากที่สุด ทำให้ทารกอวัยวะพิการ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม มีความเป็นพิษต่อตับ ไต และ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาที่ร้ายแรงต่อทั้งสุขภาพมนุษย์และสัตว์ (Meulenberg, 2012) มีการรายงานว่าความเป็นพิษของโอคราทอกซิน เอ มี ผลกระทบหลักต่อการทำงานของไต สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายทั้งและเฉียบพลันและแบบเรื้อรังขึ้นกับปริมาณสารพิษที่ได้รับ ซึ่งก่อให้เกิด

การฝ่อของเยื่อบุท่อไต และพบการรั่วของโปรตีนออกทางปัสสาวะ อาการอาจเริ่มจากอาการโดยทั่วไป เช่น เบื่ออาหาร ซึม อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ความรุนแรงของอาการจะสัมพันธ์กับเซลล์ของท่อไตที่ถูกทำลายขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (อำนาจ, 2562)

โอคราทอกซิน เอ จัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นลำดับสามในยุโรป อันเนื่องมาจากอันตรายที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ในมนุษย์ The International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดสารพิษ Ochratoxin A อยู่ใน Group 2B Possibly carcinogenic to humans คือ อาจจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Edwin *et al*., 2010) การปนเปื้อนของ OTA อาจพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์มากมาย อาทิ ธัญพืชและผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์กาแฟ องุ่นและผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์จากโกโก้ และเครื่องเทศ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการปนเปื้อนไปยังผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ นม เลือดหมู ตับ ไต และเนื้อสัตว์ปีกที่เลี้ยงด้วยอาหารปนเปื้อน OTA องค์กรสากล Codex Committee on Food Additive and Contaminants (CCFAC) ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของ OTA ในอาหารสำหรับการบริโภคไว้ที่ 5 ppb และ 20 ppb สำหรับวัตถุดิบทางการค้า (รัชนี และคณะ, 2552) เดิมการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมี เช่น วิธี TLC (thin layer chromatography) และวิธี HPLC (high performance liquid chromatography) (Venkataramana *et al*., 2015) ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ขั้นตอนการวิเคราะห์มีความยุ่งยาก ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายสูงในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ปัจจุบันหลายประเทศได้ทำการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยการใช้วิธีทาง immunological assay เช่น การใช้วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (อมรา, 2551) วิธี ELISA ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการตรวจประเมินปริมาณสารพิษจากเชื้อรา เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่มีความรวดเร็ว เฉพาะเจาะจง และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ไม่สูงเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น ๆ โดยมีการใช้ polyclonal antibodies ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวบาร์เล่ย์ และข้าวสาลี โดยวิธี indirect competitive ELISA ได้อย่างประสบผลสำเร็จ (Morgan *et al*., 1983; Lee and Chu, 1984)

การวิเคราะห์สารพิษ ด้วยวิธี ELISA อาศัยการทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ ดังนั้นส่วนประกอบที่สำคัญของวิธีทาง Immunoassay ที่ต้องเตรียมเป็นสิ่งแรก คือ การผลิตแอนตีบอดี (Antibody) ต่อสารพิษนั้น ๆ (Chu, 1984) ซึ่งแอนติบอดี คือ สารโปรตีนที่มีอยู่ในซีรั่ม น้ำคัดหลั่งต่าง ๆ ที่ร่างกายของคนหรือสัตว์สร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านต่อแอนติเจนหรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยแอนติบอดีจะมีปฏิกิริยาจำเพาะแอนติเจนที่มากระตุ้นเท่านั้น ดังนั้นการผลิตแอนติซีรั่ม (Antiserum) ซึ่งก็คือ แอนติบอดีชนิดหนึ่ง เป็นของเหลวส่วนน้ำเหลืองที่สกัดได้จากน้ำเลือดที่มีแอนติบอดีจำเพาะเจาะจงต่อสารโอคราทอกซิน เอ ซึ่งเป็นสารพิษที่ใช้ในการฉีดกระตุ้น เพื่อนำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้มาใช้ต่อยอดในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำหรับวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ เทียบเท่าการวิเคราะห์ในแบบอื่น ๆ เป็นการเสริมคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้ซื้อและผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน น้ำหนัก 2,500-3,000 กรัม เพศเมีย จำนวน 4 ตัว
2. สารโอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A)
3. Ochratoxin A–BSA conjugate (OTA-BSA)
4. Complete และ Incomplete Freund's adjuvant
5. Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate
6. Horseradish Peroxidase (HRP)
7. Bovine Serum Albumin (BSA)
8. 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB)
9. เข็มฉีดยา
10. หลอดทดลอง
11. Dialysis tubing cellulose membrane
12. เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)
13. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
14. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Micro ELISA Reader)
15. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

วิธีการ

1. การเสนอโครงการต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (National Laboratory Animal Centre Animal Care and Use Committee, NLAC-ACUC)

ดำเนินการเสนอโครงการต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (National Laboratory Animal Centre Animal Care and Use Committee, NLAC-ACUC) โดยจัดทำแบบฟอร์มเสนอโครงการวิจัย (protocol) การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่ายเพื่อนำเสนอต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (NLAC-ACUC) ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 โดยดำเนินการทดลองที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ

2.1 การฉีดแอนติเจนในกระต่ายทดลอง

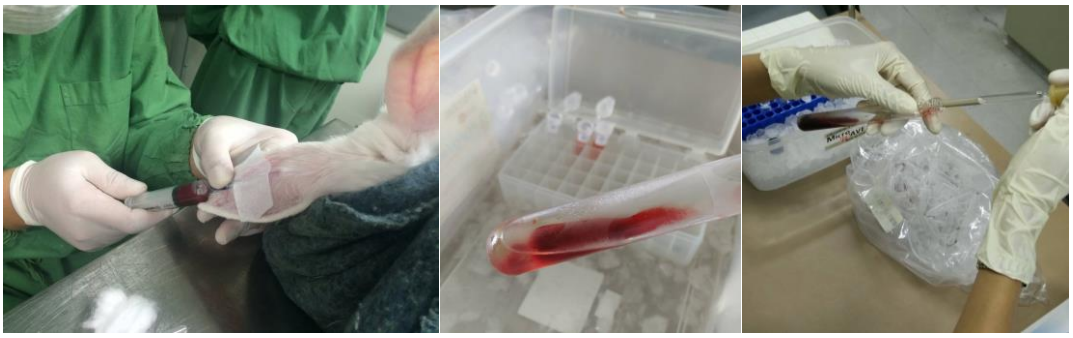
ผลิตแอนติซีรั่มแบบ polyclonal antibody โดยเตรียมสาร OTA-BSA adjuvant เป็นแอนติเจน (Antigen) สำหรับการฉีดกระต่ายทดลอง การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก (Initial immunization) เตรียม OTA-BSA ปริมาณ 300 ไมโครกรัม ผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:2 ใช้ magnetic stirrer ปั่นสารให้ละลายผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฉีดแอนติเจนปริมาณ ตัวละ 1 มิลลิลิตร/กระต่าย 1 ตัว เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอของกระต่ายทดลอง (subcutaneous injection) โดยแบ่งฉีดบริเวณใต้ผิวหนัง 4

ตำแหน่ง ๆ ละ 250 ไมโครลิตร และหลังจากนั้น 3 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้น (Boosts) ด้วยสารละลายโอคราทอกซิน เอ 250 ไมโครกรัม ที่ผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งฉีดแบบ subcutaneous injection และ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง (Intramuscular injection) ทำการฉีดกระตุ้น 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ subcutaneous injection และ Intramuscular injection ในกระต่ายทดลอง

2.2 การเจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรั่ม

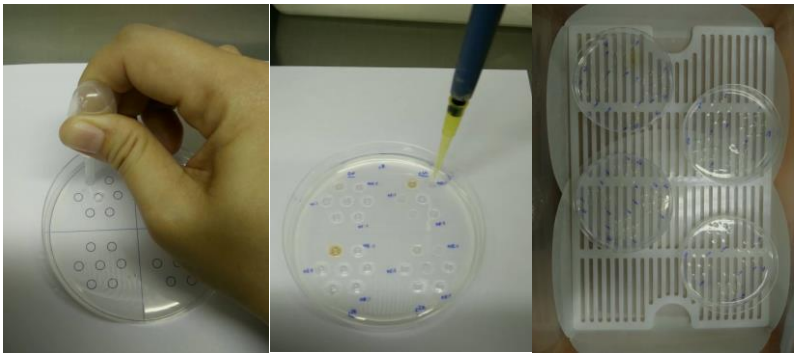
เจาะเก็บเลือดกระต่ายทุกตัวก่อนการฉีดแอนติเจนครั้งแรก (Initial injection) เพื่อใช้เป็น normal serum สำหรับเปรียบเทียบคุณภาพแอนติซีรั่ม และหลังการฉีดแอนติเจนครั้งแรกประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดแดงใหญ่กลางใบหู (central ear vessel) ของกระต่ายทดลอง และทำการเจาะเก็บทุกสัปดาห์เป็นเวลา 15 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายที่ได้ใส่ในหลอดทดลองวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้เกล็ดเลือดจับตัวเป็นก้อน (blood clots) และดูดเก็บเฉพาะส่วนของน้ำเหลือง (serum) ใส่ใน micro tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำให้เป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เจาะเลือดบริเวณ central ear vessel ของกระต่ายทดลอง หลังจากทิ้งไว้ข้ามคืนเลือดจะเกิดการจับตัวเป็นก้อน และแยกชั้นเป็นส่วนของ serum ดูดเก็บเฉพาะส่วนของ ซีรั่มใส่ใน micro tube และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เบื้องต้น

ทดสอบความเข้มข้นเบื้องต้นด้วยเทคนิคการตกตะกอนผ่านวุ้น (Agar Gel Immunodiffusion Test) ด้วยวิธี Ouchterlony Double Diffusion Test ในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) โดยเทวุ้น Agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อวุ้นแข็งตัวจะทำการเจาะหลุมตามแผนผังที่วางไว้ โดยเจาะหลุมเป็นกลุ่ม มีหนึ่งหลุมอยู่ตรงกลาง มีหลุมล้อมรอบอีก 6 หลุม ขนาดความกว้างของหลุมประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เตรียมหลุมทดสอบได้ประมาณ 4 กลุ่มต่อจานเลี้ยงเชื้อ การทดสอบจะนำแอนติซีรั่ม (Crude Serum) มาเจือจางใน 0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ1:320 หยดแอนติซีรั่มที่เตรียมลงในหลุม 6 หลุมที่อยู่รอบ ๆ และหยดแอนติเจน (OTA-BSA) ลงในหลุมตรงกลาง นำจานเลี้ยงเชื้อไปใส่ในกล่องที่มีความชื้นปิดฝาแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) แล้วนำมาอ่านผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

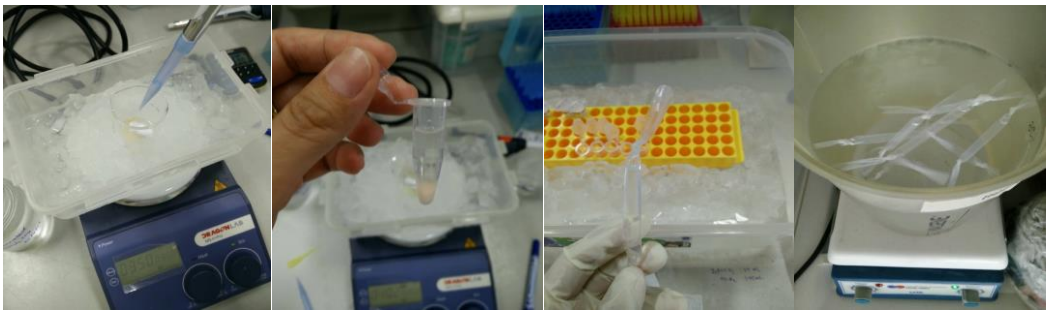


ภาพที่ 3 ทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เบื้องต้นโดยวิธี Ouchterlony test

2.4 การทำแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์

เตรียมแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ammonium precipitation โดยนำแอนตีซีรั่ม (Crude Serum) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 0.5-1 มิลลิลิตร จนได้ตะกอนสีขาวขุ่น จากนั้นนำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการตกตะกอนของแอนติซีรั่ม ทิ้งน้ำส่วนใสให้เหลือแต่ตะกอน แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.01M PBS และทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีกครั้งโดยผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น จากนั้นนำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.01M PBS แล้วดูดใส่ dialysis tubing cellulose membrane ทำการ dialysis โดยนำแอนติซีรั่มที่อยู่ใน dialysis tubing แช่ในน้ำกลั่น 2 ลิตร แล้วตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็น 0.01M PBS อีก 2 ครั้ง และ dialysis ต่อข้ามคืน (ภาพที่ 4) นำส่วน

ที่ผ่านการ dialysis แล้วมาแบ่งใส่ micro tube หลอดละ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บแอนติซีรั่มโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4 การทำแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Ammonium precipitation

2.5 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้

วัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ของกระต่ายแต่ละตัวที่เตรียมได้แต่ละครั้งเปรียบเทียบกับ normal serum ด้วยวิธี Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay โดยเคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ที่ละลายใน 0.01M PBS ความเข้มข้น 1:20,000 ปริมาณหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารในหลุมทดสอบทิ้ง นำมาล้างด้วย 0.01M PBS + 0.05% Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง แล้วเติมด้วย 100 ไมโครลิตร blocking buffer (0.01M PBS + 0.1% Bovine Serum Albumin) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลุมทดสอบมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เตรียม normal serum และแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 12 ความเข้มข้น (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000, 1:256000, 1:512000, 1:1024000) หยดแอนติซีรั่มแต่ละความเข้มข้นลงในหลุมทดสอบหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง และล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยด 50 ไมโครลิตร Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Conjugate ลงไปในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง และล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยดตามด้วย substrate 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อเกิดสีในหลุมทดสอบแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3M Phosphoric acid นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; O.D.) ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3. การเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate)

ทดลองเตรียมการเชื่อมต่อสารโอคราทอกซิน เอ กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) 3 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ตามวิธีการของ Schwerdt *et al*. (1999) โดยมีสาร *N*-hydroxysuccinimide (NHS), Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ เติมสาร OTA 1.6 μmol ลงใน 7.5 μmol NHS และ 15 μmol DCC ละลายสารทั้ง 3 ชนิดด้วย 65 μl DMF แล้วบ่มไว้ที่

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ HRP โดยหยดสารละลายที่ได้ลงใน 0.25 µmol HRP ที่ละลายใน 1.5 ml 0.13 mmol/l sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) แล้วบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนำสารที่ได้มา dialysis ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ข้ามคืนโดยทำการเปลี่ยน buffer ทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้สาร OTA-HRP ที่บริสุทธิ์ ดูด OTA-HRP ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการที่ 2 ทดลองเตรียม OTA-HRP ตามวิธีการของ Stachowiak *et al.* (2017) โดยเตรียม OTA 1.362 µmol ละลายใน 300 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) และเตรียม 50 µl ของ DCC และ NHS (80 mM) ที่ละลายใน DMSO นำสารละลาย DCC และ NHS ที่เตรียมได้เติมลงในสารละลาย OTA นำไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เตรียม 227 nmol HRP ละลายใน 1.7 ml Sodium Phosphate Buffer (PB) เติมสารละลาย OTA ที่บ่มข้ามคืนลงในสารละลาย HRP นำไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ดูด OTA-HRP มา dialysis ใน dialyzing buffer (0.9% sodium chloride) เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยน buffer วันละ 2 ครั้ง นำคอนจูเกตที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการที่ 3 เตรียม OTA-HRP ตามวิธีการของ Radoi *et al.* (2009) โดยละลาย 5 mg OTA ใน 500 µl acetone และเติมด้วย 7.5 mg 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เตรียมเอนไซม์ HRP โดยชั่ง HRP 21 mg ละลายใน 2 ml carbonate buffer นำสารละลาย OTA มาหยดลงในสารละลาย HRP แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเขย่าและบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แยก OTA ที่ไม่ได้คอนจูเกตโดยการผ่าน NAP-10 column โดยมี PBS เป็น mobile phase เก็บเฉพาะส่วนที่คอนจูเกต OTA-HRP ซึ่งมีสีน้ำตาลไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate

นำ OTA-HRP ที่เตรียมได้ทั้ง 3 วิธีการ มาทดสอบความเข้มข้นด้วยวิธี Direct competitive ELISA โดยการเคลือบหลุมทดสอบด้วยแอนติซีรั่ม OTA บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg/ml หลุมละ 100 µl บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารในหลุมทดสอบทิ้ง นำมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วเติมด้วย 150 ไมโครลิตร blocking buffer (PBS-BSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลุมทดสอบมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง และเตรียม OTA-HRP conjugate ที่ได้จากแต่ละวิธีการให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 และ 1:64000) หยดลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มหลุมทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เทสารในหลุมทดสอบทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง หยด 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มหลุมทดสอบนาน 10 นาที เติม 3M Phosphoric acid หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

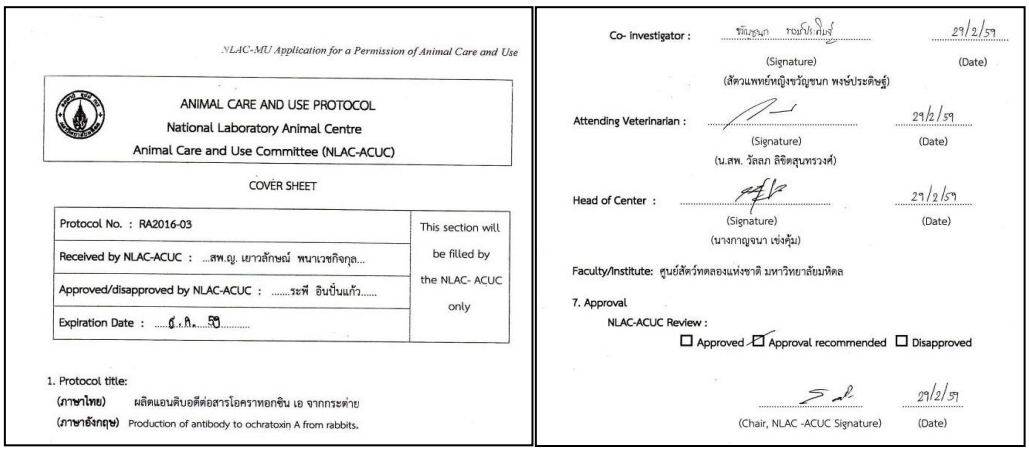
เวลาและสถานที่ ระยะเวลาทำการทดลอง: เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง: กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร และ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเสนอโครงการต่อคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (National Laboratory Animal Centre Animal Care and Use Committee, NLAC-ACUC)

ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 ที่ใช้กำกับดูแลและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของประเทศไทยให้สอดคล้องกับหลักจรรยาบรรณและมาตรฐานของสากล เพื่อคุ้มครองชีวิตและสวัสดิภาพของสัตว์ ส่งเสริมความก้าวหน้าทางวิชาการของประเทศ ตลอดจนส่งเสริมนักวิจัยให้มีผลงานอันเป็นที่ยอมรับของนานาประเทศ (พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์, 2558) ทำให้การใช้สัตว์ทดลองจะต้องมีสถานที่ดำเนินการ สภาพแวดล้อม อุปกรณ์ และมีสัตวแพทย์ซึ่งได้รับใบอนุญาตเป็นผู้ประกอบวิชาชีพการสัตวแพทย์ชั้นหนึ่งจากสัตวแพทยสภา และมีประสบการณ์ทางด้านวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลองตามที่คณะกรรมการกำหนด รวมทั้งให้มีคณะกรรมการกำกับดูแลเพื่อทำหน้าที่ในการพิจารณาอนุมัติโครงการ และกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ให้สอดคล้องกับจรรยาบรรณ จึงติดต่อศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่าย โดยแบบฟอร์มเสนอโครงการวิจัยการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่าย ได้ผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (NLAC-ACUC) แล้ว (ภาพที่ 5) จึงได้ดำเนินการเลี้ยงกระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White อายุ 3 เดือน น้ำหนัก 2,500-3,000 กิโลกรัม เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับทำการทดลอง (ภาพที่ 6)



NLAC-MU Application for a Permission of Animal Care and Use

ANIMAL CARE AND USE PROTOCOL
National Laboratory Animal Centre
Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC)

COVER SHEET

Protocol No. : RA2016-03	This section will be filled by the NLAC- ACUC only
Received by NLAC-ACUC : ...สพ.ญ. เยาวลักษณ์ พนาเวชกิจกุล...	
Approved/disapproved by NLAC-ACUC : .....ระพี อินปั้นแก้ว.....	
Expiration Date : .....ต.ค.....59.....	

1. Protocol title:
(ภาษาไทย) ผลิตแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่าย
(ภาษาอังกฤษ) Production of antibody to ochratoxin A from rabbits.

Co- Investigator : 29/2/59
(Signature) (Date)
(สัตวแพทย์หญิงขวัญชนก พงษ์ประดิษฐ์)

Attending Veterinarian : 29/2/59
(Signature) (Date)
(น.สพ. วัลลภ สิทิตสุนทรวงศ์)

Head of Center : 29/2/59
(Signature) (Date)
(นางกาญจนา เข่งคุ้ม)

Faculty/Institute: ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

7. Approval
NLAC-ACUC Review :
☐ Approved ☑ Approval recommended ☐ Disapproved

..... 29/2/59
(Chair, NLAC -ACUC Signature) (Date)

ภาพที่ 5 ตัวอย่างแบบฟอร์มเสนอโครงการวิจัยการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ จากกระต่ายที่ผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (NLAC-ACUC)

ภาพที่ 6 กระต่ายทดลองสายพันธุ์ New Zealand White จำนวน 4 ตัว ดำเนินการวิจัยที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ

2.1 การฉีดแอนติเจนในกระต่ายทดลอง

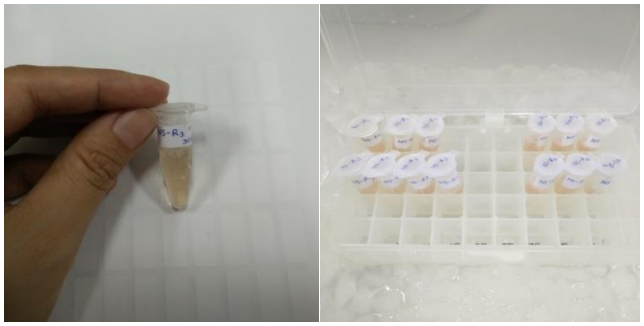
เก็บเลือดกระต่ายสำหรับเป็น normal serum ก่อนทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก และเลือกฉีดแอนติเจน (OTA-BSA) 1 มิลลิลิตร แบบ subcutaneous injection โดยแบ่งฉีด 4 ตำแหน่ง เนื่องจากว่าเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง หากสัตว์ทดลองเกิดอาการผิดปกติจะสามารถรักษาอาการได้ง่ายกว่าตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ผู้ดูแลสัตว์ทดลอง ส่วนการฉีดกระตุ้น (Boosts) แบ่งฉีดแบบ subcutaneous injection 2 ตำแหน่ง และ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง (Intramuscular injection) 2 ตำแหน่ง Harlow and Lane (1988) อธิบายว่า ประสิทธิภาพในการฉีดกระตุ้นภูมิที่ตำแหน่ง subcutaneous จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดกระตุ้นภูมิที่ตำแหน่ง Intramuscular เนื่องจาก ฉีดแบบ Intramuscular จะเป็นการกระตุ้นแบบ slow release จึงฉีดกระตุ้นภูมิที่ตำแหน่ง subcutaneous 2 จุด และ Intramuscular 2 จุด เพื่อให้การฉีดกระตุ้นเกิดประสิทธิภาพได้ดีที่สุด รัชนี (2558) อธิบายว่า subcutaneous injection เป็นวิธีที่นิยมมากในการฉีดสัตว์ที่ใช้ในห้องทดลองโดยเฉพาะกระต่าย ตำแหน่งที่ฉีดคือ บริเวณใต้ผิวหนังที่หลังคอของสัตว์ทดลอง แอนติเจนจะเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ที่สุดและสะสมอยู่บริเวณนั้น ถ้าปริมาณที่ฉีดสูงเกิน 0.8 มิลลิลิตร ควรแบ่งฉีดมากกว่า 1 ตำแหน่ง ส่วน Intramuscular injection เป็นวิธีการฉีดอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เมื่อต้องการปลดปล่อยแอนติเจนเข้าสู่ระบบการไหลเวียนของกระต่ายอย่างช้า ๆ โดยการฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง

การเจริญเติบโตของกระต่ายทดลองที่ผลิตแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน ทั้ง 4 ตัว มีการเจริญเติบโตปกติ มีน้ำหนักเริ่มต้น คือ 2,857 3,082 3,244 และ 3,113 กรัม ตามลำดับ โดยในการทดลองนั้นมีการชั่งน้ำหนัก 1 ครั้งต่อสัปดาห์ พบว่า น้ำหนักของกระต่ายทั้ง 4 ตัว เพิ่มขึ้น และในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองกระต่ายทดลองมีน้ำหนัก 3,960 4,379 4,258 และ 4,109 ตามลำดับ

2.2 การเจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรั่ม

ในการเก็บเลือดกระต่ายทดลองครั้งที่ 1 หลังการฉีดแอนติเจนครั้งแรก 3 สัปดาห์ พบว่าเลือดข้นจับตัวเป็นก้อนและแยกชั้นเป็นส่วนของซีรั่มน้อย ประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว อาจเกิดจากกระต่ายทดลองกินอาหารข้นที่เป็นอาหารสำเร็จรูปมากไป จึงทำการปรับเสริมด้วยอาหารสดเพื่อให้กระต่ายได้รับน้ำมากขึ้นในการกินอาหาร หลังจากนั้นสามารถเจาะเก็บเลือดกระต่ายได้ประมาณ 6-8 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว ต่อ

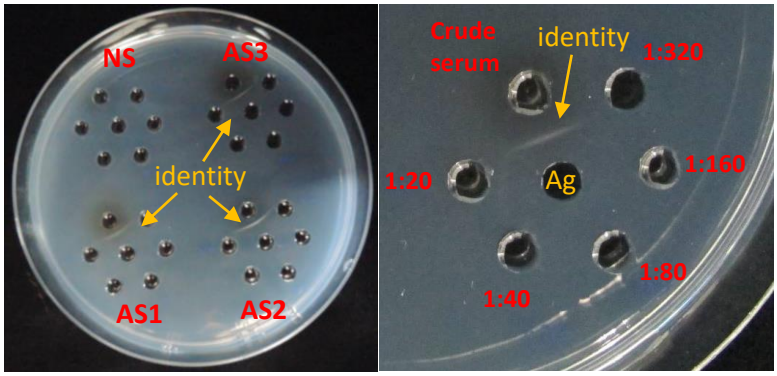
ครั้ง นำเลือดมาดูดเก็บเฉพาะส่วนซีรั่มได้ประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว ต่อครั้ง รวมการทดลองทั้งหมด 18 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดกระต่ายทดลองทั้งหมด 15 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายจะทำการเก็บเลือดกระต่ายทดลองทั้งตัว ได้แอนติซีรั่มทั้งหมดประมาณ 420 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตกตะกอนให้เป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สำหรับการทดลองต่อไป (ภาพที่ 7)



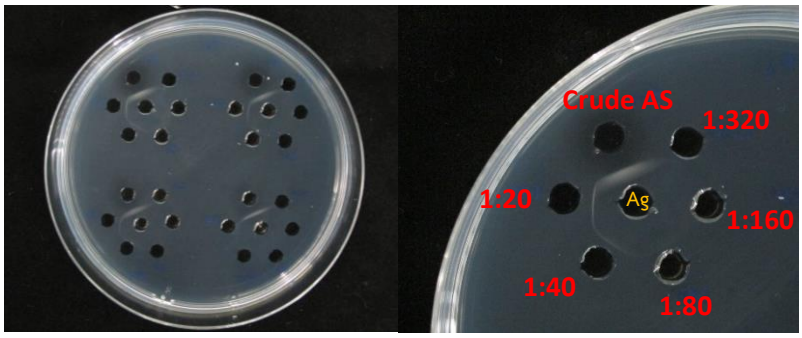
ภาพที่ 7 เก็บเฉพาะส่วน serum ที่ได้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เบื้องต้น

ผลการทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม ที่ผลิตได้เบื้องต้นโดยวิธี Ouchterlony double diffusion test พบว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพราะเกิดปฏิกิริยาความสัมพันธ์ระหว่างแอนตีซีรั่ม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับแอนติเจน (OTA-BSA) ที่อยู่ในหลุมกลาง เป็นแบบ identity คือ แถบของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากหลุมของแอนติซีรั่ม 2 หลุม ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่นำมาทดสอบเกิดเป็นแถบตะกอนในวุ้น แต่ในการเก็บแอนติซีรั่มครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 3 ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ยังน้อย จะเกิดแถบปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 1:20 เมื่อเทียบกับ normal serum ซึ่งไม่มีการฉีดแอนติเจนจะพบว่าไม่เกิดแถบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ (ภาพที่ 8) และความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีความเข้มข้นแตกต่างกันจากเลือดที่เจาะได้ในแต่ละครั้ง ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของกระต่ายทดลองแต่ละตัว Hassan *et al.* (2014) ได้ทดสอบแอนติบอดีต่อสารแอฟลาทอกซิน บี1 โดยวิธี Ouchterlony test พบว่า ซีรั่มของกระต่ายที่ผ่านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย Aflatoxin B1-BSA ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ไม่พบแอนติบอดีต่อสารแอฟลาทอกซิน บี 1 แต่ในสัปดาห์ที่ 5, 7, 9, 11 ซีรั่มของกระต่ายมีแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาต่อสารแอฟลาทอกซิน บี 1 เกิดตกตะกอนเป็นแถบแบบ identity สำหรับแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเกิดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบคือ 1:160 ในการเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 7 จากกระต่ายตัวที่ 3 (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบ normal serum (NS) ที่ไม่เกิดแถบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบกับแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ครั้งที่ 1, 2 และ 3 (AS1, AS2, AS3) ที่พบแถบของปฏิกิริยาแบบ identity ที่เกิดขึ้นจากแอนติซีรั่มทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (Ag) เกิดเป็นแถบตะกอนในวุ้น



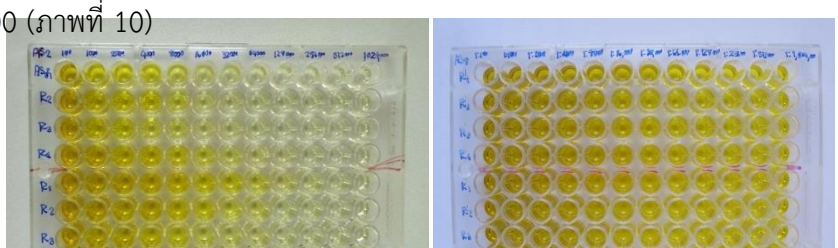
ภาพที่ 9 ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเกิดแถบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ คือ 1:160 ในการเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 7 จากกระต่ายตัวที่ 3

2.4 การทำแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์

การตกตะกอนแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ammonium precipitation โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวเพื่อสกัดอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) หรือแอนติบอดี (Antibody, Ab) ออกจากสารอื่นที่มีอยู่ในซีรั่ม จากแอนติซีรั่มที่ผลิตได้สามารถตกตะกอนให้เป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ได้ประมาณ 320 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีทาง Immunoassay ต่อไป ชลิดา (2554) อธิบายว่า แอนติบอดีเป็นสารที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์เลือดอุ่นสร้างขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมซึ่งเรียกว่า แอนติเจน โดยแอนติบอดีจะอยู่ในน้ำเลือดหรือซีรั่มในส่วนของโกลบูลิน ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จึงเรียกโกลบูลินหรือโปรตีนชนิดนี้ว่า อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) อิมมูโนโกลบูลินมี 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE อรดี (ม.ป.ป.) ให้ข้อมูลว่า อิมมูโนโกลบูลินเป็น glycoprotein มีส่วนประกอบของ polypeptide 82-96% และคาร์โบไฮเดรต 4-18% โดย IgG มีปริมาณมากที่สุดในน้ำเหลืองคนปกติ พบประมาณ 75-80% ของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคติดเชื้อต่าง ๆ ระดับของ IgG จะเพิ่มสูงขึ้นมากภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน

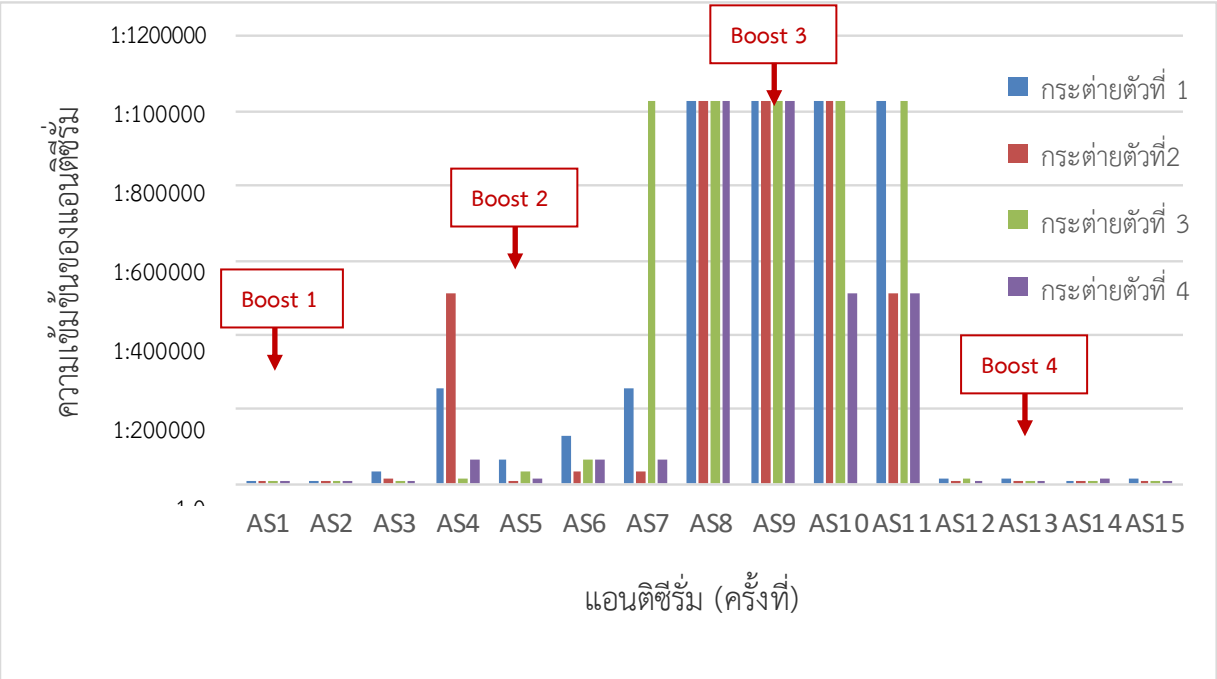
2.5 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้

วัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ (Purified IgG) ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Indirect Competitive ELISA พบว่า แอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เริ่มสร้างหลังจาก Initial injection ในความเข้มข้นระดับต่ำและค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 หลังจาก Booster injection โดยหลุมทดสอบที่มีสีเหลืองเข้มแสดงถึงแอนติซีรั่มบริสุทธิ์มีความเข้มข้นมาก หลุมที่มีสีเหลืองจางแอนติซีรั่มมีความเข้มข้นน้อย ซึ่งแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้สัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัวมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูง โดยมีความเข้มข้น 1:1024000 (ภาพที่ 10)



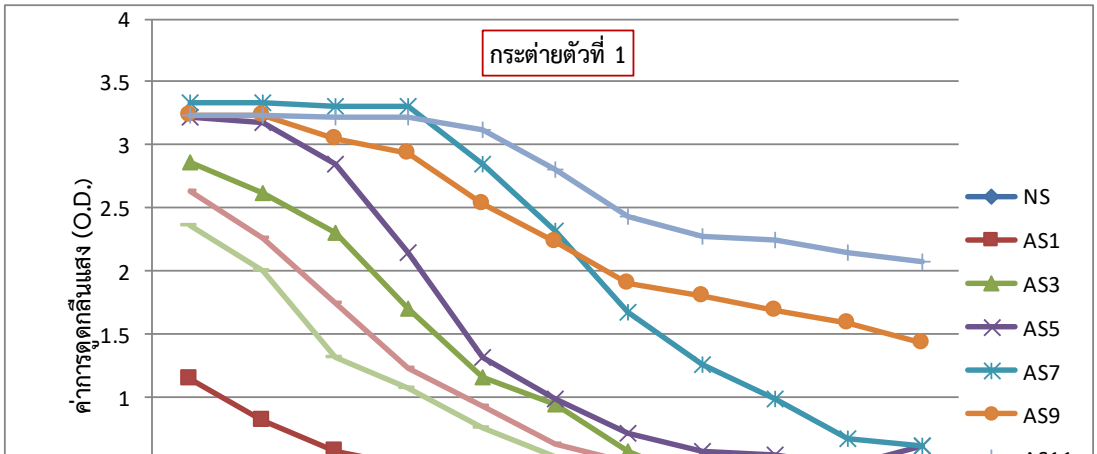
ภาพที่ 10 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ (Purified IgG) ของกระต่ายทั้ง 4 ตัว โดยวิธี Indirect Competitive ELISA ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ของการเก็บเลือด (AS2, AS3) มีความเข้มข้นต่ำ (ภาพซ้าย) ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัวมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูง โดยมีความเข้มข้น 1:1024000 (ภาพขวา)

ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ในกระต่ายทดลองแต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ โดยหลังการฉีดกระตุ้น (Boosts) ในแต่ละครั้ง กระต่ายทดลองจะผลิตแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป กระต่ายทั้ง 4 ตัว ผลิตแอนติซีรั่มมีความเข้มข้นสูงถึง 1:1024000 ในการเก็บเลือดครั้งที่ 8, 9 และ 10 (AS8, AS9, AS10) แต่ในครั้งที่ 10 กระต่ายตัวที่ 4 ผลิตแอนติซีรั่มลดลงเหลือ 1:512000 ในการปฏิบัติงานพบว่า กระต่ายตัวที่ 1 จะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้น และผลิตแอนติซีรั่มที่มีความเข้มข้นได้ค่อนข้างสูงกว่ากระต่ายตัวอื่น ๆ ในเกือบทุกสัปดาห์ แต่กระต่ายตัวที่ 3 ในช่วงแรกเจาะเก็บเลือดได้น้อย และแอนติซีรั่มมีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำกว่ากระต่ายตัวอื่น ๆ หลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 (Boost 2) ในการเก็บเลือดครั้งที่ 6 (AS6) เริ่มตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดี ผลิตแอนติซีรั่มที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และในการเก็บเลือดครั้งที่ 7-11 (AS7-AS11) ผลิตแอนติซีรั่มที่มีความเข้มข้นสูงถึง 1:1024000 (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับรายงานของ อมรา และคณะ (2551) ในการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารแอฟลาทอกซิน เอ็ม1 กระต่ายตัวที่ 1 สร้างแอนติซีรั่มความเข้มข้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 และ 12 ส่วนกระต่ายตัวที่ 2 ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มสูงสุดผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 5 และลดต่ำลงในสัปดาห์ที่ 7 ส่วนกระต่ายตัวที่ 3 สามารถผลิตแอนติซีรั่มได้สูงสุด 1:256000 ในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากนั้นลดต่ำลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 9 จนถึงสัปดาห์ที่ 21 จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการสร้างแอนติบอดีของกระต่ายแต่ละตัวจะไม่เท่ากัน

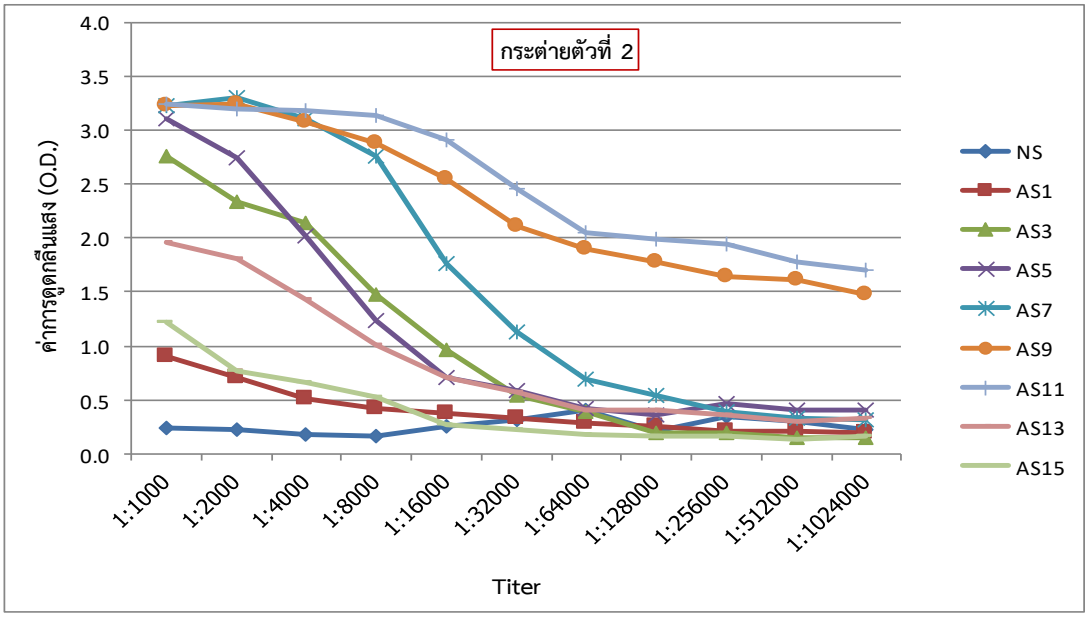


ภาพที่ 11 ความเข้มข้นของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้จากการเก็บเลือดในแต่ละครั้งของกระต่ายทดลองทั้ง 4 ตัว

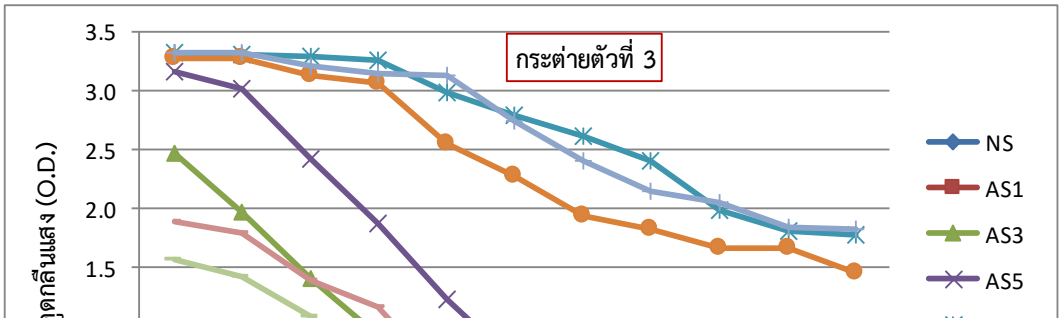
ค่า Titer หรือ ความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรั่มที่ยังทำปฏิกิริยากับสารโอคราทอกซิน เอ ของกระต่ายทดลองทั้ง 4 ตัวที่ผลิตได้ เมื่อเปรียบเทียบซีรั่มก่อนการฉีดแอนติเจน (NS) กับแอนติซีรั่มหลังการฉีดแอนติเจน (AS) จะเห็นได้ว่า แอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ โดยในแต่ละครั้งของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยาต่อสารโอคราทอกซิน เอ เกิดสีในหลุมทดสอบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้แตกต่างกันไปตามความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม ค่า Titer ของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ครั้งที่ 1 (AS1) มีค่าความเข้มข้นน้อยทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในหลุมเป็นสีเหลืองจาง ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ที่ความเข้มข้น 1:1000 ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.673-1.131ซึ่งค่า Titer แอนติซีรั่มที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 9 มีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มปริสุทธ์สูง ในกระต่ายทั้ง 4 ตัว ที่ความเข้มข้น 1:1000 ค่าการดูดกลืนแสงสูงอยู่ที่ 3.211-3.237 เนื่องจากกระต่ายทดลองเจริญเติบโตมีความแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่ และมีการฉีดแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ครั้งแล้ว ในสัปดาห์ที่ 11 กระต่ายตัวที่ 1 และ3 ยังคงผลิตแอนติซีรั่มที่มีความเข้มข้นสูง แต่แอนติซีรั่มของกระต่ายตัวที่ 2 และ 4 มีความเข้มข้นลดลง (ภาพที่ 12-15)



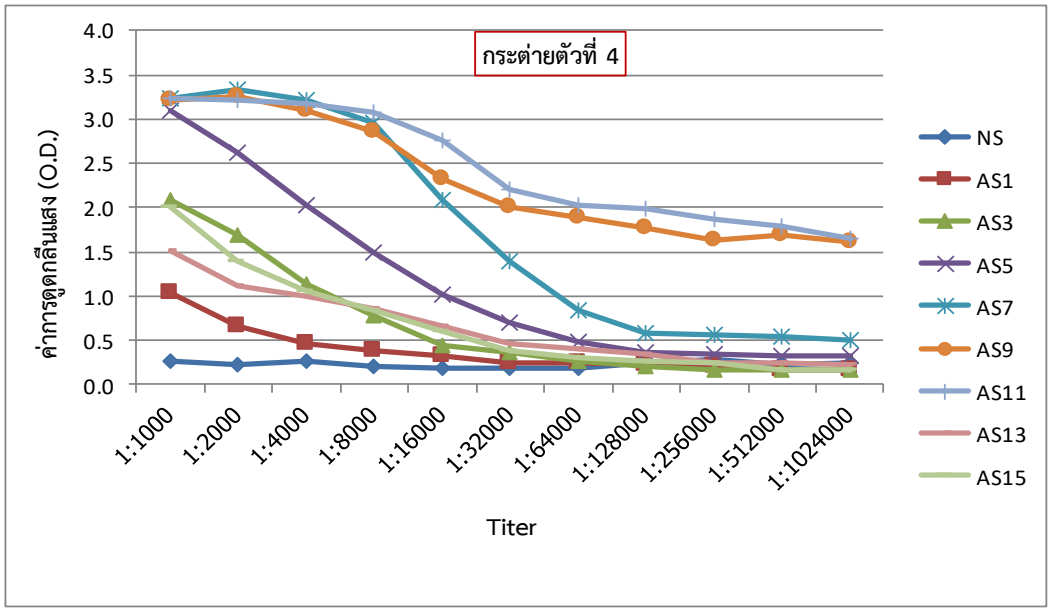
ภาพที่ 12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ15 (AS1, AS3, AS5, AS7, AS9, AS11, AS13, AS15) กับซีรั่มปกติ (Normal Serum, NS) ของกระต่ายตัวที่ 1



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ15 (AS1, AS3, AS5, AS7, AS9, AS11, AS13, AS15) กับซีรั่มปกติ (Normal Serum, NS) ของกระต่ายตัวที่ 2



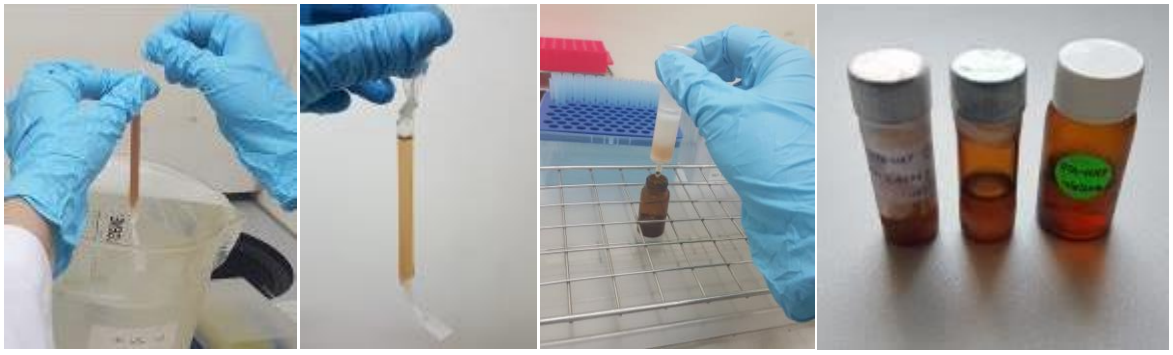
ภาพที่ 14 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ15 (AS1, AS3, AS5, AS7, AS9, AS11, AS13, AS15) กับซีรั่มปกติ (Normal Serum, NS) ของกระต่ายตัวที่ 3



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ในสัปดาห์ที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ15 (AS1, AS3, AS5, AS7, AS9, AS11, AS13, AS15) กับซีรั่มปกติ (Normal Serum, NS) ของกระต่ายตัวที่ 4

3. การเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate)

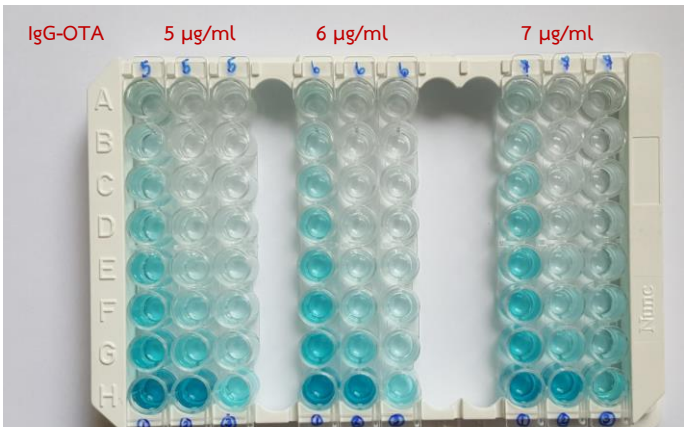
ผลการเชื่อมต่อ ochratoxin A กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) ตามวิธีการที่ 1 ใช้ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อได้ OTA-HRP conjugate ประมาณ 2 มิลิลิตร ซึ่งเอนไซม์คอนจูเกตที่ได้ผ่านการ dialysis ใน PBS มีสีน้ำตาลขุ่น ตามวิธีการที่ 2 ที่ใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ในการทำปฏิกิริยา หลังผ่านการ dialysis ด้วย 0.9% sodium chloride ได้ OTA-HRP conjugate ที่มีสีน้ำตาลใสกว่าวิธีการแรก ประมาณ 2 มิลิลิตร ส่วนวิธีการที่ 3 ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อด้วย 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) แล้วแยกเอาส่วน OTA ที่ไม่ได้คอนจูเกตออกโดยการผ่าน NAP-10 column ได้ OTA-HRP conjugate ประมาณ 4 มิลิลิตร (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 เอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate) ที่เตรียมได้จากทั้ง 3 วิธีการ

4. ทดสอบความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate

ทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์คอนจูเกต OTA-HRP ที่เตรียมได้ด้วยวิธี Direct competitive ELISA พบว่า สีในหลุมทดสอบเรียงกันจากสีฟ้าเข้ม-สีฟ้าจาง ตามความเข้มข้นของสาร โดยหลุมที่มีความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate มาก (1:100) สีในหลุมทดสอบเป็นสีฟ้าเข้ม ส่วนหลุมที่มีความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate น้อย (1:64000) สีในหลุมทดสอบเป็นสีฟ้าจาง จะเห็นได้ว่าทุกความเข้มข้นของ IgG-OTA ที่เคลือบในหลุมทดสอบ เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมตามวิธีการที่ 1 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าวิธีการที่ 2 และ 3 โดยหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 6 μg/ml ที่ความเข้มข้นสูง 1:100 เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.871 รองลงมาคือวิธีการที่ 2 และ 3 ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.782 และ 0. 867 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำ 1:64000 หลุมทดสอบมีสีฟ้าจางและใส เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสง 0.263 รองลงมาคือวิธีการที่ 2 และ 3 ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.075 และ 0.067 ตามลำดับ (ภาพที่ 17) (ตารางที่ 1) ซึ่ง OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ยังต้องนำไปทดสอบร่วมกับแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ และสารพิษมาตรฐาน เพื่อพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ Indirect- หรือ Direct-competitive ELISA ต่อไป



ภาพที่ 17 ความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ 1, 2 และ 3 ทดสอบในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 μg/ml

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงในหลุมทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate ต่าง ๆ

ความเข้มข้น IgG-OTA (μg/ml)	OTA-HRP Conjugate เตรียมได้ตามวิธีการที่	ค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)							
		ความเข้มข้นของ OTA-HRP Conjugate							
		1:100	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000
5	1	3.795	2.020	1.538	1.129	0.830	0.572	0.392	0.259
5	2	3.711	1.077	0.615	0.368	0.214	0.134	0.096	0.073
5	3	1.024	0.539	0.415	0.302	0.195	0.146	0.106	0.084
6	1	3.871	2.020	1.548	1.198	0.872	0.619	0.406	0.263
6	2	3.782	0.996	0.592	0.348	0.207	0.132	0.095	0.075
6	3	0.867	0.445	0.366	0.252	0.174	0.130	0.095	0.067
7	1	3.613	1.927	1.546	1.187	0.837	0.606	0.378	0.242
7	2	3.458	0.871	0.520	0.311	0.191	0.127	0.090	0.071
7	3	0.950	0.574	0.429	0.302	0.205	0.145	0.103	0.078

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในกระต่ายทดลอง จำนวน 4 ตัว แบบ polyclonal antibody ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยแผนการปฏิบัติงานได้ผ่านการพิจารณาและแก้ไขจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง (NLAC-ACUC) ตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 สามารถผลิตเป็นแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ได้ประมาณ 320 มิลลิลิตร การทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม ที่ผลิตได้เบื้องต้นโดยวิธี Ouchterlony double diffusion test พบว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้เป็นแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ และเมื่อทดสอบความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Indirect Competitive ELISA พบว่า ในสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ในกระต่ายทั้ง 4 ตัวมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มบริสุทธิ์สูง โดยมีความเข้มข้น 1:1024000 และการเชื่อมต่อ ochratoxin A กับเอนไซม์

Horseradish Peroxidase (HRP) เอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมตามวิธีการที่ 1 ซึ่งใช้ Dimethylformamide (DMF) ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ จะมีค่าความเข้มข้นสูงกว่าวิธีการที่ 2 ที่ใช้ DMSO และวิธีการที่ 3 ที่เชื่อมปฏิกิริยาด้วย CDI ซึ่งแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ผลิตได้ และ OTA-HRP conjugate ที่เตรียมได้ ยังต้องนำไปทดสอบต่อร่วมกับสารพิษมาตรฐาน เพื่อพัฒนาเป็นวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ Indirect- หรือ Direct-competitive ELISA ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ที่ผลิตได้ไปพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซินเอ แบบ Indirect competitive ELISA ต่อไป
2. เอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate) ที่เตรียมได้สามารถนำไปทดสอบร่วมกับแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซินเอ แบบ Direct competitive ELISA
3. สามารถนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว ด้วยวิธีทาง Immunoassay เพื่อลดความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณท่านที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร (ดร.อมรา ชินภูติ) ที่ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมากในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ร่วมกันปฏิบัติงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอแสดงความระลึกถึงกระต่ายทดลองทั้ง 4 ตัว ที่ได้สละชีวิตในการปฏิบัติงานในครั้งนี้ เพื่อให้เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในอนาคตต่อไป

12. เอกสารอ้างอิง

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. 2554. โรคพืชและการวินิจฉัย. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์. 2558. พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558. ราชกิจจานุเบกษา 13 มีนาคม 2558. เล่ม 132 ตอนที่ 18 ก หน้า 1-16.

รัชนี ฮงประยูร. 2558. เทคนิคทางซีรัมวิทยาในการวินิจฉัยโรคพืช. นครปฐม: เพชรเกษมพริ้นติ้ง กรุ๊ป.

รัชนี ฮงประยูร, สุวรรณา กลัดพันธุ์, วราภา มหากาญจนากุล, สมลักษณ์ พุ่มระชัฎ และ ศรีหรรษา มลิจารย์. 2552. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ Ochratoxin A โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ประจำปี พ.ศ. 2552. แหล่งที่มา: http://www3.rdi.ku.ac.th/exhibition/53/group02/ratchanee/ratchanee.html. 31 มกราคม 2562

อมรา ชินภูติ. 2551. สารพิษจากเชื้อราและการจัดการ. หน้า1-21. *ใน:* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรอย่างรวดเร็วโดยชุด ตรวจสอบ

สำเร็จรูป “DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit”. สำนักวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

อมรา ชินภูติ, ศุภรา อัคคะสาระกุล, ลิลลี่ พรานุสร, ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และ ชูรัฐ แปลกสงวนศรี. 2551. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซิน เอ็ม 1 ในน้ำนม. เงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 54 หน้า.

อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์. ไม่ปรากฏปีพิมพ์. อิมมูโนโกลบุลิน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. แหล่งที่มา: http://www.cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4713/index.html. 12 กมภาพันธ์ 2562.

อำนาจ พัวพลเทพ. 2562. สารพิษจากเชื้อรา: ภัยเงียบในอาหาร. หน้า 73-82. *ใน:* The 3rd International Conference of Mycotoxicology and Food Security (*ICM 2019*) “The merits driving to refurnish food and feed security”. 6-7 กุมภาพันธ์ 2562 ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

Chu, F.S. 1984. Immunoassays for analysis of mycotoxins. Journal Food Protection 47: 562-569.

Edwin R. Palencia, Dorothy M. Hinton, and Charles W. Bacon. 2010. Review The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. Toxins 2: 399-416.

Harlow, E.d. and Lane, D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1988, 726 p.

Hassan, F.F., Al-Jibouri, M.H., Mustafa, K.A. and Hashim, A.K.J. 2014. Production of antibody (IgG) against aflatoxin B1. Iraqi Journal of Science 55(2A): 394-402.

Lee, S.C. and F.S. Chu. 1984. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of ochratoxin A in wheat. Journal - Association of Official Analytical Chemists 67: 45-49.

Meulenberg E.P. 2012. Immunochemical methods for ochratoxin A detection: a review. Toxins 2012(4): 244-266.

Morgan, M.R.A., McNerney, R. and Chan, H.W.S. 1983. Enzyme Linked Immunosorbant Assay of ochratoxin A in barley. Journal - Association of Official Analytical Chemists 66: 1481-1484.

Radoi, A., Dumitru, L. and Marty, J.L. 2009. Ochratoxin A in some French wines: application of a direct competitive ELISA based on an OTA-HRP conjugate. Analytical Letters 42: 1187-1202.

Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S. and Gekle, M. 1999. Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. Toxicology 135: 1-10.

Stachowiak, M.O., Kleintjens, T., Sajic, N., Haasnoot, W., Campbell, K., Elliott, C.T. and Salden, M. 2017. T-2 Toxin/HT-2 Toxin and ochratoxin A ELISAs development and in-house

validation in food in accordance with commission regulation (EU) no 519/2014. Toxins 9(388): 11-18.

Venkataramana, K., Rashmi, R., Uppalapati, S.R., Chandranayaka, S., Balakrishna, K., Radhika, M., Gupta, V.K. and Batra, H.V. 2015. Development of sandwich dot-ELISA for specific detection of Ochratoxin A and its application on to contaminated cereal grains originating from India. Frontiers in Microbiology (6)511: 1-11.