

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ยาคลอแรมเฟนิคอล โดยวิธี
Competitive ELISA

ผู้วิจัย ชัชชัย ตะยาภิวัดนา¹ และ มุกดา ภัทราราวาพันธ์²

หน่วยงาน ¹ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาชุดน้ำยาทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการ
หาระดับของยาคลอแรมเฟนิคอล ด้วยวิธี competitive enzyme-linked immunoassay
ซึ่งมีการเตรียมโมเลกุลของยาคลอแรมเฟนิคอลที่เชื่อมต่อกับอัลบูมินจากวัวโดยใช้
ปฏิกิริยาทางเคมี จากนั้นนำโมเลกุลที่ได้ไปทำการฉีดกระตุ้นกระต่ายเพื่อผลิตโพลี
โคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิคอล โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของ
กระต่ายถูกนำมาทดสอบความจำเพาะโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ ELISA และ
Western immunoblotting ในการเตรียมชุดน้ำยาทดสอบหาระดับยาคลอแรมเฟนิคอล
ทำโดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยยาคลอแรมเฟนิคอลที่ทำการเชื่อมต่อกับอัลบูมินจาก
โคกกีบอัลบูมินจากไข่ขาว เพื่อเป็นแอนติเจนสำหรับให้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ
คลอแรมเฟนิคอลที่เตรียมได้เข้าจับ เมื่อมีการผสมยาคลอแรมเฟนิคอลในปริมาณที่
ต่าง ๆ กันจะทำให้มีการยับยั้งการจับกันของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อคลอแรมเฟนิ
คอลในซีรัมกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนหลุม ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยใช้
แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของกระต่ายที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอสมเรดิซเปอร์
ออกซิเดส เมื่อเติม TMB/H₂O₂ substrate-buffered solution จะเกิดสีที่มีความเข้ม
แปรเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณของยาคลอแรมเฟนิคอลในสิ่งส่งตรวจ วิธีการที่
พัฒนาขึ้นมีความไวที่ 10 ng/ml และมีการแปรผันเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 10 ถึง 1,280
ng/ml ซึ่งเพียงพอที่จะใช้ในการสุ่มตรวจในผลิตภัณฑ์อาหารได้

Abstract

Title Establishment of Competitive ELISA for the Detection of Chloramphenicol

Researchers Chatchai Tavapiwatana¹ and Mookda Pattarawarapan²

Organization ¹Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences and ²Department of Chemistry, Faculty of Sciences Chiang Mai University.

A quantitative immunoassay for chloramphenicol was optimized using competitive enzyme-linked method. The chemically conjugated chloramphenicol-bovine serum albumin was prepared, determined and subjected as an immunogen in rabbit. Hyperimmune serum containing polyclonal anti-chloramphenicol was subsequently obtained. The characteristic and quality of rabbit polyclonal antibodies were evaluated using certain immunological techniques i.e. ELISA and Western immunoblotting. To establish the immunodetection, chloramphenicol-conjugated ovalbumin was synthesized and coated to the ELISA well. The binding of specific rabbit anti-chloramphenicol antibodies to solid phase-bound chloramphenicol was competitively inhibited by free chloramphenicol in the standard or sample to be assayed. Antibody not displaced was indicated by using a commercially available enzyme-linked anti-rabbit immunoglobulin preparation and reacted with added TMB/H₂O₂ substrate-buffered solution. The amount of chloramphenicol presented was inversely proportional to the measured absorbance. Consequently, the assay sensitivity was 10 ng/ml with the linearity from 10 to 1280 ng/ml. The successfully developed in-house detection system will be useful for screening of consumable food products.