

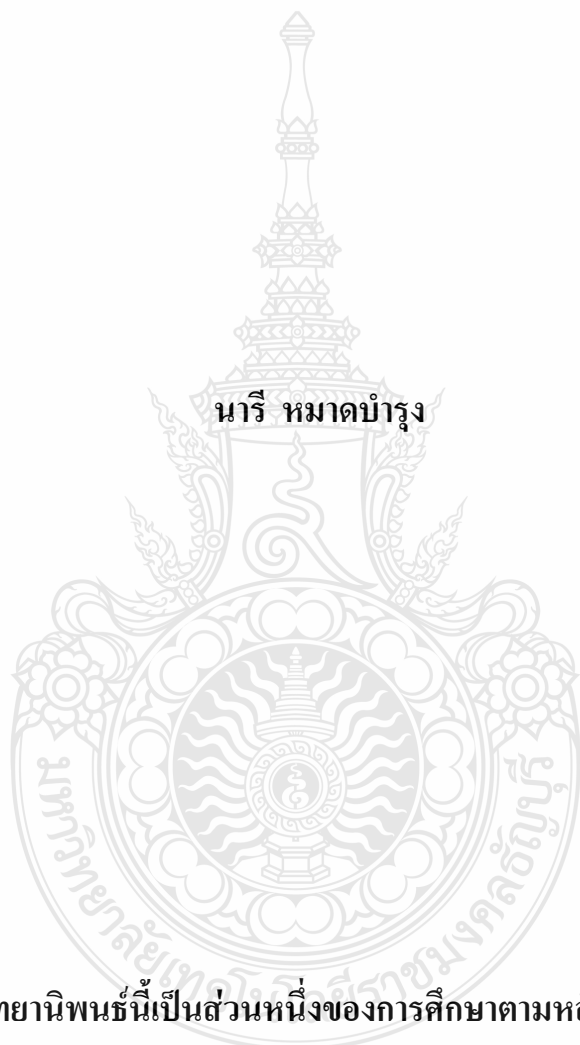
การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็ง

**DEVELOPMENT OF IMMUNOSENSOR FOR TUMOR MARKER
DETECTION**

นารี หมดบำรุง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็ง

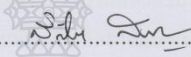


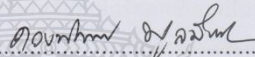
นารี หมดบำรุง

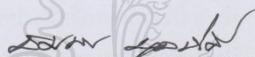
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีนวัตกรรม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี


หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็ง Development of Immunosensor for Tumor Marker Detection
ชื่อ - นามสกุล	นางสาวนารี หมาดบำรุง
สาขาวิชา	เคมีนวัตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ศิริวรรณ คีฎ์, ปร.ค.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สมพร มุลมั่งมี, Ph.D.
ปีการศึกษา	2556

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

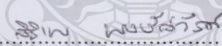

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์สิงห์โต สกุลเขมฤทัย, Ph.D.)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงทิพย์ มุลมั่งมี, Ph.D.)


..... กรรมการ
(อาจารย์สมพร มุลมั่งมี, Ph.D.)


..... กรรมการ
(อาจารย์ศิริวรรณ คีฎ์, ปร.ค.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติ
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิรินัย พงษ์สวัสดิ์, วท.ค.)

วันที่ 6 เดือน ตุลาคม พศ. 2556

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็ง
ชื่อ – นามสกุล	นางสาวนารี หมาดบำรุง
สาขาวิชา	เคมีนิวตกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ศิริวรรณ ตี๋ภู, ปร.ค.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สมพร มุลมังมี, Ph.D.
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณคาร์ซีโนเอมบริโอนิก แอนติเจน (ซีอีเอ) ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิช โดยใช้แมกเนติกบีคเพื่อขยายสัญญาณวิเคราะห์หลักการของเทคนิคนี้อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีกับแอนติเจนของซีอีเอ ตรวจวัดความเข้มข้นของซีอีเอได้โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นสารติดฉลาก เมื่อเติมสารสับสเตรทจะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสีน้ำเงิน และเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกได้สารละลายสีเหลือง สัญญาณค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของซีอีเอ

เริ่มต้นศึกษาหาสภาวะที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวิธีนี้ พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 60 นาที ความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่ตรงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอตินและความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีนี้มีความเที่ยง ความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจงสูง ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงจาก 0.05 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีขีดจำกัดการตรวจวัด 0.005 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สุดท้ายประยุกต์ใช้วิธีนี้เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของซีอีเอในตัวอย่างซีรัม นำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยใช้สถิติ ที-เทส พบว่าทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P=0.05$) สรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีข้อดีคือ มีความไววิเคราะห์สูง ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์และลดการนำเข้าของชุดทดสอบจากต่างประเทศ

คำสำคัญ: สารบ่งชี้มะเร็ง ซีอีเอ อิมมูโนเซนเซอร์ แมกเนติกบีค

Thesis Title	Development of Immunosensor for Tumor Marker Detection
Name – Surname	Miss Naree Mhadbamrung
Program	Innovative Chemistry
Thesis Advisor	Mrs. Siriwan Teepoo, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Mr. Somporn Moonmangmee, Ph.D.
Academic Year	2013

ABSTRACT

The objective of this research was to develop an analytical method for carcinoembryonic antigen (CEA) determination. The proposed method was based on a sandwich immunosensor technique by using magnetic beads to enhance analytical signal. The principle of this technique was focused on the specific binding between antibody and antigen of CEA. The concentration of CEA was measured via peroxidase as an enzyme labeling. When the substrates were added, the production of blue color was obtained. This reaction was stopped by sulfuric acid and then provided yellow solution. The absorbance signal was directly proportional to CEA concentration.

Firstly, parameters influencing the performance of this method were optimized. The optimized of primary antibody concentration was 0.1 mg/ml. The reaction time was 60 min. The optimized concentration of magnetic beads immobilizing antibody labeled with biotin and the concentration of streptavidin-peroxidase were 0.5 and 0.01 mg/ml, respectively. Under optimizations, it was found that this method provided high precision, accuracy and selectivity with a linear range of 0.05-50 ng/ml. The limit of detection was 0.005 ng/ml. Finally, the proposed method was applied for the detection of CEA concentrations in serum samples. When compared with the standard method by t-test, it was found that there was no difference between the results from the two methods at the statistically significant level of 95% ($P=0.05$).

In conclusion, the following advantages were obtained from this method: high sensitivity, cost-effective use and reduction of imported test kits.

Keywords: tumor marker, CEA, immunosensor, magnetic bead

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือ คุณดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจากหลายๆฝ่าย โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ ดร.ศิริวรรณ ตีโก้ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คือ ดร.สมพร มุลมั่งมี ในการแนะนำ ตรวจสอบ ให้ออกแนะ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านอาจารย์ทั้งสองท่านนี้เป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สิงห์โต สกฤตเชมฤทัย ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ออกแนะ แก่ใจ และให้แนวคิดต่างๆที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงทิพย์ มุลมั่งมี กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่สละเวลามาเป็นกรรมการสอบ ให้คำปรึกษา และแนะนำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ทุนการศึกษาในโครงการภาคีบัณฑิตศึกษา ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ที่ทำให้งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชา บ่มเพาะจนผู้วิจัยสามารถนำเอาความรู้และหลักการต่างๆ มาประยุกต์ใช้และอ้างอิงในงานวิจัยครั้งนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกเหนือจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความช่วยเหลือและกำลังใจจาก คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง และเพื่อนๆ ตลอดจนบุคคลต่างๆ ที่ให้ความช่วยเหลืออีกมากมาย ที่ผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และปรารถนาดีของท่านเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

นารี หมาดบำรุง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญตาราง.....	(8)
สารบัญรูป.....	(9)
บทที่ 1 บทนำ.....	11
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	11
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	12
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	12
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	14
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	16
บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
2.1 คาร์ซีโนเอมบริโอนิกแอนติเจน.....	17
2.2 วิธีการตรวจหา CEA.....	18
2.3 การเพิ่มความไววิเคราะห์.....	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	33
3.2 การทดลอง.....	35
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	45
4.1 การตรึงแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี.....	45
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์.....	46
4.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ (Validation method).....	56
4.4 การหาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยใช้แมกเนติกบีด.....	63
4.5 การตรวจหา CEA ในตัวอย่างซีรัม.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	66

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.1 สรุปผลการทดลอง	66
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	68
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก.....	74
ภาคผนวก ก ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ	75
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณ.....	81
ประวัติผู้เขียน.....	89



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์ปริมาณ CEA.....	39
ตารางที่ 3.2 แสดงสถานะที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA.....	42
ตารางที่ 4.1 ผลของการหยุดปฏิกิริยาโดยใช้กรดซัลฟิวริก	46
ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์	48
หาปริมาณ CEA	
ตารางที่ 4.3 แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์	50
หาปริมาณ CEA	
ตารางที่ 4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของ CEA.....	51
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วย	53
ไบโอดีความเข้มข้นต่างๆ	
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆ	55
ตารางที่ 4.7 แสดงผลการศึกษการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจหาปริมาณ CEA.....	56
ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาก่อนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจหาปริมาณ CEA.....	57
ตารางที่ 4.9 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA.....	58
ในตัวอย่างซีรัม	
ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA.....	60
ที่ความเข้มข้นต่างๆ	
ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ.....	62
ตารางที่ 4.12 แสดงผลการหาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบ	63
ระหว่างการใช้แมกเนติกบีดและไม่ใช้แมกเนติกบีด	
ตารางที่ 4.13 การทดสอบผลการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ด้วยสถิติ t-test.....	65

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 หลักการตรวจหาปริมาณ CEA โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิช	15
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของแอนติบอดี	19
รูปที่ 2.2 การจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน ในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์	21
รูปที่ 2.3 การตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอดีบนเมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี	22
รูปที่ 2.4 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง	23
รูปที่ 2.5 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA.....	24
รูปที่ 2.6 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	25
รูปที่ 2.7 อิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิชเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA.....	26
รูปที่ 2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า	27
รูปที่ 2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิชโดยใช้.....	28
ตัวตรวจวัดทางแสง	
รูปที่ 2.10 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้อนุภาคนาโนทองในการเพิ่มพื้นที่ผิว.....	29
รูปที่ 2.11 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้อนุภาคนาโนเงินร่วมกับอนุภาคนาโนทอง.....	30
รูปที่ 2.12 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุแม่เหล็กโดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน.....	31
รูปที่ 2.13 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุแม่เหล็กโดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิช	32
รูปที่ 3.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยไบโอดี.....	36
รูปที่ 3.2 การตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอดีบนเมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี	36
รูปที่ 3.3 หลักการตรวจหาปริมาณ CEA โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิช	38
รูปที่ 4.1 สมบัติทางกายภาพของเมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีก่อนตรึงแอนติบอดี.....	45
(รูป ก) และเมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีหลังตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลาก ด้วยไบโอดี(รูป ข) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	
รูปที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองโดยไม่ใช้กรดซัลฟิวริก(ก) และใช้.....	47
กรดซัลฟิวริกในการหยุดปฏิกิริยา(ข)	
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีตัวหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ...	49
รูปที่ 4.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	50

สารบัญรูป(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของ CEA	51
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของ CEA	52
รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	53
รูปที่ 4.8 แสดงผลของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ในการ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	54
รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการ ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	55
รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของ CEA ที่ความเข้มข้นต่างๆในสารตัวอย่าง	58
รูปที่ 4.11 แสดงความเข้มของสารละลายสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CEA ที่เพิ่มขึ้น	59
รูปที่ 4.12 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ CEA	60
รูปที่ 4.13 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA	61
รูปที่ 4.14 แสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์	62
รูปที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้แมกเนติกบีด และไม่ใช้แมกเนติกบีด	64
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของการวัด CEA ในสารตัวอย่าง	65

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคที่เกิดจากการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์ในปัจจุบันซึ่งมีมากกว่า 100 ประเภท หนึ่งในนั้นคือโรคมะเร็ง ซึ่งความอันตรายของโรคมะเร็งนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์ก่อตัวกันเป็นก้อนเนื้อเยื่อ เรียกว่า “เนื้องอก” (มีข้อยกเว้น สำหรับมะเร็งในเม็ดเลือดขาว โดยมะเร็งจะไปยับยั้งการทำงานของเลือด และทำให้เกิดความผิดปกติในกระแสเลือด) ซึ่งโรคมะเร็งนั้นเป็นโรคที่พบบ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันซึ่งมีมลภาวะจากสภาวะแวดล้อมต่างๆในประเทศ และประชาชนส่วนใหญ่ เอาใจใส่ดูแลสุขภาพตนเองน้อยลง ออกกำลังกายน้อยลง และการรับประทานอาหารอย่างไม่เลือก ปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้ประชาชนเป็นโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้น ซึ่งโรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ และรักษาให้หายขาดได้เช่นกัน หากมีการตรวจวินิจฉัยได้ตั้งแต่ระยะเริ่มเป็น โรคมะเร็งส่วนใหญ่ที่พบบ่อยในอันดับต้นๆของคนไทย คือ โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในปัจจุบัน ซึ่งหากมีการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งอยู่สม่ำเสมอ และทำการตรวจหาความผิดปกติในร่างกายได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มแรก พบว่าอัตราการเสียชีวิตลดลงอย่างชัดเจนในผู้ป่วยที่พบว่าเป็นโรคมะเร็งในระยะเริ่มแรก ซึ่งการตรวจหาความผิดปกตินี้ ก็คือการตรวจหาสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย หรือสารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor marker) นั้นเอง ซึ่งสภาวะที่เซลล์ในร่างกายเกิดความผิดปกติ มีสารพันธุกรรมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยสารต่างๆ เหล่านี้ที่เกิดจากเซลล์มะเร็ง เรียกว่าเป็นสารบ่งชี้มะเร็ง ซึ่งสามารถตรวจหาความผิดปกติต่างๆได้จากเลือด หรือ สารคัดหลั่งในร่างกาย เช่น น้ำในช่องปอดของผู้ป่วยรายนั้นๆ

สารบ่งชี้มะเร็งนั้นมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัย ซึ่งการดูแลผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง และการตรวจหาปริมาณสารบ่งชี้มะเร็ง โดยการตรวจก่อนการรักษา นั้นมีประโยชน์ต่อการวางแผนเพื่อทำการรักษา และในโรคมะเร็งบางชนิด ปริมาณสารบ่งชี้มะเร็งนั้นยังสามารถบ่งถึงระยะของโรคได้อีกด้วย

คาร์ซิโนเอมบริโอนิก แอนติเจน (Carcinoembryonic antigen; CEA) เป็นสารบ่งชี้มะเร็ง ซึ่ง CEA สามารถตรวจพบได้ทั้งในผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งในร่างกายคนปกติจะมีค่า CEA น้อยกว่า 2.5 ng/ml และมีค่าน้อยกว่า 5.0 ng/ml สำหรับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และสำหรับผู้ที่สูบบุหรี่ตามลำดับ

วิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ CEA ที่นิยมใช้ทางอิมมูโนวิทยา คือ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยาระหว่าง

แอนติบอดีและแอนติเจน วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์โดยทั่วไปทางเคมีคลินิก แต่มีข้อเสียคือ ชุดทดสอบมีราคาแพง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และต้องใช้ร่วมกับเครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง ซึ่งเมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีเทคนิคที่น่าสนใจสำหรับการตรวจหา CEA อีกวิธีหนึ่งคือ เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ (Immunosensor) [1] มีข้อดี คือ ให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว ราคาถูก ใช้เครื่องมือพื้นฐาน และให้จีตจำกัดการตรวจวัดค่า [2]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดหาสารบ่งชี้มะเร็ง (CEA) โดยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) ประเภทอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช และใช้วัสดุแม่เหล็กในการเพิ่มความไววิเคราะห์ ทำให้ตรวจวัด CEA ได้ในความเข้มข้นต่ำๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีอิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวิเคราะห์หา CEA โดยใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หา CEA

1.2.3 เพื่อหาประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์หา CEA

1.2.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ตรึงแอนติบอดี (anti-CEA) บนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

1.3.1.1 ศึกษาวิธีการตรึงแอนติบอดี (anti-CEA) บนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี ด้วยเทคนิคโควาเลนต์โดยใช้สารเชื่อมไขว้

1.3.1.2 ทดสอบการเกาะติดของแอนติบอดีบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีน โดยใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) โดยเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพระหว่างก่อนและหลังการเกาะติดของแอนติบอดีบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

1.3.1.3 ตรวจสอบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจน โดยพิจารณาจากผลของการเกิดปฏิกิริยา ถ้าแอนติเจนจับกับแอนติบอดีจะเกิดสารใหม่เกิดขึ้นที่มีสีน้ำเงิน และเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก จะได้เป็นสารละลายสีเหลือง ความเข้มของสีที่ได้จะต้องแปรผันตรงตามความเข้มข้นของปริมาณ CEA

1.3.2 เตรียมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (anti-CEA-biotin)

1.3.2.1 ศึกษาวิธีการติดฉลากแอนติบอดีด้วยไอโอดีน

1.3.2.2 ทดสอบการเกาะติดของไอโอดีนบนแอนติบอดีด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer) โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงระหว่างก่อนและหลังติดฉลากด้วยแอนติบอดี

1.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณ CEA เพื่อให้สามารถวิเคราะห์หา CEA ในความเข้มข้นต่ำในระดับความเข้มข้นที่กำหนดไว้ได้ (<5.0 ng/ml) ได้แก่

1.3.3.1 ศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยา

1.3.3.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวหนึ่งที่เหมาะสม

1.3.3.3 ศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

1.3.3.4 ศึกษาผลความเข้มข้นของ CEA

1.3.3.5 ศึกษาหาความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไอโอดีนที่เหมาะสม

1.3.3.6 ศึกษาหาความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม

1.3.4 หาประสิทธิภาพของวิธีตรวจวิเคราะห์หา CEA เพื่อให้ได้วิธีที่ถูกต้องและแม่นยำ

1.3.4.1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

1.3.4.2 การทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ (Repeatability) โดยการทำซ้ำ 7 ครั้งในวันเดียวกัน

1.3.4.3 การทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ (Reproducibility) โดยการทดลองวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน

1.3.4.4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) โดยการเติม CEA ลงไปในตัวอย่างจริง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของวิธี โดยเปอร์เซ็นต์ที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 40-120%

1.3.4.5 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) โดยค่าความเป็นเส้นตรงต้องมากกว่า 0.95

1.3.4.6 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ (Limit of Qualitative; LOQ)

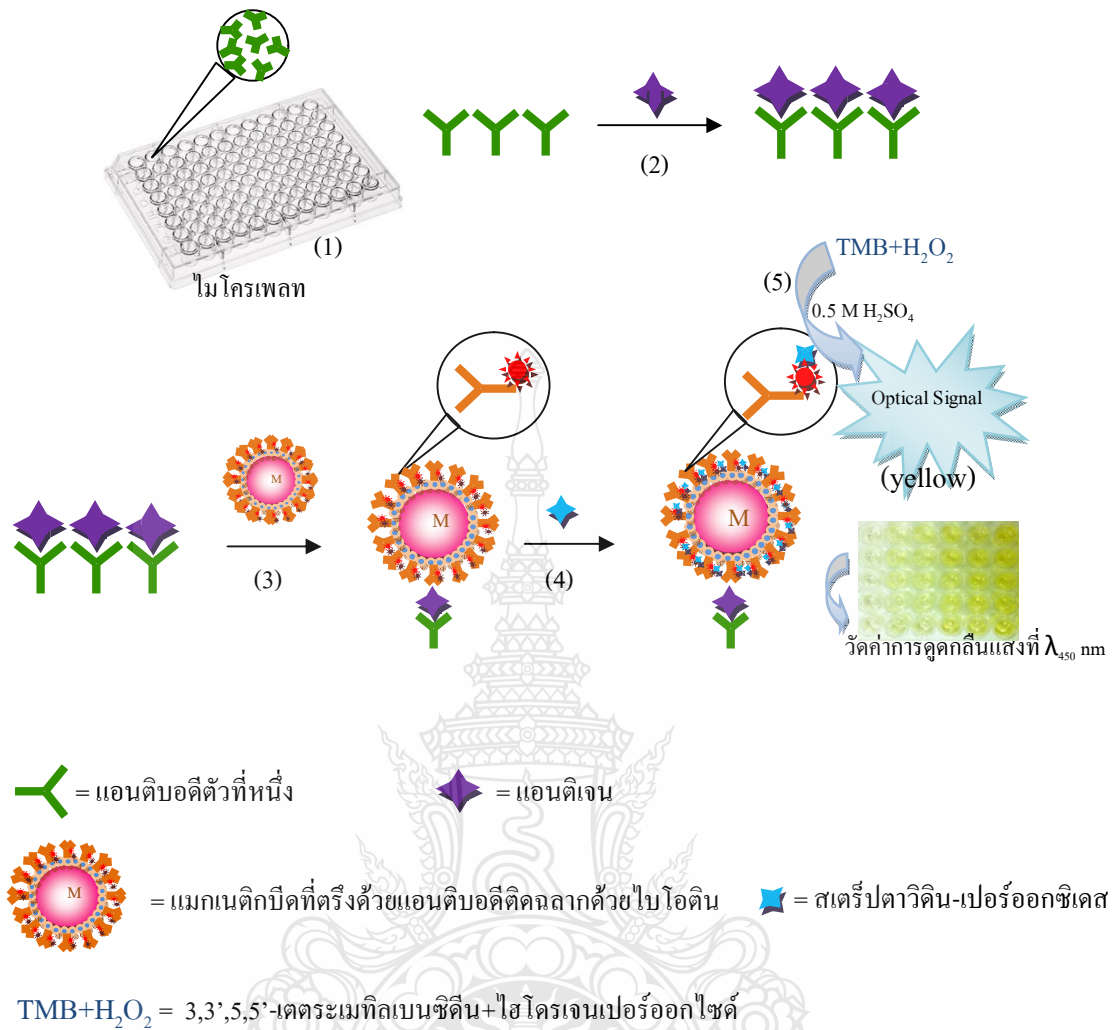
1.3.4.7 หาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity)

1.3.5 ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริง โดยผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีที่โรงพยาบาลใช้ คือวิธี ELISA

1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย

เนื่องจากระดับปริมาณ CEA ในเลือดนั้นพบได้ในปริมาณน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความไววิเคราะห์สูง (sensitivity) จึงทำให้ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์หา CEA ด้วยแมกเนติกบีดเคลือบด้วยโปรตีนจี โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ โดยใช้หลักการตรวจวัดแบบแซนวิช (sandwich-type) [3] เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดให้ดียิ่งขึ้น โดยมีแนวความคิดดังรูปที่ 1.1 การจับกันของแอฟฟินิตีไบโอเซนเซอร์แบบแซนวิช เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจน CEA ในกรณีที่ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มี CEA โดยที่ CEA ในตัวอย่างจะไปจับกับแอนติบอดีของ CEA (anti-CEA) ที่เคลือบอยู่บนไมโครเพลท เมื่อเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน (แอนติบอดีตัวที่สอง) ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปจับกับแอนติเจน CEA เมื่อเติมสเตรปตาวิดีน-เปอร์ออกซิเดส และเติมสับสเตรท 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; TMB) ผสมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสีฟ้า แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสีเหลือง และความเข้มข้นของสีจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ CEA ในตัวอย่าง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 nm จึงใช้หลักการนี้ในงานวิจัยเพื่อตรวจหาปริมาณ CEA





รูปที่ 1.1 หลักการตรวจหาปริมาณ CEA โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช
 ขั้นที่ (1) การเคลือบแอนติบอดีตัวที่หนึ่งในไมโครเพลท ขั้นที่ (2) การเติมแอนติเจน (CEA)
 ขั้นที่ (3) การเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลาดด้วยไบโอติน ขั้นที่ (4) การเติม
 สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ขั้นที่ (5) การเติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซีนผสมกับ
 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีอิมมูโนเซนเซอร์ในการตรวจวิเคราะห์หา CEA โดยใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

1.5.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หา CEA

1.5.3 ได้วิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์หา CEA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.5.4 สามารถตรวจหา CEA ในตัวอย่างจริงได้



บทที่ 2

วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คาร์ซีโนเอมบริโอนิก แอนติเจน

เป็นแอนติเจนชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่ม Oncofetal antigen ซึ่งสามารถสร้างเป็นปกติได้จากเซลล์ตับ ตับอ่อน และลำไส้ของทารกในครรภ์ซึ่งมีอายุครรภ์ประมาณ 2-6 เดือน ซึ่งจะสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่ง สำหรับตรวจหามะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยในร่างกายปกติจะมีค่า CEA น้อยกว่า 2.5 ng/ml และน้อยกว่า 5.0 ng/ml สำหรับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ และผู้ที่สูบบุหรี่ตามลำดับ ในการกำหนดระดับปริมาณของ CEA ว่าผู้ป่วยรายนั้นป่วยเป็นโรคมะเร็งต้องมีค่าสูงเกินค่าปกติอยู่ 5-10 เท่า และนอกจากนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอ่อนอักเสบ ตับแข็ง โรคปอดอักเสบ ทางเดินอาหารอักเสบก็จะมีค่า CEA สูง แต่พบว่าสูงไม่มากนัก ส่วนในรายที่พบว่าค่า CEA ที่สูงมากๆนั้น จะสามารถบ่งบอกถึงการแพร่กระจายของโรคนั้นได้

ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ควรมีการตรวจ CEA เป็นระยะๆอย่างน้อยทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง จะช่วยให้การวินิจฉัยมีความแน่นอนมากยิ่งขึ้น และเมื่อพบว่าการตรวจคัดกรองแต่ละครั้งมีค่า CEA สูงขึ้นเรื่อยๆ โดยการติดตามผลการรักษา ควรจะมีการตรวจปริมาณ CEA ก่อนการผ่าตัดเอาไว้ก่อน เนื่องจากค่า CEA ในร่างกายของแต่ละคนมีปริมาณไม่เท่ากัน และหลังจากการผ่าตัดเรียบร้อยแล้วควรมีการตรวจปริมาณ CEA เป็นระยะๆ ซึ่งถ้าหลังการผ่าตัดพบว่ามีค่า CEA สูงขึ้นเกิน 10 ng/ml แสดงว่าเชื้อมะเร็งกลับมาใหม่อีกครั้ง ซึ่งโดยหลักๆ CEA ไม่ได้มีไว้สำหรับวินิจฉัยโรคมะเร็งอย่างเดียว แต่มีไว้สำหรับติดตามการแพร่กระจายของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และโรคมะเร็งชนิดอื่นๆอีกด้วย นอกจากนี้ CEA ยังใช้สำหรับติดตามการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็ง ดังนั้นการตรวจวัดระดับปริมาณของ CEA ในเลือดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยโรค และรักษาโรคมะเร็ง

CEA เป็นสารโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่สร้างมาจากเซลล์บางชนิดในระยะที่ยังเป็นทารกในครรภ์มารดา หรือจากเซลล์มะเร็งบางชนิด [3] เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งตับอ่อน มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งถ้าตรวจพบว่า ในเลือดมีระดับ CEA สูง อาจบ่งถึงการเกิดขึ้นใหม่ของเซลล์มะเร็งนั้นๆ ซึ่ง CEA เป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง ซึ่งพบครั้งแรกในปี 1965 [4] โดยพบจาก adenocarcinoma ของลำไส้ใหญ่ โดยต่อมาพบว่ามีในตับอ่อน ลำไส้ ตับ ของทารกในครรภ์และจะเริ่มมีปริมาณลดลงเมื่อโตขึ้น และในผู้ใหญ่ก็ยังคงมีการสร้าง CEA บ้าง แต่มีในปริมาณเล็กน้อย CEA เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) [5-6] ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 200 ± 20 kDa ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวและ

คาร์โบไฮเดรต 45-60% ที่ผลิตจากเซลล์มะเร็งแล้วหลุดออกไปสู่กระแสเลือด สามารถพบได้ทั้งในมะเร็งของ ปอดเต้านม ตับ หรือตับอ่อน ลำไส้ใหญ่-ไส้ตรง โดยเฉลี่ยแล้ว ระดับค่า CEA ที่สูงพบได้ 40-80% ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งดังกล่าวข้างต้น แต่สำหรับในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่-ไส้ตรง จะมีระดับ CEA ในเลือดสูงมาก และสามารถพบได้บ่อยกว่าโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ

2.2 วิธีการตรวจหา CEA

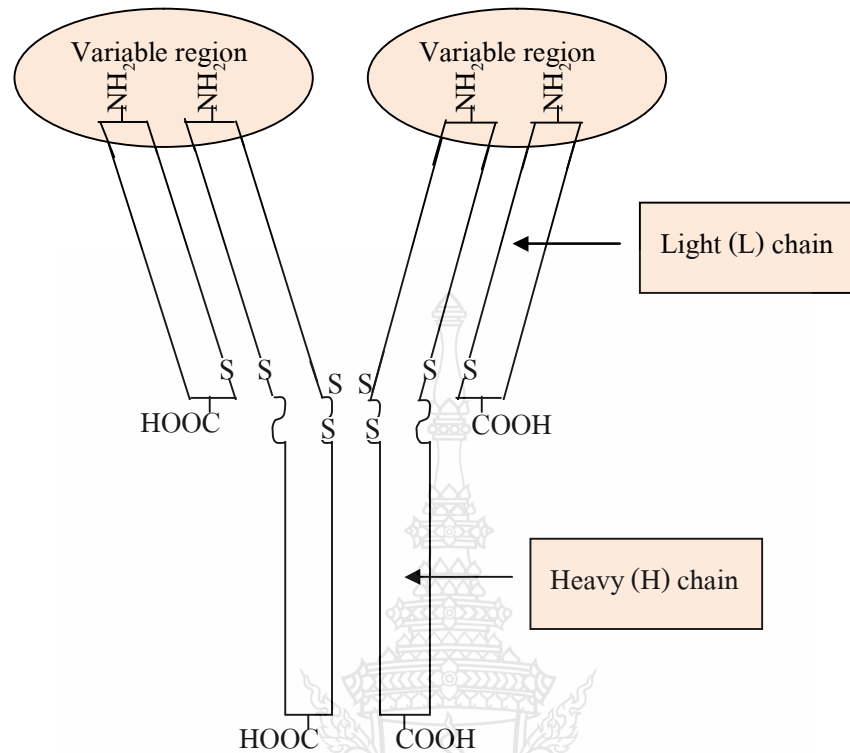
การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CEA ในทางการแพทย์โดยทั่วไปใช้วิธีการตรวจวัดคือ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [2,7-10] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สำหรับการตรวจสอบทางเคมีคลินิก แต่เนื่องจากต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก ชุดทดสอบต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และต้องใช้ร่วมกับเครื่องมือเฉพาะ คือ microplate reader จากปัญหาดังกล่าวทำให้เมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้นำเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CEA และนำผลการตรวจวัดเทียบกับวิธี ELISA พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีได้ผลใกล้เคียงกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีแนวคิดที่จะนำเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CEA [4,11-12] ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธี ELISA คือ ไม่มีขั้นตอนในการเตรียมที่ซับซ้อน สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย ใช้เวลารวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อย ตรวจสอบได้ที่ปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ และสามารถสร้างชุดทดสอบขึ้นมาได้เองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ร่วมกับเครื่องมือตรวจวัดทั่วไป

วิธีอิมมูโนเซนเซอร์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหา CEA ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความไววิเคราะห์สูง โดยอาศัยหลักการการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนอย่างจำเพาะเจาะจง

2.2.1 การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน

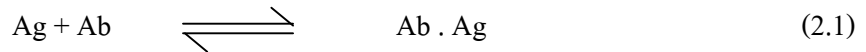
2.2.1.1 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

แอนติบอดี หรือที่เรียกกันอีกอย่างคือ อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) เป็นโปรตีนซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบิน เป็นสารละลายที่สร้างและหลั่งมาจาก plasma cell มีคุณสมบัติสามารถจับกับ antigenic determinant ของแอนติเจน (Antigen, Ag) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยส่วนใหญ่แอนติบอดีจะอยู่ในส่วนของ γ -globulin และมีส่วนที่อยู่ในส่วนของ β -globulin ซึ่งเป็นส่วนน้อย ดังนั้นจึงเรียกแอนติบอดีได้ว่า Immunoglobulin (Ig) (รูป 2.1) [13]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของแอนติบอดี

แอนติบอดีประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ทั้งหมด 4 สาย โดยแยกเป็น Light (L) chain 2 สาย และ Heavy (H) chain 2 สาย โดยมีปลายข้างหนึ่งในแต่ละสายเป็นหมู่เอมิโน (-NH₂-) ซึ่งเรียกว่า N-terminal และมีปลายอีกข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล (-COOH-) เรียกว่า C-terminal โดยที่สายโพลีเปปไทด์ทั้งหมดนี้จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และสายโพลีเปปไทด์ในแต่ละส่วนจะเรียกว่า domain โดยปลายด้าน N-terminal จะเป็นส่วนที่จับกับแอนติเจน เรียกปลายส่วนนี้ว่า variable region ส่วนด้าน C-terminal จะค่อนข้างคล้ายกันในแต่ละสาย เรียกส่วนนี้ว่า constant region สามารถบอกถึงชนิดของแอนติบอดีได้ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิดตามความแตกต่างของ H-chain คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งมี H-chain เป็น γ , α , μ , δ และ ϵ ตามลำดับ ซึ่งแต่ละชนิด จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน คุณสมบัติทางชีวภาพ ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต antigenic determinant การเรียงตัวของกรดอะมิโน และการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน [14-16] โดยแอนติบอดีจากจุลินทรีย์นั้น จะมีองค์ประกอบของโปรตีน มีความสามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจงด้วยกลไก ดังสมการที่ 2.1



$$\text{ค่าคงที่ของการจับ (affinity constant;K) = } \frac{[\text{Ab} \cdot \text{Ag}]}{[\text{Ag}][\text{Ab}]} = 10^6$$

2.2.1.2 แอนติเจน (Antigen, Ag)

แอนติเจน เป็นสารหรือสิ่งแปลกปลอมที่ไม่มีอยู่ในร่างกายและเมื่อเข้าสู่ร่างกาย สิ่งแปลกปลอมนี้จะสามารถกระตุ้นทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ (specific immune response) โดยจะทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี หรือ T lymphocyte (มีหน้าที่ทำลายเซลล์เป้าหมาย ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน) ที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific sensitized T lymphocyte) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนนั้น ๆ ได้ [14,17-20] ซึ่งแอนติเจนมีคุณสมบัติ 2 ประการด้วยกัน คือ

1) Immunogenicity หมายถึง ความสามารถในการกระตุ้น ที่ทำให้เกิด specific immune response โดยสาร immunogen คือสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิด specific immune response ได้

2) Specific reactivity หรือ antigenicity หมายถึง แอนติเจนชนิดนั้น ๆ สามารถทำปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติบอดี หรือ T lymphocyte ที่มากระตุ้นให้เกิดการสร้างขึ้นบนแอนติเจน 1 โมเลกุลจะประกอบไปด้วยตำแหน่งย่อยเล็ก ๆ ที่จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ซึ่งเรียกตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนนี้ว่า antigenic determinant หรือ epitope แอนติเจนแต่ละตัวจะมี antigenic determinant ได้ในจำนวนที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป [14,15-16,20]

2.2.1.3 การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เกิดจากใช้แรงในการจับกันอย่างอ่อนๆ ซึ่งเป็น noncovalent bond ได้แก่

1) Electrostatic force (Coulombic force) เป็นแรงที่เกิด เนื่องจากการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยประจุที่แตกต่างกัน

2) Hydrogen bonding force เป็นแรงที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่าง hydrophilic group เช่น -OH, -NH₂, COOH เป็นต้น ความแข็งแรงระหว่างพันธะขึ้นอยู่กับความใกล้ชิดระหว่างโมเลกุล

3) Hydrophobic force เป็นแรงผลักระหว่างโมเลกุลที่ไม่มีขั้วกับโมเลกุลของน้ำ โดยเกิดจากการรวมตัวกันของสารที่ไม่มีขั้วหันส่วนที่เป็น hydrophobic group เข้าหากัน

4) Van der Waals force คือแรงระหว่างโมเลกุลที่อยู่ใกล้กัน แล้วเกิดปฏิกริยาระหว่าง external electron clouds เพื่อให้แรงดึงดูดของประจุอยู่ในสภาวะสมดุล

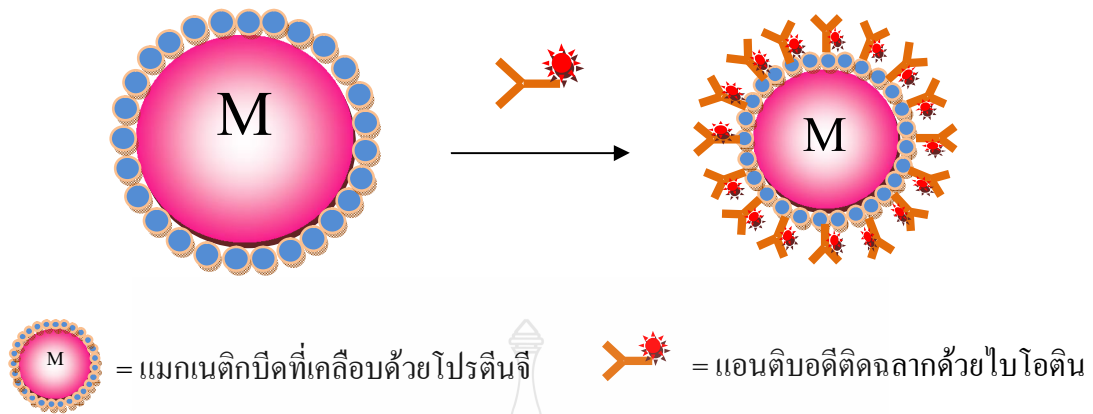


รูปที่ 2.2 การจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน ในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ ที่มาของรูปภาพตัดแปลงมาจาก [21]

2.2.1.4 การตรึงแอนติบอดีบนวัสดุแม่เหล็ก

ในงานวิจัยนี้จะตรึง anti-CEA ซึ่งเป็นชนิด IgG1 โดยจะตรึง anti-CEA ไว้บนวัสดุแม่เหล็กที่เคลือบด้วยโปรตีนจี โดยใช้พันธะโควาเลนต์ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรง

โปรตีนจี เป็นโปรตีนที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงแอนติบอดีชนิด IgG1 ทั้งนี้เพราะสามารถควบคุมให้ในส่วนของโคนของแอนติบอดีให้มาจับกับโปรตีนจี แล้วหันส่วนปลายของแอนติบอดีออกข้างนอก เพื่อจับกับแอนติเจน [22-23] ดังรูปที่ 2.3 จึงทำให้สามารถตรวจหาปริมาณแอนติเจนในความเข้มข้นต่ำๆได้



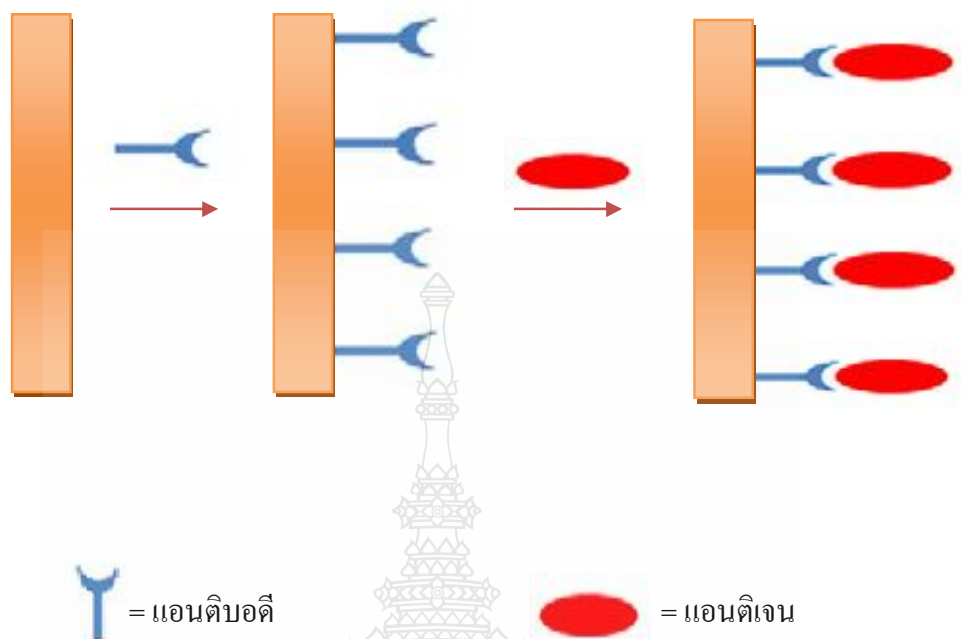
รูปที่ 2.3 การตรึงแอนติบอดีที่ติดบนเมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีน

2.2.2 ประเภทของอิมมูโนเซนเซอร์

อิมมูโนเซนเซอร์เป็นเทคนิคทางไบโอเซนเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารทางด้านอิมมูโนวิทยา (immunology) [24] ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่สำคัญและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากวิธีนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคในช่วงเบื้องต้น โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีกับแอนติเจนหรือสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ การตรวจวัดโดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์นี้ สามารถแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

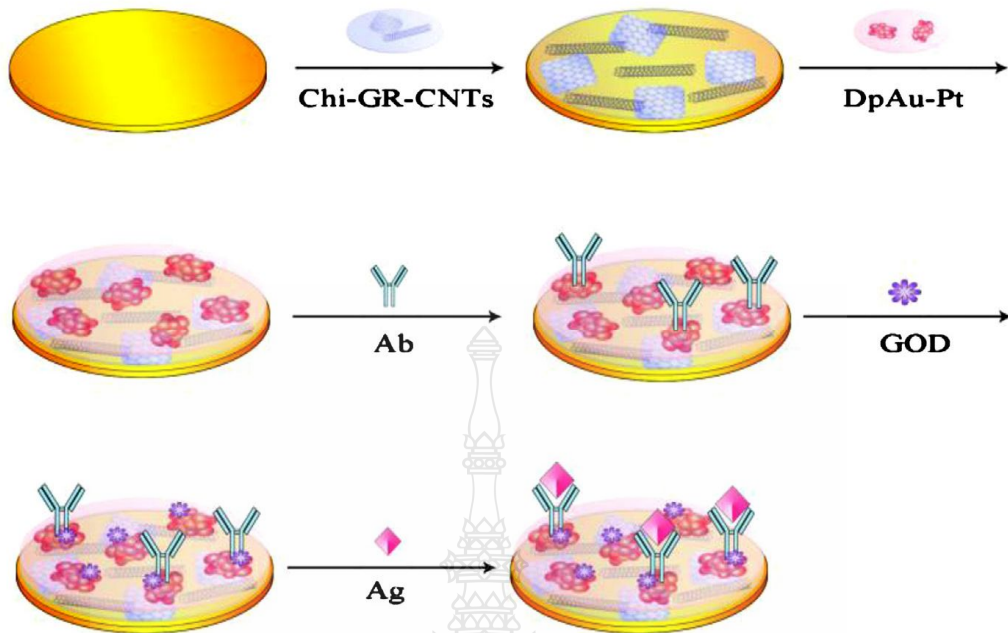
2.2.2.1 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง (Direct immunosensor)

เป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่าง โดยมีหลักการคือให้แอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดจับกับแอนติบอดีโดยตรง ผลจากที่แอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา ทำให้สมบัติทางกายภาพเปลี่ยนไปด้วยตัวตรวจวัด และวัดผลจากสมบัติทางกายภาพที่เปลี่ยนไป ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน [25] แต่มีข้อจำกัดคือตัวตรวจวัดที่ใช้จะต้องมีความไววิเคราะห์สูง เนื่องจากมีผลการเปลี่ยนที่เกิดขึ้นจากการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเกิดขึ้นน้อย หรือแอนติเจนจะต้องมีน้ำหนักโมเลกุลมาก เพื่อที่จะสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงหลังจากแอนติเจนจับกับแอนติบอดีได้ง่าย



รูปที่ 2.4 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง

ได้มีงานวิจัยที่ใช้วิธีอิมมูโนเซนเซอร์แบบตรง เช่น การหาปริมาณ CEA โดยการใช้อุภาคนาโนทองและนาโนแพลตตินัม ตรึงบนขั้วไฟฟ้าแกรไฟต์ คาร์บอนนาโนทิวบ์ดังรูปที่ 2.5 แล้วตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนบนอนุภาคนาโนดังกล่าว บล็อกด้วยกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase; GOD) จากนั้นเติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดลงไป สัญญาณที่ได้ ขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนในสารตัวอย่าง ซึ่งจากผลที่ได้ พบว่า สามารถตรวจวัด CEA ได้ในช่วงความเข้มข้น 0.1 pg/ml ถึง 40 ng/ml มีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.03 pg/ml (S/N = 3) [26]



รูปที่ 2.5 อิมมูโนเซนเซอร์แบบตรงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA [26]

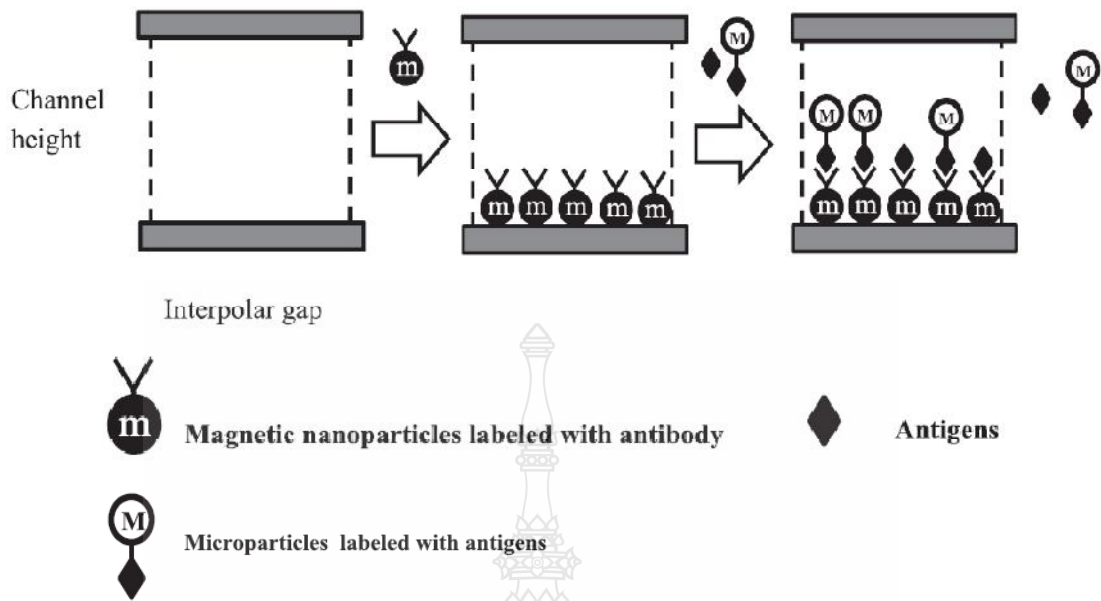
Chi-GR-CNTs = Chitosan-graphene-single wall carbonnanotubes

DpAu-pt = Au nanoparticle-Pt nanoparticle electrodeposited

GOD = glucose oxidase

2.2.2.2 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน (Competitive immunosensor)

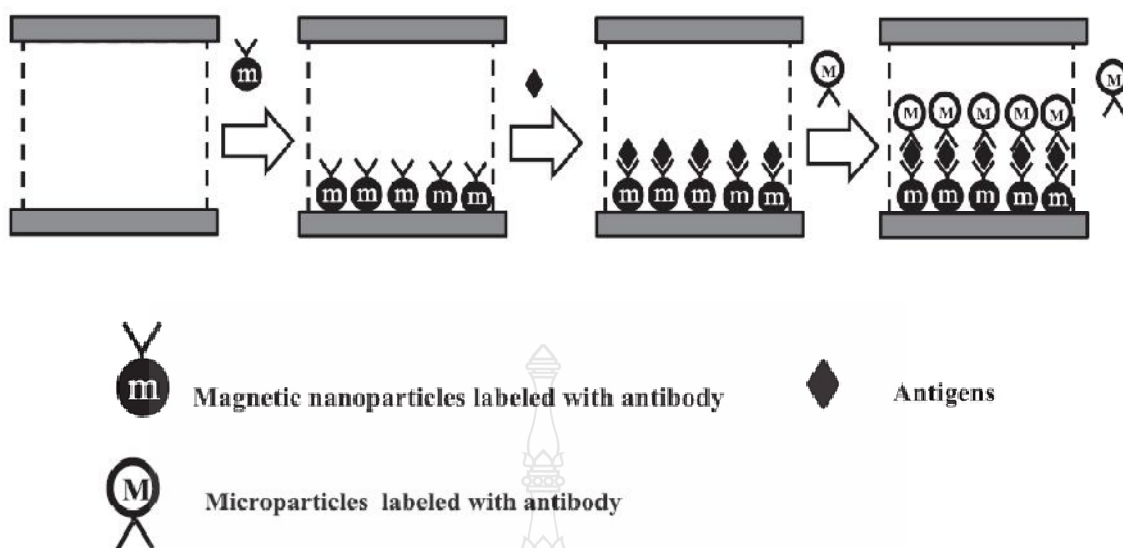
หลักการของอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน จะอาศัยการแข่งขันการเข้าจับกับแอนติบอดีระหว่างแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัด และแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารติดตาม เช่น เอนไซม์ หรือ วัสดุ นาโน สามารถหาปริมาณแอนติเจนที่ได้จากสารติดตามที่ติดอยู่กับแอนติเจน โดยสัญญาณที่ได้ นั้นจะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนในตัวอย่าง การวิเคราะห์หาแอนติเจนด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับสารที่มีโมเลกุลน้อย เช่น หาปริมาณ CEA โดยการใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่ตรึงด้วยแอนติบอดี จากนั้นเติมสารแอนติเจน และอนุภาคนาโนโครมิตติดฉลากด้วยสารแอนติเจน [11]



รูปที่ 2.6 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA [11]

2.2.2.3 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช (Sandwich immunosensor)

การตรวจวัดโดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช เป็นการตรวจวัดโดยทางอ้อม โดยการตรึงแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (Primary antibody) บนตัวตรวจวัด และแอนติเจนจะเข้าจับกับแอนติบอดีที่ตรึงอยู่ หลังจากนั้นจะเติมแอนติบอดีตัวที่สอง (Secondary antibody) ที่ติดฉลากด้วยสารติดตาม เช่น เอนไซม์ แอนติบอดีดังกล่าวนี้จะเข้าจับกับแอนติเจนอีกครั้ง ซึ่งจะสามารถหาปริมาณแอนติเจนได้จากสารติดตาม สัญญาณที่ได้จะแปรผันตามปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง วิธีนี้จะมี ความจำเพาะเจาะจงสูง และให้ความไววิเคราะห์สูง สามารถตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ เช่น งานวิจัยที่ใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กตรึงด้วยแอนติบอดี เพื่อตรวจหาปริมาณ CEA หลังจากนั้นเติมแอนติเจนลงไป จะเกิดการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงกับแอนติบอดี หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สองคือ อนุภาคไมโครที่ติดฉลากด้วยแอนติบอดี ลงไปจับแอนติเจนอีกครั้ง ตรวจวัดสัญญาณจากสารติดฉลาก [11,27]



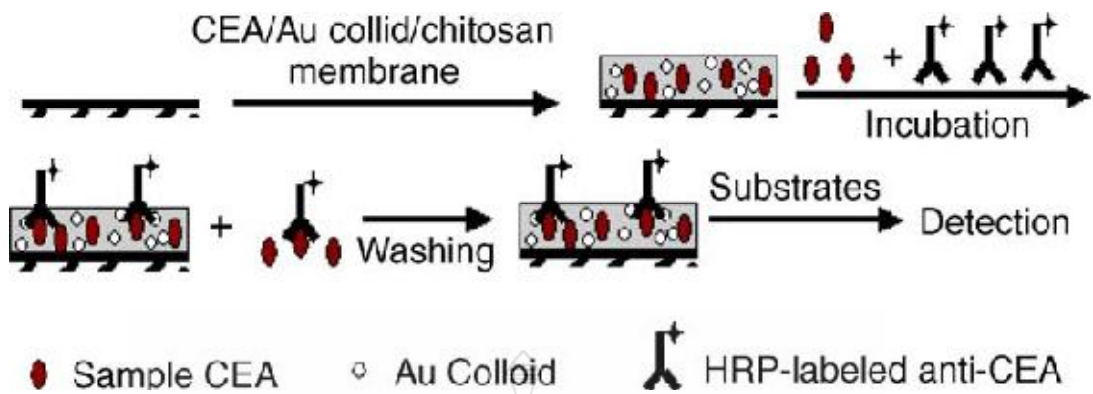
รูปที่ 2.7 อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิชเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA [11]

2.2.3 ตัวตรวจวัด

ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ในทางอิมมูโนเซนเซอร์ได้แก่

2.2.3.1 ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า เป็นเทคนิคที่วัดศักย์ไฟฟ้าหรือกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าที่นำมาประยุกต์ใช้เป็น ตัวตรวจวัดสำหรับอิมมูโนเซนเซอร์ เช่น เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก (Amperometric) และ โปเทนชิโอเมตริก (Potentiometric) ส่วนใหญ่แล้วเทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก ถือเป็นตัวตรวจวัดที่ นิยมใช้ในทางอิมมูโนเซนเซอร์ เพราะให้ความไวของการวิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจงและราคา ถูก ที่ผ่านมามีงานวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA (ดังรูปที่2.8) โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า ตัวอย่างเช่น การหาปริมาณ CEA โดยเคลือบ CEA/colloid Au/chitosan membrane บนขั้วไฟฟ้า โดยใช้วิธีการจับกันแบบแข่งขันระหว่างสารตัวอย่างที่มี CEA กับแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ สัญญาณจากสารติดฉลากลดลงตามความเข้มข้นของ CEA ที่เพิ่มขึ้นในสารตัวอย่าง ในช่วงความเป็น เส้นตรง 0.5-25 ng/ml พบว่าวิธีนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9981 และขีดจำกัดของการ ตรวจวัดเท่ากับ 0.22 ng/ml มีข้อดีคือ มีความเสถียรและความถูกต้องสูง [23]



รูปที่ 2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้ตัวตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า [23]

2.2.3.2 ตัวตรวจวัดทางมวล

ตัวตรวจวัดทางมวลอาศัยสมบัติทางมวลที่เปลี่ยนแปลงไป ตัวตรวจวัดทางมวลที่ใช้ในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ ได้แก่ ควอตซ์คริสตัลไมโครบาลานซ์ (Quartz crystal microbalance ; QCM) ซึ่งใช้หลักการตรึงแอนติบอดีบนผลึกควอตซ์ เพื่อตรวจหาปริมาณแอนติเจนในตัวอย่าง จากนั้นให้พลังงานภายนอกแก่ผลึกควอตซ์จะทำให้ผลึกควอตซ์เกิดการสั่น ความถี่ของการสั่นจะขึ้นอยู่กับมวลที่เปลี่ยนไป และเมื่อแอนติเจนไปจับกับแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่บนผลึกควอตซ์ ส่งผลทำให้มวลเพิ่มขึ้น ความถี่ของการสั่นก็จะเปลี่ยนไป ด้วยความสัมพันธ์ระหว่างมวลกับความถี่แสดงดังสมการ 2.2 [28]

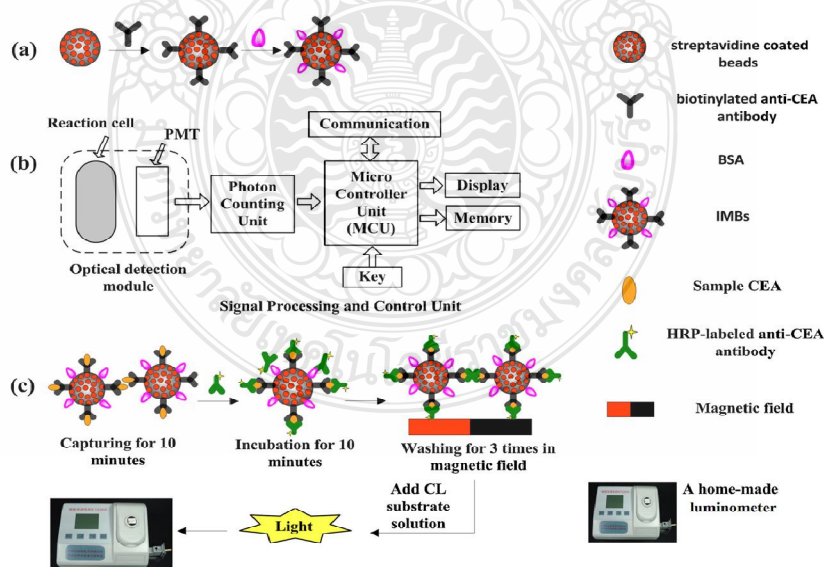
$$\Delta F = (-2.3 \times 10^{-6}) f_0^2 \frac{\Delta M}{A} \quad (2.2)$$

- F คือ ความถี่ที่เปลี่ยนไปเมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดี
- f_0 คือ ความถี่ของควอตซ์
- M คือ มวลที่เปลี่ยนไปหลังแอนติเจนจับกับแอนติบอดี
- A คือ พื้นที่ผิวของควอตซ์

2.2.3.3 ตัวตรวจวัดทางแสง

ตัวตรวจวัดทางแสง ใช้สำหรับการตรวจหาชนิดและปริมาณของสารโดยอาศัยหลักการที่ว่า สารแต่ละชนิดสามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วงความยาวคลื่นเฉพาะของสารแต่ละชนิด และปริมาณการดูดกลืนรังสีนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร โดยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือทั่วไปที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาว ที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนได้ ที่เกิดจากสารตัวอย่าง สารตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้ ในปัจจุบันเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้มีการพัฒนาให้มีขนาดเล็กลง กระทัดรัด มีความไววิเคราะห์ และให้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น รวมทั้งการพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ควบคู่กับเครื่องมือในการวิเคราะห์ให้ง่ายขึ้น และสามารถเชื่อมกับเทคนิคอื่นๆ ได้อีกด้วย ซึ่งจากการพัฒนานี้ทำให้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถนำไปใช้งานได้กว้างขึ้น

ได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ใช้วิธีอิมมูโนเซนเซอร์โดยใช้ตัวตรวจวัดทางแสงสำหรับหาปริมาณ CEA ดังรูป 2.9 ใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช โดยใช้อิมมูโนแมกเนติกบีดตรงด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ CEA ภายใต้สนามแม่เหล็ก วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่ความยาวคลื่น 300 ถึง 500 nm สัญญาณที่ได้ แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ CEA ในตัวอย่าง วิธีนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0 ถึง 50 ng/ml และมีขีดจำกัดในการตรวจพบเท่ากับ 5.0 pg/ml [29]

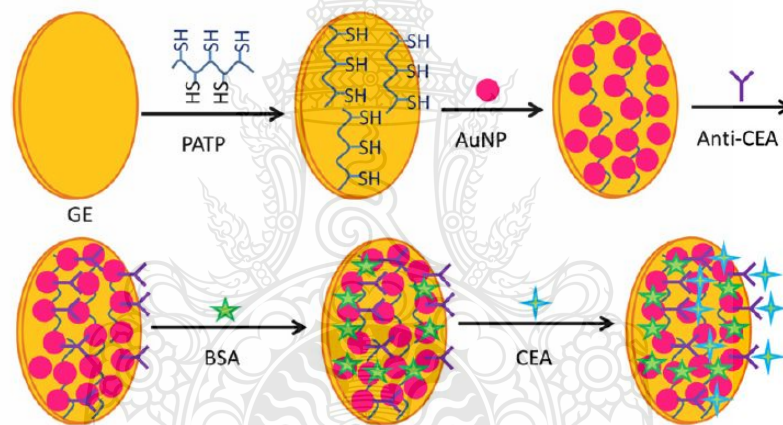


รูปที่ 2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิชโดยใช้ตัวตรวจวัดทางแสง [29]

2.3 การเพิ่มความไววิเคราะห์

2.3.1 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนทอง

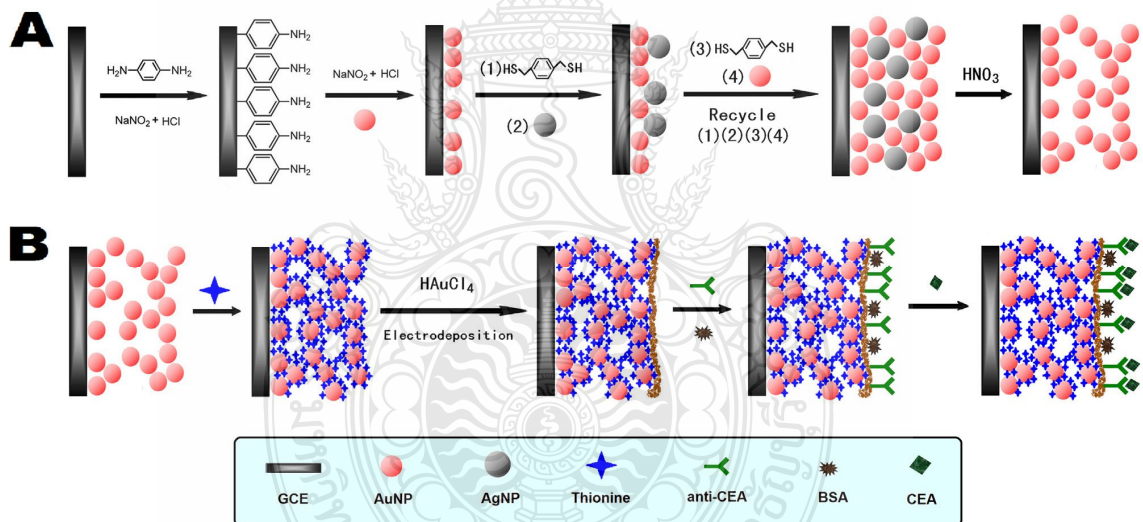
โดยการนำอนุภาคนาโนทองมาใช้ในการเพิ่มพื้นที่ผิวให้มากยิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดี ซึ่งได้มีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ใช้อนุภาคนาโนทองในการเพิ่มพื้นที่ผิวในการตรึงแอนติบอดี [30-32] เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้อนุภาคนาโนทองเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวบนขั้วไฟฟ้า ทำให้แอนติบอดีสามารถเกาะติดบนขั้วไฟฟ้าได้มากขึ้น ตรวจสอบปริมาณ CEA โดยใช้เทคนิคแอมเพอร์โรเมตริก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สัญญาณการตอบสนองของ CEA มีช่วงความเป็นเส้นตรงจาก 1 fg/ml ถึง 10 ng/ml มีขีดจำกัดของการตรวจพบต่ำถึง 0.015 fg/ml [32] แต่มีข้อเสียเนื่องจากอนุภาคนาโนทองสังเคราะห์มาจากสารละลายทองซึ่งมีราคาแพง



รูปที่ 2.10 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้อนุภาคนาโนทองในการเพิ่มพื้นที่ผิว [32]

2.3.2 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยอนุภาคนาโนเงิน

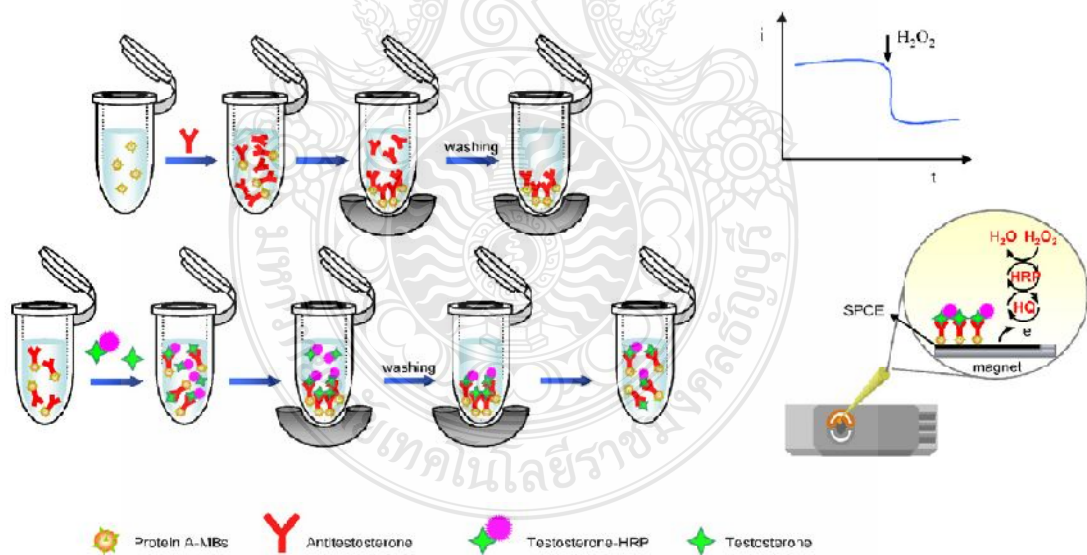
ได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้อนุภาคนาโนเงินร่วมกับอนุภาคนาโนทอง [27] ในการเพิ่มพื้นที่ผิวโดยใช้ 1,4 - benzenedimethanethiol เป็นตัวเชื่อม หลังจากนั้นเมื่อเติมกรดไนตริกลงไปทำให้อนุภาคนาโนเงินละลาย จากนั้นเติมสาร Thionine สารชนิดนี้จะดูดซับบนผิวของอนุภาคนาโนทอง และ HAuCl_4 เพื่อให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางบนผิวหน้าด้วยปฏิกิริยารีดักชัน เมื่อเติมแอนติบอดีลงไป แอนติบอดีจะดูดซับโดยตรงบนทอง และเมื่อเติมแอนติเจนลงไป แอนติเจนจะจับกับแอนติบอดีอย่างจำเพาะเจาะจง ผลการวิจัยพบว่า เทคนิคนี้มีความไววิเคราะห์สูง ช่วงความเป็นเส้นตรงกว้าง (10 pg/ml ถึง 100 ng/ml) มีขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 3 pg/ml [27] แต่มีข้อด้อยคือ อนุภาคนาโนเงินไม่เสถียร ทำให้เปลี่ยนรูปได้ง่าย



รูปที่ 2.11 การวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้อนุภาคนาโนเงินร่วมกับอนุภาคนาโนทอง [27]

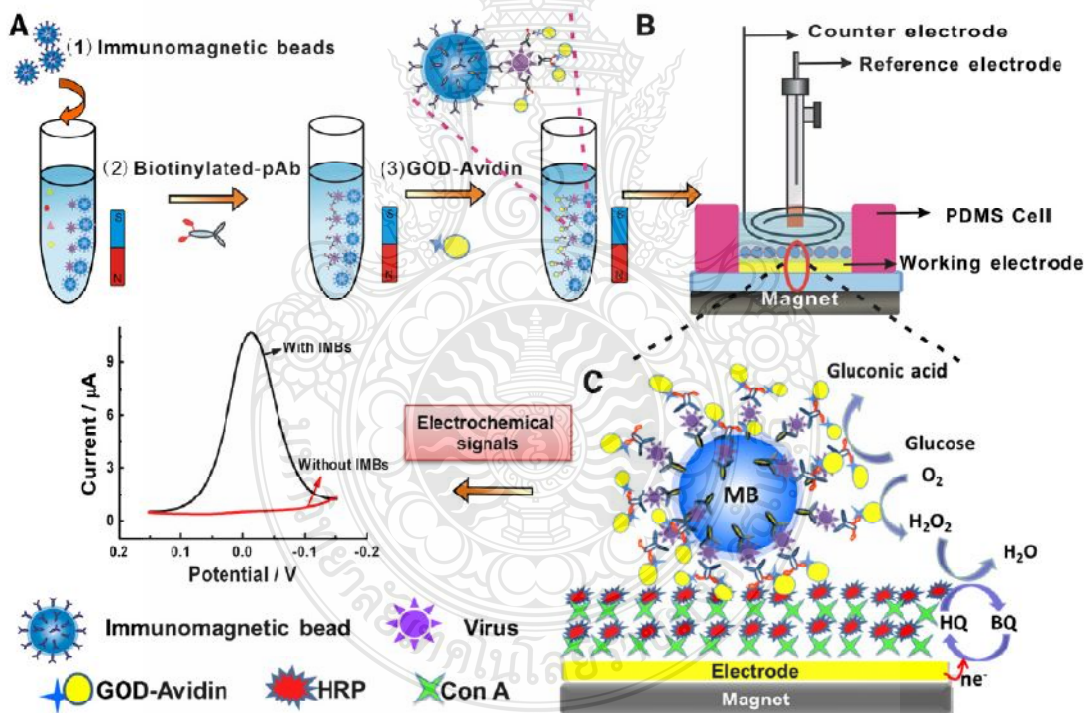
2.3.3 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุแม่เหล็ก

วัสดุแม่เหล็ก เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มความไววิเคราะห์ในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์ เพราะวัสดุแม่เหล็กมีความเสถียรสูง สัณเคราะห์ง่าย และราคาถูก [33,34-36] วัสดุแม่เหล็กที่นิยมนำมาใช้ในการเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์คือแมกเนติกบีด ซึ่งเป็นวัสดุแม่เหล็กที่อยู่ในรูปของเหล็กออกไซด์ แมกนีไทต์ (Fe_3O_4) สัณเคราะห์ได้จากวิธีตกตะกอนร่วมระหว่างเฟอร์รัส คลอไรด์ (Ferrous chloride) และ เฟอร์ริก คลอไรด์ (Ferric chloride) การประยุกต์ใช้แมกเนติกบีดในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์มีทั้งแบบตรง แบบแข่งขันและแบบแซนวิช [37,38-41] ตัวอย่างเช่น Eguilaz และคณะ [42] ได้นำแมกเนติกบีดมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน ดังรูปที่ 2.12 โดยตรึงแอนติบอดีไว้บนแมกเนติกบีด ใช้แม่เหล็กภายนอกดูดให้แมกเนติกบีดที่ตรึงแอนติบอดีอยู่กับที่ และติดฉลากแอนติเจนที่เข้าแข่งขันด้วยเอนไซม์ ตรวจวัดปริมาณของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจากสารติดฉลากด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า พบว่าวิธีดังกล่าวแมกเนติกบีดที่ตรึงแอนติบอดีมีความเสถียรสูงถึง 25 วัน และมีขีดจำกัดการตรวจวัด คือ 1.7 pg/ml



รูปที่ 2.12 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุแม่เหล็กโดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแข่งขัน [42]

นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่นำแมกเนติกบีดไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส H9N2 ซึ่งเป็นไวรัสสายพันธุ์หนึ่งของไข้หวัดนก ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช โดยขยายสัญญาณด้วยแมกเนติกบีดตรงด้วยสารติดฉลากเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ตรวจวัดปริมาณไวรัสจากปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ติดฉลาก จากปฏิกิริยาให้อิเล็กตรอน และตรวจวัดปริมาณอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (รูปที่ 2.13) พบว่าวิธีนี้ให้ความไววิเคราะห์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไม่ได้ขยายสัญญาณด้วยแมกเนติกบีด 4.7 เท่า และแอนติบอดีที่ถูกตรึงอยู่บนแมกเนติกบีดมีความเสถียรสูงถึง 2 เดือน [43] จากข้อดีของแมกเนติกบีดดังกล่าวจึงทำให้ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำแมกเนติกบีดมาใช้ในการขยายสัญญาณเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ด้วยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช



รูปที่ 2.13 การเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยวัสดุแม่เหล็ก โดยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช [43]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 โมโนโคลนอล แอนติ-คาร์ซีโนเอมบริโอนิก แอนติเจน แอนติบอดี (Monoclonal Anti-carcinoembryonic Antigen antibody; anti-CEA, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.2 คาร์ซีโนเอมบริโอนิก แอนติเจน (Carcinoembryonic antigen; CEA, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.3 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB, Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide; H_2O_2 , Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.5 ไบโอติน 3-ซัลโฟ-เอ็น-ไฮดรอกซีสักซินิไมด์ เอสเทอร์ โซเดียม ซอลต์ (Biotin 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt; BAC-SulfoNHS, Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.6 สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-peroxidase, Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.7 ซีรัม โบวีน อัลบูมิน (Serum bovine albumin; BSA, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, Analytical reagent, Ajex Finechem)
- 3.1.1.9 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate; $NaHCO_3$, Analytical reagent, Ajex Finechem)
- 3.1.1.10 ไดโซเดียมคาร์บอเนต (Di-sodium carbonate; Na_2CO_3 , Analytical reagent, Ajex Finechem)
- 3.1.1.11 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Sodium di-hydrigen orthophosphate; NaH_2PO_4 , Analytical reagent, Ajex Finechem)
- 3.1.1.12 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen orthophosphate; Na_2HPO_4 , Analytical reagent, Ajex Finechem)

- 3.1.1.13 ไมโครแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี (Micromagnetic beads coated Protein G, Dynal Invitrogen)
- 3.1.1.14 แอลฟา-ฟีโตโปรตีน (Alpha-Fetoprotein; AFP, Pacific Science)
- 3.1.1.15 นิวรอนสเปซิฟิกลีโนเลส (Neuron Specific Enolase; NSE, Pacific Science)
- 3.1.1.16 สกิมมิลค์ (Skim milk, Difco Laboratorise)
- 3.1.1.17 กรดยูริก (Uric acid, Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.18 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4 , Analytical reagent, J.T.Baker)
- 3.1.1.19 กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde; $HCO(CH_2)_3CHO$, Analytical reagent, Sigma-Aldrich)
- 3.1.1.20 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, พีเอช 7.40 (0.1 M phosphate buffer solution) เตรียมจาก
- สารละลาย A : สารละลาย 0.2 M โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 27.80 g ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลาย B : สารละลาย 0.2 M ไดโซโซเดียมออร์โทเดียมฟอสเฟต โดยชั่งไดโซโซเดียมออร์โทเดียมฟอสเฟต 358.14 g ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น
- ผสมสารละลาย A ปริมาตร 95 ml ลงในสารละลาย B ปริมาตร 405 ml ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น และปรับให้ได้พีเอช 7.40
- 3.1.1.21 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 9.60
- ชั่งไดโซเดียมคาร์บอเนต 0.159 g ผสมกับโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตหนัก 0.293 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น และปรับพีเอชให้ได้ 9.60 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M
- 3.1.1.22 ตัวอย่างซีรัมจากโรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระรัตนราชสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี
- 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์
- 3.1.2.1 ไมโครเพลท (Micro plate)
- 3.1.2.2 ไมโครปิเปต ขนาด 10, 100, 1,000, และ 5,000 μ l
- 3.1.2.3 เครื่องเขย่า รุ่น VORTEX-GENIE2
- 3.1.2.4 เครื่องกวนแม่เหล็ก พร้อมแมกเนติกบาร์ (IKA RH basic 1)

3.1.2.4 เครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer)
รุ่น UV-1601 บริษัท SHIMATSU

3.1.2.5 เครื่องมือวัดกรดด่าง (pH meter) รุ่น Model UB-10 ยี่ห้อ DENVER
INSTRUMENT บริษัท เบคไทย กรุงเทพมหานครเคมีภัณฑ์

3.1.2.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope;
SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-6301F)

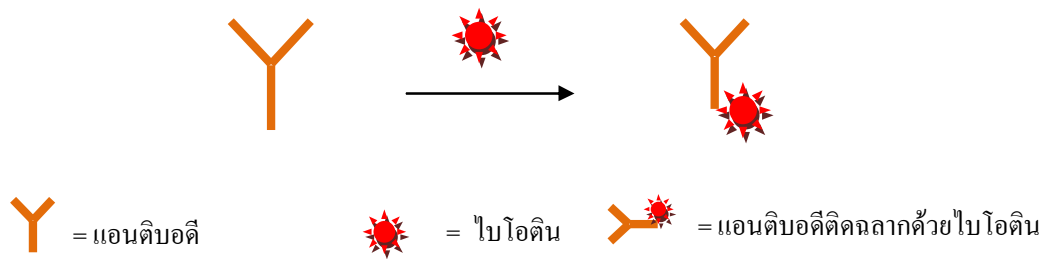
3.2 การทดลอง

3.2.1 เตรียมแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

เขย่าสารละลายแมกเนติกบีดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 นาที และปิเปตมาปริมาตร 50 μ l (1.5 mg) ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วแยกสารละลายออกจากแมกเนติกบีดโดยใช้แม่เหล็กภายนอกในการแยก และดูดสารละลายออก ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง นำไปวัดสมบัติทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.2.2 เตรียมแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน (ดังรูปที่ 3.1)

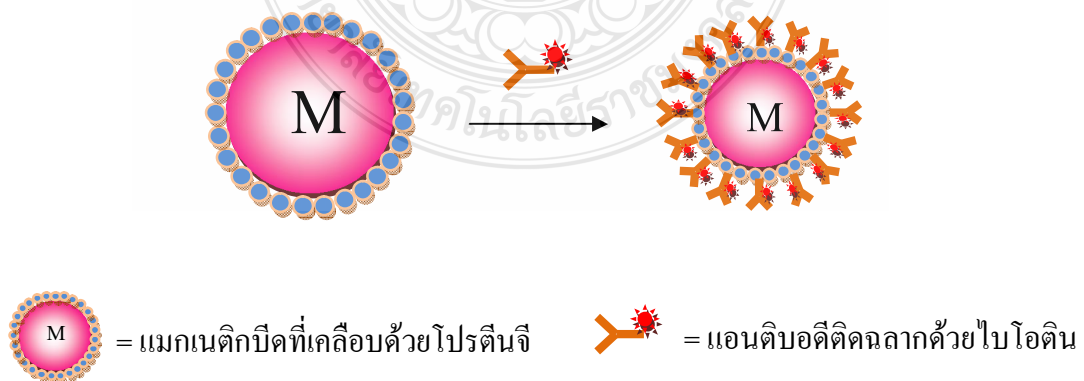
ขั้นแรกทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยปิเปตสารละลายแอนติบอดีความเข้มข้น 6.5 mg/ml ปริมาตร 500 μ l ลงในถุงไดอะไลซิสขนาด 8/32 และนำไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 โดยกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อกำจัดโซเดียมอะไซด์ (sodium azide) จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.20 ลงในไบโอดีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไบโอดีนเป็น 10 mg/ml ปิเปตสารละลายที่ได้ลงในสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการไดอะไลซิสเรียบร้อยแล้ว กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ไปทำการไดอะไลซิส อีกครั้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM, pH 7.40 กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายผสมที่ผ่านการไดอะไลซิสเรียบร้อยแล้วไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เพื่อนำไปใช้งานในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยไอโอดีน

3.2.3 ตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไอโอดีนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี
(ดังรูปที่ 3.2)

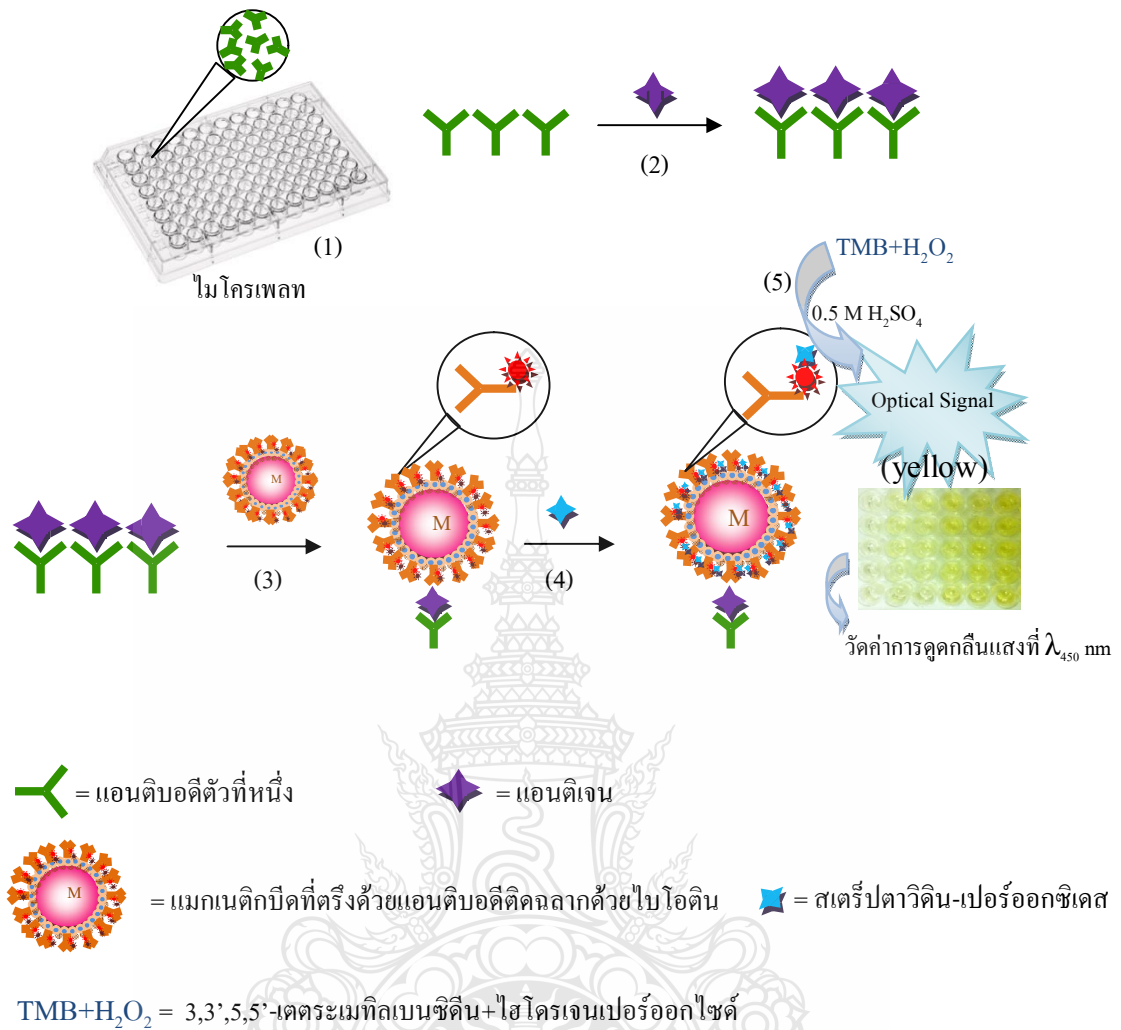
ล้างแมกเนติกบีดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 และเปิดแมกเนติกบีด ปริมาตร 50 μl ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เต็ม 0.5 M กลูตาโรลดีไฮด์ ปริมาตร 100 μl เพื่อเป็นตัวเชื่อมระหว่างแมกเนติกบีดกับแอนติบอดี ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เปิดสารละลายแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไอโอดีนปริมาตร 1,300 μl ลงในแมกเนติกบีดปริมาตร 325 μl โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแมกเนติกบีดต่อแอนติบอดี เป็น 1.5 mg ต่อ 10 μg ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 1% w/v ซีรัมโบวินอัลบูมิน แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



รูปที่ 3.2 การตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไอโอดีนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

3.2.4 วิธีการวิเคราะห์หา CEA

ขั้นที่ 1 เคลือบแอนติบอดีลงในไมโครเพลทด้วยสารละลายคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100 μ l จากนั้นเปิดสารละลายแอนติบอดีตัวที่หนึ่งความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l ลงในไมโครเพลท ที่มีสารละลายคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์เคลือบอยู่ และเปิด 1% w/v สกิมมิลค์ ปริมาตร 200 μ l ลงในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4⁰C จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง ขั้นที่ 2 เติม CEA ความเข้มข้น 5 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นขั้นที่ 3 เติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง ขั้นที่ 4 เติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้าง ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง และขั้นที่ 5 เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l (ได้สารละลายสีน้ำเงิน) และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 μ l (ได้สารละลายสี เหลือง) และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 450 nm



รูปที่ 3.3 หลักการตรวจหาปริมาณ CEA โดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบเซนวิช

ขั้นที่ (1) การเคลือบแอนติบอดีตัวที่หนึ่งในไมโครเพลท ขั้นที่ (2) การเติมแอนติเจน (CEA) ขั้นที่ (3) การเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน ขั้นที่ (4) การเติม สเตอริปตาวิดอิน-เปอร์ออกซิเดส ขั้นที่ (5) การเติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ผสมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อ หาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจหา CEA โดยใช้เทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช ให้สามารถตรวจหาปริมาณ CEA ที่มีความเข้มข้นต่างๆได้ สภาวะที่ทำการทดลองได้แก่ ศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยา ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ศึกษาผลความเข้มข้นของ CEA ศึกษาหาความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอตินที่เหมาะสม และ ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส สรุปสภาวะที่จะศึกษาได้ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งทุกสภาวะที่ศึกษา ทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ต้องการศึกษา ส่วนสภาวะอื่นคงที่

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ต้องการศึกษาในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง
1. ผลของการหยุดปฏิกิริยา	แบบที่ 1 ไม่หยุดปฏิกิริยา แบบที่ 2 หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก
2. ความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mg/ml
3. เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที
4. ความเข้มข้นของ CEA	1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 ng/ml
5. ความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอติน	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mg/ml
6. ความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส	0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.012, 0.014, 0.016, 0.018 และ 0.02 mg/ml

3.2.5.1 ศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยา

ศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยา ทำการทดลองพร้อมกันสองแบบคือ แบบที่ 1 ทำการทดลองโดยไม่หยุดปฏิกิริยา และ แบบที่ 2 ทำการทดลองโดยหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก โดยใช้แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง 0.1 mg/ml และ CEA ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.2.4 การทดลองแบบที่ 1 จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0-45 นาที และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ส่วนแบบที่ 2 เมื่อได้สารละลายสีน้ำเงินแล้ว ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 μ l จะได้เป็นสารละลายสีเหลือง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 0-45 นาที และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.5.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง

ศึกษาหาความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่เหมาะสม ทำการทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mg/ml แต่ละความเข้มข้น เติม CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนความเข้มข้น 1.0 mg/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 mg/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.5.3 ศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำการทดลองที่เวลา 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที โดยเคลือบแอนติบอดีความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l ในไมโครเพลท จากนั้นเติม CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.01 mg/ml ปริมาตร 30 μ l

ตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l โดยตั้งทิ้งไว้ที่เวลาต่างๆ และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.5.4 ศึกษาผลความเข้มข้นของ CEA

ศึกษาผลของความเข้มข้นของ CEA ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 ng/ml ตามลำดับ โดยใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l, CEA ปริมาตร 30 μ l ที่ความเข้มข้นที่กล่าวข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก 100 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.5.5 ศึกษาหาความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนที่เหมาะสม

ศึกษาผลของความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0 1.5, 2.0 และ 2.5 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l, CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน ปริมาตร 30 μ l ที่ความเข้มข้นต่างๆข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก 100 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.5.6 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

ศึกษาหาความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.012, 0.014, 0.016, 0.018 และ 0.02 mg/ml ตามลำดับ โดยใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l, CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอติน ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตร 30 μ l ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 μ l ที่ความเข้มข้นต่างๆที่กล่าวข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.40 จำนวน 3 ครั้ง เติม 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก 100 μ l แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.6 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา โดยทำการศึกษาหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ความเป็นเส้นตรง ซีดจำกัด ในการตรวจพบ ซีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ และ ความจำเพาะเจาะจงของวิธี ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองตามข้อ 3.2.4 และทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

สภาวะที่ศึกษา	การทดลอง
1. หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก	กรดซัลฟิวริก 0.5 M ที่เวลา 15 นาที
2. ความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	0.1 mg/ml
3. เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	60 นาที
4. ความเข้มข้นของ CEA	5.0 ng/ml
5. ความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอติน	0.5 mg/ml
6. ความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส	0.01 mg/ml

3.2.6.1 การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1) ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำโดยใช้ CEA ความเข้มข้น 5 ng/ml ปริมาตร 30 μ l โดยทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้งในวันเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาค่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation ; RSD)

2) ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทวนซ้ำโดยใช้ CEA ความเข้มข้น 5 ng/ml ปริมาตร 30 μ l ทำการทดลองวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.2.6.2 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน โดยเติม CEA ที่ความเข้มข้น 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ng/ml ลงในตัวอย่างจริง จำนวน 5 ตัวอย่างตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็งในข้อ 3.2.4 และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนโดยใช้กราฟมาตรฐานของ CEA ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 9.5 ng/ml

3.2.6.3 ศึกษาความเป็นเส้นตรง

ศึกษาความเป็นเส้นตรงโดยใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l, CEA ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01, 0.03, 0.05, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 และ 100.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CEA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

3.2.6.4 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลนค์ (สารละลายบัฟเฟอร์) จำนวน 7 ครั้ง แล้วคำนวณหา % RSD เพื่อนำมาคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจพบ

3.2.6.5 หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยการวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายเบลงค์ จำนวน 7 ครั้ง แล้วคำนวณหา % RSD เพื่อนำมาคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยความเข้มข้นที่ได้ ต้องมีความเที่ยงและเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนที่ยอมรับได้ ณ ความเข้มข้นนั้น

3.2.6.6 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีด้วยสารบ่งชี้มะเร็ง คือ AFP, NSE และ กรดยูริก เปรียบเทียบกับ CEA ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5.0 ng/ml โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็งในข้อ 3.2.4 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แต่ใช้ AFP, NSE และ กรดยูริก แทน CEA และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2.7 การหาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยใช้แมกเนติกบีด

ศึกษาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยทำการทดลองสองแบบคือ แบบที่ 1 ใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีทีตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนเป็นแอนติบอดีตัวที่สอง แบบที่ 2 ใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนเป็นแอนติบอดีตัวที่สอง โดยทั้งสองแบบจะทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็งในข้อ 3.2.4 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเคลือบแอนติบอดีตัวที่หนึ่งความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 30 μ l บนไมโครเพลทเด็ม CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ปริมาตร 30 μ l และใช้แอนติบอดีตัวที่สองความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตร 30 μ l เดิมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 30 μ l จากนั้นเติมสับสเตรทคือ 3,3',5,5'-เตตระเมทิลเบนซิดีน ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 0.5 M ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาตร 50 μ l และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 100 μ l นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นของ CEA เพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างการทดลองทั้งสองแบบ

3.2.8 การตรวจหา CEA ในตัวอย่างซีรัม

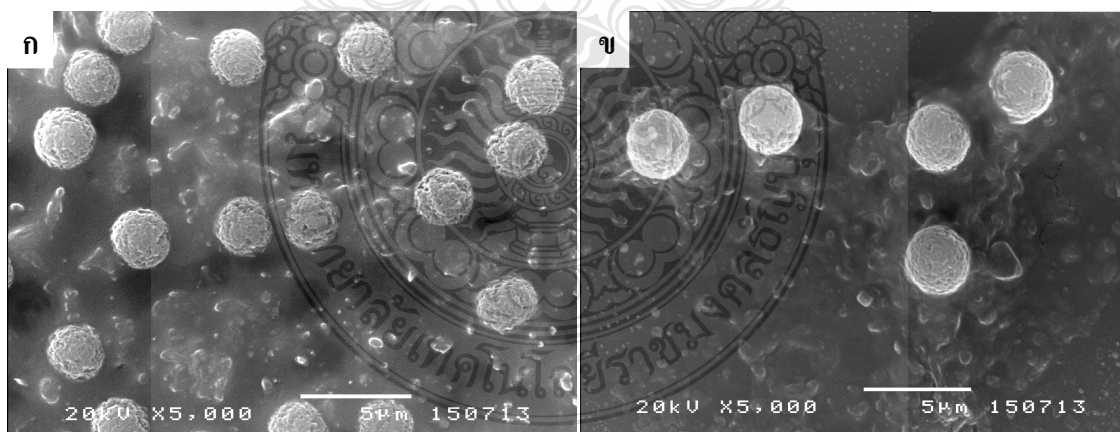
เมื่อได้วิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริง ซึ่งใช้ตัวอย่างซีรัมที่ผ่านการปั่นเอาเม็ดเลือดแดงออก จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างซีรัมทั้ง 5 ตัวอย่างมาเจือจาง 2 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็งในข้อ 3.2.4 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ตัวอย่างซีรัมแทน CEA ในการทดลอง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และคำนวณหาความเข้มข้นของ CEA จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การตรึงแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีโนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี

ผลการตรึงแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีโนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี เมื่อนำไปตรวจสอบการเกาะติด โดยนำแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีก่อนตรึงแอนติบอดี และหลังตรึงแอนติบอดี ไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า หลังจากตรึงแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีโนบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี (รูปที่ 4.2 ข) ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีผิวของแมกเนติกบีดเรียบขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนตรึงแอนติบอดี (รูปที่ 4.2 ก) เนื่องจากแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีโนไปเกาะบนผิวของแมกเนติกบีด จึงทำให้ขนาดของแมกเนติกบีดเพิ่มขึ้น และผิวของแมกเนติกบีดเรียบขึ้น จากผลการทดลอง จึงคาดว่าแอนติบอดีสามารถตรึงบนแมกเนติกบีดได้ และเมื่อนำไปทดสอบ โดยนำไปใช้เป็นแอนติบอดีตัวที่สองในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA พบว่าการทดลองให้ผลบวก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแอนติบอดีสามารถตรึงอยู่บนแมกเนติกบีดได้จริง



รูปที่ 4.1 ภาพสมบัติทางกายภาพของแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีก่อนตรึงแอนติบอดี (ก) และแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีหลังตรึงแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอดีโน (ข) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

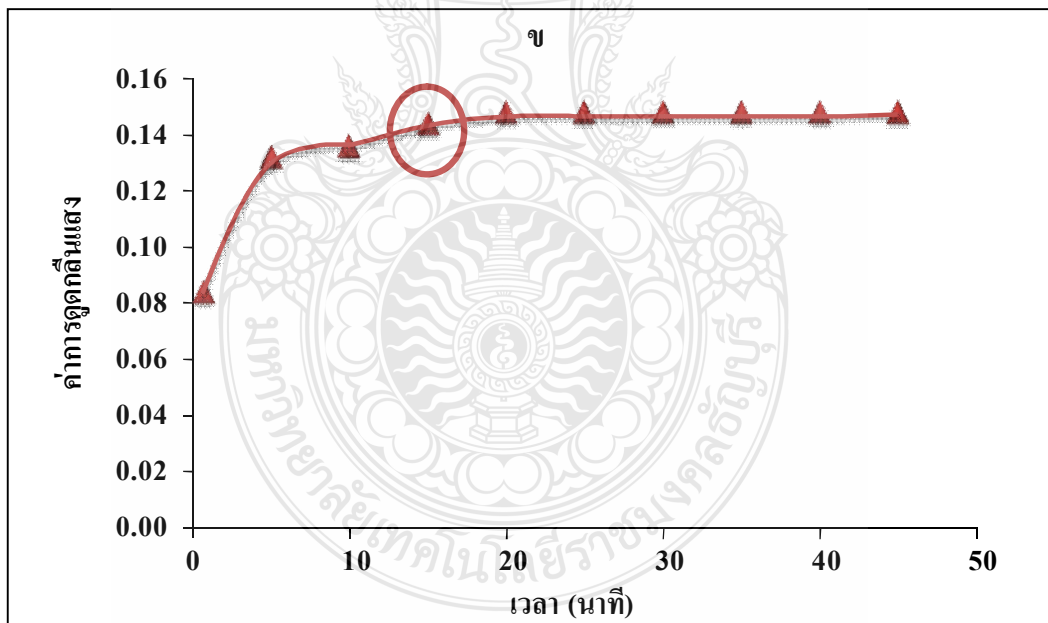
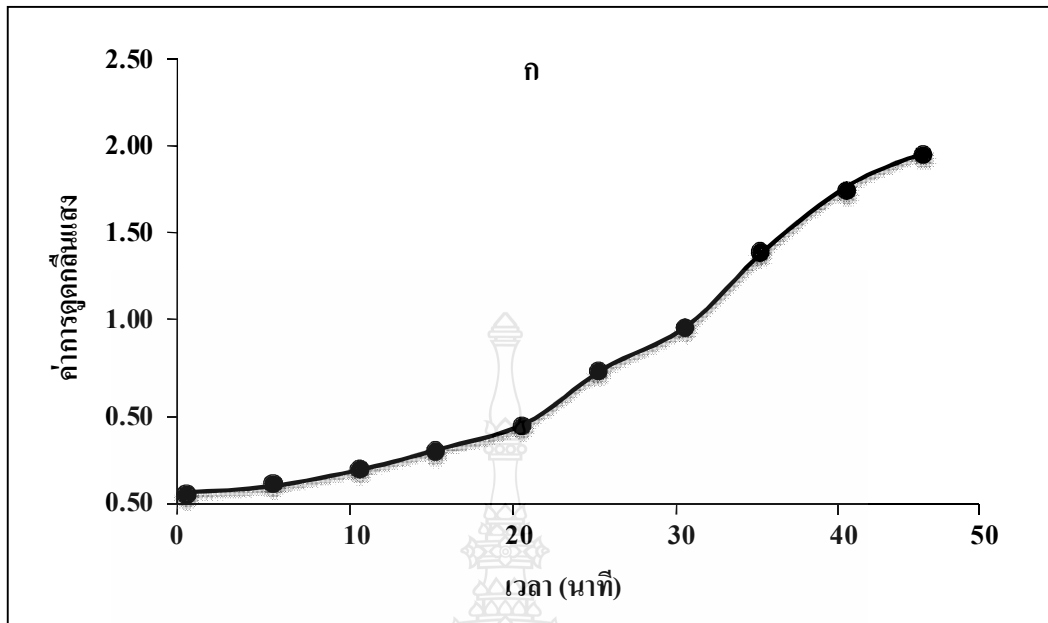
4.2 การหาสถานะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

4.2.1 ศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยาโดยใช้กรดซัลฟิวริก

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ควรขึ้นกับความเข้มข้นของแอนติเจน ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ต้องคงที่ จึงทำการศึกษาผลของการใช้กรดซัลฟิวริกในการหยุดปฏิกิริยา โดยทำการทดลองพร้อมกันสองแบบคือ แบบที่ 1 ทำการทดลองโดยไม่หยุดปฏิกิริยา และแบบที่ 2 ทำการทดลองโดยหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก ผลการทดลองที่ได้เป็นดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 พบว่าการทดลองแบบที่ 1 ไม่ได้หยุดปฏิกิริยา ได้สารละลายสีฟ้า (รูปที่ 4.2 ก) จะเห็นได้ว่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการทดลองแบบที่ 2 การหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริก จะได้สารละลายเป็นสีเหลือง เพราะเมื่อ TMB อยู่ในรูปของตัวออกซิไดซ์ในสารละลายกรด จะเปลี่ยนจากสารละลายสีฟ้าเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.2 ข) แสดงให้เห็นว่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น และคงที่ ที่เวลา 15 นาที ทั้งนี้เพราะ สเตรีปตาวิดอิน-เปอร์ออกซิเดสเป็น โปรตีน เมื่ออยู่ในสถานะเป็นกรดแก่ โครงสร้างของโปรตีนจะเสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อีกต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกที่จะหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5 M เป็นเวลา 15 นาที ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการหยุดปฏิกิริยาโดยใช้กรดซัลฟิวริก

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง	
	ไม่ใช้กรดซัลฟิวริก	ใช้กรดซัลฟิวริกในการหยุดปฏิกิริยา
0	0.0181	0.0833
5	0.0981	0.1295
10	0.1380	0.1350
15	0.2370	0.1430
20	0.3732	0.1441
25	0.7151	0.1430
30	0.9460	0.1452
35	1.3532	0.1442
40	1.6872	0.1440
45	1.9250	0.1441



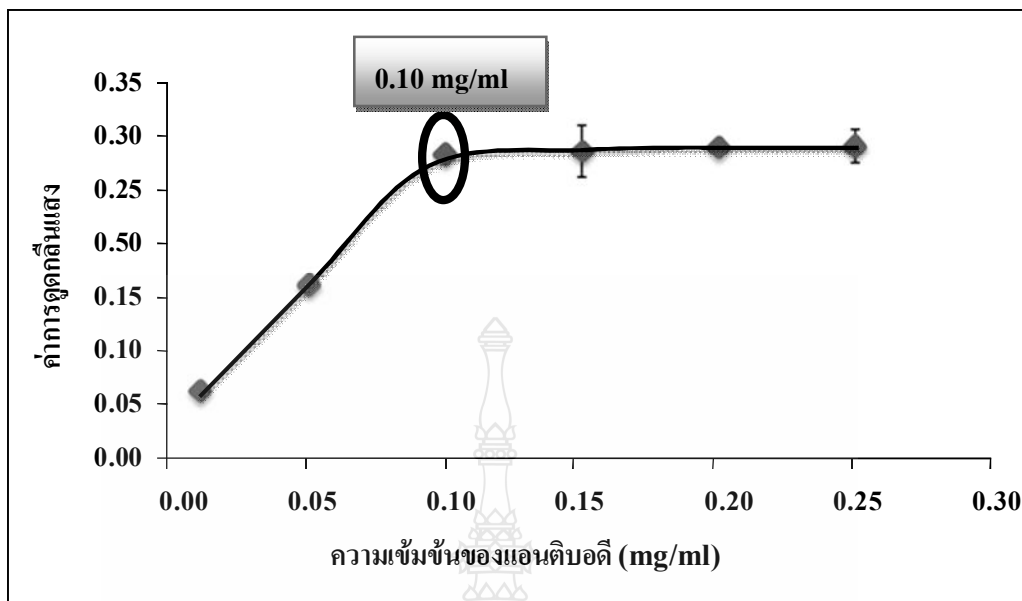
รูปที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองโดยไม่ใช้กรดซัลฟิวริก (ก) และใช้กรดซัลฟิวริกในการหยุดปฏิกิริยา (ข)

4.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง

ปริมาณของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ที่เคลือบอยู่บนไมโครเพลท มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ถ้ามีปริมาณแอนติบอดีมาก จะทำให้การเข้าจับของ CEA เพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามีแอนติบอดีน้อย การเข้าจับกับ CEA ก็น้อยลง ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 mg/ml เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3) จนถึงที่ความเข้มข้น 0.10 mg/ml และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 0.1 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น เพราะพื้นที่ของไมโครเพลทมีจำกัด แอนติบอดีที่เหลือจึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้สัญญาณที่ได้เมื่อแอนติบอดีมากกว่า 0.10 mg/ml จึงมีค่าคงที่ ดังนั้นสรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่เหมาะสมคือ 0.1 mg/ml

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

ความเข้มข้นของ แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.01	0.0610	0.0600	0.0610	0.0603	0.0005
0.05	0.1570	0.1550	0.1560	0.1560	0.0010
0.10	0.2720	0.2730	0.2730	0.2720	0.0010
0.15	0.3040	0.2270	0.2780	0.2697	0.0392
0.20	0.2760	0.2780	0.2790	0.2777	0.0015
0.25	0.2780	0.2980	0.2710	0.2823	0.0140



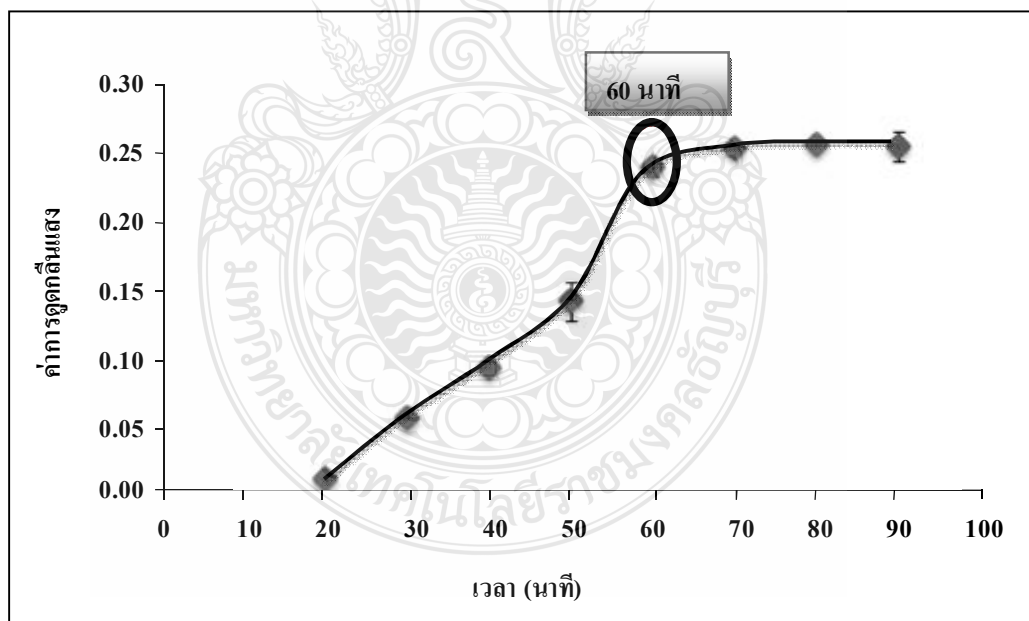
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนนโดอิดีตัวที่หนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

4.2.3 ศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

การจับกันระหว่างแอนนโดอิดีและแอนติเจน ต้องใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อต้องการให้แอนติเจนและแอนนโดอิดีจับกันได้สมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเข้าจับกันของแอนนโดอิดีและแอนติเจน ในแต่ละขั้นตอนการทดลอง เพื่อให้ได้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป โดยทำการศึกษาที่เวลา 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm มาสร้างกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบกับเวลาต่างๆ ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 20 ถึง 60 นาที ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่หลังจากเวลา 60 นาที ค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนนโดอิดีเกิดขึ้นสมบูรณ์ที่เวลา 60 นาที ซึ่งเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นมากกว่า 60 นาที จึงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 60 นาที เป็นเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

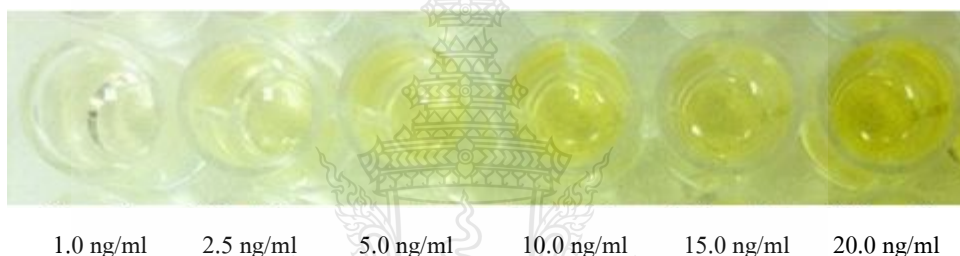
เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
20	0.0110	0.0100	0.0100	0.0103	0.0006
30	0.0560	0.0560	0.0550	0.0553	0.0006
40	0.0940	0.0940	0.0930	0.0937	0.0006
50	0.1390	0.1450	0.1570	0.1470	0.0092
60	0.2510	0.2400	0.2470	0.2460	0.0056
70	0.2590	0.2600	0.2590	0.2597	0.0006
80	0.2650	0.2560	0.2630	0.2613	0.0047
90	0.2790	0.2850	0.2680	0.2767	0.0085



รูปที่ 4.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

4.2.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ CEA

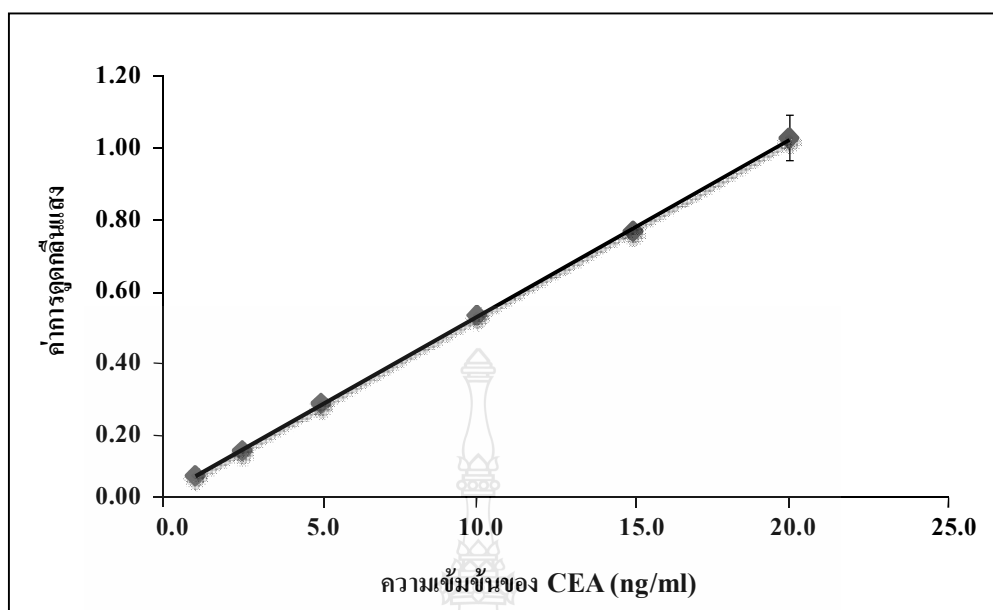
ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ต้องเป็นไปตามความเข้มข้นของ CEA ซึ่งถ้าปริมาณ CEA น้อย ทำให้สามารถเข้าจับกับแอนติบอดีได้น้อย แต่ถ้าปริมาณ CEA เพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเข้าจับกับแอนติบอดีได้มากขึ้น สัญญาณที่ได้จึงควรแปรผันตรงตามความเข้มข้นของ CEA โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของ CEA ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 ng/ml เมื่อนำสารละลายที่ได้ตั้งรูปที่ 4.5 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CEA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CEA เพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.6 แสดงว่าสภาวะในการตรึงแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง และเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเหมาะสม



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นของ CEA

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของความเข้มข้นของ CEA

ความเข้มข้นของ CEA (ng/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
1.0	0.0770	0.0830	0.0600	0.0733	0.0000
2.5	0.1410	0.1370	0.1370	0.1383	0.0023
5.0	0.2720	0.2670	0.2750	0.2713	0.0000
10.0	0.5250	0.5040	0.5050	0.5113	0.0000
15.0	0.7250	0.7630	0.7630	0.7503	0.0000
20.0	0.9060	1.0410	1.0530	1.0000	0.1000



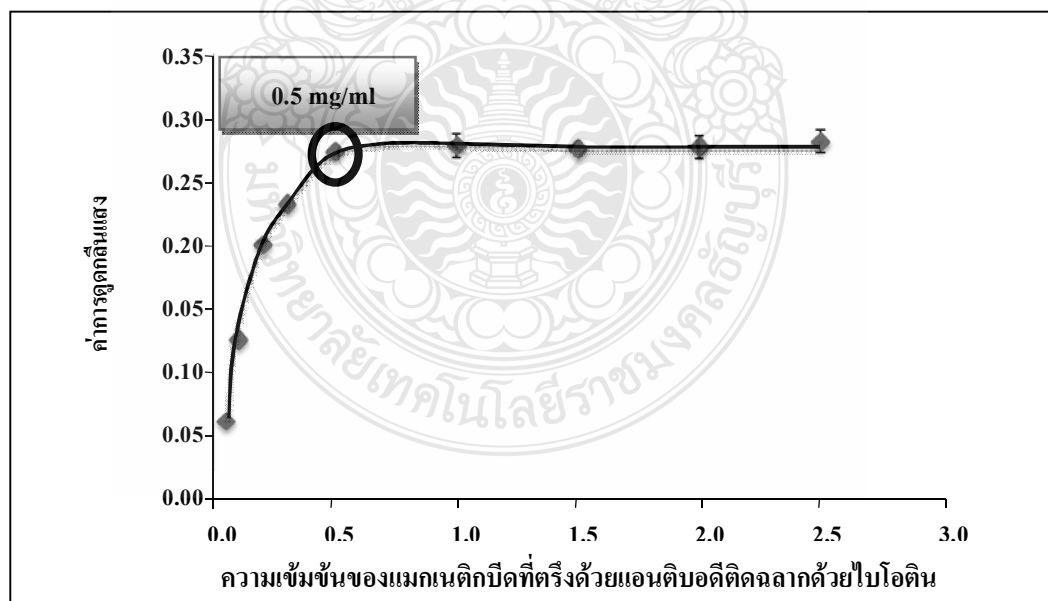
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของ CEA

4.2.5 ศึกษาหาความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีตินที่เหมาะสม

ถ้ามีจำนวนแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีตินมาก จะทำให้จับกับ CEA ได้มาก แต่ถ้ามีแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีตินน้อย จะทำให้จับกับ CEA ได้น้อยลง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะน้อยลง ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mg/ml พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแมกเนติกบีคเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่เพิ่มขึ้นจาก 0.05 ถึง 0.5 mg/ml (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.7) และที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5 mg/ml เป็นต้นไป พบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลง เพราะการเกิดสัญญาณขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติเจนและปริมาณของ HRP จึงอาจทำให้เมื่อแมกเนติกบีคมีความเข้มข้นมากกว่า 0.5 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จึงไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.05	0.0590	0.0610	0.0600	0.0600	0.0010
0.1	0.1250	0.1240	0.1240	0.1243	0.0006
0.2	0.2030	0.1990	0.1970	0.1997	0.0031
0.3	0.2310	0.2290	0.2350	0.2317	0.0031
0.5	0.2740	0.2730	0.2720	0.2730	0.0010
1.0	0.2890	0.2730	0.2730	0.2783	0.0092
1.5	0.2730	0.2810	0.2720	0.2753	0.0049
2.0	0.2720	0.2870	0.2720	0.2770	0.0087
2.5	0.2900	0.2720	0.2820	0.2813	0.0090



รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกเนติกบีคที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

4.2.6 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส

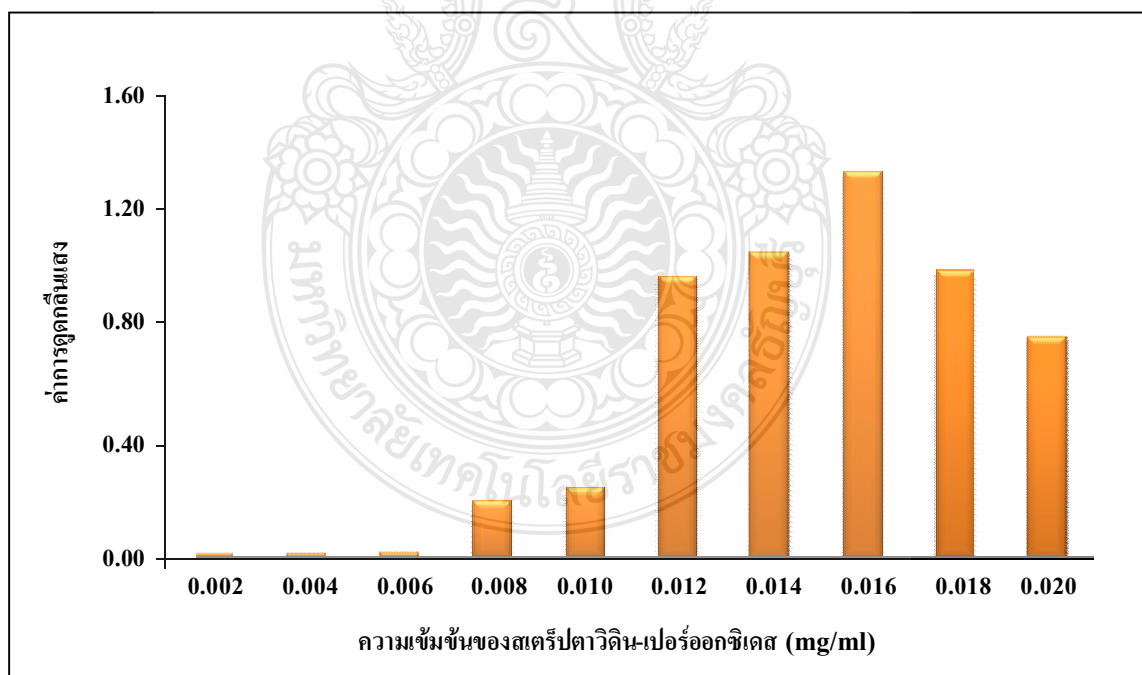
ปริมาณของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส มีผลต่อการตรวจวัด โดยถ้าสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส มีปริมาณน้อย จะทำให้เข้าจับกับ ไบโอดีนได้น้อย เมื่อเติมสับสเตรท จะพบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ยังสามารถเกิดได้อีก เนื่องจากยังมีพื้นที่ว่างของไบโอดีนที่สามารถให้สเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสเข้าจับได้อีก ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 0.002 ถึง 0.02 mg/ml (รูปที่ 4.8) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.002 ถึง 0.01 mg/ml ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสขึ้นอีก พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นสูงมากและมีค่าไม่แน่นอน (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.9) โดยได้ทำการทดลองซ้ำพบว่ายังได้ผลการทดลองที่เหมือนเดิม ซึ่งอาจจะเกิดจากโมเลกุลของ HRP ไปจับแอนติบอดีที่อยู่บนแมกเนติกบีดได้สมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/ml ดังนั้น HRP ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01 mg/ml อาจจะตกลงมาเกาะบนผิวของไมโครเพลท ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เพิ่มขึ้นสูงมากและมีแนวโน้มที่ไม่คงที่ ดังนั้นในการทดลองนี้ ความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมคือ 0.01 mg/ml



รูปที่ 4.8 แสดงผลของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสเตรปโตคอกคัส-เปอร์ออกซิเดส ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์สเตรปโตคอกคัส-เปอร์ออกซิเดส (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง
0.002	0.0010
0.004	0.0122
0.006	0.0180
0.008	0.1974
0.01	0.2430
0.012	0.9830
0.014	1.0657
0.016	1.3460
0.018	1.0026
0.02	0.7683



รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์สเตรปโตคอกคัส-เปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

4.3 การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ เป็นการหาประสิทธิภาพ และยืนยันการนำมาใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถนำไปใช้งานได้จริง ดังนั้นจึงทำการหาประสิทธิภาพของวิธีดังนี้

4.3.1 การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

4.3.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาการทำซ้ำโดยใช้ CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.72 ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เพราะเกณฑ์การยอมรับได้ของ %RSD ที่ยอมรับได้ในช่วงความเข้มข้นระดับ ppb (ng/ml) ต้องไม่เกิน 30% [44]

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์ ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.2800
2	0.2790
3	0.2760
4	0.2790
5	0.2770
6	0.2780
7	0.2820
% RSD	0.72

4.3.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

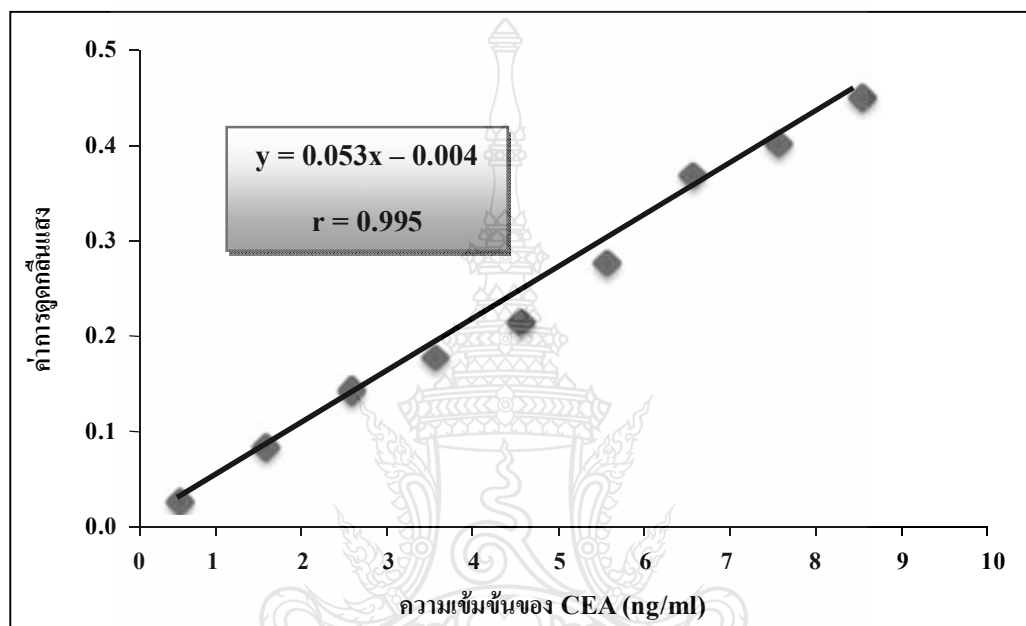
ศึกษาการทวนซ้ำโดยใช้ CEA ความเข้มข้น 5.0 ng/ml ทำการทดลองวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.40 ดังตารางที่ 4.8 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยเกณฑ์ปกติ %RSD ที่ยอมรับได้ที่ความเข้มข้นนี้คือ 30% [44]

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.2787
2	0.2713
3	0.3103
4	0.2737
5	0.2667
6	0.2837
7	0.2600
% RSD	1.40

4.3.2 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

จากผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเมื่อนำค่าที่ได้คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CEA (รูปที่ 4.10) พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 84 - 96% ดังตารางที่ 4.9 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ยอมรับได้ในช่วง 40 – 120%) [44] แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องสูง



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของ CEA ที่ความเข้มข้นต่างๆในสารตัวอย่าง

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างซีรัม

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ CEA (ng/ml)			% การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม	
1	0.6	0.5	1.0	82
2	1.7	2.0	3.3	80
3	3.5	3.0	6.1	88
4	4.4	4.0	8.2	95
5	5.7	5.0	10.3	92

4.3.3 ศึกษาความเป็นเส้นตรง

ศึกษาความเป็นเส้นตรง ทำการทดลองโดยใช้ CEA ความเข้มข้น 0.01, 0.03, 0.05, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 และ 100.0 ng/ml วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ CEA เพิ่มขึ้น สารละลายสีเหลืองที่ได้มีความเข้มเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.11 และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ CEA ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.12 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CEA เพิ่มมากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของ CEA ที่เพิ่มขึ้น โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 0.05 ถึง 50.00 ng/ml

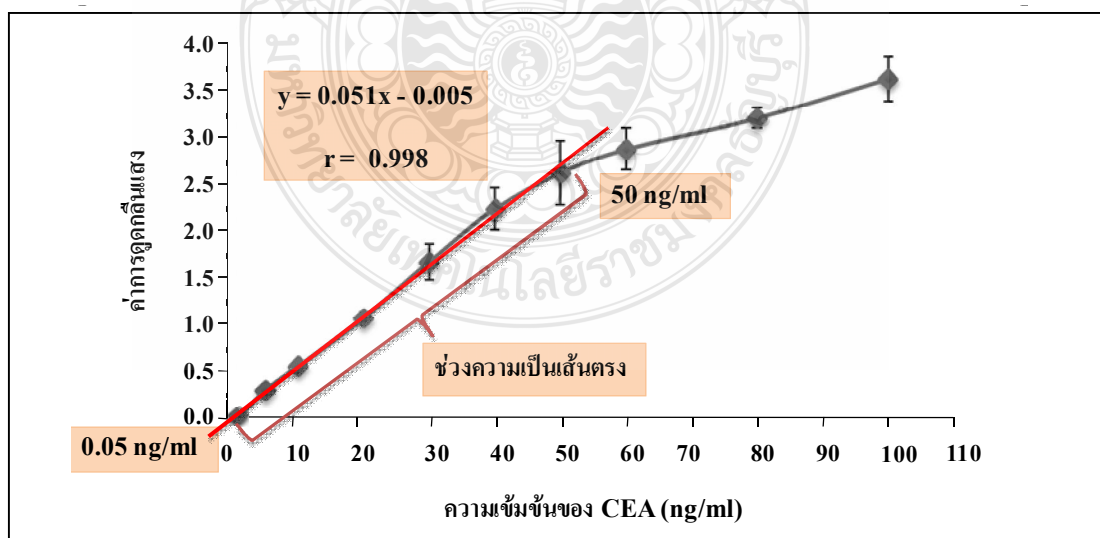
0.05 1.0 5.0 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 ng/ml



รูปที่ 4.11 แสดงความเข้มของสารละลายสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CEA ที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น CEA (ng/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง				ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
0.01	0.0002	0.0001	0.0000	0.0001	0.0001
0.03	0.0003	0.0007	0.0005	0.0005	0.0002
0.05	0.0015	0.0013	0.0019	0.0016	0.0003
1.0	0.0021	0.0025	0.0023	0.0023	0.0002
5.0	0.2720	0.2610	0.2751	0.2700	0.0000
10.0	0.5324	0.5250	0.5050	0.5206	0.0000
20.0	1.0480	0.9060	1.0530	1.0023	0.1000
30.0	1.4954	1.8230	1.5010	1.6065	0.1874
40.0	2.5030	2.2080	2.1041	2.2717	0.2069
50.0	2.7330	2.1994	2.8030	2.5785	0.3301
60.0	2.5518	2.9687	2.7718	2.7441	0.2103
80.0	2.8908	3.2640	3.0490	3.0346	0.1372
100.0	3.4579	3.8074	3.3360	3.5437	0.2329



รูปที่ 4.12 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ CEA

4.3.4 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ จำนวน 7 ครั้ง ที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วคำนวณหาขีดจำกัดในการตรวจพบ ซึ่งได้เท่ากับ 0.005 ng/ml โดยคำนวณจาก

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{mean}_{\text{blank}} + 3\text{SD} \\ &= 0 + 3(0.0016) \\ &= 0.005 \text{ ng/ml} \end{aligned}$$

4.3.5 หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ

หาขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์จำนวน 7 ครั้ง ที่ความยาวคลื่น 450 nm พบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 0.05 ng/ml และเมื่อศึกษาหาความเที่ยงที่ความเข้มข้นนี้ พบว่าให้ %RSD เท่ากับ 1 และหาความถูกต้องของวิธีที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเท่ากับ 97% สรุปได้ว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพได้เท่ากับ 0.05 ng/ml

4.3.6 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธี

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ด้วยสารบ่งชี้มะเร็งตัวอื่น ได้แก่ AFP, NSE และ กรดยูริก เปรียบเทียบกับค่าการตอบสนองต่อ CEA ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5.0 ng/ml พบว่า AFP, NSE และ กรดยูริก ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพราะไม่สามารถจับกับแอนติบอดีได้ ดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.13 ในขณะที่เมื่อเติม CEA เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ได้สารละลายสีเหลือง แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์หา CEA สูง

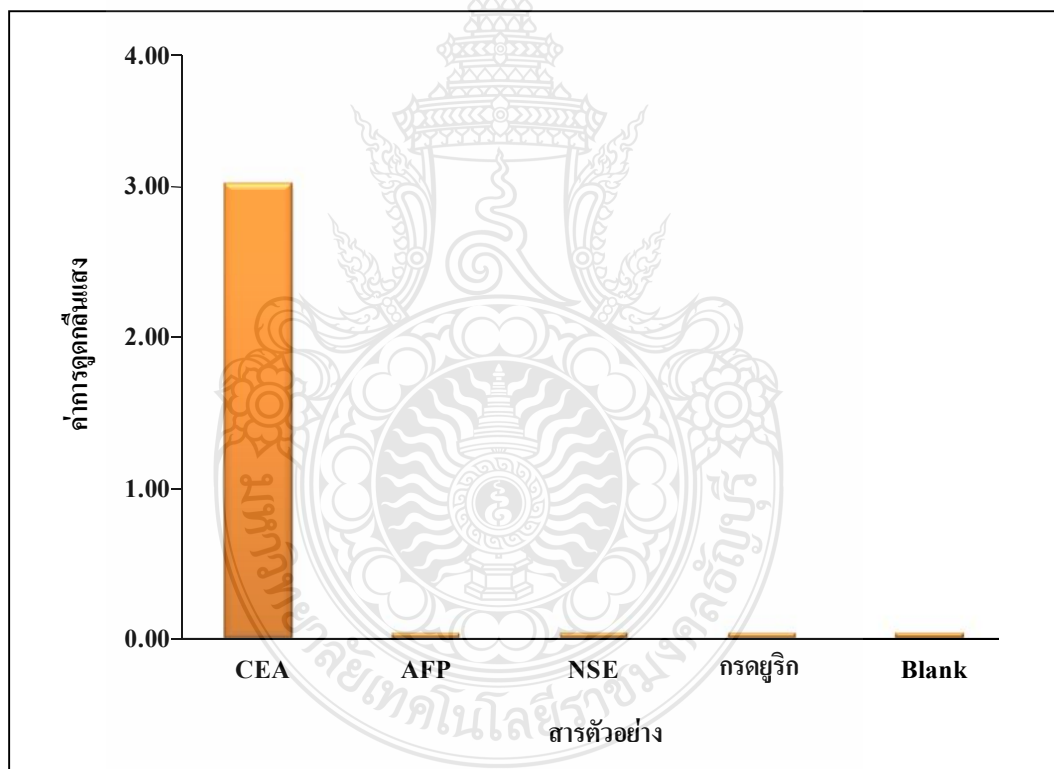


CEA AFP NSE กรดยูริก Blank

รูปที่ 4.13 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CEA

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารต่างๆ

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง
CEA	5.0	0.3030
AFP	5.0	0.0000
NSE	5.0	0.0000
กรดยูริก	5.0	0.0000
Blank	-	0.0000



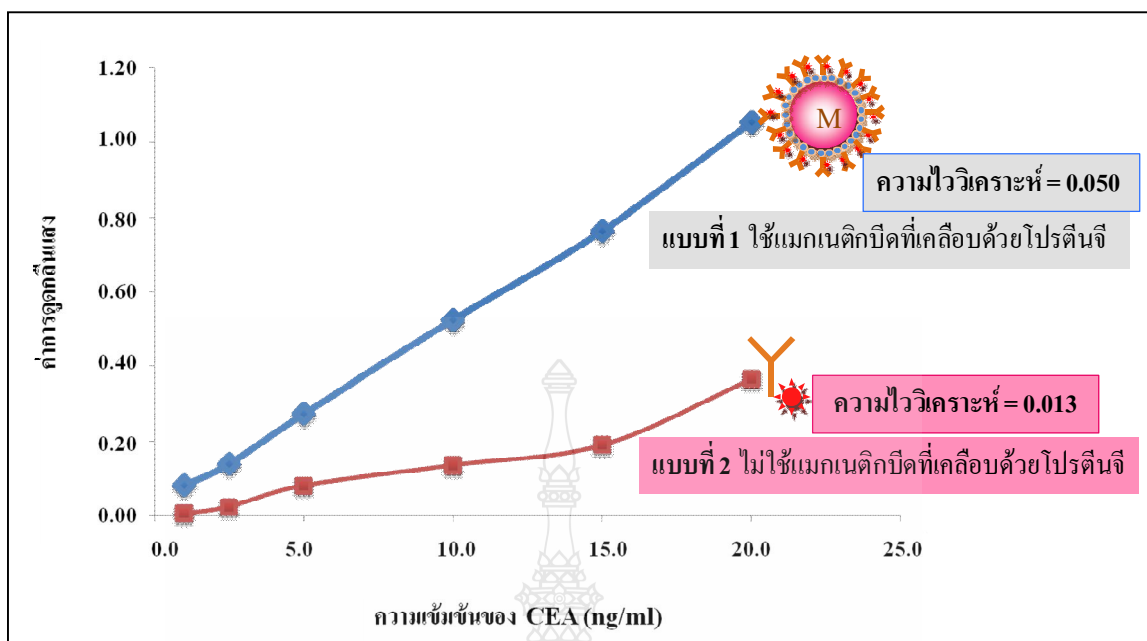
รูปที่ 4.14 แสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

4.4 การหาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยใช้แมกเนติกบีด

ศึกษาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์ด้วยแมกเนติกบีด โดยทำการทดลองสองแบบคือ แบบที่ 1 ใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนเป็นตัวติดฉลากด้วยไบโอดีนและHRP แบบที่ 2 ไม่ใช้แมกเนติกบีด โดยใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีนและHRP เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับความเข้มข้นของ CEA เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการทดลองแบบที่ 1 และ 2 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.12 พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CEA ที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดลองทั้งสองแบบ เห็นได้ชัดเจนว่าการใช้แมกเนติกบีดในการขยายสัญญาณ ให้ค่าสัญญาณที่สูงกว่าถึง 4 เท่า (รูปที่ 4.15) ทั้งนี้เพราะว่า บนพื้นผิวของแมกเนติกบีดมีปริมาณแอนติบอดีที่มี HRP ติดอยู่จำนวนมาก จึงทำให้ถึงแม้ว่าการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียงตัวเดียว แต่ HRP ที่เหลือรอบๆแมกเนติกบีดก็สามารถเกิดสัญญาณได้ จึงทำให้ได้ค่าการตอบสนองมากกว่าไม่ใช้แมกเนติกบีด เพราะการใช้เฉพาะแอนติบอดี ติดฉลาก HRP เพียงโมเลกุลเดียว จึงทำให้อัตราการเกิดสัญญาณระหว่างแอนติบอดีกับ HRP เป็นเพียง 1:1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า วิธีอิมมูโนเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้แมกเนติกบีดในการขยายสัญญาณได้จริง

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการหาประสิทธิภาพของการเพิ่มความไววิเคราะห์โดยเปรียบเทียบระหว่างการ
การใช้แมกเนติกบีดและไม่ใช้แมกเนติกบีด

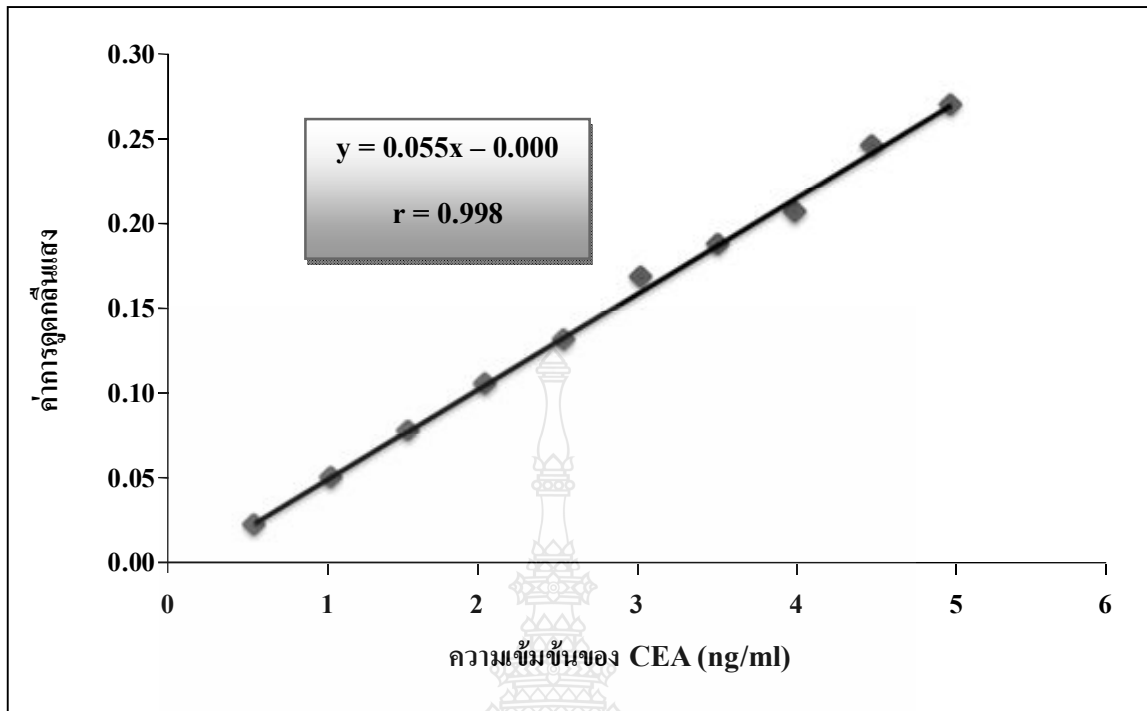
ความเข้มข้นของ CEA (ng/ml)	แบบที่ 1 ใช้แมกเนติกบีด	แบบที่ 2 ไม่ใช้แมกเนติกบีด
1	0.083	0.007
2.5	0.141	0.025
5	0.275	0.082
10	0.525	0.137
15	0.763	0.191
20	1.053	0.368



รูปที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้แมกเนติกบีด และไม่ใช่แมกเนติกบีด

4.5 การตรวจหา CEA ในตัวอย่างซีรัม

เมื่อทำการทดลองได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริง โดยใช้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งทุกๆตัวอย่างจะนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ CEA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ng/ml ดังรูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นที่วัดได้ด้วยวิธีอิมมูโนเซนเซอร์ มีค่าใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในโรงพยาบาล (วิธี ELISA) ดังตารางที่ 4.13 และเมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอิมมูโนเซนเซอร์และวิธีมาตรฐาน มาทดสอบความแตกต่างของสองวิธี ด้วยสถิติ t-test ผลการทดสอบ พบว่าค่าที่คำนวณได้ มีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากตาราง (ค่าจากตารางเท่ากับ 2.776) [45] จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมา สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริงได้ ซึ่งมีข้อดีกว่าที่ใช้ในโรงพยาบาลคือ เครื่องมือราคาไม่แพงและไม่ซับซ้อน สามารถทำการวิเคราะห์ได้เร็วในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เครื่องมือพื้นฐานเช่น เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และมีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดและมีความไววิเคราะห์สูง



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของการวัด CEA ในสารตัวอย่าง

ตารางที่ 4.13 การทดสอบผลการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ด้วย สถิติ t-test [45]

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น CEA (ng/ml)		ความแตกต่างของสองวิธี (D)	D ²
	วิธีอิมมูโนเซนเซอร์	วิธีมาตรฐาน*		
1	0.44	0.60	-0.16	0.0256
2	1.67	1.70	-0.03	0.0009
3	3.51	3.50	0.01	0.0001
4	4.40	4.15	0.25	0.0625
5	5.81	5.70	0.11	0.0121
			ΣD = 0.18	ΣD² = 0.1012
			t _{calculate}	0.5233
			t _{table}	2.776

* หมายเหตุ ค่าที่ระบุในตารางได้มาจาก ค่าของโรงพยาบาลที่ตรวจวัดด้วยวิธี ELISA

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารบ่งชี้มะเร็ง คือ CEA ซึ่งเป็นสารบ่งชี้มะเร็ง โดยใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีเป็นตัวขยายสัญญาณในการตรวจวัดเพื่อเพิ่มความไววิเคราะห์ โดยวิธีอิมมูโนเซนเซอร์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหา CEA ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความไววิเคราะห์สูง โดยอาศัยหลักการโดยการจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้อิมมูโนเซนเซอร์แบบแซนวิช โดยเคลือบ anti-CEA บนไมโครเพลทและเติมแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติบอดีลงไป หลังจากนั้นล้างส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกและเติมแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอติน และเติมสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสลงไป ทำการตรวจวัดแอนติเจน CEA โดยสัญญาณที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณ CEA ที่เข้าจับแอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งใช้ แมกเนติกบีดเพื่อช่วยในการเพิ่มสัญญาณ และมี $TMB+H_2O_2$ เป็นสับสเตรท ทำให้เห็นสีของสารละลายเป็นสีฟ้า ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ CEA และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟิวริกจะเกิดเป็นสารละลายสีเหลือง

ขั้นแรกทำการศึกษาวิธีการเตรียมแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอติน โดยวิธีโคอะไลซิสเพื่อกำจัดโซเดียมเอไซด์ ได้รับความเข้มข้นของแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอตินเท่ากับ 10 mg/ml และบล็อกด้วย BSA จนได้รับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% จากนั้นตรึงแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอตินบนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี โดยใช้สารเชื่อมโยงวักกูลูตารอลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.5 M เพื่อให้เกิดพันธะโควาเลนต์ และทดสอบการเกาะติดของแอนติบอดีบนแมกเนติกบีดด้วย SEM ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอตินสามารถตรึงอยู่บนแมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีได้

ขั้นต่อไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณ CEA โดยขั้นแรกศึกษาผลของการหยุดปฏิกิริยา พบว่าจะต้องใช้กรดซัลฟิวริกในการหยุดปฏิกิริยา เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 450 nm และได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เคลือบในไมโครเพลท จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 0.1 mg/ml

จากนั้นศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าใช้เวลาในการทดลองที่ 60 นาที สามารถทำให้แอนติบอดีและแอนติเจนจับกันอย่างสมบูรณ์ที่สุด ทำให้ทราบว่าวิธีการเคลือบแอนติบอดีบน

เพลทสามารถตรวจวัด CEA ได้จริง ดังนั้นจึงทำการศึกษาแอนติบอดีตัวที่สองต่อ โดยศึกษาความเข้มข้นของแมกเนติกบีดที่ตรึงด้วยแอนติบอดีติดฉลากด้วยไบโอดีน (แอนติบอดีตัวที่สอง) พบว่าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5 mg/ml และขั้นสุดท้ายทำการศึกษาความเข้มข้นของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดส พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสคือ 0.01 mg/ml เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นอีก ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงมาก ซึ่งเกิดจากสเตรปตาวิดิน-เปอร์ออกซิเดสที่ใช้ มีความเข้มข้นสูงเกินไป ทำให้ดูดซับบนไมโครเพลท ทำให้ค่าการดูดกลืนที่ได้สูงมาก ดังนั้นจึงเลือกที่ความเข้มข้น 0.01 mg/ml

เมื่อทำการทดลองได้สถานะที่เหมาะสมแล้ว จึงศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ CEA โดยใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจี ผลการทดลองพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้แมกเนติกบีดที่เคลือบด้วยโปรตีนจีในการขยายสัญญาณเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า มีความเที่ยง (%RSD <30) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สูง (เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนอยู่ในช่วง 40-120%) โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงคือ 0.05-50.0 ng/ml มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.998 โดยที่วิธีวิเคราะห์นี้มีความไววิเคราะห์เท่ากับ 0.051 Abs/ng/ml เมื่อศึกษาผลของตัวรบกวน ได้แก่ AFP, NSE และกรดยูริก ผลการทดลองพบว่าตัวรบกวนดังกล่าว ไม่มีผลต่อการตรวจวัด CEA แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ CEA สูง โดยที่มีขีดจำกัดในการตรวจวัดและขีดจำกัดในการตรวจพบเชิงคุณภาพเท่ากับ 0.005 ng/ml และ 0.05 ng/ml ตามลำดับ

สุดท้ายทดสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ CEA ในตัวอย่างจริง โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธีมาตรฐานของโรงพยาบาล โดยใช้ตัวอย่างซีรัมที่ได้จากโรงพยาบาล จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาเจือจางเป็น 2 เท่าด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นนำมาตรวจวัดโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยใช้สถิติ t-test ผลการทดลองทางสถิติพบว่าการตรวจวัดด้วยวิธีที่พัฒนาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีมาตรฐานของโรงพยาบาล ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้มีข้อดีคือใช้เวลาในการตรวจวัดที่รวดเร็ว โดยเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดในเทคนิคอิมมูโนเซนเซอร์สามารถตรวจวัดได้สะดวก โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการตรวจวัด เมื่อเทียบกับตัวตรวจวัดทางโรงพยาบาล ซึ่งตรวจวัดด้วย microplate reader ที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีอิมมูโนเซนเซอร์สำหรับวิเคราะห์หาสารบ่งชี้มะเร็งได้จริง และนำไปใช้ในงานได้จริง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากในการทดลองด้วยวิธีนี้จะใช้แอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ และใช้สารในปริมาณน้อย อาจมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องมีความระมัดระวังในทุกขั้นตอนการทดลอง โดยเฉพาะขั้นตอนการล้าง ควรล้างสารละลายที่มากเกินไปออกให้หมด เพื่อป้องกันการเกิดผลการทดลองคลาดเคลื่อน

5.2.2 การนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ตรวจหาปริมาณสารอื่น ควรมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง



บรรณานุกรม

- [1] L. Meiyang, J. Chunping, J. Qinghui, et al, "Novel colorimetric enzyme immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen," *Talanta*, vol. 81, pp. 1625–1629, 2010.
- [2] P.J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, et al, "Antibody production, design and use for biosensor-based applications," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, pp. 10–26, 2009.
- [3] H. Xiulan, Y. Ruo, C. Yaqin, et al, "A sensitive amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen detection with porous nanogold film and nano-Au/chitosan composite as immobilization matrix," *J. Biochem. Biophys*, vol. 70, pp. 823-829, 2008.
- [4] J. Wen, Y. Ruo, C. Chai, et al, "A novel electrochemical immunoassay based on diazotization-coupled functionalized bioconjugates as trace labels for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 2786-2790, 2011.
- [5] M. Grunnet and J.B. Sorensen, "Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 76, pp. 138-143, 2012.
- [6] A.K. Watorek, A. Laskowska, J. Salwa, et al, "CEA-related proteins on human urothelial cell lines of different transformation grades," *Cancer Letters*, vol.139, pp. 15-22, 1999.
- [7] Y. Zhanjun, Z. Chen, Y. Feng, et al, "Automated chemiluminescent dual-analyte immunoassay based on resolved immunosensing channels," *Talanta*, vol. 82, pp. 1462-1467, 2010.
- [8] H. Qun, "Protein complexes/aggregates as potential cancer biomarkers revealed by a nanoparticle aggregation immunoassay," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol.78, pp. 259-265, 2010.
- [9] F.H. Xiao, "Magnetic-controlled non-competitive enzyme-linked voltammetric immunoassay for carcinoembryonic antigen," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, pp. 267-275, 2008.
- [10] H.Y. Tsai, Y.C. Hsieh, Y.M. Su, et al, "Effects of particle characteristics on magnetic immunoassay in a thin channel," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, pp. 38-43, 2011.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [11] K. Masahide, M. Yasuko, A. Fumiko, et al, Reducing interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) by using a human/mouse chimeric antibody to CEA as the tracer, *Journal of Immunological Method*, vol. 180, pp. 81-91, 1995.
- [12] J.F. Laura, M. Neumaier, J.E. Shively, et al, “Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs,” *Immunotechnology*, vol. 4, pp. 49-57, 1998.
- [13] A.J. Killard, B. Deasy, R.O. Kennedy, et al, “Antibodies: production, functions and applications in biosensors,” *Trends in analytical chemistry*, vol. 14, pp. 257-266, 1995.
- [14] ทักษิณี สุโกศล, แอนติเจนและแอนติบอดี ในอิมมูโนวิทยา, พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : บริษัท เค.พี.พรินติ้ง จำกัด, 2537.
- [15] S. Sell, *Basic Immunology: immune mechanisms in health and disease*, New York: Elsevier, 1987.
- [16] G.M. Bernier, *Antibody and Immunoglobulins: Structure and Function. In : Immunology III*, Edited by Bellanti JA. 3rd ed. Tokyo : Igaku-Shoin/Saunders, 1985.
- [17] J.W. Goodman, *Immunoglobulins I: Structure and Function. In: Basic and Clinical Immunology*, Edited by Stites DP, Stobo JD and Wells JV. 6th ed. California : Appleton&Lange, 1987.
- [18] I. Roitt, J. Brostoff and D.Male, *Immunology*, 4th ed. London : Mosby, 1996.
- [19] D. Greenwood, R. Slack and J. Reutherer, *Medical Microbiology*, 15th ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 1997.
- [20] T.G. Parslow. *Immunoglobulins and immunoglobulin genes. In: Medical Immunology*, Edited by Stites DP, Terr AI and Parslow TG. 9th ed. Connecticut : Appleton & Lange, 1997.
- [21] P.B. Lippa, L.J Sokoll and D.W. Chan, “Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, pp. 1-26, 2001.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [22] D. Haidopoulos, M.M. Konstadoulakis, P.T. Antonakis, et al, "Circulating anti-CEA antibodies in the sera of patients with breast cancer," *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 26, pp. 742–746, 2000.
- [23] W. Jie, T. Jinhai, D. Zong, et al, "A disposable electrochemical immunosensor for flow injection immunoassay of carcinoembryonic antigen," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 102–108, 2006.
- [24] G. Zhiqiang, Z. Jie and T.P. Boon, "A doubly amplified electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 1825–1830, 2009.
- [25] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, et al, "A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis," *Analytica Chimica Acta*, vol. 605, pp. 111-129, 2007.
- [26] J. Xinya, C. Yaqin, Y. Ruo, et al, "An ultrasensitive luminol cathodic electrochemiluminescence immunosensor based on glucose oxidase and nanocomposites: Graphene–carbon nanotubes and gold-platinum alloy," *Analytica Chimica Acta*, vol. 783, pp. 49– 55, 2013.
- [27] Y. Hongchuan, Y. Ruo, C. Yaqin, et al, "Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 56, pp. 116– 124, 2011.
- [28] H.C. Lin and W.C Tsai, "Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of *staphylococcal enterotoxin B*," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 1479-1483, 2003.
- [29] Q. Shuxue, L. Juntao, L. Jinping, et al, "A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum," *Analytica Chimica Acta*, vol. 766, pp. 94– 99, 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [30] S. Xiaobin and M. Zhanfang, "Electrochemical immunosensor based on nanoporous gold loading thionine for carcinoembryonic antigen," *Analytica Chimica Acta*, vol.780, pp. 95– 100, 2013.
- [31] C. Xia, W. Ning, J. Shu, et al, "Bimetallic AuPt nanochains: Synthesis and their application in electrochemical immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 39, pp. 226-230, 2013.
- [32] L. Zhimin and M. Zhanfang, "Fabrication of an ultrasensitive electrochemical immunosensor for CEA based on conducting long-chain polythiols," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 46, pp. 1-7, 2013.
- [33] L. Fang, Z. Rui, Z.Kaihong, et al, "Magnetic beads-based electrochemical immunosensor for detection of pseudorabies virus antibody in swine serum," *Talanta*, vol. 87, pp. 302-306, 2011.
- [34] H. Mirian, A. Miguel and E. Alberto, "Simplified calibration and analysis on screen-printed disposable platforms for electrochemical magnetic bead-based immunosensing of zearalenone in baby food samples," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 1755-1760, 2010.
- [35] S. Thangavelu, D. Jagotamoy, H.W. Sang, et al, "Ultrasensitive electrochemical immunosensing using magnetic beads and gold nanocatalysts," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 932-938, 2008.
- [36] Z. Bing, T. Dianping, L. Bingqian, et al, "Nanogold-functionalized magnetic beads with redox activity for sensitive electrochemical immunoassay of thyroid-stimulating hormone," *Analytica Chimica Acta*, vol. 711, pp. 17-23, 2012.
- [37] R.K. Mendes, S. Laschi, L.T. Kubota, et al, "A disposable voltammetric immunosensor based on magnetic beads for early diagnosis of soybean rust," *Sensors and Actuators B*, vol. 166–167, pp. 135-140, 2012.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [38] C. Huafeng, T. Dianping, Z. Bing, et al, "Electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nanosilver-coated magnetic beads and gold-graphene nanolabels, " *Talanta*, vol. 91, pp. 95-102, 2012.
- [39] P.R. Patricio, A.J. Fernando, V.R. Nelio, et al, "Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine, " *Sensors and Actuators B*, vol. 162, pp. 327-333, 2012.
- [40] H. Akhtar, B. Lise and J.L. Marty, "Enzyme-linked immunosensor based on super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid, " *Analytica Chimica Acta*, vol. 690, pp. 248-252, 2011.
- [41] F. Conzuelo, S. Campuzano, A.J. Reviejo, et al, "Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk, " *Analytica Chimica Acta*, vol. 737, pp. 29-36, 2012.
- [42] M. Eguilaz, J.M. Pingarron, S. Campuzano, et al, "An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 517-522, 2010.
- [43] C.H. Zhou, Y.M. Long, B.P. Qi, et al, "A magnetic bead-based bienzymatic electrochemical immunosensor for determination of H9N2 avian influenza virus, " *Electrochemistry Communications*, vol. 31, pp. 126-132, 2013.
- [44] I. Taverniers, L.D. Marc and E.V. Bockstaele "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, " et al, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 29-34, 2004.
- [45] J.C. Miller and J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1993.

ภาคผนวก





ภาคผนวก ก

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

PURE AND APPLIED CHEMISTRY
INTERNATIONAL CONFERENCE 2013



GLOBAL

Chemical Science for Green Community

CHEMICAL SCIENCE FOR GREEN COMMUNITY



January 23-25, 2013

Bangsaen Beach

THAILAND

POSTER PRESENTATION PROGRAM

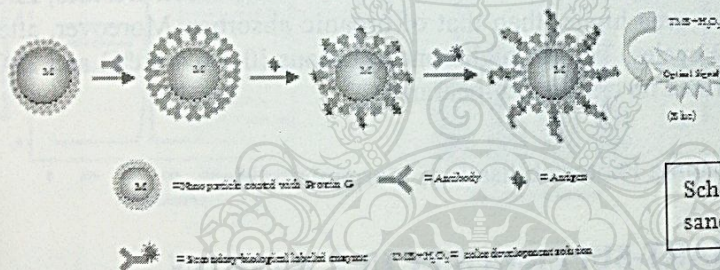
Poster Presentation session/Date	A (23-Jan-2013)	B (24-Jan-2013)	C (25-Jan-2013)
Analytical Chemistry	ANC-P-001-057	ANC-P-058-097	
Biological / Biophysical Chemistry and Chemical Biology		BBC-P-001-029	
Bioinformatics		BIF-P-001	
Chemical Education		CHE-P-001-005	
Cosmetics		COS-P-001-007	
Environmental Chemistry	ENC-P-001-035		
Free radicals/ Antioxidants			FRA-P-001-015
Food safety and Food Chemistry	FSC-P-001-020		
Industrial Chemistry and Innovation		IIN-P-001-021	
Inorganic Chemistry	INC-P-001-021		
Material Sciences and Nanotechnology	MSC-P-001-052		MSC -P-053-111
Organic Chemistry and Medicinal Chemistry		OCM-P-001-033	OCM-P-034-079
Physical and Computational Chemistry		PCC-P-001-030	PCC-P-031-053
Polymer Chemistry	PMC-P-001-025	PMC-P-026-055	
Petroleum Chemistry and Catalysis		PTC-P-001-014	
Installation Date/Time	22-Jan-2013 23-Jan-2013	16.00-20.00 8.00-9.00	24-Jan-2013 8.00-10.00
Display			25-Jan-2013 8.00-9.00
Discussion		14.00 - 18.30	13.00 - 18.30 9.00 - 10.10
Removable Date/Time		17.10 - 18.30	17.10 - 18.30 9.00 - 10.10
		18.30-20.00	18.30-20.00 10.30-12.00

MSC
P
035

PREPARATION OF BIOBEADS FOR CLINICAL APPLICATION

N. Mhadbamrung, S. Moonmangmee, S. Teepoo

Department of Chemistry, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand



Schematic of CEA detection base on sandwich-type immunoassay

Keywords

Immunoassay; Tumor marker; Nanobead and biobead



PREPARATION OF BIOBEADS FOR CLINICAL APPLICATION

N. Mhadbammung¹, S. Moonmangmee², S. Teepoo^{1*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Klong6, Thanyaburi, Pathumthani 12110, Thailand

²Thailand Institute of Scientific and Technological Research, KlongLuang, Pathumthani 12120 Thailand

*E-mail: siriwan@mail.rmutt.ac.th

Abstract

In this work, bifunctional nanobeads were investigated for tumor marker detection based a sandwich immunoassay. Protein G coated nanobeads were use as support to immobilize the specific antibody via covalent binding. The spectroscopy was used to demonstrate the nanobead conjugated with antibody. A sandwich immunoassay using a tracer with horseradish peroxidase for the enzymatic labeling was performed. The trapped antigen was detected by spectroscopy at 650 nm. The colorimetric response of the sandwich immunoassay was proportional to tumor marker concentration. The biobeads provided a promising probe for clinical detection for the tumor marker.

Introduction

Recently, nanoparticles have been used in analytical method because of their special physical and chemical properties. Especially, nanobeads are considered as a good matrix because of their biocompatibility, chemical stability and their surfaces are easily modified biological element. Therefore, in this work we investigated the use of bionanobeads for tumor marker measurement.

Objective

To develop immunosensor for detection of tumor marker concentration by using nanobeads

Method

Preparation of nanobeads

Resuspend nanobeads in the vial

Transfer 50 μ L (1.5 mg) of nanobeads to a tube

Separate the beads from the solution and remove the supernatant

Measure the nanobead by UV-visible spectroscopy and dynamic light scattering

Immobilization of antibody on nanobeads

Add antibody in phosphate buffer with Tween®-20 into the nanobeads

Incubate with rotation for 10 min at room temperature

Separate the nanobeads from the solution and then remove the supernatant

Resuspend the nanobeads-antibody complex in phosphate buffer and measurement the absorption spectrum by UV-visible spectroscopy and the size with dynamic light scattering

Results and discussion

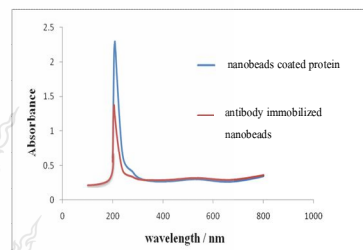


Fig. 1 UV-vis absorption spectra of nanobeads coated protein and antibody immobilized nanobeads.

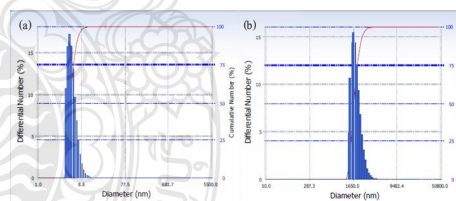


Fig. 2 Dynamic light scattering result of nanobeads coated protein (a) and antibody immobilized nanobeads (b).

Conclusion

We developed a colorimetric enzyme immunoassay to detect tumor marker in which used as carriers of enzyme and bionanobeads were used as supporting substrates. The proposed method was successfully applied to measure antigen. The absorbance intensity increased in proportion to the addition of antigen concentration. It has been demonstrated here the immunosensor could be applied for clinical detection.

References

Meiyang Liu, Chungping Jia, Qinghui Jin, Xinhui Lou, Shihua Yao, Jiaqing Xiang, Jianlong Zhao, Talanta, 81 (2010) 1625–1629.



PACCON
PURE AND APPLIED CHEMISTRY
INTERNATIONAL CONFERENCE 2013



Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013)
"Global Chemical Sciences for Green Community"

The Tide Resort, Bangsaen Beach, Chon Buri, Thailand, 23-25 January, 2013

In honor of your attendance, we are pleased to present

CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

to

NAREE MHADBAMRUNG

on 25 January 2013

Supawan Tantayanon

Assoc. Prof. Dr. Supawan Tantayanon
President of Chemical Society of Thailand

T. Usavadee

Assoc. Prof. Dr. Usavadee Tuntivanuruk
Dean of Faculty of Science, Burapha University

ภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณ



1. การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

1.1 การหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

1.1.1 ศึกษาการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

โดยทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการศึกษการทำซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.2800
2	0.2790
3	0.2760
4	0.2790
5	0.2770
6	0.2780
7	0.2820
%RSD	0.72

คำนวณจากสูตร
$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$
$$= \frac{0.0020}{0.2787} \times 100$$
$$= 0.72 \%$$

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง

1.1.2 ศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

โดยทำการทดลองวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากข้อมูลในตารางตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาการทวนซ้ำของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.2787
2	0.2713
3	0.3103
4	0.2737
5	0.2667
6	0.2837
7	0.2600
%RSD	1.40

คำนวณจากสูตร

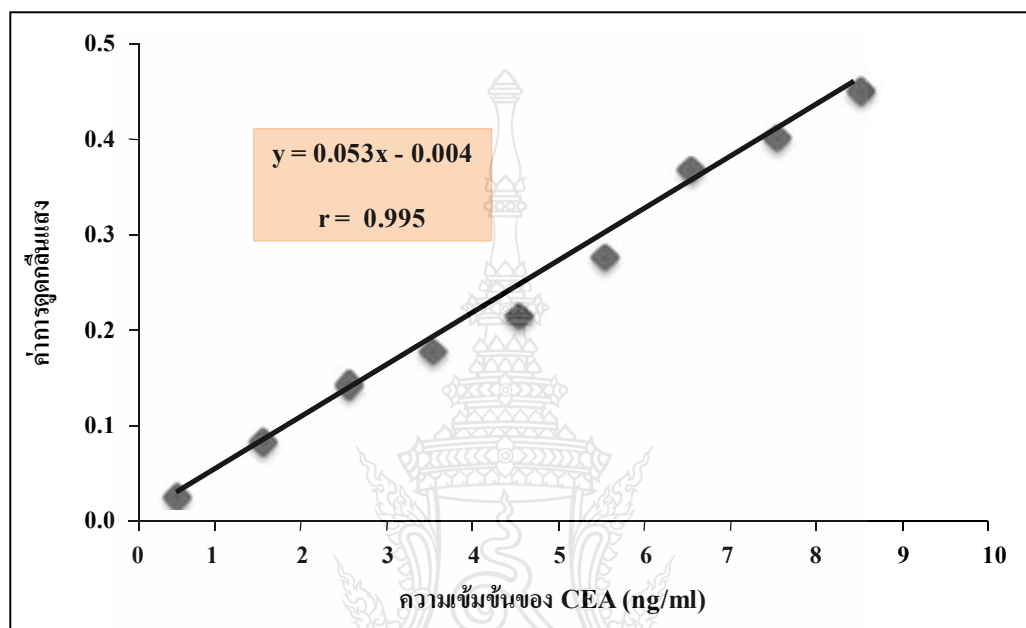
$$\begin{aligned} \%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \\ &= \frac{0.0039}{0.2778} \times 100 \\ &= 1.40 \% \end{aligned}$$

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง

1.1.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

โดยการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน นำค่าที่ได้จากตารางที่ 4.9 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ CEA (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของ CEA ในสารตัวอย่าง

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ CEA (ng/ml)			ค่าการดูดกลืนแสง	% การได้กลับคืน
	ก่อนเติม	เติม	หลังเติม		
1	0.6	0.5	1.0	0.0495	82
2	1.7	2.0	3.3	0.1702	80
3	3.5	3.0	6.1	0.3211	88
4	4.4	4.0	8.2	0.4296	95
5	5.7	5.0	10.3	0.5421	92

$$\text{คำนวณจากสูตร } \% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

C_{sp} คือ ความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐาน กับสารตัวอย่างที่เติมลงไป (จากการคำนวณ)

C_s คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เติมลงในสารละลายมาตรฐาน

C_a คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

คำนวณความเข้มข้นที่ได้ จากสมการเส้นตรง $y = 0.053x - 0.004$

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

ตัวอย่างที่ 1

$$\text{จาก } y = 0.053x - 0.004 \quad \% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

$$x = \frac{0.0495 + 0.004}{0.053} = \frac{(1.01 - 0.6)}{0.5} \times 100$$

$$= 1.01 \text{ ng/ml} \quad = 82 \%$$

ตัวอย่างที่ 2

$$\text{จาก } y = 0.053x - 0.004 \quad \% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

$$x = \frac{0.1702 + 0.004}{0.053} = \frac{(3.29 - 1.7)}{2.0} \times 100$$

$$= 3.29 \text{ ng/ml} \quad = 80 \%$$

ตัวอย่างที่ 3

$$\text{จาก } y = 0.053x - 0.004 \quad \% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

$$x = \frac{0.3211 + 0.004}{0.053} = \frac{(6.13 - 3.5)}{3.0} \times 100$$

$$= 6.13 \text{ ng/ml} \quad = 88 \%$$

ตัวอย่างที่ 4

$$\text{จาก } y = 0.053x - 0.004$$

$$x = \frac{0.4296 + 0.004}{0.053}$$

$$= 8.18 \text{ ng/ml}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

$$= \frac{(8.18 - 4.4)}{4.0} \times 100$$

$$= 95 \%$$

ตัวอย่างที่ 5

$$\text{จาก } y = 0.053x - 0.004$$

$$x = \frac{0.5421 + 0.004}{0.053}$$

$$= 10.3 \text{ ng/ml}$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_{sp} - C_s)}{C_a} \times 100$$

$$= \frac{(10.3 - 5.7)}{5.0} \times 100$$

$$= 92 \%$$



2. การตรวจหา CEA ในตัวอย่างซีรัม

โดยใช้ตัวอย่างซีรัมจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งทุกๆตัวอย่างจะนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของ CEA (รูปที่ 4.16) และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอิมมูโนเซนเซอร์และวิธีมาตรฐาน มาทดสอบความแตกต่างของสองวิธี ด้วยสถิติ t-test ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.13 การทดสอบผลการวิเคราะห์ด้วย สถิติ t-test

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น CEA (ng/ml)		ความแตกต่างของสองวิธี (D)	D ²
	วิธีอิมมูโนเซนเซอร์	วิธีมาตรฐาน		
1	0.44	0.60	-0.16	0.0256
2	1.67	1.70	-0.03	0.0009
3	3.51	3.50	0.01	0.0001
4	4.40	4.15	0.25	0.0625
5	5.81	5.70	0.11	0.0121
			$\Sigma D = 0.18$	$\Sigma D^2 = 0.1012$
				$t_{\text{calculate}} = 0.5233$
				$t_{\text{table}} = 2.776$

$$t\text{-test} = \frac{\frac{\Sigma D}{N}}{\sqrt{\frac{\Sigma D^2 - \frac{(\Sigma D)^2}{N}}{N(N-1)}}$$

จำนวนจากสูตร

ΣD คือ ผลรวมของค่าความแตกต่างระหว่างสองวิธี

N คือ จำนวนตัวอย่าง

$$\text{จาก } t\text{-test} = \frac{\frac{\sum D}{N}}{\sqrt{\frac{\sum D^2 - \frac{(\sum D)^2}{N}}{N(N-1)}}$$

$$= \frac{\frac{0.18}{5}}{\sqrt{\frac{0.1012 - \frac{(0.18)^2}{5}}{5(5-1)}}$$

$$= \frac{0.036}{\sqrt{\frac{0.1012 - 0.0065}{5(4)}}$$

$$= \frac{0.036}{\sqrt{4.735 \times 10^{-3}}}$$

$$= \frac{0.036}{0.0688}$$

$$t\text{-test} = 0.5233$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวนารี หมดบำรุง
วัน เดือน ปีเกิด 9 กันยายน 2531
ที่อยู่ 41 ซอยเคหะร่มเกล้า 78 แยก 1 แขวง/เขต สะพานสูง กรุงเทพฯ 10240
การศึกษา สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

