ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร (FTH-212)

การตรวจวัดปริมาณยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลในอาหารด้วยเทคนิค ELISA

อาจารย์ ดร. จิราพร เจริญพูล

****

บทนำ

คลอแรมฟินิคอลเป็นยาปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum antibiotic) และมีผลข้างเคียงต่อร่างกายมนุษย์ ก่อให้เกิดภาวะเลือดจาง ปัจจุบันห้ามใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อผลิตอาหาร เช่น การเลี้ยงผึ้ง สัตว์น้ำ อย่างไรก็ดีพบการปนเปื้อนคลอแรมฟินิคอลในอาหารส่งออกจากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจการปนเปื้อนมีหลายวิธี เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC), liquid chromatographic mass spectrometer (LC/MS/MS), แต่วิธีการเหล่านี้ต้องใช้เวลา และเครื่องมือมีราคาแพง วิธีการทดสอบทางอิมมูนเป็นการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนยาปฏิชีวนะโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีการทดสอบหลายวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ เช่น radioimmunoassay, enzyme immunoassay, rapid test (strip test), Biacore วิธีที่ที่ทำได้ ง่าย รวดเร็ว และมีความไวและความแม่นยำสูง คือ Enzyme-liked immunosorbent assay (ELISA) สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารหลายประเภท เช่น น้ำผึ้ง นม นมผง ไข่ เนื้อ ปลา กุ้ง ไส้กรอก โดยนำอาหารเหล่านี้มาสกัดก่อนนำไปทดสอบ ELISA ยังนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ ในบทปฏิบัติการนี้ นักศึกษาจะได้ทดลองตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนคลอแรมฟินิคอลในตัวอย่างอาหาร

หลักการ Competitive enzyme immunoassay

แอนติบอดีจำเพาะต่อคลอแรมฟินิคอลถูกนำมาเคลือบในหลุมของ microtiter plate เมื่อเติมสารละลายคลอแรมฟินิคอลมาตรฐาน (standard) หรือ ตัวอย่างตรวจ (samples) พร้อมกับคลอแรมฟินิคอลที่ติดฉลากด้วย enzyme ลงไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี คลอแรมฟินิคอลที่ติดฉลาก และคลอแรมฟินิคอลที่ไม่ได้ติดฉลาก (standard หรือ sample) จะแย่งกันกันจับกับแอนติบอดี ส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาจะถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนการล้าง เติมสับสเตรต (substrate) ของเอนไซม์จะเกิดสีฟ้าและเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำยา stop solution สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง วัดความเข้มสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 450 nm ปริมาณความเข้มสีจะเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาณคลอแรมฟินิคอลที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์และน้ำยา

1. 96 -well-microtiter plate
2. สารมาตรฐานคลอแรมฟินิคอล (standard) 0, 25 ppt, 50 ppt, 100 ppt, 250 ppt, 750 ppt
3. คอนจูเกท (peroxidase conjugated chloramphenicol concentrate) ระยะการคงตัวจำกัด ควรเตรียมก่อนใช้ คอนจูเกท 1 ส่วนใน บัฟเฟอร์ 10 ส่วน เช่น conjugate 200 µl ใน buffer 2 ml เพียงพอสำหรับ 4 strips
4. substrate [Tetramethylbenzidine-hydrogen peroxide (TMB/H_2O_2)]
5. Stop solution (1 N sulfuric acid)
6. conjugate/ sample dilution buffer (100 ml)

7. washing buffer ; (phosphate buffer saline ;PBS) ละลายผงบัฟเฟอร์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บที่ 4°C ได้นาน 4-6 สัปดาห์
8. centrifuge
9. shaker
10. vortex
11. mixer
12. automatic pipette ขนาด 20-200 μl
13. multichanel automatic pipette ขนาด 300 μl
14. pipette tip
15. กระดาษซับ/ทิชชู่

ขั้นตอนวิธีการทดสอบ

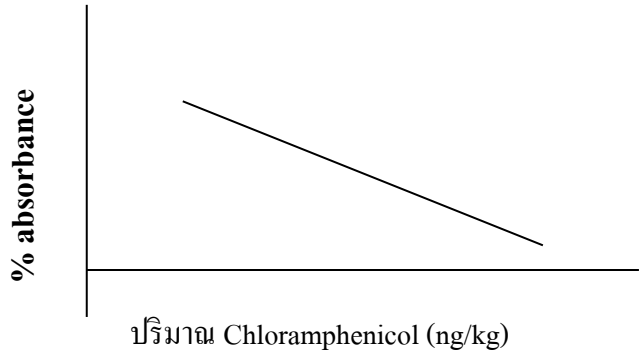
1. นำน้ำยาและชุดทดสอบออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง
2. เขียนหมายเลข standard (Std.) และ unknown (Unk) สารควบคุมผลบวก (positive control ;NC) และสารควบคุมผลลบ (negative control ; NC) บน microtiter plate
3. เติม standard และตัวอย่าง สารควบคุมผลบวกและลบลงในหลุม microtiter plate หลุมละ 50 μl ตามตาราง

แถว	1	2	3
A	Std. 0	Std. 0	Unk.1
B	Std. 25	Std. 25	Unk.1
C	Std. 50	Std. 50	Unk 2
D	Std. 100	Std. 100	Unk 2
E	Std. 250	Std. 250	Unk 3
F	Std. 750	Std. 750	Unk 3
G	NC	NC	Unk 4
H	PC	PC	Unk 4

4. เติม คอนจูเกทเอ็นไซม์ที่เจือจางแล้ว ลงในทุกหลุม หลุมละ 50 μl Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม.
5. เทสารละลายทั้งหมดในเพลททิ้งและซับ โดยคว่ำเพลทเคาะเบาๆ 3-4 ครั้งบนกระดาษทิชชู่
6. เติม washing buffer หลุมละ 250 μl ดูดล้างขึ้นลง 4-5 ครั้ง แล้วดูดสารทั้งหมดทิ้งไป ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายซับด้วยกระดาษทิชชู่ โดยคว่ำเพลทเคาะเบาๆ 3-4 ครั้ง
7. เติมสับสเตรต (Substrate) ลงในทุกหลุมหลุมละ 100 μl ผสมโดยการเคาะเพลทเบาๆ Incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที
8. เติมน้ำยา Stop solution ลงในทุกหลุมหลุมละ 100 μl ผสมโดยการเคาะเพลทเบาๆ นำไปวัดการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 450 nm ควรอ่านผลภายในเวลา 30 นาที
9. คำนวณผลโดยนำเอา OD standard /OD unk x 100 = % absorbance

OD zero standard (std.0)

10. นำค่า % absorbance ไป plot ในกระดาษกราฟ semilog โดยให้แกน Y เป็นค่า % absorbance และแกน X เป็น ค่าความเข้มข้นของ Chloramphnicol (ng/kg or parts per trillion ;ppt)

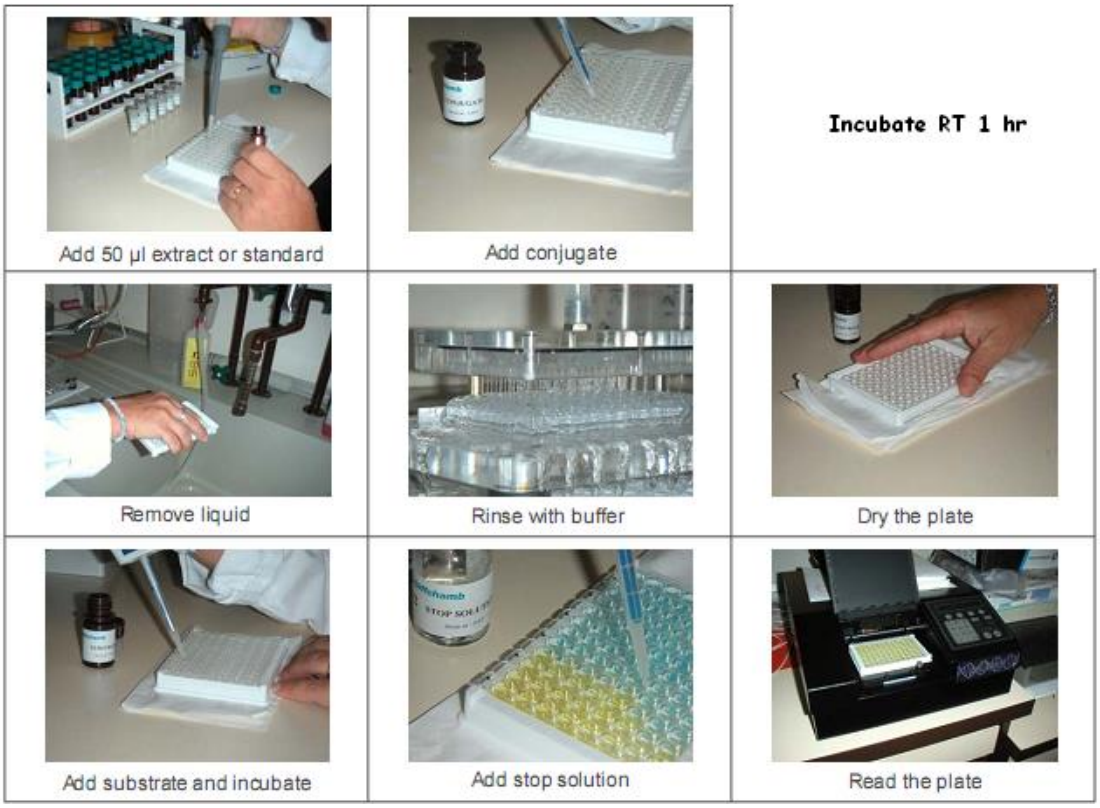


11. นำค่า OD ที่ได้จาก Sample มาอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน
12. ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากควรนำไปทำการเจือจางก่อน และเมื่ออ่านค่าจากกราฟมาตรฐานแล้วให้คูณอัตราการเจือจางกลับ

ข้อควรระวัง

1. สาร Substrate มีความไวต่อแสงมาก ควรเก็บหรือหลีกเลี่ยงไม่ให้โดนแสง
2. หาก สาร Substrate เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินก่อนใช้แสดงว่าน้ำยาเสื่อมคุณภาพ

สรุปขั้นตอนการทดสอบ



ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....
.....
.....
.....
.

****

เอกสารอ้างอิง

1. ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ, เฉลิมพร ควรหา และกนกพร อธิสุข. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์คลอแรมเฟนิคอลตกค้างในนมผงและน้ำผึ้งโดยวิธี LC-MS/MS / วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่49 ฉบับที่ 3 (2550) ; 190-200.
2. Barbara K. Neuhaus, Jefferey A Hurlbut, Walter Hammack. LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp. Laboratory Information Bulletin 2002; 18 (9).
3. Jaenc-Marc Diserense. Microsystems for the detection of food contaminants. Retrieved November 5, 2008. from www.goodfood-project.org/www/Works/Florence2/florencejmd.pdf
4. เอกสารประกอบน้ำยา RIDASCREEN Chloramphenicol Art No. R1505; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany