รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย :** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลเกษตร

2. **โครงการวิจัย :** การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์
   กิจกรรม: พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย):** การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี ELISA
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Development of Ochratoxin A Test Kit by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง:	ศุภรา อัคคะสาระกุล	สังกัด กวป.
ผู้ร่วมงาน :	เนตรา สมบูรณ์แก้ว	สังกัด กวป.
	สุพี วนศิรากุล	สังกัด กวป.
	อัจฉราพร ศรีจุดานุ	สังกัด กวป.

5. **บทคัดย่อ**

การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A; OTA) ในผลิตผลเกษตรทำให้ผลผลิตเสียหายและก่อให้เกิดอันตรายโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค การควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรตลอดกระบวนการผลิตเป็นขั้นตอนแรกของการแก้ปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วถือเป็นมาตรการหนึ่งที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อหา 1) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) และแบบ Direct Competitive ELISA ด้วยวิธี checkerboard titration test 2) อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเคลือบสารในหลุมทดสอบ และ 3) สารละลายที่เหมาะสมในการเจือจางสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ผลการทดสอบพบว่า สาร Ochratoxin A-Bovine Serum Albumin (OTA-BSA) เข้มข้น 5, 6 และ 7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) ทดสอบร่วมกับแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml มีความเหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA ส่วนวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA ควรเคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 µg/ml ทดสอบร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 สำหรับอุณหภูมิและเวลาในการเคลือบหลุมทดสอบให้มีประสิทธิภาพ ควรบ่มหลุมทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) ส่วนการเตรียมสารพิษมาตรฐาน ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ

กรมวิชาการเกษตร

Phosphate Buffer Saline +10 % Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween 20 -Bovine Serum Albumin+7% Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin

Abstract

The contamination of Ochratoxin A (OTA) in agricultural commodities not only affect to the quality of the products but it is also harmful to the health of consumers. Besides the control and prevention of mold and mycotoxin contamination in agricultural products throughout the production process, which is the initial solution to the problem. Furthermore, the development of rapid mycotoxin assay is one of the important measures in solving the problem of mycotoxin contamination in agricultural products. The aims of this study were to develop a rapid mycotoxin analysis method by determining the appropriate 1) concentrations of Ochratoxin A-Bovine Serum Albumin (OTA-BSA) and antiserum against OTA (IgG-OTA) for Indirect Competitive ELISA, and OTA-BSA and enzyme conjugate for Direct Competitive ELISA testing by the Checkerboard titration test, 2) temperature and duration for coating incubation, and 3) OTA standards diluent. For the Indirect Competitive ELISA, the optimum concentration of OTA-BSA were 5, 6 and 7 micrograms/milliliter (µg/ml) with IgG-OTA at the concentration of 0.25 µg/ml. Whilst, the Direct Competitive ELISA was coated with IgG-OTA at the concentration of 4, 5 and 6 µg/ml with the concentration of enzyme conjugate 1:400. In addition, an appropriate time for coated well was incubated at 4°C overnight (approx. 14-15 hr.). For preparation of OTA standard solution, 3 formulations of Phosphate Buffer Saline + 10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween 20-Bovine Serum Albumin + 7% Methanol and Phosphate Buffer + 1% gelatin were effective for dilution.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

โอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A; OTA) เป็นสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* เมื่อเชื้อราเหล่านี้เจริญภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สารโอคราทอกซินประกอบด้วย ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB), ochratoxin C (OTC) และ ochratoxin α (OTα) ซึ่งโอคราทอกซิน เอ มีความเป็นพิษมากที่สุด (Meulenberg, 2012) ความเป็นพิษของโอคราทอกซิน เอ จัดเป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีความสำคัญเป็นลำดับสามในยุโรป อันเนื่องมาจากอันตรายที่อาจก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ในมนุษย์ The International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดสารพิษ Ochratoxin A อยู่ใน Group 2B Possibly carcinogenic to humans คือ อาจจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Edwin *et al*., 2010) Sangare-Tigori *et al*. (2006) รายงานว่า โอคราทอกซิน เอ เป็นพิษต่อไตในสัตว์ทุกชนิดที่ทำการศึกษา และมีแนวโน้มเป็นพิษมากที่สุดต่อมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ใช้ระยะเวลาที่ปริมาณสารพิษถูกขับถ่ายหรือทำลายไปครึ่งหนึ่ง

ยาวนานมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ โอคราทอกซิน เอ มีผลทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ (Teratogenic) มีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immunotoxic) เป็นสารก่อมะเร็งที่มีผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สารพันธุกรรม (Genotoxic) เกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenic) และเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogenic) ซึ่งทั้งหมดนำไปสู่การเกิดโรคที่เป็นอันตรายในปัจจุบัน การปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และอาหารสัตว์หลายชนิด เช่น ในกลุ่มธัญพืช (ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว ข้าวฟ่าง และข้าวโอ๊ต) ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช (ขนมปัง แป้ง และพาสต้า) ไวน์ ผลิตภัณฑ์จากนม (นม และ ชีส) ผลไม้ (องุ่น แอปเปิ้ล และมะเดื่อฝรั่ง) ผัก (มันเทศ กระเทียม หอมใหญ่ มันฝรั่ง และมะเขือเทศ) beans (เมล็ดกาแฟ ถั่วลิสง และถั่วเหลือง) ผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง (ถั่วเมล็ดแห้ง ปลาตากแห้งหรือปลารมควัน ลูกเกด และเนื้ออบแห้ง) ถั่ว งา เครื่องเทศ ธัญพืชสำหรับทารก อาหารสำหรับทารกที่มีส่วนผสมของนม เป็นต้น (Chen *et al*., 2018)

จากผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์ที่พบการปนเปื้อนเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ได้หลายชนิด ทำให้การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญที่ควรตระหนักถึง ซึ่งนอกจากจะทำให้คุณภาพผลผลิตเสียหายแล้ว สารพิษจากเชื้อรายังก่อให้เกิดอันตรายโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค นอกจากการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ตลอดกระบวนการผลิตซึ่งเป็นวิธีการจัดการเพื่อป้องกันในเบื้องต้นแล้ว การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วถือเป็นมาตรการหนึ่งที่แก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร โดยการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษในผลิตผลเกษตรก่อนการนำเข้าหรือส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้ซื้อและผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราสามารถทำได้หลายวิธี คือ วิธีทางชีววิทยา วิธีทางเคมี และวิธีทางอิมมูนวิทยา ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในด้านความยากง่ายของวิธีการ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการ และระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น (กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, 2560) ดังนั้นการเลือกวิธีการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความสามารถของผู้ตรวจวิเคราะห์ และวัตถุประสงค์ของการตรวจวิเคราะห์เป็นหลัก ปัจจุบันประเทศผู้นำเข้าหลายประเทศมีการกำหนดมาตรฐานสินค้าและผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ส่งออก ซึ่งสารพิษจากเชื้อราจัดเป็นข้อกำหนดหนึ่งที่ต้องมีการตรวจวิเคราะห์ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์มาตรฐานการส่งออก และควรมีการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลเกษตรก่อนการจำหน่ายหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค การทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ รวมทั้งสารละลายสำหรับเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมสารพิษมาตรฐาน เป็นขั้นตอนพื้นฐานที่ต้องทำการศึกษาเพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว ด้วยวิธีทางอิมมูนวิทยา ซึ่งเป็นแนวทางที่จะช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตผลเกษตรต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. Micro ELISA Reader
2. Spectrophotometer
3. Microwell plates
4. Ochratoxin A
5. Ochratoxin A-BSA conjugate from *Aspergillus ochraceus* (OTA-BSA)
6. แอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ
7. Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate
8. 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB)
9. ชุดทดสอบโอคราทอกซิน เอ (Veratox® Ochratoxin test kit)

- วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA)

โดยเตรียมแอนติซีรั่ม (Crude Serum) ให้เป็นอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin G, IgG) ด้วยวิธี Ammonium precipitation ตามขั้นตอนดังนี้

1.1 นำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้จากการทดลองการผลิตแอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 0.5-1 มิลลิลิตร จนได้ตะกอนสีขาวขุ่น

1.2 นำแอนติซีรั่มเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการตกตะกอนของแอนติซีรั่ม

1.3 ทิ้งน้ำส่วนใสให้เหลือแต่ตะกอน

1.4 นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.01M Phosphate buffer saline (PBS)

1.5 เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวจนได้ตะกอนสีขาวขุ่น

1.6 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1.2 ถึง 1.4 แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่ dialysis tubing cellulose membrane

1.7 ทำการ dialysis โดยนำแอนติซีรั่มที่อยู่ใน dialysis tubing แช่ในน้ำกลั่น 2 ลิตร วางบนเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) นาน 1 ชั่วโมง

1.8 dialysis อีกครั้งโดยเปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็น 0.01M PBS ทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.9 dialysis ต่อข้ามคืน นำส่วนที่ผ่านการ dialysis แล้วมาแบ่งใส่ micro tube หลอดละ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บแอนติซีรั่มโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) ที่ผลิตได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

กรมวิทยาศาสตร์

นำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ผลิตได้มาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) ด้วย 0.01M PBS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

2. ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในหลุมทดสอบ ด้วยวิธี Checkerboard titration test

2.1 การตรวจวิเคราะห์แบบ Indirect Competitive ELISA ทดสอบโดยเจือจาง OTA-BSA ด้วยสารละลาย 0.01M PBS ให้มีความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) สำหรับเคลือบหลุมทดสอบ และเตรียมแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 µg/ml นำไปทดสอบร่วมกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยมีวิธีการดังนี้

2.1.1 เคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ที่ละลายใน 0.01M PBS ที่ความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 µg/ml หลุมละ 100 ไมโครลิตร (µl)

2.1.2 นำหลุมทดสอบบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3 นำหลุมทดสอบออกมา เทสารในหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย Phosphate Buffer Saline-Tween 20 (PBS-T) 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.1.4 หยด blocking buffer (Phosphate Buffer Saline-Bovine Serum Albumin; PBS-BSA) ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.1.5 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยดแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ละลายด้วย PBS-BSA ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 µg/ml ลงในหลุม ๆ ละ 100 µl

2.1.6 นำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

2.1.7 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.1.8 หยดตามด้วย secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP conjugate) ความเข้มข้น 1:3,000 หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

2.1.9 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.1.10 หยด TMB substrate หลุมละ 100 µl บ่มนาน 10 นาที

2.1.11 หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย 2.89M Phosphoric acid หลุมละ 100 µl นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.2 การตรวจวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA ทดสอบโดยเจือจาง IgG-OTA ด้วยสารละลาย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 µg/ml สำหรับเคลือบหลุมทดสอบ และเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต (OTA-HRP conjugate) ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 และ 1:6400 นำไปทดสอบร่วมกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยมีวิธีการดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

2.2.1 เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ที่ละลายใน coating buffer ความเข้มข้น 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 และ 0.5 µg/ml หลุมละ 100 µl

2.2.2 นำหลุมทดสอบบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3 นำหลุมทดสอบออกมา เทสารในหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.4 หยด blocking buffer (PBS-BSA) ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.5 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง หยด OTA-HRP conjugate ที่เจือจางด้วย PBS-BSA ให้มีความเข้มข้น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 และ 1:6400 ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 µl

2.2.6 นำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.2.7 เทสารในหลุมทิ้งและล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง

2.2.8 หยด TMB substrate หลุมละ 100 µl บ่มนาน 10 นาที

2.2.9 หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย 2.89M Phosphoric acid หลุมละ 100 µl นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3. ทดสอบอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบ เคลือบหลุมทดสอบด้วย OTA-BSA ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg/ml ที่ละลายใน 0.01 M PBS หยดลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 100 µl เปรียบเทียบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ โดยนำหลุมทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 2, 4, 6 ชั่วโมง และ บ่มข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) เพื่อหาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกาะจับกันของสารในหลุมทดสอบ จากนั้นนำหลุมทดสอบที่เคลือบและบ่มไว้มาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เคาะหลุมทดสอบบนกระดาษให้แห้ง หยด PBS-BSA ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 150 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำหลุมทดสอบที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA ตามวิธีการในข้อ 2.1.5 ถึง 2.1.11 และดูปฏิกิริยาความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบ โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

4. ทดสอบสารละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน (OTA standard) โดยเตรียมจากสารโอคราทอกซิน เอ แบบผง 1 มิลลิกรัม เจือจางด้วยสารละลาย toluene + acetic acid (99+1) นำไปอ่านค่าด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นด้วยสูตร

$$\text{OTA (µg/ml)} = \frac{A \times MW \times 1000}{\varepsilon}$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร

MW = น้ำหนักโมเลกุลของสารโอคราทอกซิน เอ

ε = ค่าโมลาร์ แอบซอบติวิตี้ ของสารโอคราทอกซิน เอ ใน toluene + acetic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เมื่อได้ความเข้มข้นตั้งต้นแล้วนำมาเจือจางต่อให้เป็นสารพิษมาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/ml) ด้วยสารละลาย 4 สูตร ได้แก่ Phosphate Buffer Saline+10% Methanol (PBS+10%MeOH), Sample and standard dilution buffer (SDB), Phosphate Buffer Saline-Tween20-Bovine Serum Albumin+7%Methanol (PBS-T-BSA+7%MeOH) และ Phosphate Buffer+1% gelatin (PB+1% gelatin) นำสารพิษมาตรฐานทั้ง 3 สูตรที่เตรียมได้ทดสอบกับชุดทดสอบ Veratox® Ochratoxin test kit ขั้นตอนตามคู่มือที่ใช้ในชุดทดสอบ และนำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง: เริ่มต้น ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง: กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

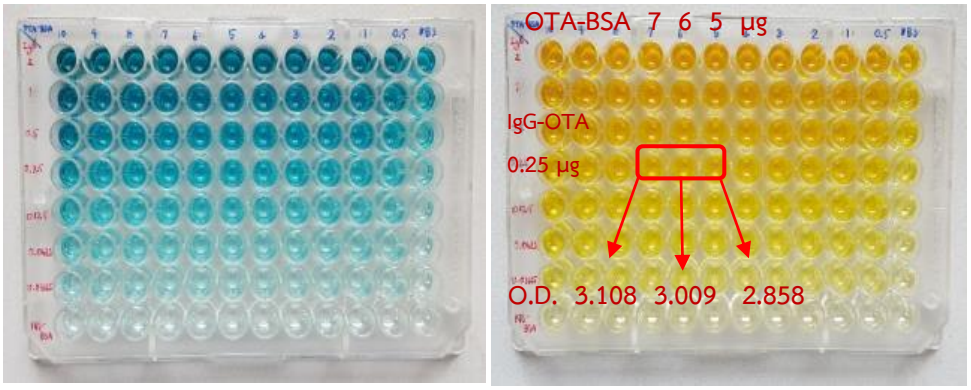
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ต่อสารโอคราทอกซิน เอ (IgG-OTA) แอนติซีรั่มต่อสารโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) จะมีลักษณะใส ไม่มีสี นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วย 0.01M PBS โดยนำแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1.4 ซึ่งแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml เพื่อเป็นความเข้มข้นตั้งต้นสำหรับนำไปเจือจางใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในหลุมทดสอบ

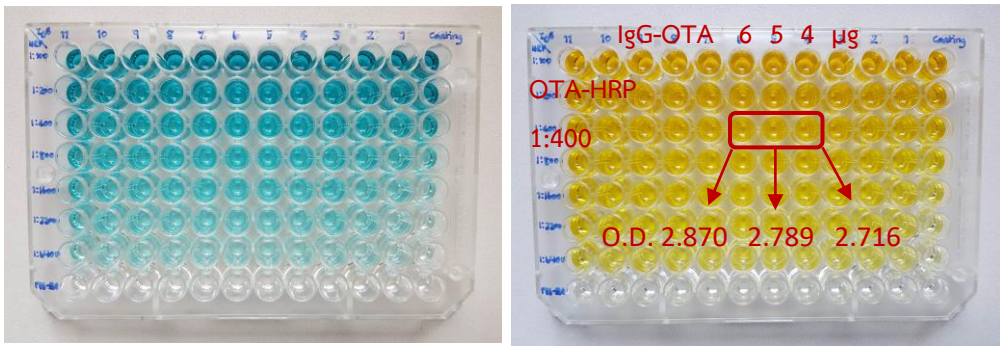
2.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA โดยวิธี checkerboard titration test พบว่า สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.518-4.065 ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ IgG-OTA สูง 0.5-2 µg/ml ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบจะมีสีเข้มมาก ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 3.424-4.065 แต่เมื่อความเข้มข้นของ IgG-OTA ลดลงที่ 0.03125-0.25 µg/ml ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงตามลำดับ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.518-3.21 ซึ่งระดับความเข้มข้นเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบต่อไป คือ OTA-BSA 5, 6 และ 7 µg/ml สำหรับใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ และ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าความเข้มแสง 2.858, 3.009 และ 3.018 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) Azri *et al.* (2018) ทดสอบหาความเข้มข้นของที่เหมาะสมของวิธีการ Indirect competitive ELISA ด้วยความเฉพาะเจาะจงในการจับกันระหว่าง primary antibody (rabbit anti-AFB1) กับคอนจูเกตที่เคลือบหลุมทดสอบ (AFB1-BSA) โดยทดสอบด้วยวิธี checkerboard titration ความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน เจือจางให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.00001-1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับความเข้มข้นของ rabbit anti-AFB1 ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:2,500-1:640,000 (v/v) ส่วน secondary antibody (goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate) ใช้ความเข้มข้น 1:5,000 (v/v)

กองวิจัยการเกษตร



ภาพที่ 1 การทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA โดยวิธี checkerboard titration test (ภาพซ้าย) หลุมทดสอบที่เกิดปฏิกิริยาโดยการหยดด้วย TMB substrate (ภาพขวา) หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย Phosphoric acid สารในหลุมทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 450 นาโนเมตร

2.2 ทดสอบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA พบว่า ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.559-3.832 ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate 1:100-1:200 ความเข้มข้นของสารมากหลุมทดสอบมีสีฟ้าเข้ม แต่เมื่อความเข้มข้นของ OTA-HRP conjugate ลดลง สีในหลุมทดสอบจะจางลง ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 1:400-1:6,400 ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบจะมีสีฟ้าจนถึงสีฟ้าจาง โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 2.981-0.559 ซึ่งระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA ต่อไป คือ IgG-OTA 4, 5 และ 6 µg/ml สำหรับการเคลือบหลุมทดสอบ และทดสอบร่วมกับ OTA-HRP conjugate ที่ความเข้มข้น 1:400 สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสง 2.716, 2.789 และ 2.870 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สำหรับความเข้มข้นเบื้องต้นที่ได้ยังต้องไปทดสอบร่วมกับสารพิษมาตรฐาน และอาจต้องมีการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบเกิดสีที่แตกต่างกันชัดเจน Näslund *et al.* (2014) อธิบายว่าการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิธีการ ELISA ทดสอบโดย checkerboard titration ซึ่งเป็นวิธีการสำหรับคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจน และคอนจูเกตโดยการเจือจางและนำมาทดสอบร่วมกัน



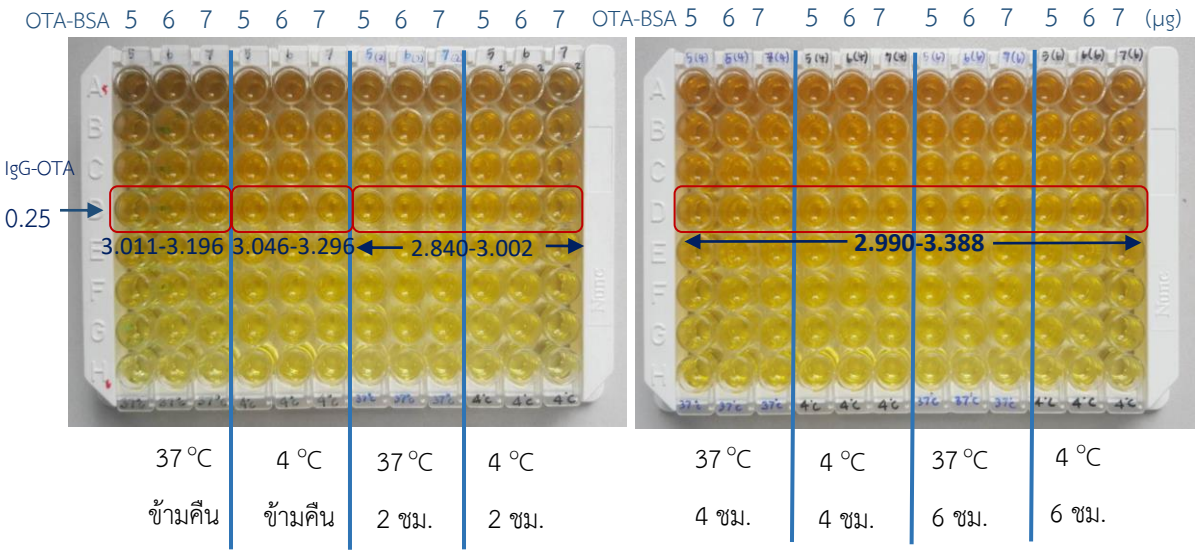
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2 การทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA โดยวิธี checkerboard titration test (ภาพซ้าย) หลุมทดสอบที่เกิดปฏิกิริยาโดยการหยดด้วย TMB substrate (ภาพขวา) หยุดปฏิกิริยาในหลุมทดสอบด้วย Phosphoric acid สารในหลุมทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำหลุมทดสอบไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 450 นาโนเมตร

3. ทดสอบอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบ

จากการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA พบว่า การเคลือบหลุมทดสอบแบบรวดเร็วด้วย OTA-BSA ความเข้มข้น 5, 6 และ 7 µg ควรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้ OTA-BSA เกาะจับในหลุมทดสอบได้ดี ซึ่งในการทดสอบร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml สีของปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสง 2.990-3.388 ส่วนการบ่มนาน 2 ชั่วโมง สีในหลุมทดสอบจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าอยู่ที่ 2.840-3.002 แต่ในการบ่มแบบข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สีในหลุมทดสอบจะเข้มกว่าการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ มีค่าการดูดกลืนแสงสูง 3.046-3.296 ส่วนการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสง 3.011-3.196 (ภาพที่ 3) ดังนั้น ในการเคลือบหลุมทดสอบเพื่อให้ OTA-BSA เกาะจับในหลุมทดสอบได้ดี ควรบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน สาร TMB substrate จะทำปฏิกิริยากับ Goat Anti-Rabbit IgG-HRP conjugate ที่จับอยู่กับ IgG-OTA ในหลุมทดสอบ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้าเข้ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ วิมลและคณะ (2550) พัฒนาชุดตรวจ Indirect ELISA สำหรับตรวจภาวะการติดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Typhi แบบเฉียบพลัน โดยพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับเคลือบชุดทดสอบ ใช้สารละลาย carbonate buffer pH 9.6 เป็น coating buffer เตรียมแอนติเจน จาก crude extract ของ *Salmonella* Typhi โดยมีความเขมข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 30 µg/ml เคลือบแอนติเจนที่ 4 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16-24 ชั่วโมง

กรมวิทยาศาสตร์

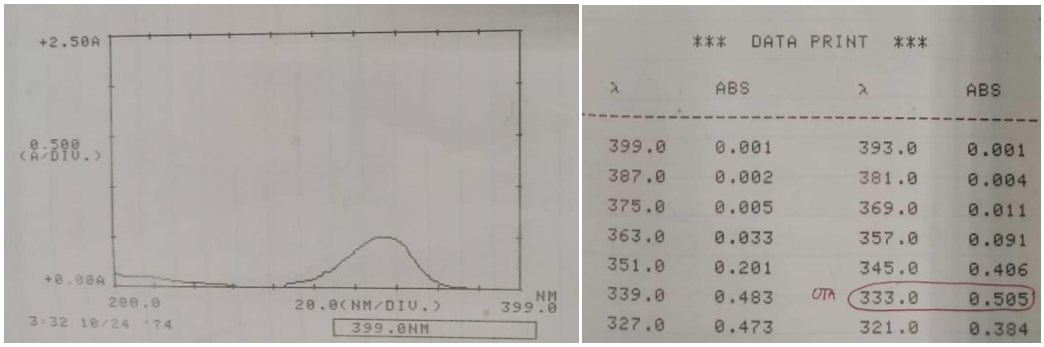


ภาพที่ 3 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA

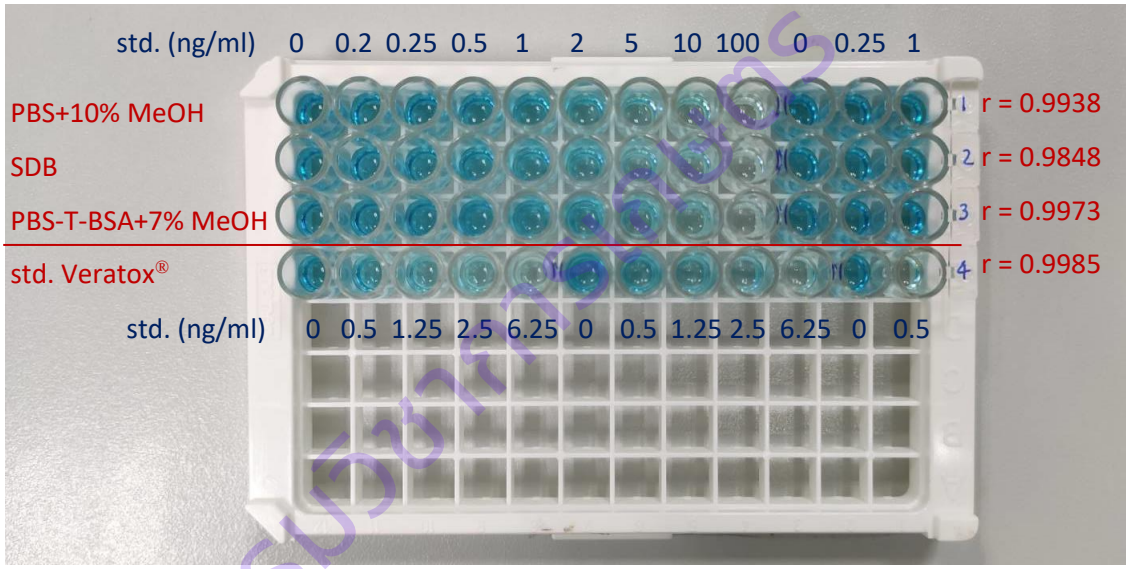
4. ทดสอบสารละลายที่เหมาะสมในการเตรียมสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน (OTA standard)

นำสารโอคราทอกซิน เอ แบบผงมาละลายด้วย toluene + acetic acid และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เท่ากับ 0.505 (ภาพที่ 4) นำมาคำนวณปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ตั้งต้นได้ 37.48 µg/ml และนำมาทดสอบกับสารละลายในการเตรียมเป็นสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานทั้ง 4 สูตร โดยเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5และ 10 ng/ml โดยใช้ PBS+10% MeOH, SDB, PBS-T-BSA+7% MeOH และ PB+1% gelatin เป็นตัวทำละลาย ทดสอบกับชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ Veratox® Ochratoxin test kit พบว่า ตัวทำละลาย 3 สูตร คือ PBS-T-BSA+7% MeOH, PBS+10% MeOH และ PB+1% gelatin ใช้เป็นสารเจือจางสำหรับเตรียมเป็นสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.9973, 0.9938 และ 0.9903 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานของชุดทดสอบ Veratox® Ochratoxin test kit ที่มีค่า r เท่ากับ 0.9985 และ 0.9959 ส่วนสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ที่ละลายด้วย SDB มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9848 (ภาพที่ 5, 6 และ 7) ตามหลักการแล้วองค์ประกอบของสารเจือจางมาตรฐานจะใกล้เคียงกับเมทริกซ์ตัวอย่าง เช่น หากวัดความเข้มข้นของแอนติเจนในส่วนของเหลวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารเจือจางมาตรฐาน และ blocking buffer มักจะนำมาใช้เป็นสารเจือจางมาตรฐานเช่นกัน (Thermo scientific, n.d.) Won-Bo *et al*. (2009) ได้ทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ และซีราลีโนน แบบ Direct competitive ELISA โดยเตรียมสารมาตรฐาน ด้วยสารละลาย PBS ที่มี 10% Methanol เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารมาตรฐานที่เตรียมมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้สำหรับสารโอคราทอกซิน เอ และซีราลีโนน 0.1 และ 0.15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

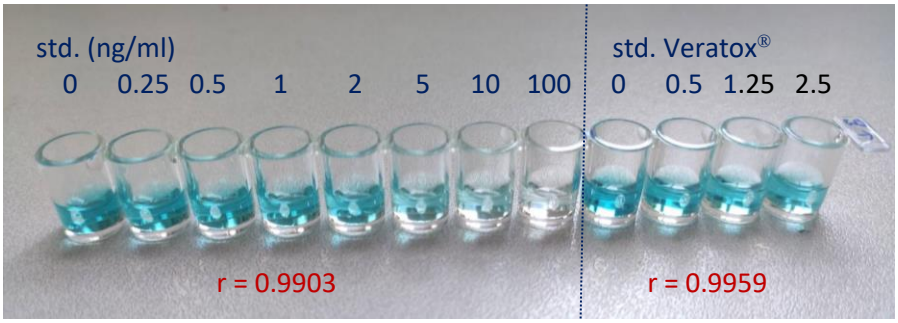
กรมวิทยาศาสตร์



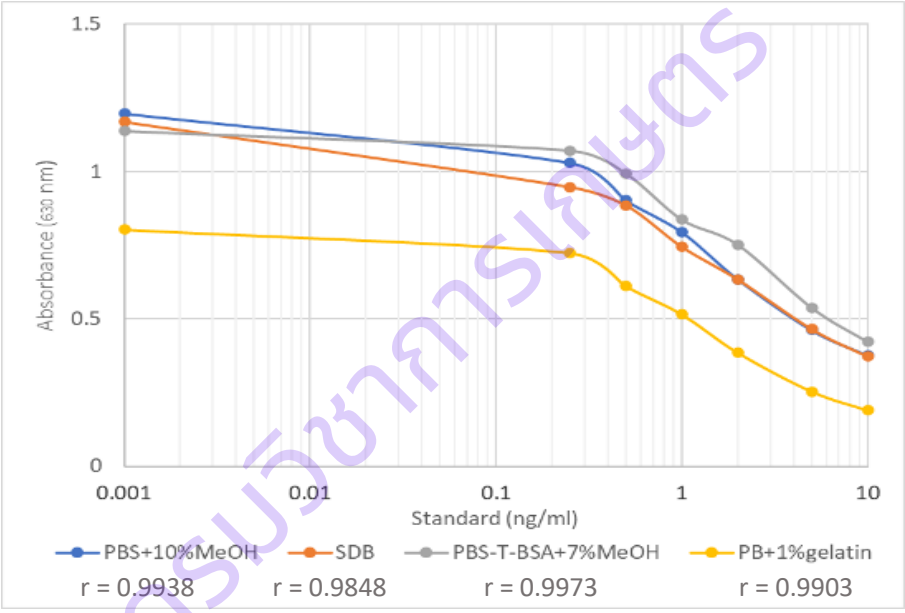
ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ ตั้งต้น โดยการอ่านค่าด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.505



ภาพที่ 5 การทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานทั้ง 3 สูตร ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 100 ng/ml โดยใช้ PBS+10% MeOH, SDB และ PBS-T-BSA+7% MeOH เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐานของชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ Veratox® Ochratoxin test kit



ภาพที่ 6 การทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 100 ng/ml โดยใช้ PB+1% gelatin เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐานของชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ Veratox® Ochratoxin test kit



ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของการทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ทั้ง 4 สูตร ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ10 ng/ml โดยใช้ PBS+10% MeOH, SDB, PBS-T-BSA+7% MeOH และ PB+1% gelatin เป็นตัวทำละลาย กับชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ Veratox® Ochratoxin test kit

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการปรับแอนติซีรั่มบริสุทธิ์ที่ได้ให้มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml เป็นความเข้มข้นตั้งต้นสำหรับนำไปเจือจางต่อเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบ ซึ่งการเคลือบหลุมทดสอบสำหรับตรวจวิเคราะห์แบบ Indirect Competitive ELISA ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ OTA-BSA 5, 6 และ 7 µg/ml ร่วมกับ IgG-OTA ที่ความเข้มข้น 0.25 µg/ml ส่วนวิธีวิเคราะห์แบบ Direct Competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย IgG-OTA ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 µg/ml ร่วมกับเอนไซม์คอนจูเกต ความเข้มข้น 1:400 และการเคลือบหลุมทดสอบให้มีประสิทธิภาพ ควรบ่มหลุมทดสอบข้ามคืน (14-15 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบสารพิษมาตรฐานที่เตรียมเองกับชุดตรวจสอบต่างประเทศ ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการเตรียม

สารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน มี 3 สูตร คือ Phosphate Buffer Saline+10% Methanol, Phosphate Buffer Saline-Tween20-Bovine Serum Albumin+7%Methanol และ Phosphate Buffer+1% gelatin ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบ และการเตรียมสารพิษมาตรฐานยังต้องนำมาทดสอบต่อร่วมกันเพื่อพัฒนาให้ได้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำความเข้มข้นและวิธีการที่เหมาะสมในการเคลือบหลุมทดสอบทั้งแบบ Indirect- และ Direct-competitive ELISA และสารละลายที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการเจือจางเพื่อเตรียมเป็นสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ไปทดสอบต่อเพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ ELISA ต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.อมรา ชินภูติ ท่านที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านการเผยแพร่ผลงานวิชาการ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่มีประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัย

12. เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. 2560. สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

วิมล ชอบชื่นชม, ขนิษฐา เลี้ยงบำรุง, ศรินธร รักษมณี, สุรสา ลิมาคม และ สุรสิทธิ์ สุวรรณสินธุ์. 2550. การพัฒนาชุดตรวจ indirect ELISA สำหรับการตรวจภาวะการณติดเชื้อ *Salmonella* Typhi แบบเฉียบพลัน. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยศรีปทุม ปการศึกษา 2550 วันที่ 6 สิงหาคม 2550. หน้า 9-16.

Azri, F.A., R. Sukor, J. Selamat, F.A. Bakar, N.A. Yusof and R. Hajian. 2018. Electrochemical immunosensor for detection of aflatoxin B1 based on indirect competitive ELISA. Toxin 10(196): 1-13.

Chen, W., L. Chen, B. Zhang, Z. Zhou, Y. Shen, X. Liao, J. Yang, Y. Wang, X. Li, Y. Li and X.L. Shen. 2018. Advances in Biodetoxification of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades. Frontiers in Microbiology 9(1386): 1-11.

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

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

Näslund, K., G. Blomqvist, C. Vernersson, S. Zientara, E. Bréard and J. F Valarcher. 2014. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for

กรมวิชาการเกษตร

serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. Acta Veterinaria Scandinavica 56(71):1-8.

Sangare-Tigori, B., S. Moukha, J.H. Kouadio, D.S. Dano, A.M. Betbeder, A. Achour and E.E. Creppy. 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. Toxicon 47(8): 894 – 900.

Thermo scientific. no date. ELISA technical guide and protocols. Available Source: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0065-ELISA-guide.pdf. February 2, 2021.

Wan-Bo, S., B.D. Dzantiev, S.A. Eremin and D.H. Chung. 2009. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin A and zearalenone. Journal of Microbiology and Biotechnology 19(1): 83-92.

กรมวิชาการเกษตร

IgG-OTA (µg/ml) ← OTA-BSA (µg/ml) →

ภาคผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA โดยวิธี checkerboard titration test

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0.5
2	3.826	3.721	3.927	3.808	4.065	3.842	3.743	3.845	3.765	3.773	3.744
1	3.803	3.763	3.869	3.840	4.021	3.843	3.747	3.857	3.765	3.791	3.746
0.5	3.762	3.682	3.800	3.683	3.884	3.739	3.614	3.676	3.588	3.618	3.424
0.25	3.210	3.062	3.108	3.018	3.009	2.858	2.720	2.763	2.710	2.608	2.280
0.125	2.051	1.901	1.856	1.867	1.847	1.702	1.652	1.648	1.613	1.551	1.394
0.0625	1.288	1.169	1.218	1.173	1.139	1.015	0.981	0.955	0.956	0.946	0.847
0.03125	0.774	0.720	0.773	0.699	0.718	0.621	0.611	0.591	0.602	0.599	0.518

OTA-HRP ← IgG-OTA (µg/ml) →

	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1:100	3.666	3.676	3.832	3.693	3.851	3.773	3.675	3.699	3.677	3.661	3.726
1:200	3.569	3.569	3.682	3.523	3.624	3.269	3.474	3.463	3.510	3.470	3.482
1:400	2.981	2.974	3.003	2.869	2.845	2.870	2.789	2.716	2.799	2.658	2.506
1:800	2.386	2.340	2.276	2.225	2.205	2.199	2.074	2.018	1.979	1.914	1.701
1:1600	1.832	1.743	1.714	1.701	1.655	1.690	1.569	1.516	1.469	1.323	1.193
1:3200	1.342	1.325	1.274	1.228	1.232	1.211	1.154	1.114	1.155	0.983	0.828
1:6400	0.877	0.913	0.863	0.844	0.834	0.847	0.778	0.762	0.734	0.688	0.559

กรมวิทยาศาสตร์

ภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Direct Competitive ELISA โดยวิธี checkerboard titration test

IgG-OTA (µg/ml) ← OTA-BSA (µg/ml) →

	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7
2	3.858	3.932	4.059	3.881	3.951	4.045	3.796	3.876	3.828	3.829	3.860	3.729
1	3.787	3.835	3.985	3.872	3.905	3.883	3.965	3.775	3.707	3.750	3.758	3.581
0.5	3.678	3.779	3.876	3.701	3.768	3.793	3.623	3.668	3.626	3.635	3.644	3.427
0.25	3.052	3.011	3.190	3.096	3.046	3.296	2.901	3.002	2.840	2.969	2.886	2.676
0.125	2.115	1.890	1.948	2.047	1.932	1.935	1.930	1.902	1.908	1.897	1.852	1.730
0.0625	1.300	1.267	1.198	1.340	1.269	1.379	1.247	1.323	1.259	1.231	1.180	1.101
0.03125	0.824	0.888	0.908	1.024	0.929	0.980	0.945	0.874	0.988	0.778	0.889	0.740
	บ่ม 37°C นานข้ามคืน			บ่ม 4°C นานข้ามคืน			บ่ม 37°C นาน 2 ชั่วโมง			บ่ม 4°C นาน 2 ชั่วโมง		

ภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และบ่มข้ามคืน

IgG-OTA (µg/ml) ← OTA-BSA (µg/ml) →

	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7
2	3.855	3.891	4.069	3.899	4.029	4.043	3.884	3.885	3.821	3.864	3.908	3.701
1	3.793	3.870	3.997	3.852	4.065	4.009	3.795	3.887	3.705	3.754	3.789	3.595
0.5	3.743	3.791	3.877	3.761	3.906	3.854	3.718	3.772	3.680	3.673	3.668	3.527
0.25	3.414	3.388	3.101	3.217	3.290	3.190	3.168	3.252	3.156	2.990	3.022	2.929
0.125	2.330	2.435	2.352	2.279	2.255	2.170	2.112	2.065	2.084	1.954	1.947	2.075
0.0625	1.591	1.673	1.593	1.536	1.492	1.508	1.422	1.359	1.419	1.283	1.270	1.336
0.03125	1.097	1.220	1.203	1.182	1.115	1.100	1.074	0.919	1.047	1.167	0.813	0.875
	บ่ม 37°C นาน 4 ชั่วโมง			บ่ม 4°C นาน 4 ชั่วโมง			บ่ม 37°C นาน 6 ชั่วโมง			บ่ม 4°C นาน 6 ชั่วโมง		

ภาคผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุมทดสอบแบบ Indirect Competitive ELISA โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 และ 6 ชั่วโมง

กรมวิทยาการเกษตร