รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลเกษตร

2. โครงการวิจัย : การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์
กิจกรรมที่ 4 : พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): การพัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Development of Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Ochratoxin A

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุพี วนศิรากุล สังกัด กวป.
ผู้ร่วมงาน : นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล สังกัด กวป.
นางสาวอัจฉราพร ศรีจุดานุ สังกัด กวป.

5. บทคัดย่อ

การใช้เทคนิค Lateral Flow Immunoassay มาพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ strip test เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรเบื้องต้นอย่างรวดเร็ว โดยใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แอนติเจนในตัวอย่างจะแข่งขันกับแอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนแถบกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง การอ่านผลจะดูจากการเกิดสีที่เส้นทดสอบหรือ test line ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเกิดสีม่วงแดงในตำแหน่ง control line เส้นเดียว ถ้าตัวอย่างไม่มีสารพิษจะปรากฏสีให้เห็นทั้งที่ตำแหน่ง control line และ test line จากการทดสอบพบว่า การใช้แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการติดฉลากกับอนุภาคทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 และจากการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG สำหรับขีดเส้นในตำแหน่ง test line และ control line พบว่า การใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ goat anti-rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทองได้ดีที่สุด แต่จากผลการทดลองสีที่ปรากฏในตำแหน่ง test line ยังไม่เข้มพอเมื่อเทียบกับสีที่ปรากฏในตำแหน่ง control line ยังต้องปรับหาวิธีการเพื่อให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำหลัก : Lateral Flow Immunoassay, อนุภาคทอง, สารโอคราทอกซิน เอ, แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ

กรมวิชาการเกษตร

Lateral Flow Immunoassay was developed for the detection of ochratoxin A (OTA) in agricultural products. The detection is based on the competition of OTA in sample and OTA-protein conjugate immobilized on test strip for the binding to colloidal gold-labeled OTA antibodies. The results can be observed from the presence of purple red color in the test line (T). The high concentration of OTA in sample will result in no visible line in the test zone. While the sample without OTA will form visible color in both test line and control line. In this study, OTA-antibodies (OTA-IgG) at 100 µg/ml were suitable for conjugated with colloidal gold diameter of 40 nanometer, the pH of the solution was adjusted to 8.6. The suitable concentration of OTA-BSA and goat anti-rabbit IgG for test line and control line were 0.8 mg/ml. However, the color that appears in the test line is light color compared to control line. Thus, there would be a need to improve suitable method to get more effective test kit.

Keywords: Lateral Flow Immunoassay, colloidal gold, ochratoxin A, OTA-antibodies

6. คำนำ

สารโอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ที่พบปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง พริก กาแฟ โกโก้ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์ การปนเปื้อนพบได้ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดการณ์ได้ยาก นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นเครื่องต่อรองราคาในการซื้อขายทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2560) องค์กร International Agency for Research on Cancer, IRAC (2002) จัดให้สารโอคราทอกซิน เอ เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 2B คือ มีความเป็นไปได้ต่อการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ ประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุข (2563) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของสารโอคราทอกซิน เอ สำหรับพริกแห้งหรือพริกป่นที่ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลหรือผลิตภัณฑ์ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารพิษ การตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ จึงเป็นสิ่งสำคัญ การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราถือเป็นมาตรการหนึ่งที่แก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร เป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น การตรวจหาปริมาณสารพิษทำได้หลายวิธี แต่วิธีการที่สามารถตรวจวิเคราะห์ในเบื้องต้นอย่างรวดเร็ว ได้แก่ วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological assay) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้งานง่าย ไม่จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญพิเศษ วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) และเทคนิค LFIA (Lateral Flow Immunoassay) (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

กรมวิชาการเกษตร

เทคนิค Lateral flow immunoassay หรือ Immunochromatographic assay เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid test) ในรูปแบบแถบทดสอบ (strip test) ที่ใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สารพิษหรือแอนติเจนในตัวอย่างจะแข่งขันกับสารพิษที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง โดยอาศัยของเหลวหรือสารละลายเป็นตัวพาให้แอนติเจนไหลผ่านบริเวณที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือลักษณะ lateral flow จากซ้ายไปขวา การอ่านผลจะดูจากแถบสีที่เกิดขึ้นบริเวณเส้นทดสอบ (test zone) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ภายใน 10-15 นาที (Bazin *et al.*, 2010) และเนื่องจากสามารถอ่านผลการทดสอบได้เอง ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการแปรผล สะดวกต่อการนำไปใช้วิเคราะห์ผลในเชิงคุณภาพ จึงได้มีการพัฒนาชุดทดสอบแบบ strip test นี้ มาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ชุดตรวจการตั้งครรภ์ ชุดตรวจสารเสพติด ชุดตรวจวินิจฉัยโรค และชุดตรวจคุณภาพอาหาร รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรด้วย (Dzantiev *et al*, 2014)

Urusov *et al*. (2011) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค LFIA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับอนุภาคทอง ใช้หลักการแข่งขันของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่าง และโอคราทอกซิน เอ ที่เชื่อมติดกับโปรตีนบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสจับกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง ถ้ามีการปนเปื้อนของสารพิษจะไม่พบแถบสีบริเวณเส้นทดสอบ (test line) สามารถอ่านผลการทดสอบได้ภายใน 10 นาที นอกจากนี้ Liu et al. (2018) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ในไวน์แดง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื่อมติดกับอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และสามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ปริมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ปัจจุบันพบปัญหาการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรเพิ่มมากขึ้น การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค Lateral flow immunoassay เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลเกษตรที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เป็นการลดต้นทุนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรได้มากขึ้น และเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose Membrane)
2. แผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (Conjugate Released Pad, CRP)
3. แผ่นรองรับตัวอย่าง (Sample Application Pad, SAP)
4. แผ่นดูดซับตัวอย่าง (Absorbent Pad)
5. แผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (Plastic Backing Card)
6. พู่กันเบอร์ 0
7. ปากกาหมึกซึม

ศรีปทุมยินดี

8. แอนติซีรัมโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (OTA-IgG)
9. อนุภาคทอง (colloidal gold nanoparticles) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร
10. สารโอคราทอกซิน เอมาตรฐาน
11. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)
12. โบวีนซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)
13. โอคราทอกซิน เอเชื่อมติดกับโบวีนซีรัม อัลบูมิน (OTA-BSA)
14. โซเดียมเอไซด์ (NaN_3)
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

วิธีการ

1. การทดสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในการติดฉลากกับอนุภาคทอง

นำแอนติซีรัมต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ได้จากการทดลอง “การผลิตแอนติซีรัมต่อสารโอคราทอกซิน เอ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบรวดเร็ว” มาเตรียมแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ บริสุทธิ์ (IgG-OTA) ปรับให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 0.01M PBS (phosphate buffer saline) วัดค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.4 ที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร หยดแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ระดับความเข้มข้น 200, 150, 100, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมทดสอบ หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วหยดสารละลายอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ตามลงไป 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้นข้น 10% หลุมละ 100 ไมโครลิตร บันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทองที่ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดี และค่าความเป็นกรด-ด่างของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกัน โดยคัดเลือกจากความสามารถในการจับกันได้หมดของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง ทำการทดสอบซ้ำเพื่อดูความคงที่ของความเข้มข้นของ OTA-IgG และความเป็นกรด-ด่างของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกัน

2. การติดฉลากอนุภาคทองด้วยแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ (colloidal gold- labeled OTA-IgG)

นำสารละลายอนุภาคทองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) เข้มข้น 1% ปริมาตร 37.5, 50, 75, 100 และ 125 ไมโครลิตร หรือที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0, 7.4, 7.7, 8.6 และ 9.5 ตามลำดับ กวนสารละลายเบาๆ เติม OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน OTA-IgG ต่ออนุภาคทองเท่ากับ 1:10 กวนเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เข้มข้น 10% กวนเบาๆ เป็นเวลา เป็นเวลา 60 นาที ปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1, 10 และ 20%

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. การเตรียมแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (Conjugate Released Pad, CRP)

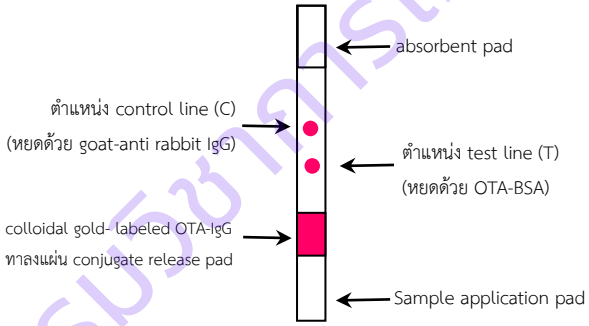
นำแผ่น CRP ที่ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้พู่กันจุ่มสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG ทาลงบนกระดาษ CRP ให้ทั่ว

4. การเตรียม OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG สำหรับเส้น test line และ control line

นำแผ่น Nitrocellulose Membrane (NCM) ติดลงบนแผ่นรองรับปฏิกิริยา (Backing Pad) ขีดเส้น control line (C) และเส้น test line (T) ห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม OTA-BSA ความเข้มข้น 0.5, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงบนเส้น test line และปากกาอีกด้ามจุ่ม Goat Anti-Rabbit IgG (2^{nd} antibody) ความเข้มข้น 0.5, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงตรงตำแหน่งเส้น control line แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที แต่ในการทดสอบเบื้องต้นจะทำการหยด OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG ลงบน strip test ที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.4 เซนติเมตร (ภาพที่ 1)

5. การประกอบชุดตรวจสอบ OTA แบบ Strip Test

นำชิ้นส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad, SAP) แผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate release pad, CRP) กระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) แผ่นดูดซับตัวอย่าง absorbent pad แผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (Plastic Backing Card) มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของเส้น test line (T) และ control line (C)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง: ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

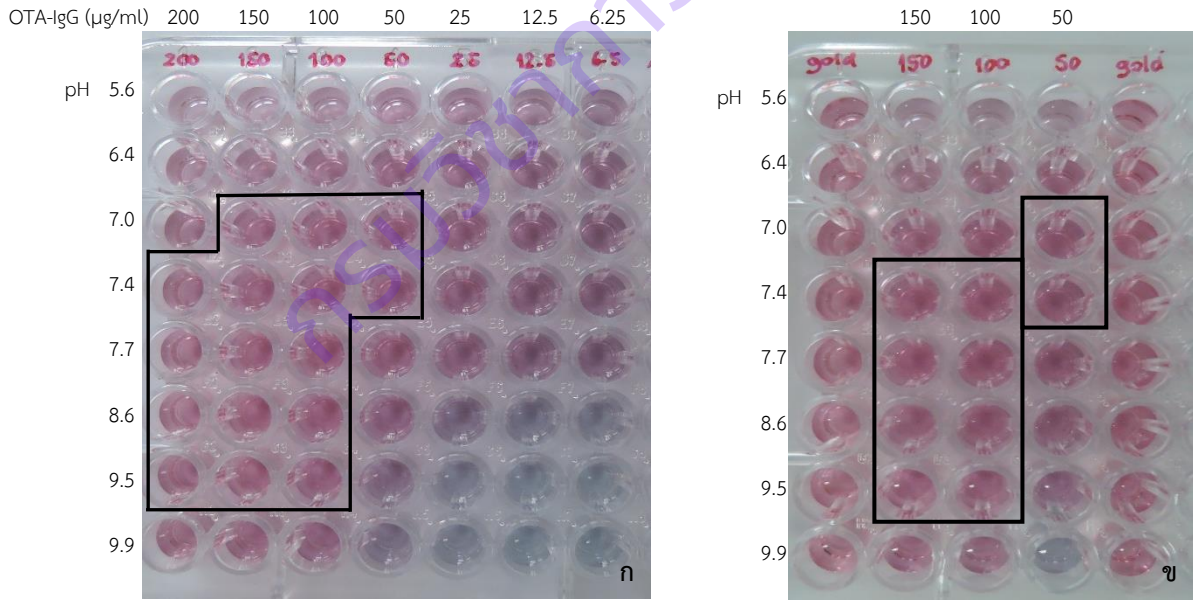
สถานที่ทำการทดลอง: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชไร่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในการติดฉลากกับอนุภาคทอง

ความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ในการจับกับอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างกัน ทำการทดสอบปฏิกิริยาในหลุมทดสอบ พบว่า OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเชื่อมติดกับอนุภาคทองที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0-9.5 หรือเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ปริมาตร 5-20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2ก) ความเข้มข้นของ OTA-IgG ที่เหมาะสมในการเชื่อมติดกับอนุภาคทอง สังเกตจากการจับกันได้หมดของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง ถ้า OTA-IgG จับกับอนุภาคได้หมด เมื่อหยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้นข้น 10% ลงไป สีของอนุภาคทองจะไม่เปลี่ยน ถ้า OTA-IgG น้อยไปจะจับกับอนุภาคทองไม่หมด อนุภาคทองที่เหลือจะทำปฏิกิริยากับโซเดียมคลอไรด์เกิดการตกตะกอน ทำให้สีของอนุภาคทองเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีฟ้าอมเทา จากการทดสอบซ้ำเพื่อดูความคงที่ในการจับกันของ OTA-IgG กับอนุภาคทอง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง MicroELISA Reader คัดเลือกหลุมทดสอบที่ให้ความเข้มสีใกล้เคียงกับสีของอนุภาคทอง โดยพบว่า OTA-IgG ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับอนุภาคทองได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0-7.4 และสารละลายอนุภาคทองจะเริ่มเปลี่ยนสีเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ OTA-IgG ความเข้มข้น 100-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจับกับอนุภาคทองได้หมดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4-9.5 โดยที่สีของอนุภาคทองยังคงใกล้เคียงกับสีเดิม (ภาพที่ 2ข)



ภาพที่ 2 สีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ (OTA-IgG) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับอนุภาคทองที่ความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

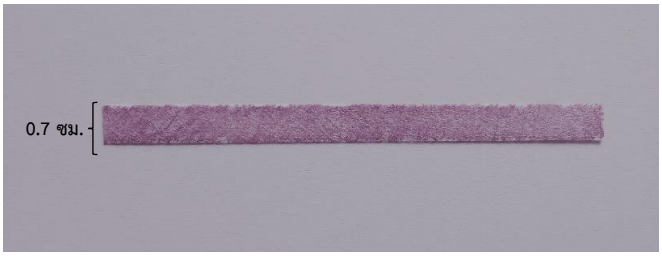
2. การติดฉลากอนุภาคทองด้วยแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ (colloidal gold- labeled OTA-IgG)

การติดฉลากอนุภาคทองด้วย OTA-IgG โดยใช้อนุภาคทองปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0 7.4 7.7 8.6 และ 9.5 ใช้ OTA-IgG ความเข้มข้น 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายตะกอน colloidal gold- labeled OTA-IgG ด้วยด้วย passive gold diluent (50 mM $NaH_2PO_4.H_2O$ + 1% BSA) ในปริมาตร 0.05-0.1 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น พบว่า การเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ปริมาตร 75 ไมโครลิตร หรือที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 ทดสอบเติมน้ำตาลซูโครส 1, 10 และ 20% พบว่า การเติมน้ำตาลซูโครส 10 และ 20% และทาลงบนแผ่น CRP ที่อัตรา 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ให้สีของ test line ที่ชัดเจนขึ้น แต่สีที่สังเกตได้ไม่แตกต่างกันจึงเลือกเติมซูโครสที่ 10% (ภาพที่ 3) แผ่น CRP ที่ทาด้วย colloidal gold- labeled OTA-IgG แล้ว สามารถเก็บในถุงอลูมินั่มฟอยล์ เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการเตรียมชุดทดสอบต่อไป

3. การเตรียมแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (Conjugate Released Pad, CRP)

นำแผ่น CRP ที่ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่มสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG ทาลงบนกระดาษ CRP ปริมาตร 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่5)

ภาพที่ 3 การเกิดสีในตำแหน่ง test line (T) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1, 10 และ 20% ในสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG

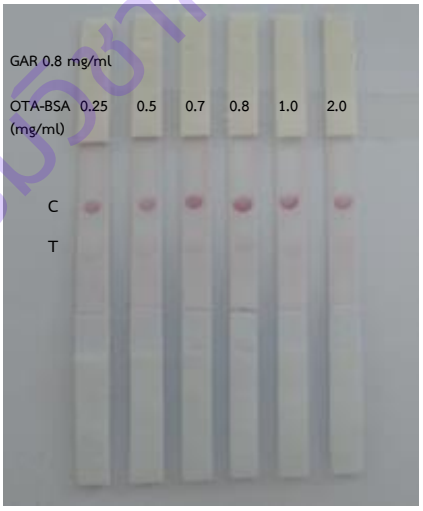


กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 5 แผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate released pad, CRP) ที่ทาด้วยสารละลาย colloidal gold- labeled OTA-IgG อัตรา 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร

4. การเตรียม OTA-BSA และ goat-anti rabbit IgG สำหรับเส้น test line และ control line

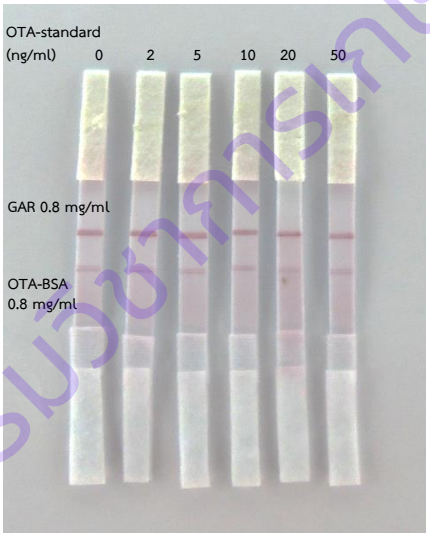
การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG (GAR) โดยทำการหยด OTA-BSA ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 0.25 0.5 0.7 0.8 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ GAR ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.5 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรต่อ strip test หรือ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นบนตำแหน่ง test line และ control line โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.01M PBS ซึ่งไม่มีสารพิษเป็นตัวอย่างทดสอบ พบว่าเมื่อหยดบัฟเฟอร์ลงแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad) ของเหลวจะไหลผ่านแผ่น CRP ที่มี OTA-IgG ติดฉลากกับอนุภาคทอง OTA-IgG จะจับกับ OTA-BSA ที่ตรึงอยู่บนกระดาษในตำแหน่ง test line ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทอง พบการเกิดสีชัดเจนที่สุดเมื่อหยด OTA-BSA ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเหลวไหลต่อไปและจับกับ Goat Anti-Rabbit IgG ที่ตรึงอยู่บนกระดาษ ทำให้เกิดสีม่วงแดงในตำแหน่ง control line โดยเลือกใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสีปรากฏมีความเข้มเพียงพอแล้ว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การเกิดสีในตำแหน่ง test line (T) เมื่อใช้ OTA-IgG ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเชื่อมติดกับอนุภาคทอง และใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.7 0.8 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทดสอบหยดสารพิษมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 0 2 5 10 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเกิดสีไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) ซึ่งตามหลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ควรจะพบการเกิดสีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารพิษสูงขึ้น สารพิษจากตัวอย่างจะเกาะจับกับแอนติบอดีที่ผูกติดกับอนุภาคทองและเคลื่อนที่ไปยัง test line และ control line บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเกิดสีม่วงแดงให้เห็นเฉพาะที่ control line ถ้าในตัวอย่างไม่มีสารพิษจะปรากฏสีให้เห็นทั้งในตำแหน่ง control line และ test line (Michael *et al*., 2006) สารโอคราทอกซิน เอ จะจับกับ OTA- IgG ที่ติดฉลากกับอนุภาคทอง และไหลไปที่ตำแหน่ง test zone ถ้าปริมาณสารพิษมากแอนติบอดีจะจับกับอนุภาคทองหมด ไม่เหลือมาจับกับ OTA-BSA ที่ตำแหน่ง test line แต่ถ้าปริมาณสารพิษมีน้อย ก็จะพบสีของอนุภาคทองจาง แต่จากผลการทดสอบที่ให้ผลไม่เป็นไปตามทฤษฎี อาจเกิดจากปริมาณแอนติบอดีมีมากกว่าแอนติเจน จึงทำให้เกิดการจับกับแอนติเจนที่ตำแหน่ง test line ได้ไวกว่า หรืออาจเกิดจากอัตราการไหลที่เร็วไป ต้องทำการทดสอบกระดาษไนโตรเซลลูโลสและของเหลวที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่างเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้สีที่ปรากฏในตำแหน่ง test line ยังค่อนข้างจาง จึงต้องทำการปรับวิธีการเพื่อให้ OTA- IgG ที่ผูกติดกับอนุภาคทองสามารถจับกับ OTA-BSA ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น



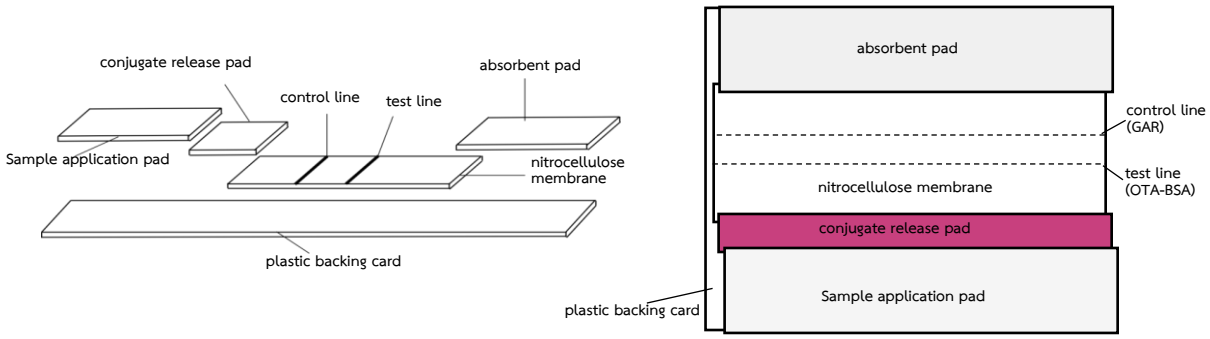
ภาพที่ 7 การทดสอบหยดสารพิษมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆกัน

5. การประกอบชุดตรวจสอบ OTA แบบ Strip Test

ประกอบชิ้นส่วนต่างๆ ลงบนแผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (plastic backing card) โดยลำดับแรกทำการติดกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ลงไป กำหนดจุดสำหรับการขีดเส้น test line และ control line ห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ขีดเส้นด้วย OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate release pad, CRP) ที่ทาด้วย colloidal gold- labeled OTA-IgG และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีแล้ว มาติดตรงส่วนด้านล่างของกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยติดให้เกยกันประมาณ 0.1 เซนติเมตร แล้วติดแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application

กรมวิชาการเกษตร

pad, SAP) ลงตรงด้านล่างให้เกยทับแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ สุดท้ายทำการติดแผ่นดูดซับตัวอย่าง absorbent pad ในส่วนบนให้เกยทับแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบแบบ strip test และการประกอบชิ้นส่วนต่างๆ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay หรือชุดทดสอบแบบ strip test ในเบื้องต้น สามารถเตรียมการติดฉลากของแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ กับอนุภาคทอง โดยใช้อนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.6 เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายตะกอนอนุภาคทองที่ติดฉลากแล้วด้วย passive gold diluent ปริมาตร 0.05 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น โดยเติมน้ำตาลซูโครส 10% ใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง test line และใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดในตำแหน่ง control line ให้ผลการทดสอบโดยพบการเกิดสีชัดเจนที่สุด แต่ในตำแหน่ง test line สีที่ปรากฏยังไม่เข้มเพียงพอเมื่อเทียบกับสีที่ปรากฏในตำแหน่ง control line ยังต้องปรับหาวิธีการใหม่ ซึ่งอาจทำได้โดยการปรับความเข้มข้นของสารละลาย การปรับสูตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายตะกอนอนุภาคทอง การปรับเปลี่ยนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ตลอดจนส่วนประกอบต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำต้นแบบชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ นี้ พัฒนาต่อเพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรได้

2. ใช้เป็นแนวทางการพัฒนาชุดตรวจสอบสารพิษจากเชื้อรา โดยวิธี Lateral Flow Immunoassay

กรมวิชาการเกษตร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

กระทรวงสาธารณสุข. 2563. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ. 2563) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137 ตอนพิเศษ 118ง ลงวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2563.

Bazin, I., E. Nabais and M. Lopez-Ferber. 2010. Raid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of Ochratoxin A. **Toxins**, 2: 2230-2241.

Dzantiev, B.B., N.A. Byzova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev. 2014. Immunochromatographic methods in food analysis. **Trends Anal. Chem**, 55: 81-93.

International Agency for Research on Cancer (IRAC). 2002. Evalution of carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. **IARC Monographs**, 82: 275-366.

Liu, L., L. Xu, S. Suryoprabowo, S. Song and Hua Kuang. 2018. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of ochratoxin A in red wine. **Food and Agricultural Immunology**, 29(1): 434-444.

Michael, Z.Z., J.L. Richard and J. Binder. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia** 161: 261-273.

Urusov, A.E., S.N. Kostenko, P.G. Sveshnikov, A.V. Zherdev and B.B. Dzantiev. 2011. Immunochromatographic Assay for the Detection of Ochratoxin A. **J. Anal Chem**, 66: 770-776.

กรมวิชาการเกษตร