การพัฒนาชุดตรวจสอบสารพิษซีราลีโนนแบบรวดเร็วในวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี

Development of Rapid Test Kit for Detecting Zearalenone in Feedstuffs by Immunochromatographic Technique

กิตติศักดิ์ อินทร์เสวก[1,2,3] รัชนี ฮงประยูร[1,2,3] สุวรรณา กลัดพันธุ์[4] วราภา มหากาญจนกุล[5] และ ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง[6]

Kittisak Insawake[1,2] Ratchanee Hongprayoon[1,3] Suwanna Kladpan[4] Warapa Mahakarnchanakul[5] and Prapeuk Tangmunkhong[6]

Abstract

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by various *Fusarium* spp., especially *F. graminearum,* and a regularly contaminant in cereals and animal feedstuffs which can potentially enter human food chain. Animals fed with ZEA contaminated diet can affect their reproductive system leading to greatly economic loss in livestock production. Efficient analytical method for ZEA detection is therefore required to control the loss. In this research, an immunochromatrographic strip (ICS) specific to ZEA was developed using anti-ZEA monoclonal antibody from the hybridoma clone ZN-1 conjugated with gold particle. The reaction activity on a nitrocellulose membrane was determined by dot immunobinding assay. The ICS was developed following competitive assay by immobilizing ZEA-BSA conjugate and rabbit anti-mouse antibody at a test line and a control line, respectively. The detection limits of ICS was investigated and the result showed that the developed ICS had the detection limits at 20 ppb for standard ZEA solution and 100 ppb for spiked corn sample. This ICS required only 15 min for reaction development.

Key words: Zearalenone, antibody, mycotoxin, immunochromatographic strip

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

[2] Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[4] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.กรุงเทพมหานคร 10900

[4] Scientific Equipment Center, Kasetsart University Research and Development Institute, Bankok, 10900

[5] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.กรุงเทพมหานคร 10900

[5] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok, 10900

[6] ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ และการบริการวินิจฉัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[6] Department of Veterinary Public Health and Diagnostic Services, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

รับเรื่อง : สิงหาคม 2553

* Corresponding : agrrat@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ซีราลีโนน [Zearalenone : (ZEA)] เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อราในกลุ่มของ *Fusarium* spp. โดยเฉพาะ *F. graminearum* พบการปนเปื้อนในธัญพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์และมีโอกาสเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ เมื่อสัตว์ได้รับสารพิษดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ สร้างความเสียหายต่อระบบการผลิตสัตว์ จึงจำเป็นที่ต้องมีวิธีการตรวจสอบสารพิษที่มีความถูกต้องแม่นยำและสะดวกต่อการใช้งานเพื่อช่วยในการตรวจสอบปริมาณของการปนเปื้อนสารพิษในเบื้องต้น งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบ Immunochromatographic strip (ICS) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารพิษ ZEA จากไฮบริโดมาโคลน ZN-1 นำมาติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยวิธี dot immunobinding assay และทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา จากนั้นนำมาประกอบเป็นชุด ICS ด้วยวิธีการ competitive assay โดยเคลือบ test line และ control line ด้วย ZEA-BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ rabbit anti-mouse antibody (RAM) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำ ICS ไปทดสอบกับตัวอย่างสารพิษมาตรฐานและข้าวโพดตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ ZEA ที่ ICS สามารถตรวจสอบได้มีค่าเท่ากับ 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารละลายซีราลีโนนมาตรฐาน และ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม สำหรับข้าวโพดบดที่เติมซีราลีโนน โดยใช้เวลาในการทดสอบ 15 นาที

คำนำ

ซีราลีโนน (Zearalenone:ZEA) เป็นสารทุติยภูมิที่สร้างโดยเชื้อราในกลุ่ม *Fusarium* spp. ในหลายสายพันธุ์ เช่น *Fusarium graminearum*, *F. roseum, F. sporotrichioides* และ *F. culmorum* (Bennett and Klich, 2003) ซึ่งเจริญอยู่กับผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด เมล็ดทานตะวัน ถั่วลิสง ถั่วเหลือง รำข้าวและธัญพืช อื่นๆ (CCFAC. 2000) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในอาหารคนและสัตว์ มีรายงานว่าเมื่อสัตว์ได้รับสาร ZEA จะทำให้เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ เช่น การแท้งลูก การกลับสัดไม่ตรงรอบ ผสมติดยาก น้ำเชื้ออ่อนแอ การบวมน้ำและทะลักของอวัยวะเพศ โดยพบว่าการปนเปื้อน ZEA 500-750 ไมโครกรัม/กิโลกรัม จะทำให้ลูกสุกรตายก่อนและหลังคลอดเพิ่มขึ้น และตรวจพบ ZEA ปนเปื้อนในน้ำนมของสัตว์ที่ได้รับ ZEA (Diekman and Green, 1992) Prelusky *et al.* (1990) พบว่า ZEA เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดสภาพ Hyperoestrogenic syndromes ในมนุษย์

จากสาเหตุดังกล่าว จึงมีการควบคุมปริมาณการปนเปื้อน ZEA ในอาหารคนและสัตว์ เช่น สหภาพยุโรปได้ประกาศระเบียบมาตรฐาน ขอบเขตปริมาณการปนเปื้อน ZEA ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยกำหนดให้ธัญพืชที่ไม่ผ่านการแปรรูป (ไม่รวมข้าวโพด) มีการปนเปื้อนได้ไม่เกิน 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และข้าวโพดที่ไม่ผ่านการแปรรูปปนเปื้อนได้ไม่เกิน 350 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (EC, 2007) ซึ่งที่ผ่านมาการดำเนินการด้านการควบคุมการปนเปื้อน ZEA ในผลผลิตเกษตรน้อยมาก ทั้งนี้สาเหตุสำคัญประการหนึ่งคือยังขาดเครื่องมือตรวจสอบติดตามที่รวดเร็วและแม่นยำในการหาปริมาณและชนิดของสารพิษดังกล่าว ในปัจจุบันวิธีการตรวจสอบ ZEA ที่นิยมอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (C-ELISA) และ Immunochromatographic assay (ICA) ซึ่งใช้ปฏิกิริยาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อสารพิษ ZEA ที่เป็นแอนติเจน โดยเฉพาะวิธี ICA สามารถใช้งานสะดวก รวดเร็วยิ่งขึ้น และสามารถใช้ได้พื้นที่ต่างๆ ไม่จำกัดเฉพาะห้องปฏิบัติการ ส่งผลให้การตรวจสอบทำได้กว้างขวาง เพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษใน

ผลผลิต และเพิ่มความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยอาหารให้กับผู้บริโภค

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิค สตริป (Immunochromatographic strip, ICS) สำหรับตรวจสอบสาร ZEA ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ โดยอาศัยคุณสมบัติการจับจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ZEA (MAb-ZEA)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารพิษซีราลีโนน (MAb-ZEA)

ผลิต MAb-ZEA โดยเพิ่มปริมาณไฮบริโดมาโคลน ZN-1 โดย MAb-ZEA สร้างอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG_1 และ κ light chain และผ่านการทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา โดย MAb-ZEA ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ อนุพันธุ์ของ ZEA ได้แก่ α-zearalenol (α-ZON) และ β-zearalenol (β-ZON) รวมทั้งไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารพิษ Aflatoxin B1 (AFB1) Ochratoxin A (OTA) และ Bovine serum albumin (BSA) ด้วยวิธี indirect competitive ELISA (รัชนี และคณะ, 2550)

2. การเพิ่มปริมาณ และ การเตรียม MAb-ZEA บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity column chromatography

เพิ่มปริมาณ MAb-ZEA โดยเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ZN-1 ในอาหาร Complete medium (CM) (Liddell and Cryer, 1991) และแยก IgG บริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Affinity column chromatography โดยใช้ Protein G-Sepharose (ZYMED, USA) คำนวณความเข้มข้นของสารละลาย IgG บริสุทธิ์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และใช้ค่า $E\ 0.1\%_{280\ nm}$ เท่ากับ 1.4 (Clark and Adams, 1977) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 6.0% stacking gel และ12% separating gel (Laemmli, 1970)

4. การทดสอบการทำปฏิกิริยาของ MAb-ZEA บนแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) โดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ICA เป็นวิธีการทดสอบทางซีรัมวิทยา โดยทำปฏิกิริยาบนแผ่น NCM ดังนั้นเพื่อตรวจสอบความสามารถของ MAb ในการทำปฏิกิริยาบนแผน NCM จึงเลือกใช้วิธี DIBA ในการทดสอบ โดยหยด ZEA-BSA ที่เจือจางใน CB ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Rabbit anti-mouse IgG (RAM) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ CB ลงบน NCM โดยแต่ละตัวอย่างใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ปล่อยให้ตัวอย่างแห้ง แช่ NCM ใน Blocking solution บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำไปแช่ใน MAb-ZEA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 60 นาที ล้างด้วย TBST แล้วแช่ใน Goat anti-mouse IgG (GAM) ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (Sigma, USA) บ่มนาน 60 นาที ล้างออก แล้วเติม 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)(Invitrogen, USA) เมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ NCM ในน้ำ (รัชนี, 2550)

5. การติดฉลากอนุภาคทองกับ MAb-ZEA (Gold-MAb conjugate)

ทำตามวิธีของ Faulk and Taylor (1971) โดยใช้สารแขวนลอยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 เติม MAb-ZEA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติม 10%BSA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนต่อไปอีก 30 นาที ปั่นตกตะกอน 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนแล้วละลายด้วย Gold dilution

buffer, pH 7.4 (Tris buffer saline + 0.5% Tween 20 + 1% BSA + 0.02% sodium azide) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม Sucrose ความเข้มข้นสุดท้าย 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4^{O}ซ นำ Gold-MAb conjugate นำมาทดสอบด้วยวิธี DIBA โดยหยดตัวอย่างตามวิธีข้างต้นลงบน NCM แช่ใน Blocking solution หลังจากล้างแผ่น NCM แล้วแช่ใน Gold-MAb conjugate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ

6. การประกอบชุดตรวจสอบ Immunochromatographic strip (ICS)

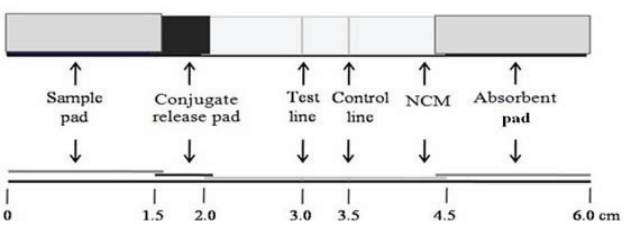
ICS ประกอบด้วย backing pad เป็น Self adhesive polyester backing (ARCARE 7823) สำหรับรองรับส่วนประกอบต่างๆ โดยกำหนดให้ ICS มีขนาดเท่ากับ 5x6 มิลลิเมตร มีส่วนประกอบแบ่งเป็น sample pad (SP) และ conjugate release pad (CRP) ใช้วัสดุ Standard 17 Glass fiber (Whatman, UK) ส่วน NCM ใช้ PRIMA 40 (Whatman, UK) และใช้ WP 470 (Whatman, UK) เป็น absorbent pad (AP) โดยเรียงเป็นชั้นตามลำดับใน ภาพที่ 1 ส่วน ZEA-BSA และ RAM ถูกพ่นบริเวณ test line และ control line ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง Biojet:XYZ Dispensing System (BIODOT, USA) ใช้อัตราเร็ว 0.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร (Xiulan *et al*.,2004)

7. การทดสอบชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมกับ ICS

ประกอบ ICS โดยพ่น ZEA-BSA และ RAM ที่เจือจางใน CB ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรบนแผ่น NCM ที่ตำแหน่ง test line และ control line ตามลำดับ พ่น CRP ด้วย Gold-MAb conjugate ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อบที่ 37^{O}ซ ทดสอบกับ Sample buffer 5 ชนิด ได้แก่ 1) Methanol 2) 1x Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 3) 1x Tris buffer saline (TBS), pH7.4 4) 1x Phosphate buffer saline ผสม 0.5% Tween 20 (PBST), pH 7.4 และ 5) 1x Tris buffer saline ผสม 0.5% Tween 20 (TBST), pH7.4

8. การทดสอบ ICS โดยใช้สารพิษ ZEA มาตรฐาน ที่ละลายใน 70% Methanol

เนื่องด้วยการตรวจสอบสาร ZEA ด้วยวิธี ICA มีการแสดงผลในส่วนของ test line ที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะการแข่งขัน ซึ่งที่ความเข้มข้นของ ZEA มากพอจะทำให้สาร Gold-MAb conjugate ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาในส่วนของ test line ได้ และปริมาณของสาร ZEA ดังกล่าวจะถือเป็นความเข้มข้นสูงสุดของ ZEA ที่ ICS สามารถตรวจสอบได้ งานวิจัยนี้ทดสอบโดยเตรียม ICS ตามวิธีข้างต้น โดยบริเวณ test line ใช้ ZEA-BSA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน CB นำมาทดสอบกับ ZEA มาตรฐานที่ละลายใน 70% Methanol โดยมีความเข้มข้นของสาร ZEA เป็น 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และนำมาผสมกับ Sample buffer ในอัตราส่วน 1:4 ตรวจสอบปฏิกิริยาภายใน 15 นาที



ภาพที่ 1 แผนผังการประกอบชุดตรวจสอบ ICS

9. การทดสอบ ICS กับข้าวโพดบดที่เติม ZEA เปรียบเทียบกับวิธี C-ELISA

การปนเปื้อนสารพิษ ZEA ในธัญพืชที่เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ มีข้อกำหนดอยู่ที่ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม การทดลองนี้จึงพัฒนา ICS ให้ความสามารถตรวจสอบ ZEA ความเข้มข้นสูงสุดที่ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม โดยชั่งข้าวโพดบด 20 กรัม เติม ZEA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บ่มไว้ที่ 4^{O}ซ ข้ามคืน นำวัตถุดิบดังกล่าวมาเติม 70%Methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (1:5) เขย่าที่ 300 รอบ/นาที นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmen#1 แล้วเจือจางด้วย Sample buffer อัตราส่วน 1:4 ทดสอบกับ ICS ที่ test line มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้อัตราเร็ว 0.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เปรียบเทียบกับการตรวจโดยวิธี C-ELISA และเปรียบเทียบค่า %Recovery (Xiulan *et al*.,2004)

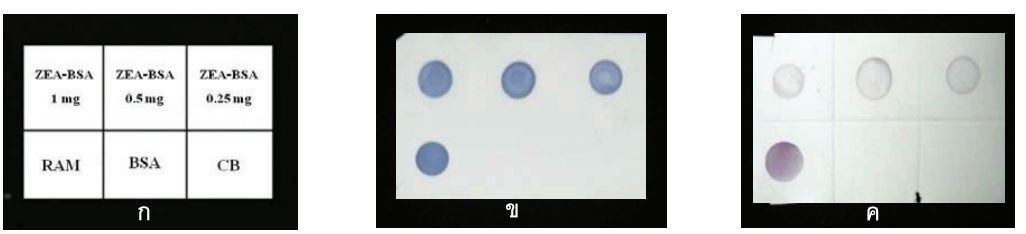
ผลและวิจารณ์

1. การเพิ่มปริมาณและการเตรียม MAb-ZEA บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity column chromatography

MAb-ZEA ที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดโคลน ZN-1 เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณในสภาพ *in vitro* และแยก IgG บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity column chromatography ได้ปริมาณ IgG 5.97 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 200 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีความบริสุทธิ์โดยให้แถบโปรตีนเพียง 2 แถบขนาดประมาณ 50 และ 25 kDa ซึ่งเป็นส่วนของ heavy chain และ light chain ของ IgG ตามลำดับ

2. การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของ MAb-ZEA บนแผ่น NCM โดยวิธี DIBA

การทดสอบโดยวิธี DIBA เป็นการทำปฏิกิริยาบน NCM ซึ่งคล้ายกับการเกิดปฏิกิริยาของ ICS พบว่าการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยใช้ MAb-ZEA หรือ Gold-MAb conjugate ให้ผลของปฏิกิริยาเช่นเดียวกันคือเกิดปฏิกิริยาบนตำแหน่ง ZEA-BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และ RAM ซึ่งแอนติเจนทั้งสองจะนำมาใช้เป็นส่วนของ test line และ control line ของ ICS ตามลำดับ และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ BSA และ CB ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ยังคงความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ตามปกติบน NCM (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทำปฏิกิริยา DIBA (ก) แผนผังแอนติเจนบน NCM โดยหยด ZEA-BSA ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, Rabbit anti-mouse IgG (RAM), BSA และ Coating buffer (CB) (ข) ทำปฏิกิริยากับ MAb-ZEA และตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย GAM-AP และสับสเตรท เปรียบเทียบกับ (ค) ทำปฏิกิริยากับ Gold-MAb conjugate และสังเกตสีของอนุภาคทองที่เกิดขึ้น

3. การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมกับ ICS

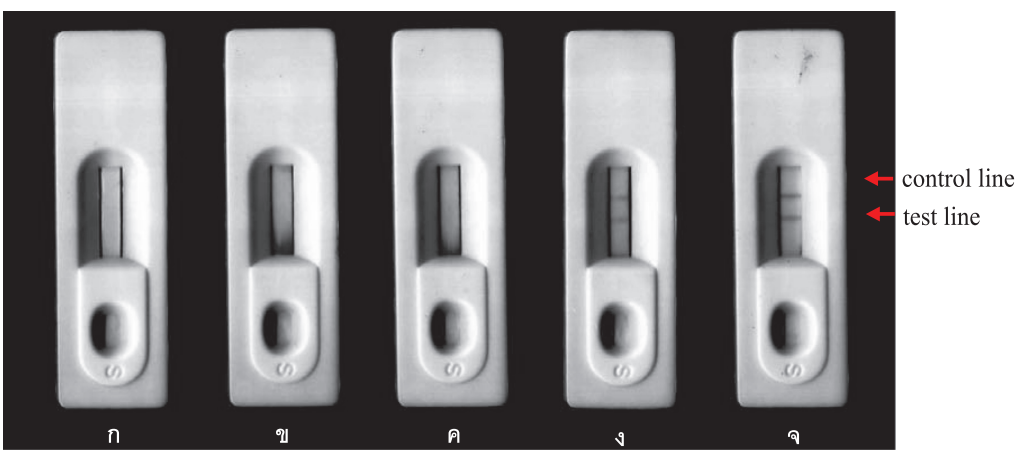
ชนิดของ Sample buffer เป็นสารละลายที่ทำหน้าที่พาสารต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาไปยังบริเวณ test line และ control line เมื่อเปรียบเทียบสารละลาย 5 ชนิด พบว่า Methanol ไม่สามารถที่จะพา Gold-MAb conjugate ให้เคลื่อนที่ไปยังส่วน NCM ได้ ส่วน PBS pH, 7.4 และ TBS, pH 7.4 มีการเคลื่อนตัวของ Gold-MAb conjugate ในช่วงแรกเท่านั้นแต่ไม่สามารถทำให้เกิด test line ได้แม้ทิ้งไว้นานกว่า 10 นาที แต่เมื่อใช้ PBST, pH7.4 และ TBST, pH7.4 พบว่า มีการเคลื่อนที่ของ Gold-MAb conjugate และเกิดแถบปฏิกิริยาที่ชัดเจนทั้งบริเวณ test line และ control line โดยใช้เวลาในการแสดงผลไม่เกิน 10

4. การทดสอบ ICS กับสาร ZEA มาตรฐาน ที่ละลายใน 70% Methanol

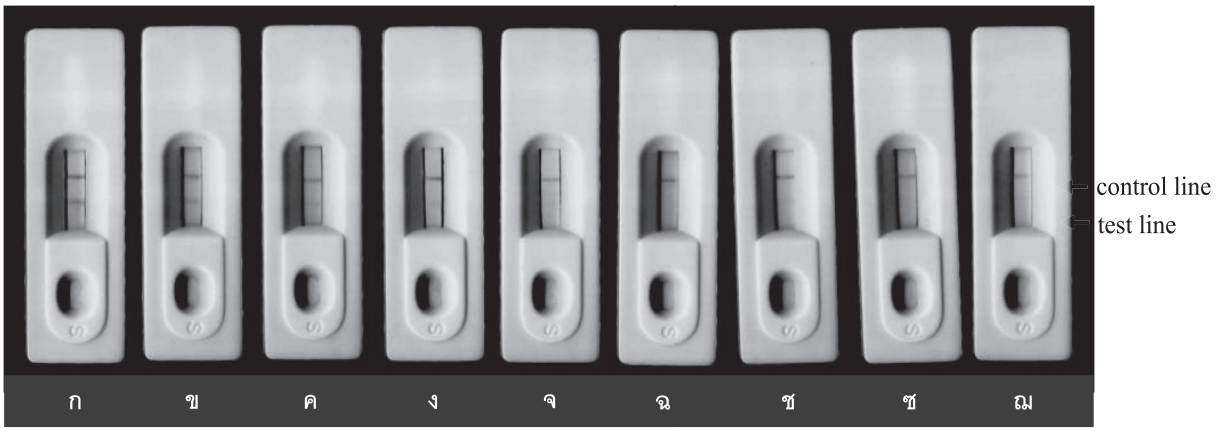
การทดสอบหาความเข้มข้นสูงสุดของ ZEA ในการตรวจสอบด้วย ICS เมื่อใช้ ZEA-BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น test line พบว่า ZEA ความเข้มข้นมากกว่า 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ไม่ทำให้ปรากฏแถบ test line (ภาพที่ 4)

5. การทดสอบ ICS กับข้าวโพดบดที่เติม ZEA เปรียบเทียบกับวิธี C-ELISA

เมื่อนำข้าวโพดบดที่เติม ZEA ในความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม มาตรวจสอบด้วย ICS ที่พัฒนาขึ้น พบว่าจะไม่ปรากฏแถบ test line ในข้าวโพดบดที่เติม ZEA 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม แต่ยังปรากฏแถบที่ test line เมื่อทดสอบกับข้าวโพดบดที่เติม ZEA 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบกับ ZEA ที่ละลายใน 70% Methanol ที่แถบ test line จะไม่ปรากฏที่กับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ ZEA 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (ภาพที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากการสกัด ZEA จากข้าวโพดมีค่าร้อยละของการคืนกลับ 91.82% (ตารางที่ 1) หรือมีค่าน้อยกว่า 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ดังนั้นจึงทำให้เกิดแถบปรากฏที่ test line ดังที่ได้ผลจากการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองในข้อ 4.



ภาพที่ 3 การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมกับ ICS ได้แก่ (ก) Methanol (ข) PBS, pH 7.4 (ค) TBS, pH7.4 (ง) PBST, pH 7.4 และ (จ) TBST, pH 7.4



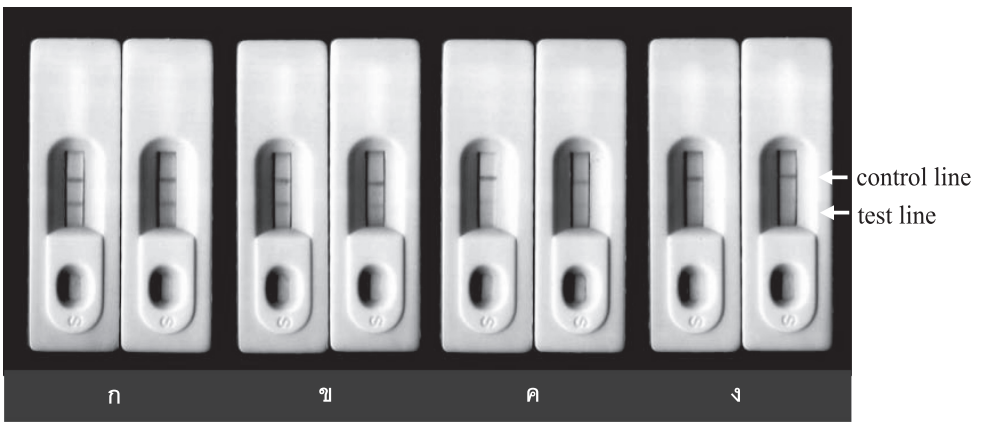
ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ ZEA ใน 70% Methanol ต่อการทำปฏิกิริยาบน ICS โดยใช้ (ก) 70%Methanol ที่ไม่มี ZEA เป็นสารละลายควบคุม เปรียบเทียบกับ ZEA ใน 70%Methanol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ข-ฌ)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบ ZEA ในข้าวโพดตัวอย่างด้วยวิธี ICA และ C-ELISA

ปริมาณ ZEA ที่เติมในข้าวโพด (ไมโครกรัม/กิโลกรัม)	ผลของปฏิกิริยาในวิธีการตรวจสอบ			% Recovery
	C-ELISA***	ICA		
		Test line	Control line	
ไม่เติม ZEA	13.03	+ *	-**	
50	43.95	+	-	87.90%
100	91.82	+	-	91.82%
150	118.42	-	-	78.95%

***(+)** ปรากฏแถบสี **(–)** ไม่ปรากฏแถบสี

***Competitive enzyme linked immunosorbent assay โดยแสดงปริมาณ ZEA เป็น ไมโครกรัม/กิโลกรัม



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบ ICS กับข้าวโพดที่เติม ZEA ต่อการทำปฏิกิริยาโดยใช้ (ก) ข้าวโพดบดที่สกัดด้วย 70% Methanol (ข-ง) ข้าวโพดบดที่เติม ZEA ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ

สรุป

การพัฒนาชุดตรวจสอบ ZEA ใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ZEA ติดฉลากด้วยอนุภาคทองนำมาฉีดพ่นบริเวณ CRP ส่วนของ test line และ control line เคลือบด้วย ZEA-BSA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ rabbit anti-mouse antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นข้าวโพดบดและสกัดสารพิษซีราลีโนนที่ปนเปื้อนด้วย 70%Methanol นำมาเจือจางด้วย PBST ในอัตราส่วน 1:4 พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ ZEA ที่ ICS สามารถตรวจสอบได้เท่ากับ 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย ZEA มาตรฐาน หรือเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในข้าวโพดบดก่อนขั้นตอนการสกัด ซึ่งสูงกว่าที่ Shim *et al.*(2009) รายงานไว้ว่าค่าความเข้มข้นสูงสุดของ ZEA ที่ตรวจสอบได้เท่ากับ 2.5 นาโนกรัม/มิลลิตร และ 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นของ ZEA ที่ ICS ซึ่งพัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบได้เหมาะสมในการตรวจสอบ ZEA ที่ปนเปื้อนธัญพืชที่ไม่ผ่านการแปรรูปซึ่งต้องไม่เกิน 100 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (EC, 2007) ตรงต่อความต้องการของผู้ใช้ตรวจสอบ ZEA ในเบื้องต้น นอกจากนั้นผลงานวิจัยนี้ยังเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษชนิดอื่นๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Bennett, J.W. and M. Klich. 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev.16: 497-516.

Clark M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen. Virol. 34: 475-483.

Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC). 2000. Posting date. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Position paper on zearalenone. Publication CCFAC 00/19. Codex Alimentarius Commission. Rome, Italy.

European Commission (EC). 2007. Regulation (EC) No. 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards fusarium toxins in maize and maize products. Off. J. Eur. Union L255: 14-17.

Diekman, M.A. and M.L. Green. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. Anim.Sci. 70: 1615-1627.

Faulk, W.P. and G.M. Taylor. 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. Immnochemistry 8: 1081-1083.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the hade of bateriophage T4. Nature 227 : 680-687.

Liddell, J. E. and A. Cryer. 1991. Practical guide to monoclonal antibody. John Wiley and Sons, Inc. New York. 188p.

Prelusky, D.B., P.M. Scott, H. Trenholm and G.A. Lawrence. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. Environ.Sci. 25: 87-103.

Shim W.B., K.Y. Kim and D.H. Chung. 2009. Development and validation of a gold nanoparticle immunochromatographic assay (ICG) for the detection of zearalenone. Agric. Food Chem. 5: 4035-4041.

Xiulan, S., Z. Xiaolian, T. Jian, G. Xiaohong and Z. Jun. 2004. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. Food control. 17: 256-262.