การพัฒนาวิธี Competitive ELISAสำหรับตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอช-ไอ-วีเนวิราพีน

บทคัดย่อ

ในส่วนแรกของงานวิจัยนี้ ได้พัฒนาแผ่นตรวจวิเคราะห์ยาต้านไวรัสเอชไอวีชนิดเนวิราพีน (NVP) ได้เป็นผลสำเร็จ โดยเริ่มจากการผลิตแอนติซีรัมต่อ NVP จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยคอนจูเกต NVP-BSA ทำการประเมินคุณภาพของโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่เตรียมได้ด้วย Western immunoblotting และ competitive indirect ELISA จากนั้นนำ anti-NVP แอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาคอนจูเกตกับ colloidal gold ซึ่งตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปคโทรสโคปี และใช้ภาพจากกล้องจุลทรรศอิเล็คตรอนแบบส่องผ่านในการตรวจสอบขนาดและรูปร่างของคอนจูเกตที่ได้ นำเอา gold conjugates มาผลิตแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโทกราฟิกสำหรับเนวิราพีน จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแผ่นตรวจสามารถใช้ตรวจหายา NVP ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1.0 μg/ml ใน PBS บัฟเฟอร์ โดยที่ยาต้านไวรัสชนิดอื่นไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มรบกวนการอ่านผล

ในส่วนที่สองของงานวิจัย ได้สังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบโมเลกุลเพื่อให้ได้แอนติบอดีเทียมเพื่อใช้พัฒนา enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay สำหรับเนวิราพีน ในตอนแรกได้ใช้นิโคตินาไมด์เป็นสารต้นแบบสำหรับสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบ 11 ชนิด ซึ่งแตกต่างกันที่ชนิดและอัตราส่วนของฟังก์ชันนัลมอนอเมอร์ สารครอสลิงค์ ตัวทำละลาย และวิธีการพอลิเมอไรเซชัน จากการศึกษาการจับกับสารต้นแบบพบว่า MIP11 หรือ poly(MAA-*co*-TRIM) ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบตกตะกอนในตัวทำละลายผสม THF/methanol/H_2O สามารถจับกับนิโคตินาไมด์และเนวิราพีนได้ดีที่สุดโดยเฉพาะในตัวกลางที่เป็นน้ำ เมื่อใช้สภาวะพอลิเมอไรเซชันแบบเดียวกันนี้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบเนวิราพีนหรือ P(NVP) พอลิเมอร์ที่ได้นี้สามารถจับกับเนวิราพีนได้ดีและมีความจำเพาะสูง จากนั้นได้เตรียม HRP-labelled NVP ซึ่งทำการตรวจสอบคุณลักษณะด้วย competitive ELISA assay โดยใช้ rabbit anti-NVP antibodies ที่ผลิตได้จากตอนแรก ในขั้นสุดท้ายได้ใช้พอลิเมอร์ MIP11 และ P(NVP) แทนแอนติบอดีในการพัฒนา competitive binding assay สำหรับตรวจหาเนวิราพีน ซึ่งได้กราฟมาตรฐานสำหรับเนวิราพีนที่มีความเข้มข้น 10-100 μg/ml และ 10-500 μg/ml เมื่อใช้ MIP11และ P(NVP) ตามลำดับ

Development of Compettitive ELISA Methods for Determination of Nevirapine, an Anti-HIV Drug

Abstract

In the first part of this research, an immunochromatograhic (IC) strip test to detect nevirapine (NVP) in human plasma has been successfully developed. Antiserum to NVP was first raised in rabbits by immunization against NVP chemically conjugated with bovine serum albumin, and subsequently validated by Western immunoblotting and competitive indirect ELISA. The partially purified anti-NVP antibodies were conjugated with colloidal gold particles. UV-visible spectroscopic technique was used to monitor the conjugation reaction, while transmission electron microscopy images were used to characterize the particle size and shape of the conjugates. The resulting colloidal gold conjugates were used for the production of an IC strip test for nevirapine. Preliminary results show that it was possible to detect the presence of NVP at a concentration as low as 1.0 μg/ml in PBS, and no cross-reactivity from other commonly administered HIV drugs or components in the human plasma was observed.

In the second part of this research, molecularly imprinted polymers were synthesized to obtain an artificial antibody to be use in developing an enzyme-linked molecularly imprinted sorbent assay for NVP. Initially, nicotinamide was used as a pseudo-template instead of nevirapine to synthesize 11 imprinted polymers by varying types and ratios of functional monomer, crosslinker, porogen, and polymerization methods. Equilibrium rebinding studies revealed that MIP11, poly(MAA-*co*-TRIM), prepared by precipitation polymerization in solvent mixture THF/methanol/H_2O exhibited high binding affinity toward nicotinamide especially in aqueous media. And when the same polymerization condition was used in the synthesis of nevirapine-imprinted polymer, P(NVP), the resulting polymer exhibits high binding ability and selectivity toward NVP. HRP-labelled NVP was then prepared and characterized by competitive ELISA assay using rabbit anti-NVP antibodies produced from previous section. Finally, the polymers MIP11 and P(NVP) were used in place of antibodies to develop a competitive binding assay for NVP detection. The calibration curves were obtained corresponding to NVP concentrations ranging from 10-100 μg/ml and 10-500 μg/ml from using MIP11 and P(NVP), respectively.