รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

: นายอรรคพล ภูมีศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

: นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีสังเคราะห์ โปรตีน EPSPS ที่มีความบริสุทธิ์ ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ด้วยการสังเคราะห์ยีน CP4EPSPS แล้วโคลนยีน เข้าเวคเตอร์ pET200/D-TOPO (ให้ชื่อพลาสมิดว่า pET200-NK603) แล้วสังเคราะห์โปรตีน EPSPS ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม ด้วยการเลี้ยง E. coli ในอาหารเหลว 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ และชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยเติมสาร IPTG ความเข้มข้น 1มิลลิโมลาร์ เพื่อผลิตโปรตีน EPSPS ที่ 22 ชั่วโมง ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาด 48 kDa จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยเทคนิค DIBA และเตรียม gold-conjugated IgG linked ด้วยเทคนิค Hetero-funtional linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมในการเชื่อมต่ออนุภาคทองคำ คือ IgG linked เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ต่ออนุภาคทอง 1 มิลลิลิตร เมื่อทดสอบความเข้มข้นของ Gold-conjugated IgG ที่มีต่อ conjugated release pad อยู่ที่อัตรา 10-15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร โดยใช้ goat anti-rabbit (GAR) ทำ control line และ ทำ test line ด้วย IgG ของ NK603 ซึ่งจะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดกับสารละลาย Na_2HPO4 โดยสามารถตรวจสอบได้ภายในระยะเวลา 5-10 นาที ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ คือ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่าง negative sample

6. คำนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับการรับรองให้ปลูกเป็นการค้าและรับรองความปลอดภัยในการนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ในบางประเทศ โดยในช่วงปี 2539 - 2547 พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 47 เท่า โดยเฉพาะปี 2547 มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดถึง 140 ล้านเฮกแตร์ทั่วโลก ซึ่งในจำนวนพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดทั้งหมดนี้คิดเป็นพื้นที่เพาะปลูกเฉพาะข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมถึงร้อยละ 14 จากรายงานในปี 2552 ของ Seong Hun Lee และคณะกล่าวว่าพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมได้เพิ่มขึ้นจากเดิม 1.7 ล้านแฮกแตร์ ในปี 2539 เป็น 125 ล้านแฮกแตร์ ในปี 2551 จากพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดพบว่าพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปลูกกันเป็นจำนวนมาก 3 อันดับแรก คือถั่วเหลือง คิดเป็น 70% ของพื้นที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก รองลงมาคือ ฝ้าย คิดเป็น 46% และอันดับที่ 3 คือ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม คิดเป็น 24 % ของพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม ตามที่ The International Service for the Acquistion of Agri biotech Application หรือ ISAAA ได้มีรายงานว่าปัจจุบัน มีข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมมากกว่า 121 ชนิดที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นอาหารหรืออาหารสัตว์ และยังมีการปลูกเพื่อการค้าในประเทศต่างๆ มากกว่า 23 ประเทศ (James, 2013; Jae et al,2014).

ข้าวโพด NK603 หรือชื่อทางการค้าคือ ข้าวโพด Roundup Ready เป็นพืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ประกอบไปด้วยยีน cp4epsps (CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ได้มีการวิจัยพัฒนาการตรวจสอบด้วยพืชดัดแปรพันธุกรรมต่างๆมากมายไม่ว่าจะเป็น ทางด้านดีเอ็นเอเช่น เทคนิค PCR หรือ Real-time PCR หรือ การตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีน ทั้งนี้การเปิดการค้าเสรี ทำให้สินค้าเกษตรมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรม การพัฒนาชุดตรวจสอบ ด้วยการใช้เทคนิค immunochromatographic strip test ซึ่งปัจจุบันได้พัฒนากลายเป็นเทคนิค gold labeled IgG flow test (GLIFT) (สุรภี และคณะ, 2547 และ กิตติศักดิ์ และคณะ, 2549) ในการทดลองนี้เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อการตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการทางอิมูโนวิทยา และการไหลของสารในการทำปฏิกิริยา (lateral flow technique) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนหรือเรียกอีกอย่างว่า Lateral Flow Test (LFT) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้อ่านผลได้อย่างรวดเร็ว ง่าย และตรวจสอบภาคสนามได้ (Kobra et al, 2011; Liu et al, 2014)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่องอบลมร้อนแบบเขย่า (Incubate shacker)
- เครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน AKTApure
- เครื่องพ่นสาร Biodot

วิธีการ

การเตรียมและทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

สังเคราะห์ยีน CP4EPSPS แล้วเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET200/D-TOPO เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pET200-NK603 เข้าสู่เซลล์ E. coli BL21 คัดเลือกแบคทีเรีย NK603-BL21จำนวน 2 โคลนแล้วจึงทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โปรตีน EPSPS เมื่อ E. coli ทั้ง 2 โคลน ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมแล้วถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะและชักนำ (induced) ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วยสาร IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 22 ชั่วโมง เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้แบคทีเรีย NK603 สังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ EPSPS โปรตีนขนาด 48 kDa ได้ดีที่สุดก่อนจะนำไปทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein purification) ด้วยการใช้หลักการ Affinity Chromatography (Jiang et al, 2014) โดยใช้ specific (affinity) elution หรือ non-specific elution ด้วยการใช้ค่า pH หรือ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH 4.9-8 เพื่อให้ได้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด โดยเปรียบเทียบปริมาณและขนาดของโปรตีนที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากได้แอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนชนิด CP4EPSPS บริสุทธิ์แล้ว จึงได้นำโปรตีนชนิดนี้ซึ่งมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปฉีดกระต่าย สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยฉีดเข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white จำนวน 3 ครั้ง รวมระยะเวลาเท่ากับ 3 สัปดาห์ จากนั้น ในสัปดาห์ที่ 4 จึงได้ใช้แอนติเจน (โปรตีน CP4EPSPS) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับ incomplete adjuvant แล้วนำไปฉีดเข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของกระต่ายตัวเดิม จากนั้นจึงเจาะเลือดเพื่อเก็บแอนตีซีรัม โดยเจาะเลือดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เริ่มเจาะเลือดในสัปดาห์ที่ 4 ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 13 รวมจำนวนครั้งที่เจาะเลือดเท่ากับ 10 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งจะเจาะให้ได้เลือดประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เลือดที่เจาะได้ในแต่ละครั้งจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกเก็บแอนติซีรัมที่เป็นส่วนใสด้านบน แอนติซีรัมจะถูกเก็บในหลอดสำหรับเก็บแอนติซีรัมที่เติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 % (v/v) เพื่อเป็นสารรักษาสภาพแอนตีซีรัม จากนั้นจึงเก็บหลอดแอนติซีรัมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การแยกสกัด IgG

ในช่วงแรกของการแยกสกัดเป็นการทดสอบโดยนำแอนติซีรัมต่อ recombinant protein CP4EPSPS ที่ได้จากกระต่าย โดยเลือกซีรั่มที่ผ่านการวัดค่าไตเตอร์ว่า มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดมาทำการแยกสกัด IgG

โดยใช้แอนติซีรัมจำนวน 1 มิลลิลิตร มาผสมให้เจือจางด้วยอัตราส่วน IgG : Distilled water (DW) เป็น 1:9 แล้วเติม ammonium sulphate saturated ในปริมาณ 1 เท่าของแอนติซีรัม ที่เจือจาง โดยค่อย ๆ เติมทีละหยด และทำในกล่องทำความเย็น วางทิ้งในกล่องความเย็น นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS:DW ในอัตราส่วน 1:1 นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีอีกครั้ง ทิ้งส่วนใสเก็บตะกอนมาละลายใน 0.01 M PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไป dialysis ในน้ำกลั่น ปริมาณ 2 ลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และเปลี่ยนมา dialysis ในบัฟเฟอร์ 0.5x PBS นานข้ามคืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) ตรวจสอบคุณภาพ IgG ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณปรับความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร O.D.280/1.4 = X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977)แต่ในภายหลังได้มีการนำเครื่องที่สามารถใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนได้มาใช้เพื่อทำการสกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) ใช้ Binding buffer เป็น 20 mM Sodium phosephate pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ นำแอนติซีรัมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เจือจางแอนติซีรัมกับ Binding buffer อัตราส่วน 1:9 โหลดแอนติซีรัมผ่านคอลัมน์ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย Binding buffer ปริมาณ 5-10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยสังเกตจากกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ OD.280 (UV1_280) จากนั้นจึงชะ IgG บริสุทธิ์ด้วย Elution buffer จากนั้นทำการ Desalting เพื่อนำเกลือออกจากตัวอย่างและเพื่อเปลี่ยน buffer โดยให้ IgG อยู่ในสารละลายสุดท้ายเป็น 100 mM Na2HPO4 pH7.5 ด้วย0.05 เท่าของปริมาตร IgG ด้วย Netutralizing buffer เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์แต่ละ fraction ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG โดยใช้ค่า Extinction coefficient ของ IgG เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลาง คำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จากสูตร OD.280/1.4 = X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977) ผลจากการสกัด IgG และหลัง Concentrate พบว่าได้ค่า Absorbance ที่คิดเป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายได้ 1.6 mg/ml

การทดสอบคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจนด้วยวิธี immunochromatographic assay

- ทดสอบแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตามวิธีการ indirect ELISA ของ Clark และ Adam (1977) โดยการเคลือบหลุม micro plate ด้วย recombinant protein CP4EPSPS ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างออกด้วย PBST (PBS ที่ผสม 0.05% Tween20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (2% skim

milk, sigma, St. Louis, USA) ที่ละลายใน PBST) หลุมละ50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้น เป็นเวลานาน 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที หลังจากนั้นเติมตัวอย่างพืชได้แก่ใบข้าวโพด ที่คาดเป็นข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม NK603 แล้วหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม IgGที่เจือจางด้วย blocking solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นนาน 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม GAR-conjugated (Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase) เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มไว้ในกล่องความชื้นนาน 60 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเติมสารละลาย สับเสตรทp-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 10% Diethanolamine หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นและมืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOHหลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (A 405) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของซีรัมปกติ ที่ให้ค่าเป็นบวก

- ทดสอบแอนติซีรัมด้วยเทคนิค DIBA

เจือจาง Recombinant protein NK603 บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ผึ่งให้แห้ง นำแผ่น NCM แช่ลงใน Blocking buffer (2% skim milk ที่ละลายใน TBS) ที่เติม 0.4% Triton X-100 เป็นเวลา เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม แอนติซีรัม เจือจางใน Blocking buffer ในอัตรา 1:200 เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นไปแช่ในสารละลาย GAR-conjugated ที่เจือจางใน Blocking buffer อัตราส่วน 1:10,000 โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าตลอดเวลาและล้างด้วย TBST (0.05% tween 20, tris-buffer saline) จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Napthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2 toluidincdiazonium chloride hemizene chloride) เป็นสับสเตรท บ่มในที่มืดจนกว่าจะเกิดสีชมพูของปฏิกิริยาหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น

ทดสอบการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG) ด้วยหลัก Physical interaction (electrostatic coupling) ทดสอบเปรียบเทียบกับการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG) ด้วยหลัก Chemical interaction (covalent coupling) นำโปรตีนที่ได้มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัด Bradford และสกัด IgG จากแอนตี้ซีรั่ม ด้วยคอลั่ม HiTrap Protein A HPใหม่เพื่อให้เพียงพอต่อการทดสอบ

การติด linker ที่ antibodies

เนื่องจากการทดสอบครั้งที่ผ่านมาพบว่า IgG สามารถเชื่อมต่อกับ Gold ได้แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ control line และ test line แล้วพบว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาดังนั้นจึงเพิ่มความเสถียรและความสามารถในการจับกับ Gold ให้แก่ IgG ด้วยการติด linker ซึ่งเป็นการเชื่อม IgG และ อนุภาคทองด้วยโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายโพลิเมอร์ หรือ Heterofuntional Linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้บริเวณหมู่คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide) ด้วยการผสม IgG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับ 100 mM $NaIO_4$ เขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1x PBS และเติม 46.5 mM linker solution แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 40 mM HEPES แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g นาน 10 นาที ที่ 4 องศา ด้วย 10k MWCO จากนั้นเติมด้วย 40 mM HEPES ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ml แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนถึงทำการทดสอบ

ตรวจสอบ การ Oxidation ของ IgG linker ด้วย Purpald test

ขั้นตอนสำคัญของการเชื่อมต่อแอนติบอดี้กับอนุภาคทองคือการ ปลดปล่อย aldehyde group ด้วยการออกซิเดชั่นของน้ำตาล ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้ด้วย 1xPBS และ $NaIO_4$ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของ Aldehydes ในตัวอย่าง IgG ที่ได้รับการ Oxidation นั้นสามารถทำได้โดยการเติม 60 ไมโครลิตร purpled solution ลงใน 20 ไมโครลิตร IgG ซึ่งวิธีการนี้จะต้องทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากตัวอย่างจะกลายเป็นสีม่วง ซึ่งหมายถึงการปลดปล่อย Oxygen ออกมา

การทดสอบการ conjugated ของ IgG กับ Gold เพื่อหาอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบการเชื่อมต่อของแอนติซีรั่ม กับ colloid gold ที่มีอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ด้วยการทดสอบที่ ระดับความเข้มข้นของ IgG linked 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยการผสม colloid gold 1 ml กับ IgG linked ปริมาตร 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ul จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที แล้วสังเกตสีและการตกตะกอนของอนุภาคทอง ด้วย กล้อง transmission electron microscopy (TEM) ที่ได้ดังรูปภาพที่ 2 จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm

ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

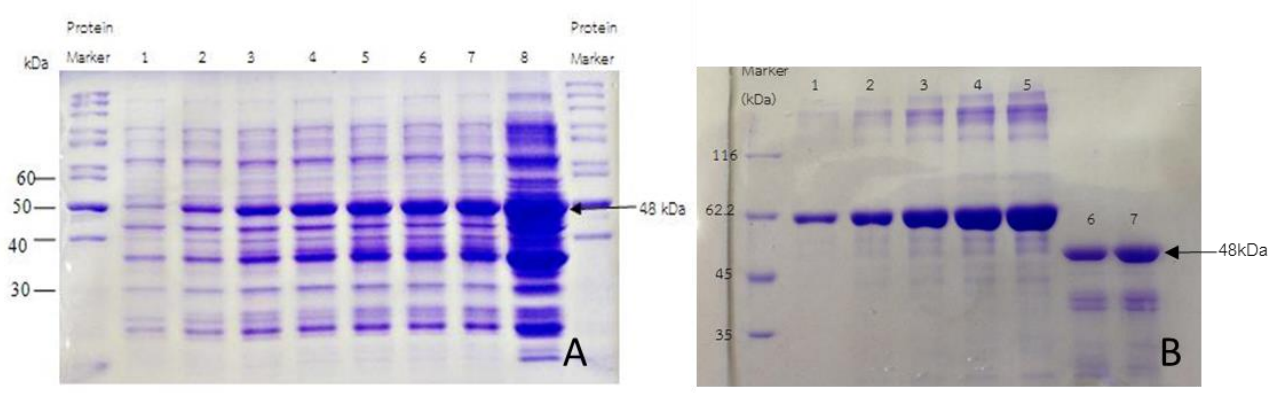
ผลิตชุดตรวจสอบ Strip test ด้วยการทดลองพ่น Gold conjugated ลงบนแผ่น Gold conjugate release pad โดยทำการ เตรียม gold pad ด้วยการแช่สารละลาย Pretreatment ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทองที่อัตราส่วนระหว่าง Gold:IgG linked 1มิลลิลิตร :1 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร :15 ไมโครลิตร แล้วนำมาพ่นบน Gold conjugate release pad ที่ได้รับการ Pretreatment แล้ว

ทดสอบความหนาแน่ของการพ่นด้วย ระยะ ตั้งแต่ 10 -30 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบ ให้แห้ง แล้วเตรียมเมมเบรนสำหรับทดสอบด้วยการขีดเส้น Test line ด้วย IgG NK603 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ เส้น Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG อบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการประกอบชุดทดสอบด้วยการติด Gold Conjugate release pad ลงไปแล้วตามด้วยแผ่น Sample pad เพื่อใช้สำหรับดูดซับตัวโปรตีน NK603 บนแผ่น Backing card จากนั้นวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่มีเส้น Control line และ Test line ซึ่งแผ่น Nitrocellulose membrane (NM) ที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ AE99 แล้วติดลงบน Backing card แล้วจึงวางแผ่นซับ Wick pad ไว้ด้านบนสุด

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลของการเตรียมและทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ EPSPS โปรตีนออกมามากที่สุด คือ 22 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้จากวิธี SDS-Page แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ EPSPS โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ จากการคาดคะเนความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับโปรตีน BSA พบว่ามีความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 1.0 mg/ml และเมื่อที่ขนาดประมาณ 48 kDa เมื่อได้โปรตีน NK603 ตามเป้าหมายแล้ว จึงใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนี้ต่อไป (ภาพที่1)



ภาพที่ 1 (A) แสดงปริมาณโปรตีน EPSPS ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ที่ผลิตโดย E. coli BL21 โคลนที่ 2 เมื่อถูกชักนำด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆ

หมายเลข 1-8 แสดงระยะเวลาต่างๆ ที่เซลล์ E. coli โคลนที่ 2 ถูกชักนำให้ผลิตโปรตีน EPSPS โดยที่

แถวที่ 1 = ชั่วโมง 0 (non-induced) แถวที่ 5 = ชั่วโมงที่ 4

แถวที่ 2 = ชั่วโมงที่ 1 แถวที่ 6 = ชั่วโมงที่ 5

แถวที่ 3 = ชั่วโมงที่ 2 แถวที่ 7 = ชั่วโมงที่ 6

แถวที่ 4 = ชั่วโมงที่ 3 แถวที่ 8 = ชั่วโมงที่ 22 (ข้ามคืน)

(B) แสดงการทดสอบโปรตีนที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธี SDS-Page เลนหมายเลข 1-5 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 mg/ml ตามลำดับ เลนหมายเลข 6-7 แสดงแถบโปรตีน EPSPS ซ้ำที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

เมื่อได้แอนติซีรัมจากเลือดกระต่ายครบทั้ง 10 ครั้งแล้ว จึงทำการตรวจคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธีนี้จะใช้โปรตีน CP4EPSPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เป็นแอนติเจน จากนั้นจึงเจือจางแอนติซีรัม จาก 1:10 ไปจนถึง 1: 3,276,800 (2 fold dilution) แล้วนำมาตรวจหาปริมาณแอนติซีรัมที่น้อยที่สุด (ไตเตอร์) ที่ยังคงสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน (โปรตีน CP4EPSPS) แล้วให้ผลเป็นบวกหรือ positive ได้ ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งที่ 1 (As-1 หรือ สัปดาห์ที่ 4) จนถึงครั้งที่ 10 (As-10 หรือ สัปดาห์ที่ 13) แสดงให้เห็นในตารางที่ 1

ตารางที่ 1แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมตั้งแต่การเจาะเลือดครั้งที่ 1 (As-1) จนถึงครั้งที่ 10 (As-10)

แอนติซีรัม (As)	As-1	As-2	As-3	**As-4**	As-5	**As-6**	As-7	As-8	As-9	As-10
ค่าไตเตอร์	1:51,200	1:102,400	1:409,600	**1:819,200**	1:409,600	**1:819,200**	1:204,800	1: 409,600	1:204,800	1:204,800

จากตารางจะเห็นได้ว่าแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่ายในครั้งที่ 4 และครั้งที่ 6 ให้ค่าไตเตอร์ที่สูงที่สุดคือ 819,000 ซึ่งเป็นปริมาณแอนติซีรัมที่เจือจางที่สุดหรือเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังคงสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน CP4EPSPS และให้ผลเป็นบวกหรือ positive ในเทคนิค indirect ELISA ได้ พบว่าหากทำการสกัด IgG ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ammonium sulphate saturated ปริมาณของ IgG ที่ได้ มีค่าน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ Hitrap Protein A ซึ่งทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของ IgG สูงกว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอน ammonium sulphate saturated

การทดสอบคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจนด้วยวิธี immunochromatographic assay

- ผลการทดสอบแอนติซีรัมและIgGที่ผลิตจากกระต่ายกับตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

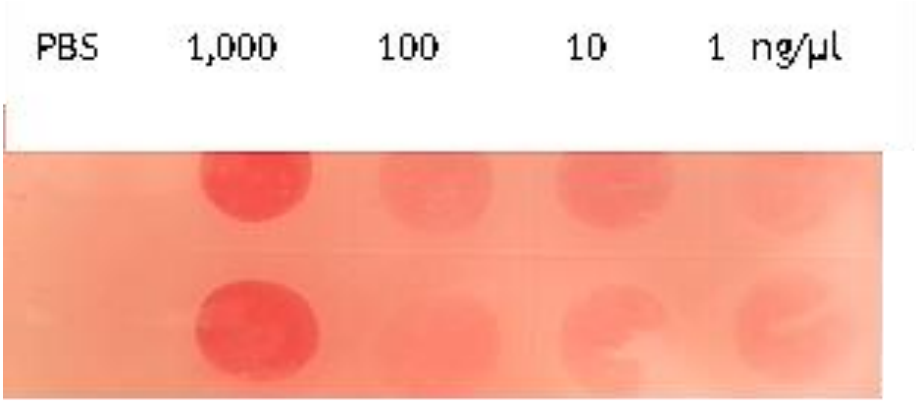
นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีน และ IgG ที่สกัดได้จากการใช้วิธี Hitrap Protein A มาทำการทดสอบกับตัวอย่างพืชที่คาดว่าจะเป็นข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม CP4EPSPS จากตารางที่ 2 พบว่า เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างพืชกับ โปรตีน CP4EPSPS โดยใช้ IgG ที่ได้จากการผลิตแอนติบอดีในกระต่ายเป็น first antibody และใช้ GAR-conjugated (Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase) เป็น secondary antibody เมื่อเทียบค่ากับ Negative control พบว่า ตัวอย่างที่ได้จากพืช มีค่าความเข้มข้นสูงกว่า 2x ของความเข้มข้นของ Negative control แต่มีค่าน้อยกว่า Positive control ซึ่งเป็น protein บริสุทธิ์ ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบเป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมแต่มีการปนเปื้อนของยีนดัดแปรพันธุกรรมอยู่ในปริมาณที่ต่ำ

ตารางที่ 2 แสดงผลทดสอบ indirect ELISA กับตัวอย่างพืชและ IgG ที่ได้จากโปรตีน CP4EPSPS

ตัวอย่าง	ค่าความเข้มข้น			เทียบค่า 2x
	replication 1	replication 2	ค่าเฉลี่ย	control blank
Control Blank	0.097	0.12	0.109	0.217
Positive control	3.831	3.824	3.828	7.655
1	0.977	1.028	1.003	2.005
2	1.157	1.205	1.181	2.362
3	0.991	1.026	1.009	2.017
4	1.173	1.208	1.191	2.381
5	1.012	1.005	1.009	2.017
6	0.96	1.002	0.981	1.962

- ทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายด้วยเทคนิค DIBA

ผลการตรวจสอบ recombinant protein CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1,000-1 นาโนกรัม/ไมโครลิตรด้วยเทคนิค DIBA ผลการตรวจสอบที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังจากเติมสับสเตรทแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อ recombinant protein CP4EPSPS ที่ผลิตจากจากกระต่ายมีความจำเพาะเจาะจง และมีความไวในการตรวจจับโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทดสอบคือ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพที่ 2) ระดับความความเข้มของสีที่แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาจะแปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน



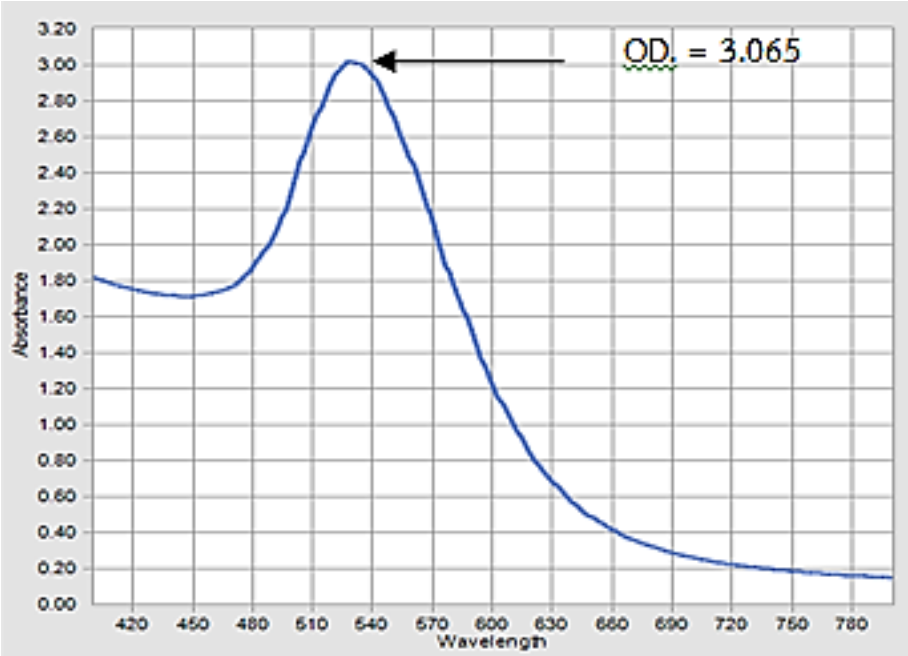
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบ recombinant protein CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 10 นาที หลังจากเติมสับสเตรท

ทดสอบการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG)

- หลัก Physical interaction (electrostatic coupling)

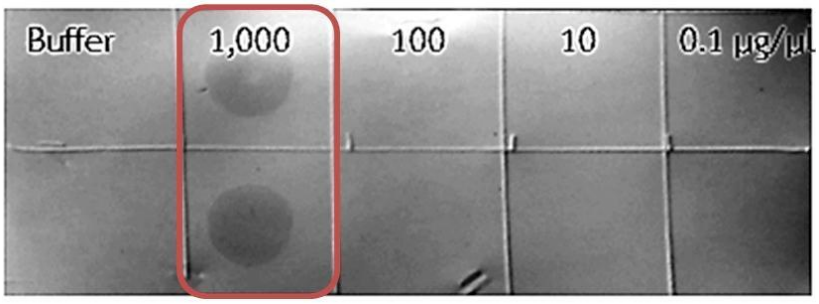
สร้าง AuNP IgG conjugates ด้วยหลักการ Physical interaction (electrostatic coupling) ซึ่งเป็นวิธีการเชื่อมต่อผ่านปฏิกิริยาสัมพันธ์ของประจุของ IgG ด้วยประจุที่อยู่บนพื้นผิวสัมผัส ซึ่งขึ้นอยู่กับ การเชื่อมต่อของประจุลบจาก AuNPและประจุบวกจากแอนติบอดี้ หรือแรงดึงดูดระหว่างพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic attraction) ระหว่าง AuNPและ แอนติบอดี้ และ การจับกันของประจุลบของ AuNPกับกรดอะมิโนจากแอนติบอดี้ โดยทำการเชื่อมต่อ Colloidal gold กับ IgG ของ PAb-CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตกตะกอน Colloidal gold conjugated IgG ด้วยสารละลาย passive

gold diluents pH 7.4 กัน ตรวจวัดค่า O.D. 530 ให้มีค่าเท่ากับ 3.065 (ภาพที่ 3) เป็นค่าที่มีปริมาณและความเหมาะสมของการเชื่อมต่อของอนุภาคทองกับ IgG



ภาพที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น A 400-800 นาโนเมตร ของ Colloidal gold conjugated IgG ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่

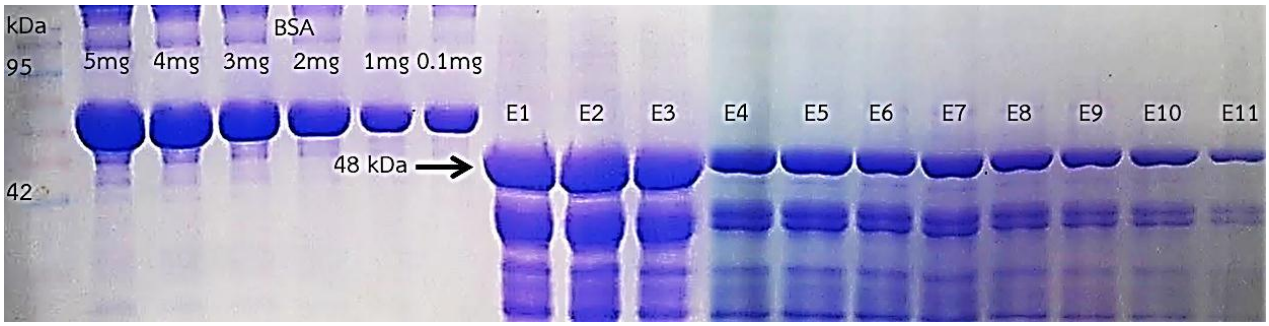
AuNP IgG conjugated ที่เชื่อมต่อกันด้วยหลักการ electrostatic coupling มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ Colloidal gold conjugated IgG ของ PAb-CP4EPSPS ต่อ recombinant protein CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาสีม่วงแดงของ Colloidal gold conjugated IgG ที่ทำปฏิกิริยาของโปรตีนที่ความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงซึ่งแสดงให้เห็นว่า Colloidal gold conjugated IgG สามารถตรวจจับกับโปรตีนเป้าหมาย CP4EPSPS ได้อย่างจำเพาะเจาะจงไม่เกิดปฏิกิริยาข้ากับสารละลายบัพเฟอร์ (ภาพที่ 4) ซึ่งจะต้องปรับค่าความเจือจางในการทำปฏิกิริยาของ Colloidal gold conjugated IgG เมื่อต้องนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงและใช้เวลาน้อยในการตรวจสอบที่ควรมีการพัฒนาขึ้นมาเนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียวกัน เป็นการประหยัดต้นทุนในการตรวจสอบ



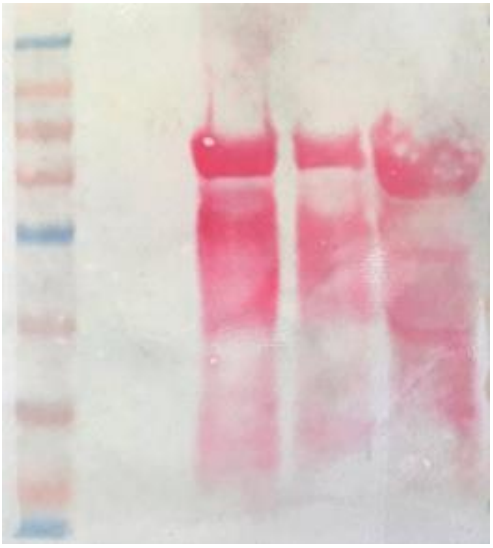
ภาพที่ 4 แสดงผลการทดสอบ Colloidal gold conjugated IgG ที่ระดับความเจือจาง 1: 50 ทำปฏิกิยากับ recombinant protein CP4EPSPS

- หลัก Chemical interaction (covalent coupling)

จากผลการทดลองเดิมพบว่าโปรตีนที่ใช้ในการทดสอบยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำทดสอบชุดตรวจ อีกทั้งเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานทำให้ตัวอย่างแอนติเจนเกิดการเสื่อมสภาพมีลักษณะเป็นตะกอนขุ่นขาว จึงผลิตแอนติเจนอีกครั้ง โดยดำเนินการเลี้ยงและชักนำให้เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 transformants ในสภาวะที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตโปรตีน NK603 ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้และดำเนินการเลี้ยงในปริมาณมากเพื่อดำเนินการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในคราวเดียวโดยใช้ Buffer E ที่ pH 5.9 เป็นตัว Elute โปรตีนจาก Colum Ni-NTA แล้วนำตัวอย่างแอนติเจน CP4EPSPS ที่ได้มาตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีน ด้วย SDS-PAGE ซึ่งมีขนาด Heavy chain ประมาณ 48kDa โดยทดสอบเทียบกับ BSA ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 -0.1 mg ดังภาพที่5 เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาของชุด strip kit และทำบริสุทธิ์ IgG โดยครั้งนี้กำหนดให้IgG ที่ได้อยู่ในสารละลายสุดท้ายที่เป็น 100mM Sodium Phosphate buffer pH 7.5เพื่อใช้เปรียบเทียบ gold conjugation จากนั้นตรวจสอบปริมาณและสภาพโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 5) ซึ่งโปรตีนที่ได้มีลักษณะเป็นแบนคู่ติดกัน ในรูปแบบ Heavy chain และ Light chain โดยทำการทดสอบยืนยันว่าทั้งสองแบนที่ได้เป็นโปรตีนชนิดเดียวกันด้วยวิธีทดสอบ Westhern bloting (ภาพที่ 6) เมื่อทำการถ่ายโปรตีนจากเจลอะคริลาไมด์ไปยังแผ่นเมมเบรน พบว่าโปรตีนทั้ง 2 แบนสามารถถ่ายเทไปยังแผ่นเมมเบรนด้วยกันได้ซึ่งหมายความว่าโปรตีนทั้ง 2 เป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน แต่อาจจะอยู่ในรูปหรือขนาดของโปรตีนที่แตกต่างกัน



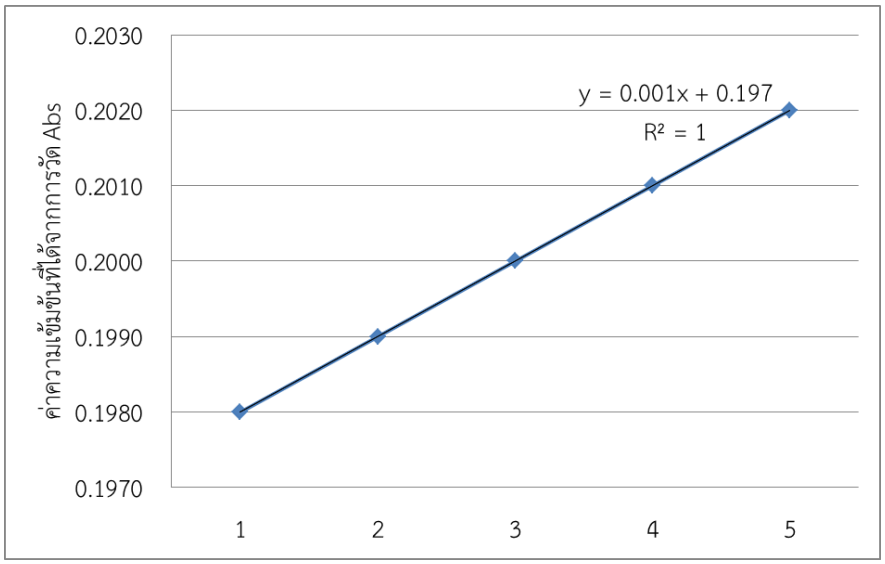
ภาพที่ 5 ทำการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีน ด้วย SDS-PAGE ซึ่งมีขนาด Heavy chain ประมาณ 48 kDaโดยทดสอบเทียบกับ BSA ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 –0.1 mg ดังภาพ



ภาพที่ 6 ทดสอบชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Westhern Blotting

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัด Bradford

นำโปรตีน BSA ซึ่งจะใช้ในการสร้าง Standard Control มาเจือจางให้เป็น 1-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับเพื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน CP4EPSPS ที่ผลิตได้ แล้วนำมาผสมกับ dry ด้วยอัตราส่วน 5:1 (โปรตีน : dry) จากนั้นนำค่า Standard curve ของ BSA ที่ได้มาสร้างกราฟสมการเส้นตรง คือ Y=0.0011+0.1968, R^2 = 0.9911 ดังรูปที่ 7 และเมื่อนำค่า Abs ที่วัดได้จากโปรตีน CP4EPSPS มาคำนวณ พบว่า ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ คือ 66.09091 และ 31.36364 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่



ภาพที่ 7 แสดง Standard curve ของ BSA ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในรูปของสมการเส้นตรง

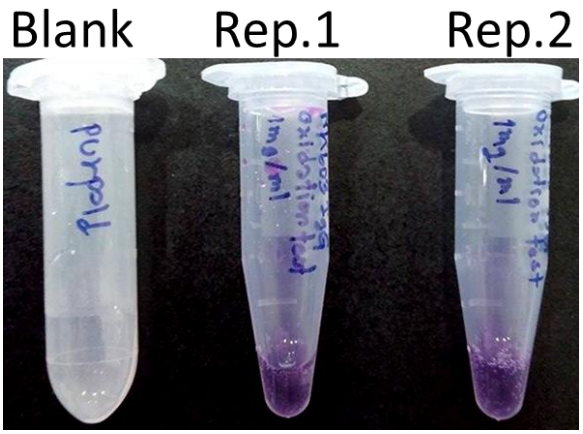
การติด linker ที่ antibodies

เนื่องจากการทดสอบครั้งที่ผ่านมาพบว่า IgG สามารถเชื่อมต่อกับ Gold ได้แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ control line และ test line แล้วพบว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาดังนั้นจึงเพิ่มความเสถียรและความสามารถในการจับกับ Gold ให้แก่ IgG ด้วยการติด linker ซึ่งเป็นการเชื่อม IgG และ อนุภาคทองด้วยโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายโพลิเมอร์ หรือ Heterofuntional Linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้บริเวณหมู่คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide) ด้วยการผสม IgG ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับ 100 mM $NaIO_4$ เขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1x PBS และเติม 46.5 mM linker solution แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 40 mM HEPES แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g นาน 10 นาที ที่ 4 องศา ด้วย 10k MWCO จากนั้นเติมด้วย 40 mM HEPES ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ml แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนถึงทำการทดสอบ

ตรวจสอบ การ Oxidation ของ IgG linker ด้วย Purpald test

ขั้นตอนสำคัญของการเชื่อมต่อแอนติบอดี้กับอนุภาคทองคือการ ปลดปล่อย aldehyde group ด้วยการออกซิเดชั่นของน้ำตาล ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้ด้วย 1xPBS และ $NaIO_4$ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของ Aldehydes

ในตัวอย่าง IgG ที่ได้รับการ Oxidation นั้นสามารถทำได้โดยการเติม 60 ไมโครลิตร purpled solution ลงใน 20 ไมโครลิตร IgG ซึ่งวิธีการนี้จะต้องทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากตัวอย่างจะกลายเป็นสีม่วง ซึ่งหมายถึงการปลดปล่อย Oxygen ออกมาจากการทดสอบพบว่า ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย purpled แสดงสีม่วงเข้มชัดเจน ในขนาดที่ตัวอย่างที่ เป็น negative ไม่มีสีเลย ดังรูปที่ 8

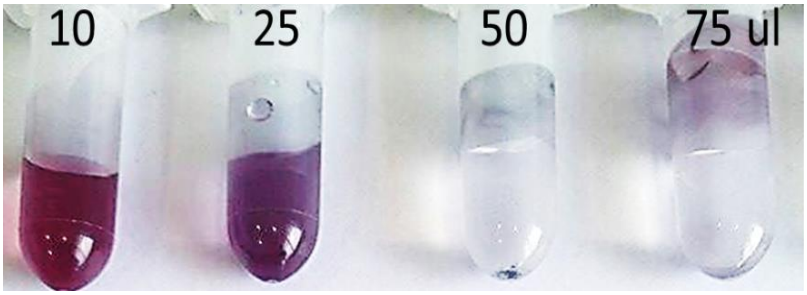


ภาพที่ 8 แสดงการปลดปล่อย Aldehyde groups ด้วยการ Oxidation ของน้ำตาล โดยแสดงปฏิกิริยาออกด้วย Purpald testing ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเมื่อมีการปลดปล่อยออกซิเจนออกมาในบรรยากาศ

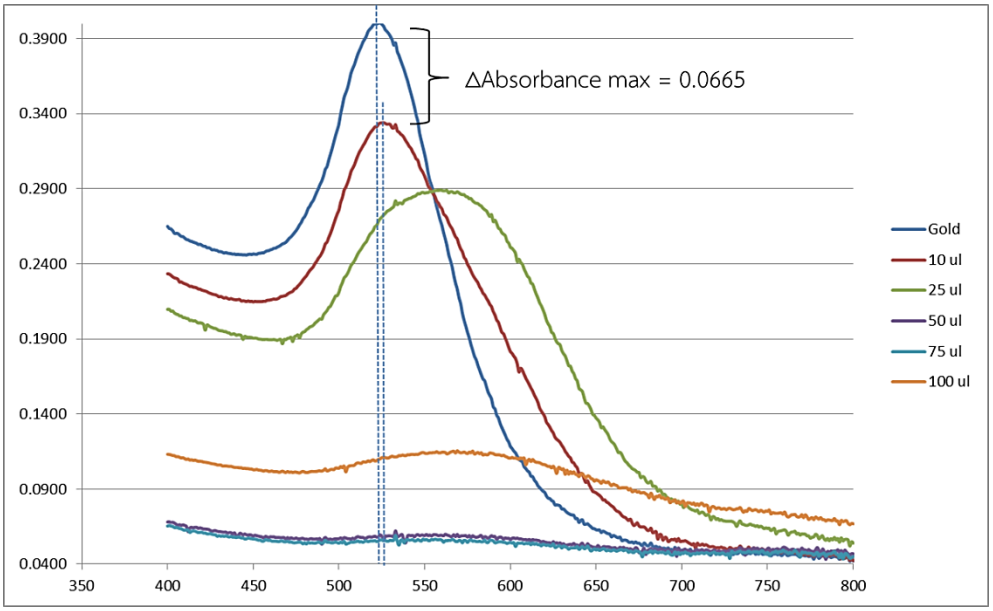
ผลการทดสอบการ conjugated ของ IgG กับ Gold เพื่อหาอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบการเชื่อมต่อของแอนติซีรั่ม กับ colloid gold ที่มีอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40nm ด้วยการทดสอบที่ ระดับความเข้มข้นของ IgG linked 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยการผสม colloid gold 1 ml กับ IgG linked ปริมาตร 10, 25, 50 และ 75 ul จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที แล้วสังเกตสีที่และการตกตะกอนของอนุภาคทองที่ได้ดังรูปภาพที่ 9 จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax และค่า Absorbancemax พบว่า อนุภาคทองคำมีค่า λmax เท่ากับ 524 nm และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.4006 และพบว่าปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ 10 µl โดยมีค่า λmax เท่ากับ 526 nm และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.3341 โดยมีค่า $\Delta\lambda$max เท่ากับ 2 nm (Sensitivity แบบหยาบ) ΔAbsorbancemax = 0.0665 ดังรูปภาพที่ 10 แต่เมื่อพิจารณารูปที่ 9 พบว่าช่วงของการที่อนุภาคยังคงทำ

ปฏิกิริยาระหว่าง อนุภาคทองและ IgG แล้วยังไม่ตกตะกอนอยู่ในช่วง IgG 10-25 ul ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติม

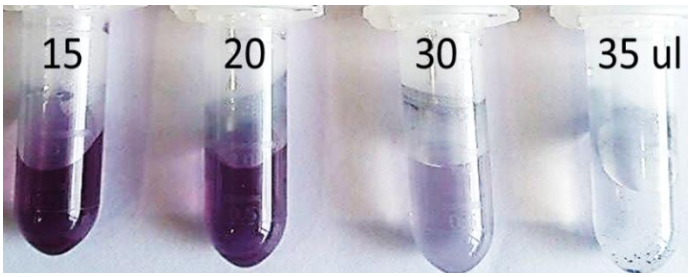


ภาพที่ 9 แสดงภาพปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองคำ และ IgG ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 75ul สีชมพูอ่อนแสดงให้เห็นว่าเกิดการจับตัวกันโดย Electrostatic force ระหว่าง IgG และ อนุภาคทองคำ สีที่ใกล้เคียงกับ Collidal gold solution มากที่สุดแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดี

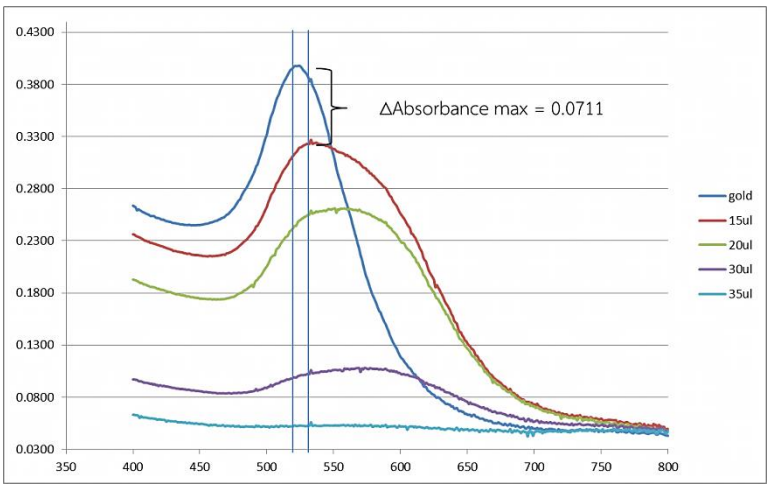


ภาพที่ 10 แสดงการวัดค่า Absorbance ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 nm ในสารละลาย Colloidal gold-IgG เปรียบเทียบกับ สารละลาย Colloidal gold ที่ปริมาณ IgG 10,25,50 และ 75 ul

เมื่อทำการทดสอบที่ ระดับความเข้มข้นของ IgG linked 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยการผสม colloid gold 1 ml กับ IgG linked ปริมาตร 15, 20, 30 และ 35 ul จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที แล้วสังเกตสีที่และการตกตะกอนของอนุภาคทองที่ได้ดังรูปภาพที่ 11 จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax และค่า Absorbancemax พบว่า อนุภาคทองคำมีค่า λmax เท่ากับ 524 nm และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.398 และพบว่าปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ 15 µl โดยมีค่า λmax เท่ากับ 533 nm และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.3269 โดยมีค่า $\Delta\lambda$max เท่ากับ 9 nm (Sensitivity แบบหยาบ) ΔAbsorbancemax = 0.0711 ดังรูปภาพที่ 12 จึงสรุปได้ว่า ช่วงค่าที่อนุภาคทองคำจับกับ IgG ได้ดีที่สุดคือช่วงที่ IgG 10-15 ul ต่อปริมาณ Gold 1 ml



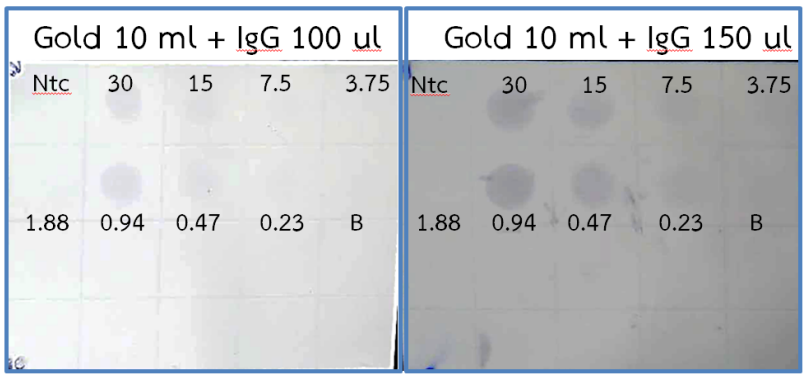
ภาพที่ 11 แสดงภาพปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองคำ และ IgG ที่ความเข้มข้น 15, 20, 30 และ 35ul สีชมพูอ่อนแสดงให้เห็นว่าเกิดการจับตัวกันโดย Electrostatic force ระหว่าง IgG และ อนุภาคทองคำ สีที่ใกล้เคียงกับ Collidal gold solution มากที่สุดแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดี



ภาพที่ 12 แสดงการวัดค่า Absorbance ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 nm ในสารละลาย Colloidal gold-IgG เปรียบเทียบกับ สารละลาย Colloidal gold ที่ปริมาณ IgG 15, 20, 30 และ 35ul

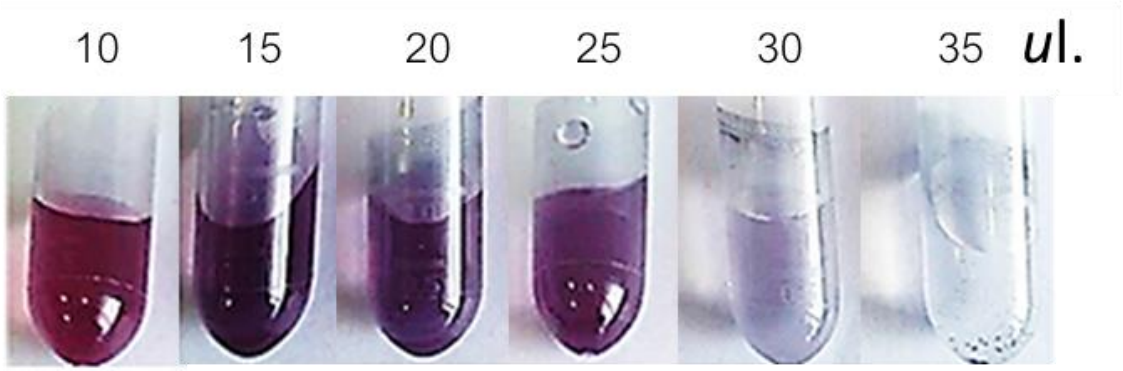
การทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของ อนุภาคทองคำกับ IgG-linked ด้วย Dot blot

เตรียมอนุภาคทอง ปริมาตร 10 ml กับ IgG-linked 100 และ 150 µl แล้วปั่นตกตะกอนทองให้เหลือปริมาตร 1 ml ผสมกับ 2% skim milk 4 ml แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 1xTBS buffer 5 นาที หยดโปรตีนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ช่องละ 15 µl โดยมีเข้มข้น 1 mg/ml เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้น ทำการเจือจางโปรตีนกับ 1xPBA ในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงแช่แผ่นเมมเบรนในสารละลาย blocking solution เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม แล้วจึงแช่ gold conjugated จนเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 13 พบว่าการ conjugated Gold กับ IgG 150 ul ให้ผลการทดสอบชัดเจนที่สุดโดยสามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้ต่ำสุดที่ 7.5 mg/ml

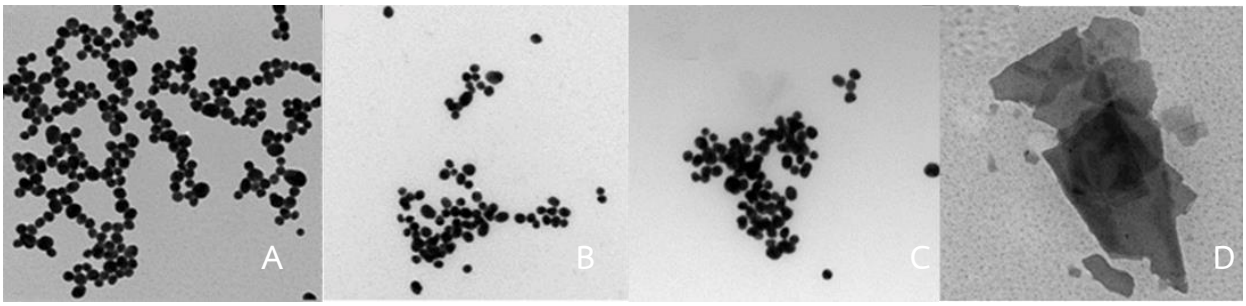


ภาพที่ 13 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Gold conjugated กับ โปรตีน NK603 (ภาพซ้าย) Gold 10ml conjugate กับแอนติซีรั่ม 100 ul (ภาพขวา) Gold 10 ml conjugate กับแอนติซีรั่ม 150 ul

ทดสอบการเชื่อมต่อของแอนติซีรั่ม กับ colloid gold ที่มีอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40nm ด้วยการทดสอบที่ ระดับความเข้มข้นของ IgG linked 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ปริมาตร IgG linked ต่างๆกัน พบว่าช่วงของการที่อนุภาคยังคงทำปฏิกิริยาระหว่าง อนุภาคทองและ IgG linked แล้วยังไม่ตกตะกอนอยู่ในช่วง IgG linked 10-25 ไมโคลิตร โดยอนุภาคทองคำมีค่า λmax เท่ากับ 524 นาโนเมตร และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.398 และพบว่าปริมาตร IgG linked ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อทำการเชื่อมต่อคือ 15 ไมโครลิตร โดยมีค่า λmax เท่ากับ 533 นาโนเมตร และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0. 3269 โดยมีค่า $\Delta\lambda$max เท่ากับ 9 นาโนเมตร ΔAbsorbancemax = 0.0711 จึงสรุปได้ว่า ช่วงค่าที่อนุภาคทองคำจับกับ IgG linked ได้ดีที่สุดคือช่วงที่ IgG linked 10-15 ul ต่อปริมาณ Gold 1 มิลลิลิตร (ภาพที่ 14) จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ทำการเชื่อมต่ออนุภาคทองไปทดสอบด้วยการส่องกล้อง แบบ Transmission electron microscopy ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมต่อระหว่าง IgG กับ Colloidal gold ที่ระดับ 10, 15, 20, 25, 30 และ 35

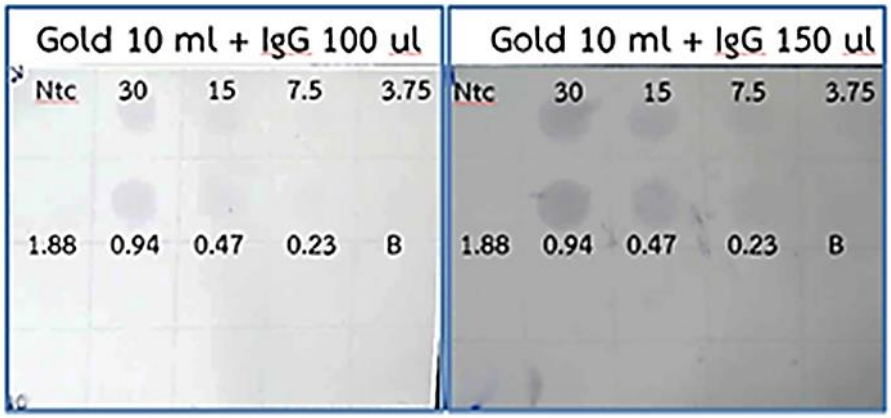


ภาพที่ 15 แสดงการจับกันของอนุภาคทองและแอนติบอดีโดยใช้กล้อง Transmission electron micrographs (TEM) ที่อนุภาคทองมีขนาด 40 nm รูปที่1 ตัวอย่างของ Colloidal gold (bio science) รูปที่2 un-conjugated gold รูปที่ 3 gold conjugated กับ NK603 IgG และ รูปที่4 gold conjugated กับ NK603 IgG ในสารละลาย Diluent.

จากการด้วยกล้อง transmission electron microscopy พบว่าตัวอย่างดังภาพ 15B-C มีการจับกันของอนุภาคทองกับ IgG ในรูปแบบกลุ่มก้อน เมื่อเปรีบบเทียบกับตัวอย่างในภาพ 15A ซึ่งเป็นตัวอย่างอนุภาคทองเพียงอย่างเดียวพบว่าอนุภาคของ 15B-C ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับอนุภาคทองตั้งต้น ในขณะที่ 15D ซึ่งเป็นตัวอย่างของสารละลายที่ไม่จับกับอนุภาคทองจะพบว่าไม่มีลักษณะก้อนกลมของอนุภาคทองอยู่

การทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของ อนุภาคทองคำกับ IgG-linked ด้วย Dot blot

เตรียมอนุภาคทอง ปริมาตร 10 ml กับ IgG-linked 100 และ 150 µl แล้วปั่นตกตะกอนทองให้เหลือปริมาตร 1 ml ผสมกับ 2% skim milk 4 ml แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 1xTBS buffer 5 นาที หยดโปรตีนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ช่องละ 15 µl โดยมีเข้มข้น 1 mg/ml เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้น ทำการเจือจางโปรตีนกับ 1xPBA ในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงแช่แผ่นเมมเบรนในสารละลาย blocking solution เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอม แล้วจึงแช่ gold conjugated จนเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 16 พบว่าการ conjugated Gold กับ IgG 150 ul ให้ผลการทดสอบชัดเจนที่สุดโดยสามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้ต่ำสุดที่ 7.5 mg/ml



ภาพที่ 16 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Gold conjugated กับ โปรตีน NK603 ที่ระดับ 30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47, 0.23 mg/ml (ภาพซ้าย) Gold 10ml conjugate กับแอนติซีรั่ม 100 ul (ภาพขวา) Gold 10 ml conjugate กับแอนติซีรั่ม 150 ul

ทดสอบหา Extraction buffer เพื่อใช้ในการทดสอบตัวอย่าง

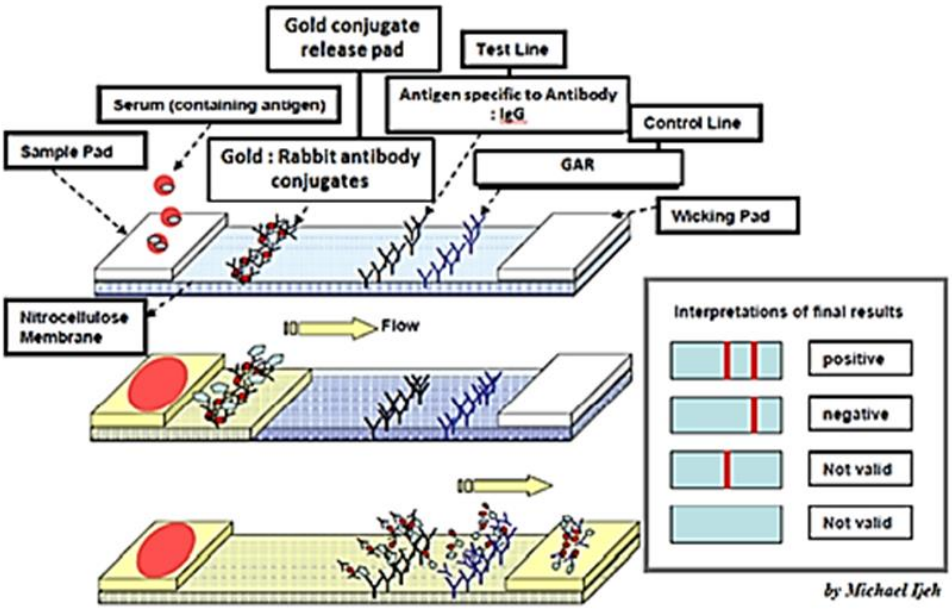
เมื่อได้ค่าของอัตราส่วนที่แน่นอนระหว่าง Colloidal gold และ IgG แล้ว ด้วยการทดสอบ พ่นด้วย Bio dot ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 12 ul/cm จึงทดสอบ Extraction buffer กับสารละลาย 8 ชนิด คือ 1xPBS pH7.4, 100mM Na2HPO4, 5M Guanidinuim, SEBA buffer, 2% CTAB, Doa extraction buffer, Buffer B pH8.0 และ Lysis buffer ดังภาพที่ 17 ผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างที่ทดสอบด้วยสารละลาย 1xPBS pH7.4, 100mM Na2HPO4, 2% CTAB และ Doa extraction ให้ผลการทดสอบเป็น Positive แต่เนื่องจาก 2% CTAB ต้องใช้เวลานานกว่า 10 นาที จึงจะเห็นผลจึงคัดเลือกเพียง สารละลาย 1xPBS pH7.4,

100mM Na2HPO4 และ Doa extraction มาทำการทดสอบต่อ พบว่าสารละลาย 1xPBS pH7.4 ให้ผลการทดสอบเห็นชัดได้ไวที่สุดแต่กลับให้ผล false positive ส่วนสารละลาย Doa extraction ให้ผลการทดสอบ false negative

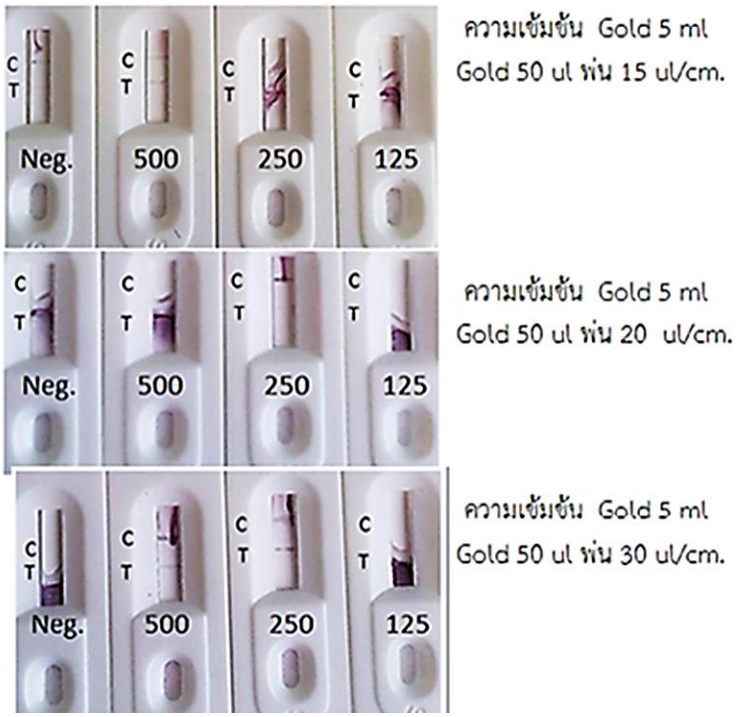
ภาพที่ 17 ผลการทดสอบเปรียบเทียบ สารละลายทั้ง 8 ชนิด รูปที่1-8 คือ 1xPBS pH7.4, 100mM Na2HPO4, 5M Guanidinuim, SEBA buffer, 2% CTAB, Doa extraction buffer, Buffer B pH8.0 และ Lysis buffer

ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

ทำการผลิตชุดตรวจสอบ การประกอบชุดตรวจสอบ Strip test ด้วยการทดลองพ่น Gold conjugate ลงบนแผ่น Gold conjugate release pad โดยทำการ เตรียม gold pad ด้วยการแช่สารละลาย Pretreatment (Conjugate pad pretreatment buffer, PBS (0.01 mol/L, pH 8.0), 10% sucrose, 0.05% Tween-20) และ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทองที่อัตราส่วนระหว่าง Gold:IgG linked เป็น 1ml:10ul และ 1ml:15 ul แล้วนำมาพ่นบน Gold conjugate release pad ที่ได้รับการ Pretreatment แล้ว ทดสอบความหนาแน่ของการพ่นด้วย ระยะ 15, 20 และ 30ul/cm. จากนั้นนำไปอบ ให้แห้ง แล้วเตรียมเมมเบรนสำหรับทดสอบด้วยการขีดเส้น Test line ด้วย IgG NK603 ความเข้มข้น 1 mg/ml และ เส้น Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปแช่ใน Blocking buffer (PBS (0.001 mol/L, pH 7.4), 1% concentration BSA) 30 นาที ที่ 37°C และตากให้แห้งที่ 37°C ทำการประกอบชุดทดสอบด้วยการติด Gold Conjugate release pad ลงไปแล้วตามด้วยแผ่น Sample pad เพื่อใช้สำหรับดูดซับตัวโปรตีน NK603 บนแผ่น Backing card จากนั้นวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่มีเส้น Control line และ Test line แล้วลงบน Backing card แล้วจึงวางแผ่นซับ Wick pad ไว้ด้านบนสุด วิธีการประกอบดังภาพที่ 18 เมื่อประกอบชุดตรวจสอบเสร็จแล้วให้นำไปตัดด้วยเครื่อง Biodot เป็นชิ้นขนาดกว้าง 0.35 cm แล้วทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของโปรตีนที่ระดับ 0.5 mg, 0.25 mg และ0.125 mg พร้อมสังเกตดูลักษณะการไหลของตัวอย่างทดสอบและผลทดสอบดังภาพที่19 และ 20 เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 19 พบว่า การทดสอบ negative control ที่ control line เห็นขีดชัดเจนที่ระดับความเข้มข้นของ Gold 1 ml:10 ul ที่ความหนาแน่นของการพ่น Gold conjugated 15 ul/cm และเมื่อทำการทดสอบด้วยโปรตีน พบว่าที่ระดับโปรตีน 0.5mg มีเส้น control line และเส้น Test line ขึ้นทั้งสองเส้นคือเป็น Positive results แต่ที่ระดับโปรตีน 0.25 และ 0.125 mg มีเพียงเส้น Test line ขึ้นเพียงอย่างเดียวเนื่องจากลักษณะการไหลของตัวอย่างไม่ค่อยดี อาจเนื่องจาก Gold มีความหนาแน่นมากไป หรืออาจเกิดจาก Extraction buffer ไม่เหมาะสม ที่ระดับการพ่น Gold conjugated 20 ul/cm พบว่ามีเพียงระดับโปรตีนเข้มข้น 0.25mg. ที่ตัวอย่างสามารถไหลไปถึง Wick pad ได้ ทำให้ปรากฏขีดสีม่วงเข้มที่บริเวณ Control line แต่ไม่เกิดขีดสีม่วงบริเวณ Test line และเมื่อพิจารณาที่ ระดับการพ่น Gold conjugated 30ul/Cm พบว่าสามารถเกิดแถบสีม่วงเข้มได้ที่ระดับโปรตีนความเข้มข้น 0.5 และ 0.25 mg แต่ตัวอย่างไม่สามารถไหลในตัวอย่างที่เป็น Negative control และระดับความเข้มข้นที่ 0.125mg เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 18 ที่อัตราส่วน Gold 1 ml: IgG 15ul พบว่าที่ระดับความหนาแน่นของการพ่น Gold conjugated ที่ 20ul/cm ให้ผลชัดเจนที่สุด คือสามารถอ่านผลเป็น negative ที่ตัวอย่าง Negative control และตัวอย่างที่ระดับโปรตีนทั้ง 3 ระดับ ปรากฏแถบสีม่วงทั้ง Control line และ test line

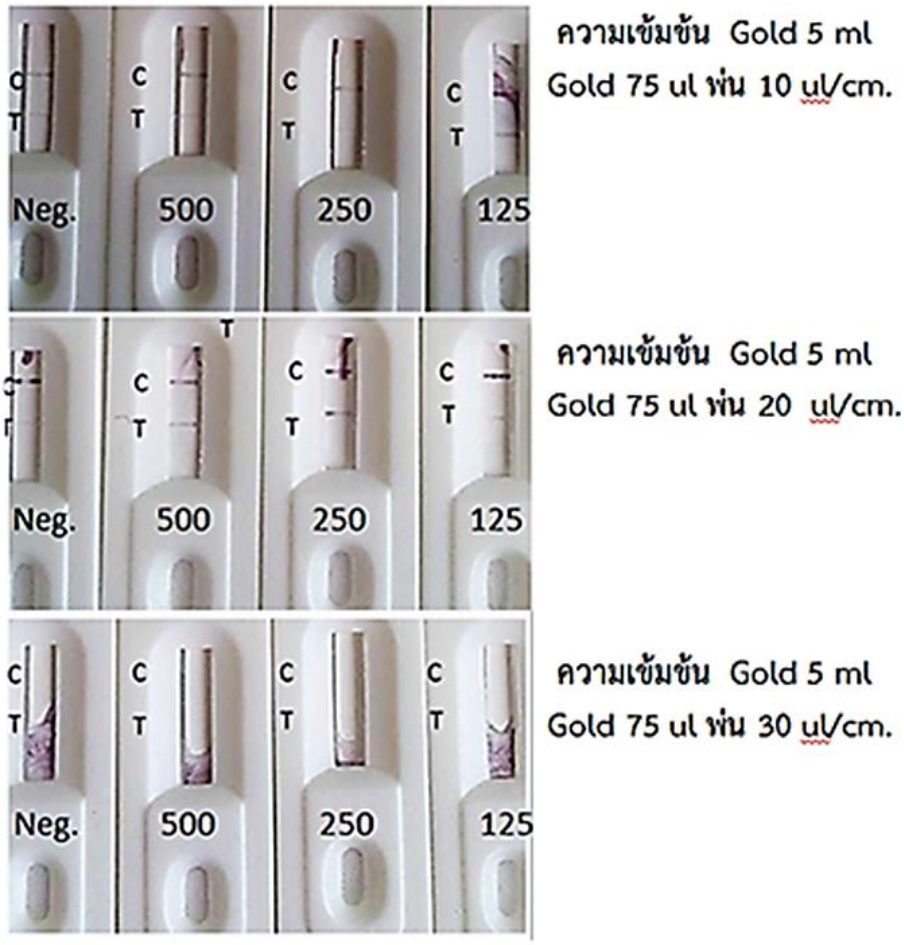


ภาพที่ 18 รูปแบบและการทำงานของชุดตรวจ GLIFT



ภาพที่ 19 แสดงผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาของ Strip test ด้วยการทดสอบการใช้ปริมาณ Gold : IgG ที่ระดับ 1ml : 10ul, ทดสอบ การพ่น Gold conjugated ที่ระดับ 15, 20 และ 30 ul/cm. (บน, กลาง, ล่าง

ตามลำดับ) และ ทดสอบปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบที่ระดับ 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml C คือ เส้น Control line ใช้สำหรับอ่านค่าความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ และ T คือ Test line ใช้สำหรับอ่านค่าการตรวจจับได้ของโปรตีน NK603 ทดสอบด้วย Doa extraction



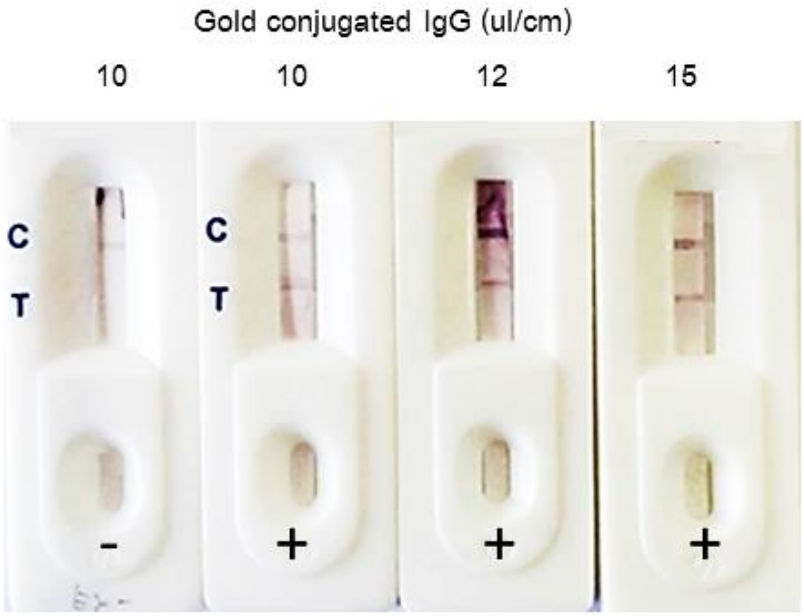
ภาพที่ 20 แสดงผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาของ Strip test ด้วยการทดสอบการใช้ปริมาณ Gold : IgG ที่ระดับ 1ml : 15 ul, ทดสอบ การพ่น Gold conjugated ที่ระดับ 10, 20 และ 30 ul/cm. (บน, กลาง, ล่าง ตามลำดับ) และ ทดสอบปริมาณโปรตีนที่ใช้ทดสอบที่ระดับ 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml C คือ เส้น Control line ใช้สำหรับอ่านค่าความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ และ T คือ Test line ใช้สำหรับอ่านค่าการตรวจจับได้ของโปรตีน NK603 ทดสอบด้วย Doa extraction

เนื่องจากปัญหาการไหลของตัวอย่างไม่ดีเท่าที่ควรซึ่งอาจเกิดการจากหนืดของตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคสและทรีอาโลสผสมอยู่มากเกินไปในขั้นตอนการเตรียม Backing pad และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จึงทดสอบเปลี่ยน Backing pad มาใช้ AE99 ซึ่งลดขั้นตอนการเตรียม ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และการ Pretreat Gold conjugate pad ด้วยน้ำตาลกลูโคส จากภาพที่ 20 พบว่าตัวอย่างสามารถไหลได้ดีและเกิดแถบสีม่วงที่เส้น Control ได้ชัดเจน แต่ยังคงมีปัญหากับเส้น Test line ซึ่งเกิดจากปริมาณความเข้มข้นยังไม่เหมาะสม

ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

เมื่อได้ค่าของอัตราส่วนที่แน่นอนระหว่าง Colloidal gold และ IgG แล้ว ทำการทดสอบ พ่นด้วย Bio dot ที่ระดับความเข้มข้น 12-15 ul/cm โดยทดสอบ Extraction buffer กับสารละลาย 8 ชนิดคือ 1xPBS pH7.4, 100mM Na_2HPO4, 5M Guanidinuim, SEBA buffer, 2% CTAB, Doa extraction buffer, Buffer B pH8.0 และ Lysis buffer พบว่าตัวอย่างที่ทดสอบด้วยสารละลาย 1xPBS pH7.4, 100mM Na2HPO4, 2% CTAB และ Doa extraction ให้ผลการทดสอบเป็น Positive แต่เนื่องจาก 2% CTAB ต้องใช้เวลานานกว่า 10 นาที จึงจะเห็นผลจึงคัดเลือกเพียง สารละลาย 1xPBS pH7.4, 100mM Na2HPO4 และ Doa extraction มาทำการทดสอบต่อ พบว่าสารละลาย 1xPBS pH7.4 ให้ผลการทดสอบเห็นชัดได้ไวที่สุดแต่กลับให้ผล false positive ในตัวอย่าง blank (ภาพที่ 21) ส่วนสารละลาย Doa extraction ให้ผลการทดสอบ false negative ในตัวอย่างทดสอบ โปรตีน NK603 ดังนั้นสารละลายที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดโดยไม่ก่อให้เกิด false positive และ false negative และสามารถตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในการทดสอบนี้คือ 100mM Na_2HPO4 ทั้งนี้เมื่อดำเนินการทดสอบด้วยการพ่น Gold conjugated IgG ลงบนแผ่น Gold conjugate release pad ด้วยอัตรา 12 – 15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร โดยเมื่อทำการทดสอบเจือจางตัวอย่างโปรตีนที่นำมาใช้ทดสอบชุด GLIFL พบว่าค่าต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้คือ 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 22.)

ภาพที่ 21 ทดสอบ Backing Pad AE 99 กับ Gold 1ml: IgG linker 15 ul ที่ความหนาแน่นของ Gold conjugated 20ul/cm ด้วยสารละลาย 1xPBS



ภาพที่ 22 แสดงชุดตรวจสอบ Gold labeled IgG flow (GLIF) ด้วยการทำ serial dilutions ระหว่าง Gold conjugated IgG จาก NK603 IgG ที่ผ่านการติด linker แล้ว. ผลการทดสอบพบว่า เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าชุดตรวจสอบสามารถแสดงผลได้ภาพในระยะเวลา 5-10 นาที โดยที่ตัวอย่าง blank ให้ผลเป็น ลบ และตัวอย่างที่มีโปรตีน NK603 อยู่ให้ผลเป็นบวก

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในข้าวโพด NK603 ซึ่งเป็นข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช สามารถทำการเพิ่มปริมาณและทำบริสุทธิ์แอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้เพื่อทำชุดตรวจสอบ โดยเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค DIBA พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงระหว่าง แอนติบอดีและแอนติเจนที่ผลิตได้ Gold labeled IgG flow Test ได้ ด้วยการทำเส้น Test line จาก NK603 IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียม Gold conjugated release pad ด้วยปริมาณความเข้มข้นของ IgG linked 10-15 ไมโครลิตร ต่ออนุภาคทองคำขนาด 40 นาโมเมตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่อทำการพ่นบน Gold conjugated release pad ในอัตรา 12-15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จะให้ผลการทดสอบชัดเจนภายในระยะเวลา 5-10 นาทีเมื่อทำปฏิกิริยาโปรตีน NK603 ด้วยสารละลาย Na_2HPO4 ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 0.3 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยไม่ก่อให้เกิด false positive เมื่อทดสอบกับ Blank sample ซึ่งจะต้องทำการพัฒนาในส่วนของระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป เพื่อให้สามารถเก็บได้นานขึ้นและนำไปใช้เพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการผลิตชุดตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม NK603 ในเชิงพานิชย์ และการผลิต Recombonaint Protein, การ Pure Protein ด้วยหลักการ Affinity Chromatography โดยใช้ specific (affinity) elution

11.เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, สุรภี กีรติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. **GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง**. วารสารวิชาการเกษตร 24 (2) : 168-177.

สุรภี กีรติยะอังกูร, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. **ชุดตรวจสอบโรคไวรัสกล้วยไม้ในกล้วยไม้**. วารสารโรคพืช 18 (1-2) : 1-14.

Jae H.K., Dabing Z., and Hae Y.K. 2014. Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems. **Food Control**. 35: 345-353.

James, C. 2013. Global status of commercialized biotech/GM crops 2012. **ISAAA. Brief No**. 44.

Jiang T., Liang Z.,Ren W.W., Chen J., Zhi X.Y., Qi G.Y., Liu X.T., and Cai X.P., 2011. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatogarpic strip test for detection of FMDV serotype A**. Virologica Sinica**. Volume 26: 30-39.

Kuang H., Liu L., Luo L., Suryoprabowo S., Peng J., and Xu C. 2014. Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Ciprofloxacin in Milk Samples. **Sensors**.*14*:16785-16798.

Michael Ijeh. 2011. Covalent gold nanoparticle—antibody conjugates for sensitivity improvement in LFIA A dissertation submitted to the Mathematics, **Informatics and Natural Sciences Faculty of Hamburg University**

Omidfar K., Kia S., and Larijani B. 2011. Development of a Colloidal Gold-based Immunochromatographic Test Strip for Screening of Microalbuminuria. **HYBRIDOMA** 30: Number 2, 2011.

Pratixa P.J., Soon J.Y., William G.H., Stanislav E., and Konstantin V.S. 2013. Conjugation of antibodies to gold nanorods through Fc portion:Synthesis and molecular specific imanging. **Biocojuq Chem**. Jun19;24(6):878-888.

Seong H.L., Bu Y.Y., and Su J.K., 2009. Event-specific analytical methods for biotech maize MIR 604 and DAS-59122-7. **Journal Science Food Agricultural**, 89: 2616–2624.

http://www.isaaa.org The International Service for the Acquistion of Agri biotech Application ISAAA