รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีน Cry9C (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of CRY9C Protein Rapid Detection via GICA for StarLink BT Corn

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

: นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CRY9C แบบ Strip โดยเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CRY9C จากยีน cry9c ผู้วิจัยสกัดโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากแบคทีเรียEscherichia coliเพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรั่ม นำแอนติซีรั่มมาสกัดแอนติบอดี้ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน(IgG) แล้วเชื่อมกับอนุภาคทองคำขนาด 40นาโนเมตร โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส เป็นวัสดุนำผ่านเปรียบเทียบการเชื่อมต่อ electrostatic force และ nearly covalent พบว่าการเชื่อม IgGกับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ทำให้พันธะของอนุภาคทองคำและIgGมีความเสถียรกว่าการเชื่อมแบบ electrostatic forceเมื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีน พบว่าการพ่นอนุภาคทองคำ-IgG ที่อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตรให้ผลดีที่สุดโดยใช้ Goatanti-rabitIgGความเข้มข้น 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น control line และใช้ Anti-CRY9C IgGความเข้มข้น 2.3มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้นTest line ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนชัดเจนที่สุดทั้งนี้จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบโปรตีน CRY9C ได้คือ10นาโนกรัม/ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนสามารถมองเห็นได้ชัดเจนประมาณ 20 นาทีโดยสามารถเก็บชุดตรวจสอบได้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

6. คำนำ

การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมในเชิงคุณภาพและปริมาณ วิธีที่นิยมและเป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คือ PCRและReal-time PCR (Berdal and Holst-Jensen., 2001) ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON810, Bt176, Bt11, GA21 และ MON863 โดยได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ Real-time PCR นอกจากนี้กำลังดำเนินการวิจัยพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63, LL62 และ LL601 อย่างไรก็ดีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลานานและไม่สะดวก(Mettler M. et al.,2005) ต่อการนำไปใช้ในพื้นที่จริงในกรณีที่ต้องมีการเก็บตัวอย่าง ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อใช้ตรวจโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช ซึ่งช่วยให้การตรวจวิเคราะห์มีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

อนึ่งประเทศไทยมีนโยบายให้การสนับสนุนการพัฒนาศักยภาพการวิจัยและพัฒนาพันธุวิศวกรรมให้มีความเข้มแข็งนำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการเพาะปลูก ยกเว้นเพื่อการศึกษาทดลองเท่านั้น โดยอาศัยกลไกการควบคุมของพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551) ซึ่งกำหนดให้มีพืชดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 89 รายการเป็นสิ่งต้องห้ามนำเข้า ยกเว้นข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นอาหารหรือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะข้าวโพด StarLinkซึ่งทาง องค์การอาหารและยาไม่อนุญาตให้นำเข้าโดยเด็ดขาด โดยได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 215 พ.ศ.2544 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย โดยให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพันธุกรรมครายไนน์ซี (Cry9C DNA Sequence) หรือโปรตีนที่สร้างมาจากสารพันธุกรรมนี้ ในข้าวโพดและถั่วเหลือง เนื่องด้วยโปรตีน Cry9c มีลักษณะโมเลกุลที่คล้ายกับโปรตีนที่สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ในมนุษย์ (Investigation of Human Health Effects Associated with Potential Exposure to Genetically Modified Corn, 2001)

ในการตรวจสอบโปรตีนชนิดนี้ นิยมใช้เทคนิค ELISA เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น โดยทางสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องซื้อชุดตรวจสอบ ELISA (Rica d. l. et al., 2012) จากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาประมาณชุดละ 30,000 บาท ชุดตรวจสอบ 1 ชุด สามารถตรวจสอบได้ 2–10ตัวอย่าง ประเทศไทยต้องสูญเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในการซื้อชุดตรวจสอบนี้ การทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ใช้ได้เองภายในประเทศ ซึ่งจะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศและลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเป็น immune strip ให้มีความสะดวกและรวดเร็วในการใช้งานกับพื้นที่ในแปลงปลูกหรือด่านตรวจพืชได้อีกประการหนึ่งด้วย

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Aktapure
2. เครื่องแยกขนาดโปรตีนโดย Acrylamide
3. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Gel-electrophoresis
4. เครื่องพ่นอนุภาคทองคำ Biodot

วิธีการ

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CRY9C

นำลำดับเบสของยีน cry9Cของข้าวโพดจากฐานข้อมูล NCBI Protein Accession No. Q45733.1(Lambert B. et al., 1996)ขนาด 1,100 bp ไปสังเคราะห์โดยGenScript USA ในพลาสมิดpUC57 โคลนยีน Cry9C เข้าสู่เวคเตอร์ pET 200/D-TOPO®และถ่ายยีนเข้าสู่ E.coli BL21 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรีย BL21 ที่ได้รับ Recombinant vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว2xYT 100 ml กับ Kanamycin 50 mg/l เพื่อใช้เป็น starter 1 คืน เตรียมอาหารเหลว LB กับน้ำตาล Glucose (1%final concentration)Kanamycin 50 mg/l ปริมาตร 1 – 2 ลิตร จากนั้นนำ starter ที่ได้เติมลงในอาหารที่เตรียมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20% เลี้ยงบ่มที่ 37oC ที่ 250 rpm นาน 1 ชม. หรือ จนกว่าจะได้ OD600 ประมาณ 0.5จากนั้นเติม IPTG 0.5 mMและเลี้ยงต่ออีก 3 ชม. เมื่อครบกำหนดนำเซลล์ทั้งหมดไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ปั่นตกตะกอนทั้งหมดไปดำเนินการทำ Freeze toll โดยแช่ที่ -80oC 1 ชม. จากนั้นนำออกมาละลายและเติม Lysozyme ประมาณ 2 กรัม เขย่า 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 ชม.และ นำไปแช่ที่ -80oC อีก 1 ชม. จากนั้นนำมา ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm10 นาที 4oCแล้วนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Colum Ni-NTA

การผลิตแอนติซีรั่มจากกระต่าย

เจาะเลือดกระต่ายเก็บเป็น normal Serum เพื่อใช้เป็น negative control การฉีดครั้งแรกนำโปรตีน Cry9c ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมา Dilute กับน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 mg/ml ปริมาตร1 ml จากนั้นนำไปผสมกับ adjuvant ชนิด Complete อัตราส่วน 1:1 จนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันสีขุ่นขาว และฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอ

กระต่ายประมาณสามครั้งจนหมด ดำเนินการทดลองฉีดติดต่อกันทั้งหมด 3 สัปดาห์โดยเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ฉีดแต่ละครั้งครั้งละ 0.5 mg/ml และเปลี่ยน adjuvant เป็นชนิด incomplete เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ทิ้งระยะไว้ 1 สัปดาห์แล้วจึงเริ่มเจาะเพื่อเก็บแอนติซีรั่ม ทั้งหมด 8 ครั้ง ระยะห่าง 1 สัปดาห์/ครั้ง ในการเจาะแต่ละครั้งจะดำเนินการใช้เข็มฉีดยาเจาะที่เส้นเลือดบริเวณใบหูของกระต่ายและเก็บเลือดประมาณ 20 ml/ครั้ง เลือดที่ได้ทิ้งไว้จน Clot แข็งแล้วจึงดูดเก็บ Serum ใสที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือด นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนใสซึ่งเป็น Antiserum เก็บไว้ที่ -20oC

การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพIgG

นำแอนตีซีรั่มที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วย (NH4)2SO4 จากนั้นนำไปสกัด IgG ด้วยคอลัมน์ protein A และ ผ่านเครื่อง AKTA pure โดยผสมแอนติซีรั่มที่ตกตะกอนแล้วกับbinding buffer sodium phosphate ความเข้มข้น 20mM ที่pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 และนำไปผ่านคอลัมน์โปรตีน Aใช้ Elution bufferกรดcitric ความเข้มข้น0.1 M ที่ pH3 ชะตัวอย่างออกมาและเติมNeutralizing buffer Tris-HCL ความเข้มข้น 1 M ที่ pH 9.0 ในหลอดเก็บตัวอย่างเพื่อปรับสภาพ pH ของ IgGที่ได้จากนั้นนำIgGที่ได้ไปดำเนินการทำDesalting เพื่อนำเกลือออกโดยคอลัมน์Desalting เพื่อเปลี่ยนสารละลาย วัด AbsorbanceOD 280 เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นโดยตรวจสอบคุณภาพของ IgG ที่ได้ด้วย SDS-PAGEและทดสอบปฏิกิริยาของ IgG ด้วยวิธี NCM ELISAหรือ Dot blot โดยหยดโปรตีน Cry9C ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ช่องละ 5 µl โดยใช้ความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น จากนั้นทดสอบโดยนำ IgG ที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml และทดสอบที่อัตราส่วน 1:2,000 และใช้ BSA กับ blank bufferเป็น negative control

การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วย Electrastatic force

นำ IgG ที่สกัดได้มาผสมกับสารละลายอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 nm (Kestral) ที่ pH 7.4 โดยใช้ IgG ที่ปริมาตรแตกต่างกัน 500 µl จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax ซึ่งเป็นตัวบอกความยาวคลื่นแสง ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ในการประเมินคุณภาพของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำ

การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วยพันธะ neary-covalent

ผสม IgG กับ Sodium periodate (NaIO4) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นกับหมู่ cis-diols และเปลี่ยนหมู่ aldehyde เป็น active aldehydes (–CHO) ทั้งนี้หมู่ (–CHO) จะสามารถทำปฏิกิริยา Coupling กับ

Linker (Kumaret al., 2008) ได้ซึ่งในที่นี้ใช้โมเลกุล dithiol aromatic PEG6-CONHNH2 เป็นตัวเชื่อม (Linker) บนIgG นำ IgG-linker ไปผสมกับอนุภาคทอง เพื่อให้เกิดพันธะกึ่งโควาเลนต์ หรือ Nearly-covalent ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีและอนุภาคทองคำหลุดออกจากกันได้ยาก และ Blocking บริเวณที่ไม่มี Linker จับด้วยโปรตีน BSA 10% เพื่อป้องกัน Non-specific binding จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งเป็นตัวบอกความยาวคลื่นแสง ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เพื่อประเมินคุณภาพของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำ(Michael I.,2011)

การเตรียมและการประกอบ Immunostrip

ดำเนินการเตรียมแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad)โดยแช่ในสารละลาย Pretreatment (Conjugate pad pretreatmentbuffer, PBS (0.01 mol/L, pH 8.0), 10% sucrose, 0.05% Tween-20) และ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทอง 10 ml แล้วนำไปผสมกับ IgG-linker500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีจากนั้นจึงเติม BSA 10% และนำไปปั่นตกตะกอนและนำตะกอนอนุภาคทองที่เตรียมไว้มาละลายในสารละลายทอง (0.01 mol/L PBS; pH 8.0, 1% concentration BSA, 0.05% PEG) ให้ได้ปริมาตร 600µl ดำเนินการเตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยขีดเส้น Test line ด้วย IgG Cry9c ความเข้มข้น 2.5 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 330 µg/ml แล้วนำไปแช่ใน Blocking buffer (PBS (0.001 mol/L, pH 7.4), 1% concentration BSA) 30 นาที ที่ 37oC และตากให้แห้งที่ 37oC

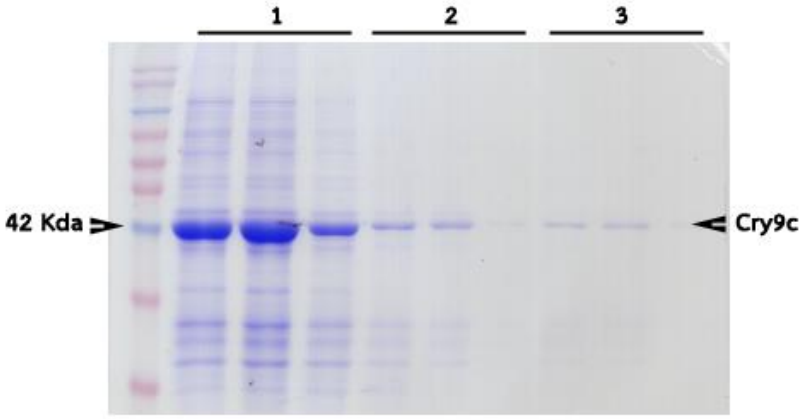
เมื่อเตรียมอุปกรณ์ทุกอย่างแล้วจึงนำสารละลายทองคำ-แอนติบอดี้ ที่เตรียมไว้มาเข้าเครื่อง Biodot เพื่อพ่นบนแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ที่ 15 µl/cmจากนั้นนำแผ่นทองคำทั้งหมดไปอบที่ 37oC 2 ชม. จนแห้งดำเนินการประกอบแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) แผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) แผ่นรอง (Backing card) เข้าด้วยกัน โดยเริ่มจากการวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm จากนั้นจึงวางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ประมาณ 1 mm เช่นกัน และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm เมื่อประกอบเสร็จแล้วจึงนำไปตัดด้วยเครื่อง Biodot เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้าง 0.35 cm เพื่อให้สามารถใส่ลงตลับได้

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการทดลอง

<u>การผลิตโปรตีน Cry9C ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์</u>

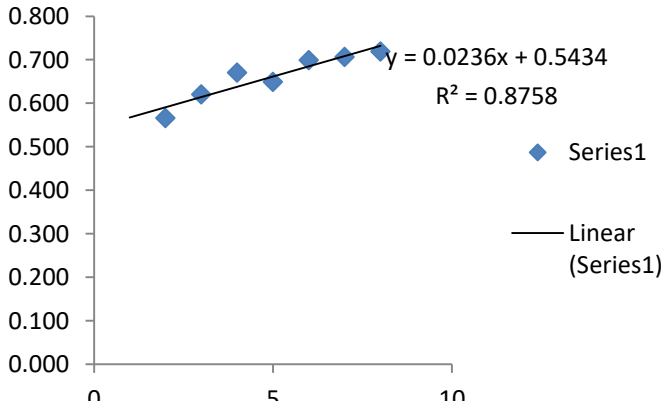
ดำเนินการเลี้ยงและชักนำให้เซลล์แบคทีเรีย E. coli BL21 transformants จากโคลน C2 ที่มีพลาสมิด pET200-Cry9c ซึ่งได้รับการยืนยันแล้วในสภาวะที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตโปรตีน Cry9c ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้และดำเนินการเลี้ยงในปริมาณมากเพื่อดำเนินการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในคราวเดียวที่ปริมาณมากโดยใช้ Buffer E ที่ pH 5.9 (ภาพที่ 1) เป็นตัว Elute โปรตีนจาก Colum Ni-NTA



ภาพที่ 1 แสดงการชะโปรตีนด้วย Buffer D ที่ pH 5.9 โดยบ่ม 3 ช่วง ช่วงละ 15 นาที โดยได้จากเซลล์แบคทีเรียซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB+Lactose 1mM

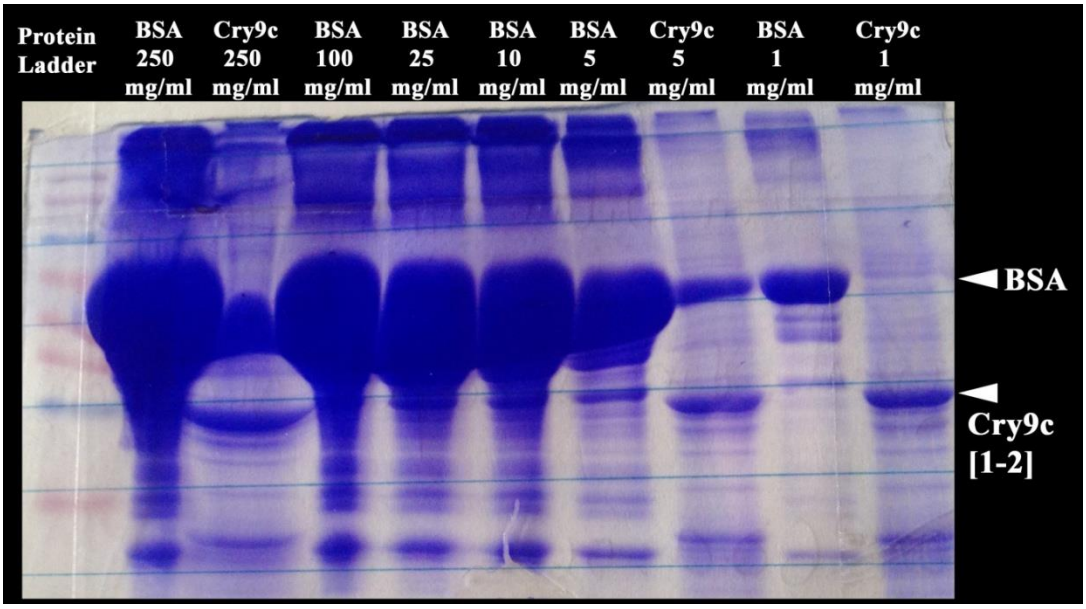
<u>การหาค่าตวามเข้มข้นของโปรตีน Cry9c ที่ทำให้บริสุทธิ์</u>

นำโปรตี BSA (Control) และ Cry9c [1-2] ย้อมกับ Bradford อัตราส่วน 4:1 (โปรตีน : Bradford) และทำการ dilute โปรตีน BSA เป็น Serial dilution 10 ค่า Dilution กับน้ำตั้งแต่ 0, 1:9 ถึง 1:1 และ Dilute โปรตีน Cry9c [1-2] ในอัตราส่วน 1:10, 1:30, 1:60 จาก Standard curve ของ BSA ได้กราฟสมการเส้นตรงคือ $y = 0.023x + 0.543$ และ $R^2 = 0.875$ (ภาพที่ 2) เมื่อนำค่า Abs ที่วัดได้จาก Cry9c [1-2] ที่อัตราส่วน 1:10 มาคำนวน พบว่าได้ความเข้มข้นของโปรตีน Cry9c [1-2] ประมาณ 250 mg/ml



ภาพที่ 2 แสดง Standard curve ของ BSA เป็นกราฟสมการเส้นตรง

อย่างไรก็ดีค่าที่วัดได้จากเครื่องอาจมีความคลาดเคลื่อน จึงต้อง Run เจลประกอบเทียบกับค่าที่คำนวนได้เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริง โดย Dilute โปรตีน BSA และ ให้ได้ความเข้มข้น 250, 100, 25, 10, 5 และ 1 mg/ml พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ขนาด Band ของ BSA ใหญ่กว่า Cry9c [1-2] 2.5 เท่า (ภาพที่ 3) จึงสามารถประมาณความเข้มข้นที่แท้จริงได้เท่ากับ 100 mg/ml



ภาพที่ 3 แสดง การ Run เจล Acrylamide เปรียบความเข้มข้นระหว่าง control BSA และ Cry9c [1-2]

การผลิตแอนตี้ซีรั่มจากกระต่าย

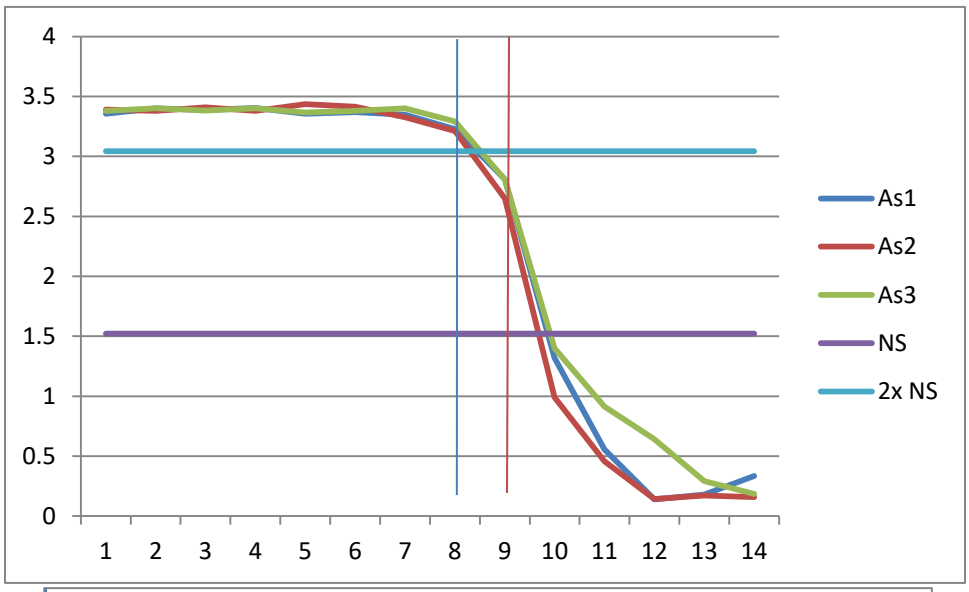
เจาะเลือดกระต่ายเก็บเป็น Normal Serum เพื่อใช้เป็น Negative control การฉีดครั้งแรกนำโปรตีน Cry9c [1-2] ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมา Dilute กับน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 mg/ml โดยมี Volume final 1 ml จากนั้นนำไปผสมกับ adjuvant ชนิด Complete อัตราส่วน 1:1 จนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันสีขุ่นขาว และฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอกระต่ายประมาณสามครั้งจนหมด ดำเนินการทดลองฉีดติดต่อกันทั้งหมด 3 สัปดาห์โดยเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ฉีดแต่ละครั้งครั้งละ 0.5 mg/ml และเปลี่ยน adjuvant เป็นชนิด incomplete

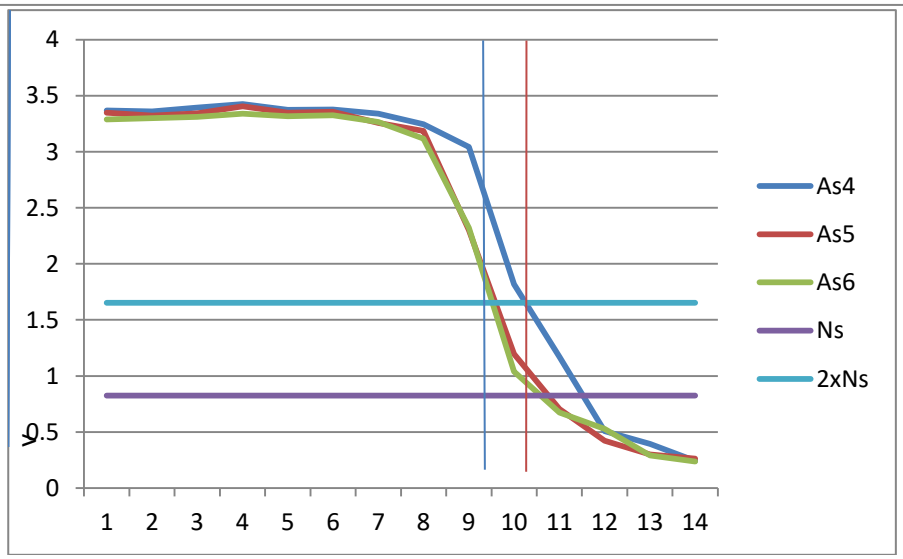
เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ทิ้งระยะไว้ 1 สัปดาห์แล้วจึงเริ่มเจาะเพื่อเก็บแอนตี้ซีรั่ม ทั้งหมด 8 ครั้ง ระยะห่าง 1 สัปดาห์/ครั้ง ในการเจาะแต่ละครั้งจะดำเนินการใช้เข็มฉีดยาเจาะที่เส้นเลือดบริเวณใบหูของกระต่ายและเก็บเลือดประมาณ 20 ml/ครั้ง เลือดที่ได้ทิ้งไว้จน Clot แข็งแล้วจึงดูดเก็บ Serum ใสที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือด นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนใสซึ่งเป็น Antiserum เก็บไว้ที่ -20oC

<u>การวัดค่าไตเตอร์การทำปฏิกิริยาระหว่าง แอนตี้ซีรั่มและ Cry9c [1-2]</u>

นำแอนตี้ซีรั่มที่ได้จากการเจาะครั้งที่ 1 – 6 มาทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนตี้ซีรั่มและ Cry9c [1-2] โดยเทคนิค Indirect-Elisa นำ Antiserum 1 - 6 มาทำ Serial dilution 14 ค่า Dilution โดยหากค่า Abs ที่เครื่องอ่านได้จากแอนตี้ซีรั่ม เป็น 2 เท่า ของค่า Abs ที่อ่านได้จาก Normal serum จะถือว่าค่าที่ได้ “ยอมรับได้” (Significant) ว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนตี้ซีรั่มและแอนติเจน

จากการทดลองพบว่า Antiserum 1 – 3 มีค่า Abs ที่ Significant ถึงระดับ Dilution ที่ 8 คิดเป็นประมาณ 1:25,600 ในขณะที่ Antiserum 4 มีค่า Abs ที่ Significant ถึงระดับ Dilution ที่ 10 คิดเป็น 1: 10,2400 และ Antiserum 5 – 6 มีค่า Abs ที่ Significant ถึงระดับ Dilution ที่ 9 คิดเป็นประมาณ 1: 51,200 จึงสรุปได้ว่า Antiserum 4 มีความเข้มข้นของ IgG อยู่มากที่สุดจึงทำให้ค่าไตรเตอร์ปฏิกิริยาขึ้นได้สูงสุดที่ 1: 102,400 ภาพที่ 4)





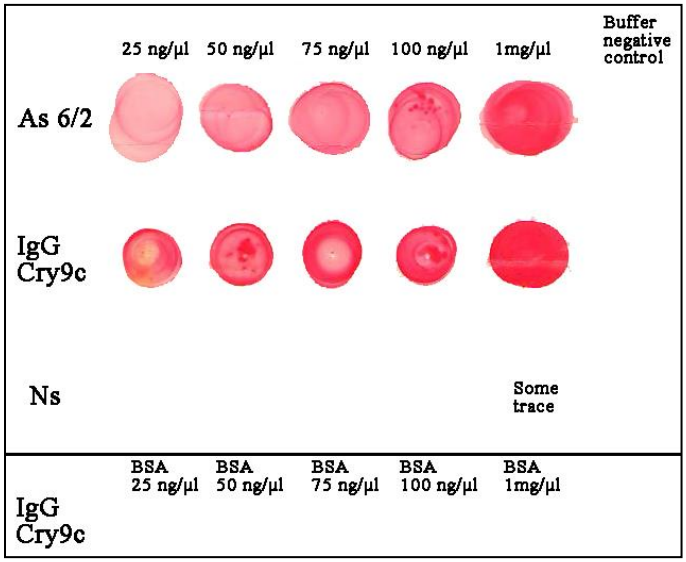
ภาพที่ 4 แสดงกราฟการวัดค่าไตรเอตร์การทำปฏิกิริยาของ แอนตี้ซีรั่ม As 1 – 6 และนอร์มอลซีรั่ม

<u>การทดสอบ NCM ELISA (Dot blot)</u>

นำ Antiserum 6/2 มาทดสอบด้วยวิธี NCM ELISA โดยหยด โปรตีน Cry9c ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ช่องละ 5 µl ที่ความเข้มข้น 25 ng/µl, 50 ng/µl, 75 ng/µl, 100 ng/µl และ 1 mg/µl จากนั้นทดสอบ Dot blot ด้วย Antiserum 6/2 ที่อัตราส่วน 1: 2,000 พบว่า Antiserum 6/2 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดี สามารถจับกับโปรตีน Cry9c และตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นทุกค่าความเข้มข้นโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ Buffer negative control และ BSA negative control (ภาพที่ 5)

นำ IgG ที่สกัดได้จากการตกตะกอนมาทดสอบด้วยวิธี NCM ELISA โดยหยด โปรตีน Cry9c ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ช่องละ 5 µl ที่ความเข้มข้น 25 ng/µl, 50 ng/µl, 75 ng/µl, 100 ng/µl และ 1 mg/µl จากนั้นทดสอบ Dot blot โดยนำ IgG ที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml และทดสอบที่อัตราส่วน 1: 2,000 พบว่า IgG ที่สกัดได้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีมาก สามารถจับกับโปรตีน Cry9c และตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นทุกค่าความเข้มข้นโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ Buffer negative control และ BSA negative control (ภาพที่ 5) (IgG ที่สกัดได้จากเครื่องได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับภาพที่ 5 : ผลการทดลองไม่ได้แสดงตรงนี้)

ในส่วนของ Normal serum ไม่พบปฏิกิริยาใดๆเกิดขึ้นแต่ที่โปรตีน Cry9c ความเข้มข้น 1 mg/µl พบว่าเกิดปฏิกิริยาขึ้นเล็กน้อย แต่น้อยมากแถบมองไม่เห็น (ภาพที่ 5)



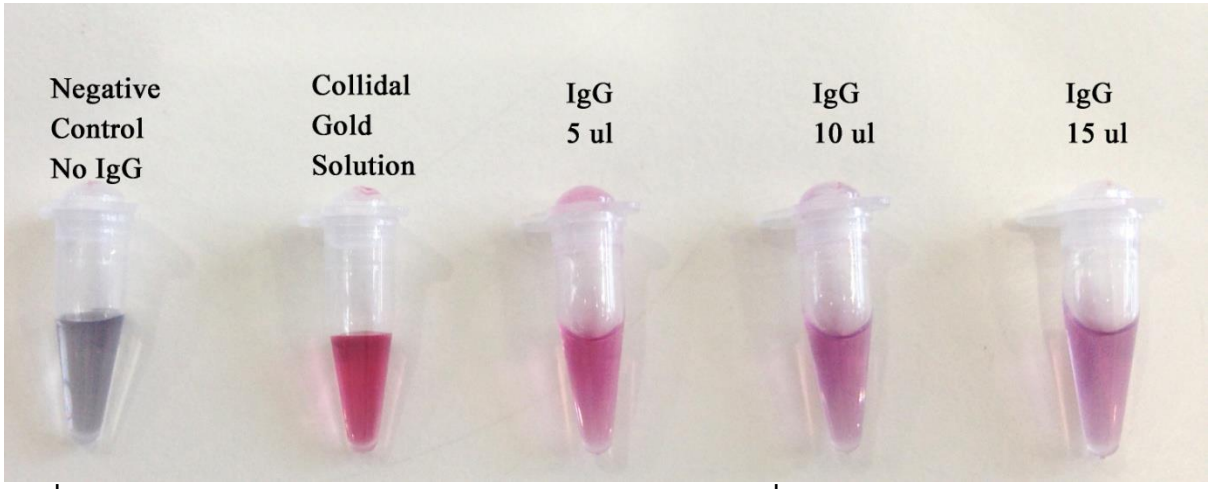
ภาพที่ 5 แสดงผลการทดสอบ NCM ELISA (Dot blot) กับโปรตีน Cry9c ที่ความเข้มข้น 25 – 100 ng/µl, As : Antiserum, Ns: Normal serum

<u>ภาวะที่เหมาะสมต่อการ Conjugate ระหว่างอนุภาคทองคำและแอนตีบอดี</u>

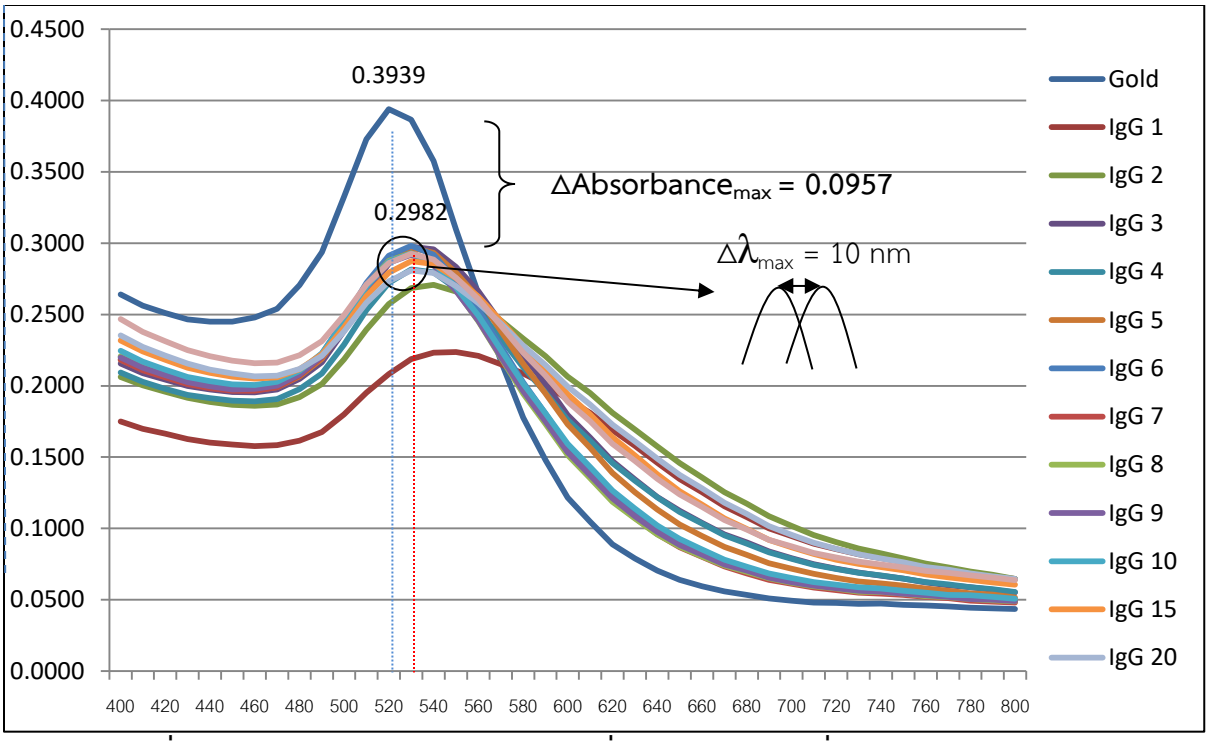
นำ IgG ที่สกัดได้จากการตกตะกอนมาผสมกับสารละลายอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 nm (Kestral) ที่ pH 7.4 โดยใช้ IgG ที่ 1- 10, 15, 20 และ 25 µl ผสมกับสารละลายอนุภาคทองคำ 500 µl (ความเข้มข้น stock IgG = 1.7 mg/ml, ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลาย 3.4 µg/ml – 34 µg/ml, 51 µg/ml, 68 µg/ml และ 85 µg/ml) (ภาพที่ 6,7)

จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λ_{max} และค่า $Absorbance_{max}$ พบว่า อนุภาคทองคำมีค่า λ_{max} เท่ากับ 520 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ 0.3939 และพบว่าปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ pH 7.4 คือ 6 µl โดยมีค่า λ_{max} เท่ากับ 530 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ 0.2982 โดยมีค่า $\Delta\lambda_{max}$ เท่ากับ 10 nm (Sensitivity แบบหยาบ) $\Delta Absorbance_{max}$ = 0.0957 (ภาพที่ 7)

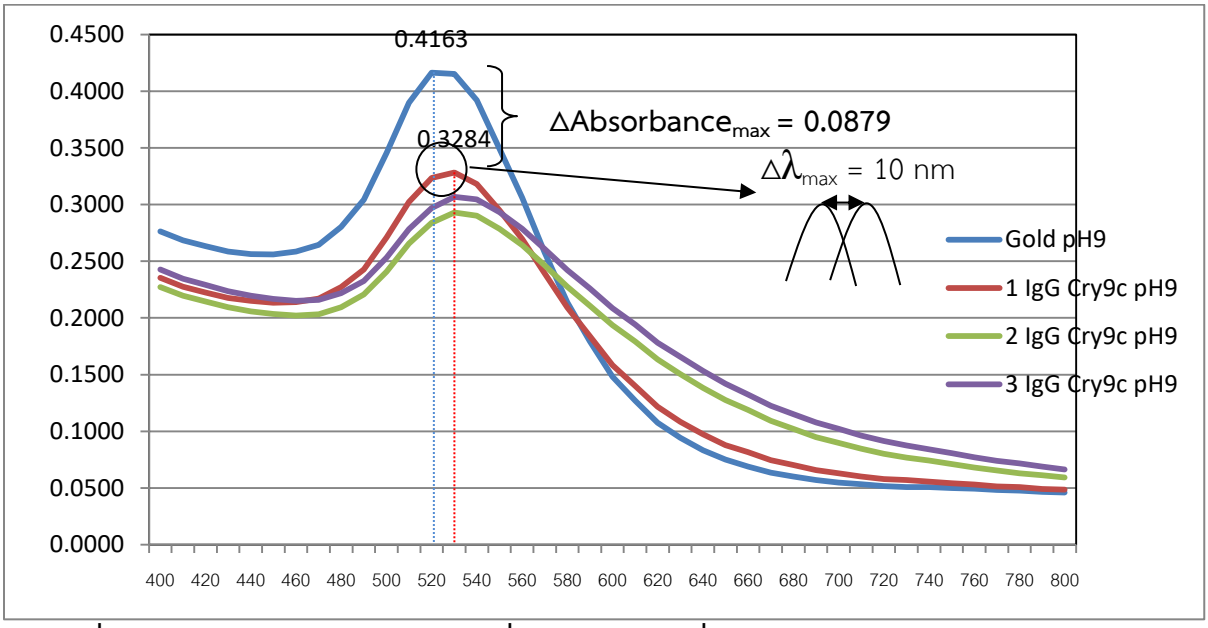
ในส่วนของการทดสอบสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH 9 พบว่าอนุภาคทองคำมีค่า λ_{max} เท่ากับ 520 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ 0.4163 ในส่วนของ IgG ใช้ปริมาตร IgG 5 µl, 10 µl และ 15 µl เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate พบว่า ที่ IgG 5 µl มีค่า λ_{max} เท่ากับ 530 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ 0.3284 โดยมีค่า $\Delta\lambda_{max}$ เท่ากับ 10 nm (Sensitivity แบบหยาบ) $\Delta Absorbance_{max}$ = 0.0879 (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 แสดงภาพปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคทองคำ pH 9 และ IgG ที่ความเข้มข้นต่างๆ สีชมพูอ่อนแสดงให้เห็นว่าเกิดการจับตัวกันโดย Electrostatic force ระหว่าง IgG และ อนุภาคทองคำ สีที่ใกล้เคียงกับ Collidal gold solution มากที่สุดแสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดี



ภาพที่ 7 แสดงการวัดค่า Absorbance ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 nm ในสารละลาย Colloidal gold-IgG เปรียบเทียบกับ สารละลาย Colloidal gold ที่ pH 7.4



ภาพที่ 8 แสดงการวัดค่า Absorbance ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 nm ในสารละลาย Colloidal gold-IgG เปรียบเทียบกับ สารละลาย Colloidal gold ที่ pH 9

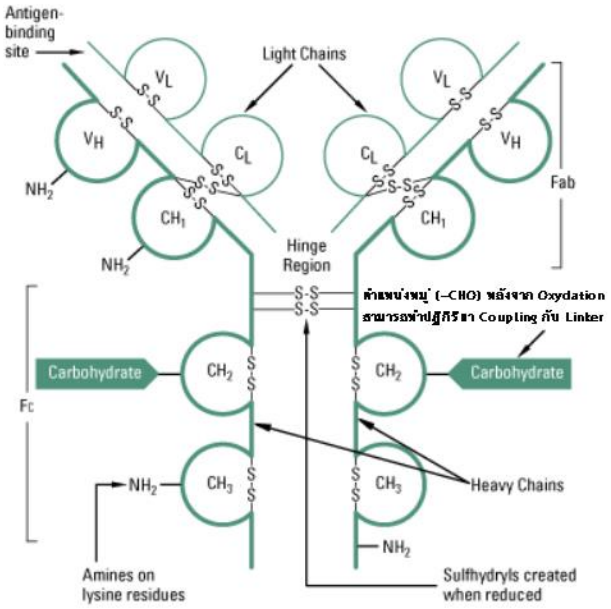
หาก IgG สามารถจับกับ Colloidal gold ได้อย่างสมบูรณ์ ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่าที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold อย่างเดียว สำหรับในการทดลองนี้

พบว่า ค่า $\Delta Absorbance_{max}$ ที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG pH9 มีค่าน้อยกว่าค่า $\Delta Absorbance_{max}$ ที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG pH 7.4 ซึ่งมีแนวโน้มว่าที่ pH สูง IgG Cry9c มีแนวโน้มที่จะเข้าเชื่อมกับ gold particle มากกว่าที่ pH ต่ำ และการที่ค่า Abs ของ Colloidal gold-IgG ขึ้นไม่ถึงค่า Abs ของ สารละลาย Colloidal gold อาจเป็นไปได้ว่า IgG ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอและเกิดปฏิกิริยาแบบ Competitive ระหว่าง gold particle กับ โปรตีนชนิดอื่น ซึ่งจะต้องนำ IgG ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง

<u>การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วยวิธี Nearly-covalent</u>

จากปัญหาการจับตัวกันของ IgG และ อนุภาคทองซึ่งมีความไม่แน่นอนสูงหากมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในสารละลายเพียงเล็กน้อยก็สามารภทำให้อนุภาคทองและ IgG หลุดออกจากกันได้เพราะเป็นการจับตัวกันโดย Electrostatic force

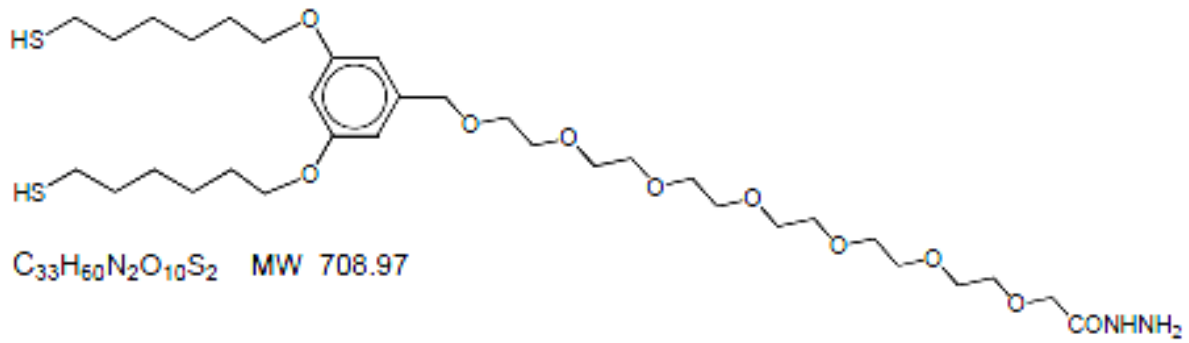
เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงทดลองเชื่อม IgG และ อนุภาคทองด้วยโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายโพลิเมอร์ หรือ Heterofuntional Linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้บริเวณหมู่คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide) (ภาพที่ 9)



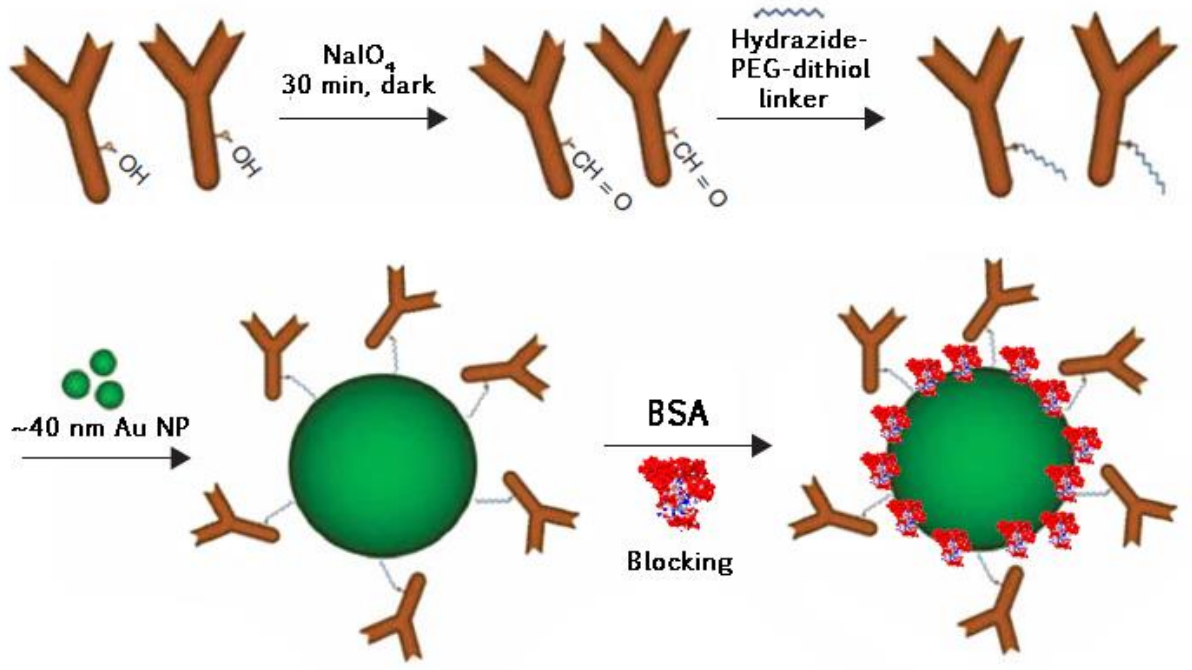
ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งหมู่ (–CHO) บนแอนติบอดี้ที่สามารถทำปฏิกิริยา Coupling กับ Linker หลังจากปฏิกิริยา Oxydation

ดำเนินการทดลองผสมแอนติบอดี้กับ Sodium periodate ($NaIO_4$) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นกับหมู่ cis-diols และเปลี่ยนหมู่ aldehyde เป็น active aldehydes (–CHO) ทั้งนี้หมู่ (–CHO) จะสามารถทำปฏิกิริยา Coupling กับ Linker ได้ซึ่งในที่นี้ใช้โมเลกุล dithiol aromatic PEG6-$CONHNH_2$ (ภาพที่ 10) เป็นตัวเชื่อม (Linker) ระหว่างแอนติบอดี้และอนุภาคทองโดยพันธะกึ่งโควาเล้น หรือ Nearly-covalent ซึ่งจะทำให้

แอนติบอดีและอนุภาคทองคำหลุดออกจากกันได้ยาก และ Blocking บริเวณที่ไม่มี Linker จับด้วยโปรตีน BSA 10% เพื่อป้องกัน Non-specific binding (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 โมเลกุล dithiol aromatic PEG6-CONHNH$_2$



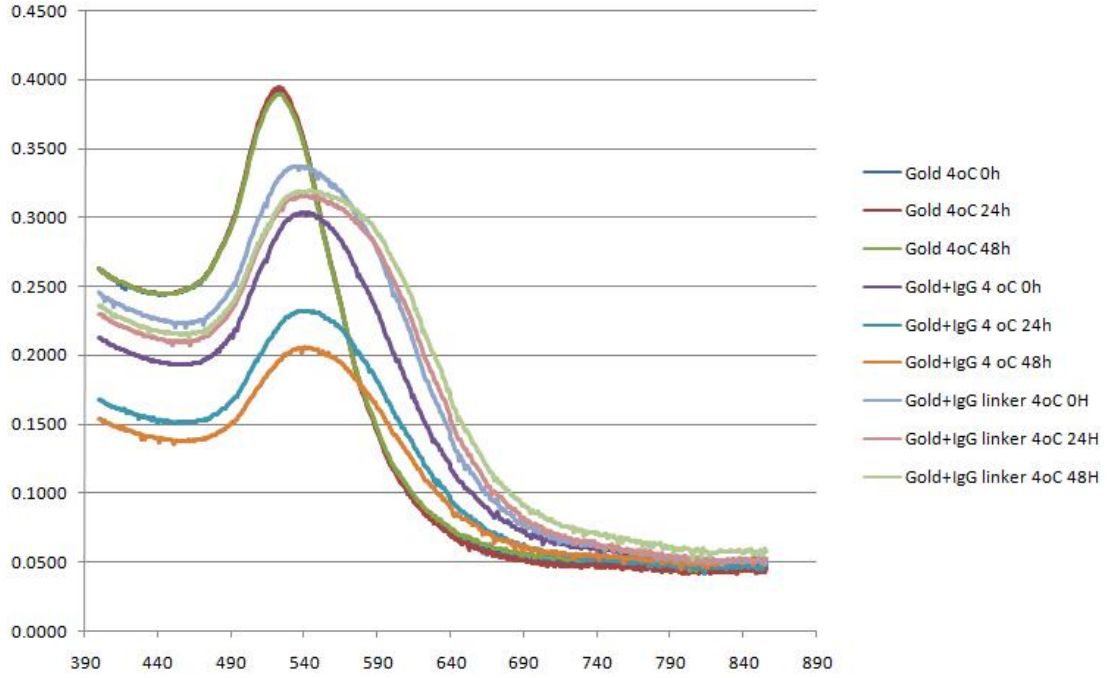
ภาพที่ 11 อธิบายขั้นตอนการเชื่อม IgG-linker และ อนุภาคทองคำ

<u>การทดสอบความเสถียรของอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดีแล้ว</u>

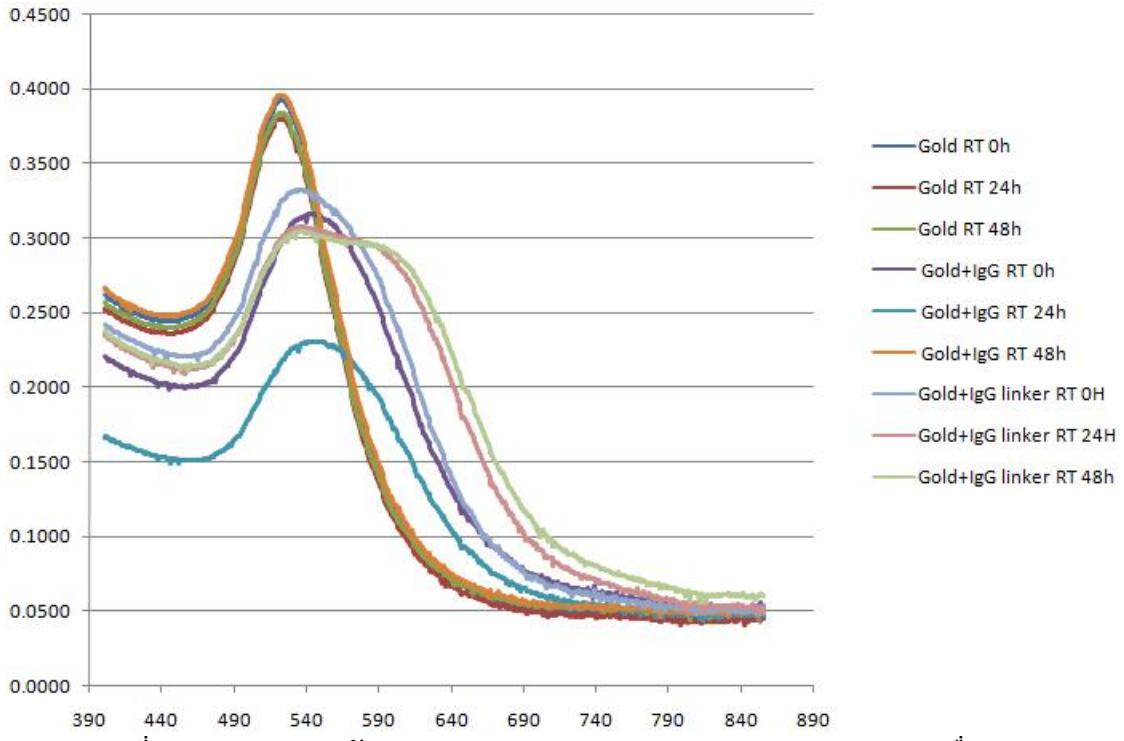
การทดลองทดสอบ UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm ของอนุภาคทองคำขนาด 40 nm เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรของอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดีแล้วระหว่างการใช้วิธีปกติโดย Electrostatic force และ การใช้วิธี Nearly-covalent ในการเชื่อมแอนติบอดี้และอนุภาคทองคำ

ในส่วนของการเชื่อมแอนติบอดี้และอนุภาคทองคำด้วยวิธี Electrostatic force ดำเนินการโดยผสมแอนติ้บอดี้ปริมาณ 5 µl (ความเข้มข้น 2.66 mg/ml) และสารละลายอนุภาคทองคำปริมาตร 1 ml เข้าด้วยกันและบ่มที่อุณภูมิห้อง 20 นาที ทั้งนี้แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลอง คือที่ 4oC ที่ 0 ชม. 24 ชม. และ 48 ชม. และที่อุณหภูมิห้องที่ 0 ชม. 24 ชม. และ 48 ชม. จากนั้นดำเนินการวัด UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm

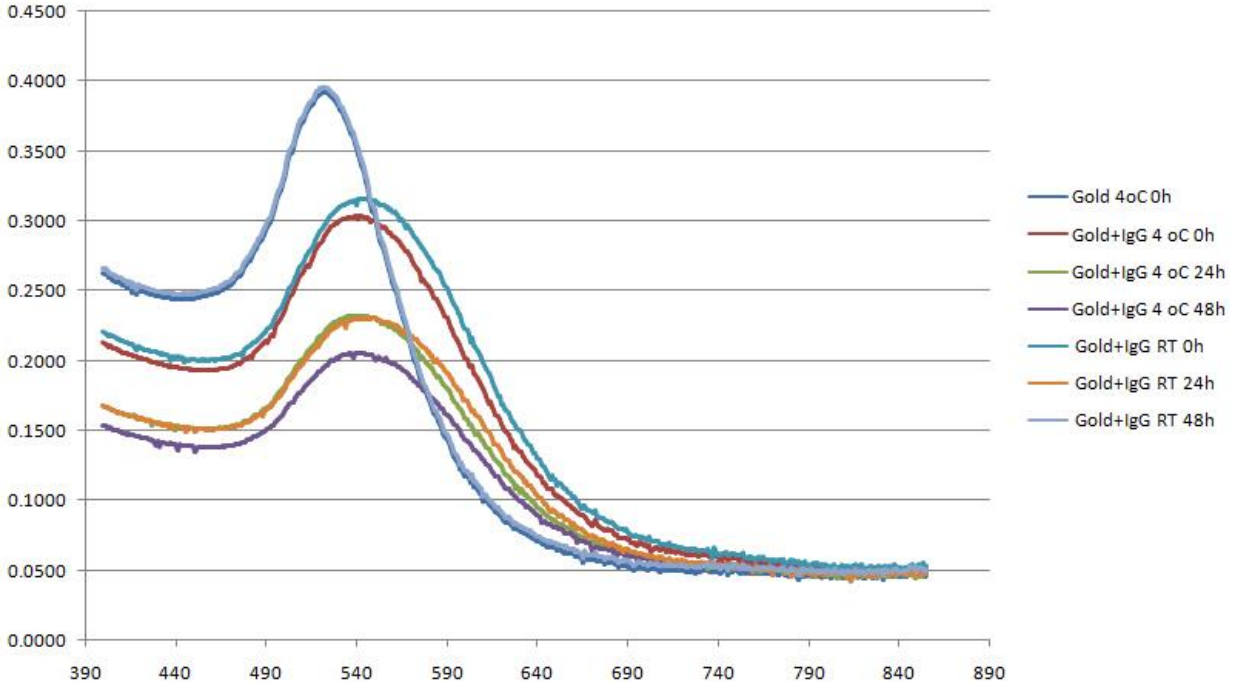
ในส่วนของการเชื่อมแอนติบอดี้และอนุภาคทองคำด้วยวิธี Nearly-covalent ดำเนินการโดยผสมแอนติ้บอดี้-linker ปริมาณ 50 µl (ความเข้มข้น 50 µg/ml) และสารละลายอนุภาคทองคำปริมาตร 1 ml เข้าด้วยกันและบ่มที่อุณภูมิห้อง 20 นาที ทั้งนี้แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลอง คือที่ 4oC 0 ชม. 24 ชม. และ 48 ชม. และที่อุณหภูมิห้องที่ 0 ชม. 24 ชม. และ 48 ชม. จากนั้นดำเนินการวัด UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm



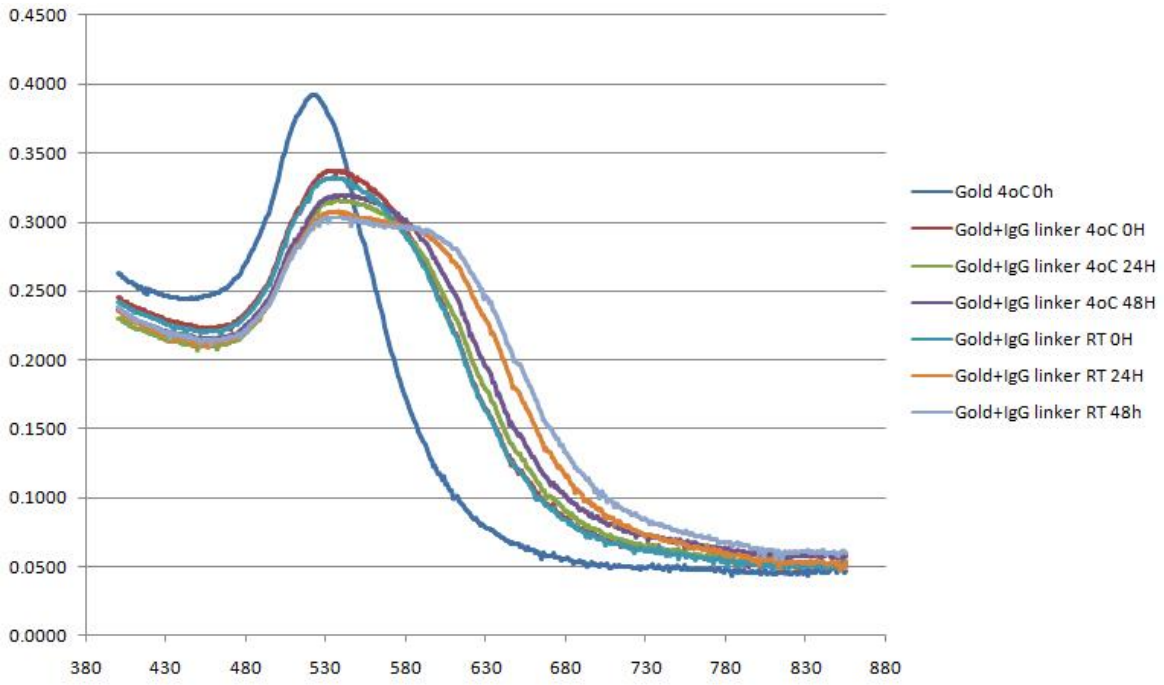
ภาพที่ 12 แสดงผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบระหว่าง IgG-linker และ อนุภาคทองคำ และ IgG ปกติกับอนุภาคทองคำ จากการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 แสดงผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบระหว่าง IgG-linker และ อนุภาคทองคำ และ IgG ปกติกับอนุภาคทองคำ จากการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 14 แสดงผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลืนแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบระหว่าง IgG ปกติกับอนุภาคทองคำเก็บที่อุณหภูมิ 4oC กับที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 15 แสดงผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบระหว่าง IgG-linker กับอนุภาคทองคำเก็บที่อุณหภูมิ 4°C กับที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง

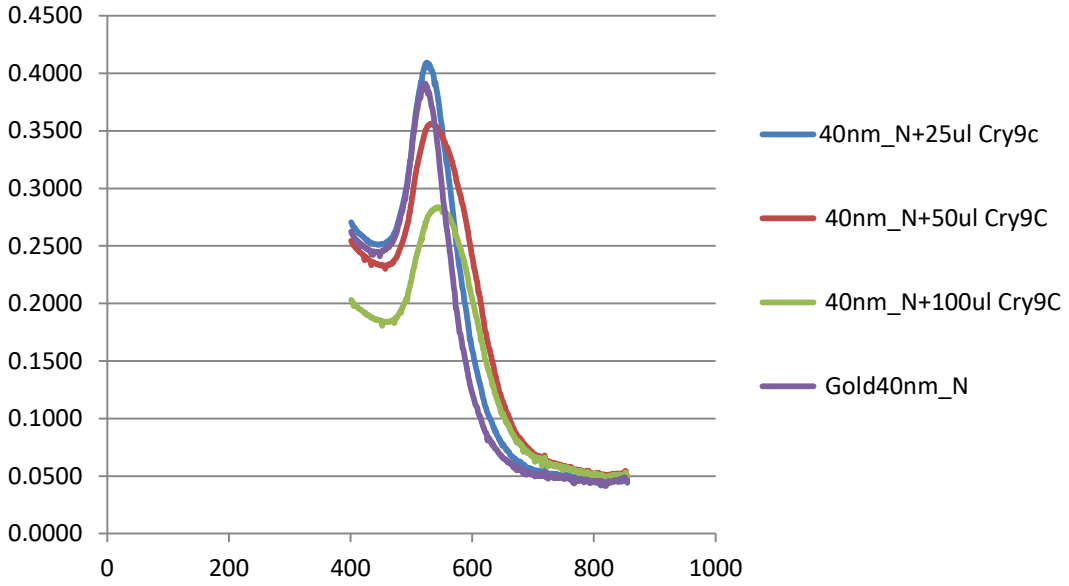
จากกราฟผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบระหว่าง IgG-linker และ อนุภาคทองคำ และ IgG ปกติกับอนุภาคทองคำ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 12) พบว่าการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG-linker มีความเสถียรและมีความหนาแน่นของ IgG บนอนุภาคทองคำมากกว่าการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติโดยค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อม อนุภาคทองคำกับ IgG-linker ที่ เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงมีค่ามากกว่าค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติและเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า ค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อม อนุภาคทองคำกับ IgG-linker ลดลงเล็กน้อยและหยุดอยู่ที่ระหว่าง 0.3155 – 0.3194 ในขณะที่ค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วใน 48 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิการเก็บรักษาอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดี้แล้วมีผลต่อความเสถียรของแอนติบอดี้บนอนุภาคทองคำด้วย โดยพบว่าการเก็บรักษาอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดี้แล้วที่อุณหภูมิห้อง ทำให้แอนติบอดี้หลุดออกจากอนุภาคทองคำได้ง่ายและเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 4°C ทั้งสองกรณีคือทั้งการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG-linker และ การเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติ (ภาพที่ 14,15) แต่ในกรณีของการเชื่อมด้วย IgG-linker ก็ยังมีความเสถียรมากกว่า IgG ปกติถึงแม้จะเป็นที่อุณหภูมิห้องก็ตามแต่ค่า $Absorbanc_{max}$ ของการเชื่อมด้วย IgG-linker หยุดอยู่ที่ 0.341-0.374 ที่ 48 ชั่งโมง (ภาพที่ 15) ในขณะที่การเชื่อมด้วย IgG นั้น

IgG หลุดออกจากอนุภาคทองคำทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) โดยค่า Absorbanc$_{max}$ กลับไปเท่ากับอนุภาคทองคำ (Control) ที่ 48 ชั่วโมง

<u>การทดสอบหาปริมาตรที่เหมาะสมของ IgG-linker ในการเชื่อมกับอนุภาคทอง</u>

ดำเนินการทดลองหาปริมาตรที่เหมาะสมของ IgG-linker ในการเชื่อมกับอนุภาคทอง โดยผสม IgG-linker ที่ปริมาตร 25 µl 50 µl และ 100 µl กับสารละลายทองคำ 1 ml

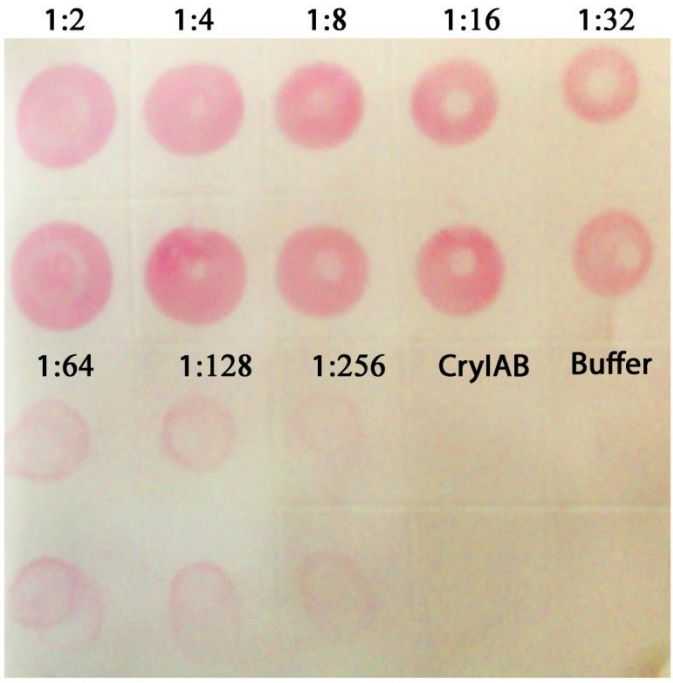


ภาพที่ 16 แสดงผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm เปรียบเทียบการผสม IgG-linker กับสารละลายอนุภาคทองคำที่ปริมาตรที่แตกต่างกัน จากการ

ทดลองพบว่า การผสม IgG-linker ปริมาตร 50 µl กับสารละลายอนุภาคทองคำได้ค่า λ_{max} ที่ 533 nm ซึ่งไม่เกิน 10 nm เมื่อเทียบกับค่า λ_{max} ของอนุภาคทองคำ และค่า Absorbance$_{max}$ ดีที่สุดเท่ากับ 0.3563 ดังนั้นจึงใช้ปริมาตร IgG-linker ที่อัตราส่วน 50 µl/ml gold solution ในการผสมสารละลายอนุภาคทองกับ IgG-linker ในการทดลองขั้นต่อไป

<u>การทดสอบ NCM ELISA (Dot blot) กับอนุภาคทองคำที่เชื่อมด้วย IgG-linker</u>

ดำเนินการผสมสารละลายอนุภาคทอง ปริมาตร 10 ml กับ IgG-linker 500 µl แล้วปั่นตกตะกอนทองให้เหลือปริมาตร 1 ml ผสมกับ 2% skim milk 4 ml เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน หยดโปรตีนโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ช่องละ 5 µl โดยมีเข้มข้น Cry9c จาก Stock 100 mg/ml ที่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ ทดสอบ Crossing กับ CryIAb ที่ 1:10 จาก Stock



ภาพที่ 17 แสดงผลการทดสอบ Dot blot จากอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับ IgG-linker

จากการทดลองพบว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี้บนอนุภาคทองกับโปรตีนเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมงไปแล้วโดยปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ถึงอัตราส่วน 1:256 หรือ ประมาณ 390 µg/mlและไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน CryIab และ Negative control buffer (ภาพที่ 17)

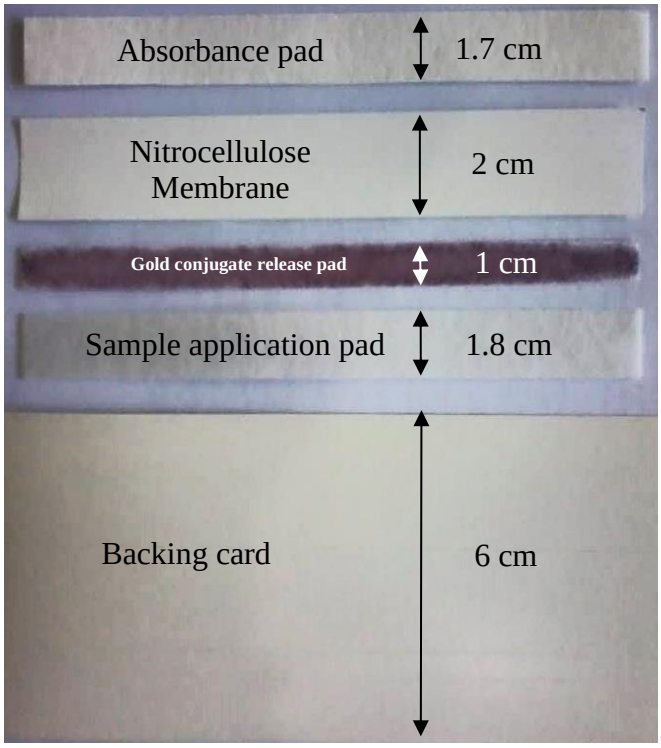
<u>การประกอบชุดตรวจสอบ Strip test</u>

<u>การทดสอบปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการพ่นลงบนแผ่น Gold conjugate release pad</u>

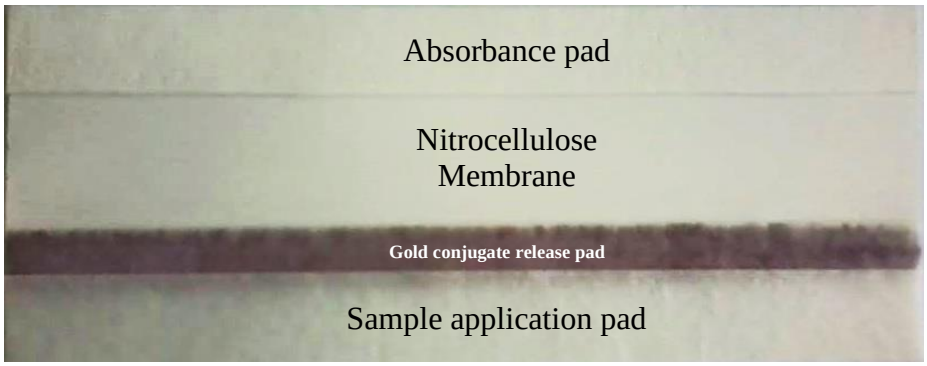
ดำเนินการเตรียมแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) โดยแช่ในสารละลาย Pretreatment (Conjugate pad pretreatment buffer, PBS (0.01 mol/L, pH 8.0), 10% sucrose, 0.05% Tween-20) และ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทอง 10 ml แล้วนำไปผสมกับ IgG-linker 500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีจากนั้นจึงเติม BSA 10% และนำไปปั่นตกตะกอน จากนั้นนำตะกอนอนุภาคทองที่เตรียมไว้มาละลายในสารละลายทอง (0.01 mol/L PBS; pH 8.0, 1% concentration BSA, 0.05% PEG) ให้ได้ปริมาตร 600 µl ดำเนินการเตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยขีดเส้น Test line ด้วย IgG Cry9c ความเข้มข้น 2.5 mg/ml และ 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

เมื่อเตรียมอุปกรณ์ทุกอย่างแล้วจึงนำสารละลายทองคำ-แอนติบอดี้ ที่เตรียมไว้มาเข้าเครื่อง Biodot เพื่อพ่นบนแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองคือ พ่นที่ ความเข้มข้น 5 µl/cm, 10 µl/cm, 15 µl/cm และ 20 µl/cm ชุดละ 7.5 cm จากนั้นนำแผ่นทองคำทั้งหมดไปอบที่ 37°C 2 ชม. จนแห้ง (ภาพที่ 18)

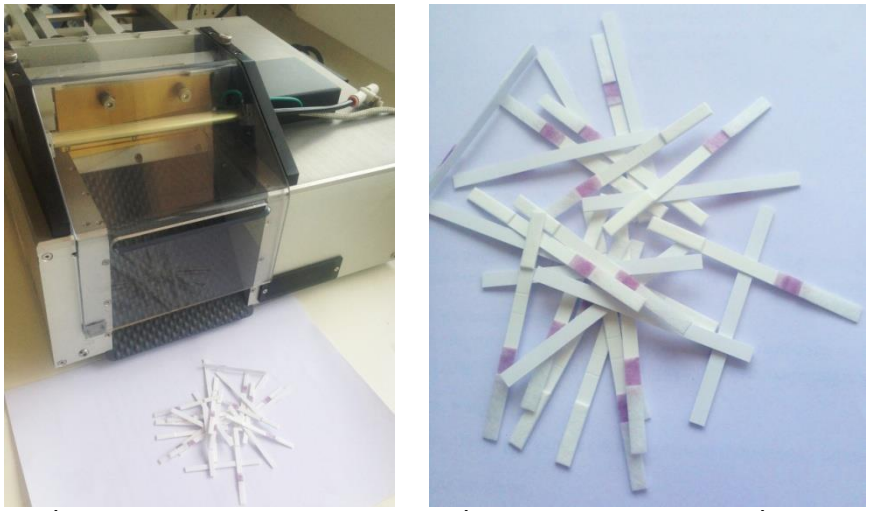
ดำเนินการประกอบแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) แผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) แผ่นรอง (Backing card) เข้าด้วยกัน โดยเริ่มจากการวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm จากนั้นจึงวางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ประมาณ 1 mm เช่นกัน และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm เมื่อประกอบเสร็จแล้วจึงนำไปตัดด้วยเครื่อง Biodot เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้าง 0.35 cm เพื่อให้สามารถใส่ลงตลับได้ (ภาพที่ 19, 20, 21)



ภาพที่ 18 แสดงองค์ประกอบต่างๆของชุด Strip test

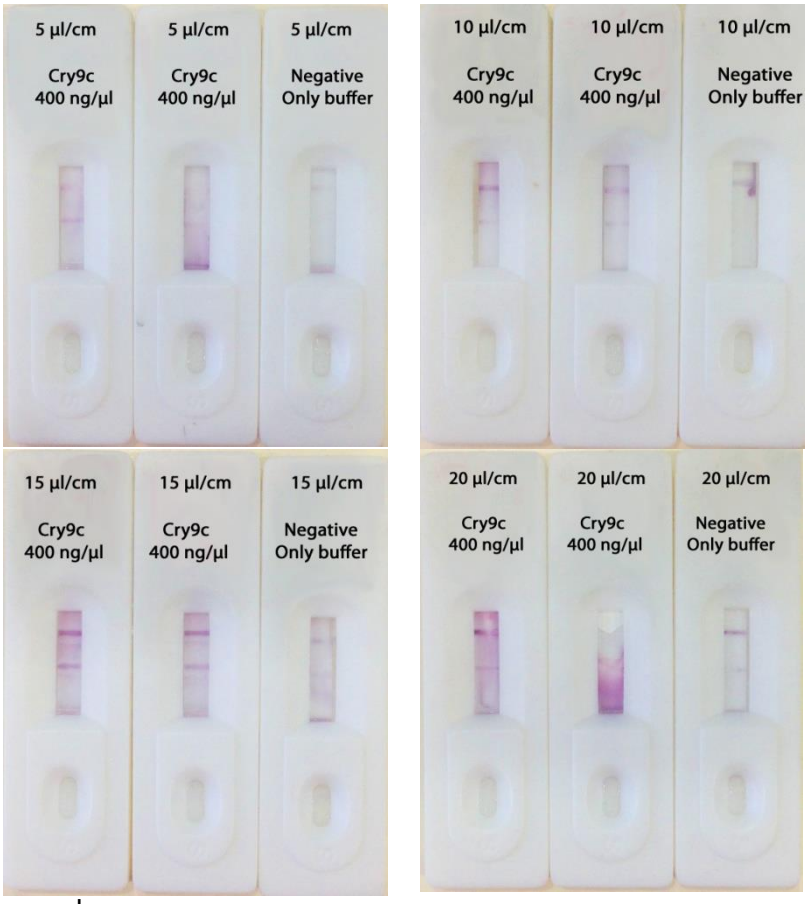


ภาพที่ 19 แสดงชุด Strip test ที่ประกอบเสร็จแล้ว



ภาพที่ 20 แสดงภาพการตัด Strip test ที่ประกอบเสร็จแล้วด้วยเครื่อง Bio Dot

ภาพที่ 21 แสดงภาพการประกอบ Strip test กับ กับตลับพลาสติก

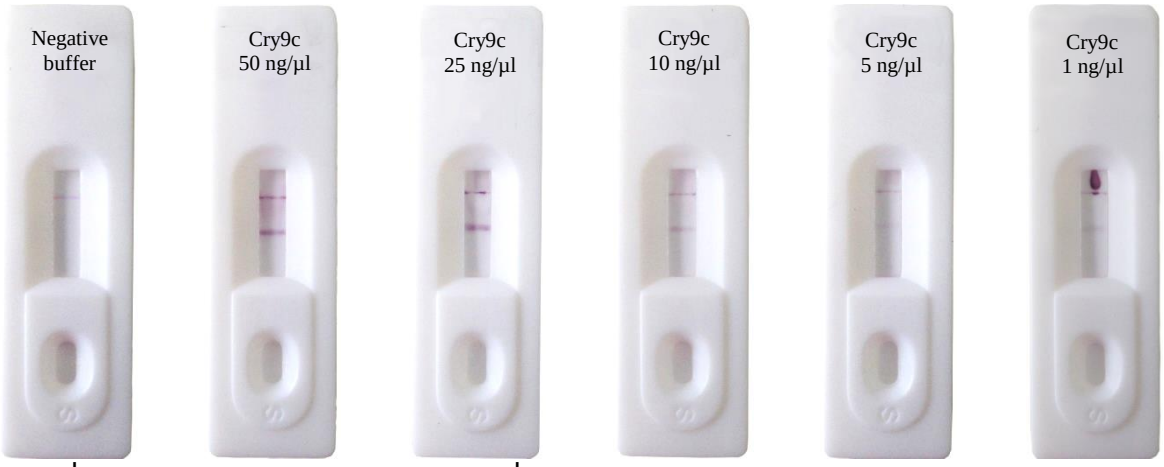


ภาพที่ 22 แสดงภาพการทดสอบการพ่น Gold conjugated-IgG-linker ที่ปริมาณความเข้มข้น 5 µl/cm, 10 µl/cm, 15 µl/cm, 20 µl/cm

จากการทดลอง (ภาพที่ 22) พบว่าที่ความเข้มข้น 15 µl/cm ให้ Test-line และ Control-line ที่ชัดเจนที่สุด ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้น 15 µl/cm เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการพ่นอนุภาคทองในการทดลองต่อไป

การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ชุด Strip test สามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้

ดำเนินการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ชุด Strip test สามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้ โดยเจือจางโปรตีนและทดสอบชุด Strip test จากความเข้มข้น 50 ng/µl, 25 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl, 1 ng/µl



ภาพที่ 22 แสดงภาพการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของชุด Strip test สามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CRY9C แบบ Strip โดยเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CRY9C จากยีน cry9c ผู้วิจัยสกัดโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากแบคทีเรียEscherichia coliเพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรั่ม นำแอนติซีรั่มมาสกัดแอนติบอดี้ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน(IgG) แล้วเชื่อมกับอนุภาคทองคำขนาด 40นาโนเมตร โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส เป็นวัสดุนำผ่านเปรียบเทียบการเชื่อมต่อ electrostatic force และ nearly covalent พบว่าการเชื่อม IgGกับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ทำให้พันธะของอนุภาคทองคำและIgGมีความเสถียรกว่าการเชื่อมแบบ electrostatic forceเมื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีน พบว่าการพ่นอนุภาคทองคำ-IgG ที่อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตรให้ผลดีที่สุดโดยใช้ Goatanti-rabitIgGความเข้มข้น 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น control line และใช้ Anti-CRY9C IgGความเข้มข้น 2.3มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้นTest line ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนชัดเจนที่สุดทั้งนี้จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบโปรตีน CRY9C ได้คือ10นาโนกรัม/ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนสามารถมองเห็นได้ชัดเจนประมาณ 20 นาทีโดยสามารถเก็บชุดตรวจสอบได้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

ทั้งนี้ในการทดลองพัฒนาเชิงพานิชย์สามารถกระทำได้โดยการพัฒนาคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ IgG และพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเพื่อให้ชุดตรวจสอบสามารถมีอายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจาก 3 เดือน เป็น 1 ปี หรือมากกว่านั้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของโปรตีน Cry9C ในข้าวโพดให้ใช้ได้เองภายในประเทศ ซึ่งจะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศและลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเชิงพานิชย์เป็น immune strip ให้มีความสะดวกและรวดเร็วในการใช้งานกับพื้นที่ในแปลงปลูกหรือด่านตรวจพืชได้อีกประการหนึ่งด้วย

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

12.เอกสารอ้างอิง

พระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507; (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2542; (ฉบับที่ 3) แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 215 พ.ศ.2544 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือ จำหน่าย โดยให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพันธุกรรมครายไนน์ซี (Cry9C DNA Sequence) หรือ โปรตีนที่สร้างมาจากสารพันธุกรรมนี้ ในข้าวโพดและถั่วเหลือง

Berdal, K.G. and Holst-Jensen A. 2001. Roundup Ready Soybean Event-specific Real-time Qualitative PCR Assay and Estimation of the Practical Detection and Quantification limit in GMO Analysis. European Food Research and Technology 213: 432-438.

Investigation of Human Health Effects Associated with Potential Exposure to Genetically Modified Corn. 2001. A Report to the U.S. Food and Drug Administration from the Centers for Disease Control and Prevention.

KumarS., Aaron J.andSokolov K. 2008. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties.Nature Protocols 3: 314 – 320.

Lambert B., Buysse L., Decock C., Jansens S., Piens C., Saey B., Seurinck J., Audenhove K., Rie J., Vliet A. and Peferoen M.1996.A Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. Applied and Environmental Microbiology 62: 80-86.

Mettler M., Grimm F.,Capelli G., Heinrich Camp. andDeplazes P. 2005. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs.Journal of Clinical Microbiology 43: 5515–5519.

Rica d. l., Roberto, Stevens, Molly M. 2012.Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. Nature Nanotechnology 7: 821–4.

Michael I. 2011.Covalent gold nanoparticle-antibody conjugates for sensitivity improvement. A dissertation submitted to the Mathematics, Informatics and Natural Sciences Faculty of Hamburg University: 1-147.