รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal Antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of NPTII Protein Detection from Polyclonal Antibody using Surface Plasmon Resonance Technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นางปิยรัตน์ ดนัยสิริชัยชล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลร่วมกับระบบอิเล็กโทรนิควงจรไฟฟ้า (ไบโอเซนเซอร์ for Detection, Lab-on-Chip) ได้รับความนิยมและพัฒนาขึ้นอย่างมากในทางการแพทย์ในช่วงเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคือ เทคนิค Surface Plasmon Resonance หรือ ปฏิกิริยาการสั่นของอนุภาคควอนตั้มแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์หาโมเลกุลหรือโปรตีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงและมีปริมาณน้อยมากได้ ในงานวิจัยนี้เป็นการนำโปรตีนโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์มาจากยีน *nptII* ซึ่งได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการใช้เป็นตัวคัดแยกทางชีวภาพ สำหรับการดัดแปลงพันธุกรรมพืช ในงานวิจัยนี้สามารถผลิต Recombinant โปรตีน NPTII และทำให้บริสุทธิในปริมาณมากได้ในคุณภาพที่อยู่ในระดับดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถนำไปใช้กระตุ้นในการผลิต Polyclonal antibody และเมื่อนำ Recombinant โปรตีน NPTII มาทดสอบการเชื่อมกับชิป NTA พบว่า His-Tag ที่อยู่บน Recombinant โปรตีน สามารถจับกับ Ni^{2+} ได้เป็น Ligand ที่ใช้ทดสอบการจับกันของโปรตีน NPTII และความสามารถในการจับของ Antibody ซึ่งเมื่อนำ Polyclonal Antibody ที่ทำให้บริสุทธิมาใช้เชื่อมกับโปรตีน A พบว่าโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ที่ผลิตได้ทุกชนิดและเปลี่ยนเป็น Ligand ซึ่งสามารถจับกับ Analyte ซึ่งเป็นโปรตีน NPTIII ได้ และจากการนำ Antibody มาทำปฏิกิริยา Amine coupling เพื่อเชื่อม Antibody แบบถาวรกับชิป CM5 และทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน NPTII พบว่าที่ pH 4.5 มีการสะสมของ Antibody บน

ชิปมากที่สุด และเมื่อทดสอบการตรวจวับกับโปรตีน NPTII สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 µg/ml หรือ 5 ng/µl แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี งานวิจัยชิ้นสามารถเป็นต้นแบบในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โปรตีนปนเปื้อน GM ด้วยเทคนิคที่ง่ายและมีราคาถูกได้

6. คำนำ

นีโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์มาจากยีน *nptII* ยีนดังกล่าวได้ถูกค้นพบและโคลนมาจาก ทรานสโพซอน Tn5 ในจีโนมแบคทีเรีย อีโคไลน์ สายพันธุ์ K12 (Beck et al. 1982) เอนไซม์ชนิดดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของสารปฏิชีวนะจำพวก กานาไมซิน นีโอไมซิน เจเนทิซิน (G418) และ พาราโมไมซิน ได้ โดยการเติมกลุ่ม เอทีพี เทอไมนอลฟอสเฟต เข้าไปที่โมเลกุลของสารปฏิชีวนะและทำให้สารปฏิชีวนะเสียคุณสมบัติไป (Richard L. et al. 1990)

ยีน *nptII* เป็นยีนที่แพร่หลายและรู้จักมานานแล้วเพราะเป็นยีนสำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มตระกูล ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะจำพวก นีโอไมซิน *(neo)* ที่สามารถนำไปใช้เป็นมากเกอร์ชีวภาพสำหรับคัดเลือกในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น ยีสต์ (Jimenez A. et al. 1980) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Florence C. G. et al. 1981) และพืช (Bevan, M. W. et al. 1983)

ในปัจจุบัน *nptII* ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการใช้เป็นตัวคัดแยกทางชีวภาพ สำหรับ การดัดแปลงพันธุกรรมพืชเนื่องด้วยไม่มีหลักฐานว่า *nptII* เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (EFSA 2009) และจากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ พบว่า *nptII* ไม่มี ลักษณะคล้ายคลึงหรือความเหมือนทางพันธุกรรมร่วมกับสารพิษใดๆ หรือสารกระตุ้นอาการแพ้ใดๆ (Lu et al. 2007) ทั้งนี้การจัดกลุ่มของ ตัวคัดแยกทางชีวภาพ ชีวภาพที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะ มีอยู่ 3 ระดับด้วยกันคือ 1) “ใช้ได้ไม่จำกัด” เป็นกลุ่มที่สามารถใช้ได้โดยไม่มีข้อจำกัดเพราะว่าเป็นยีนที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นยีนที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะชนิดที่หายากหรือไม่มีการใช้ในทางการแพทย์ คือ กานาไมซิน รีซิสแทนส์ ซึ่ง *nptII* จัดอยู่ในหมวดนี้ 2) “ห้ามใช้ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ค้าขายเชิงพานิช” เป็นกลุ่มยีนที่สามารถใช้ในการทดลองภาคสนามเท่านั้น (Field trail) เนื่องด้วยยีนกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดกระบวนการต่อต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้ในมนุษย์ได้ เช่นกลุ่มยีน แอมพิซิลิน รีซิสแทนส์ และ 3) ไม่อนุญาติให้ใช้ เนื่องด้วยยีนกลุ่มนี้ทำให้เกิดการต่อต้านสารปฏิชีวนะระดับสูง ชนิดจำเพาะเจาะจงที่ใช้ในกางการแพทย์ในมนุษย์เช่น *nptIII* สามารถต่อต้านสารปฏิชีวนะชนิดเอมิกาซิน ได้ (EFSA 2009)

nptII จึงเป็นยีนที่ถูกใช้ทั่วไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมและสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ GMOs ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนยีน *nptII* และโปรตีนนีโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II หลายวิธีการเช่น PCR หรือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Suratman A. et al. 2013) Real-time PCR หรือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-time (Mohamed F. et al. 2010) Elisa

หรือ การตรวจวิเคราะห์จากการตกตะกอนของโปรตีน (Roland J. et al. 1992) Immunostrip หรือ การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Jennifer R. N. et al. Cotton con. 2008) อย่างไรก็ตามการทำ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) หรือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-time (Real-time PCR) ถึงแม้จะมีความแน่นอนและความแม่นยำสูงแต่ยังเป็นเทคนิคที่ต้องใช้เวลาและใช้สารเคมีที่มีราคาแพงในการดำเนินงานในการทดสอบ นอกจากนี้ การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ที่ผลิตขายในท้องตลาดสามารถใช้ตรวจสอบได้เพียงตรวจคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้นและไม่สามารถระบุความเข้มข้นและลักษณะของการปนเปื้อนของโปรตีนในตัวอย่างได้

ช่วงสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิจัยระบบการตรวจโดยเทคโนโลยี ไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางอิเล็คโทรนิคและทางชีววิทยาเข้าด้วยกัน โดยใช้หลักการตรวจวิเคราะห์จากรหัสเบสโอลิโกนิวคลีโอไทน์ ที่จับกับสารทางชีวโมเลกุลต่างๆหรือโมเลกุลทางเคมี (Tombelli S. et al. 2005; Gyeong S. B. et al. 2005; Yi X. D. et al. 2005) และการตรวจวิเคราะห์การจับตัวกันของ แอนติเจน-แอนตี้บอดี้ และ การตรวจจับกันของ โปรตีน-ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคการตรวจจับ Surface Plasmon Resonance(SPR) หรือปฏิกิริยาการสั่นของอนุภาคควอนตั้มแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว โดยใช้ไบโอเซนเซอร์ ในการตรวจวิเคราะห์ (Eyal G. et al.2009; Dongmei H. et al. 2013; Shingo N. et al. 2013)

SPR สามารถตรวจสอบสารต่างๆได้ด้วยความจำเพาะเจาะจงสูงและรวดเร็ว โดยสามารถระบุความเข้มข้นของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบของสารละลายหรือสารเนื้อผสม นอกจากนี้เทคนิค SPR ยังเป็นเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ต้องติดฉลากและเป็นการวิเคราะห์แบบทันที ณ ขณะนั้น (real-time) อีกด้วย (Chinowsky T.M. et al. 2007)

อนึ่งการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนมีปัจจัยที่สำคัญ ๒ ประการ คือ การพัฒนาให้ระบบมีความจำเพาะเจาะจงสูงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม้ในตัวอย่างที่มีส่วนผสมหลากหลาย และมีความไวในการตรวจจับที่เหมาะสมตามที่ต้องการในการวิเคราะห์ผล เพราะตัวอย่างต่างๆเช่น สายละลายจากเซลล์พืชสด ซีรั่ม ผงแป้ง สารละลาย น้ำมัน ฯลฯ อาจมีสารหรือโมเลกุลที่สามารถเข้าไปขัดขวางการทำงาน หรือจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง กับผิวหน้า SPR จนอาจไปรบกวนสัญญานจากการตรวจวิเคราะห์ได้ (Scott D. S. et al. 2009)

เพื่อให้ปัจจัยทั้ง ๒ ประการครบถ้วน มีวิธีการหลากหลายที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มความไวต่อการตอบสนองและลดค่าความไม่แน่นอนเพื่อให้การตรวจตัวอย่างในสารเนื้อผสมได้ดีขึ้น เช่น การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ในแบคทีเรียหรือในสภาพทดลอง (in-vitro) ก่อนที่จะนำมาตรวจโดย การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) หรือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (real-time) (reviewed, Benoit et al. 2003) การใช้เทคนิค การตกตะกินโปรตีนโดยแม่เหล็ก (Immunomagnetic) ในการแยกตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ (Straub T.M. et al.2005) การใช้วิธีกรองผ่านเมมเบรนเพื่อที่จะแยกส่วนประกอบหรือสารชนิดอื่นออกไป เช่น สารหรือโมเลกุลที่ใหญ่กว่าสารที่จะวิเคราะห์จากตัวอย่างที่นำมาตรวจ (Stevens R.C. et al. 2003) อย่างไรก็ดีเทคนิคที่กล่าวถึงทั้งหมดเป็นการทดลองที่ต้องใช้เวลาในการเตรียมและมีความซับซ้อนก่อนที่ตัวอย่างจะพร้อมเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลร่วมกับระบบอิเล็กโทรนิควงจรไฟฟ้า (ไบโอเซนเซอร์ for Detection, Lab-on-ชิป) ได้รับความนิยมและพัฒนาขึ้นอย่างมากในทางการแพทย์ในช่วงเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคือเทคนิค Surface Plasmon Resonance หรือ ปฏิกิริยาการสั่นของอนุภาคควอนตั้มแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์หาโมเลกุลหรือ โปรตีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงและมีปริมาณน้อยมากได้ นอกจากมีความไวต่อการตรวจจับที่สูงแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยความรวดเร็วมากอีกด้วยโดยใช้เวลาเพียง 15 – 30 นาทีต่อตัวอย่าง และในปัจจุบันราคาของเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถูกลงมากกว่าในอดีต ทำให้เหมาะสมในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้การกับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน GMOs ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สินค้าเกษตร

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาในกระบวนการส่งออกคือระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้เวลา 5 – 10 วัน ซึ่งผู้ประกอบการจะไม่ดำเนินการตามกระบวนการขั้นตอนปกติตามหลักที่ควรจะเป็นคือดำเนินการสุ่มจากโรงคัดบรรจุก่อนส่งออก เพื่อให้ตัวอย่างที่ได้สุ่มมานั้นเป็นตัวแทนของสินค้าที่จะส่งออกอย่างแท้จริงโดยผู้ประกอบการจะสุ่มจากแปลงส่งออกแล้วจึงส่งผลิตภัณฑ์หรือสินค้าที่จะส่งออกไปโรงคัดบรรจุ (เช่นมะละกอผลสด) เพื่อส่งออกในวันรุ่งขึ้นทันที อนึ่งหากสามารถลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ให้ต่ำกว่า 5 วันได้ผู้ประกอบการสามารถนำผลผลิตเข้าโรงคัดบรรจุ เก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์และสามารถรอใบรับรองเพื่อเตรียมส่งออกได้ทันทีจะทำให้ตัวอย่างที่สุ่มมาตรวจนั้นเป็นตัวแทนของสินค้าที่จะส่งออกอย่างแท้จริง

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (GeneAmp PCR System 9700)

7.1.2 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Gel-electrophoresis

7.1.3 Vortex mixer

7.1.4 Dry bath

7.1.5 เครื่องปั่นตกตะกอน Centrifuge

7.1.6 เครื่องวัดปริมาณ DNA GeneQuant II RNA/DNA

7.1.7 UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ

7.1.8 เครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Aktapure

7.1.9 เครื่องแยกขนาดโปรตีนโดย Acrylamide

7.2 วิธีการ

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอมะละกอด้วยวิธี Cell breaking

ดำเนินการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอมะละกอโดยวิธี Cell breaking หรือสกัดโดยชุดสกัด DNeasy mericon Food Kit โดยชั่งตัวอย่างหนัก 0.2-0.25 กรัม ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลูกปืนสเตนเลส ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้วลงไปในหลอด จำนวน 3 เม็ด เติม Homogenization buffer(Solution I buffer) (ที่เติม β-mercaptoethanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้บัฟเฟอร์เข้ากับตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการใส่ทิวป์เข้ากับช่องใส่ทิวป์ของเครื่องตี ตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเปิดให้เครื่องทำงาน จำนวน 5 รอบ (ใช้เวลานาน 1 นาที ต่อรอบ) เติมLysis buffer (Solution II buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรพลิกหลอดไปมาให้สารละลาย ผสมกันนำไปบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Precipitation buffer (Solution III buffer) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งไป เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไปแล้วเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง GeneQuant IIRNA/DNA

7.2.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM ที่ตรวจพบ 35S CaMV และ NOS Terminator โดยบดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วตักใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 200 mg สกัดดีเอ็นด้วยวิธี Gene Scan (Rogers *et al.*1985) โดย เติม Lysis buffer และ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่บรรจุตัวอย่างไว้แล้ว 200 mg (2 ซ้ำ) โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อ Lysis buffer และ Proteinase K ดังนี้

ตารางที่ 1. แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างต่อการใช้ Buffer

Test portion	Lysis buffer (มิลลิลิตร)	Proteinase K (ไมโครลิตร)
0.1-0.3 กรัม	0.80 - 1.30	20

จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 ชั่วโมง วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ปิเปต

ส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ปิเปตได้ เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ปิเปตของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่

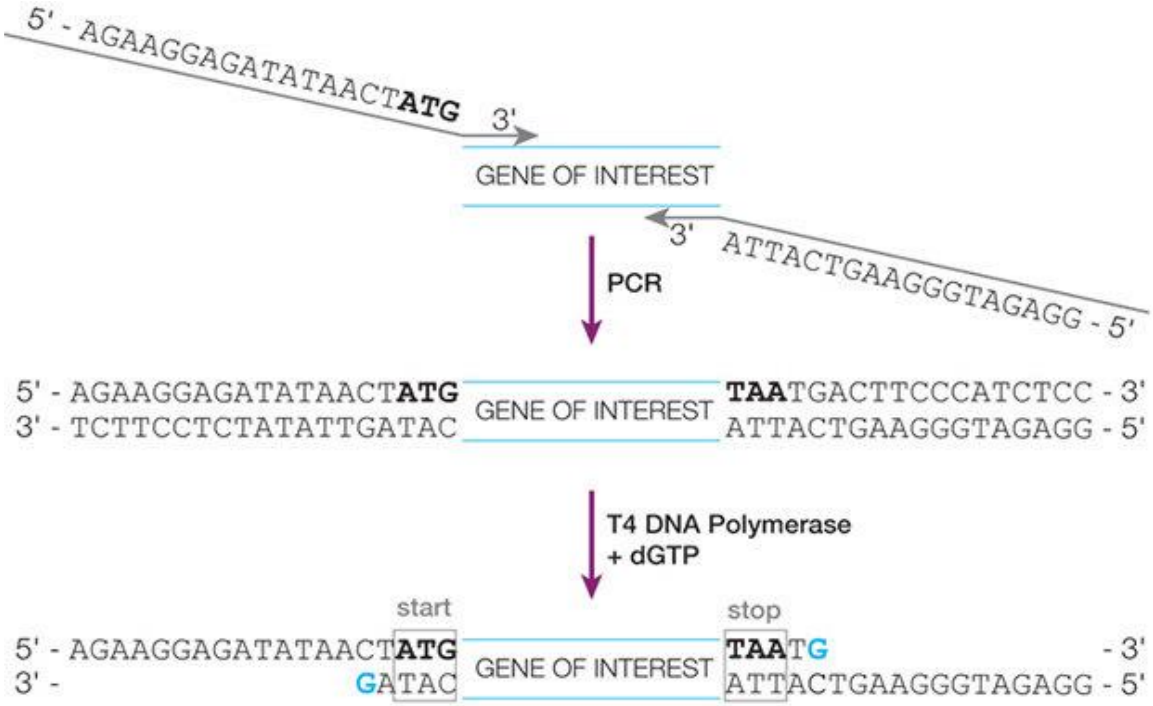
เติม 100% Isopropanal ที่แช่เย็นไว้จำนวน 2 ใน 3 ของปริมาตรของเหลวที่ปิเปตได้เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปแช่ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10นาที เท Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard™ minicolumn โดยเติม Miniprep DNA Purification Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) ติดกับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA Purification Resin จากข้อ 4.4.1 ลงในsyringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.2 หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยดันสารละลายลงจนหมด ดีเอ็นเอจะเกาะติดกับ Silica ใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของเหลวนั้นไปเติม 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อล้างดีเอ็นเอ 1 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม 80% Isopropanol ให้ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติด Syringe กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (อุ่น) นึ่งฆ่าลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

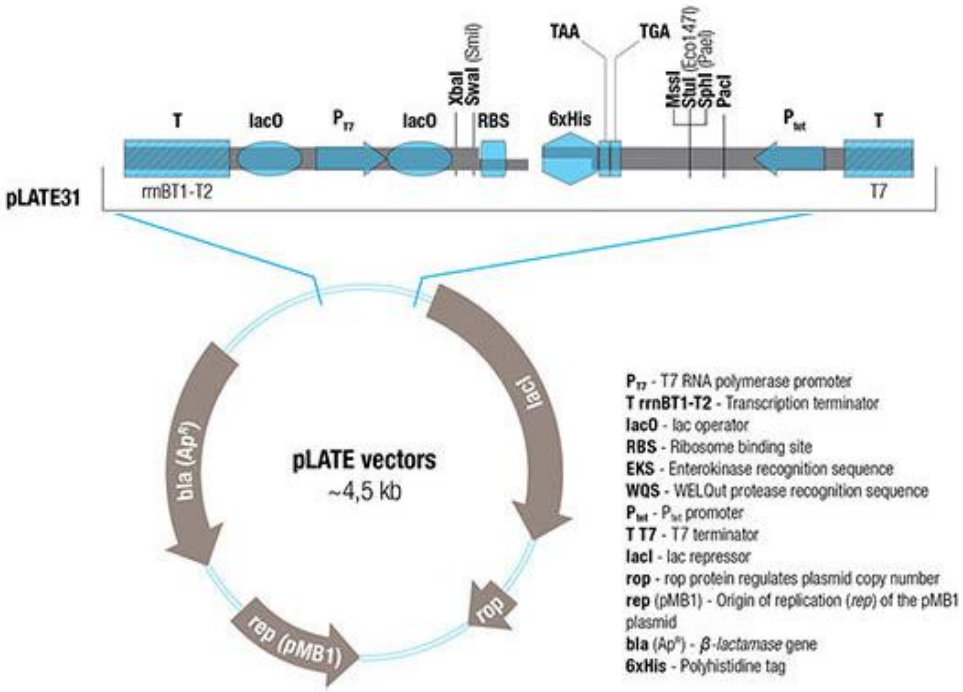
7.2.3 การสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม nptII เพื่อเตรียมสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์

ดำเนินการออกแบบ Primer เพื่อโคลนยีน *nptII* จากเวคเตอร์ pRI909 ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่ใช้สำหรับถ่ายเข้าสู่พืชเพื่อดัดแปรพันธุกรรมพืช แล้วตัดต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pLATE31 โดยระบบ aLICator LIC Cloning ซึ่งจะทำให้เกิด 5' และ 3' overhangs ใน PCR template โดยเตรียมส่วนผสมดังต่อไปนี้ที่อุณหภูมิห้อง : 5X LIC Buffer 2 µL, Purified PCR product 0.1 pmol, T4 DNA Polymerase (1u/µL) 1 µL เติมน้ำจนได้ 10 µL

Vortex และ ปั่นตกตะกอน 3-5 วินาที นำมาบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M EDTA 0.6 µL จากนั้นเติม pLATE 31 1 µL (LIC-ready vector (60 ng, 0.02 pmol DNA)) Vortex เล็กน้อยและปั่นตกตะกอน 3-5 วินาที บ่มส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดไป Transform เข้าสู่แบคทีเรีย DH5α แล้วคัด Transformant ด้วย Kanamycin 50 mg/ml



ภาพที่ 1. แสดงวิธีการโคลนยีนตามระบบ aLICator LIC Cloning



ภาพที่ 2. แสดงภาพ pLATE Vector และ pLATE 31

ตารางที่ 2. แสดง Primer สำหรับใช้ Clone ยีน *nptII* จาก Vector pRI909

Name	Sequence 5’-3’
With Start_F	AGAAGGAGATATAACTATGATTGAACAAGATGGA
Plate 31_R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGAAGAACTCGTCAAGAAG

7.2.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII

ถ่าย Vector ที่สกัดได้เข้าสู่ E.coli BL21 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรีย BL21 ที่ได้รับ Recombinant vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB medium ที่ 37ºC ข้ามคืน 100 µg/mL ampicillin เขย่าที่ 220-250 rpm/นาที นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนไปใส่ในอาหาร LB/Amp medium ใหม่ในอัตราส่วน 1:50 สังเคราะห์โปรตีน NPTII ต่อเนื่องในปริมาณมากแล้วนำไปเลี่ยงที่ 37ºC เขย่าที่ 220-250 rpm/นาที จนเชื้อได้ความเข้มข้น OD600 ประมาณ 0.5-0.6 (ประมาณ 2 ชั่วโมง) จากนั้นเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM และบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง นำเชื้อทั้งหมดมาปั่นตกตะกอนแล้วนำไปสกัดเอา รีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII ออกมา 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 4oC แล้วนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Colum Ni-NTA โดยดำเนินการเลี้ยงเซลล์ *E.coli* BL21 transformant vector pLATE31 ที่ได้รับยีน *nptII* ทำการเลี้ยงในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรียไปทำการแยกและทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยเลี้ยง starter ที่ได้จากโคโลนีเดี่ยวใน flask ที่มีอาหาร LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/mL เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แบ่ง starter เติมลงในอาหาร LB ซึ่งมีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 1 ลิตร (เติม starter ปริมาตร 10% ของอาหารใหม่) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง (non induce) นำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM แล้วเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการเซนติฟิวส์เชื้อในหลอดเซนทริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C รวมตะกอนใส่ในหลอด falcon ขนาด 50 มิลลิลิตร ในขั้นตอนการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน (Induce) เลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์โปรตีน 3 – 4 ชม. จากนั้นนำมาสกัดเอาโปรตีน NPTII

ทำเซลล์ให้แตกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ผ่านคอลั่ม Ni-NTA ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ B (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ตะกอนเซลล์ที่เก็บจากอาหาร 500 ml ละลายด้วยบัฟเฟอร์ B (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme ประมาณเท่าหัวไม้ขีด กวนให้เข้ากันจนเหนียว บ่มในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วเอามาเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วบ่มในน้ำแข็ง 15 นาที เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ –80 °C นานข้ามคืน เพื่อให้เซลล์แตกบางส่วน ทำให้เซลล์แตกมากยิ่งขึ้น โดยนำเซลล์มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไป break cell ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD รุ่น 2200 ตั้งค่าที่ 5 min, power 40% ทำการ sonicate ประมาณ 4-5 ครั้ง จนสารละลายเซลล์หายหนืดและใส (crude) นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm. นาน 10 นาที ที่ 4°C แยกเก็บส่วนใส (supernatant) กับตะกอน (pellet) นำส่วน supernatant มาทำให้มีความบริสุทธิ์โดย Nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin โดยบรรจุ column ด้วย Ni-NTA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รอให้ Ni-NTA จัดเรียงตัว ประมาณ 20 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย buffer B ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin (25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดมาผสมกับ Supernate เขย่าไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โหลดส่วนผสมทั้งหมดลงใน column เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ (flow through) ล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) ที่เติม tween 20 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 % ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin (Wash I) ล้าง column ด้วย buffer D (pH 5.9) ที่เติม tween 20 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 % ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (Wash II) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ใน

หลอด ตามลำดับ ทำการชะ (elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย buffer E (pH 4.5) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ Desalting เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสารละลาย Running buffer ของเครื่อง Biercore แล้วเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอพร้อมใช้

7.2.5 การผลิตแอนติซีรั่มจากกระต่าย

ในการทดลองขั้นต่อไปเป็นการเตรียมนำโปรตีนฉีดเข้าสู่กระต่ายโดยผู้เชี่ยวชาญซึ่งมีใบรับรองการปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองจากสถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์เป็นผู้ดำเนินการ

เจาะเลือดกระต่ายเก็บเป็น Normal Serum เพื่อใช้เป็น Negative control การฉีดครั้งแรกนำโปรตีน NPTII ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมา Dilute กับ PBS ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.1 g/l โดยมี Volume final 1.5 ml จากนั้นนำไปผสมกับ adjuvant ชนิด Complete อัตราส่วน 1:1 จนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันสีขุ่นขาว และฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังกระต่ายประมาณสามครั้งจนหมด ดำเนินการทดลองฉีดติดต่อกันทั้งหมด 3 สัปดาห์ และเปลี่ยน adjuvant เป็นชนิด incomplete เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ทิ้งระยะไว้ 1 สัปดาห์แล้วจึงเริ่มเจาะเพื่อเก็บแอนตี้ซีรั่ม เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ทิ้งระยะไว้ 1 จึงดำเนินการเก็บ antiserum แบบ Whole body เลือดที่ได้นำไปปั่นด้วย ultra centrifuge ที่ 14,000 rpm 4°C แล้วจึงดูดเก็บ antiserum ใสที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือดไว้ที่ -20°C

ภาพที่ 3. แสดงการผลิต Antibody โดยการกระตุ้นด้วยการฉีด โปรตีน NPTII (29 kDa) ที่ผ่านการทำบริสุทธิแล้วกับกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ขาว อายุ 2-3 เดือน.

7.2.6 การสกัด IgG จากแอนตี้ซีรั่มโดยผ่านคอลั่ม HiTrap Protein A HP

ดำเนินการสกัด IgG จาก Antiserum เพื่อให้มีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์โดยดำเนินการสกัดผ่านเครื่อง AKTA pure โดยมีขั้นตอนดังนี้

8.2.3.1 เตรียม binding buffer 20 mM Sodium phosephate pH 7.0

8.2.3.2 เตรียม Elution buffer 0.1 M citric acid pH3

8.2.3.3 เตรียม Neutralizing buffer 1 M Tris-HCL pH 9.0

8.2.3.5 ผสมแอนตีซีรั่มกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1:10

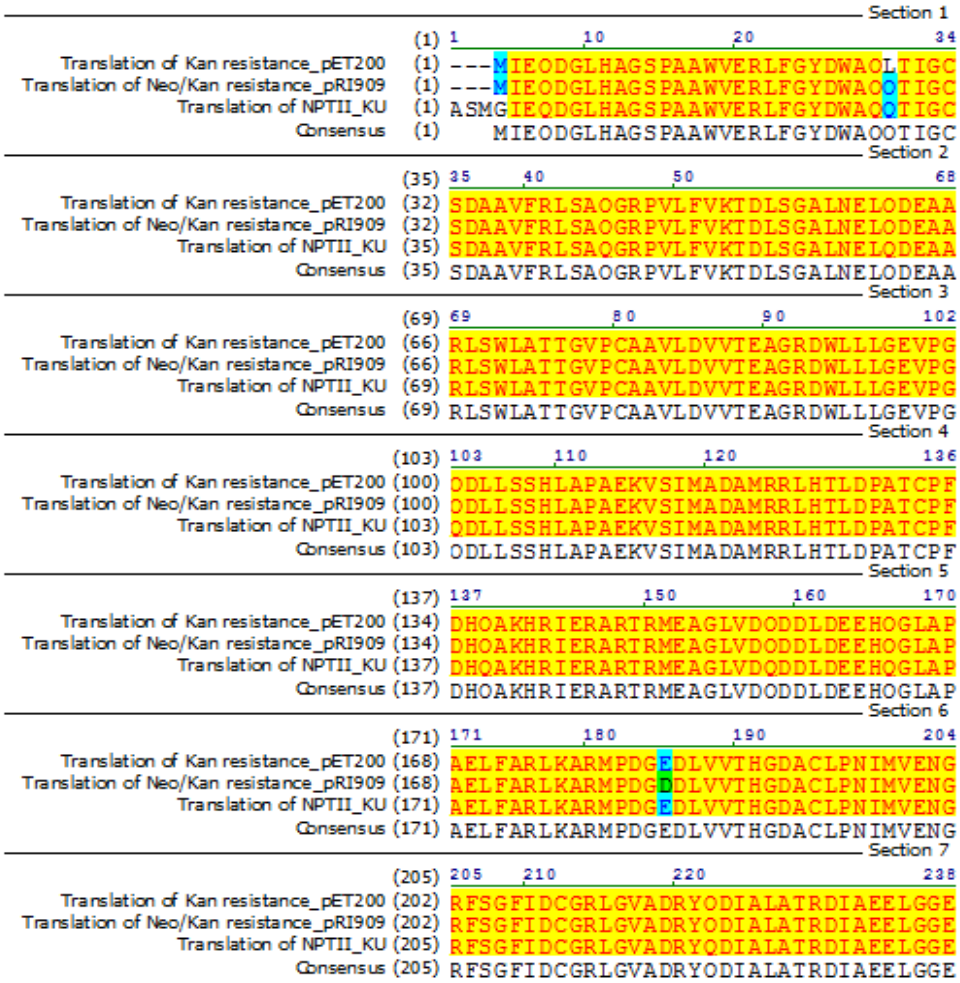
8.2.3.6 ต่อคอลั่ม HiTrap Protein A HP เข้ากับเครื่องแล้วดำเนินการสกัด IgG แบบ peak fraction

8.2.3.8 ดำเนินการ Desalting เพื่อนำเกลือออกจากตัวอย่างและเพื่อเปลี่ยน buffer

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

8.1 การสืบค้นข้อมูลทาง Bioinformatic เพื่อให้ได้สายรัหสพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับยีน *nptII*

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลยีน *nptII* โดยนำยีน *nptII* จากแหล่งต่างๆมาเปรียบเทียบพบว่ามีความแตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบในส่วนของสายรหัสเปปไทด์พบว่าสายรหัสเปปไทด์มีความเหมือนกันถึง 99% เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI สายรหัสเปปไทด์มีความเหมือนกัน 98-100% ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆคือ Riemerella anatipestifer, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas nitritireducens, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium รวมถึงเวคแตอร์ชนิดต่างๆกันอีกด้วย



ภาพที่ 4. แสดงภาพ Alignment สายรหัสเปปไทด์ของโปรตีน NPTII จากที่มาที่แตกต่างกัน

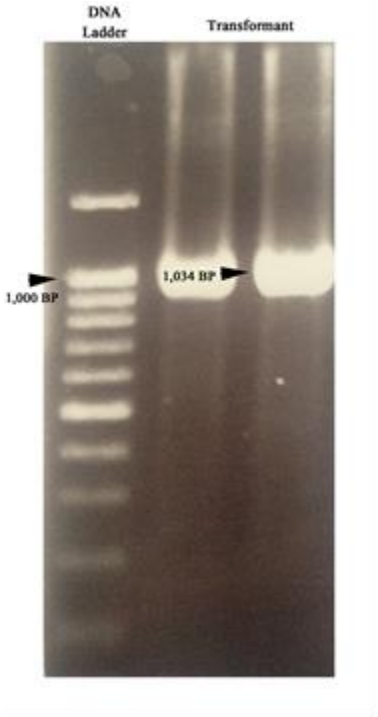
จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบโปรตีนซึ่งใช้เป็น Genetic marker ในพืช GM ที่ใช้โปรตีน NPTII สามารถดำเนินการได้ในเชิง Universal target เพราะมีการรักษาสายรหัสเปปไทด์ Sequence ไว้อย่างเข้มงวดในสิ่งมีชีวิตต่างๆกัน

เมื่อนำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมยีน *nptII* จากเวคเตอร์ pRI909 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า สายรหัสเปปไทด์มีความแตกต่างเพียง 3 ตำแหน่ง และไม่มีความแตกต่างในตำแหน่งอื่นๆซึ่งไม่มีผลต่อลักษณะโครงสร้างของโปรตีนและสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้เป็น Universal target ได้

8.2 การสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม nptII เพื่อเตรียมสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์

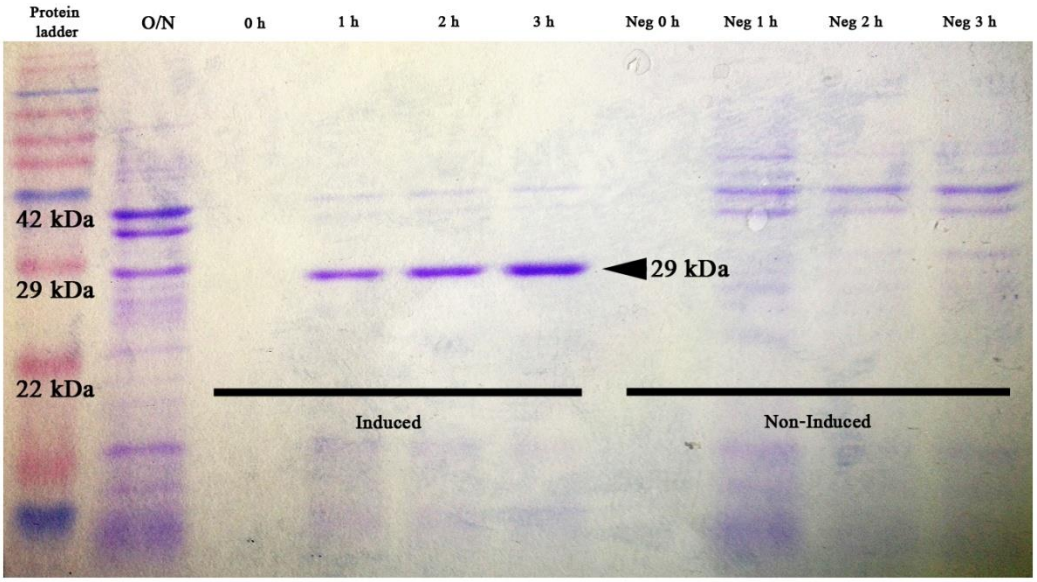
หลังจากโคลนยีน *nptII* และเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pLATE31 แล้วถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่ E-coli ชนิด DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณเวคเตอร์ที่ได้รับการดัดแปลงแล้วจึงตรวจสอบความถูกต้องพบว่าถูกต้องตามที่คาดการคือ ขนาดของยีนที่โคลน และขนาด Adapter เวคเตอร์ได้ขนาดคือประมาณ 1,034 bp

ภาพที่ 5 แสดง ผล colony PCR จาก Transformant pLATE31



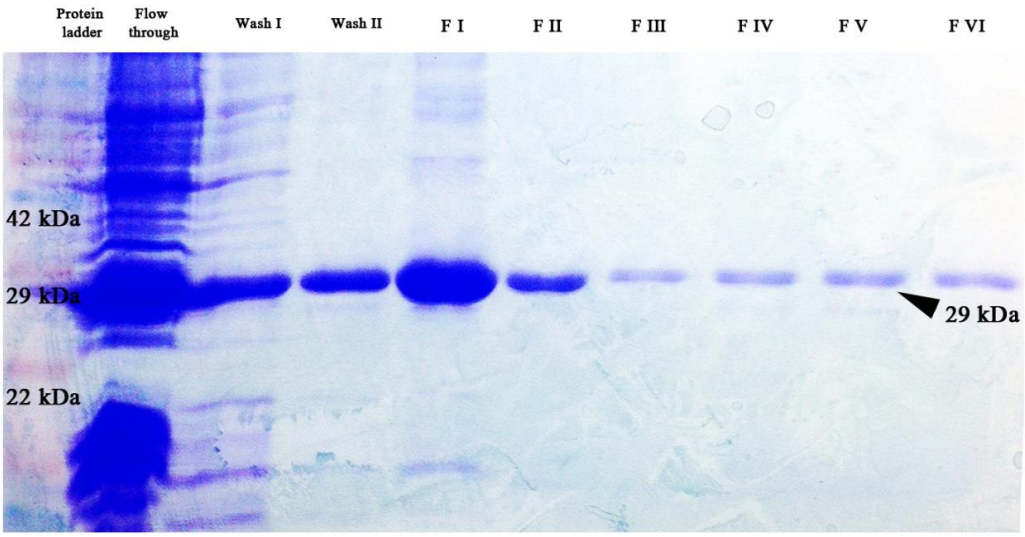
8.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII

ในขั้นตอนการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน (Induce) พบว่าการเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์โปรตีนเพียง 3 – 4 ชม. เพียงพอต่อการนำมาสกัดเอาโปรตีน NPTII โดยไม่มีผลต่อความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่าการตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ในแบคทีเรีย Transformant ที่ได้รับ vector pLATE31 มีประสิทธิภาพสูง ได้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการสังเคราะห์เพียงพอ



ภาพที่ 6. แสดงการวิเคราะห์ Protein Gels (SDS-PAGE) โดยเป็นการเทียบกันระหว่าง E.Coli BL21 transformant ที่ได้รับการกระตุ้นเพื่อให้ผลิตโปรตีนและที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในเวลา 3 ชั่วโมง

เมื่อเก็บ Fraction ทั้งหมดไปตรวจสอบโดย SDS-PAGE พบว่าสามารถชะโปรตีน NPTII ออกจากคอลั่ม Ni-NTA ได้เกือบทั้งหมดที่ Fraction 12 โดยใน Fraction อื่นหลังจากนั้นแถบไม่ปรากฏแถบโปรตีนให้เห็น จึงดำเนินการเก็บ Fraction 1-12 ไปผ่านการ Desalting โดยเครื่อง Purify protein ให้อยู่ในสารละลาย PBS แล้วนำไปเอาน้ำออกด้วย Dialysis tube และ Microsep Advance 10K จนได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

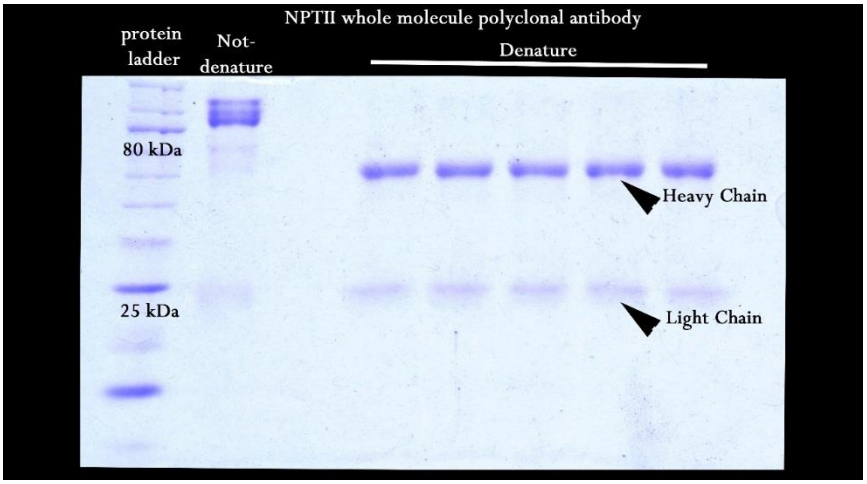


ภาพที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ Protein Gels (SDS-PAGE) แสดงให้เห็นการทำ NPTII protein (29 kDa) ให้บริสุทธิ โดย Ni-NTA resin จาก supernatant ของ BL21 E.Coli transformant ที่ได้รับการกระตุ้นให้ผลิตโปรตีน ในรูป Fraction 1-6, fraction 7-24 (ไม่ได้แสดง)

8.4 การสกัด IgG จากแอนตี้ซีรั่มโดยผ่านคอลั่ม HiTrap Protein A HP

ผลจากการสกัด IgG และหลัง Concentrate พบว่าได้ค่า Absorbance 1:6 ที่ 0.26 – 0.5 คิดเป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายได้ 1 - 1.6 mg/ml และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย Gel SDS-PAGE พบว่า Antibody ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถนำไปทดสอบกับโปรตีนชิปต่อไป

ภาพที่ 8. แสดงการวิเคราะห์ Polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการฉีดกระต่าย

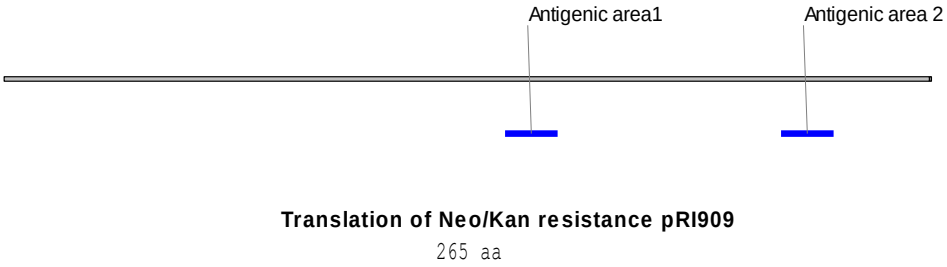


8.5 การสังเคราะห์โปรตีนแบบ Short peptide เพื่อใช้เป็น Antigen กระตุ้นการผลิตแอนติบอดี

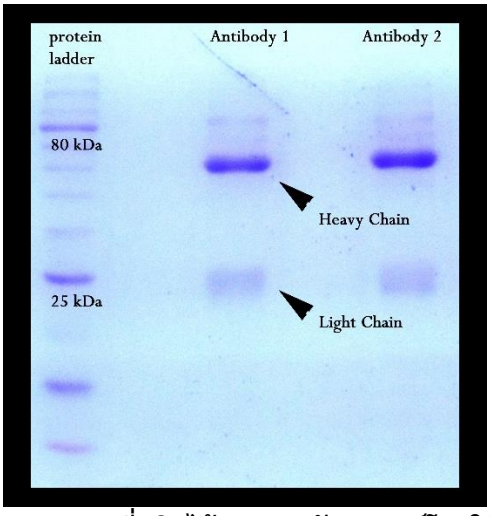
ดำเนินการสังเคราะห์สายโปรตีนขนาดสั้นสองเส้นและนำไปใช้เป็น Antigen เพื่อผลิต Polyclonal antibody เทียบกับแบบทั้งโมเลกุลโปรตีน

Antigenic area 1 : ARTRMEAGLVDQDDL (Peptide #1)

Antigenic area 2 : LATRDIAEELGGEWA (Peptide #2)



ภาพที่ 9 แสดง Translation feature ของยีน *nptII* และ antigenic area ซึ่งจะนำไปทำ protein synthesis



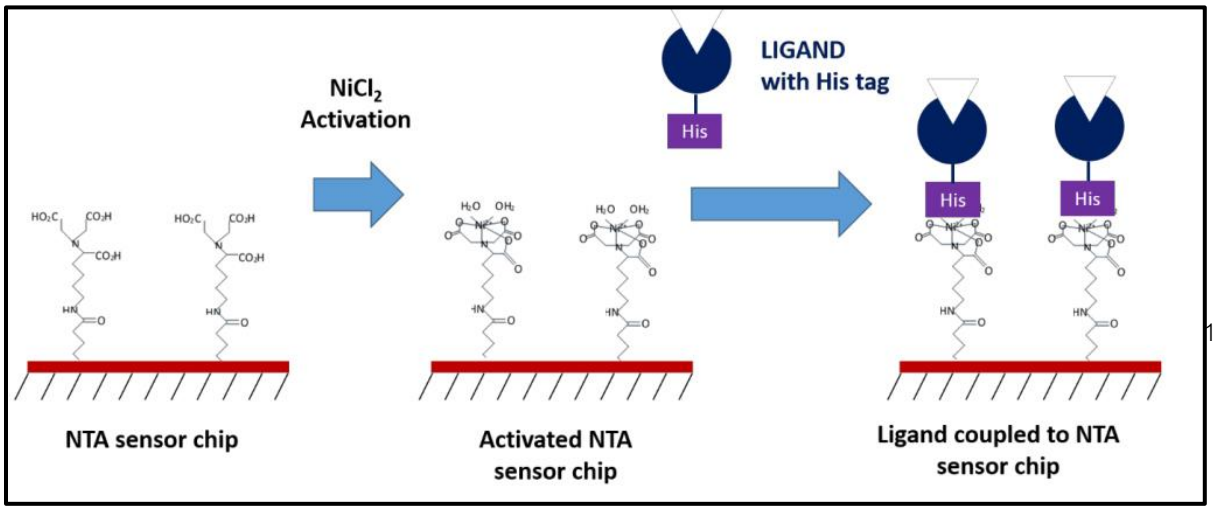
ภาพที่ 10.แสดง Polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ Peptide #1&2 เป็น antigen

เมื่อนำ Antibody ที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วย Gel SDS-PAGE พบว่า Antibody ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถนำไปทดสอบกับโปรตีนชิปต่อไป และความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 1 - 1.5 mg/ml การดำเนินการในขั้นต่อไปเป็นการนำ Antibody แบบทั้งสายโปรตีนเปรียบเทียบกับ Antibody ที่ได้จากการใช้ Peptide #1&2 เป็น antigen โดย การสร้าง Protein ชิป

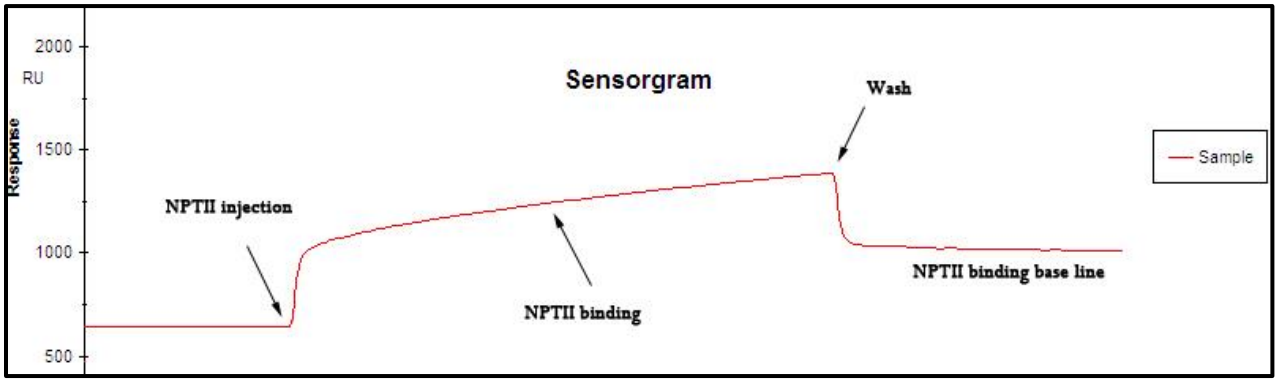
8.6 การทดสอบการจับกันของ Antibody และโปรตีน NPTII บน NTA ชิป

ดำเนินการ Activate NTA ชิป ด้วยสารละลาย $NiCl_2$ เพื่อให้ประจุของ Ni^{2+} จับกับสายโมเลกุลคาร์บอนบนชิป จากนั้นจึงฉีดโปรตีน NPTII ที่มีสายเปปไทน์ His tag ความเข้มข้น 10 µg/ml เข้าสู่ชิปเพื่อใช้เป็น ligand ในการทดสอบ

ภาพที่ 11 แสดง NTA ชิป activation โดย $NiCl_2$ และ capturing ของ NPTII ligand กับ Ni^{2+}

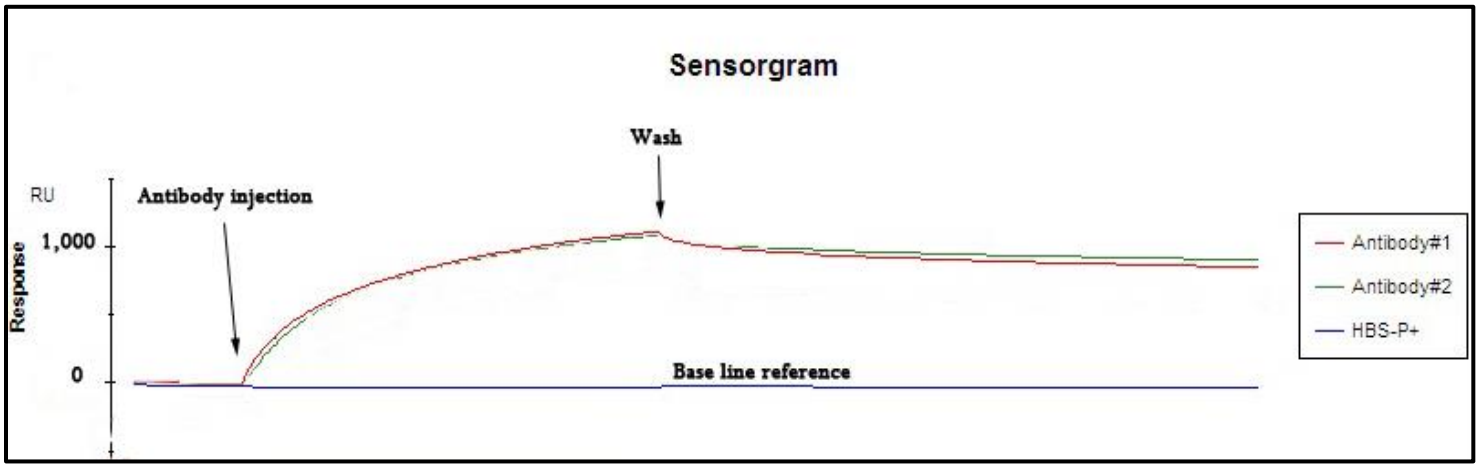


ภาพที่ 12 แสดง NPTII binding baseline ในการ Capturing ของ NPTII ligand กับ Ni^{2+}



จากการทดลองพบว่าการจับตัวกันของโปรตีน NPTII ที่ฉีดเข้าบนชิปมีความเสถียร ได้ค่า Response 450 RU แล้วจึงดำเนินการฉีด Antibody 1 และ 2 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับกันของ Antibody 1 และ 2 ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml จากการทดลองพบว่า Antibody ทั้ง 2 ชนิดสามารถจับกับ โปรตีน NPTII ได้ดีพอๆกัน โดยมีค่า Response ประมาณ 1,000 RU อย่างไรก็ดีในส่วนของ Antibody 1 พบว่าสามารถจับกับโปรตีน NPTII ได้เร็วกว่า Antibody 2 เล็กน้อย แต่ Antibody 1 มีความเสถียรในการจับกับโปรตีน NPTII น้อยกว่า Antibody 2 เมื่อสังเกตจากความเร็วในการ Wash โปรตีน NPT II หลุดออกจาก Antibody 1 เร็วกว่าเล็กน้อยเช่นกัน

ภาพที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบการจับกันของ Antibody 1 และ 2 กับ NPTII ligand.

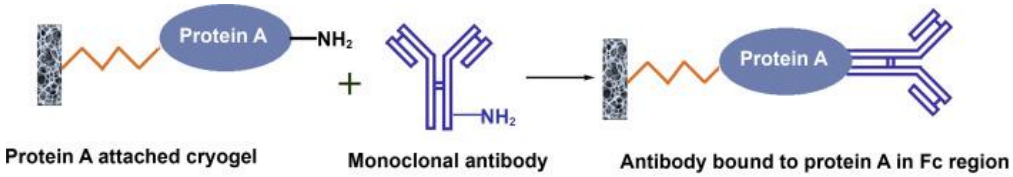


จากการทลองจึงสามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้ Antibody ทั้งสองในการตรวจจับ โปรตีน NPTII ได้ดีพอกัน แต่ Antibody 1 จับได้เร็วกว่าจึงอาจเหมาะสมกว่าในการนำไปพัฒนาบนชิป เพื่อตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้ต้องดำเนินการทดสอบ kinetic อีกครั้ง และต้องเปรียบเทียบกับ NPTII Antibody แบบ Whole molecule ด้วย

8.7 ปฏิกิริยาและการทำงานของโปรตีน A ชิป

โปรตีน A ชิป เป็นชิปที่เคลือบพื้นผิวทองคำด้วย Carboxymethylated dextran และยึดกับ recombinant Protein A (MabSelect™ SuRe ligand) โดยโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ชนิด IgG ได้ด้วยพันธะ Covalent บริเวณ Fc ของ Antibody

ภาพที่ 14 แสดงกระบวนการจับกันระหว่างโปรตีน A และ Antibody



จากนั้นเตรียมดำเนินการทดลองเพื่อหา Full Binding Kinetic Analysis ของ Antibodies เพื่อหาค่า binding kinetic parameters ต่างๆดังนี้ 1. Ka : Association rate 2. Kd: Dissociation rate และ 3. KD : Affinity constant โดยการนำ Antibody 1, 2 และ Polyclonal จากการฉีดกระต่ายแต่ละชนิดมาจับกับโปรตีน A บน Protein A ชิป แล้ว Run Antigen Recombinant Protein NPTII เทียบที่อย่าง 6 ค่าความเข้มข้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแม่นยำขอข้อมูล โดยแอนติบอดีที่ดีจะต้องมีค่า Affinity สูง และยึดติดแน่นหรือหลุดยาก (Low off-rate)

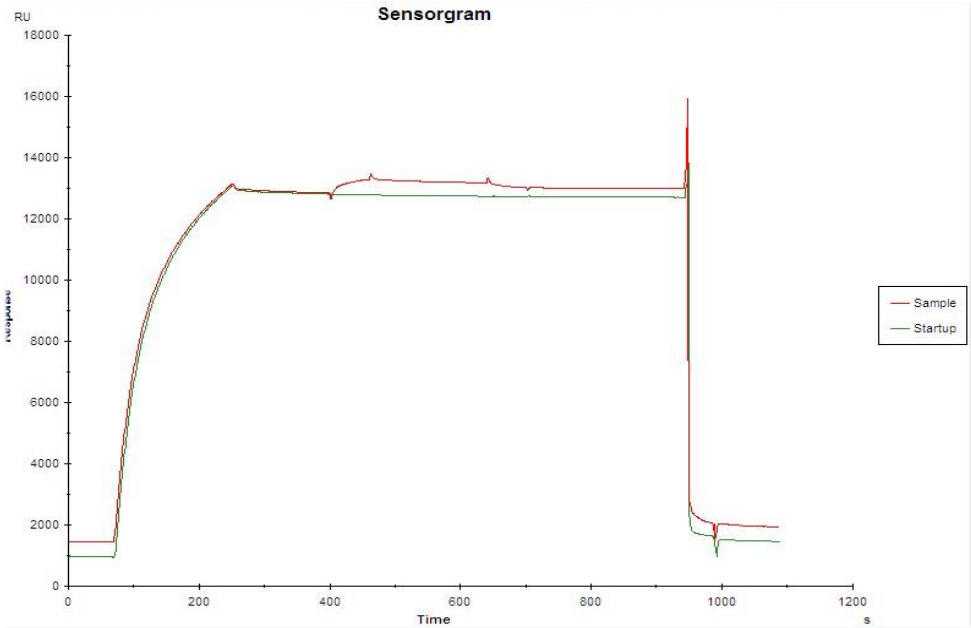
8.8 การทดสอบการจับของโปรตีน NPTII และ และ Polyclonal 1# โดยชิปโปรตีน A

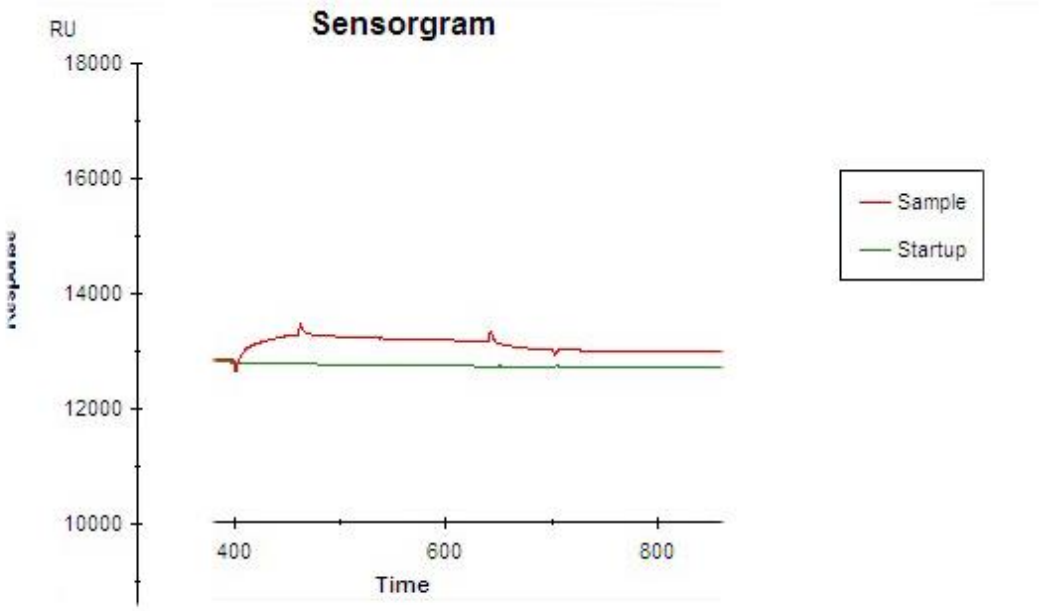
นำ Polyclonal 1# ที่ได้รับการ desalting แล้วใน NaH_2PO_4 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/ml และ โปรตีน NPTII 10 µg/ml ทดสอบร่วมกับชิปโปรตีน A Run ระบบด้วย Buffer HBS-EP$^+$ และ Elute โดย Buffer Glycine-HCl, pH 1.5 ตั้งโปรแกรมเครื่องให้เป็นการ Detect โดย Ligand with analyst จากการทดลองได้ผลดังนี้

ภาพที่ 15 แสดง Sensogram ที่ได้จากการนำ Polyclonal 1# ไปทดสอบกับโปรตีน NPTII

จาการทดลองสามารถนำมาคำนวณหาค่า Binding constant หรือค่าAssociation/Disassociation constant ได้ หรือที่เรียกว่าค่า constant K ซึ่งเป็นค่าคงที่ที่บอกถึงการจับกันหรือการหลุดออกจากกันของโมเลกุล เช่น Receptor (R) และ ligand (L) โดยมีสมการดังต่อไปนี้

$$R + L \rightleftharpoons RL$$





ภาพที่ 16 แสดง Sensogram ขยายที่ได้จากการนำ Polyclonal 1# ไปทดสอบกับโปรตีน NPTII

โดยเมื่อ Inject แอนติบอดี 1# เข้าสู่ระบบพบว่าชิปโปรตีน A จับกับแอนติบอดี 1# ถึงระดับ 11,500 RU ภายในเวลา 180 s (ตำแหน่ง A.) ได้ค่า Ka = 63 RU/s จากนั้นระบบจึงฉีดโปรตีน NPTII (ตำแหน่ง B.) พบว่าแอนติบอดี 1 สามารถจับกับโปรตีน NPTII และค่า RU เพิ่มขึ้น 400 RU ภายในเวลา 60 วินาที ได้ค่า Ka = 6.66 RU/s และเมื่อทำการ Washing (ตำแหน่ง C.) พบว่าค่า RU ลดลงจาก 400 มาเท่ากับเส้น Reference ใช้เวลา 720 s ค่า Kd ของโปรตีน NPTII และ แอนติบอดี 1# มีค่าเท่ากับ 0.5 RU/s แสดงให้เห็นว่าการจับกันของโปรตีน NPTII และ แอนติบอดี 1# สามารถตรวจจับ โปรตีน NPTII ซึ่งเป็น Recombinant protein ได้ดี และมีความเสถียรมากโดยใช้เวลาในการหลุดออกจากกันนานโดยมีค่า Kd ต่ำ (0.5 RU/s)

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า แอนติบอดี 1# สามารถนำมาใช้ในการตรวจจับ โปรตีน NPTII บนชิปได้และมีค่า Ka = 6.66 RU/s และ Kd =0.5 RU/s ซึ่งในขั้นต่อไปจะเป็นการทดสอบกับโปรตีนในธรรมชาติที่ไม่บริสุทธิ์และหาค่า LOD จนถึงทดสอบความใช้ได้ต่อไป และทดสอบค่า kinetic แบบ Different concentration series

8.9 การตรึงแอนติบอดีบน ชิป CM5 แบบโควาเลนท์เพื่อใช้ตรวจวีเคราะห์โปรตีน NPTII

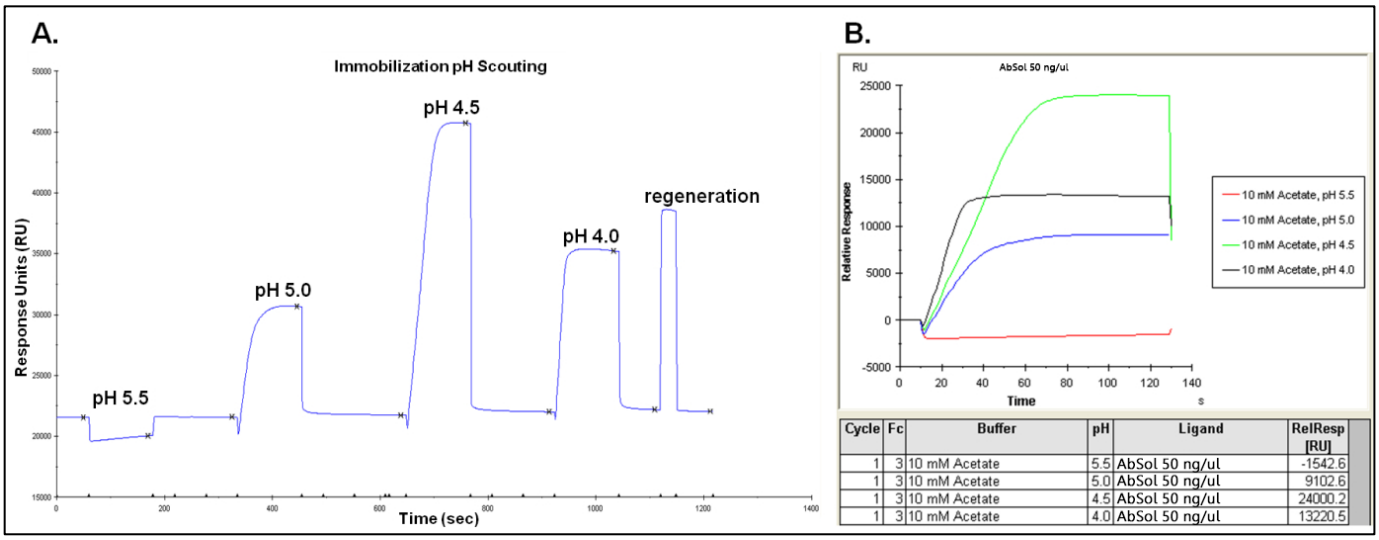
นำ ชิป CM5 ซึ่งประกอบด้วยหมู่ carboxyl สำหรับการทำปฏิกิริยา amine coupling มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมสารละลายสำหรับ amine coupling โดยผสม EDC และ NHS ในน้ำกลั่นกรองด้วย filter 0.2 micron ปริมาตร 10 ml เพื่อให้ได้สารละลาย EDC 400 mM และ สารละลาย NHS 100 mM ตามลำดับ

นำสารละลาย 1.0 M ethanolamine-HCl, HBS-EP buffer, acetate buffers และ regeneration scouting kit มาตั้งไว้ที่อุณภูมิห้อง เพื่อการทดลองในขั้นต่อไป

8.10 การทดสอบค่า pH เพื่อการตรึง Antibody บน ชิป CM5

การทดสอบค่า pH ในการตรึงแอนติบอดีบนบน ชิป CM5 ช่วยให้สามารถระบุค่า pH (optimal pH) ที่เหมาะสมที่จะใช้และค่าความแรงของประจุไฟฟ้า หรือ ionic strength ได้ การทดสอบค่า pH ในขั้นตอนนี้จึงจำเป็นในกรณีที่ทำการทดลองกับ ชิป ซึ่งเคลือบด้วย carboxymethylated dextran matrix (CM) โดยดำเนินการดังนี้

1. นำ ชิป CM5 ซึ่งประกอบด้วยหมู่ carboxyl สำหรับการทำปฏิกิริยา amine coupling ใส่เข้าเครื่อง Biacore
2. เตรียมสารละลาย HBS-EP buffer เป็น running buffer
3. เตรียมสารละลายแอนติบอดี 100 µl ความเข้มข้น 50 ng/µl ใน 10 mM acetate buffers ที่ pH ที่แตกต่างกัน (4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5)
4. ฉีดสารละลายแอนติบอดี ที่ pH แตกต่างกันเข้าสู่ระบบ 80 µl และตรวจสอบค่า pH ที่ให้ค่า RU สูงที่สุด แล้วล้าง ชิป ด้วย running buffer
5. ฉีดสารละลาย ethanolamine-HCl ความเข้มข้น 1 M 220 µl เข้าระบบเพื่อล้างชิป



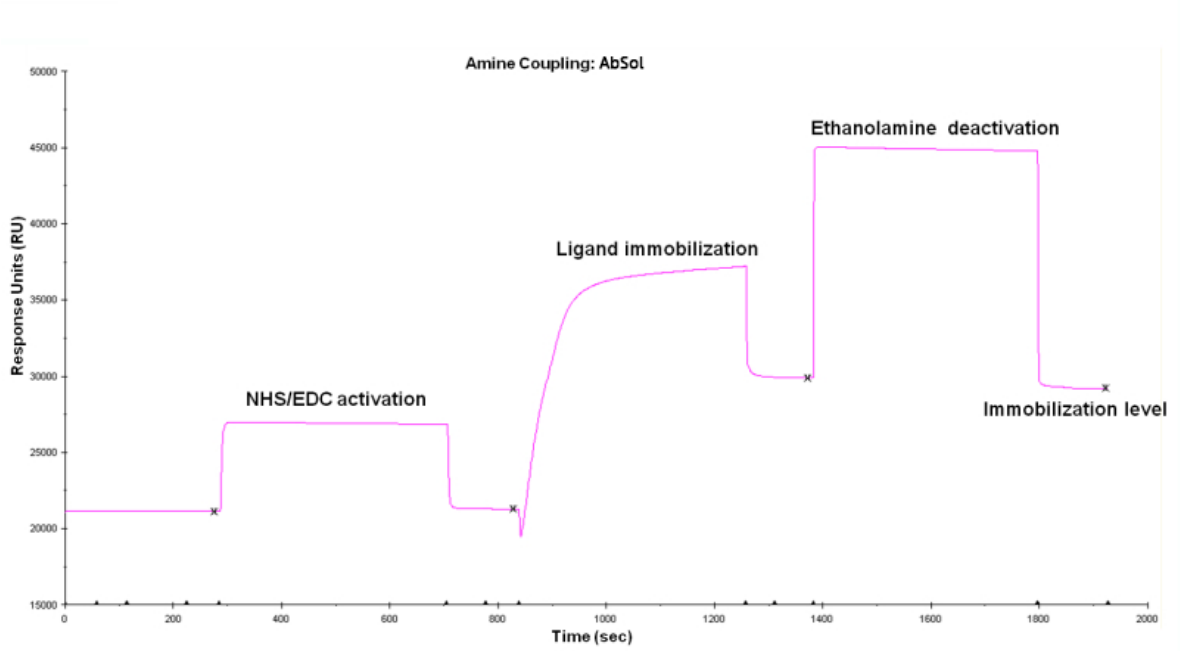
Cycle	Fc	Buffer	pH	Ligand	RelResp [RU]
1	3	10 mM Acetate	5.5	AbSol 50 ng/ul	-1542.6
1	3	10 mM Acetate	5.0	AbSol 50 ng/ul	9102.6
1	3	10 mM Acetate	4.5	AbSol 50 ng/ul	24000.2
1	3	10 mM Acetate	4.0	AbSol 50 ng/ul	13220.5

ภาพที่ 17 A. แสดง RU sensogram ของแต่ละ antibody solution ที่ pH แตกต่างกัน B. แสดง RU accumulation ของแต่ละ antibody solution ใน 10 mM Acetate ที่ pH แตกต่างกัน เมื่อเวลาผ่านไป

จากการทดลองพบว่าที่ pH ต่างกัน แอนติบอดีมีความสามารถในการเข้าไปจับกับ ชิป CM5 ต่างกันโดยที่ pH 5.5 พบว่าแทบไม่มีการสะสมของแอนติบอดีบน ชิป เลย ในขณะที่ pH 5 และ 4.5 มีการสะสมของ Antibody บน ชิป เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 9,102.6 RU และ 24,000.2 RU และลดลงที่ pH 4 13,220 RU จึงสามารถสรุปได้ว่าที่ pH 4.5 เป็นค่า pH ที่ดีที่สุดที่สามารถใช้ สำหรับสารละลาย Antibody ในการตรึงบน ชิป CM5

8.11 การตรึง Antibody บน ชิป CM5

1. เตรียมสารละลาย Antibody ใน 10 mM Acetate ที่ pH 4.5
2. เตรียมหลอดสารละลาย EDC, NHS และ ethanolamine-HCL
3. เมื่อเริ่มเดินเครื่อง ระบบจะฉีด สารละลาย EDC, NHS ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 เพื่อ Activate ผิวของ ชิป เพื่อการตรึง Antibody จากนั้นสารละลาย Antibody จะถูกฉีดเข้าไป และ ethanolamine-HCl จะเป็นตัวชะล้าง Antibody ส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับ ชิป

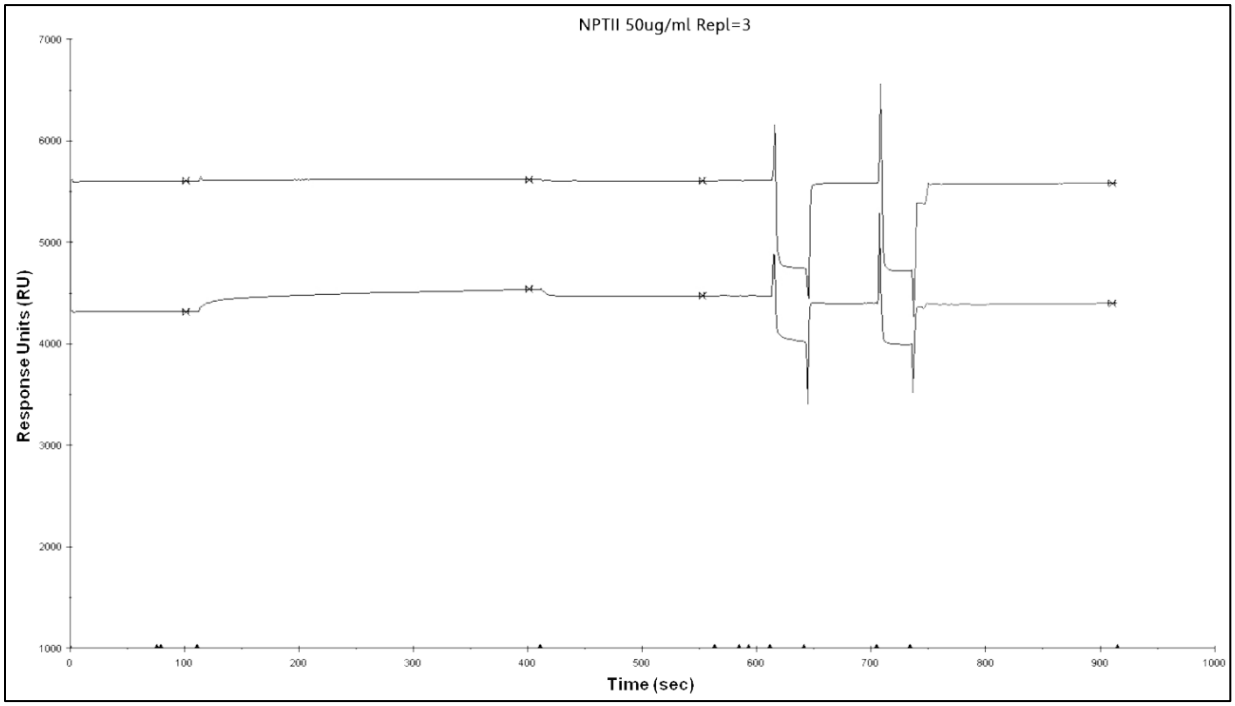


ภาพที่ 18. แสดง Sensorgram ของ ligand immobilization การตอบสนองการตรึงของ Antibody (Ligand) บน ชิป แสดงถึง ปริมาณของ Antibody (ligand) ที่ตรึงกับ ผิวของ ชิป หลังจากการทำปฏิกิริยา

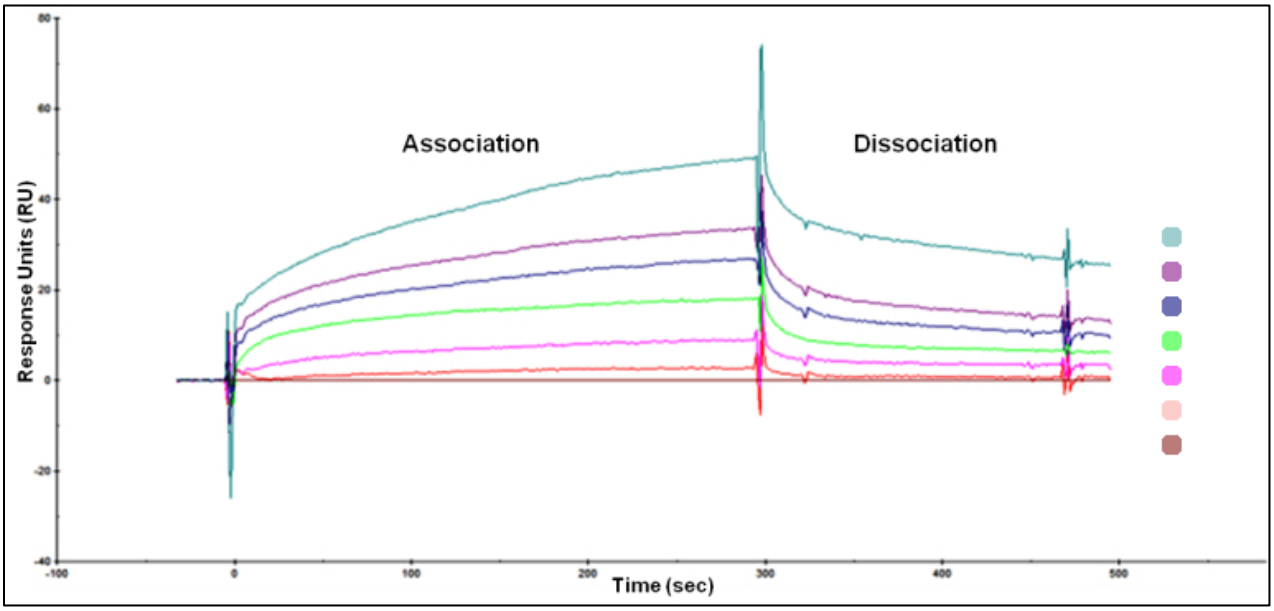
จากการทดลองพบว่า Antibody สามารถตรึงกับ ชิป CM5 แบบ Covalent หรือแบบถาวร โดยมีค่า RU ที่สะสมบน ชิป CM5 Response bound 8,607 RU และหลังจากล้างด้วย Running buffer ได้ Response final 8,083.5 RU

8.12 การทดสอบความสามารถในการจับโปรตีน NPTII โดย Antibody ชิป CM5

ดำเนินการทดสอบ Regeneration conditions (ผลไม่ได้แสดง) พบว่าใช้ 150 mM NaOH เป็นเวลา 5 นาที ให้ผลการชะล้าง Analyst ที่ดีที่สุด จากนั้นเตรียม โปรตีน NPTII ที่สังเคราะห์ต่อเนื่องในปริมาณมากและทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Colum NTA แล้ว นำมา Dilute เป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml เพื่อทดสอบความสามารถในการจับโปรตีน NPTII โดย Antibody ชิป CM5 โดยใช้ Blank control เป็นช่อง ชิป ที่ไม่มีการตรึง Antibody และ Negative control เป็น Protein BSA 50 µg/ml โดยระบบจะฉีดตัวอย่างเป็นรอบ ตามด้วย Running buffer และ Regeneration buffer เพื่อขึ้นรอบใหม่ Flow rate 30 µl/min, Injection time 5 min โดยแต่ละความเข้มข้นดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 19 แสดงข้อมูลดิบ Raw sensorgram ของ binding assay หรือการจับกันระหว่าง Antibody และ protein NPTII 50 µg/ml



ภาพที่ 20 แสดง Final sensorgram ของการจับกันระหว่าง Antibody และ protein NPTII ที่ความเข้มข้นต่างๆ generated โดย BIAevaluation software

จากการทดลอง เมื่อนำ Sensogram ซึ่งเป็น Binding assay แบบ Raw data ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BIAevaluation สามารถสร้างกราฟ Binding assay ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่า Antibody มีความจำเพาะเจาะจง และไม่พบ signal ใดๆ ในส่วนของ Negative control BSA นอกจากนี้ Antibody CM5 ชิป สามารถตรวจจับโปรตีน NPTII ได้ถึง รกล่าวสามารถนำไปใชะดับความเข้มข้น 5 µg/ml หรือ 5 ng/µl

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง สามารถผลิต Recombinant โปรตีน NPTII และทำให้บริสุทธิในปริมาณมากได้ในคุณภาพที่อยู่ในระดับดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถนำไปใช้กระตุ้นในการผลิต Polyclonal antibody และเมื่อนำ Recombinant โปรตีน NPTII มาทดสอบการเชื่อมกับชิป NTA พบว่า His-Tag ที่อยู่บน Recombinant โปรตีนสามารถจับกับ Ni^{2+} ได้เป็น Ligand ที่ใช้ทดสอบการจับกันของโปรตีน NPTII และความสามารถในการจับของ Antibody ซึ่งเมื่อนำ Polyclonal Antibody ที่ทำให้บริสุทธิมาใช้เชื่อมกับโปรตีน A พบว่าโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ที่ผลิตได้ทุกชนิดและเปลี่ยนเป็น Ligand ซึ่งสามารถจับกับ Analyte ซึ่งเป็นโปรตีน NPTIII ได้ และจากการนำ Antibody มาทำปฏิกิริยา Amine coupling เพื่อเชื่อม Antibody แบบถาวรกับ ชิป CM5 และทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน NPTII พบว่าที่ pH 4.5 มีการสะสมของ Antibody บนชิปมากที่สุด และเมื่อทดสอบการตรวจวับกับโปรตีน NPTII สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 μg/ml หรือ 5 ng/μl แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

โปรตีนชิปในการตรวจจับหาโปรตีนหรือโมเลกุลเป้าหมาย โดยใช้ Antibody หรือ Ligand ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากและสามารถตรวจหาสารหรือโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้โดยวิธีการที่ไม่ซับซ้อน (เมื่อผลิตชิปและทดสอบความใช้ได้ของชิปเสร็จแล้ว) และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจมีราคาถูก เครื่องมือใช้ได้ง่าย ผู้ปฏิบัติงานสามารถเรียนได้ภายใน 1 วัน และใช้สารปริมาณน้อยสามารถนำชิปไปพัฒนาและสร้างเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นอกจากการตรวจวิเคราะห์ด้าน GMOs สามารถนำไปพัฒนาใช้กับการตรวจวิเคราะห์ด้านอื่นๆ ได้อีกเช่นกันเช่น การตรวจหาโรคพืชที่ปนเปื้อนในตัวอย่างสินค้าทางการเกษตร การตรวจหาสารเคมีผนเปื้อนหรือสารสำคัญทางการเกษตรเป็นต้น

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

12.เอกสารอ้างอิง

Beck E., Ludwig G., Auerswald E. A., Reiss B., Schaller H. 1982.Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Volume 19, Issue 3, Pages 327–336.

Benoit P. W., Donahue D. W. 2003.Review Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment. J Food Prot.; 66(10):1935-48.

Bevan M. W., Flavell R. B. & Chilton M.-D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature (London) 304, 184–187.

Chinowsky T. M., Soelberg S. D., Baker P., Swanson N. R., Kauffman P., Mactutis A., Grow M. S., Atmar R., Yee S. S., Furlong C. E. 2007.Portable 24-analyte surface Plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. Biosens Bioelectron. Apr 15; 22(9-10):2268-75.

EFSA.2009. Scientific opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified paltns" European Food Safety Authority 1034: 1-82.

Dongmei H., Scott R. F., Johnny X. H., Xixia D., Liwen Q., Yuxian P., Yue C., Jing J., Catriona M. , Joe B., Xiaoyan C. and Matthew A. C. 2013. Comparison of surface Plasmon resonance, Resonant Waveguide Grating Biosensing and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Evaluation of a Dengue Virus Immunoassay. Biosensor, 3, 297-311

Florence C. –G., Florian H., Philippe K., Axel-Claude G. 25 July 1981. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. Journal of Molecular Biology Volume 150, Issue 1, Pages 1–14.

Gyeong S. B., Suhyeong Cho., Byung-Gee K. 15 December 2005. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. Volume 21, Issue 6, Pages 863–870.

Jennifer R. N. and Kyu S. C. 2008. NPTII ImmunoStrip® for the Rapid Detection of the Selectable Marker Neomycin Phosphotransferase II in Transgenic Cotton. Beltwide Cotton

Conferences January 8-11, Gaylord Opryland Resort and Convention Center Nashville, Tennessee

Jimenez A., and Davies J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces. Nature (London) 287:869-871.

Lu Y., Xu W., Kang A., Luo Y., Guo F., Yang R., Zhang J., Huang K. 2007. Prokaryotic expression and allergenicity assessment of hygromycin B phosphotransferase protein derived from genetically modified plants. J Food Sci. Sep;72(7):M228-32.

Mohamed F., Lydia F. and Lorenzo B. 2010. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. . BMC Biotechnology, 10:53 doi:10.1186/1472-6750-10-53

Roland J. N., John M. M., Robert G. B. 1992. Evaluation of an ELISA assay for rapid detection and quantification of neomycin phosphotransferase II in transgenic plants. Molecular Biology Reporter August, Volume 10, Issue 3, pp 263-272

Scott D., Soelberg R. C., Stevens A. P., Limaye and Clement E. F. 2009. Surface Plasmon resonance (SPR) Detection Using antibody-Linked Magnetic Nanoparticles for Analyte Capture, Purification, Concentration and Signal Amplification. Anal Chem. Mar 15; 81(6): 2357–2363.

Shingo N., Rui Y., Takeshi O. and Kiyoshi T. 2013. Sensitive Detection of Capsaicinoids Using a surface Plasmon resonance Sensor with Anti-Homovanillic Acid Polyclonal Antibodies. Biosensor, 3, 374-384

Stevens R. C., Soelberg S. D., Near S., Furlong C. E. 2008 Sep 1. Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface Plasmon resonance Biosensor system. Anal Chem.; 80(17):6747-51.

Straub T. M., Dockendorff B.P., Quiñonez-Díaz M.D., Valdez C.O., Shutthanandan J. I., Tarasevich B. J., Grate J. W., Bruckner-Lea C. J. 2005 Sep. Automated methods for multiplexed pathogen detection. J Microbiol Methods. 62(3):303-16.

Suratman A., Ughude J. O. and Sismindari. 2013. Detection of nptII Gene and 35SCaMV Promoter in Tomatoes (Solanum lycopersicum L.). J.Food Pharm.Sci. 1 ,10-13

Yi X., Arica A. L., Alan J. H. and Kevin W. P. August 26, 2005. Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor† Volume 44, Issue 34, pages 5456–5459.