รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	พงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	อรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	ศรีเมฆ ชาวโพงพาง	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
	ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน *CrylAb/Ac* เพื่อตรวจข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 อย่างรวดเร็ว โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ยีน *CrylAb/Ac* ของข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 ขนาด 1,845 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® แล้วโคลนเข้าสู่ pET 200/D-TOPO® ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB ซึ่งมีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1 % ชักนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยเติมสาร IPTG ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มาผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน โดยใช้ชุด nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin ตรวจสอบขนาดและปริมาณของโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน นำโปรตีนที่ได้ไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย สกัด IgG โดยใช้ชุดสกัดโปรตีน A ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 100 mM Na_2HPO_4 pH 7.5 นำ IgG เชื่อมต่อกับ colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร แบบ neary covalent

โดยใช้ IgG-linker ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร ตกตะกอน gold conjugated IgG ใน Diluent buffer พ่น gold conjugated IgG อัตราส่วน 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บนแผ่น conjugate pad ชนิด glass fiber grade 8964 บริเวณ control line ใช้ GAR 1:2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line ใช้ IgG เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร พ่นลงบนแผ่นเมมเบรน Unisart 140 นำเมมเบรนและ conjugated pad อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ประกอบชุดตรวจสอบ ซึ่งประกอบด้วย sample pad, conjugate pad, membrane และ Absorption pad ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบโปรตีน Crylab/Ac บริสุทธิ์ที่ 62.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสามารถตรวจสอบโปรตีน Crylab/Ac ที่อยู่เซลล์แบคทีเรียได้เช่นกัน ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่สอดคล้องกับการใช้ชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ที่มีจำหน่ายทางการค้า และการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA

6. คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย มีการผลิตขึ้นเพื่อบริโภคและส่งออกต่างประเทศ ซึ่งประเทศไทยถือเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุดของโลก ข้าวไทยถูกส่งออกไปยังทวีปแอฟริกา (ประมาณ 54%), ทวีปเอเชีย (21%), ตะวันออกกลาง (10%), ยุโรป (7%), อเมริกา (6%), อินโดนีเซีย (2%) โดยประเทศที่นำเข้าข้าวไทยมากที่สุดเรียงตามลำดับดังนี้ 1) ไนจีเรีย 2) แอฟริกาใต้ 3) เบนิน 4) ไอเวอรี่ โคสต์ 5) สหรัฐอเมริกา 6) เซเนกัล 7) จีน 8) อิรัก 9) ฮ่องกง และ 10) ญี่ปุ่น (หอการค้าไทยและสำนักงานมาตรฐานสินค้านำเข้าและส่งออก, 2552) กลุ่มประเทศที่ส่งออกข้าวรองลงมา คือ เวียดนาม อินเดีย ปากีสถาน และจีน ตามลำดับ ข้าวในประเทศไทยเป็นข้าวที่มีคุณภาพและเป็นที่น่าเชื่อถือของผู้จัดหาข้าวป้อนสู่ตลาดโลกและอุตสาหกรรมข้าว เนื่องจากในยุคปัจจุบันของการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพหรือพืชจีเอ็มโอที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศผู้นำในการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพ ได้มีการพัฒนาข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่มีความต้านทานยาฆ่าหญ้า เช่น ข้าวลิเบอร์ตี้ลิ้ง (Liberty Link, LL) โดยบริษัท ไบเออร์ (Bayer) (Bethell, 2002) ข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่นำมาใช้ในทางเภสัชวิทยา ประเทศจีนและสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ที่มีศูนย์วิจัยตั้งอยู่ภายในสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ ได้พัฒนาข้าวบีที (Bt Rice) เพื่อให้มีความต้านทานแมลง และยังมีข้าวสีทอง (Golden Rice) ซึ่งเป็นข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการตัดต่อยีนเพื่อเพิ่มระดับของสารเบต้าเคโรตีน (International, 1977) ได้มีการปลูกทดสอบในประเทศฟิลิปปินส์, บังคลาเทศ, อินเดีย, อินโดนีเซีย และเวียดนาม

ในปัจจุบันมีข้าวดัดแปรพันธุกรรม 3 ชนิดเท่านั้น ที่ได้รับการขึ้นทะเบียน ได้แก่ LL601, LL06/LL62 ข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL06/LL62 ได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศออสเตรีย, แคนนาดา, เม็กซิโก และสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศเดียวที่ที่มีการอนุญาตให้มีการขึ้นทะเบียนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL601 ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมามีเหตุการณ์การปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม ข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ออกสู่สิ่งแวดล้อมใน

สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีผลกระทบก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมข้าว ข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ถูกพบว่าปนเปื้อนในระบบการค้าข้าวในทวีปยุโรป, แอฟริกา และเอเชีย เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 ทำให้หลายประเทศในทวีปยุโรปและญี่ปุ่นระงับการนำเข้าข้าวเมล็ดยาวจากสหรัฐอเมริกา คาดการณ์ว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 741-1,285 ล้านดอลลาร์สหรัฐ จากเหตุการณ์ที่เกิดการปนเปื้อนของข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ทำให้ประเทศญี่ปุ่นเพิ่มการตรวจสอบการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรมให้ครอบคลุมข้าวทุกชนิดที่นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ซึ่งรวมถึงข้าวเมล็ดกลางและเล็ก รวมถึงญี่ปุ่นจะมีการขอให้มีการตรวจสอบข้าวทุกชนิดที่มีการนำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการตรวจพบการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL601 ในเอเชีย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ไม่อนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมภายในประเทศ แต่สืบเนื่องจากปัจจุบันเป็นยุคของพืชเทคโนโลยีชีวภาพ มีการวิจัยพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมกันหลายประเทศในแถบเอเชีย อย่างเช่น ประเทศจีน ซึ่งเป็นประเทศที่กำลังขยายฐานการผลิตวัตถุดิบสินค้าเกษตรมายังกลุ่มประเทศที่มีพื้นที่ใกล้เคียงกับประเทศไทย อาจมีการลักลอบนำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรม อย่างเช่น ข้าว Bt63 เข้ามาภายในประเทศ ถ้าเกิดกรณีดังกล่าวขึ้น จะมีมูลค่าความเสียหายเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล จากขั้นตอนการสุ่มเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ การดูแลรักษา แรงงาน และอื่น ๆ ซึ่งนั่นหมายถึง หากเกิดการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรมจะต้องแบกรับต้นทุนในการจัดการให้มั่นใจว่าข้าวไทยปลอดจากจีเอ็มโอ และส่งผลกระทบให้ประเทศคู่ค้า วางมาตรการการกีดกันทางการค้า หรือยุติการนำเข้าข้าวจากประเทศไทย

ปัจจุบันมีนักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบโปรตีนของพืชดัดแปรพันธุกรรม Yang, 2005 ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบ hygromycin B phosphotransferase (HPT) ในข้าวดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA ด้วยเหตุนี้ทางกรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานหลักในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจีเอ็มโอในพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการคิดค้นเทคโนโลยีในการตรวจสอบ เพื่อให้มีความสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ขนิษฐาและคณะ, 2554 ได้พัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready) โดยอิมมูโนโครมาโตกราฟี ซึ่งชุดตรวจสอบที่มีการวิจัยพัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้การตรวจคัดกรองวัตถุดิบในเบื้องต้น ลดการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นหน่วยงานต้นแบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ นำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับตรวจสอบ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova)
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge Beckman)
3. ชุดทำให้เซลล์แตก (Bandelin HD3200)
4. ชุดตรวจสอบและเคลื่อนย้ายเจลสู่เมมเบรน (Biorad Trans-Blot Sytem)
5. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Binder)
6. ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Thermo scientific)
7. ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier)
8. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Bosh)
9. เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo scientific)
10. เครื่องผลิตชุดตรวจสอบ (Biodot)
11. อุปกรณ์ สารเคมี ในการสกัดและเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย
12. อุปกรณ์ สารเคมี ในการผลิตและตรวจสอบคุณภาพของแอนติบอดี
13. อุปกรณ์ สารเคมี ในการตรวจสอบขนาดและคุณภาพของโปรตีน
16. อุปกรณ์ สารเคมี ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ

วิธีการ

1. การสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูลของข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 รวบรวมข้อมูลของรหัสพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกส่วนของยีนข้าวที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่ต้านทานแมลง คัดเลือกบริเวณของยีนดังกล่าว สังเคราะห์ยีน ขนาด 1,845 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® แล้วโคลนเข้าสู่ pET 200/D-TOPO® และถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย สกัดพลาสมิดลูกผสมตามวิธีการของ Sambrook and Russell, 2001 ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สังเคราะห์อีกครั้ง ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย

2. การเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียและทำบริสุทธิ์ recombinant protein CryIAb/Ac

2.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณ Recombinant protein CryIAb/Ac ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน CryIAb/Ac มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ Recombinant protein CryIAb/Ac โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 transformants CryIAb/Ac-BL21 ในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 220 รอบต่อนาทีนานข้ามคืน (14-16 ชั่วโมง) เพื่อจะใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น จากนั้นเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1% (final concentration) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 220 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง แล้วชักนำเซลล์ด้วยสาร IPTG เติมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ชักนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนในระยะเวลาต่างกัน เพื่อหาว่าควรชักนำเซลล์ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลานานเท่าใดเซลล์ถึงจะผลิตโปรตีนลูกผสมออกมามากที่สุด

2.2 การทำโปรตีน CryIAb/Ac ให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* CryIAb/Ac-BL21 transformants ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (non induce) จากนั้นเติมสาร IPTG ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ลงในแต่ละ flask (induce) แล้วเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรียไปทำการแยกและทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ ตามวิธีในคู่มือการแยกและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (The QIA expressionist ของบริษัท QIAGEN) เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวมตะกอนใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ 1xPBS (pH 7.4) ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเซลล์เปียกหนักประมาณ 1.5 กรัม เติม lysozyme เพื่อช่วยให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแตกได้ดีขึ้น เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เก็บแช่ไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เอาออกมาวางที่อุณหภูมิห้องให้เซลล์ละลาย ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก โดยการ Sonication (ตั้งค่า: power = 30%, นาน 5 นาที) นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใส (supernatant) กับตะกอน (pellet) ไปตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนอยู่ในส่วนตะกอน (pellet) จึงนำส่วนตะกอนไปละลายในบัฟเฟอร์ B (pH 8) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติม β-Mercaptoethanol ปริมาตร 21 ไมโครลิตรต่อสารละลายเซลล์ 15 ml ทำให้โปรตีนละลายออกมาในสารละลายมากที่สุดโดยการ Sonication อีกครั้ง (ตั้งค่า: power= 30%, นาน 5 นาที) นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใส (supernatant) มาทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์โดย nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin โดย

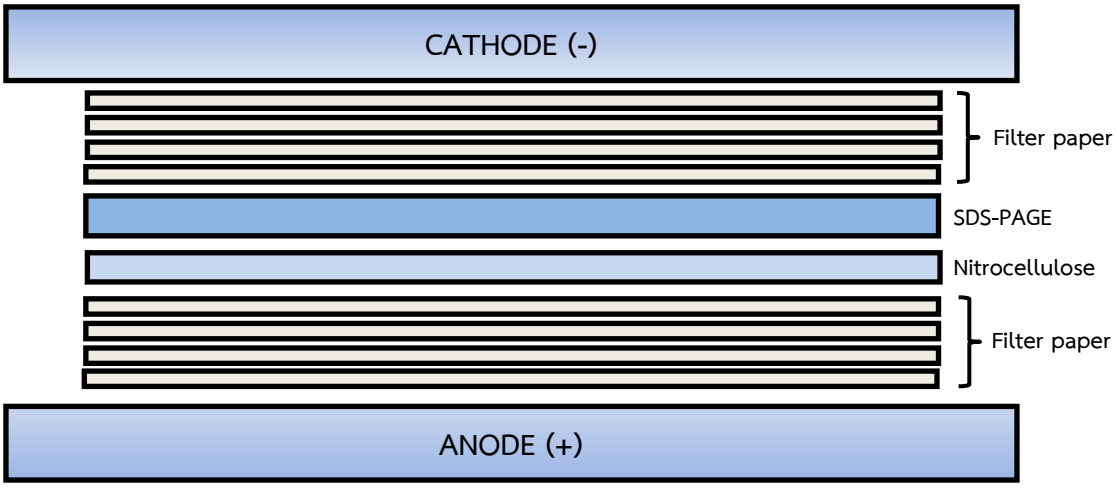
บรรจุ column ด้วย Ni-NTA ปริมาตร 4 มิลลิลิตร รอให้ Ni-NTA จัดเรียงตัว ประมาณ 20 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย dH_2O 10 มิลลิลิตร แล้วล้างคอลัมน์ด้วย buffer B ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin (12 มิลลิลิตร) จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดมาผ่าน column เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ (flow through) ล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) ที่เติม tween 20 ให้มีความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA และล้างคอลัมน์ ด้วย buffer D (pH 5.9) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ในหลอด เรียกว่า wash I+II ชะโปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ (elute) ด้วย buffer E (pH 3.5) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาจำนวน 6 ส่วน (fraction) ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร ปริมาตรส่วนละ 1.5 มิลลิลิตร (E1-E7 ตามลำดับ) แต่ละส่วนเติม Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สุดท้ายนำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แต่ละช่วงไปทำการตรวจสอบหาขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธีการ Bradford's method (Bradford, 1776)

2.3 การศึกษาขนาดและตรวจสอบ recombinant protein ด้วยเทคนิค Western blotting

ศึกษาขนาดของ recombinant protein CryIAb/Ac โดยแยกขนาดของ recombinant protein ด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ประกอบด้วย 12% (v/v) resolving gel และ 5% stacking gel ใช้ชุดอุปกรณ์ของบริษัท Bio-Rad™ โดยเมื่อเตรียม polyacrylamide gel และประกอบแผ่นเจลเข้ากับชุดอุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว นำ flow through wash I+II และ eluted แต่ละส่วน (fraction) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 2x loading buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำแข็งอีก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาหยอดลงในแต่ละช่องของเจล แล้วแยกขนาดของโปรตีนโดยการนำชุด SDS-PAGE ต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนค่ากระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที แกะเจลออกมาย้อมด้วย coomasie blue เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยบัฟเฟอร์ Destain นาน 24 ชั่วโมง

เตรียมตัวอย่างโปรตีนและนำไปแยกขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส 1 แผ่น ขนาดเท่ากับแผ่นเจลแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ towbin จนชุ่มและตัดกระดาษกรอง (filter paper) ให้มีขนาดเท่ากับหรือใหญ่กว่าแผ่นเจล SDS-PAGE เล็กน้อยจำนวน 8 แผ่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ towbin จนชุ่ม วางแผ่นไนโตรเซลลูโลส แผ่นเจล แล้วประกบด้วยกระดาษกรองด้านบนและด้านล่าง 4 แผ่น ตามภาพที่ 1 ย้ายโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่อง transfer blotting (Biorad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในสารละลาย BSA/TBST blocker™ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา

1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย TBST 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในแอนติบอดี anti-6x His tag , Alkaline Phosphatatse (abcam, England) ที่เจือจางด้วย TBST ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวนอนจนเกิดปฏิกิริยาชัดเจน ล้างออกด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที



ภาพที่ 1 การประกอบชิ้นส่วนสำหรับวิธีการแบบ semi dry western blotting

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

3.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองเป็นกระต่ายเพศเมียพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 3 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัม โดยเจาะเลือดกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum, Ns) จากนั้นนำ recombinant protein CryIAb/Ac ที่ทำการสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) ในครั้งแรก และจะทำการฉีดแอนติเจนเข้มข้น 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิมอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4

เริ่มเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหูครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 5 และทำการเจาะเลือดทุก ๆ สัปดาห์ จนครบ 10 ครั้ง เมื่อทำการเจาะเลือดจากกระต่ายแล้วนำเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรีดรอบ

ก้อนเลือดด้วยเข็มฉีดยา แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยแรงเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนซีรัมและเติม 2% NaN_3 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.02% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ (Titer) ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายด้วยเทคนิค indirect ELISA

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ recombinant protein CrylAb/Ac เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของ A_{405} ของซีรัมปกติ, Normal serum) ด้วยวิธีการ indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยการเคลือบหลุม micro plate ด้วย recombinant protein CrylAb/Ac 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 เติมแอนติซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution แบบ 2 เท่า (2 fold-dilutions) โดยเริ่มต้นเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100-1:1, 638, 400 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) (Sigma, Germany) เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร สำหรับแอนติบอดีที่ผลิตในกระต่ายและ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มไว้ในกล่องความชื้น นาน 60 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเติมสารละลายสับเสตรท *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 10% Diethanolamine หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นและมืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของซีรัมปกติ ที่ให้ค่าเป็นบวก

3.3 การแยกสกัดแกมมาอิมมูโนโกลบูลิน ชนิด G (IgG)

การแยกสกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP (GE, Germany) ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) โดยการโหลด Binding buffer ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตร

คอลัมน์ 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 ปรับสภาพของ IgG ด้วย 0.05 เท่าของปริมาตร IgG ด้วย Netutralizing buffer เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลางเก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์แต่ละ fraction ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG โดยใช้ค่า Extinction coefficient คำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร $OD_{280}/1.4 = X$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

โครงสร้างของชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ที่เรียกว่า อิมมูโนโครมาโทกราฟิคสตริป หรืออิมมูโนสตริป มีส่วนประกอบสำคัญ ภาพที่ 2 ได้แก่ backing pad, sample pad, conjugate pad, reaction membrane และ absorption pad (Kumar, 2011)

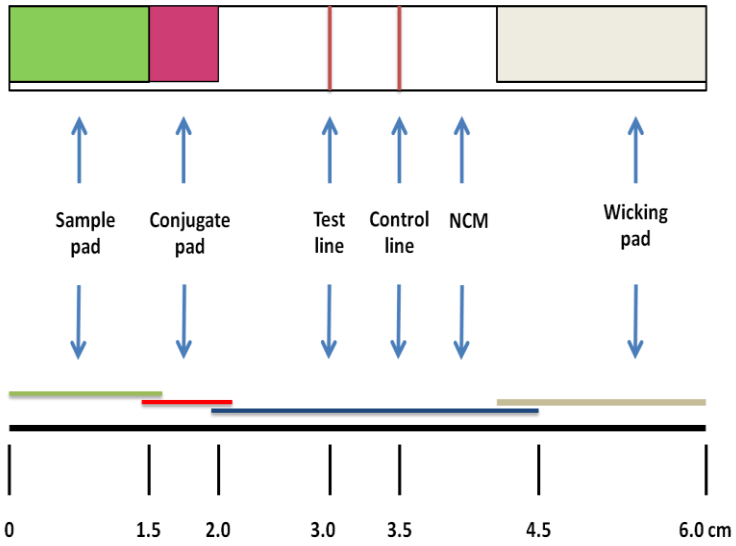
Backing pad ทำหน้าที่ค้ำจุน (support) องค์ประกอบต่าง ๆ ของชุดตรวจสอบ ได้แก่ sample pad, conjugate pad, nitrocellulose และ absorption pad ให้เป็นโครงสร้างของชุดตรวจสอบที่สมบูรณ์ backing pad ที่ใช้ส่วนใหญ่ทำมาจากโพลีเอสเตอร์ (polyester) หนาประมาณ 0.25-1 มิลลิเมตร

Sample pad เป็นส่วนที่ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างโดยตรง และเกี่ยวข้องกับการควบคุมอัตราการไหลของตัวอย่างไปยังส่วนของ Conjugate pad โดยทั่วไป Sample pad ที่ใช้จะมีอยู่ 2 แบบ คือ woven meshes และ cellulose filters (Buddhirakkul *et al*., 2004) ซึ่ง woven meshes หรือบางครั้งเรียกว่า screens มีคุณสมบัติที่ดีซึ่งทำให้ตัวอย่างมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบน SAP มีความแข็งแรงเมื่อเปียกน้ำ ไม่ฉีกขาด แต่มี sample volume หรือความสามารถในการรับตัวอย่างได้ต่ำ คือ ประมาณ 1-2 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร และราคาแพงเมื่อเทียบกับวัสดุชนิดอื่น ส่วน cellulose filter มีคุณสมบัติตรงข้าม คือ มีความหนาไม่แข็งแรง แต่ราคาไม่แพง สามารถรองรับตัวอย่างได้มาก คือ มากกว่า 25 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งคุณสมบัตินี้เหมาะกับตัวอย่างบางชนิดที่ต้องการให้สามารถรองรับตัวอย่างปริมาตรสูงได้

Conjugate pad มีหน้าที่สำคัญนอกจากจะเป็นส่วนที่เก็บรักษา detector (antibody conjugate) แล้วยังทำหน้าที่เสมือนตัวส่ง detector ไปยัง test line และ control line เพราะฉะนั้นการเลือก conjugate pad ชนิดใดมาใช้ในงานทดลองจึงถือเป็นส่วนสำคัญ ทั้งนี้ในปัจจุบันชนิดของ conjugate pad ที่นำมาใช้ ได้แก่ ชนิดที่เป็น cellulose glass และ plastic (เช่น polyester และ polypropylene เป็นต้น)

Reaction membrane ชนิดของเมมเบรนที่นำมาใช้มีหลายชนิด เช่น Hydrophobic Nitrocellulose หรือ cellulose acetate membrane ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด และขนาดของแอนติเจนต้องมีคุณสมบัติในการให้แอนติเจนสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปได้ในอัตราเร็วที่เหมาะสม มีความสามารถในการตรึงแอนติบอดีที่นำมาใช้เป็นเส้น test line และ control line ให้คงอยู่อย่างมีเสถียรภาพที่ดี ทั้งนี้ขนาดรูพรุนของแผ่น nitrocellulose จะแปรผันตามอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารละลาย กล่าวคือแผ่น nitrocellulose ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่การเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่างจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งในบางครั้งอาจเร็วมากจนทำให้แอนติบอดีและแอนติเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยากันได้ อาจมีผลต่อความไวของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ นอกจากปัจจัยทางโครงสร้างดังกล่าวแล้ว ความหนาของแผ่น nitrocellulose ก็ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับอัตราเร็วในการไหลของสารละลายที่ต้องคำนึงถึงด้วยเช่นกัน

Absorption pad มีหน้าที่ช่วยเพิ่มแรงดึงของแรง capillary เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ ดังนั้นข้อดีของการใช้ absorption pad คือช่วยเพิ่มปริมาตรและระยะเวลาของสารละลายที่เคลื่อนที่ผ่าน test line และ control line มากขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีมากยิ่งขึ้น (Hochleitner, 2002)



ภาพที่ 2 การประกอบชุดตรวจสอบบน Plastic backing pad ขนาด 6x30 cm. ประกอบด้วย sample pad, conjugate pad, test line, control line , wicking pad/absorption pad

4.1 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค electrostatic force

นำสารละลาย colloidal gold pH 7.4 ที่มีขนาดอนุภาค 40 นาโนเมตร มาทดสอบการเชื่อมต่อกับ IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย colloidal gold (ปรับให้ได้ pH 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 10% NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มอีก 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทอง อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง Colloidal gold conjugated IgY คือ สารละลาย colloidal gold ไม่ตกตะกอน และไม่เปลี่ยนสีจากสีม่วงแดง เป็นสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ 10% NaCl (Kumar *et al*, 2011) ตรวจวัดค่า $OD_{400-800}$ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG เลือกปริมาณ ของ IgG ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า colloidal gold ที่ขนาด 40 นาโนเมตร สร้างกราฟความสัมพันธ์ของค่า OD_{530} กับปริมาณ IgG คัดเลือกปริมาณ IgG ที่อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

4.2 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค neary covalent

เมื่อแยกสกัด IgG จากแอนติซีรัมด้วยชุดสกัด Protein A Chromatography ซึ่งจะได้ IgG ที่จำเพาะเจาะจงกับ recombinant protein CryIAb/Ac อยู่ใน elution buffer จะต้องเปลี่ยน IgG ที่สกัดได้ให้อยู่ใน 100 mM Na_2HPO_4 pH 7.5 โดยผ่านกระบวนการทำ Desalting ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ $OD._{280}$ เจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปต IgG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม $NaIO_4$ 10 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1X PBS ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา Oxydation ของ IgG โดยการปิเปต 20 ไมโครลิตรของ IgG ที่ทำปฏิกิริยา ผสมกับ 60 ไมโครลิตร ของสารละลาย purpald ถ้าเกิดการ Oxydation ของ IgG จะให้ผลการตรวจสอบเป็นสีม่วง เมื่อได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยา Oxydation อย่างสมบูรณ์แล้ว ติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารละลาย 46.5 mM linker ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เติม 40 mM HEPES ปริมาณ 1 มิลลิลิตร คัดแยก IgG ที่ตัดฉลากกับ linker โปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนโดยการกรองด้วย 10K MW cut of โดยการปั่นเหวี่ยงที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์เท่ากับ (RCF/g) 2,000 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใส ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 40 mM HEPES เก็บ IgG linker ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (Michael, 2011)

ทดสอบหาปริมาณ IgG linker ที่เหมาะสมกับการเชื่อมต่อด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร โดยการผสม IgG linker จำนวน 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ที่ปริมาณ 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร และชุดที่ 2 ที่ปริมาณ 50, 75 และ 100 ไมโครลิตร กับ colloidal gold ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ตรวจสอบการเชื่อมต่อของ gold conjugated IgG โดยการตรวจวัดค่า $OD_{400-800}$ นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ

colloidal gold ปกติ คัดเลือก gold conjugated IgG ที่ให้ค่า $OD_{400-800}$ นาโนเมตร ที่มากกว่า colloidal gold ที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับ IgG

4.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ โดยใช้ตัวย่าง supernatant ของเซลล์แบคทีเรีย และ recombinant protein CrylAb/Ac ที่ทำบริสุทธิ์ และตัวอย่าง recombinant protein CrylAb ด้วยเทคนิค DIBA หยดตัวอย่างปริมาณ 15 ไมโครลิตร บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแช่ใน Blocking solution (TBS+2% Skim milk +0.05% TritonX-100) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ใช้ IgG ที่ระดับความเจือจาง 1:200 และ alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG ที่เจือจาง 1:10,000 ทำปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลการตรวจสอบภายในระยะเวลา 5 นาที หลังการเติมสับสเตรท เปรียบเทียบกับการทดสอบโดยการใช้ gold conjugated IgG ที่เจือจางใน Blocking solution

4.4 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะ colloidal gold และ gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เปรียบเทียบขนาดของ colloidal gold ก่อนและหลังการเชื่อมด้วย IgG โดยการนำหยดอนุภาคทองลงบนแผ่นกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอร์มวามและคาร์บอนซับให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตรวจดูที่กำลังขยาย 120,000 เท่า ที่ 100 กิโลโวลต์ วัดขนาดอนุภาคทอง ดูการกระจายและหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด colloidal gold และ gold conjugated IgG

4.5 การทดสอบหาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อกับ IgG ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

ทดสอบสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 nm ที่ค่า pH 7.4 และ pH 9.0 เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมของ colloidal gold ที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อกับ IgG โดยใช้ IgG : colloidal gold ที่อัตราส่วน 1:100 กวนสารละลาย gold conjugated IgG ที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย BSA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ของปริมาตร gold conjugated IgG กวนสารละลายต่อที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน gold conjugated IgG ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอน gold conjugated IgG ด้วย Diluent buffer (1x PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% PEG)

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำ gold conjugated IgG ที่ละลายใน diluent buffer ตรวจวัดค่า $OD_{400-800}$ นาโนเมตร เลือกค่า pH ของ colloidal gold ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่สูงกว่าไปพัฒนาชุดตรวจสอบ

4.6 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ conjugate pad

ทดสอบเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบ protein CrylAb/Ac บนแผ่นเมมเบรนที่ต่างชนิดกัน คือ AE 99 และ Unisart CN 140 นำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลาย blocking NCM (1x PBS pH 7.4, 1% BSA) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ซับให้แห้งแล้วอบเมมเบรนต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง ใช้ GAR เจือจาง 1:2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็น control line และ test line เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร จากนั้นนำเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำมาประกอบชุดตรวจสอบ

การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของ conjugate pad ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิด คือ glass fiber grade 8964 และ polyester sheet โดยแช่ conjugate pad ในสารละลาย conjugate pad pretreatment (1xPBS, 5% sucrose, 1% BSA, 0.05% Tween-20) และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พ่น gold conjugated ที่อัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ด้วยเครื่อง Biodot หยดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร อ่านผลที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ คัดเลือกชนิดของเมมเบรนและconjugate pad ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจน ไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

4.7 ปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของ control line และ test line

ปริมาณความเข้มข้นและความเข้มข้นของ control line ซึ่งใช้ Anti-Rabbit IgG F(ab)2, F cross absorbed antibody produced in goat (Sigma, USA) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ IgG ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายโดยเจือจาง GAR ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3 เพื่อศึกษาอัตราส่วนของ control line ที่เหมาะสมในการตรวจจับกับ gold conjugated IgG บริเวณ control line ซึ่งเป็นส่วนของการแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาเพื่อยืนยันความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ ซึ่งจะต้องเกิดปฏิกิริยาทุกครั้งบนบริเวณ control line ไม่ว่าชุดตรวจสอบสอบจะให้ผลการตรวจสอบเป็นบวกหรือลบ โดยการพ่น GAR ที่เจือจาง 1:2 ในอัตราส่วน 1, 1.5 และ 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บนเมมเบรน Unisart CN 140 ห่างจากขอบเมมเบรนระยะ 1 เซนติเมตร และพ่น GAR ที่เจือจาง 1:3 ในอัตราส่วนเดียวกัน เปรียบเทียบผลการตรวจสอบที่แสดงผลบริเวณ control line ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจน เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

เจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พ่น IgG ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นในอัตราส่วน 1, 1.5 และ 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บริเวณ test line ซึ่งห่างจากตำแหน่ง

control line เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร เป็นบริเวณการแสดงผลของ test line จะแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาเมื่อตัวอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจสอบมีการปนเปื้อนของ protein CryIAb/Ac ซึ่งเป็นโปรตีนในข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 บริเวณ test line จะให้ผลการตรวจสอบเป็นเส้นสีแดง ในทางกลับกันคือ หากตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีน CryIAb/Ac บริเวณ test line จะไม่แสดงผลการตรวจสอบเป็นเส้นสีแดง

4.8 การหาปริมาณความเหมาะสมของ gold conjugated IgG สำหรับลงบนแผ่น Conjugate pad

ทดสอบอัตราส่วน gold conjugated IgG ที่ใช้ IgG-linker ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร และอัตราส่วน gold conjugated IgG ที่ใช้ IgG-linker ปริมาณ 15 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร โดยการพ่น gold conjugated IgG แต่ละความเข้มข้นที่อัตราส่วน 10, 20 และ 30 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บนแผ่น Conjugate pad ด้วยเครื่อง Biodot จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยาบริเวณ control line และ test line โดยทดสอบกับ DOA extraction buffer และ recombinant protein CryIAb/Ac คัดเลือกช่วงของปริมาณ gold conjugated IgG ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำไปเป็นเกณฑ์กำหนดโดยการทดสอบซ้ำอีกในหลาย หลายอัตราส่วน

4.9 ทดสอบหา Extraction buffer สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ

เปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของ Extraction buffer จำนวน 6 ชนิด คือ DOA extraction buffer pH 8.5, 1xPBS pH 7.4, 2% CTAB, Extraction strip kit Agdia, Borate buffer pH 7.4, Lysis buffer หยดตัวอย่าง Extraction buffer แต่ละชนิดตรงบริเวณ sample pad ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ให้ Extraction buffer เคลื่อนที่ ผ่าน conjugate pad, test line และ control line จนถึง absorption pad อ่านการเกิดปฏิกิริยาภายในเวลา 10 นาที คัดเลือก Extraction buffer สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง โดยให้ผลการตรวจสอบ บริเวณ control line และ test line ที่ชัดเจน ไม่เกิดผลการทดสอบลวง (false positive)

4.10 การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ

ผลิตชุดตรวจสอบโดยการใช้ colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ค่า pH 7.4 เชื่อมต่อกับ IgG-linker ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กวน gold conjugated IgG ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที แล้วเติมสารละลาย BSA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1% ของปริมาตร gold conjugated IgG กวนต่อไปที่ความเร็วรอบเช่นเดิมอีก 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน gold conjugated IgG ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ละลาย gold conjugated IgG ด้วย diluent buffer

เติม 10% trehalose และ 20% sucrose นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{400-800}$ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 3.0 พ่นสารละลาย gold conjugated IgG บนแผ่น polyester sheet ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร นำ conjugate pad ไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ส่วนของการแสดงผลปฏิกิริยาใช้เมมเบรน Unisart CN 140 เตรียม control line โดยใช้ GAR 1:2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บริเวณ test line ใช้ IgG เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดเส้น control line และ test line ห่างกัน 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง ประกอบชุดตรวจสอบ โดยนำแต่ละส่วนมาประกอบบน plastic backing card ใช้ absorption pad grade 222, conjugate pad และ sample pad แต่ละชิ้นเหลื่อมกันประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เพื่อให้เกิดความต่อเนื่องของการไหล จากนั้นตัดให้มีขนาดกว้างชิ้นละ 3.8 มิลลิเมตรบรรจุลงตลับเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ

4.11 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงและประสิทธิภาพของความไวในการตรวจสอบได้ค่าต่ำสุดของชุดตรวจสอบ (LOD)

ทดสอบความจำเจาะจงของชุดตรวจสอบโดยใช้ตัวอย่างโปรตีน NK 603, EPSPS, NPTII, Cry9C, CryIAb, CryIAb/Ac ตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ข้าวที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของโปรตีนด้วยเทคนิค Real time PCR เจือจางตัวอย่างด้วย DOA extraction buffer ที่ระดับความเข้มข้น 1: 100 หยดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร บนชุดตรวจสอบที่บริเวณ control line ใช้ GAR เข้มข้น 1:2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line ใช้ IgG เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร gold conjugated IgG พ่นบน glass fiber grade 8964 อัตราส่วน 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังหยดตัวอย่าง

ตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบในการตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac โดยใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบ 2 ชนิด คือ โปรตีน CryIAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1:100, 1:200, 1:400, 1: 800, 1:1,600 และเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีน CryIAb/Ac ที่ระดับความเจือจางเดียวกันใน DOA extraction buffer ทดสอบหยดตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บนชุดตรวจสอบ อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังหยดตัวอย่าง

4.12 การหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างสำหรับใช้ทดสอบ

หาปริมาณการใช้ตัวอย่างสำหรับการเตรียมตัวอย่างและปริมาณการใช้ตัวอย่างที่เหมาะสมในการใช้กับชุดตรวจสอบ เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่แสดงผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ชัดเจน โดยการเตรียมตัวอย่างโปรตีน CryIAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีน 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในสารละลาย DOA extraction buffer หยดตัวอย่างที่ปริมาณแตกต่างกัน คือ 80, 90 และ 100 ไมโครลิตร ในหลุมรองรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบ ปล่อยให้ตัวอย่างเคลื่อนที่ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา เปรียบเทียบผลการตรวจสอบปริมาณของแต่ละตัวอย่าง ดูจากผลการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบภายในระยะเวลา 10 นาที

4.13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเทียบกับชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของ Agdia ชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีน CryIAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DOA extraction buffer ในอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:400, 1: 800, 1:1,600 และเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีน CryIAb/Ac เจือจางในอัตราส่วนเดียวกัน และเจือจางตัวอย่างในอัตราส่วนเดียวกันในสารละลาย SEBA extraction buffer ของ Agdia ผลการตรวจสอบที่ให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง ชัดเจน ทั้งในส่วนของ control line และ test line ภายในระยะเวลา 5 นาทีหลังจากหยดตัวอย่าง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ	ตุลาคม 2554 – กันยายน 2559
สถานที่ดำเนินการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
	กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	กรมวิชาการเกษตร
	ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* ขนาด 1,839 bp ซึ่งปรับ codon usage ให้เหมาะสมกับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (*E. coli* BL21 transformants) เชื่อมต่อยีน *CryIAb/Ac*เข้าสู่ expression vector คือ

pET 200/D-TOPO® ที่เชื่อมต่อกับ polyhistidine ซึ่งได้ Recombinant protein CryIAb/Ac (ให้ชื่อว่า *CryIAb/Ac*_Lab) ถ่ายโอนลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* BL21 transformants ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีสกัดพลาสมิดส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *CryIAb/Ac*_Lab กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้นแบบที่สังเคราะห์ (ให้ชื่อว่า *CryIAb/Ac*_Protein_Syn) โดยใช้โปรแกรม clustal W พบลำดับนิวคลีโอไทด์ *CryIAb/Ac*_Lab ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนต้นแบบ *CryIAb/Ac*_Protein_Syn ในข้าวดัดแปรพันธุกรรมBt 63 ถึง 99 % ภาพที่ 3 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ CryIAb/Ac_AF537267.1 มีค่าความคล้าย 88 % เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป blast ในโปรแกรม NCBI โดยใช้ blastp พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ Accesion No. CryIAb/Ac_AF537267 มีค่าความคล้าย 100 % ภาพที่ 4 แปรรหัสโปรตีนได้ 613 กรดอะมิโน คิดเป็นขนาดโปรตีน 68 กิโลดาลตัน

```
                          1                                                                  80
CryIAb/Ac_Lab      (1) ------------------ATGGATAACTGCCGCCCGTATAACTGCCTGAGCAACCCGGAAGTGGAAGTGCTGGGCGGCGA
CryIAb/Ac_Syn      (1) ------------GCTAGCATGGATAACTGCCGCCCGTATAACTGCCTGAGCAACCCGGAAGTGGAAGTGCTGGGCGGCGA
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1) ATGGACAACAACCCGAACATCAACGAATGGATTCCGTACAACTGCCTGAGCAACCCGGAAGTGGAAGTGCTGGGCGGCGA
             Consensus (1)              C A CATGGATAACTGCCGCCCGTATAACTGCCTGAGCAACCCGGAAGTGGAAGTGCTGGGCGGCGA
                          81                                                                 160
CryIAb/Ac_Lab     (63) ACGCATTGAAACCGGCTATACCCCGATTGATATTAGCCTGAGCCTGACCCAGTTTCTGCTGAGCGAATTTGTGCCGGGCG
CryIAb/Ac_Syn     (69) ACGCATTGAAACCGGCTATACCCCGATTGATATTAGCCTGAGCCTGACCCAGTTTCTGCTGAGCGAATTTGTGCCGGGCG
CryIAb/Ac_AF537267.1 (81) ACGCATCGAAACCGGCTACACCCCGATTGACATCAGCCTGAGCCTGACCCAGTTCCTGCTGAGCGAGTTCGTGCCGGGCG
             Consensus (81) ACGCATTGAAACCGGCTATACCCCGATTGATATTAGCCTGAGCCTGACCCAGTTTCTGCTGAGCGAATTTGTGCCGGGCG
                          161                                                                240
CryIAb/Ac_Lab    (143) CGGGCTTTGTGCTGGGCCTGGTGGATATTATTTGGGGCATTTTTGGCCCGAGCCAGTGGGATGCGTTTCTGGTGCAGATT
CryIAb/Ac_Syn    (149) CGGGCTTTGTGCTGGGCCTGGTGGATATTATTTGGGGCATTTTTGGCCCGAGCCAGTGGGATGCGTTTCTGGTGCAGATT
CryIAb/Ac_AF537267.1 (161) CCGGCTTCGTGCTGGGCCTGGTGGACATCATCTGGGGCATCTTCGGCCCGAGCCAGTGGGACGCCTTCCTGGTGCAGATC
             Consensus (161) CGGGCTTTGTGCTGGGCCTGGTGGATATTATTTGGGGCATTTTTGGCCCGAGCCAGTGGGATGCGTTTCTGGTGCAGATT
                          241                                                                320
CryIAb/Ac_Lab    (223) GAACAGCTGATTAACCAGCGCATTGAAGAATTTGCGCGCAACCAGGCGATTAGCCGCCTGGAAGGCCTGAGCAACCTGTA
CryIAb/Ac_Syn    (229) GAACAGCTGATTAACCAGCGCATTGAAGAATTTGCGCGCAACCAGGCGATTAGCCGCCTGGAAGGCCTGAGCAACCTGTA
CryIAb/Ac_AF537267.1 (241) GAACAGCTGATCAACCAGCGCATCGAAGAGTTCGCCCGCAACCAGGCCATCAGCCGCCTGGAAGGCCTGAGCAACCTGTA
             Consensus (241) GAACAGCTGATTAACCAGCGCATTGAAGAATTTGCGCGCAACCAGGCGATTAGCCGCCTGGAAGGCCTGAGCAACCTGTA
                          321                                                                400
CryIAb/Ac_Lab    (303) TCAGATTTATGCGGAAAGCTTTCGCGAATGGGAAGCGGATCCGACCAACCCGGCGCTGCGCGAAGAAATGCGCATTCAGT
CryIAb/Ac_Syn    (309) TCAGATTTATGCGGAAAGCTTTCGCGAATGGGAAGCGGATCCGACCAACCCGGCGCTGCGCGAAGAAATGCGCATTCAGT
CryIAb/Ac_AF537267.1 (321) CCAGATTTACGGCGAATCCTTCCGCGAATGGGAAGCCGACCCGACCAACCCGGCCCTGCGCGAAGAAATGCGCATCCAGT
             Consensus (321) TCAGATTTATGCGGAAAGCTTTCGCGAATGGGAAGCGGATCCGACCAACCCGGCGCTGCGCGAAGAAATGCGCATTCAGT
                          401                                                                480
```

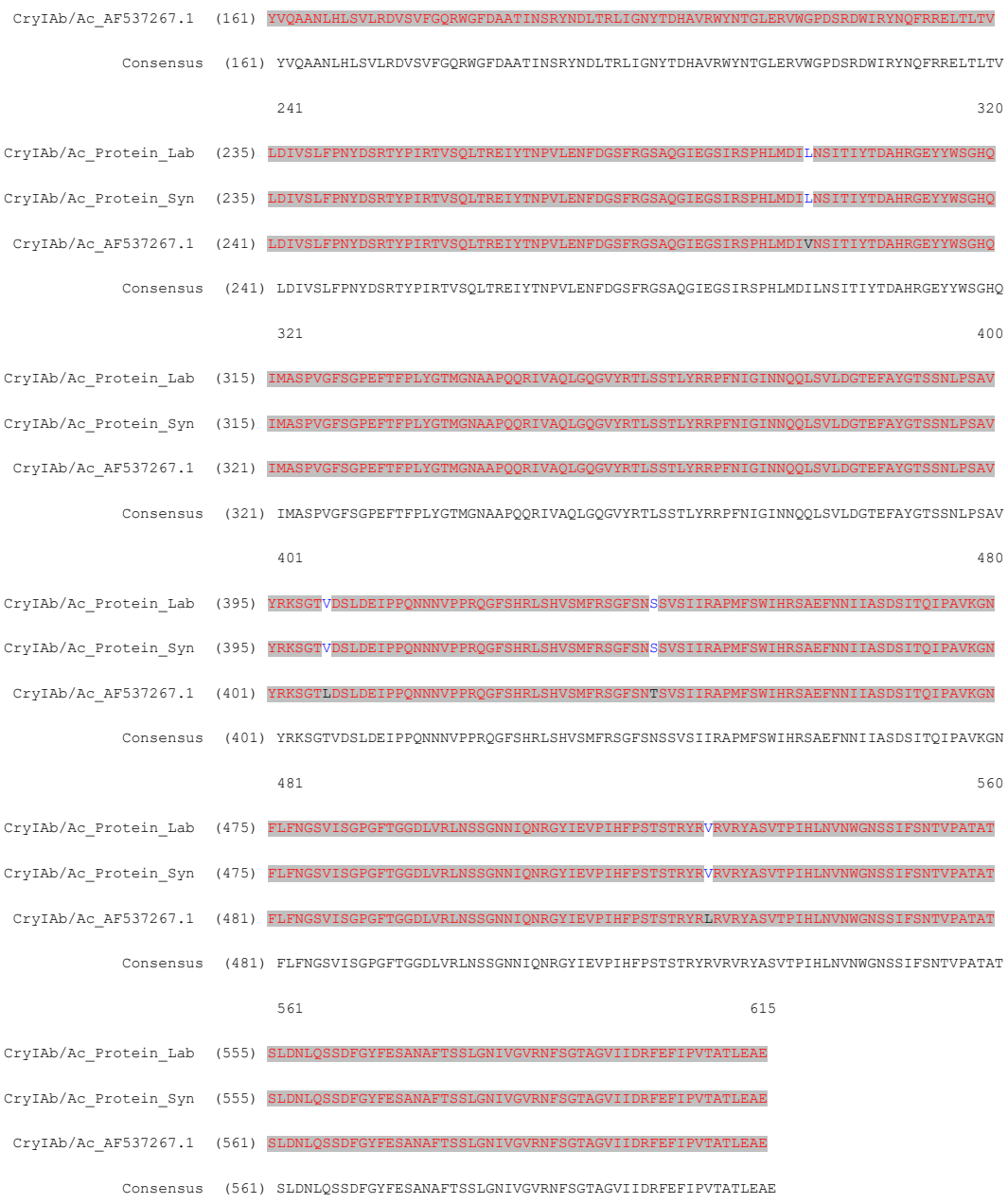
```
        CryIAb/Ac_Lab   (383) TTAACGATATGAACAGCGCGCTGACCACCGCGATTCCGCTGTTTGCGGTGCAGAACTATCAGGTGCCGCTGCTGAGCGTG
        CryIAb/Ac_Syn   (389) TTAACGATATGAACAGCGCGCTGACCACCGCGATTCCGCTGTTTGCGGTGCAGAACTATCAGGTGCCGCTGCTGAGCGTG
CryIAb/Ac_AF537267.1    (401) TCAACGACATGAACAGCGCCTGACCACCGCCATCCCGCTGTTCGCCGTGCAGAACTACCAGTTCCCGCTGCTGAGCGTG
             Consensus  (401) TTAACGATATGAACAGCGCGCTGACCACCGCGATTCCGCTGTTTGCGGTGCAGAACTATCAGGTGCCGCTGCTGAGCGTG
                               481                                                                 560
        CryIAb/Ac_Lab   (463) TATGTGCAGGCGGCGAACCTGCATCTGAGCGTGCTGCGCGATGTGAGCGTGTTTGGCCAGCGCTGGGGCTTTGATGCGGC
        CryIAb/Ac_Syn   (469) TATGTGCAGGCGGCGAACCTGCATCTGAGCGTGCTGCGCGATGTGAGCGTGTTTGGCCAGCGCTGGGGCTTTGATGCGGC
CryIAb/Ac_AF537267.1    (481) TACGTGCAGGCCGCCAACCTGCACCTGAGCGTGCTGCGCGACGTGAGCGTGTTCGGCCAGCGCTGGGGCTTCGACGCCGC
             Consensus  (481) TATGTGCAGGCGGCGAACCTGCATCTGAGCGTGCTGCGCGATGTGAGCGTGTTTGGCCAGCGCTGGGGCTTTGATGCGGC
                               561                                                                 640
        CryIAb/Ac_Lab   (543) GACCATTAACAGCCGCTATAACGATCTGACCCGCCTGATTGGCAACTATACCGATCATGCGGTGCGCTGGTATAACACCG
        CryIAb/Ac_Syn   (549) GACCATTAACAGCCGCTATAACGATCTGACCCGCCTGATTGGCAACTATACCGATCATGCGGTGCGCTGGTATAACACCG
CryIAb/Ac_AF537267.1    (561) CACCATCAACAGCCGCTACAACGACCTGACCCGCCTGATCGGCAACTACACCGACCACGCCGTGCGCTGGTACAACACCG
             Consensus  (561) GACCATTAACAGCCGCTATAACGATCTGACCCGCCTGATTGGCAACTATACCGATCATGCGGTGCGCTGGTATAACACCG
                               641                                                                 720
        CryIAb/Ac_Lab   (623) GCCTGGAACGCGTGTGGGGCCCGGATAGCCGCGATTGGATTCGCTATAACCAGTTTCGCCGCGAACTGACCCTGACCGTG
        CryIAb/Ac_Syn   (629) GCCTGGAACGCGTGTGGGGCCCGGATAGCCGCGATTGGATTCGCTATAACCAGTTTCGCCGCGAACTGACCCTGACCGTG
CryIAb/Ac_AF537267.1    (641) GCCTGGAGCGCGTGTGGGGTCCGGACAGCCGCGACTGGATTCGCTACAACCAGTTCCGCCGCGAACTGACCCTGACCGTG
             Consensus  (641) GCCTGGAACGCGTGTGGGGCCCGGATAGCCGCGATTGGATTCGCTATAACCAGTTTCGCCGCGAACTGACCCTGACCGTG
                               721                                                                 800
        CryIAb/Ac_Lab   (703) CTGGATATTGTGAGCCTGTTTCCGAACTATGATAGCCGCACCTATCCGATTCGCACCGTGAGCCAGCTGACCCGCGAAAT
        CryIAb/Ac_Syn   (709) CTGGATATTGTGAGCCTGTTTCCGAACTATGATAGCCGCACCTATCCGATTCGCACCGTGAGCCAGCTGACCCGCGAAAT
CryIAb/Ac_AF537267.1    (721) CTGGACATCGTGAGCCTGTTCCGAACTACGACAGCCGCACCTACCGATCCGCACCGTGAGCCAGCTGACCCGCGAAAT
             Consensus  (721) CTGGATATTGTGAGCCTGTTTCCGAACTATGATAGCCGCACCTATCCGATTCGCACCGTGAGCCAGCTGACCCGCGAAAT
                               801                                                                 880
        CryIAb/Ac_Lab   (783) TTATACCAACCCGGTGCTGGAAAACTTTGATGGCAGCTTTCGCGGCAGCGCGCAGGGCATTGAAGGCAGCATTCGCAGCC
        CryIAb/Ac_Syn   (789) TTATACCAACCCGGTGCTGGAAAACTTTGATGGCAGCTTTCGCGGCAGCGCGCAGGGCATTGAAGGCAGCATTCGCAGCC
CryIAb/Ac_AF537267.1    (801) CTACACCAACCCGGTGCTGGAAAACTTCGACGGCAGCTTCCGCGGCAGCGCCCAGGGCATCGAAGGCAGCATCCGCAGCC
             Consensus  (801) TTATACCAACCCGGTGCTGGAAAACTTTGATGGCAGCTTTCGCGGCAGCGCGCAGGGCATTGAAGGCAGCATTCGCAGCC
                               881                                                                 960
        CryIAb/Ac_Lab   (863) CGCATCTGATGGATATTCTGAACAGCATTACCATTTATACCGATGCGCATCGCGGCGAATATTATTGGAGCGGCCATCAG
        CryIAb/Ac_Syn   (869) CGCATCTGATGGATATTCTGAACAGCATTACCATTTATACCGATGCGCATCGCGGCGAATATTATTGGAGCGGCCATCAG
CryIAb/Ac_AF537267.1    (881) CGCACCTGATGGACATCGTGAACAGCATCACCATCTACACCGACGCCCACCGCGGCGAATACTACTGGAGCGGCCACCAG
             Consensus  (881) CGCATCTGATGGATATTCTGAACAGCATTACCATTTATACCGATGCGCATCGCGGCGAATATTATTGGAGCGGCCATCAG
                               961                                                                1040
        CryIAb/Ac_Lab   (943) ATTATGGCGAGCCCGGTGGGCTTTAGCGGCCCGGAATTTACCTTTCCGCTGTATGGCACCATGGGCAACGCGGCGCCGCA
        CryIAb/Ac_Syn   (949) ATTATGGCGAGCCCGGTGGGCTTTAGCGGCCCGGAATTTACCTTTCCGCTGTATGGCACCATGGGCAACGCGGCGCCGCA
CryIAb/Ac_AF537267.1    (961) ATCATGGCCAGCCCGGTGGGCTTCAGCGGCCCGGAGTTCACCTTCCCGCTGTACGGCACGATGGGCAACGCCGCCCCGCA
```

```
Consensus   (961) ATTATGGCGAGCCCGGTGGGCTTTAGCGGCCCGGAATTTACCTTTCCGCTGTATGGCACCATGGGCAACGCGGCGCCGCA
                  1041                                                                    1120
CryIAb/Ac_Lab (1023) GCAGCGCATTGTGGCGCAGCTGGGCCAGGGCGTGTATCGCACCCTGAGCAGCACCCTGTATCGCCGCCCGTTTAACATTG
CryIAb/Ac_Syn (1029) GCAGCGCATTGTGGCGCAGCTGGGCCAGGGCGTGTATCGCACCCTGAGCAGCACCCTGTATCGCCGCCCGTTTAACATTG
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1041) GCAGCGCATCGTGGCCAGCTGGGCCAGGGCGTGTACCGCACCCTGAGCAGCACCCTGTACCGCCGCCCGTTCAACATCG
Consensus   (1041) GCAGCGCATTGTGGCGCAGCTGGGCCAGGGCGTGTATCGCACCCTGAGCAGCACCCTGTATCGCCGCCCGTTTAACATTG
                  1121                                                                    1200
CryIAb/Ac_Lab (1103) GCATTAACAACCAGCAGCTGAGCGTGCTGGATGGCACCGAATTTGCGTATGGCACCAGCAGCAACCTGCCGAGCGCGGTG
CryIAb/Ac_Syn (1109) GCATTAACAACCAGCAGCTGAGCGTGCTGGATGGCACCGAATTTGCGTATGGCACCAGCAGCAACCTGCCGAGCGCGGTG
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1121) GCATCAACAACCAGCAGCTGAGCGTGCTGGACGGCACCGAGTTCGCCTACGGCACCAGCAGCAACCTGCCGAGCGGCGTG
Consensus   (1121) GCATTAACAACCAGCAGCTGAGCGTGCTGGATGGCACCGAATTTGCGTATGGCACCAGCAGCAACCTGCCGAGCGCGGTG
                  1201                                                                    1280
CryIAb/Ac_Lab (1183) TATCGCAAAAGCGGCACCGTGGATAGCCTGGATGAAATTCCGCCGCAGAACAACAACGTGCCGCCGCGCCAGGGCTTTAG
CryIAb/Ac_Syn (1189) TATCGCAAAAGCGGCACCGTGGATAGCCTGGATGAAATTCCGCCGCAGAACAACAACGTGCCGCCGCGCCAGGGCTTTAG
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1201) TACCGCAAGAGCGGCACCCTGGACAGCCTGGACGAAATCCCGCCGCAGAACAACAACGTGCCGCCGCGCCAGGGCTTCAG
Consensus   (1201) TATCGCAAAAGCGGCACCGTGGATAGCCTGGATGAAATTCCGCCGCAGAACAACAACGTGCCGCCGCGCCAGGGCTTTAG
                  1281                                                                    1360
CryIAb/Ac_Lab (1263) CCATCGCCTGAGCCATGTGAGCATGTTTCGCAGCGGCTTTAGCAACAGCAGCGTGAGCATTATTCGCGCGCCGATGTTTA
CryIAb/Ac_Syn (1269) CCATCGCCTGAGCCATGTGAGCATGTTTCGCAGCGGCTTTAGCAACAGCAGCGTGAGCATTATTCGCGCGCCGATGTTTA
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1281) CCACCGCCTGAGCCACGTGAGCATGTTCCGCAGCGGCTTCAGCAACACCAGCGTGAGCATCATCCGCGCCCCGATGTTCA
Consensus   (1281) CCATCGCCTGAGCCATGTGAGCATGTTTCGCAGCGGCTTTAGCAACAGCAGCGTGAGCATTATTCGCGCGCCGATGTTTA
                  1361                                                                    1440
CryIAb/Ac_Lab (1343) GCTGGATTCATCGCAGCGCGGAATTTAACAACATTATTGCGAGCGATAGCATTACCCAGATTCCGGCGGTGAAAGGCAAC
CryIAb/Ac_Syn (1349) GCTGGATTCATCGCAGCGCGGAATTTAACAACATTATTGCGAGCGATAGCATTACCCAGATTCCGGCGGTGAAAGGCAAC
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1361) GCTGGATTCACCGCAGCGCCGAGTTCAACAACATCATCGCCAGCGACAGCATCACCCAGATCCCTGCAGTGAAAGGCAAC
Consensus   (1361) GCTGGATTCATCGCAGCGCGGAATTTAACAACATTATTGCGAGCGATAGCATTACCCAGATTCCGGCGGTGAAAGGCAAC
                  1441                                                                    1520
CryIAb/Ac_Lab (1423) TTTCTGTTTAACGGCAGCGTGATTAGCGGCCCGGGCTTTACCGGCGGCGATCTGGTGCGCCTGAACAGCAGCGGCAACAA
CryIAb/Ac_Syn (1429) TTTCTGTTTAACGGCAGCGTGATTAGCGGCCCGGGCTTTACCGGCGGCGATCTGGTGCGCCTGAACAGCAGCGGCAACAA
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1441) TTCCTGTTCAACGGCAGCGTGATCAGCGGTCCGGGCTTCACCGGCGGCGACCTGGTGCGCCTGAACAGCAGCGGCAACAA
Consensus   (1441) TTTCTGTTTAACGGCAGCGTGATTAGCGGCCCGGGCTTTACCGGCGGCGATCTGGTGCGCCTGAACAGCAGCGGCAACAA
                  1521                                                                    1600
CryIAb/Ac_Lab (1503) CATTCAGAACCGCGGCTATATTGAAGTGCCGATTCATTTTCCGAGCACCAGCACCCGCTATCGCGTGCGCGTGCGCTATG
CryIAb/Ac_Syn (1509) CATTCAGAACCGCGGCTATATTGAAGTGCCGATTCATTTTCCGAGCACCAGCACCCGCTATCGCGTGCGCGTGCGCTATG
CryIAb/Ac_AF537267.1 (1521) CATCCAGAACCGCGGCTACATCGAAGTGCCGATCCACTTCCCGAGCACCAGCACCCGCTACCGCCTGCGCGTGCGCTACG
Consensus   (1521) CATTCAGAACCGCGGCTATATTGAAGTGCCGATTCATTTTCCGAGCACCAGCACCCGCTATCGCGTGCGCGTGCGCTATG
                  1601                                                                    1680
CryIAb/Ac_Lab (1583) CGAGCGTGACCCCGATTCATCTGAACGTGAACTGGGGCAACAGCAGCATTTTTAGCAACACCGTGCCGGCGACCGCGACC
```

```
        CryIAb/Ac_Syn  (1589) CGAGCGTGACCCCGATTCATCTGAACGTGAACTGGGGCAACAGCAGCATTTTTAGCAACACCGTGCCGGCGACCGCGACC
CryIAb/Ac_AF537267.1   (1601) CCAGCGTGACCCCGATCCACCTGAACGTGAACTGGGGCAACAGCAGCATCTTCAGCAACACCGTGCCGGCCACCGCCACC
             Consensus  (1601) CGAGCGTGACCCCGATTCATCTGAACGTGAACTGGGGCAACAGCAGCATTTTTAGCAACACCGTGCCGGCGACCGCGACC
                                1681                                                                1760
        CryIAb/Ac_Lab  (1663) AGCCTGGATAACCTGCAGAGCAGCGATTTTGGCTATTTTGAAAGCGCGAACGCGTTTACCAGCAGCCTGGGCAACATTGT
        CryIAb/Ac_Syn  (1669) AGCCTGGATAACCTGCAGAGCAGCGATTTTGGCTATTTTGAAAGCGCGAACGCGTTTACCAGCAGCCTGGGCAACATTGT
CryIAb/Ac_AF537267.1   (1681) AGCCTGGACAACCTCAGAGCAGCGACTTCGGCTACTTCGAAAGCGCCAACGCCTTCACCAGCAGCCTGGGCAACATCGT
             Consensus  (1681) AGCCTGGATAACCTGCAGAGCAGCGATTTTGGCTATTTTGAAAGCGCGAACGCGTTTACCAGCAGCCTGGGCAACATTGT
                                1761                                                                1840
        CryIAb/Ac_Lab  (1743) GGGCGTGCGCAACTTTAGCGGCACCGCGGGCGTGATTATTGATCGCTTTGAATTTATTCCGGTGACCGCGACCCTGGAAG
        CryIAb/Ac_Syn  (1749) GGGCGTGCGCAACTTTAGCGGCACCGCGGGCGTGATTATTGATCGCTTTGAATTTATTCCGGTGACCGCGACCCTGGAAG
CryIAb/Ac_AF537267.1   (1761) GGGCGTGCGCAACTTCAGCGGCACCGCCGGCGTGATCATCGACCGCTTCGAGTTCATCCCGGTGACGGCCACCCTGGAAG
             Consensus  (1761) GGGCGTGCGCAACTTTAGCGGCACCGCGGGCGTGATTATTGATCGCTTTGAATTTATTCCGGTGACCGCGACCCTGGAAG
                                1841      1854
        CryIAb/Ac_Lab  (1823) CGGAATAA------
        CryIAb/Ac_Syn  (1829) CGGAATAAGAGCTC
CryIAb/Ac_AF537267.1   (1841) CCGAATGA------
             Consensus  (1841) CGGAATAA
```

ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CryIAb/Ac*_Lab กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้นแบบ *CryIAb/Ac*_Protein_Syn และลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI *CryIAb/Ac*_AF537267 โดยใช้โปรแกรม clustal W

```
                                1                                                                   80
CryIAb/Ac_Protein_Lab    (1) MDN------CRPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQI
CryIAb/Ac_Protein_Syn    (1) MDN------CRPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQI
 CryIAb/Ac_AF537267.1    (1) MDNNPNINEWIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQI
             Consensus    (1) MDN      CRPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQI
                                81                                                                  160
CryIAb/Ac_Protein_Lab   (75) EQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSV
CryIAb/Ac_Protein_Syn   (75) EQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSV
 CryIAb/Ac_AF537267.1   (81) EQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQFPLLSV
             Consensus   (81) EQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLLSV
                                161                                                                 240
CryIAb/Ac_Protein_Lab  (155) YVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTLTV
CryIAb/Ac_Protein_Syn  (155) YVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTLTV
```

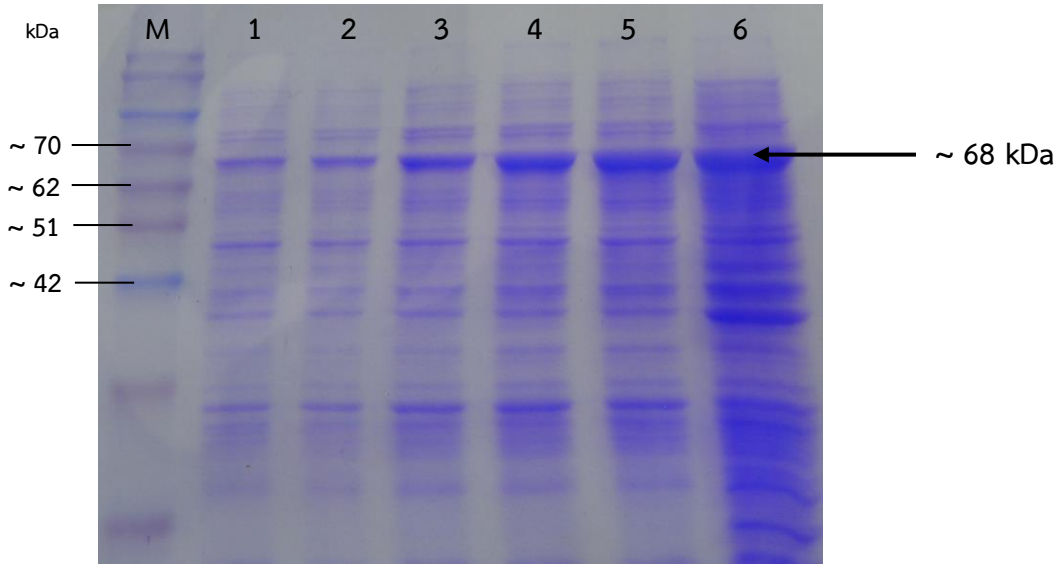


ภาพที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *CrylAb/Ac*_Lab กับลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบ *CrylAb/Ac*_Protein_Syn และลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของยีน *CrylAb/Ac*_AF537267 โดยใช้โปรแกรม blastp

2. การเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียและทำบริสุทธิ์ recombinant protein CryIAb/Ac

2.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ Recombinant protein CryIAb/Ac

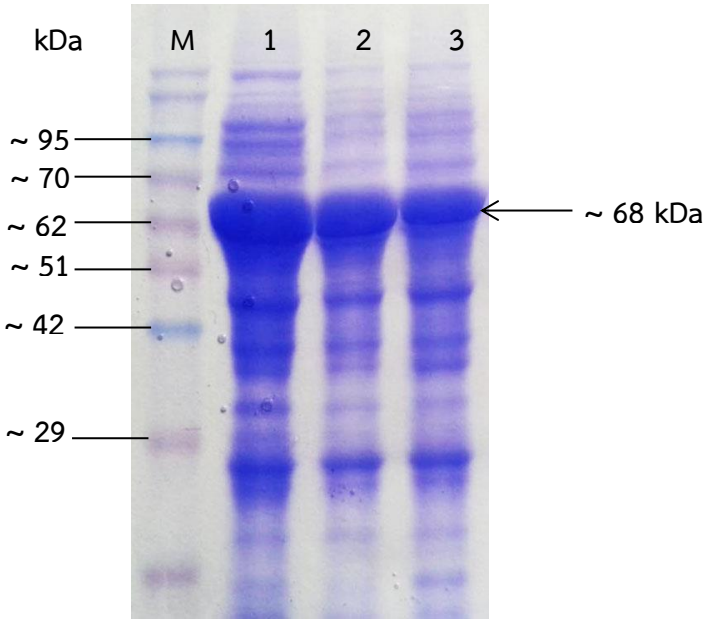
เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* CryIAb/Ac-BL21 transformants ในอาหารเหลว LB ซึ่งมีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1% ถูกชักนำให้มีการผลิตโปรตีนโดยเติมสาร IPTG ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 220 รอบต่อนาที ตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ในการชักนำเซลล์ CryIAb/Ac -BL21 ที่เวลา 1-5 ชั่วโมง โดยโปรตีนจะผลิตได้มากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนลูกผสมออกมามากเทียบเท่ากับระยะเวลาการการชักนำนานข้ามคืน และมีปริมาณ host protein น้อย คือ เวลา 5 ชั่วโมง ภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Recombinant protein CryIAb/Acที่ชักนำด้วย 1%glucose+1 mMIPTG, 1= ชั่วโมงที่ 0 (non induce) 2= ชั่วโมงที่ 1, 3= ชั่วโมงที่ 2, 4= ชั่วโมงที่ 3, 5=ชั่วโมงที่ 4, 6= ข้ามคืน (22 ชั่วโมง) ตามลำดับเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

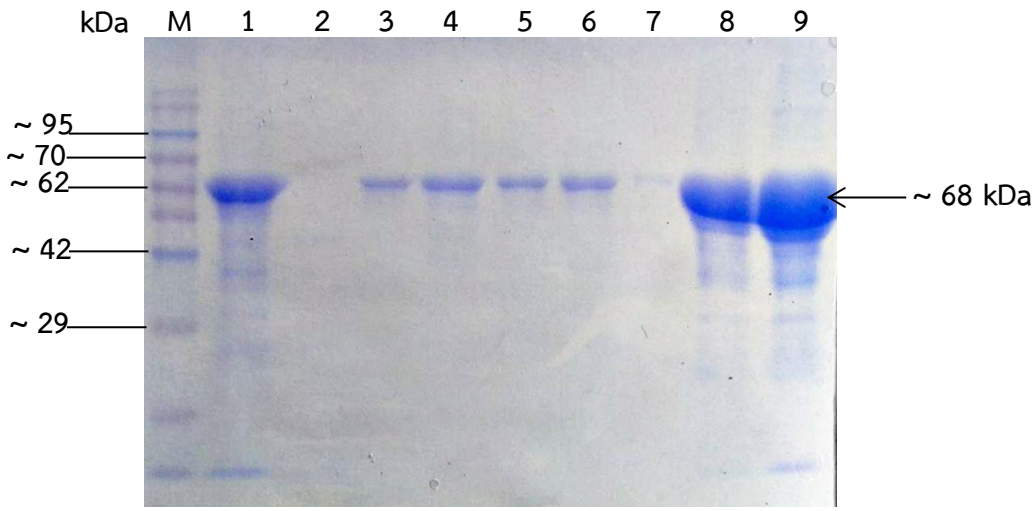
2.2 การทำโปรตีน CryIAb/Ac ให้บริสุทธิ์

เลี้ยงและชักนำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* CryIAb/Ac-BL21 transformants ในสภาวะที่ทดสอบแล้วข้างต้น จากนั้นเก็บเซลล์แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย buffer ภาพที่ 6 B และนำสารละลายเซลล์ไปทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์ด้วย nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin เมื่อนำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ในส่วนต่างๆ มาตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าในส่วนของ flow through ยังมีโปรตีนขนาด ~68 กิโลดาลตันถูกชะออกมาบ้าง แต่ในส่วนของ WashI+II โปรตีนที่ชะออกมาเป็นโปรตีนขนาดอื่น ๆ นอกเหนือจากโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน แต่เมื่อชะคอลัมน์ด้วย buffer E, pH 3.5 ในทุกส่วนพบมีโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน หลุดออกมา อีกทั้งมีโปรตีนขนาดอื่น ๆ ปนเปื้อนออกมาเล็กน้อย ดังนั้น buffer E, pH 3.5 เป็นบัฟเฟอร์ที่มี pH เหมาะสมในการชะโปรตีน Recombinant protein CryIAb/Ac ที่ถูกติด polyhistidine ไว้ทางปลาย N-terminal ของสายเปปไทด์ ให้หลุดออกจากคอลัมน์ Ni-NTA ได้ ซึ่งโปรตีนขนาด ~68 กิโลดาลตันนี้ น่าจะเป็นโปรตีน CryIAb/Ac ของข้าวดัดแปรพันธุกรรม โดยโปรตีนในส่วนที่ถูกชะออกมาด้วย buffer E, pH 3.5 ทุกส่วนตั้งแต่ E1 ถึง E7 ภาพที่ 7 สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยวิธี dialysis หรือ desalting และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนด้วยเทคนิค western blot ก่อนที่จะนำโปรตีนไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีต่อไป



ภาพที่ 6 แสดงแถบโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ที่พบละลายออกมาอยู่ในส่วนน้ำใส (supernatant) หลังจากทำให้เซลล์แตกและลายตะกอนโปรตีนด้วย buffer B ซึ่งจะนำไปทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นด้วย Ni- NTA

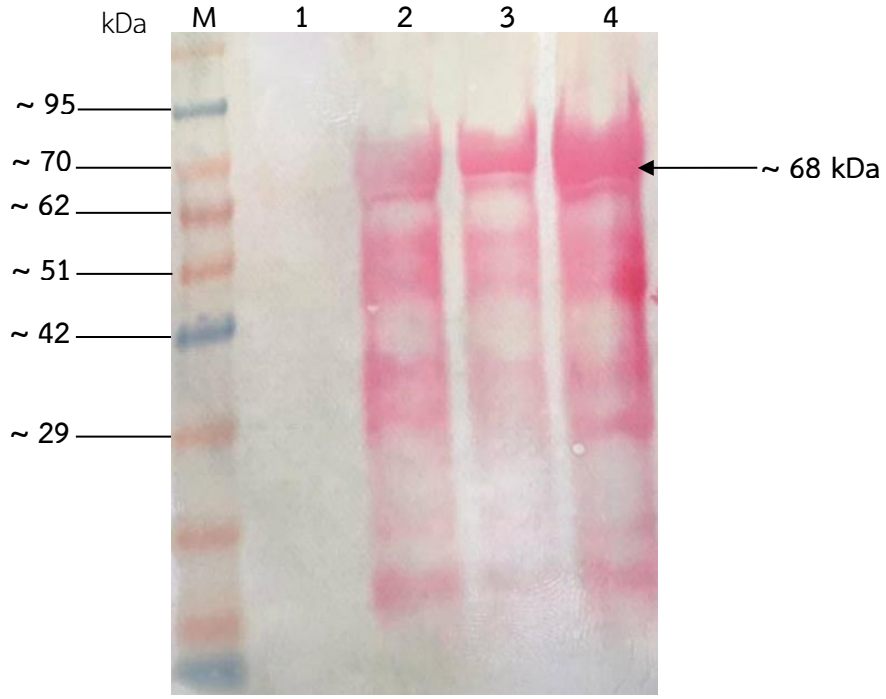
(M=Protein marker, ช่องที่ 1, 2 และ 3 คือ Supernatant จากเซลล์ recombinant protein CryIAb/Ac หลอด ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE



ภาพที่ 7 แสดงแถบโปรตีนขนาดต่างๆ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ recombinant protein CryIAb/Ac ของ ข้าวดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งพบในส่วน flow through, washI+II, buffer E (pH 3.5) ส่วน E1 ถึง E7 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

2.3 การศึกษาขนาดและตรวจสอบ recombinant protein ด้วยเทคนิค Western blotting

เมื่อนำโปรตีนที่ผ่านการกระบวนการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบขนาดของโปรตีนเป้าหมายด้วย SDS-PAGE และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติบอดีตรวจสอบ His tag ที่เชื่อมติดกับโปรตีน CryIAb/Ac พบว่าแอนติบอดี anti-6x His tag สามารถตรวจจับกับ His tag ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งในของ His tag ที่ติดกับโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียและในส่วนของโปรตีน CryIAb/Ac ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ ภาพที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทีผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นโปรตีนเป้าหมายที่สามรถนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองได้อย่างจำเพาะเจาะจง ภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงแถบขนาดของ recombinant protein CrylAb/Ac ในข้าวดัดแปรพันธุกรรม เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติบอดี anti-6x His tag ตรวจจับ His tag ที่ติดกับโปรตีน CrylAb/Ac (M=Protein marker, ช่องที่ 1 คือ BSA, ช่องที่ 2 คือ Supernatant จากเซลล์แบคทีเรีย recombinant protein CrylAb/Ac, ช่องที่ 3 คือ โปรตีน CrylAb/Ac หลอดที่ 1, ช่องที่ 4 คือ โปรตีน CrylAb/Ac หลอดที่ 2)

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

จากการฉีดกระต่ายโดยใช้โปรตีน CrylAb/Ac บริสุทธิ์มาเป็นแอนติเจน เจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมทั้งหมด 10 ครั้ง ได้ปริมาณแอนติซีรัม เท่ากับ 99 มิลลิลิตร ตารางที่ 1 นำแอนติซีรัมที่ได้มาตรวจสอบค่าไตเตอร์ ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 204,800-1,638,400 ตารางที่ 1 ซึ่งแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 6 และ 10 ให้ค่าไตเตอร์สูงสุด คือ 1,638,400 ภาพที่ 9 เนื่องจากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองของกระต่ายมีการฉีดกระตุ้นทั้งหมด 4 พบว่า อายุของสัตว์ทดลอง ปริมาณและความเข้มข้นรวมถึงจำนวนครั้งในการฉีดแอนติเจนมีผลโดยตรงต่อประสิทธิของแอนติบอดีแต่ล่ะครั้ง

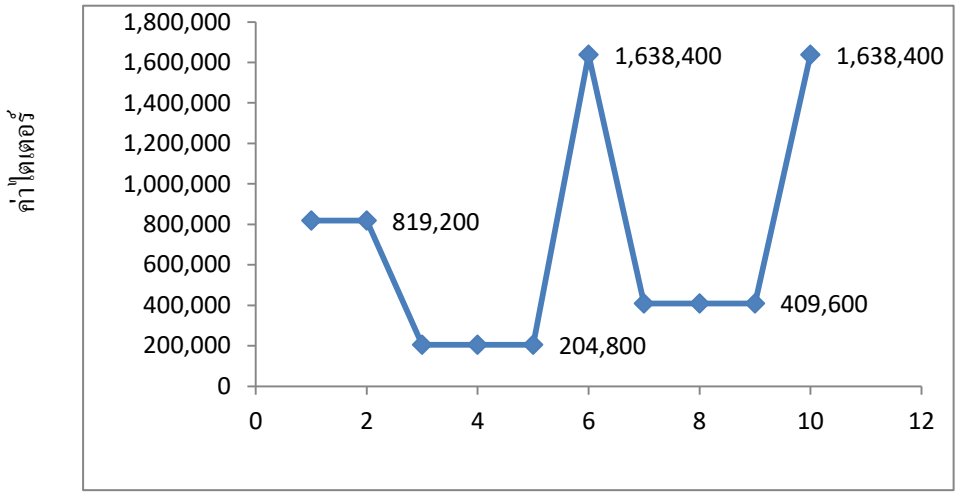
จากการแยกสกัด IgG ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน โดยใช้แอนติซีรัมเริ่มต้นที่ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจากแอนติซีรัม 1 มิลลิลิลิตร ตรวจวัดค่า UV1_280 ได้เท่ากับ 340 mAU ตรวจวัดค่าความเข้มข้นที่ $OD._{280}$ ได้เท่ากับ 2.381 คิดเป็นความเข้มข้นของ IgG เท่ากับ 1.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร IgG ที่แยกสกัดได้จะมี Heavy chain ขนาด 50 กิโลดาลตัน และ light chain และ 25 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE ภาพที่ 10

ตารางที่ 1 โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บเลือด และค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตในกระต่าย White New Zealand

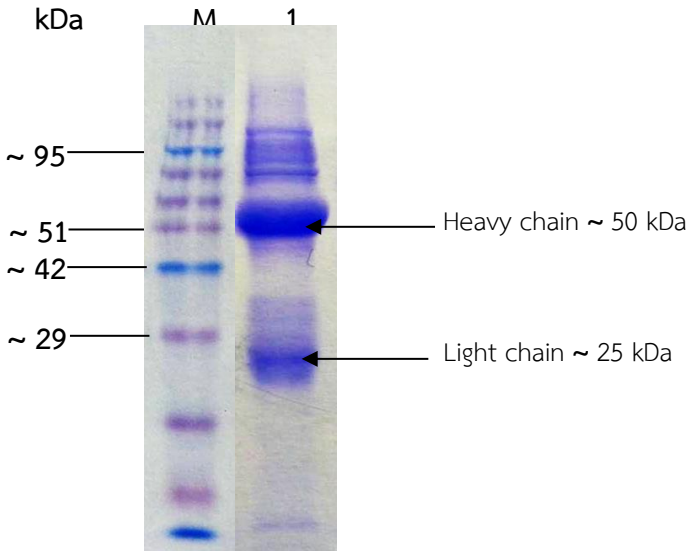
สัปดาห์ที่	แอนติเจน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอดจูแวนด์	ปริมาตรที่ฉีด (มิลลิลิตร)	ชนิดซีรั่ม	ปริมาณซีรัม (มิลลิลิตร)	ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA
1	-	-	-	NS	1	-
2	1	CFA/1	1	-	-	-
3	1	IFA/2	1	-	-	-
4	1	IFA/2	1	-	-	-
5	1	IFA/2	1	-	-	-
6	-	-	-	AS1	10	819,200
7	-	-	-	AS2	11	819,200
8	-	-	-	AS3	12	204,800
9	-	-	-	AS4	11	204,800
10	-	-	-	AS5	12	204,800
11	-	-	-	AS6	6	1,638,400
12	-	-	-	AS7	13	409,600
13	-	-	-	AS8	16	409,600
14	-	-	-	AS9	3	409,600
15	-	-	-	AS10	5	1,638,400
รวม	-	-	-		99	-

หมายเหตุ - /1 complete Freund's adjuvant

- /2 incomplete Freund's adjuvant
- ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติมสับสเตรท
- ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก



ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อ recombinant protein CryIAb/Ac จากการเจาะเลือด 10 ครั้ง โดยใช้ recombinant protein CryIAb/Ac เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA วัดค่าดูดกลืนแสงที่ A_{405} หลังจากเติม สับสเตรท 30 นาที

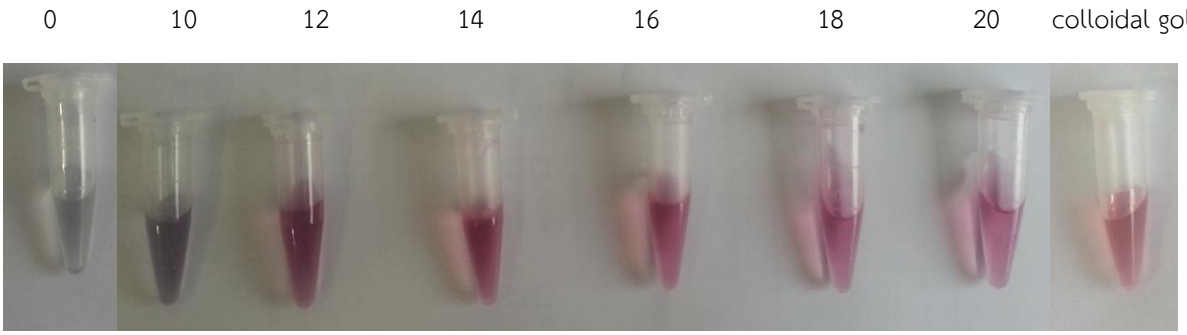


ภาพที่ 10 แสดงแถบโปรตีนขนาดประมาณ Heavy chain และ light chain ขนาด 50 และ 25 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น IgG ต่อโปรตีน CryIAb/Ac ในข้าวดัดแปรพันธุกรรม ที่ทำให้บริสุทธิ์ชุดสกัด protein A เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE (M=Protein marker, ช่องที่ 1= IgG-AS_3 ตามลำดับ)

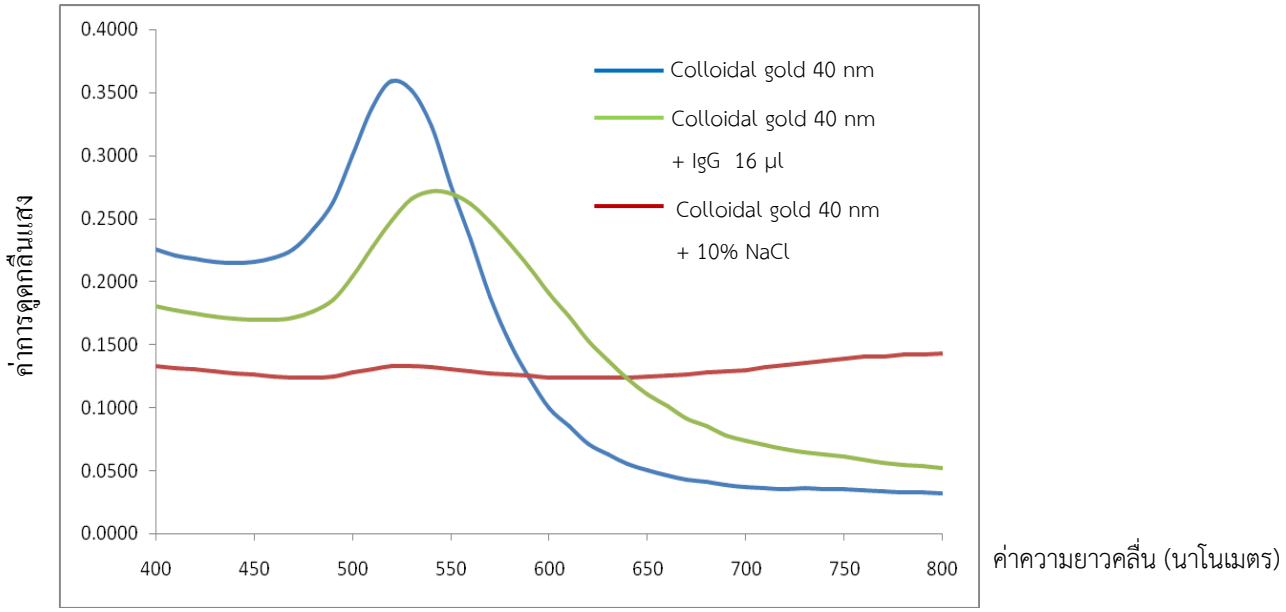
4. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี

4.1 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตรด้วยเทคนิค electrostatic force

จากการทดสอบเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมระหว่าง colloidal gold กับ IgG ที่อัตราส่วนต่างๆ เบื้องต้นจะสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงได้จากสีของ colloidal gold ที่เปลี่ยนแปลงจากปกติ (สีม่วงแดง) ซึ่งหากปริมาณของ colloidal gold และ IgG มีอัตราส่วนที่ไม่สมดุลกันนั้น ปริมาณของ colloidal gold ซึ่งมีประจุบวก จะจับกับ NaCl ที่มีประจุเป็นลบ จนตกตะกอน หรือเปลี่ยนเป็นสีม่วงเทา เลือกปริมาณของ IgG ที่ 16 ไมโครลิตร เพราะเป็นปริมาณของ IgG ที่เมื่อทดสอบกับ 10% NaCl ยังคงมีสีที่ใกล้เคียงกับ colloidal gold ปกติ ภาพที่ 11 เมื่อนำ colloidal gold conjugated IgG ที่ระดับความเข้มข้นของ IgG 16 ไมโครลิตร ไปตรวจวัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 400-800 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ colloidal gold และ colloidal gold ที่เติมเฉพาะ 10% NaCl และ colloidal gold conjugated IgG พบว่า colloidal gold conjugated IgG ให้ค่า $OD_{400-800}$ ต่ำกว่า Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร แต่ยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า colloidal gold +10% NaCl ภาพที่ 12 ซึ่งแสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของ IgG ที่ 16 ไมโครลิตร ยังเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับ colloidal gold ต้องทำการคัดเลือกระดับความเข้มข้นใหม่โดยอาจทำการตรวจวัดที่ระดับค่าความยาวเฉพาะค่าที่ colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร คือค่า OD_{530} เพียงค่าเดียวเปรียบเทียบแต่ล่ะระดับความเข้มข้น โดยเลือกค่าที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าและใกล้เคียงกับ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ซึ่งจะถือว่าเป็นช่วงที่การเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อได้ดีที่สุด



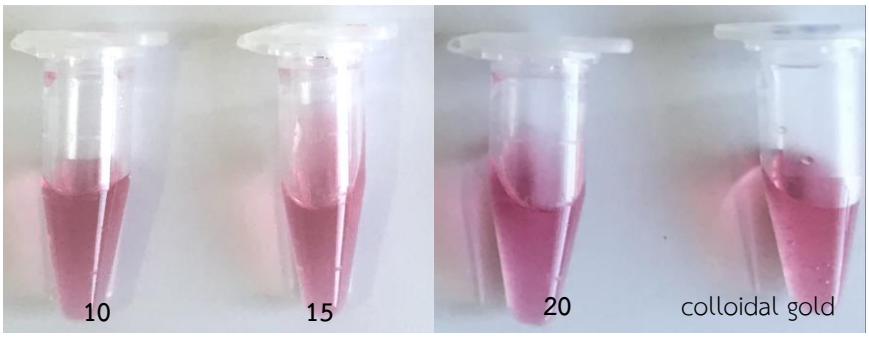
ภาพที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของ colloidal gold ที่ปริมาณความเข้มข้นของ IgG ของ PAb-CryIAb/Ac ที่ระดับความเข้มข้น 10, 12, 14, 16, 18, 20 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร ที่ 10 นาทีหลังการเติม 10 % NaCl



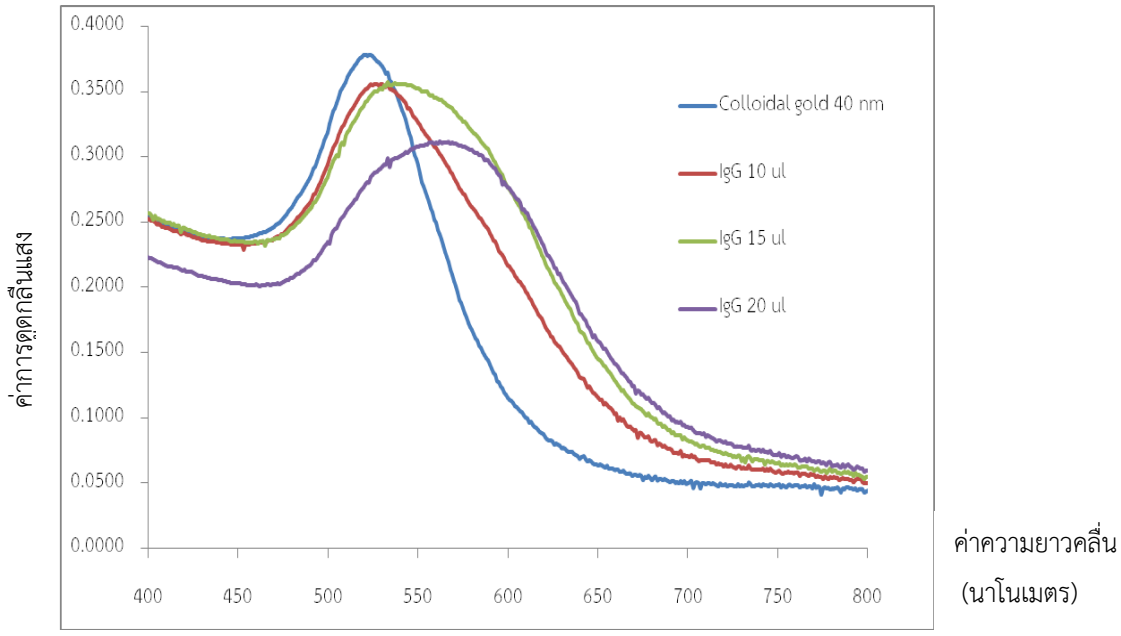
ภาพที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{400-800}$ นาโนเมตร ของ colloidal gold ปกติ, Colloidal gold 40 + IgG 16 ไมโครลิตร และ colloidal gold 40 nm + 10% NaCl ที่เวลา 10 นาที

4.2 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตรด้วยเทคนิค neary covalent

การใช้ IgG linker ในการเชื่อมต่อกับอนุภาคทอง ซึ่งจะได้ colloidal gold conjugated IgG ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ colloidal gold และ IgG ที่เชื่อมต่อกันจะมีความเสถียรและไม่หลุดจากกันเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH หรือสภาวะต่างๆ จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{400-800}$ ของ gold และ gold conjugated IgG ช่วงของค่าดูดกลืนแสงสูงสุดควรแตกต่างกันไม่เกิน 10 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อ gold conjugated IgG บริเวณพื้นผิวของ colloidal gold จะมี IgG เข้ามาจับรอบๆ พื้นที่ผิว เมื่อตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงจึงตรวจวัดค่าได้น้อยกว่า colloidal gold ปกติ จากการตรวจวัดค่าการดูด colloidal gold ให้ค่า $OD._{521}$ เท่ากับ 0.3781 และค่า gold conjugated IgG ที่อัตราส่วน 10 และ 15 ไมโครลิตร ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ $OD._{533}$ ที่ 0.3565 และ 0.3567 ตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วน 20 ไมโครลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกับ IgG อีก 2 อัตราส่วนมาก ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ $OD._{562}$ ได้เท่ากับ 0.3113 ความยาวของค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกับ colloidal gold ถึง 41 นาโนเมตร แสดงว่าที่ IgG อัตราส่วนมากเกินเมื่อไปจับกับ colloidal gold แล้วทำให้พื้นที่ผิวของ colloidal gold เสียสภาพไปจากเดิม จึงเป็นอัตราส่วนที่ไม่ควรนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจดูจากการเปลี่ยนแปลงสีของ colloidal gold อาจเห็นไม่ชัดเจนมาก จึงต้องดูจากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ภาพที่ 13 และ 14



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงสีของ gold conjugated IgG ที่อัตราส่วน IgG linker ที่ 10, 15, 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ colloidal gold ปกติ ที่ 10 นาทีหลังการเกิดปฏิกิริยา

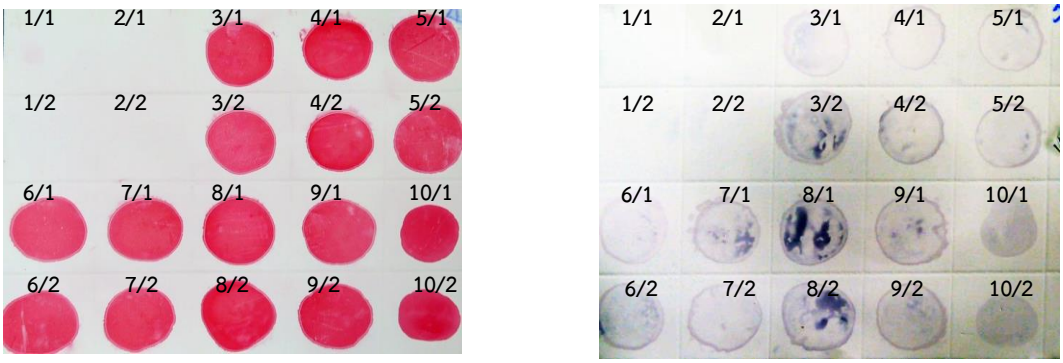


ภาพที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{400-800}$ นาโนเมตร ของ gold conjugated IgG ที่อัตราส่วน IgG linker ที่ 10, 15, 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับ colloidal gold ปกติ ที่เวลา 10 นาที

4.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อ protein CrylAb/Ac ในตัวอย่าง supernatant ของเซลล์แบคทีเรีย และโปรตีน CrylAb/Ac ที่ทำบริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน CrylAb จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CrylAb/Ac และ CrylAb พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 2 มีความคล้ายคลึง โปรตีน CrylAb เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน CrylAb/Ac เพราะฉะนั้น แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากการใช้โปรตีน CrylAb/Ac เป็นแอนติเจน แอนติบอดีต้องตรวจสอบโปรตีน CrylAb ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียว ซึ่งจากการตรวจสอบด้วย

เทคนิค DIBA โดยใช้ IgG ในการตรวจสอบตัวอย่างหลากหลายชนิด เพราะคุณสมบัติของแอนติบอดีแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นชนิดของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายในการจับกับส่วนต่างๆของแอนติเจน แต่ละโมเลกุลมีโครงสร้างในส่วน variable region แตกต่างกันและมีความเฉพาะเจาะจง และความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้น IgG ที่สกัดจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีจึงมีความสามารถในการแอนติเจนจากตัวอย่างจาก supernatant ของเซลล์แบคทีเรีย และโปรตีน CryIAb/Ac ที่ทำบริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน CryIA(b) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ที่ใช้ IgG และ gold conjugated IgG ภาพที่ 15

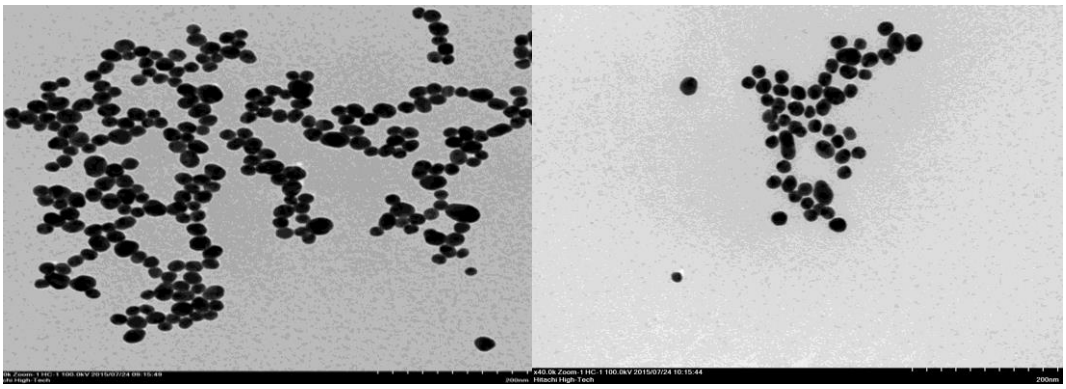


ภาพที่ 15 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค DIBA ก. IgG และ ข. gold conjugated IgG, 1/1, 1/2 คือ Buffer, 2/1, 2/2 คือ Negative, 3/1, 3/2 คือ Supernate CryIAb/Ac , 4/1, 4/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#2, 5/1, 5/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#3, 6/1, 6/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#4, 7/1, 7/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#5, 8/1, 8/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#6, 9/1, 9/2 คือ โปรตีน CryIAb/Ac#7 และ 10/1, 10/2 คือ โปรตีน CryIAb

4.4 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะ colloidal gold และ gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการตรวจสอบขนาดของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่านพบว่า ขนาดของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ขนาดของ colloidal gold conjugated IgG มีขนาดเฉลี่ย 30 นาโนเมตร ใหญ่กว่า colloidal gold มีขนาดเฉลี่ย 22 นาโนเมตร ภาพที่ 16 ถึงแม้ขนาดของ colloidal gold ยังมีขนาดไม่ถึง 40 นาโนเมตร แต่ก็อยู่ในช่วง 20-40 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีและมีสีแดงทำให้แสดงผลการตรวจสอบที่ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาบนเมมเบรนที่มีสีขาว ลักษณะของ colloidal gold conjugated IgG ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีความเสถียรของอนุภาคค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับค่าการ

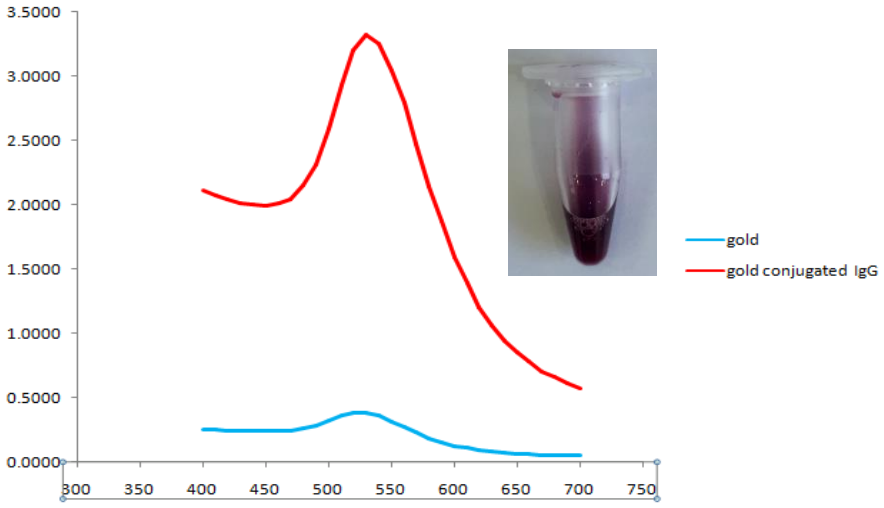
ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ O.D.$_{533}$ มีค่าเท่ากับ 3.134 ภาพที่ 17 จะให้ค่าการดูดกลืนมากแสงกว่า colloidal gold ปกติที่ให้ค่าการดูกลืนแสงสูงสุดที่ O.D.$_{522}$ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.385 แสดงให้เห็นว่า colloidal gold สามารถเชื่อมต่อกับ IgG ได้สำเร็จสามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบได้



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบขนาดของ Colloidal gold ก่อนและ gold conjugated IgG ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย x40.0k ที่ 100 กิโลโวลต์

ก) Colloidal gold ก่อนเชื่อมต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 22 นาโนเมตร

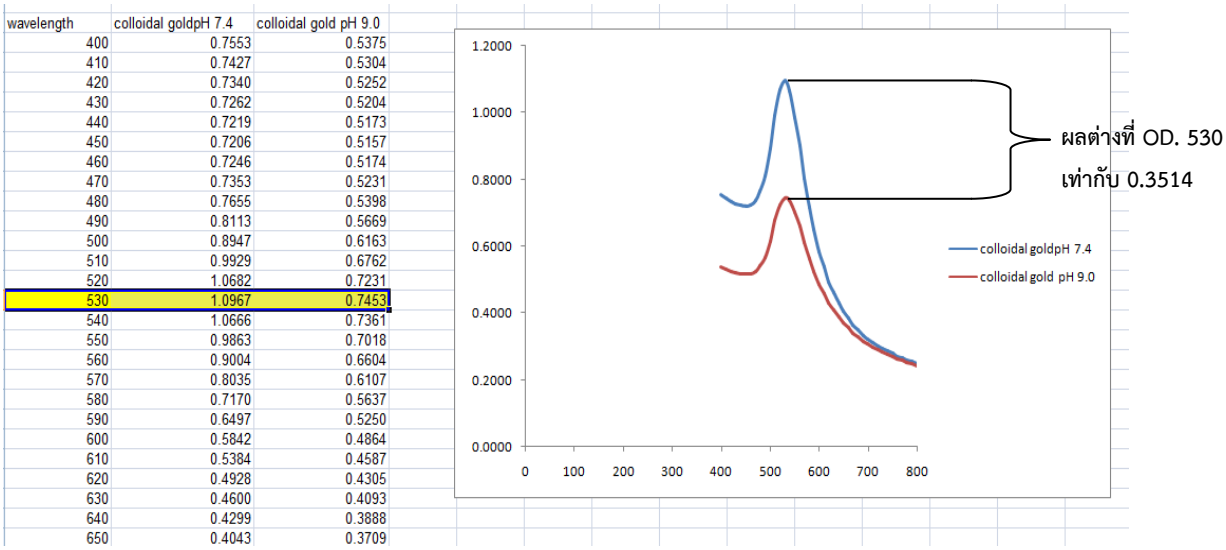
ข) Colloidal gold conjugated IgG ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 30 นาโนเมตร ตามลำดับ



ภาพที่ 17 ผลการตรวจ gold conjugated IgG ตกตะกอนในสารละลาย diluent buffer ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ OD.$_{530}$ เท่ากับ 3.3197

4.5 การทดสอบหาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อกับ IgG ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

จากการเปรียบเทียบค่า pH ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ค่า 7.4 และ 9.0 เพื่อคัดเลือกค่า pH ของ colloidal gold ที่ประสิทธิภาพและความเสถียรในการเชื่อมต่อกับ IgG พบว่าเมื่อนำ gold conjugated IgG ไปตรวจวัดค่า $OD._{400\text{-}800}$ กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ค่า $OD._{530}$ ซึ่ง colloidal gold pH 7.4 มีค่าเท่ากับ 1.0967 และ colloidal gold pH 9.0 เท่ากับ 0.7453 พบว่า colloidal gold pH 7.4 ให้ค่า $OD._{530}$ มากว่า colloidal gold pH 9.0 อยู่ 0.3514 ข้อมูลพบว่า colloidal gold pH 7.4 สามารถเชื่อมต่อกับ IgG ได้ดีกว่า colloidal gold pH 9.0 ภาพที่ 18 แสดงให้เห็นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัด colloidal gold pH 7.4 มีค่ามากกว่า colloidal gold pH 9.0 แสดงว่าบนพื้นที่ผิวของ colloidal gold pH 7.4 มีการเชื่อมต่อกับ IgG ได้มากกว่า colloidal gold pH 9.0 จึงควรเลือก colloidal gold pH 7.4 ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ



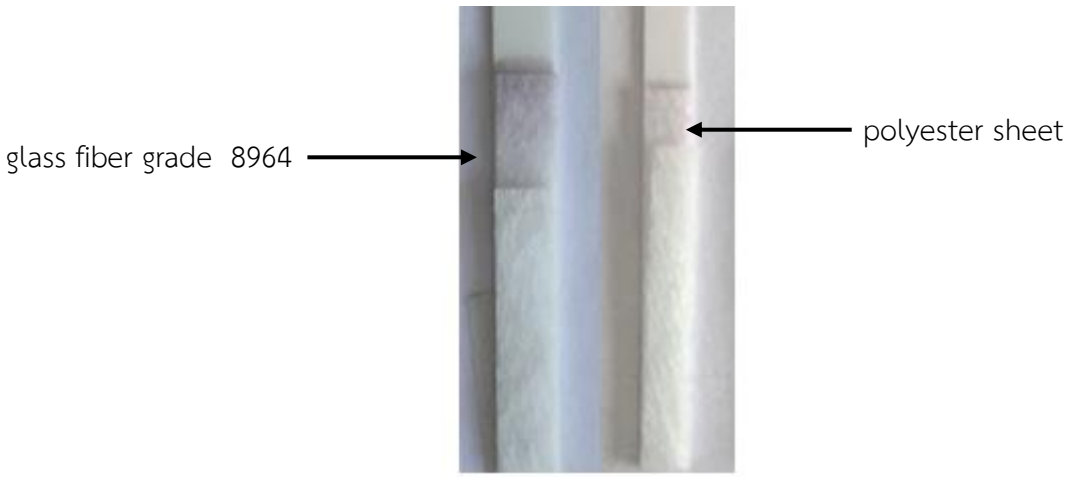
wavelength	colloidal goldpH 7.4	colloidal gold pH 9.0
400	0.7553	0.5375
410	0.7427	0.5304
420	0.7340	0.5252
430	0.7262	0.5204
440	0.7219	0.5173
450	0.7206	0.5157
460	0.7246	0.5174
470	0.7353	0.5231
480	0.7655	0.5398
490	0.8113	0.5669
500	0.8947	0.6163
510	0.9929	0.6762
520	1.0682	0.7231
530	1.0967	0.7453
540	1.0666	0.7361
550	0.9863	0.7018
560	0.9004	0.6604
570	0.8035	0.6107
580	0.7170	0.5637
590	0.6497	0.5250
600	0.5842	0.4864
610	0.5384	0.4587
620	0.4928	0.4305
630	0.4600	0.4093
640	0.4299	0.3888
650	0.4043	0.3709

ภาพที่ 18 เปรียบผลการตรวจวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น $OD._{400\text{-}800}$ ระหว่าง gold conjugated IgG ที่ใช้ colloidal gold pH 7.4 และ colloidal gold pH 9.0

4.6 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ conjugate pad

จากการทดสอบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE 99 และ Unisart 140 gold conjugated IgG สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Unisart 140 เมมเบรนได้ดีกว่า AE 99 ผลการเกิดปฏิกิริยาบริเวณ control line และ test line ให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน CrylAb/Ac สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Unisart 140 ได้

ดีกว่าเมมเบรนชนิด AE 99 จึงควรคัดเลือกเมมเบรนชนิดดังกล่าวไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ พบว่าการเคลื่อนที่ของ conjugate pad ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิดคือ glass fiber grade 8964 และ polyester sheet หลังจากหยดตัวอย่างให้ไหลผ่าน conjugate pad ทั้ง 2 ชนิด พบว่า polyester sheet สามารถปล่อย gold conjugated IgG ค่อยๆ ไหลผ่านไปได้รวดเร็ว เหลือปริมาณ gold conjugated IgG ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปได้ในปริมาณน้อยกว่า glass fiber grade 8964 ภาพที่ 18 แสดงว่า polyester sheet มีคุณสมบัติในการจับและปล่อย gold conjugated IgG ได้ดีกว่า polyester sheet ขนาดและรูพรุนของ polyester sheet มีขนาดใหญ่พอให้ gold conjugated IgG เคลื่อนที่ผ่านไปได้ ในขณะที่ glass fiber grade 8964 ไม่สามารถปล่อย gold conjugated IgG บางส่วนที่มีขนาดใหญ่ผ่านไปไม่ได้และเกิดปฏิกิริยาช้ากว่า จึงเหลือ gold conjugated IgG บางส่วนยังติดอยู่บนแผ่น glass fiber grade 8964 ซึ่งความสามารถในการปล่อยให้ gold conjugated IgG ที่จับกับแอนติเจนเคลื่อนที่ไปได้หมดจะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ แต่ในทางกลับกันเมื่อเกิดการจับและเคลื่อนที่เร็วเกินไปจะทำให้ มีระยะเวลาในการตรวจจับกับแอนติเจนน้อยเกิดไป ซึ่งจะส่งผลให้มีแอนติเจนตกค้างอยู่บริเวณของ conjugate pad จึงส่งผลให้บริเวณ test line ก็จะมีแอนติเจนไม่เพียงพอให้ test line ตรวจจับ ทำให้ชุดตรวจสอบไม่สามารถตรวจจับแอนติเจนหรือโปรตีน CryIAb/Ac ในปริมาณต่ำ ๆ ได้ เพราะฉะนั้นจึงควรคัดเลือก glass fiber grade 8964 ไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ แต่ควรมีการศึกษาสารละลาย blocking solution เพิ่มเติม เพราะชนิดของ blocking solution ที่มีส่วนผสมของ BSA และ Sucrose มีผลกระทบต่อการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่หยดบนชุดตรวจสอบ และมีส่วนช่วยในการป้องกันบริเวณพื้นผิวของ colloidal gold ที่ไม่ได้ตรวจจับกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ และส่งผลให้การตรวจสอบสามารถตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 19 แสดงผลการเคลื่อนที่ผ่าน glass fiber grade 8964 และ polyester sheet ของ gold conjugated IgG ที่ระยะเวลา 5 หลังจากหยดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร

4.7 ปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของ control line และ test line

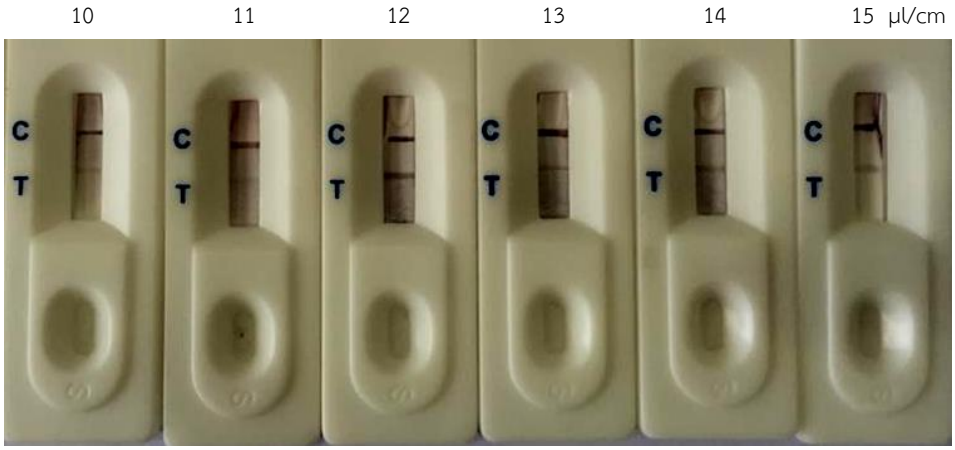
จากการทดสอบอัตราส่วนของ control line ที่ใช้ GAR อัตราส่วน 1:2 และ 1:3 และ test line ที่เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราส่วนที่เกิดปฏิกิริยาบริเวณ control line และ test line ที่ชัดเจนที่สุด คือ GAR อัตราส่วน 1:2 ให้ผลการตรวจสอบที่บริเวณได้ดีกว่า อัตราส่วน 1:3 เมื่อใช้ GAR อัตราส่วน 1:2 ที่ปริมาณ 1, 1.5 และ 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างเมื่ออ่านผลการตรวจสอบในระดับสายตา test line ที่เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจนเพียงพอ การเกิดปฏิกิริยาการตรวจจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีมีความเหมาะสมกัน ฉะนั้น อัตราส่วนของ control line ที่ใช้ GAR อัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และ test line ที่เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

4.8 การหาปริมาณความเหมาะสมของ gold conjugated IgG สำหรับลงบนแผ่น Conjugate pad

จากการทดสอบอัตราส่วนของ gold conjugated IgG จำนวน 2 ความเข้มข้นคือ gold conjugated IgG ที่ใช้ IgG-linker ปริมาณ 10 และ 15 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร เมื่อพ่น gold conjugated IgG ทั้ง 2 อัตราส่วน ที่ปริมาณ 10, 20, 30 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร พบว่าระดับความเข้มข้นของ IgG-linker ปริมาณ 15 ไมโครลิตร เมื่อทดสอบโดยการหยดตัวอย่างโปรตีนลงไปปริมาณ 100 ไมโครลิตร gold conjugated IgG จับ

กับโปรตีนเป้าหมายแล้วเกิดการตกตะกอนและเคลื่อนที่ไปอย่างช้า สีของ colloidal gold เมื่อปฏิกิริยาการทดสอบเกิดช้ามีผลให้การเปลี่ยนแปลงของจากสีแดงกลายเป็นสีม่วง เพราะมีเวลาให้ปริมาณเกลือที่เหลืออยู่ในตัวอย่างโปรตีนจับกับอนุภาคทองจึงส่งผลให้สีการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบเกิดการเปลี่ยนแปลง จึงเป็นอัตราส่วนที่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ พบว่าที่ IgG-linker อัตราส่วนปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร เมื่อทดสอบโดยพ่น gold conjugated IgG ที่ 10, 20, 30 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่อัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ปริมาณ gold conjugated IgG น้อยเกินไปไม่เพียงต่อการจับกับแอนติเจน และเกิดการเคลื่อนที่ของ gold conjugated IgG ไปอย่างรวดเร็ว จนบริเวณ test line และ control line ไม่สามารถจับกับแอนติเจนและเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราส่วนของ gold conjugated IgG ที่เหมาะสมคือปริมาณช่วงที่มากกว่า 10 แต่ไม่เกิน 20 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรไปทำการทดสอบต่อ หากมีปริมาณ gold conjugated IgG มากกว่า 20 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร หาก gold conjugated IgG ที่มากเกินไปทำให้เมื่อจับกับแอนติเจนแล้วไปบดบังตำแหน่งอิพิโทปบนแอนติเจนจนหมดไป เหลืออิพิโทปที่ว่างให้บริเวณ test line ได้จับ และยังทำให้ขนาดโมเลกุลมีขนาดใหญ่มากเกิน ทำให้เคลื่อนที่ได้ช้าหรือยังเหลือ gold conjugated IgG บางส่วนติดอยู่บริเวณ conjugate pad นอกจากปริมาณที่มากเกินไปแล้ว ยังไปยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของชุดตรวจสอบอีกด้วย

เมื่อทดสอบ gold conjugated IgG ที่อัตราส่วน 10, 11, 12, 13, 14, 15 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร พบว่าทุกอัตราส่วนที่นำมาใช้ในการทดสอบยังคงเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงในระดับหนึ่ง ตารางที่ 2 ซึ่งอัตราส่วนที่พบว่าให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและเกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนคืออัตราส่วน 12, 13, 14, 15 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ภาพที่ 20 แต่ในอัตราส่วนที่ 15 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็นอัตราส่วนที่ปริมาณ gold conjugated IgG มากเกินไป เหลือส่วนของ gold conjugated IgG ที่ไม่จับกับโปรตีนเป้าหมายมากเกินและมีผลกระทบต่ออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของชุดตรวจสอบ ทำให้ผลการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบเกิดความล่าช้า เมื่อทดสอบด้วยเซลล์แบคทีเรียที่มีความข้นของตัวอย่างมากเกินไปทำให้ตัวอย่างจับกับ gold conjugated IgG แล้วตกตะกอนยึดติดกับที่ อาจเกิดจากโปรตีนเป้าหมายมากเกินไปเมื่อจับกับ gold conjugated IgG ที่มากด้วยทำให้ไหลผ่านรูพรุนบน glass fiber ได้ยาก จึงไม่เหมาะสมที่จะเป็นอัตราส่วนในการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ จึงเลือกอัตราส่วนที่ 12.5 ไมโครลิตรไปพัฒนาชุดตรวจสอบ ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่อยู่ระหว่าง 12-14 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็นอัตราส่วนที่ไม่สิ้นเปลือง gold conjugated IgG และมีปริมาณที่พอเหมาะในการการจับกับโปรตีนเป้าหมายแล้วสามารถเคลื่อนที่ไปตามหลักโครมาโตกราฟฟีได้อย่างเหมาะสม



ภาพที่ 20 ผลการทดสอบโปรตีน CryIAbAc ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ด้วยชุดตรวจสอบโปรตีนที่พ่น gold conjugated IgG อัตราส่วน 10, 11, 12, 13, 14, 15 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 10 นาที

ตารางที่ 2 แสดงระดับความเจือจางของตัวอย่าง โปรตีน CryIAbAc และเซลล์แบคทีเรีย เมื่อใช้ gold conjugated IgG ที่อัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วน gold conjugated IgG (ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร)	โปรตีน CryIAbAc				เซลล์แบคทีเรีย			
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
10	++	++	+-	+-	+-	+-	+-	+-
11	++	++	+-	+-	+-	+-	+-	+-
12	++	++	++	+-	++	++	+-	+-
13	++	++	++	+-	++	++	+-	+-
14	++	++	++	+-	++	++	+-	+-
15	++	++	++	+-	++	++	+-	+-

หมายเหตุ +- คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลบวก test line ให้ผลลบ

++ คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลบวก test line ให้ผลบวก

-- คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลลบ test line ให้ผลลบ

4.9 ทดสอบหา Extraction buffer สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ชนิดของ Extraction buffer มีผลกระทบโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ ซึ่งคุณสมบัติของ Extraction buffer จะต้องที่ความสามารถในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีปริมาณและรักษาสภาพโปรตีนได้ดี ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนเป้าหมาย จากการทดสอบ Extraction buffer ทั้ง 6 ชนิด ภาพที่ 21 พบว่าชนิดของ Extraction buffer มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ คือ Lysis buffer เกิดผลบวกเทียม (false positive) บัพเฟอร์มีสารที่มีผลกระทบกับเมมเบรนโดยการกัดกร่อนเมมเบรนเป็นรูพรุน เช่นเดียวกับ 2% CTAB ที่ให้ผลการตรวจสอบบริเวณ control line ชัดเจน แต่มีสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนเมมเบรนจึงไม่ควรนำมาใช้ในการสกัดตัวอย่าง ส่วน Extraction strip kit Agdia, Borate buffer pH 7.4 ให้ผลการตรวจสอบบริเวณที่แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ชัดเจน Extraction buffer ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมตัวอย่าง คือ DOA extraction buffer pH 8.5 และ 1xPBS pH 7.4 เมื่อดูที่อัตราการไหลของที่ผ่านบริเวณ conjugate pad จนกระทั่งถึง absorbent pad และทิ้งไว้จนครบเวลา 10 นาที แล้วอ่านผลพบว่า DOA extraction buffer pH 8.5 สารละลายบัฟเฟอร์จะค่อยเคลื่อนที่ไปในอัตราเร็วที่เหมาะสม ต่างกับ 1xPBS pH 7.4 ที่สารละลายเคลื่อนที่เร็วเกิดไปอาจจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาคือ ช่วงเวลาในการจับแอนติเจนของ gold conjugated IgG รวดเร็วเกินไป จะทำให้ gold conjugated IgG จับแอนติเจนได้อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ หรือมีปริมาณแอนติเจนน้อยเกินไปจนบริเวณ test line ไม่สามารถตรวจจับได้ รวมถึงมีปริมาณ IgG น้อยเกินไปสำหรับ control line ทำให้เกิดผลการตรวจสอบที่ไม่ชัดเจน แม่นยำ เพราะฉะนั้นควรเลือก DOA extraction buffer pH 8.5 ไปใช้ทดสอบชุดตรวจสอบต่อไป เนื่องเป็น Extraction buffer ที่ค่อยๆ ปล่อยให้สารละลายค่อยๆ ที่ไปบนชุดตรวจสอบ ไม่เกิด false positive สีของปฏิกิริยาที่แสดงผลการตรวจสอบชัดเจนกว่าบัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

4.10 การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบพบว่า ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ชุดตรวจสอบไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนทั้ง NK 603, EPSPS, NPTII, Cry9C, BSA และ DOA extraction buffer แต่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน CryIAb ตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีส่วนคล้ายคลึงกับโปรตีน CryIAb/AC จึงทำให้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนของโปรตีน CryIAb ได้เช่นกัน สำหรับการตรวจสอบโปรตีนเป้าหมาย CryIAb/AC ชุดตรวจสอบมีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนเป้าหมาย สามารถอ่านผลการตรวจสอบได้อย่างชัดเจนภายในระยะเวลา 10 นาที หลังจากหยดตัวอย่างทดสอบ แต่เมื่อนำไปทดสอบกับผลิตภัณฑ์ข้าวที่มีการปนเปื้อนของพืชดัดแปรพันธุกรรม พบว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาไม่สามารถตรวจสอบได้ อาจเนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดัดแปร

พันธุกรรมในปริมาณน้อย และตัวอย่างผ่านการแปรรูปอาจทำให้โปรตีนมีการเสียสภาพไปจนแอนติบอดีไม่สามารถตรวจจับได้ อาจจะทดสอบหาชนิดของ Extraction buffer ที่สามารถสกัดโปรตีนให้ออกมาในสภาพเดียวกับแอนติเจนที่นำไปใช้ฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดี เพราะฉะนั้นจากการทดสอบจะเห็นได้ว่า Extraction buffer ชนิดของตัวอย่าง ระดับความปนเปื้อน มีผลต่อการทดสอบกับชุดตรวจสอบเป็นอย่างมากเพราะสภาพของโปรตีนของโปรตีนเป้าหมายที่อยู่ในตัวอย่างต่างชนิดกัน มีลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ความมีเสถียรภาพของโปรตีนจึงมีผลอย่างยิ่งต่อการทดสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบ

จากการทดสอบความไวในการตรวจสอบและระดับความเจือจางต่ำสุดของชุดตรวจสอบที่ประกอบด้วย control line ที่เจือจาง 1: 2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เมื่อจะพัฒนาชุดตรวจสอบ ควรใช้ gold conjugated IgG ที่ 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เมื่อทดสอบโปรตีน Cry IAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 5 ระดับความเข้มข้นคือ 1:100, 1:200, 1:400, 1: 800 พบว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่ 1:400 คิดเป็นความเข้มข้นโปรตีน 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสามารถตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีน CryIAb/Ac ที่ความเจือจาง 1:200 แสดงให้เห็นว่าแม้ตัวอย่างโปรตีนเป้าหมายปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ใช่สภาพตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ ชุดตรวจสอบที่ DOA extraction buffer สกัดโปรตีนยังคงสามารถตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภาพที่ 22

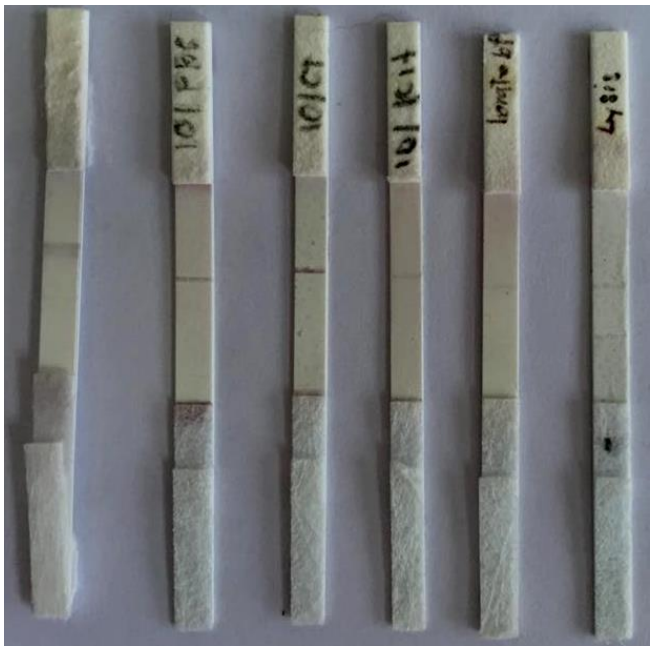
4.12 การปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างสำหรับใช้ทดสอบ

เมื่อทดสอบชุดตรวจสอบด้วยปริมาณตัวอย่างที่แตกกันคือ 70, 80, 90 และ 100 ไมโครลิตร พบว่าปริมาณตัวอย่างมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบคือ ปริมาณตัวอย่างที่มากเกินไปทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่จับกับ gold conjugated IgG เคลื่อนที่ได้ช้า เมื่อเคลื่อนที่ถึง absorption pad ทำให้สารละลายส่วนที่เหลือเกินความสามารถในการดูดซับของ absorption pad ไหลย้อนกลับ อาจส่งผลกระทบคือ มาบดบังการแสดงผลการตรวจสอบบริเวณของส่วน control line และ test line ภาพที่ 23 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบควรใช้ที่ 80 ไมโครลิตรก็เพียงพอสำหรับการทดสอบ

4.13 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน CryIAb/Ac ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนที่ได้อยู่ในสภาพ denature และตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ในสภาพ native พบว่าทั้งชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นและชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายทางการค้าสามารถตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่ได้อยู่ในสภาพ denature และสภาพ native ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ทดสอบ ซึ่งชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของบริษัท Agdia สามารถตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่อยู่ในสภาพ

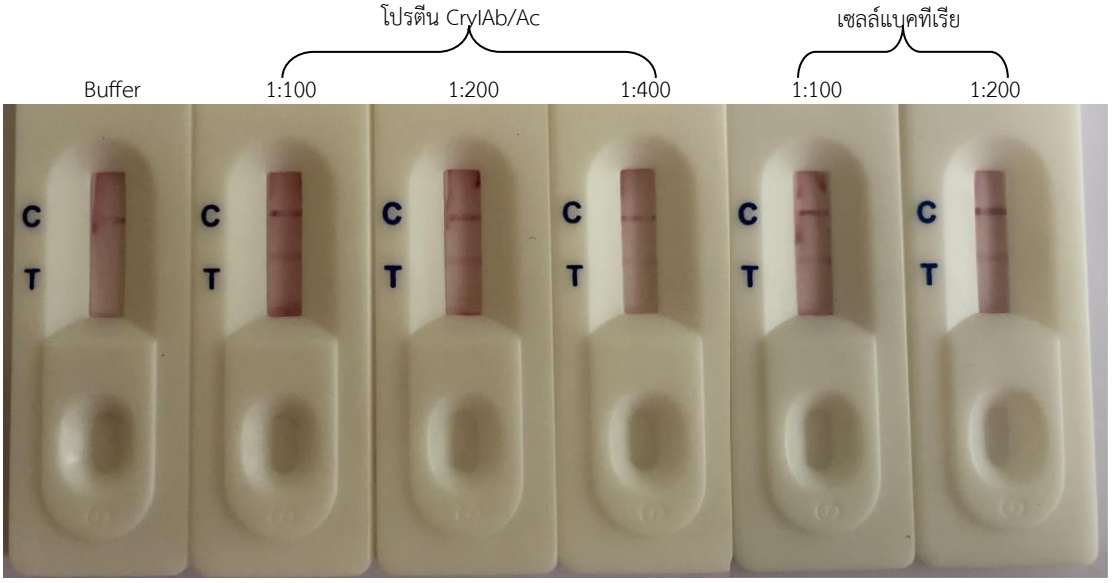
ธรรมชาติ (native) ได้ดีกว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ สามารถตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:1,600 ภายในระยะเวลา 5 นาที ในขณะที่ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบที่ระดับความเจือจางที่ 1:200 และสามารถตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน CrylAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีเมื่อเจือจางโปรตีน 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:400 ภาพที่ 24 ซึ่งสามารถตรวจสอบโปรตีนในสภาพ denature ได้ดีกว่าชุดตรวจสอบที่จำหน่ายเพื่อการค้า เพราะจะนั้นชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นถือเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต



ภาพที่ 21 ผลการทดสอบ Extraction bufferจำนวน 6 ชนิด คือ DOA extraction buffer pH 8.5, 1xPBS pH 7.4, 2% CTAB, Extraction strip kit Agdia, Borate buffer pH 7.4, Lysis buffer เปรียบเทียบผลการตรวจสอบบริเวณ control line

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบกับโปรตีนชนิดต่างๆ อ่านผลการตรวจสอบที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังจากหยดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร

ชนิดตัวอย่าง	ผลการเกิดปฏิกิริยา
DOA extraction buffer	-
BSA	-
NK 603	-
EPSPS	-
NPTII	-
Cry9C	-
Cry IAb	+
Cry IAb/Ac	++
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ข้าว	-



ภาพที่ 22 ผลการทดสอบชุดตรวจสอบที่ใช้ gold conjugated IgG อัตราส่วน 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร control line 1:2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังหยดตัวอย่าง

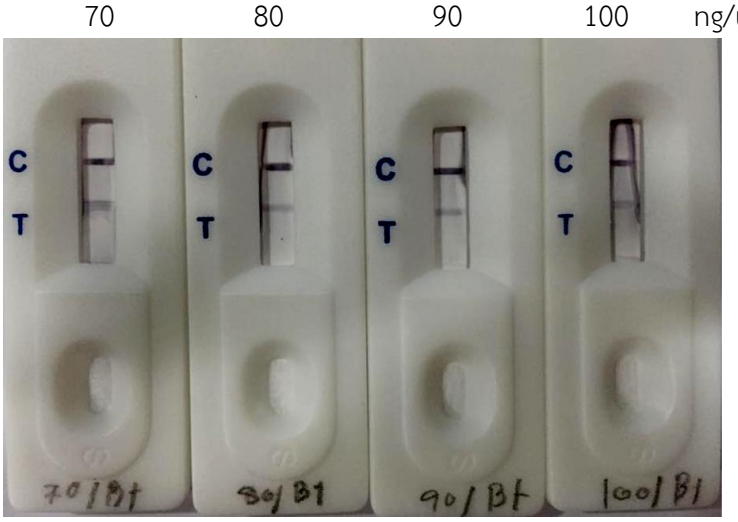
ตารางที่ 4 ผลการเกิดปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบที่อัตราส่วนและความเข้มข้นของ control line และ test line ที่ระดับต่างๆ ที่ระยะเวลา 10 นาทีทดสอบกับตัวอย่าง โปรตีน CryIAbAC ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

Control line (ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร)		Test line					
		1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร)			2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร)		
		1	1.5	2	1	1.5	2
GAR 1:2	1	+-	+-	+-	+-	++	++
	1.5	+-	+-	+-	+-	++	++
	2	+-	+-	+-	+-	++	++
GAR 1:3	1	--	--	--	+-	++	++
	1.5	--	--	--	+-	++	++
	2	+-	+-	+-	+-	++	++

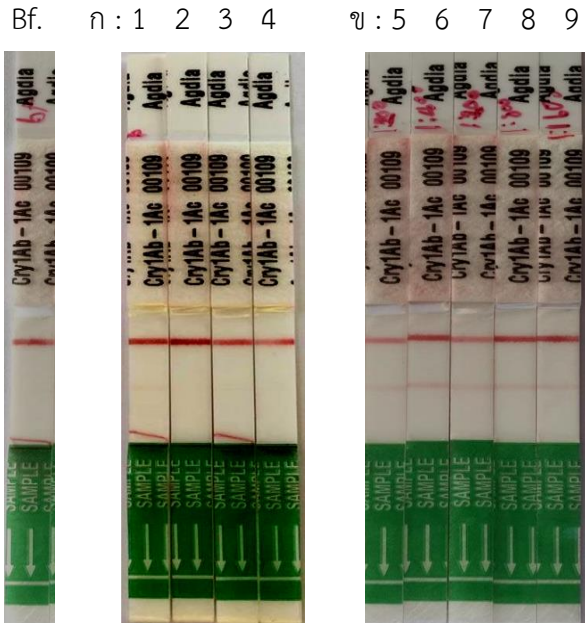
หมายเหตุ +- คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลบวก test line ให้ผลลบ

-- คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลลบ test line ให้ผลลบ

++ คือ ผลการทดสอบ control line ให้ผลบวก test line ให้ผลบวก



ภาพที่ 23 ผลการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบใช้ปริมาณตัวอย่างในการทดสอบความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ70, 80, 90 และ 100 ไมโครลิตรที่ระยะเวลา 10 นาที



ภาพที่ 24 ผลการทดสอบชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของบริษัท Agdia ต่อโปรตีน CryIAb/Ac, ก : 1, 2, 3, 4 คือ โปรตีน CryIAb/Ac ที่เจือจาง 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 ข : 5, 6, 7, 8, 9 คือเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600 ตามล

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชุดตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 เริ่มจากการสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* ขนาด 1,845 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® แล้วโคลนเข้าสู่ pET 200/D-TOPO® และถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียมาผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดโปรตีนขนาด 68 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 3.5 พบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์จะทำได้ยาก กระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีนทำให้ได้โปรตีนที่เสียสภาพ ถึงแม้จะมีการนำโปรตีนดังกล่าวไปทำ dialysis เพื่อให้โปรตีนคืนกลับในสภาพธรรมชาติก็ไม่สามารถทำให้โปรตีนกลับสู่สภาพธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ ก่อนนำโปรตีนไปใช้เป็นแอนติเจนตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายอีกครั้งโดยใช้ anti-6x His tag ตรวจสอบ His-tag เชื่อมติดอยู่กับโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค western blot จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ฉีดกระตุ้นกระต่าย เจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมมากแยกสัด IgG ด้วยชุดสกัด protein A ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ IgG โดยเฉพาะ พบว่าแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองมีผลกระทบต่อคุณภาพของแอนติบอดอย่างมาก เนื่องจาก

กระบวนการผลิตแอนติบอดี สัตว์ทดลองจะตอบสนองและจดจำแอนติเจนได้ในสภาพของแอนติเจนที่เป็นสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกาย อิพิโทปของแอนติบอดีจดจำแอนติเจนในรูปแบบที่เสียสภาพ เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบจึงส่งผลให้ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ในสภาพธรรมชาติได้ไม่ดีเท่ากับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทางการค้า แต่อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบก็สามารถตรวจสอบโปรตีนในข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ได้ทั้งในสภาพ denature และ native โดยสามารถตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 62.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ตัวอย่างทดสอบครั้งละ 80 ไมโครลิตร โดยใช้ DOA extraction buffer ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจับกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่อ่อนสามารถทำลายได้ด้วยสารละลายที่เป็นกรด เบส หรือเกลือ เพราะฉะนั้นชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบมีผลโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ ควรมีการศึกษาพัฒนาสารละลายบัฟเฟอร์ในการสกัดโปรตีนในตัวอย่างทดสอบเพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ชุดตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้น สามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ภายในระยะเวลา 10 นาทีหลังจากหยดตัวอย่างทดสอบ ซึ่งผลการใช้ชุดตรวจสอบในการตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac สอดคล้องกับการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค DIBA และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นๆ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 ถือเป็นงานวิจัยต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อนำมาใช้ในการตรวจติดตามการแพร่ระบาดของข้าวดัดแปรพันธุกรรมในสภาพแปลง การนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตร การตรวจคัดกรองวัตถุดิบ นอกจากช่วยอำนวยความสะดวกในแก่เจ้าหน้าที่หน่วยงานของภาครัฐและเอกชน แล้วสามารถขยายผลการผลิตในเชิงพาณิชย์

2. พลาสมิดลูกผสมที่มียีน CryIAb/Ac สามารถนำมาใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ด้วยเทคนิค PCR หรือ real-time PCR

3. มีพลาสมิดลูกผสมที่สามารถเก็บไว้เพิ่มปริมาณโปรตีนในครั้งต่อไปได้อย่างไม่จำกัด และ protein ที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ด้วยเทคนิค ELISA หรือ DIBA และพัฒนาเป็นโปรตีนในรูปแบบแห้งเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

4. ได้พลาสมิดลูกผสมที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อจำหน่ายหรือขยายผลในเชิงพาณิชย์ ลดการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศ

5. งานวิจัยที่เป็นต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ลดปริมาณและการใช้สารเคมี ลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลาและค่าใช้จ่าย ทุกขั้นตอนกระบวนการดำเนินงานวิจัยได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถเก็บไว้ใช้พัฒนาและเพิ่มมูลค่าขยายผลเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์

11. เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, สุรภี กีรติยะอังกูร, กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2554. การโคลนยีน *EPSPS* และการผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). http://it.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1035

Article%2005-06. asp. **International Rice Institute**. 1997. Bt rice: Research and Policy Issues, IRRI Information Series No. 5, July 1996, Revised June 1997.

Bethell, Delia. 2002. Lactiva and Lysomin: Helping to Save Lives By Improving Oral Rehydration Solution. Ventria Bioscience. http://www.ventria.com/news/ORS%20

Buddhirakkul, N., K. Balachandra, P. Pumthong, S. Chaelermtaranukul and P. Sawanpanyalert. 2004. Development of a simple strip test for the detection of Hepatitis B surface antigen. **Thai J. Health Res** 18 (1): 40-47.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitivity method of measuring microorganism quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. **Anal. Biochem.** 72: 248-264.

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

Hochleitner, K. and H. Kraus. 2002. Rapid assay formats, components and materials. pp. 10-45. *In* Awiruttakarn C., ed. **Introductory workshop on rapid diagnostic tests**. Biogenomed co.ltd., Bangkok.

Kumar, R. and R. P. Sinha. 2011. Colloidal gold based dipstick strip for detection of genetically modified crops and produce**. Int. J. of Pharma and Bio Sci.** 2: 110-121.

Michae I. 2011. Covalent gold nanopartical-antibody conjugates for sensitivity improvement. **Adissertation submitted to the Mathematics, Informatic and Natural Sciences Faculty of Hamburg University**: 1-147.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1–3.