รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน *Cry1Ab* (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

(ภาษาอังกฤษ) **Development of Cry1Ab Protein Strip Test for GM Corn**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้างานวิจัย
นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร	ผู้ร่วมงานวิจัย
นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ผู้ร่วมงานวิจัย

5. บทคัดย่อ

วิเคราะห์ลำดับเบสออกแบบไพรเมอร์และโคลนยีน *Cry1Ab* ขนาด 1377 bp เข้าสู่เวคเตอร์ pET200 ถ่ายยีนเข้าแบคทีเรีย *Eschericia coli* ตรวจสอบลำดับเบสเป็นส่วนหนึ่งของยีน *CrylAb* จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีขนาด 2,457 นิวคลีโอไทด์ เหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน Cry1Ab ด้วย IPTG ในอาหาร LB ผสมน้ำตาลกลูโคสและแลคโตส สกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วย B-Per Bacterial extraction reagent ทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Ni-NTA ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาดประมาณ 51 kdal วัดปริมาณความเข้มข้นเตรียมเป็นแอนติเจน ฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติซีรัม รวม 3 ครั้ง (1, 1.5 และ 2 มก./มล. ตามลำดับ) เจาะเก็บเลือดกระต่าย (แอนติซีรัม) ทุกสัปดาห์รวม 9 ครั้ง วัดค่าไตเตอร์ได้สูงสุด 1:204,800 นำมาสกัดแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) แล้วเชื่อมต่ออนุภาคทองคำ (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยวิธีการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ซึ่งให้พันธะของอนุภาคทองคำและ IgG มีความเสถียร ผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พ่น colloidal gold-IgG อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตร control line ใช้ Goat anti-rabit IgG 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Test line ใช้ CrylAb-IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัตรา 3 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจโปรตีน ปฏิกิริยาผลบวกจะเกิดเส้นสีม่วงของ test line และ control line หลังหยดสารละลายตัวอย่าง 5-10 นาที โดยชุดตรวจสอบมีความไวในการตรวจโปรตีนได้ต่ำสุดที่ 0.03 มิลลิกรัม สามารถเก็บรักษาชุดตรวจสอบในถุงฟรอย์ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 C และอุณหภูมิห้อง ได้เป็นเวลา 3 เดือน

6. คำนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง พัฒนาโดยบริษัทเมล็ดพันธุ์ของประเทศสหรัฐอเมริกา และได้รับอนุญาตให้ปลูกในเชิงการค้าตั้งแต่ปี 1995 ในสิบกว่าประเทศทั่วโลก ประเทศที่ปลูกมากอันดับต้นๆ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล แคนาดา และอาร์เจนตินา ซึ่งส่งขายทั่วโลก ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง Mon 810 เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดเดียวที่สหภาพยุโรปอนุญาตปลูกและใช้ในการเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง พัฒนาขึ้นโดยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมการตัดต่อยีน *Cry*IAb จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* เข้าไปในพืชให้สร้าง CryIAb delta endotoxin มีผลต่อเยื่อบุกระเพาะของแมลง lepidopteran บัจจุบันมีหลายกรณี (events) ที่อนุญาตให้ผลิตและจำหน่ายเป็นการค้า เช่น Mon810, Bt11, Bt176 เป็นต้น โดยมีหลายสายพันธุ์ที่เป็นชนิดรวมยีน (stacked trait) ทั้งนี้การควบคุมการปลูกหรือใช้ประโยชน์จากพืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรมต่างๆ ขึ้นอยู่กับกฎหมายกำกับดูแลของแต่ละประเทศ

ประเทศไทย โดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมวิชาการเกษตร ควบคุมตามพระราชบัญญัติกักพืช โดยกำหนดให้พืชดัดแปรพันธุกรรมเป็นสิ่งต้องห้าม รวม 89 สกุล ห้ามนำเข้า และปลูก หรือครอบครอง ยกเว้นได้รับอนุญาตเพื่อการศึกษาทดลอง และมีข้อยกเว้นการนำเข้า อาหารสำเร็จรูป ข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์หรืออาหารสำหรับมนุษย์หรือใช้เพื่อการอุตสาหกรรม และกระทรวงสาธารณสุข มีกฎหมายควบคุมการแสดงฉลากอาหารที่ได้จากเทคนิคการดัดแปลงพันธุกรรม กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ 22 ชนิดที่มีข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ปนสารพันธุกรรมหรือโปรตีนตั้งแต่ร้อยละ 5 เป็นอาหารที่ต้องมีฉลาก

ทั้งนี้พืชหรือผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรมไม่สามารถจำแนกได้ด้วยตาเปล่า การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม มีวิธีพื้นฐาน 2 แบบ คือ การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และการตรวจโปรตีน สำหรับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นการตรวจยีนที่ตัดต่อเข้าไปในพืช ด้วยเทคนิค PCR ห้องปฏิบัติการหลายแห่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจรับรองสินค้าพืช เนื่องจากเป็นวิธีการที่แม่นยำและมีความไวในการตรวจสอบ ทำได้ภายในเวลารวดเร็ว และสามารถตรวจสอบสินค้าเกษตรที่ถูกแปรรูปเป็นอาหารได้ แต่วิธีการนี้ก็มีข้อจำกัดคือไม่สามารถระบุปริมาณการปนเปื้อนของพืช GM ได้ บัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีมาตรฐานสามารถตรวจรับรองสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเชิงคุณภาพและปริมาณ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) การตรวจโปรตีนด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา บัจจุบันมีการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบแบบ ELISA (Enzyme Link Immuno sorbent assay) และ LFD (Lateral flow device) ซึ่งรูปแบบ LFD เป็นชุดตรวจสอบแบบ strip มีการจำหน่ายเป็นการค้าสำหรับตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ และวัตถุดิบ แต่สำหรับกรณียีนหรือลักษณะการดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สร้างโปรตีน จะต้องตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเท่านั้น งานวิจัยนี้มี

วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของข้าวโพดต้านทานแมลงเป็นรูปแบบที่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ในภาคสนามได้สำหรับตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อนุญาตปลูกและใช้ในเชิงการค้าเป็นระยะเวลานานและแพร่หลาย ซึ่งต้องคอยตรวจติดตามเฝ้าระวังการปนเปื้อนในแปลงปลูก รวมถึงการตรวจคัดกรองวัตถุดิบเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรม

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เวคเตอร์ pET200, *Escherichia coli*
2. สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น PCR buffer, MgCl2, dNTPs, ไพรเมอร์จำเพาะ เป็นต้น
3. SPS-PAGE, เครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Aktapure
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
5. อุปกรณ์ประกอบชุดตรวจสอบ ตลับ แผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษไยแก้ว กระดาซับ ฯลฯ
6. กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจน

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *CryIAb* ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ในฐานข้อมูล GenBank ออกแบบและสังเคราะห์คู่ไพรเมอร์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โคลนยีนเข้าสู่ cloning vector วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับเบสและแปรรหัสเป็นโปรตีนโดยใช้ Program analysis โคลนยีนเข้า expression vector ถ่ายเข้าเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* ศึกษาการสร้างโปรตีนในอาหารเหลวผสมกลูโคสและแลคโตสความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน เก็บเซลล์แบคทีเรีย สกัดโปรตีน และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมในการ eluted โปรตีน ตรวจวัดความเข้มข้นและขนาดของโปรตีนที่แยกได้ด้วย SDS-PAGE

2. การผลิตแอนติซีรัม

นำรีคอมบีแนน์โปรตีน CryIAb บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1 มาใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย เพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีขึ้นในระบบเลือดของกระต่าย เจาะเก็บ Normal serum ก่อนฉีดแอนติเจน และวางโปรแกรมการฉีดแอนติเจน เลือกใช้วิธีการฉีดแบบ subcutaneous บริเวณต้นคอ จำนวน 3 ครั้ง ความเข้มข้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เจาะเก็บเลือดจากกระต่ายทุกสัปดาห์ ครั้งละ 10-40 มิลลิลิตร นำน้ำเลือดที่ได้ มาสกัดแยกเม็ดเลือดแดงออกเก็บส่วนที่เป็นแอนติซีรัมแบ่งใส่หลอดทดลองเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดค่าไตเตอร์ประสิทธิภาพสูงสุดของแอนติซีรัมที่สามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ใช้เป็นแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA

3. การผลิตชุดตรวจสอบ

นำแอนติบอดีที่ได้มาสกัด IgG ทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนด้วยวิธี DIBA ทดสอบความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับผลิตเป็นชุดตรวจสอบแบบ GLIFT kit นำ IgG บริสุทธิ์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับอนุภาคของทองคำ colloidal gold ทดสอบวิธีการต่อเชื่อมของ colloidal gold กับ IgG จากนั้นนำมาทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมในการพ่นบนแผ่น fiber glass สำหรับส่งผ่านโปรตีนในการทดสอบ ใช้ IgG บริสุทธิ์ เป็นเส้น test line และ control line ใช้ Goat Anti Rabbit IgG จากนั้นติดประกอบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb

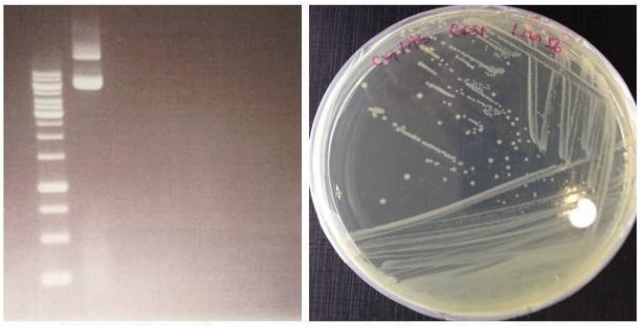
4. ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb และทดสอบความจำเพาะโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C, cp4EPSPS และความไวของการเกิดปฏิกิริยาโดยทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจโปรตีนได้ การจับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา วิธีการและอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ โดยทดสอบการเก็บในถุงฟรอยด์ปิดสนิท ใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส และเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาทดสอบปฏิกิริยาทุก 2 สัปดาห์ รวม 6 ครั้ง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมแอนติเจน

<u>การโคลนยีน</u> ได้โคลนของยีน CryIAb ขนาด 1377 bp ในเวคเตอร์ pET200 และถ่ายเข้าแบคทีเรีย E. coli BL21 (ภาพที่ 1) ตรวจสอบลำดับเบส พบว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน CryIAb จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cry1Ab (MON810) ของ Monsanto Company จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีขนาด 2,457 นิวคลีโอไทด์ ทดสอบการชักนำสร้างโปรตีนจาก 6 โคลน พบว่าทุกโคลนสามารถสร้างโปรตีนได้เมื่อเติมสาร IPTG จึงเลือกเก็บโคลน C2 และ C4 ในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซนต์ ชนิดละ 10 หลอด ที่ -80 C

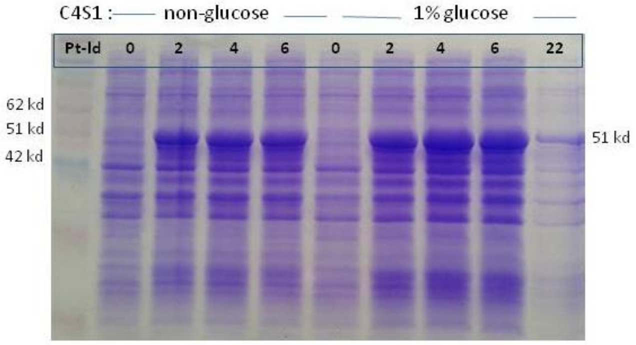


pET 200 with CryIAb gene   CryIAb gene in *E. coli* BL 21 C4S1

ภาพที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน *CryIAb* ขนาด 1377 bp และแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเวคเตอร์ pET200

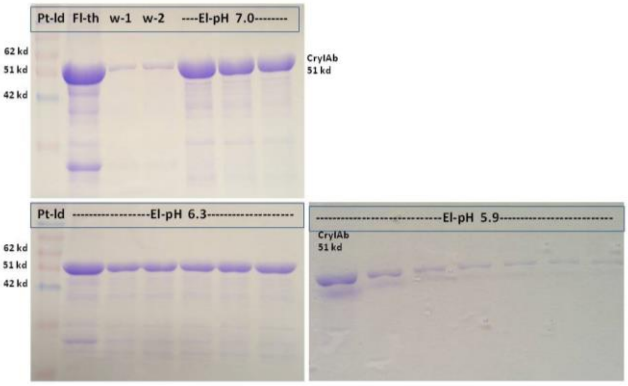
<u>การเหนี่ยวนำสร้างโปรตีน</u> เลือกแบคทีเรียโคลน C4S1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB เติม Kanamycin ปลูกเชื้อ

starter 5% บนเครื่องเขย่า 220 rpmที่ 37 C ทดสอบอาหารที่ไม่ใส่กลูโคส และใส่ 1% กลูโคส (ภาพที่ 2) และ 1mM แลคโตส เมื่อเลี้ยงไป 2 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียก่อนการเติม IPTG 1 mM IPTG และหลังการชักนำที่ 2 4 6 และข้ามคืน (22 ชั่วโมง) ตรวจปริมาณโปรตีนด้วย SPS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนหลัง เติม IPTG 2 ชั่วโมง อาหารเติมกลูโคสแบคทีเรียเจริญดีกว่า โดยการเลี้ยงในน้ำตาลแลคโตสแบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ condition ที่ดีที่สุดคือโคลน C4S1 5% ใน LB + Km 50 ppm ที่ใส่ 1 mM แลคโตส และ 1% กลูโคส บนเครื่องเขย่า 220 rpm ควบคุมอุณหภูมิ 37 C เหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย 1mM IPTG หลังจากปลูกเชื้อ 2 ชั่วโมง และเก็บเซลล์ที่ 4 ชั่วโมง

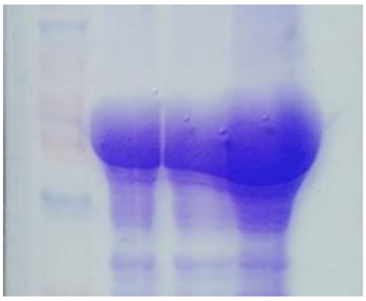


ภาพที่ 2 แถบโปรตีนของโคลน C4S1 จากการชักนำด้วย IPTG ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมกลูโคส ที่ระยะเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง รีคอมบีแนนท์โปรตีนขนาด 51 kdal

<u>การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน</u> ทดสอบวิธีการสกัดโปรตีน ด้วย extraction buffer B-Per (www.piercentt.com) เก็บตัวอย่าง supernatant และ pellet ตรวจโปรตีนด้วย SDS-PAGE ผลการทดสอบพบว่าการใช้ B-Per สามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก สกัดโปรตีนจากแบคทีเรียได้ดี เลือกใช้ B-Per buffer โดยใช้วิธีการตามขั้นตอน โดยการสกัดโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 2 ลิตร ด้วย B-Per buffer จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใสที่ปั่นเก็บ ทำการ purified ผ่าน Ni-NTA column ล้างด้วย buffer B pH7.5 eluted โปรตีนที่ pH 7, 6.5, 6.3, 5.9 เก็บตัวอย่าง tube ละ 2 ml นำมาตรวจดูโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่าสามารถ eluted ได้โปรตีนได้ทุก pH จึงเลือกใช้ pH 6.0 ในการ purified โดยการบ่มโปรตีนให้จับกับ Ni-NTA ครั้งละ 8 ml สามารถเก็บโปรตีนได้ 6-7 ครั้ง นำไปตรวจโปรตีน เลือกเก็บตัวอย่างที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีแถบโปรตีนอื่นๆ ปนมาก (ภาพที่ 3 และ 4) รวมตัวอย่างโปรตีน 2 ชุด คือ 18 ml และ 14 ml นำไป dialysis protein เพื่อล้างเกลือที่ติดมาออกจากโปรตีน ใช้ PBS buffer 1X pH 7.4 ใช้ถุง dialysis sack cutoff 30 kdal จุ่มแช่ในบัฟเฟอร์บน stirrer วางในตู้เย็น ปรับให้ปั่นเบาๆ เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3-4 ครั้ง จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากโปรตีนด้วยน้ำตาลทราบ เพื่อให้โปรตีนมีความเข้มข้น ชุดที่ 1 ได้ 3 ml ชุดที่ 2 ได้ 1.5 ml วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA และทำการเจือจางตรวจสอบด้วย SDS-PAGE คำนวณค่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้



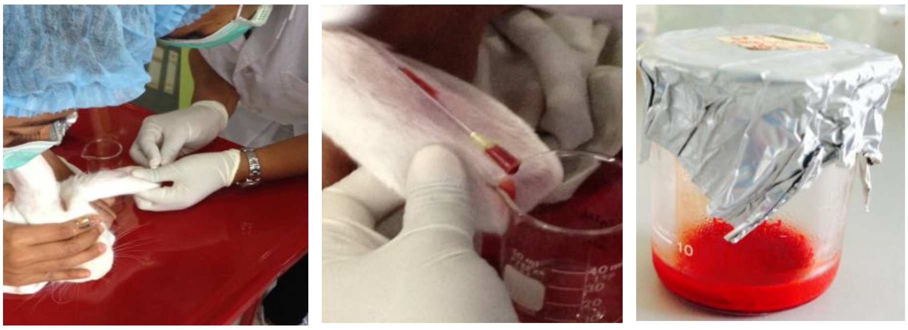
ภาพที่ 3 แสดงแถบโปรตีนที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ด้วย extraction buffer B-per และ นำไปทำให้บริสุทธิ์ ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA เก็บ flowthrough ล้างโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วเก็บโปรตีนที่ pH 7.0, 6.5, 6.3, 5.9 หลอดละ 1.5-2 มล.



ภาพที่ 4 แสดงรีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE

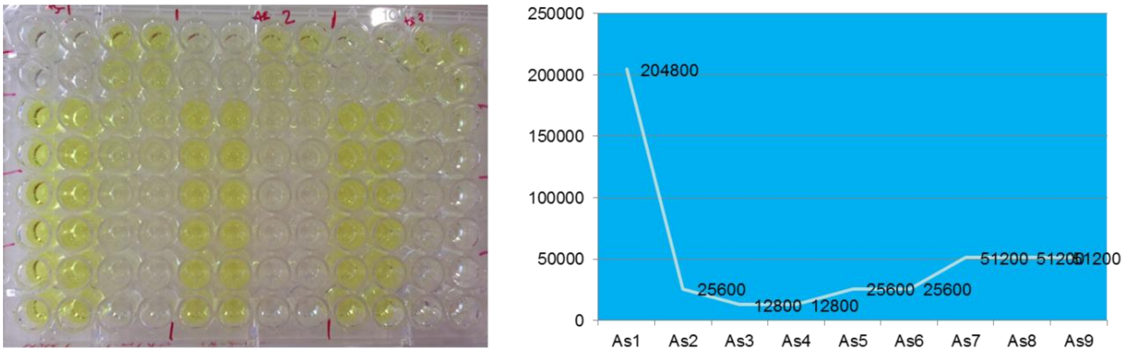
2. การผลิตแอนติซีรัม

<u>การผลิตแอนติซีรัม</u> เตรียมกระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย เจาะเก็บเลือดกระต่าย 10 มิลลิลิตร ปั่นเก็บ normal serum วางแผนโปรแกรมการฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัม โดยฉีดแอนติเจนเข้าสู่กระต่ายทดลอง 3 ครั้ง ด้วยวิธี subcutaneous สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งที่ 1 อัตราความเข้มข้นโปรตีน 1mg/ml ผสม Complete adjuvant ครั้งที่ 2 อัตราความเข้มข้นโปรตีน 1.5 mg/ml ผสม Incomplete adjuvant และครั้งที่ 3 อัตราความเข้มข้นโปรตีน 2.0 mg/ml ผสม Incomplete adjuvant ตามลำดับ เจาะเก็บเลือดกระต่ายบริเวณใบหู สับดาห์ละหนึ่งครั้งสลับข้างเจาะทุกสัปดาห์ (ภาพที่ 5) ไปเปตซีรัมน้ำใสที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือด ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนใสซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บ หลอดละ 1.2 มิลลิลิตร เก็บในตู้ -20 องศาเซลเซียส จากการทดลองปั่นเก็บแอนติซีรัม รวม 9 ครั้ง ดังนี้ AS1-12 มล, AS2-1 มล, AS3-7 มล, AS4-16 มล, AS5-13.5 มล, AS6-1 มล, AS7-11 มล, AS8-1 มล, AS9-16 มล



ภาพที่ 5 แสดงการเจาะเก็บเลือดกระต่าย เพื่อเก็บแอนติซีรัม

<u>ทดสอบค่าไตเตอร์</u> ของแอนติซีรัมที่เก็บแต่ละครั้ง จำนวน 9 ครั้งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยเจือจางรีคอมบิแนนท์โปรตีน CrylAb ที่ใช้เป็นแอนติเจน ความเข้มข้น 10 ng/ul ใช้หลุมละ 50 ul (โปรตีนเข้มข้น 500 ng) จากนั้นทำการเจือจางแอนติซีรัมที่เก็บแต่ละครั้งความเข้มข้น 1:200 จนถึง 1: 1,638,400 ใช้ Normal Serum 1:200 เป็นตัวเปรียบเทียบ จากการตรวจวัด AS 1- AS9 ได้ค่าไตเตอร์สูงสุด ของ As1 คือ 1: 204,800 (ภาพที่ 6)

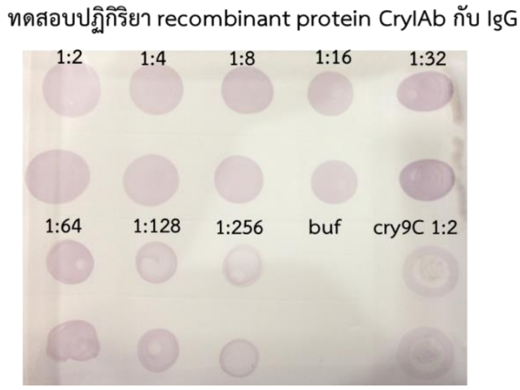


ภาพที่ 6 แสดงกราฟของค่าไตเตอร์จากการทดสอบแอนติซีรัม (Antiserum, As) ครั้งที่ 1-9

<u>การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ IgG</u> ปั่นตกตะกอนโปรตีนแอนติซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำไปสกัด IgG ด้วยคอลัมน์ protein A โดย เครื่อง AKTA pure ผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer sodium phosphate ความเข้มข้น 20mM pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 และนำไปผ่านคอลัมน์โปรตีน A ใช้ Elution buffer กรด citric ความเข้มข้น 0.1 M pH3 เติม Neutralizing buffer Tris-HCL ความเข้มข้น 1M pH 9.0 ปรับสภาพ pH เพื่อป้องกันการเสียสภาพของ IgG จากนั้นทำ desalting IgG ผ่านคอลัมน์ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง OD 280 คำนวณค่าความเข้มข้น

<u>ทดสอบปฏิกิริยา DIBA</u> ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เจือจางความเข้มข้นของโปรตีน กับ IgG ด้วยวิธี Dot blot (DIBA) บนแผ่น nitrocellulose membrane เตรียมรีคอมบีแนนท์โปรตีน CrylAb 1 mg/ml เจือจาง 1:2 ถึง 1:256 หยดตัวอย่างจุดละ 5 ไมโครลิตร ใช้ IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml

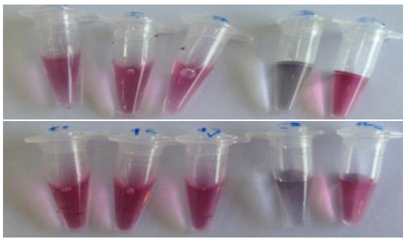
เจือจาง 1:2,000 ใช้ blank buffer และรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C 1:2 เป็น negative control ผลการทดสอบพบการเกิดปฏิกิริยาเป็นจุดสีม่วงทุกความเข้มข้นของโปรตีน ไม่เกิดปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์ที่เป็น negative control แต่พบการเกิดปฏิกิริยาจางๆ ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การทดสอบปฏิกิริยาของรีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb ที่ความเข้มข้น 1:2 ถึง 1:256 กับ IgG CryIAb อัตรา 1:2000

3. การผลิตชุดตรวจสอบ

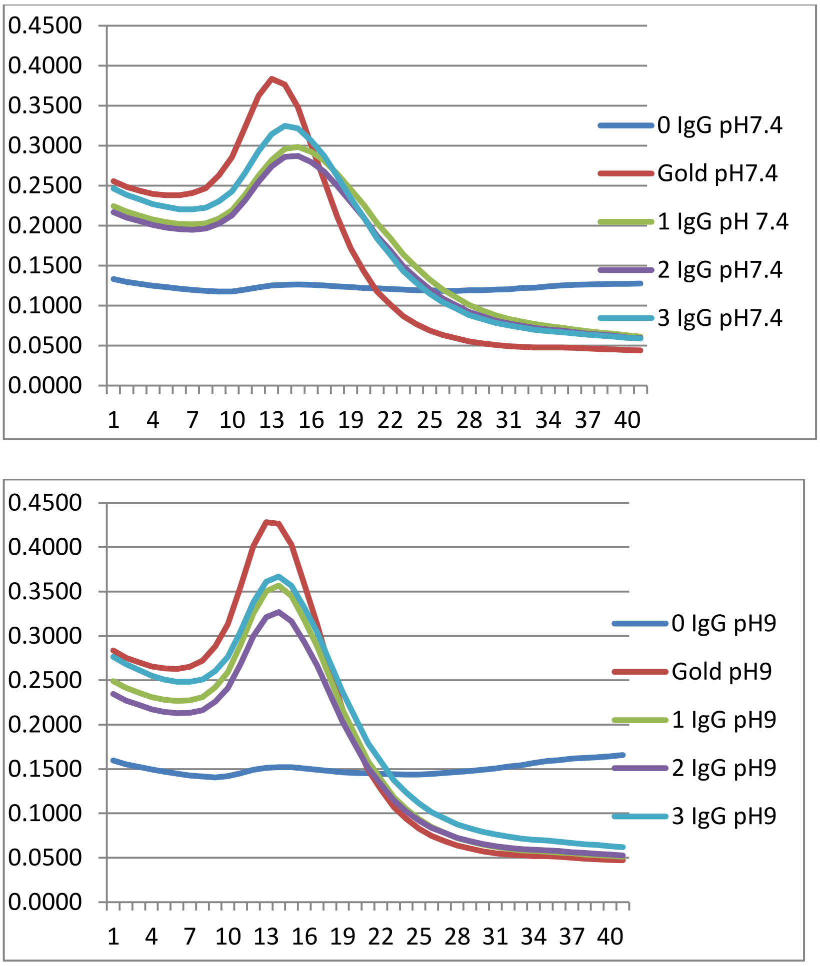
<u>ทดสอบการเชื่อมต่อ colloidal gold กับ IgG</u> ทดสอบการเชื่อมต่อของ colloidal gold กับ IgG ต่อรีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb โดยทดสอบเบื้องต้นของค่า pH colloidal gold และปริมาณความเข้มข้นของ IgG ที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อ เมื่อทำการทดลองผสม colloidal gold pH7.4 และ pH 9.0 กับIgG ที่วัดค่าความเข้มข้นได้ 1.89 mg/ml โดยใช้ gold 100 ul ต่อ IgG 1.89 ug, 3.78 ug และ 5.67 ug ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการไม่ได้ใส่ IgG และ colloidal gold ปกติ เมื่อเติม 10% NaCl เปรียบเทียบสีของสารแขวนลอยที่ได้ หากมีการจับของ IgG กับ gold ที่อัตราเหมาะสมจะได้สีของ gold จะไม่เปลี่ยนไปเมื่อเติมเกลือ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 สีของ colloidal gold pH 7.4 และ 9.0 ที่ผสมกับ IgG ความเข้มข้น 1.89 mg/ml ปริมาณ 1 2 และ 3 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับการไม่เติม IgG และ gold ปกติ

ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 400-800 nm หลังการผสมและบ่ม IgG กับ colloidal gold พบว่าที่ colloidal gold pH 7.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ของ gold ปกติ ที่ A520 ได้ 0.3835 และเมื่อ conjugated กับ IgG วัดค่าได้สูงสุดที่ A530 ได้ 0.3249 มีค่าความต่าง 0.586 ในขณะที่ colloidal gold pH 9.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ gold ปกติ ที่ A520 ได้ 0.4284 และเมื่อ conjugated กับ IgG วัดค่าได้สูงสุดที่ A530 ได้ 0.3668 มีค่าความต่าง 0.616 (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กราฟการดูดกลืนแสงของการ conjugated ระหว่าง colloidal gold กับ IgG

<u>การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วยพันธะ neary-covalent</u> ผสม IgG กับ Sodium periodate ($NaIO_4$) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นกับหมู่ cis-diols ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยา coupling กับ linker (Kumaret al., 2008) ใช้โมเลกุล dithiol aromatic PEG6-CONHNH2 เป็นตัวเชื่อม (Linker) บน IgG นำ IgG-linker ไปผสมกับอนุภาคทอง เกิดพันธะ nearly-covalent ทำให้แอนติบอดีและอนุภาคทองคำเชื่อมต่อกันหลุดออกจากกันได้ยาก เติม BSA 10% เพื่อป้องกัน Non-specific binding อ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งเป็นตัวบอกความยาวคลื่นแสงที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เพื่อประเมินคุณภาพของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำ (Michael,2011)

<u>ทดสอบปริมาณที่เหมาะสมของ Gold conjugated IgG</u> หลังจากการเตรียม Gold conjugated IgG ใช้พู่กันเบอร์ 1 ป้าย gold conjugated IgG บน glass fiber paper พบว่าปริมาณ gold conjugated

IgG กระจายตัวไม่สม่ำเสมอ เมื่อทำการทดสอบทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่สม่ำเสมอ จึงใช้เครื่อง BioDot พ่น gold conjugated IgG บน glass fiber paper ซึ่งสามารถกำหนดอัตราการพ่นได้ จึงมีความสม่ำเสมอดีกว่าการทาด้วยพู่กัน เปรียบเทียบการพ่นปริมาณ gold conjugated IgG อัตราต่างๆ ได้แก่ 5, 7.5, 10 และ 15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ประกอบชุดตรวจสอบและทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของ gold conjugated 5 µl/cm และ 7.5 µl/cm เมื่อทดสอบกับ extraction buffer (negative control) เส้น control line ยังขึ้นไม่ชัด แต่เมื่อทดสอบกับโปรตีน ทั้งเส้น control line และ test line ขึ้นชัดเจน ส่วนที่ 10 µl/cm และ 15 µl/cm เมื่อทดสอบกับ extraction buffer (negative control) เส้น control line ขึ้นจางๆ และเมื่อทดสอบกับโปรตีน ทั้งเส้น control line และ test line ขึ้นชัดเจนกว่าที่ความเข้มข้น gold 5 µl/cm และ 7.5 µl/cm ผลการทดสอบปริมาณ Gold conjugated IgG เลือกใช้ในอัตรา 15 ul/cm

<u>การเตรียมประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Lateral Flow Strip</u>

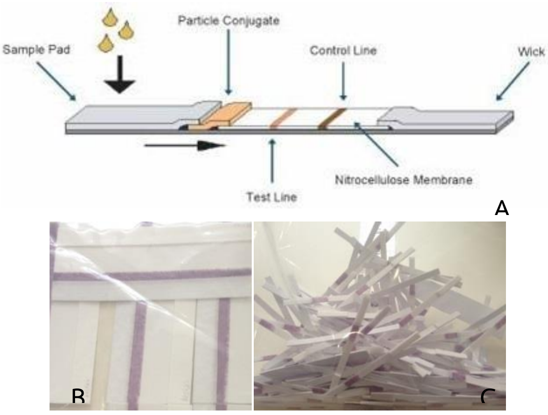
ส่วนประกอบ

- Sample application pad(SAP) ยี่ห้อ Ahstrom 8964
- Conjugate Release pad(CRP) ยี่ห้อ Ahstrom 8964
- Nitrocellulose membrane ยี่ห้อ whatman AE99
- Wick ยี่ห้อ whatman #470
- Backing card
- Cassette

เตรียมแผ่น Conjugate Release pad โดยแช่ในสารละลาย conjugated pad pretreatment (buffer; PBS 0.01 mol/L, 10% sucrose, 0.05% tween-20) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทอง 10 ml แล้วนำไปผสมกับ IgG-linker500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีจากนั้นจึงเติม BSA 10% และนำไปปั่นตกตะกอนและนำตะกอนอนุภาคทองที่เตรียมไว้มาละลายในสารละลายทอง (0.01 mol/L PBS; pH 8.0, 1% concentration BSA, 0.05% PEG) ให้ได้ปริมาตร 600µl เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยขีดเส้น Test line ด้วย IgG CryIAb ความเข้มข้น 1.0 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 330 µg/ml (1:3) อัตรา 3 ไมโครลิตร/ซม. ทิ้งให้แห้งแล้วนำไปแช่ใน Blocking buffer (PBS (0.001 mol/L, pH 7.4), 1% concentration BSA) 30 นาที ผึ่งให้แห้งที่ 37 C

นำสารละลาย IgG gold conjugated พ่นบนแผ่น Conjugate Release pad โดยใช้เครื่อง Biodot อัตรา 15 µl/cm อบที่ 37C เป็นเวลา 2 ชม. เก็บใส่ถุงพลาสติดปิดสนิท ประกอบแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) แผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) แผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) แผ่นรอง (Backing card) เข้าด้วยกัน โดยเริ่มจากการวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 มม. วางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate

release pad) 1 มม. และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรน 1 มม. ตัดด้วยเครื่อง Biodot เป็น strip กว้าง 0.35 cm (ภาพที่ 10)

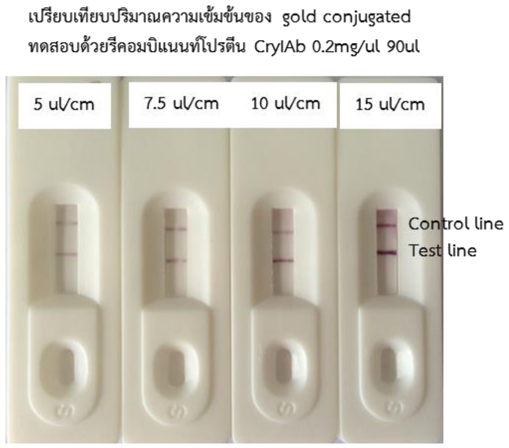


ภาพที่ 10 การประกอบชุดตรวจสอบ GLIFT kit (A), ชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb (B, C)

4. การทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

4.1 ทดสอบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์r

การทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS พบการเกิดปฏิกิริยาแต่เส้น test line และ control line ไม่คมชัด เมื่อทดสอบด้วย extraction buffer (Sodium tetraborate, PVP, SDS, Triton X-100, Sodium sulfate pH 8.5-9.0) พบการเกิดปฏิกิริยาของ control line และ test line เส้นคมชัดเจนขึ้น ทั้งนี้การนำชุดตรวจสอบแบบ strip บรรจุลงตลับแนวนอน เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าการนำชุดตรวจสอบจุ่มลงในหลอดทดลองแนวตั้ง โดยชุดตรวจสอบที่ให้ผลการตรวจโปรตีน CryIAb ดีที่สุด ประกอบด้วย Gold conjugated อัตรา 15 ul/cm Test line ด้วย IgG CryIAb ความเข้มข้น 1.0 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 330 µg/ml (1:3) ทั้งนี้ gold conjugatedIgG 5-10 ul/cm เกิดปฏิกิริยาจางกว่า (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาการทดสอบชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของความเข้มข้น gold conjugated อัตรา 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร/เซนติเมตร

4.2 ทดสอบความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์ (Specificity)

นำชุดตรวจสอบมาทดสอบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่อัตราความเข้มข้น 200 ng/ul ประกอบด้วย โปรตีน CryIAb/Ac, Cry9C, NPTII และ CP4EPSPS พบปฏิกิริยาเกิดเส้น test line เป็นบวกกับทุกโปรตีน ยกเว้นโปรตีน NPTII และไม่เกิดปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์ซึ่งเป็น negative control โดยความเข้มของเส้นโปรตีนไม่เทียบเท่ากับโปรตีน CryIAb อาจเนื่องจากปฏิกิริยา false positive ทั้งนี้ในนำไปใช้ทดสอบภาคสนามจะเป็นการตรวจคัดกรองเบื้องต้น อย่างไรก็ดีต้องมีการพัฒนาให้มีความจำเพาะมากขึ้นเพื่อป้องกันการอ่านผลผิดพลาด โดยนำตัวอย่างที่ทดสอบได้ผลบวก มาพิสูจน์ด้วยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการต่อไป

4.3 ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาและความไวในการตรวจวิเคราะห์ Sensitivity

ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบที่พ่น gold conjugated ในอัตรา 5 ul/cm, 7.5 ul/cm, 10 ul/cm และ 15 µl/cm โดยใช้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน 0.2 mg/ml ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ผลการทดสอบพบว่าทุกอัตราให้ผลบวกต่อโปรตีน เส้น test line และ control line เข้มขึ้นเมื่ออัตรา gold conjugated เพิ่มขึ้น แต่ยังพบเส้น control line ที่ไม่คมชัด อาจเนื่องจากการขีดเส้น GAR หรือความจำเพาะของ GAR ที่ไม่เหมาะสมนัก ซึ่งจะปรับแก้ไขต่อไป

ทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยา โดยเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตรา 1:2 เริ่มจาก 200 ng/ul จนต่ำสุดคือ 0.39 ng/ul ใช้ปริมาณ 90 ไมโครลิตรต่อการทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีน ดังนี้ 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125, 0.56, 0.28, 0.14, 0.07 และ 0.03 mg พบว่า ชุดตรวจสอบที่พ่น gold ในอัตรา 7.5 µl/cm ได้ค่า sensitivity 0.56 mg ส่วนชุดตรวจสอบที่พ่น gold ในอัตรา 15 µl/cm ได้ความเข้มข้นโปรตีนต่ำสุดคือ 0.39ng/ul ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.03 มิลลิกรัม (ตารางที่ 1)

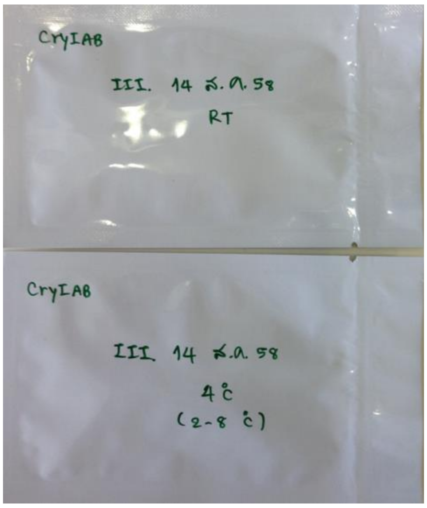
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความไวของการเกิดปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบต่อโปรตีน CryIAb

ความเข้มข้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน (ng/ul)	ปฏิกิริยาชุดตรวจสอบที่พ่น gold conjugated IgG membrane อัตรา			
	5 ul/cm	7.5 ul/cm	10 ul/cm	15 ul/cm
200	++	++	Nd	nd
100	++	++	Nd	nd
50	++	++	Nd	nd
25	++	++	Nd	nd
12.5	--	++	nd	nd
6.25	--	--	++	++
3.125	nd	nd	++	++
1.56	nd	nd	++	++
0.78	nd	nd	--	++
0.39	nd	nd	--	++

ผลการทดสอบที่ 90 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง

5.4 ทดสอบอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb

จัดทำและประกอบชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb ตามวิธีการข้างต้น ตัดแผ่นชุดตรวจสอบให้มีขนาดความกว้างต่อแผ่น 0.35 ซม. จากนั้นนำมารวมกันแล้วสุ่มบรรจุใส่ซองอะลูมิเนียมฟอล์ย ซองละ 15 ชิ้น ซิลปิดซองให้สนิท (ภาพที่ 12) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คืออุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่อายุการเก็บรักษาทุก 15 วัน เป็นเวลา 3 เดือน โดยนำซองบรรจุชุดตรวจสอบออกมาวางที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบประมาณ 30 นาที เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง หยดตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เตรียมใน extraction buffer ความเข้มข้น 100 ng/ul ใช้ตัวอย่างละ 90 ไมโครลิตร จำนวน 10 strips โดยใช้บัฟเฟอร์เป็นการทดลองเปรียบเทียบครั้งละ 2 strips



ภาพที่ 12 ชุดตรวจสอบบรรจุในถุงฟรอยด์ปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 C

การทดสอบชุดตรวจสอบโปรตีน โดยสุ่มซองตัวอย่างที่เก็บไว้ที่สภาพอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เปิดซองนำชุดตรวจสอบมาบรรจุลงตลับ หยดรีคอมบิแนนท์โปรตีนในบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100 ng/ul ตัวอย่างละ 90 ไมโครลิตร จับเวลาการเกิดปฏิกิริยา ผลการทดสอบพบว่าการเก็บรักษาระยะแรกชุดตรวจสอบที่เก็บในอุณหภูมิห้อง และ 4 C เกิดผลบวกของปฏิกิริยากับโปรตีนแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของเส้น test line และ control line ภายใน 10-20 นาที แต่เมื่ออายุการเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานกว่า 2 สัปดาห์ พบว่าชุดตรวจสอบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีอัตราการไหลผ่านของสารละลายโปรตีนได้ช้า ทำให้เกิดการตกค้างของ conjugated gold การอ่านผลได้ไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัญหาของความชื้น โดยเมื่อเก็บชุดตรวจสอบไว้เป็นเวลานานกว่า 2 เดือน พบการเกิดปฏิกิริยา ต้องใช้เวลานานขึ้น หลังจากสารละลายไหลผ่านเส้น test line และ control line แล้วเส้นยังไม่ชัดเจน ต้องทิ้งไว้นานกว่า 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัญหาของ IgG และ GAR แต่ชุดตรวจสอบที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลการไหลผ่านของสารละลายได้เร็วกว่า และเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า (ตารางที่ 2) ทั้งนี้จะดำเนินการทดสอบบัฟเฟอร์ และ GAR ใน

การประกอบชุดตรวจสอบใหม่ รวมถึงการลดความชื้นของชุดตรวจสอบก่อนเก็บ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้ได้นานขึ้น

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของชุดตรวจสอบที่เก็บในเวลาต่างๆ สภาพอุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บรักษา (สัปดาห์)	**ผลการตรวจสอบโปรตีนของชุดตรวจสอบ**		**หมายเหตุ**
	เก็บที่อุณหภูมิห้อง	**เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส**	
0	(+) 10/10 ; (-) 2/2	(+) 10/10 ; (-) 2/2	
2	(+) 5/10 ; (-) 2/2	(+) 10/10 ; (-) 2/2	Gold ไม่ flow
4	(+) 10/10 ; (-) 2/2	(+) 10/10 ; (-) 2/2	เกิดปฏิกิริยาช้า
6	(+) 10/10 ; (-) 2/2	(+) 10/10 ; (-) 1/2	เกิดปฏิกิริยาช้า
8	(+) 4/10 ; (-) 1/2	(+) 10/10 ; (-) 2/2	เกิดปฏิกิริยาช้า
10	(+) 10/10 ; (-) 2/2	(+) 10/10 ; (-) 2/2	เกิดปฏิกิริยาช้า

หมายเหตุ ทดสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน 10 strips และทดสอบเปรียบเทียบโดยบัฟเฟอร์ 2 strips

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb แบบ Strip พัฒนาจากการโคลนยีนที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของยีน *CryIAb* ที่ตัดต่อเข้าไปในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานแมลง เหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CryIAb ที่ถ่ายเข้าเวคเตอร์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรัม สกัดแอนติบอดีชนิด IgG เชื่อมกับอนุภาคทองคำ (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยวิธี nearly covalent ชุดตรวจสอบที่ใช้ Gold conjugated อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตร ใช้ CryIAb-IgG ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเส้นTest line และ Goatanti-rabit IgG อัตรา 1:3 (ความเข้มข้น 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเส้น control line อัตรา 3 ไมโครลิตร/เซนติเมตร บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนเป็นเส้นสีม่วงชัดสุด โดยผลบวกของการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดเส้นสีม่วง 2 เส้น และผลลบจะเกิดเฉพาะ contol line ความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจโปรตีน CryIAb ได้คือ 0.03 มิลลิกรัม เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา 5-10 นาที สามารถเก็บชุดตรวจสอบในถุงฟรอย์ปิดสนิทที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ 3 เดือน ทดสอบปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นต่อไปสำหรับการพัฒนา จะต้องศึกษาความจำเพาะและทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างใบและวัสดุอ้างอิง โดยทำการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาให้มีอายุได้นานขึ้น และระยะเวลาในการตรวจสอบไม่เกิน 5 นาที

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้รูปแบบการผลิตชุดตรวจสอบโปรตีนแบบ GLIFT Kit สำหรับใช้ตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของข้าวโพดต้านทานแมลง สายพันธุ์ MON810, Bt176, Bt11 เพื่อนำไปขยายผลการทดสอบในภาคสนาม

กลุ่มเป้าหมายภาคเอกชน ผู้ประกอบการนำเข้าส่งออกสินค้าพืชและผลิตภัณฑ์ข้าวโพด และภาครัฐ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านกักกันพืช ฯลฯ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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