การโคลนยีน *EPSPS* และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready)

EPSPS Gene Cloning and Antibody Production for Genetically Modified Roundup Ready Soybean Test Kit

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ [1/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง [2/] ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ [3/]
วันเพ็ญ ศรีทองชัย [4/] สุรภี กีรติยะอังกูร [5/] กิ่งกาญจน์ พิชญกุล [5/] อลงกรณ์ กรณ์ทอง [1/]

บทคัดย่อ

งานวิจัยการโคลนยีน *EPSPS* และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready) เริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีน *EPSPS* จากดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ด้วยคู่ primers จำเพาะ EPSPS 1 และ EPSPS 2 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,368 bp แปลเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความยาว 455 กรดอะมิโน เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* เชื่อมต่อเข้าไปยัง Expression vector (pET200 TOPO) แล้วถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว 2xYT ที่มีกานามัยซินผสมอยู่ชักนำให้สร้างโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG เข้มข้น 1 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่มีการเพิ่มปริมาณโปรตีนสูงสุด แล้วนำมาแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย column Ni-NTP Superflow ผลการตรวจหาความเข้มข้นโปรตีนที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีขนาดของโปรตีนประมาณ 52 กิโลดาลตัน นำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิต Polyclonal antibody ในกระต่าย แล้วสกัด IgG ให้บริสุทธิ์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ในการตรวจโปรตีน EPSPS และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ด้วยวิธี Dot immunoblinding assay (DIBA) คือ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจโปรตีน EPSPS ได้ปริมาณต่ำสุด 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำ IgG มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบ Gold Lateral Immuno Flow Test (GLIFT kit) สามารถตรวจสารละลายโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเกิดปฏิกิริยาสีม่วง 2 แถบ คือ Test line

---

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2/] คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[3/] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

[4/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[5/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

และ Control line ในขณะที่สารละลายที่ไม่มีโปรตีน EPSPS เกิดปฏิกิริยาสีม่วงแถบเดียว คือ Control line โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาตรวจตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready พบว่าเกิดปฏิกิริยาภายใน 5 นาที เช่นเดียวกัน

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร (Food และ Feed) ของประเทศไทยการผลิตถั่วเหลืองเพื่อใช้ภายในประเทศไม่เพียงพอ รัฐบาลจึงแก้ปัญหาด้วยการอนุญาตให้นำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศสำหรับเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการแปรรูป จากข้อมูลการนำเข้าของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร ปี 2553 (มกราคม-ตุลาคม) รายงานว่าปริมาณการนำเข้าถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองสูงถึง 1.4 และ 2.2 ล้านตัน มูลค่า 2.1 และ 2.9 หมื่นล้านบาท ตามลำดับ โดยแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลือง เต้าหู้ น้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลือง ซอสถั่วเหลือง ซีอิ้ว กากถั่วเหลืองนำมาแปรรูปเป็นน้ำมันและอาหารสัตว์ ปัญหาการนำเข้าถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศ โดยเฉพาะจากประเทศสหรัฐอเมริกา และแคนาดา ซึ่งเป็นประเทศที่มีการปลูกถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมมาก โดยเป็นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ GST 40-3-2 ซึ่งต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท หรือเรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ โดยตัดต่อยีน CP4*EPSPS* และ CTP มี promoter คือ 35S CaMV และ terminator คือ NOS ทำให้ถั่วเหลืองที่ถูกตัดต่อสารพันธุกรรมสามารถสร้างเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ได้ในปริมาณมาก ซึ่งเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท เอนไซม์ EPSPS หรือ 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19) คือเอนไซม์ตัวกลางในวิถี shikimate ซึ่งทำหน้าที่การสังเคราะห์ กรดอะมิโนอะโรเมติก เช่น L-phenylalanine, L-tyrosine และL-tryptophan เอนไซม์ EPSP synthase เร่งปฏิกิริยาระหว่าง shikimate-3-phosphate (S3P) และ phosphoenol pyruvate (PEP) เปลี่ยนไปเป็นสาร 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) และหมู่ฟอสเฟต

ปัจจุบันมีการปรับปรุงพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกจำนวนมาก ด้วยการตัดต่อยีนใหม่ๆ ให้มีลักษณะที่ต้องการ ได้แก่ พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคหรือแมลงศัตรูพืช จึงทำให้หลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป เมื่อเดือนกรกฎาคม 2546 ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องเพื่อควบคุมการใช้ประโยชน์พืชดัดแปรพันธุกรรม ในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับ (Traceability and Labeling of GMOs and Food and Feed Products Produced from GMOs (EC) No.1830/2003) ที่เข้มงวดกว่าเดิมและมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 เมษายน 2547 กฎระเบียบดังกล่าวนี้ กำหนดให้ต้องมีการตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา โดยกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมมากกว่าร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะต้องติดฉลากด้วย โดยในกฎระเบียบเดิมสินค้าดังกล่าวไม่จำเป็นต้องติดฉลาก มีการระบุ

ข้อความว่า “This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งอาจส่งผลให้ประเทศไทยอาจจะต้องประสบปัญหาและอุปสรรคในการส่งสินค้าเกษตรออกมากขึ้น เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า โดยแฝงมาตรการกีดกันทางการค้าไว้ด้วย ในขณะเดียวกันภายในประเทศประชาชนและผู้บริโภค ก็มีความวิตกกังวลเกี่ยวกับการบริโภคอาหารปนเปื้อนวัตถุดิบดัดแปรพันธุกรรม และมีการเรียกร้องให้มีการติดฉลากสินค้า หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของพืชดัดแปรพันธุกรรม ห้างสรรพสินค้าบางแห่งได้ออกมาตรการให้สินค้าที่จะนำมาวางขาย ต้องมีหนังสือรับรองว่าเป็นสินค้าที่ไม่ใช่พืชดัดแปรพันธุกรรม หรือไม่ได้ใช้วัตถุดิบที่ผลิตจากพืชดัดแปรพันธุกรรม

จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมได้ภายในประเทศ ที่สามารถตรวจการปนเปื้อนได้ภายใน 5 นาที ช่วยลดค่าใช้จ่าย และขั้นตอนการตรวจติดตามได้ นอกจากนี้บริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์และบริษัทอุตสาหกรรมการแปรรูป สามารถใช้เป็นการตรวจคัดกรองวัตถุดิบในเบื้องต้นได้ ทั้งนี้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม จัดเป็นโครงการต้นแบบในการผลิตชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมสำหรับพืชอื่นอีก เช่น ชุดตรวจสอบข้าวและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ต่อไป ซึ่งเทคโนโลยีการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมมีความสำคัญและจำเป็นมากยิ่งขึ้น การตรวจรับรองด้วยเทคโนโลยี Real-time PCR มีความแม่นยำสูง แต่ต้องใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ และตรวจได้เฉพาะห้องปฏิบัติการจำเพาะเท่านั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนยีน *EPSPS* และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready)

2. สังเคราะห์โปรตีนแบบ recombinant protein EPSPS ในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรั่ม

3. ผลิต Polyclonal antibody และ IgG เพื่อใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready)

4. เพื่อพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบโปรตีน EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready)

วิธีดำเนินการ

มีกิจกรรมการดำเนินการ 4 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การโคลนยีน *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready)

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ตรวจพบยีน CP4 *EPSPS* มาเพาะ โดยแช่ในสารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.12% เป็นเวลา 30 นาที นำถั่วเหลืองมาเพาะเป็นต้นกล้า จึงนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Made *et al*., 2006) หลังจากนั้นสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* โดยใช้คู่ primers EPSPS 1 และ EPSPS 2 ด้วยวิธี PCR นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน *EPSPS* ซึ่งสังเคราะห์ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pET200 TOPO จากนั้นทำการส่งผ่านพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichea coli* completent cell โดยวิธี Heat-shock หลังจากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมอยู่ในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง คัดแยกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ซึ่งได้รับการถ่ายพลาสมิด pET200 TOPO สายผสมที่มียีน *EPSPS* สอดแทรก (transformants) และ ตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อยีน *EPSPS* กับพลาสมิด pET200 TOPO ด้วยวิธี PCR โดยใช้ T7F เป็น forward และ EPSPS2 เป็น reverse primer นำโคโลนีที่ตรวจสอบแล้วไปหาการเรียงตัวของลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* ด้วย primers T7F-T7R และ EPSPS3-EPSPS4 วิเคราะห์ข้อมูลการเรียงตัวของลำดับเบสและกรดอะมิโนของชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* ด้วยโปรแกรม Blast และนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาความเหมือนและความคล้ายกันกับลำดับยีน *EPSPS* ใน GenBank

กิจกรรมที่ 2 การเตรียม recombinant protein ในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตแอนติเจน

2.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ recombinant protein EPSPS

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดสายผสมที่มียีน *EPSPS* สอดแทรก อยู่ภายในเซลล์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ซึ่งมีกานามัยซิน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl B-D- 1-thiogalactopyra noside) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เริ่มต้นเก็บอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อมาวิเคราะห์หาขนาดและปริมาณโปรตีน EPSPS โดยวิธี SDS-PAGE

2.2 การศึกษาขนาดของโปรตีน EPSPS และทำให้บริสุทธิ์

เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดสายผสม ในอาหารเหลว 2xYT กานามัยซิน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม/ไมโคลิตร และเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า ระยะเวลาตามผลข้อ 2.1 ที่ทำให้สังเคราะห์โปรตีนมากที่สุด แล้วเก็บอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ ณ ระยะเวลาซึ่งเซลล์ *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดสายผสม ผลิตโปรตีน EPSPS ได้มากที่สุด แล้วนำมาแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย column Ni-NTP Superflow ตรวจหาความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธี dialysis แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย Bradford's method (Bradfold, 1976) และขนาดของโปรตีนอีกครั้ง

กิจกรรม 3 การผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน EPSPS

3.1 การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง และเก็บแอนติบอดี

ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน EPSPS โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white อายุประมาณ 6 เดือน เตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิครั้งแรกโดยใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ปริมาณ 500 ไมโครกรัม ละลายใน phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (v/v) และผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ใน สัดส่วน 1:1 (v/v) ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง 5 จุดๆ ละประมาณ 200 ไมโครลิตร เว้นระยะห่างหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิซ้ำด้วยการเตรียมแอนติเจน ปริมาณเท่าเดิมใน incomplete Freund's adjuvant (IFA) จากนั้น 2 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่บีกเกอร์ปลอดเชื้อ เพื่อเก็บแอนติบอดี ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะแยกแอนติบอดี จากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติบอดีซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดแอนติซีรั่มโดยเติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2% (v/v) เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติบอดีที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สุรศักดิ์, 2550)ตรวจสอบค่าความเจือจางสูงสุด และค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดี ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

3.2. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready

การหาค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์ น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Coating buffer ตรวจสอบค่า ELISA titer ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Indirect ELISA หลังจากนั้นนำแอนติซีรั่มมาสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ด้วยวิธี dialysis นำไปวัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD 280 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นของโปรตีน IgG เป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.3. การทดสอบคุณภาพของ IgG

3.3.1. ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

นำแอนติเจนที่เป็นโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย IgG ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ ดังนี้ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA (นิรนาม, 2552)

3.3.2 ทดสอบความไวในการตรวจ ด้วยวิธี DIBA

นำแอนติเจนที่เป็นโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์มาเจือจางให้มีระดับต่างๆ คือ 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75 และ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer TBS ทดสอบความไวในการตรวจสอบโดยใช้สารละลาย IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA

3.3.3 ทดสอบ Buffer ที่ใช้สกัดโปรตีนจากตัวอย่างด้วยวิธี DIBA

นำ Buffer 5 ชนิดได้แก่ Buffer 1 (Guanidinium buffer) Buffer 2 (2% CTAB) Buffer 3 (Lysis buffer) Buffer 4 (Tris-HCL, pH 7.5) Buffer 5 (Na_2BO_3) มาบดกับตัวอย่าง น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) เมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready เปรียบเทียบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ Buffer โดยใช้สารละลาย IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA

กิจกรรมที่ 4 การผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไกลโฟเสท

การประกอบชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไกลโฟเสท (Roundup Ready) โดยเป็นชุดตรวจสอบแบบ Gold Lateral Immuno Flow Test (GLIFT kit) ดัดแปลงตามวิธีของสุรภี และคณะ (2547) โดยนำ IgG ของ PAb-EPSPS เชื่อมต่อกับอนุภาคทอง (Colloidal Gold Labeling IgG) ใช้พู่กันจุ่ม Colloidal Gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่นขนาดกว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร โดยใช้ Colloidal Gold conjugated IgG ประมาณ 90-120 ไมโครลิตร/15-18 เซนติเมตร คิดเป็นอัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียม Test line โดยขีด IgG ของ PAb-EPSPS ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) และเตรียม Control line โดยขีด Goat anti mouse (GAM) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผ่น NCM โดยให้ตำแหน่ง Control line อยู่ตำแหน่งด้านบนของ Test line ห่างกัน 0.5 เซ็นติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

หลังจากประกอบเสร็จนำมาตรวจสอบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Buffer ที่ไม่มีโปรตีน EPSPS สังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี และระยะเวลาที่เกิดแถบสี หลังจากนั้นนำมาทดสอบกับตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready (GM) และเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดปกติที่ไม่ปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Non-GM) โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดทั้งที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และไม่มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง Roundup Ready (Non-GM) จำนวน 0.1 กรัม เติม Buffer จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้งจึงดูดน้ำใสของตัวอย่างลงบน Sample pad ของ GLIFT Kit สังเกตปฏิกิริยาการเกิดสี และระยะเวลาที่เกิดแถบสี

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

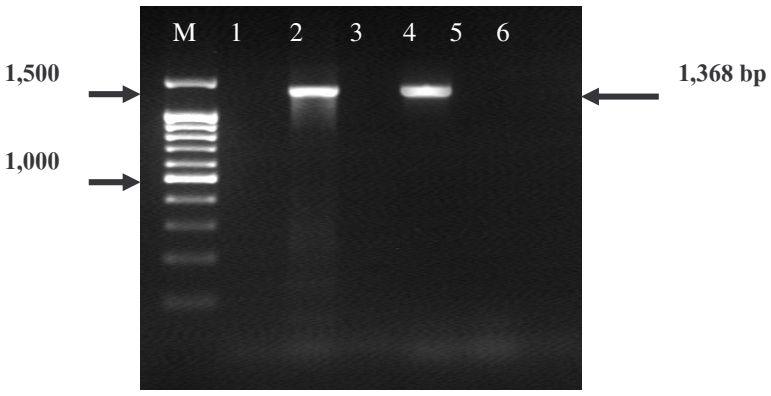
ระยะเวลาดำเนินการ เดือนตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาเกษตร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

กิจกรรมที่ 1 การโคลนยีน *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready)

ก่อนการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready มาแช่ในสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และนำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้า เพื่อคัดเลือกต้นถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท เนื่องจากในแต่ละ lot ของเมล็ดถั่วเหลืองมีการปนทั้งเมล็ดถั่วเหลืองปกติ และเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจึงต้องคัดเลือกเอาเฉพาะที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท แล้วจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready เท่านั้นสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้ ขณะที่เมล็ดถั่วเหลืองปกติไม่สามารถงอกเป็นต้นกล้า เมื่อใช้คู่ primers EPSPS1 และEPSPS 2 ซึ่งถูกออกแบบมาเพื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนของยีน CP4*EPSPS* จากข้อมูลลำดับเบสของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready (Accession no. AB209952.1) โดยใช้ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ต้นแบบ ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1,368 bp จากเมล็ดถั่วเหลืองที่ทำการแช่ด้วยสารไกลโฟเสทประสบผลสำเร็จ ดังภาพที่ 1 Laneที่ 2 และ 4 ในขณะที่ถั่วเหลืองปกติไม่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดใดๆ ได้เลย (ภาพที่ 1 Laneที่ 5) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าคู่ primers EPSPS 1 และ EPSPS 2 มีความจำเพาะกับยีน *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท



ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ EPSPS 1 และ EPSPS 2 ด้วยวิธี PCR Lane M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Lane 1 ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม + primer-forward Lane 2 ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม + primer-forward + primer-reverse Lane 3 ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม primer-reverse Lane 4 ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม + primer-forward + primer-reverse Lane 5 ดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองที่ไม่มีการดัดแปรพันธุกรรม (Non-GMOs) Lane 6 น้ำกลั่นบริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* มาทำให้บริสุทธิ์ เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pET200 TOPO และถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์ล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 แล้วคัดเลือกแบคทีเรียโคโลนีสีขาวเก็บไว้ เพื่อนำมาตรวจสอบว่าโคโลนีสีขาวเหล่านี้มีชิ้นยีน *EPSPS* เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิด pET200 TOPO และเชื่อมต่ออยู่ในทิศทางที่ถูกต้องด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ primers EPSPS3 / EPSPS4 และคู่ primers T7F / EPSPS2 ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกไว้เหล่านี้มีชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิด pET200 TOPO และเชื่อมต่ออยู่ในทิศทางที่ถูกต้อง

หลังจากนั้นนำมาพิสูจน์ชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน *EPSPS* ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆจากการนำไอโซเลทของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 ซึ่งได้รับการตรวจสอบมาแล้ว เลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และสกัดพลาสมิด pET200 TOPO ออกจากเซลล์ แล้วนำไปหาลำดับเบสของยีน *EPSPS* ได้ลำดับเบสของยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp เมื่อนำลำดับเบสของยีน *EPSPS* นี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน CP4 *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready (Accession no. AF464188) และยีน CP4*EPSPS* ของโปรตีนสังเคราะห์ (Accession no. AY125353) พบว่าลำดับเบสของยีน *EPSPS* มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน CP4 *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และยีน CP4*EPSPS* ของโปรตีนสังเคราะห์ถึง 99% และเมื่อนำไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน CP4 *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และยีน CP4*EPSPS* ของโปรตีนสังเคราะห์พบว่ากรดอะมิโนของชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* มีความยาว 455 กรดอะมิโน และลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกันถึง 99% เช่นกัน

กิจกรรมที่ 2 การเตรียม recombinate protein ในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตแอนติเจน

2.1. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ recombinant protein EPSPS

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ซึ่งมีพลาสมิด pET200 TOPO สายผสมที่มียีน *EPSPS* สอดแทรกอยู่ภายในเซลล์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่ระยะเวลาต่างๆ กันเพื่อหาระยะเวลาเพาะเลี้ยง ณ ช่วงเวลาที่เซลล์ *E. coli* BL21 ผลิตโปรตีน EPSPS มากที่สุด ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีแถบของโปรตีนจำนวน 2 แถบ ขนาด 52 และ 39 kDa ตามลำดับ เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียต่อไปอีก ปริมาณการผลิตโปรตีนทั้งสองขนาดลดลง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *EPSPS* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของพลาสมิด pET200 TOPO มีการแสดงออกของยีนสูงสุดภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 เพื่อนำโปรตีนไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรั่มครั้งต่อไป จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 ในชนิดและปริมาณของอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่ทำการทดลองนี้เป็นระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

2.2. การศึกษาขนาดของโปรตีน EPSPS เมื่อทำให้บริสุทธิ์

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ซึ่งมีพลาสมิด pET200 TOPO สายผสมที่มียีน *EPSPS* สอดแทรกอยู่ภายในเซลล์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ซึ่งมีกานามัยซินปริมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อชักนำให้สังเคราะห์โปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาย่อยให้เซลล์แตกและสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resins ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ระหว่างการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้เก็บสารละลายที่ไหลออกมาจากคอลัมน์เป็นส่วนๆ 4 ส่วนใหญ่ด้วยกัน ได้แก่

ก) ส่วน flow through (ส่วนน้ำใสหลังจากการย่อยเซลล์และตกตะกอนเซลล์ แล้วนำไปผ่าน คอลัมน์และไหลออกมาจากคอลัมน์เป็นครั้งแรก)

ข) ส่วน wash (ส่วนน้ำใสที่ไหลออกมาหลังจากล้างด้วย Buffer C)

ค) ส่วน D (ส่วนน้ำใสที่ไหลออกมาจากคอลัมน์หลังจากเติมด้วย Buffer D (pH5.9) เก็บ 20 ส่วน)

ง) ส่วน E (ส่วนน้ำใสที่ไหลออกมาจากคอลัมน์หลังจากเติม (elute) ด้วย Buffer E (pH4.5) เก็บ 20 ส่วน)

เมื่อนำส่วนน้ำใสส่วนต่างๆ เหล่านี้ไปหาขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนขนาด 52 kDa ซึ่งเป็นโปรตีน EPSPS เริ่มมีความบริสุทธิ์ขึ้นในส่วนน้ำใส E หลังจาก elute โปรตีนด้วย Buffer E ดังนั้นการนำโปรตีน EPSPS เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนตีซีรั่ม จะเริ่มเก็บตั้งแต่ E9 เป็นต้นไป เนื่องจากได้แถบโปรตีนเป้าหมายเพียงแถบเดียว ไม่มีโปรตีนอื่นปนมา จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกด้วยวิธี dialysis และนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรั่ม

กิจกรรมที่ 3 การผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน EPSPS

3.1. การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง และเก็บแอนติบอดี

จากการทดลองได้นำโปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์ มาผลิต polyclonal antibody โดยฉีดโปรตีน EPSPS เข้าในกระต่ายพันธุ์ New Zealand white เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสร้างภูมิคุ้มกันทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ เจาะเลือดและแยกแอนติซีรั่มทุกสัปดาห์ 4 ครั้ง นำมาตรวจสอบค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้โปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี PAb-EPSPS ที่เจือจางระดับต่างๆ ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} พบว่าค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 3 และ 4 สูงกว่าครั้งที่ 1 และ 2 (ภาพที่ 12) โดยครั้งที่ 3 มีค่าไตเตอร์ 1:10,000 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A_{405} ได้ 1.315 และครั้งที่ 4 ค่าไตเตอร์ขึ้นสูงถึง 1:1,000,000 มีค่า ELISA ที่ A_{405} เท่ากับ 1.025 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดี เมื่อใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ปริมาณ 100 นาโนกรัม เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA

ค่าความเจือจางของแอนติบอดี	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่			
	1	**2**	**3**	**4**
1:10	0.642	0.960	1.523	1.566
1:100	0.690	0.919	1.515	1.561
1:1,000	0.726	0.908	1.471	1.544
1:10,000	0.467	0.640	1.315	1.438
1:100,000	0.130	0.261	0.653	1.257
1:1,000,000	0.070	0.093	0.138	1.025
Coating buffer	0.079	0.057	0.062	0.058

หมายเหตุ: - ค่า A405 เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า A405 ได้ 0.074

- ค่า A405 ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready

การทดสอบประสิทธิของแอนติบอดีที่เจาะเลือดครั้งที่ 4 มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ โปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์ น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Coating buffer ตรวจสอบค่า ELISA titer ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์ และน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready เท่านั้น โดยทำปฏิกิริยาดีที่สุดกับโปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์ โดยให้ค่าความเจือจางของแอนติบอดีสูงถึง 1: 1,000,000 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A_{405} เท่ากับ 1.089 สำหรับปฏิกิริยากับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ที่ค่าความเจือจางของแอนติบอดีเท่ากับ 1:1,000 วัดค่า ELISA ที่ A_{405} เท่ากับ 0.940 (ตารางที่ 2) เนื่องจากธรรมชาติต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ผลิตโปรตีนได้น้อยกว่าโปรตีนที่สกัดบริสุทธิ์ และแอนติบอดีจะไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Coating buffer ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับโปรตีน และพืชที่สร้างโปรตีน EPSPS เท่านั้น

ตารางที่ 2 ค่า ELISA Titer ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทาน Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Coating Buffer ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect-ELISA วัดค่าที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

ค่าความเจือจางของแอนติบอดี	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติเจน			
	โปรตีน EPSPS	ถั่วเหลือง GM (RR Soy)	ถั่วเหลือง Non-GM	Coating Buffer
1:10	1.581	1.505	0.197	0.067
1:100	1.567	1.358	0.072	0.058
1:1,000	1.475	0.940	0.065	0.064
1:10,000	1.392	0.497	0.063	0.065
1:100,000	1.264	0.069	0.088	0.071
1:1,000,000	1.089	0.062	0.070	0.060
Coating buffer	0.079	0.057	0.062	0.058

หมายเหตุ: - ค่า A405 เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

3.3 การทดสอบคุณภาพของ IgG

3.3.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

จากการทดลองได้นำแอนติซีรั่มมาสกัด IgG ด้วยวิธี dialysis หลังจากนั้นจึงนำ IgG มาทดสอบคุณภาพโดยทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ด้วยวิธี DIBA กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ โปรตีน EPSPS

บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer ทำปฏิกิริยากับ IgG ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า IgG ทุกความเข้มข้นเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ โดยจะให้สีแดงเข้มชัดเจน และน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ให้สีชมพู ซึ่งจางกว่าโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ เนื่องจากว่าในธรรมชาติของมีโปรตีน EPSPS น้อยกว่าและไม่บริสุทธิ์ จึงเกิดสีชมพู และไม่เกิดปฏิกิริยากับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer เช่นเดียวกับการทดสอบแอนติบอดี และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนทั้งโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ และน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready คือตั้งแต่ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อที่จะนำ IgG ไปใช้ทำเป็นชุดตรวจสอบต่อไปคือที่ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจน

3.3.2 ทดสอบความไวในการตรวจด้วยวิธี DIBA

จากการนำแอนติเจนที่เป็นโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์มาเจือจางให้มีระดับต่างๆ คือ 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75 และ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer ทดสอบความไวในการตรวจสอบโดยใช้สารละลาย IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA พบว่า IgG สามารถตรวจสอบปริมาณโปรตีนได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถสังเกตด้วยตาเปล่าได้ และจะเห็นปฏิกิริยาเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน จากสีชมพูจนเป็นสีแดงตามลำดับ และสามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready โดยเกิดสีชมพู แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer หรือ Blank ที่ไม่มีโปรตีน EPSPS

3.3.3 ทดสอบ Buffer ที่ใช้สกัดโปรตีนจากตัวอย่าง ด้วยวิธี DIBA

การทดสอบประสิทธิภาพของ Buffer 5 ชนิดได้แก่ Buffer 1 (Guanidinium buffer) Buffer 2 (2% CTAB) Buffer 3 (Lysis buffer) Buffer 4 (Tris-HCL, pH 7.5) Buffer 5 (Na_2BO_3) เพื่อใช้สกัดโปรตีนจากตัวอย่างที่เป็นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) เมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ที่บดละเอียด เปรียบเทียบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ Buffer โดยใช้สารละลาย IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA พบว่า Buffer มีผลในการสกัดโปรตีนออกจากตัวอย่างได้มากน้อยต่างกัน โดยพบว่า Buffer 4 สกัดโปรตีนจากต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Buffer 1 แต่ Buffer 4 สกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ไม่ค่อยดี โดยเกิดปฏิกิริยาสีชมพูจางๆ แต่ Buffer 1 สามารถให้ปฏิกิริยาได้ดีทั้งต้นกล้า และเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready

กิจกรรมที่ 4 การผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไกลโฟเสท

นำอนุภาคทองคำ (Colloidal Gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาเชื่อม กับ (conjugated) IgG ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำน้ำคั้นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม หรือสารละลายที่มีโปรตีน EPSPS หยดหรือจุ่มตัวอย่างตรงบริเวณ Sample pad สารละลายที่มีโปรตีน EPSPS จะจับกับ IgG ของ EPSPS ที่เชื่อต่อกับ

Colloidal Gold แล้วพากันไหลผ่านบนแผ่น NCM ไหลไปพบกับแถบ Test line ที่มี IgG ของ EPSPS ที่วางดักอยู่ด้านบนของแผ่น NCM และ IgG นี้จะจับกับโปรตีน EPSPS ที่อยู่ในตัวอย่างซึ่งมี Gold labeling IgG เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ Sanwich คือ Gold labeling IgG-โปรตีน EPSPS-IgG ที่จับติดบนแผ่น NCM ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้ เมื่อเกิดปฏิกิริยามาจับกันจำนวนมาก จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีม่วงของอนุภาคทอง หรือ Colloidal Gold สำหรับ Gold labeling IgG ที่ไม่ได้จับกับโปรตีน EPSPS จะไม่ถูก IgG ซึ่งติดอยู่บริเวณ Test line จับ จึงไหลผ่านไปพบกับแถบ Control line ที่มี Goat anti Mouse (GAM) เมื่อพบกับ Gold labeling IgG จะจับกันทำให้เกิดปฏิกิริยาสีม่วงที่แถบ Control line

หลังจากประกอบเสร็จนำมาตรวจสอบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Buffer ที่ไม่มีโปรตีน EPSPS จะพบว่าตัวอย่างที่มีโปรตีน EPSPS จะเกิดปฏิกิริยาสีม่วง 2 แถบ คือ Test line และ Control line แสดงว่ามีการตรวจพบโปรตีน EPSPS และตัวอย่างที่ไม่มีโปรตีน EPSPS จะเกิดปฏิกิริยาสีม่วงแถบเดียว คือ Control line เท่านั้น (ภาพที่17) แสดงว่าไม่มีการตรวจพบโปรตีน EPSPS และปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นภายใน 5 นาที

การทดสอบกับเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready (GM) และเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดปกติที่ไม่ปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Non-GM) โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดทั้งที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และไม่มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง Roundup Ready (Non-GM) จำนวน 0.1 กรัม เติม Buffer จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้งจึงดูดน้ำใสของตัวอย่างลงบน Sample pad ของ GLIFT Kit พบว่าสามารถตรวจสอบได้ภายใน 5 นาที โดยตัวอย่างที่เป็นเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดทั้งที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready จะเกิดปฏิกิริยาสีม่วง 2 แถบ คือ Test line และ Control line แสดงว่ามีการตรวจพบโปรตีน EPSPS และตัวอย่างที่ไม่มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง Roundup Ready (Non-GM) เกิดปฏิกิริยาสีม่วงแถบเดียว คือ Control line เท่านั้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การโคลนยีน *EPSPS* จากต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready) ที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณยีน *EPSPS* ด้วยคู่ primers จำเพาะ EPSPS 1 และ EPSPS 2 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,368 bp มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสยีน CP4 *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และยีน CP4*EPSPS* ของโปรตีนสังเคราะห์ถึง 99% เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* ไปแปลเป็นลำดับของกรดอะมิโนพบว่ามีความยาว 455 กรดอะมิโน ซึ่งมีความยาวและเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน CP4 *EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready และยีน CP4*EPSPS* ของโปรตีนสังเคราะห์ถึง 99% เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอ *EPSPS* เชื่อมต่อเข้าไปยังพลาสมิด pET200 TOPO ซึ่งเป็น Expression vector แล้วถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 นำมา

เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร 2xYT ที่มีกานามัยซิน ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ชักนำให้สร้างโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่มีการเพิ่มปริมาณโปรตีนสูงสุด แล้วนำมาแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย column Ni-NTP Superflow และผลการตรวจหาความเข้มข้นโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า มีขนาดของโปรตีนประมาณ 52 กิโลดาลตัน และ fraction ที่บริสุทธิ์ที่ไม่มีโปรตีนอื่นปนคือตั้งแต่ fraction E9 เป็นต้นไป นำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิต Polyclonal antibody โดยฉีดเข้าในกระต่ายสายพันธุ์ New Zeland White ทำการเจาะเลือดแต่ละครั้งมาทดสอบค่าไตเตอร์พบว่าการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 ให้ค่าไตเตอร์สูงที่สุด จึงนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่มด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน EPSPS และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ ถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) จึงนำแอนติซีรั่มมาสกัด IgG ให้บริสุทธิ์ นำมาทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ด้วยวิธี DIBA พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถตรวจโปรตีน EPSPS และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ให้ปฏิกิริยาสีแดงชัดเจน และไม่เกิดปฏิกิริยากับถั่วเหลืองปกติที่ไม่ดัดแปรพันธุกรรม การทดสอบความไวในการตรวจด้วยวิธี DIBA พบว่ามีความไวในการตรวจโปรตีน EPSPS ได้ปริมาณต่ำสุด 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และการทดสอบ Buffer ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน EPSPS จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง และต้นกล้าถั่วเหลืองที่ดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ด้วยวิธี DIBA พบว่า Buffer 1 สามารถสกัดโปรตีน EPSPS จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง และต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ได้ดี หลังจากนั้นนำ IgG มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบ GLIF Kit สามารถตรวจสารละลายโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเกิดปฏิกิริยาสีม่วง 2 แถบ คือ Test line และ Control line ในขณะที่สารละลายที่ไม่มีโปรตีน EPSPS เกิดปฏิกิริยาสีม่วงแถบเดียว คือ Control line โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาตรวจตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียดที่มีการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready พบว่าเกิดปฏิกิริยาภายใน 5 นาที เช่นเดียวกัน

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ผลงานวิจัยนี้สามารถนำมาพัฒนาต่อยอดในเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ในเชิงพาณิชย์ได้ โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจหาโปรตีน EPSPS เช่น การประกอบเป็นชุดตรวจสอบแบบ Gold Lateral Immuno Flow Test (GLIFT kit) สามารถตรวจสอบโปรตีน EPSPS จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้ ภายในเวลา 5 นาที โดยผู้ทดสอบไม่ต้องมีความชำนาญหรือประสบการณ์ สามารถใช้ตรวจคัดกรองถั่วเหลืองนำเข้าโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการเกษตร หรือเจ้าหน้าที่เกษตรใช้ตรวจติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายในแปลง นักปรับปรุงพันธุ์พืชใช้สุ่มตรวจสอบต้นพ่อแม่พันธุ์และลูกผสมได้ ภาคเอกชน สามารถใช้ตรวจตัวอย่างวัตถุดิบก่อนการแปรรูป หรือตรวจการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แปรรูป

2. ขั้นตอนการผลิตชุดตรวจสอบ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตชุดตรวจสอบอย่างรวดเร็วในเชิงพาณิชย์ และจดสิทธิบัตร เพื่อเป็นประโยชน์ของกรมวิชาการเกษตรได้

3. ได้โคลนที่มียีน *EPSPS* ซึ่งเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ และถ่ายฝากในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 พร้อมที่จะนำไปผลิตโปรตีน และแอนติบอดี นอกจากนี้พลาสมิดพาหะที่มียีน *EPSPS* สามารถนำไปผลิตเป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ด้วยเทคนิคด้านดีเอ็นเอ เช่น PCR และ Real-time PCR

4. สามารถพัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย ในเชิงพาณิชย์และลดการนำเข้า หรือนำมาผลิตเป็นชุดตรวจสอบ

5. สามารถพัฒนาเพื่อผลิตแอนติซีรั่ม หรือสกัด IgG ในเชิงพาณิชย์ได้ และลดการนำเข้า หรือนำแอนติซีรั่มมาใช้ตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ด้วยวิธีทางโปรตีน เช่น ELISA, DIBA และ Lateral Flow Test

6. ผลงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางต้นแบบในการโคลนยีนที่สร้างโปรตีนเป้าหมาย เช่น โปรตีนที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือต้านทานแมลง โดยตัดต่อยีนเป้าหมายเข้าไปใน Expression vector เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณของโปรตีนขึ้นมา และนำมาผลิตแอนติซีรั่ม โดยสามารถพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ เช่น พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบข้าว Bt63 ซึ่งประเทศไทยประสบปัญหาการส่งออก เนื่องจากมีการลักลอบนำเข้าข้าว และเปิดการค้าเสรี AFTA ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรมสูง หรือข้าวโพดต้านทานแมลงที่ตัดต่อยีน *Cry9C* หรือเรียกว่าข้าวโพด StarLink ซึ่งเป็นข้าวโพดที่ไม่ผ่านความปลอดภัยทางชีวภาพ ขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา เนื่องจากทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2552. เอกสารประกอบการฝึกอบรม การผลิตชุดตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว (GLIFT kit). 15-16 มิถุนายน 2552 กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ. 55 หน้า

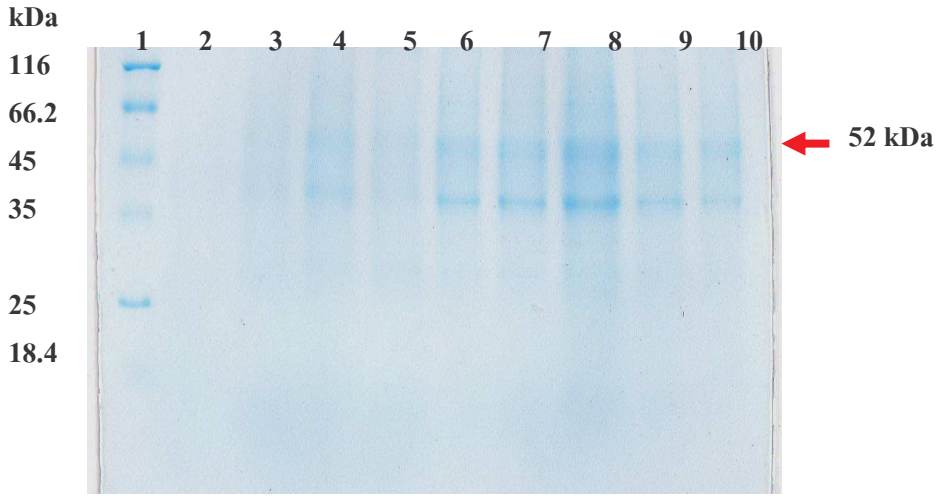
สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. GLIF KIT ตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ใน 5 นาที. ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตรประจำปี 2547. หน้า 89-100.

สุรศักดิ์ ขันคำ. 2550. การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.88 หน้า.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

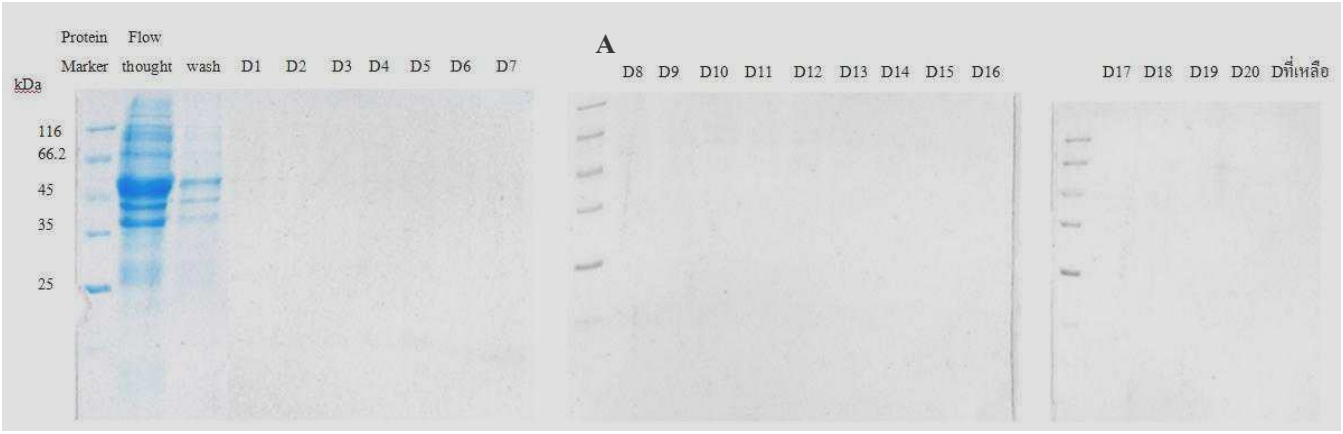
Khanitha Wongwathanarat and Prasert Wongwathanarat. 2550. Qualitative and Quantitative Detection of GM Soy Grain, Soy Meal and Food Products. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 25 ฉบับที่ 3, 280-292 น.

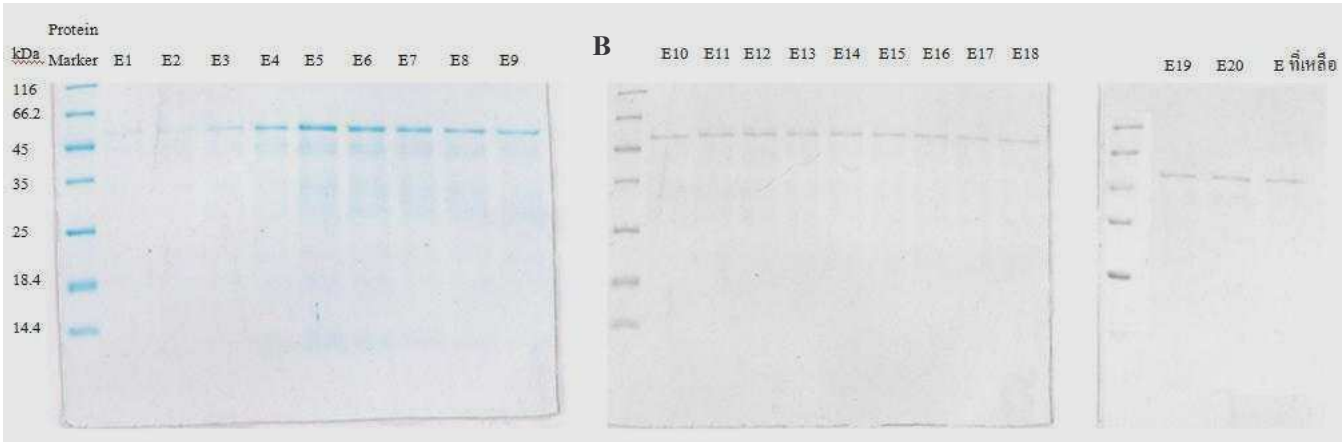
Mäde D, Degner C, Grohmann L. 2006. Detection of genetically modified rice: collaborative validation study of a construct-specific real-time PCR method for detection of transgenic Bt rice. Eur Food Res Technol. 224: 271–278.



ภาพแสดง การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ recombinant protein EPSPS และขนาดของโปรตีน EPSPS โดย วิธี SDS-PAGE ในอาหารเหลวเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่างๆ กัน

แถว 1 คือ Protein marker แถว 2 คือ ที่ 0 ชั่วโมง แถว 3 คือ ที่ 2 ชั่วโมง แถว 4 คือ ที่ 4 ชั่วโมง
แถว 5 คือ ที่ 6 ชั่วโมง แถว 6 คือ ที่ 12 ชั่วโมง แถว 7 คือ ที่ 18 ชั่วโมง แถว 8 คือ ที่ 24 ชั่วโมง
แถว 9 คือ ที่ 30 ชั่วโมง แถว 10 คือ ที่ 36 ชั่วโมง

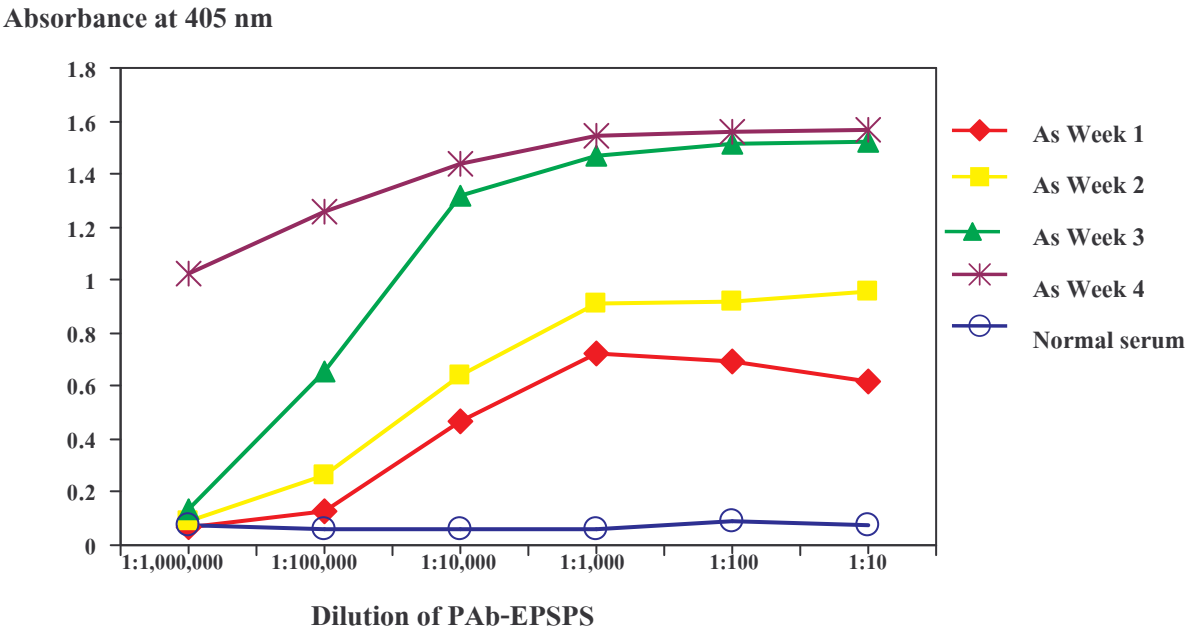




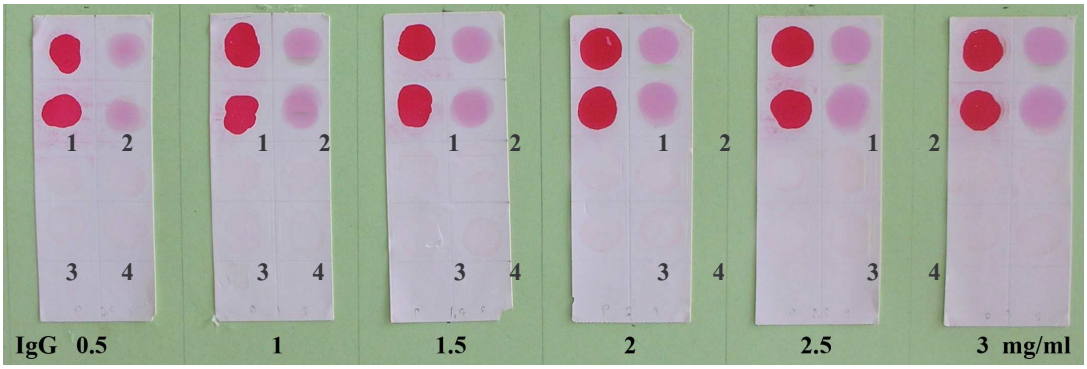
ภาพแสดง การศึกษาขนาดของโปรตีน EPSPS เมื่อทำให้บริสุทธิ์

(A) โปรตีนขนาดต่างๆ ซึ่งพบในส่วนน้ำใส flowthrough, wash และส่วน D ตามลำดับ

(B) โปรตีนบริสุทธิ์ขนาด 52 kDa ในส่วนน้ำใส E ด้วย SDS-PAGE

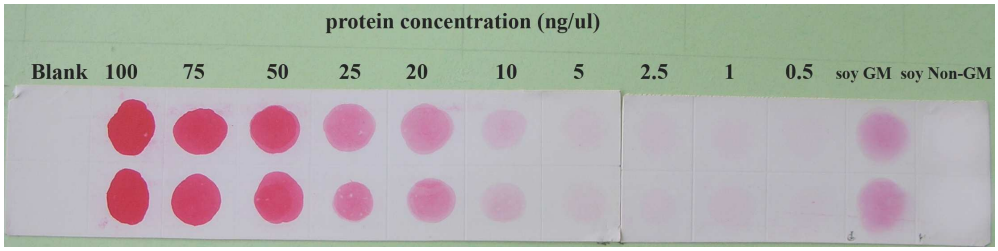


กราฟแสดง ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS จากการเจาะเลือด 4 ครั้ง ใช้โปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 นาโน กรัมเป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrateนาน 60 นาที

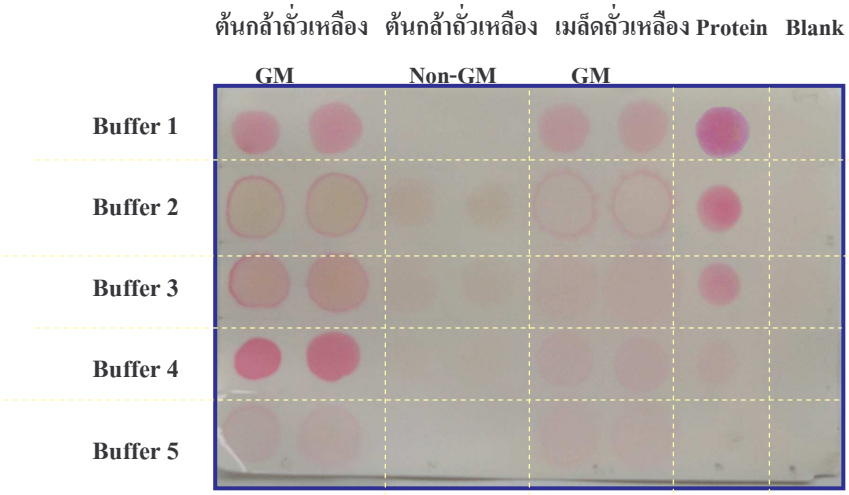


ภาพแสดง การทดสอบปฏิกิริยาของ IgG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับแอนติเจนชนิดต่างๆ โดยทำตัวอย่าง 2 ซ้ำ ด้วยวิธี DIBA

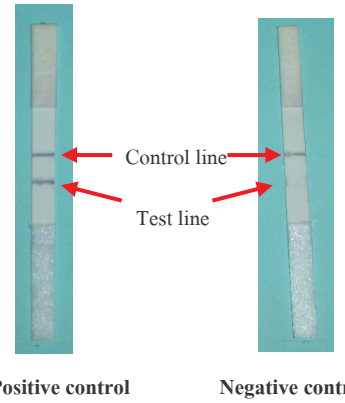
1. โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร เกิดปฏิกิริยาสีแดง
2. น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready เกิดปฏิกิริยาสีชมพู
3. น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) ไม่เกิดปฏิกิริยา
4. Buffer ไม่เกิดปฏิกิริยา



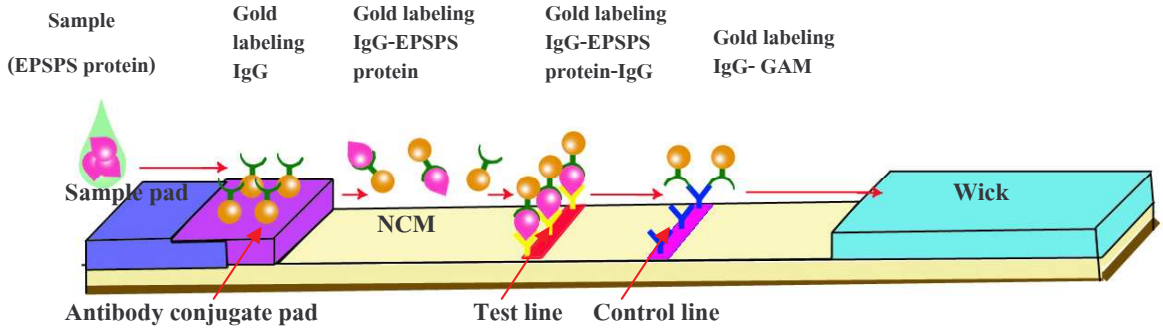
ภาพแสดง ความไวของ IgG ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการตรวจสอบกับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้น 100, 75 50, 25, 20, 10, 5, 2.5, 1 และ 0.5 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready น้ำคั้นต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) และ Buffer ที่ไม่มีโปรตีน EPSPS ด้วยวิธี DIBA



ภาพแสดง ประสิทธิภาพของ Buffer 5 ชนิดได้แก่ Buffer 1 (Guanidinium buffer) Buffer 2 (2% CTAB) Buffer 3 (Lysis buffer) Buffer 4 (Tris-HCL, pH 7.5) Buffer 5 (Na_2BO_3) ในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างที่เป็นต้นกล้าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready ต้นกล้าถั่วเหลืองปกติ (Non-GM) เมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Roundup Ready เปรียบเทียบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ Buffer โดยใช้สารละลาย IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DIBA

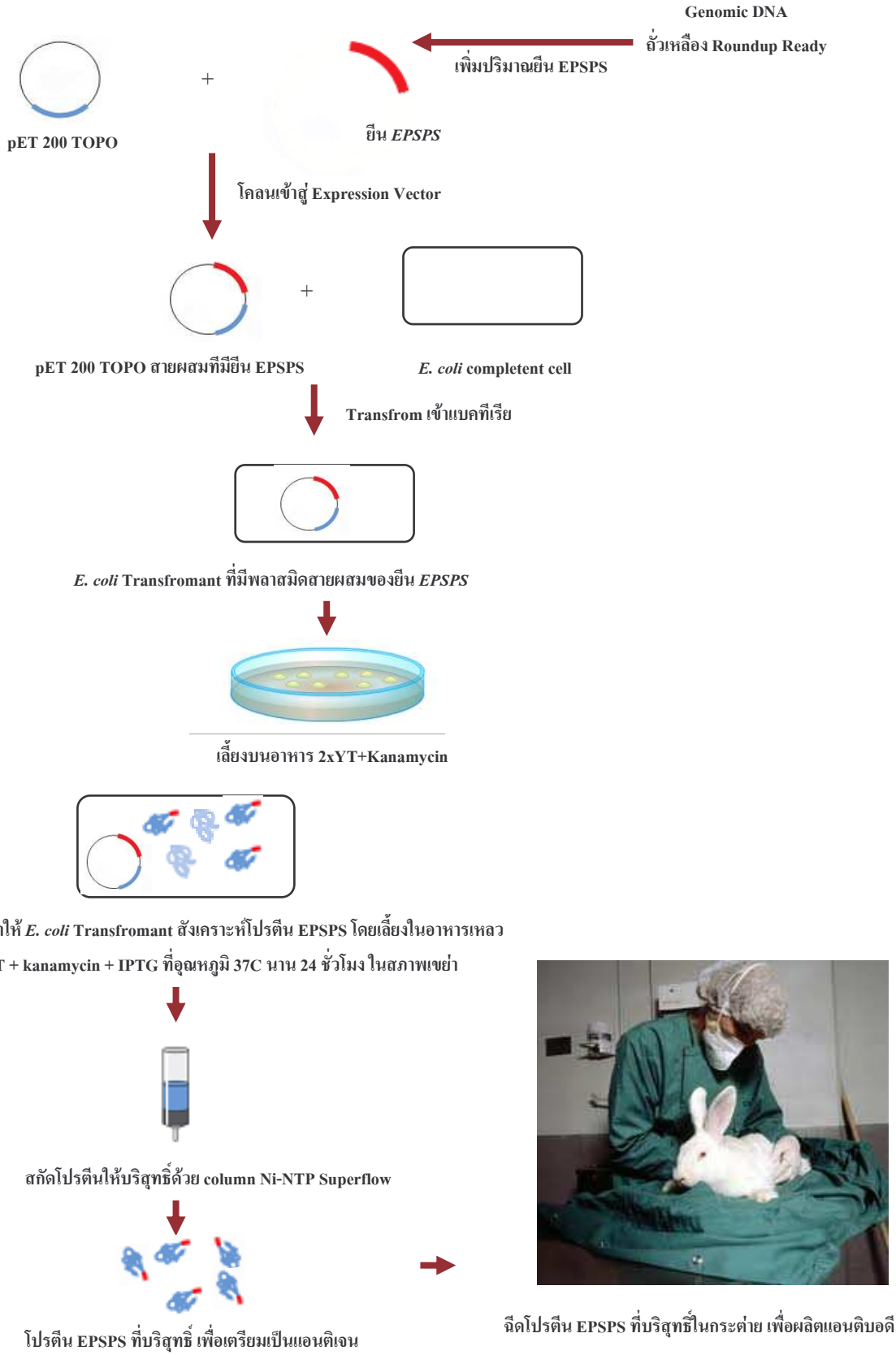


ภาพแสดง ผลการตรวจสอบกับโปรตีน EPSPS ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะเกิดปฏิกิริยาสีม่วง 2 แถบ คือ Test line และ Control line เปรียบเทียบกับ Buffer ที่ไม่มีโปรตีน EPSPS เกิดปฏิกิริยาสีม่วงแถบเดียว คือ Control line เท่านั้น โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใน 5 นาที



ภาพแสดง กลไกการทำงานของชุดตรวจสอบแบบ Gold Lateral Immuno Flow Test (GLIFT kit)

ภาพแสดง การตรวจตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ



ภาพแสดง ขั้นตอนการโคลนยีน *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready) และการผลิตแอติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย