การโคลนยีน scFv ที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซินพ่วงกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยา

Cloning of Aflatoxin-Specific ScFv Fused with Alkaline Phosphatase Genes for Immunodetection

จิรพงศ์ แพทย์สมาน[1,2] รัชนี ฮงประยูร[1,3*] และ วราภา มหากาญจนกุล[4]
Jirapong Phatsaman[1,2] Ratchanee Hongprayoon[1,3*] and Warapa Mahakarnchanakul[4]

Abstract

Aflatoxins (AFT) are fungal secondary metabolite naturally produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. These fungi are found to be contaminated in foodstuffs and agricultural products such as maize and peanut. The analytical techniques commonly used for AFT detection are chemical and immunological methods. The immunological methods such as enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA) are preferably applied in screening process for toxin contamination due to its specificity and numberous samples can be analyzed at the same time. In this study, single chain variable fragment (scFv) specific to AFT was developed by amplifying V_K and V_H genes by PCR from Hybridoma cell line C10. The amplified products were fused with a linker $(Gly_4Ser)_3$ giving the V_K -$(Gly_4Ser)_3$.- V_H product at 774 bp which was subsequently inserted into pCANTAB-5E phagemid and transformed into *Escherichia coli* strain TG1. Phage-displayed scFv (Phage scFv) was then characterized by phage ELISA. Two clones showed specific reactions with AFT and of which 2C10 with higher reactivity was chosen for further experiments. In parallel, alkaline phophatase (AP) gene was amplified from *E.coli* HB2151 and 1,350 bp sequence was obtained. It was subsequently fused the scFv gene to generate Phage scFv-AP. The result from ELISA test showed comparable reactivity by Phage scFv, Phage scFv-AP to whole molecule IgG. Specificity test by using Phage scFv-AP demonstrated that the scFv is specific to four aflatoxin derivatives including B_1, B_2, G_1 and G_2.

Keyword: aflatoxin, single chain variable fragment, scFv, alkaline phosphatase, phage display, antibody

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[1]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140
[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
[2]Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900
[3]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[3]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140
[4]ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10900
[4]Department of Food science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900
รับเรื่อง : เมษายน 2556
*Corresponding author : agrrat@ku.ac.th

บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซินเป็นเมตาโบไลต์ที่ผลิตขึ้นตามธรรมชาติโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวโพด และถั่วลิสง เป็นต้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินนิยมใช้การตรวจหาปริมาณทางเคมีและทางอิมมูโนวิทยา โดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยานี้เป็นที่นิยมใช้ในการคัดกรองเบื้องต้นเนื่องจากมีความจำเพาะสูงและใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้พร้อมกัน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิต single chain variable fragment (scFv) ที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซินโดยการเพิ่มปริมาณยีน V_K และ V_H ด้วยวิธีพีซีอาร์จากเซลล์ไฮบริโดมาโคลน C10 เมื่อนำยีนทั้งสองมาเชื่อมต่อกันโดยใช้ linker $(Gly_4Ser)_3$ พบว่า ยีน V_K -$(Gly_4Ser)_3$-V_H มีขนาด 774 คู่เบส จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับฝาจมิด pCANTAB-5E เพื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TG1และศึกษาคุณสมบัติของ scFv ที่มีการแสดงออกบนผิวฝาจด้วยวิธี Phage enzyme-linked immunosorbent assay (Phage ELISA) พบว่ามี 2 โคลนที่จำเพาะในการทำปฏิกิริยากับอะฟลาทอกซิน เลือกโคลน 2C10 ที่มีค่าปฏิกิริยาสูงมาใช้ในขั้นตอนต่อไป เพิ่มปริมาณยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, AP) โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ HB2151 ได้ยีน AP ขนาด 1.35 Kb นำมาเชื่อมต่อกับ Phage scFv เพื่อผลิต Phage scFv-AP เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA พบว่า Phage scFv, Phage scFv-AP และ whole molecule IgG มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน เลือก Phage scFv-AP มาทดสอบความจำเพาะกับอนุพันธ์อื่นๆ ของอะฟลาทอกซิน ได้แก่ B_1, B_2, G_1 และ G_2 พบว่ามีความจำเพาะกับทุกอนุพันธ์ใกล้เคียงกัน

คำนำ

อะฟลาทอกซินเป็นเมตาโบไลต์ที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งพบปนเปื้อนในผลิตผลการเกษตรและอาหารทั้งของคนและสัตว์ ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษชนิดนี้ เป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับซึ่งมีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ด้านการปศุสัตว์มีผลทำให้ผลผลิตของสัตว์เลี้ยงลดลง สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในเซลล์สัตว์และทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนในครรภ์ ส่งผลเสียต่อสุขภาพและเศรษฐกิจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น เหมาะกับการเจริญของเชื้อรา จึงมักพบปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด โดยเฉพาะในธัญพืช ถั่วลิสง พริก และอาหารแห้งชนิดอื่นๆ สารพิษอะฟลาทอกซินไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน ในกระบวนการผลิตแม้ว่าวัตถุดิบจะถูกแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารแล้วก็ตาม การตรวจสอบปริมาณของอะฟลาทอกซินในอาหารและวัตถุดิบในผลิตผลทางการเกษตร ก่อนเข้าสู่วงจรอาหาร จึงเป็นแนวทางในการป้องกันความเสี่ยงจากอันตรายในอาหาร ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอะฟลาทอกซินในอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีการ ได้แก่ การตรวจหาปริมาณทางชีววิทยา ทางเคมี กายภาพ และทางอิมมูโนวิทยา

การตรวจสอบโดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาต้องอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง และมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหาปริมาณสารพิษที่มีอยู่ การผลิตแอนติบอดีมีหลายรูปแบบ ได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดี โมโนโคลนอลแอนติบอดี และรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีซึ่งแอนติบอดีชนิดหลังนี้เป็นการโคลนยีนแอนติบอดีเข้าสู่พลาสมิด จึงสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีโมเลกุลรูปแบบต่างๆ ได้ เช่น whole molecule, antigen-binding fragment (Fab) หรือ Single chain variable fragment (scFv) เป็นต้น (Terry *et al*., 2011) ปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีได้อย่างรวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และยังคงความจำเพาะสูง ได้แก่ เทคโนโลยีฝาจดิสเพลย์ (Phage-displayed technology) ซึ่งเป็นการสร้างห้องสมุด scFv

(Phage-displayed scFv library) โดยการตัดต่อยีน scFv เข้าสู่ฝาจมิดพาหะ (phagemid) ที่เหมาะสม จากนั้นถ่ายโอน (transform) เข้าสู่แบคทีเรีย ซึ่งการแสดงออกของยีนแอนติบอดีจะสามารถแสดงออกได้บนผิวฝาจ (phage-displayed scFv) หรือในรูปของสารละลาย scFv (soluble scFv) ทำให้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะได้ในเวลารวดเร็ว นอกจากนั้นยังง่ายต่อการเก็บรักษามากกว่าเซลล์ไฮบริโดมา ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี และสามารถดัดแปลงยีนเพื่อคัดเลือกแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงขึ้นหรือเชื่อมต่อกับยีนของเอนไซม์หรือสารอื่นๆ ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต scFv ที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซิน โดยการโคลนยีนจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซิน และนำยีน scFv มาเชื่อมต่อกับยีนของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสาเตส (Alkaline phosphatase, AP) เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำและรวดเร็วต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไฮบริโดมาและสังเคราะห์ cDNA library

เพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซีน (MAb-AFT) จากเซลล์ไฮบริโดมาโคลน C10 ซึ่งผลิตอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG_1 และ κ light chain และผ่านการทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับ AFT โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับซีราลีโนน (Zearalenone) และออคราทอกซิน (Ochratoxin) (สุวรรณา และคณะ, 2552) โดยเลี้ยงในอาหาร Complete medium (CM medium) สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Tissue Total RNA Kit (Favorgen, Taiwan) นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปผ่านกระบวนการเตรียม cDNA library ด้วยชุด Superscript™ III reverse transcriptase (Invitrogen, USA) โดยใช้ Oligo (dT) 15 monomer เปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบกระบวนการ reverse transcription (RT) โดยใช้ β-actin gene primer ซึ่งเป็น house keeping gene สำหรับหนูเมาส์ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ forward primer คือ 5' TGT ATT CCC CTC CAT CGT G 3' และ reverse primer คือ 5' GGT TCT TCA TGA GGT AGT CTG TC3' (Deng *et al*., 2000)

2. การสังเคราะห์ยีน V_K และ ยีน V_H จาก variable regions

ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน V_K และ ยีน V_H ตามรายงานของ Intrasook (2006) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอิมมูโนโกลบูลินของหนูเม้าส์ ดังนี้

V_K Forward primer* คือ 5'GCCCAGCCGGCCATG GCGGAYATYSWGMTSACTCAGTC3'

V_K Reverse primer* คือ 5'GGAGCCGCCGCCGCCA GAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCACGTTTB AKYTCCARCTTKG3'

V_H Forward primer* คือ 5'GGCGGCGGCTCCGGT GGTGAGGTSMARCTGCAGSAGTC3'

V_H Reverse primer คือ 5'GCCGCCGCCGCA GAGACAGTGACGAGAGT3'

* R คือ A หรือ G, U คือ C หรือ T, M คือ A หรือ C, K คือ T หรือ G, S คือ C หรือ G, W คือ A หรือ T และ B คือ T หรือ T หรือ C หรือ G

ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณยีน V_K และ ยีน V_H ในส่วนของ variable regions และ β-actin gene จาก cDNA library ด้วยวิธีการ PCR โดยผสม 1x Phusion® HP buffer 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.4 ไมโครลิตร, 10 μM Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, cDNA library 2 ไมโครลิตร, DMSO 0.6 ไมโครลิตร, Phusion® Hot Start II DNA polymerase (2U/μl) 0.2 ไมโครลิตร และ nuclease-free deionized water (dH_20) 11.8 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°ซ นาน 45 วินาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 98°ซ

นาน 10 วินาที annealing ที่ 62ºซ นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 7 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.5% (Intrasook, 2006)

เมื่อสังเคราะห์ยีน V_K และ ยีน V_H ได้แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกันด้วย linker $(Gly_4Ser)_3$ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยผสม 1x Phusion^R HP buffer 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.4 ไมโครลิตร, 10 μM V_K Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM V_H Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, V_K PCR product 1 ไมโครลิตร, V_H PCR product 1 ไมโครลิตร DMSO 0.6 ไมโครลิตร, Phusion^R Hot Start II DNA polymerase (2U/μl) 0.2 ไมโครลิตร และ dH_20 11.8 ไมโครลิตรโดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ นาน 45 วินาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ นาน 10 วินาที annealing ที่ 58ºซ นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 7 นาที (Intrasook, 2006)

3. การโคลนยีน scFv และเชื่อมต่อเข้ากับฝาจมิดพาหะ pCANTAB 5E

นำยีน V_K ที่เชื่อมต่อกับยีน V_H (V_K linker- V_H) มาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน scFv ที่มีการเติมตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I อยู่ที่ปลาย 5' และ *Not* I อยู่ที่ปลาย 3' โดยใช้ไพรเมอร์ SCFOR 5'GGAATTC GGCCCCCGAGGCC3' และ SCBACK 5'CGC GCGGCCGCATGGCG3' (Intrasook, 2006) โดยมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 1x Phusion^R HP buffer 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.4 ไมโครลิตร, 10 μM SCFOR Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM SCBACK Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, V_K -linker- V_H PCR product 3 ไมโครลิตร, DMSO 0.6 ไมโครลิตร, Phusion^R Hot Start II DNA polymerase (2U/μl) 0.2 ไมโครลิตร และ dH_20 10.8 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ นาน 45 วินาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ 10 วินาที annealing ที่ 63ºซ นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 30 วินาทีจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 7 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.5% (Intrasook, 2006)

จากนั้นตัดดีเอ็นเอพาหะลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Sfi* I ที่ปลาย 5' และ *Not* I ที่ปลาย 3' โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 10X Buffer 2 ไมโครลิตร, PCR product 7 ไมโครลิตร, *Sfi* I restriction enzyme 1 ไมโครลิตร, *Not* I restriction enzyme 1 ไมโครลิตร และ dH_2O 9 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่ 37ºซ นาน 3 ชั่วโมง เชื่อมต่อยีน scFv เข้ากับฝาจมิดพาหะ pCANTAB 5E โดยใช้ insert gene : vector เท่ากับ 3:1, 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร และ T4 ligase 1 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37ºซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำฝาจมิดลูกผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ TG1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001)

4. การทดสอบความจำเพาะของ Phage scFv โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (Phage ELISA)

คัดเลือกโคโลนีของ *E.coli* สายพันธุ์ TG1 ที่มี recombinant phagemid (pCANTAB-5E-scFv) จากข้อ 3. นำมาเลี้ยงใน culture plate 96 หลุม โดยเลี้ยง 1 โคโลนีต่อหลุม ในอาหาร 2xYT ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ นานข้ามคืน นำของเหลวที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร 2xYT อัตราส่วน 1:10 ใน Cluster Tube 96 หลุม (Corning, New York, USA) ใหม่ที่มี glucose 2% และ ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ นาน 1 ชั่วโมง เติม helper phage M13KO7 ความเข้มข้น $4x10^{10}$ pfu ใน 2xYT ที่มี glucose 2% และ

ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าต่อที่ความเร็วเท่าเดิมนาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°ซ นาน 25 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 2xYT ที่มี ampicillin และ kanamycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนฝาจที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°ซ นาน 20 นาที (Amersham, 1996) แล้วนำส่วนใสซึ่งมีฝาจที่มีการแสดงออกของ scFv บนผิว (phage scFv) ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA

การทดสอบความจำเพาะของ phage scFv ต่ออะฟลาทอกซินบี1 (AFB_1) โดยวิธี phage ELISA ดัดแปลงจากวิธีของ Kuntalee *et al*., (2011) ใช้ B_1-BSA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer, pH 9.6 (CB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เคลือบหลุมทดสอบใน ELISA plate ส่วนอีก plate เคลือบด้วย BSA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อเป็นถาดควบคุม ลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 60 นาที ล้างหลุมทดสอบด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม Skim milk 3% ที่ละลายใน PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 60 นาที ล้างถาด ELISA เช่นเดิม เติม Phage scFv ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 90 นาที ล้างถาด ELISA เติม Anti-M13KO7 antibody (ห้องปฏิบัติการซีรัมวิทยาและตรวจวินิจฉัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน) อัตรา 1:1,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 60 นาที ล้างถาด ELISA แล้วเติม goat anti-rabbit IgG conjugate (GAR) (A 3687, SIGMA, USA) ที่เจือจางใน PBS อัตราส่วน 1:30,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 60 นาที ล้างถาด ELISA และเติมสับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน diethanolamine buffer, pH 9.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37ºซ ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กำหนดให้ ตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสองเท่าของค่าที่อ่านได้จาก negative control เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก

5. การโคลนยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากแบคทีเรีย *E.coli*

ใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ HB2151 เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

Forward primer คือ 5'-GCGGCCGCTCGGAC ACCAGAAATGCCTGTTCTG-3'

Reverse primer คือ 5'-GCGGCCGCTTT CAGCCCCAGRGCGGCTTTCAT-3'

ซึ่งไพรเมอร์ มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Not* I อยู่ที่ปลาย 5' และปลาย 3' เพิ่มปริมาณยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธีการ PCR โดยผสม 1x Phusion^R HP buffer 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.4 ไมโครลิตร, 10 µM Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 µM Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, *E.coli* สายพันธุ์ HB2151 (นำโคโลนีมาเจือจาง 1:20) 2 ไมโครลิตร, dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.6 ไมโครลิตร, Phusion^R Hot Start II DNA polymerase (2U/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร และ dH_20 11.8 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ นาน 30 วินาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 98ºซ นาน 10 วินาที annealing ที่ 55ºซ นาน 10 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72ºซ นาน 7 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย agarose gel electrophoresis 1.5% เปรียบเทียบกับ 1 Kb markers(Fermentas, USA) จากนั้นโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pQE80 ตามคำแนะนำของบริษัทและนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

6. การเชื่อมต่อยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเข้ากับยีน scFv ในฝาจมิดพาหะ pCANTAB-5E

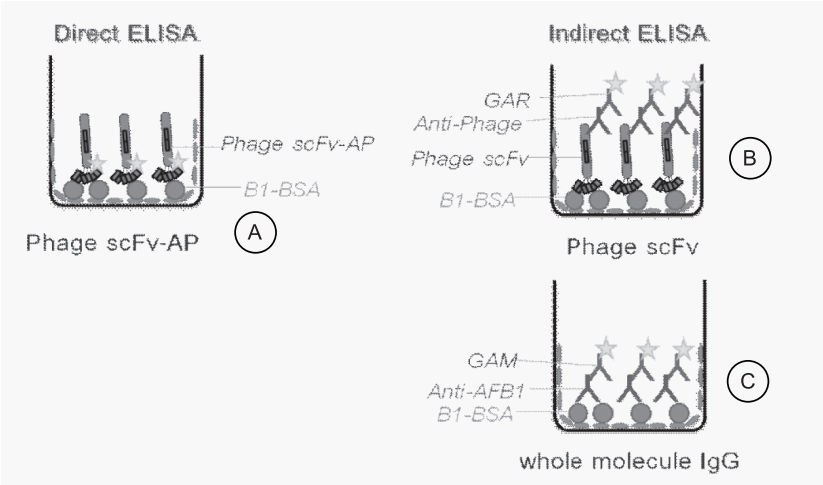
นำ *E.coli* สายพันธุ์ TG1โคลน 2C10 (ข้อ 4.) ที่มีการแสดงออกของ scFv ที่จำเพาะกับอะฟลาทอกซิน มาสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAprep^{R} Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) และนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน AP (ข้อ 5.) มาตัดด้วยเอนไซม์ *Not* I จากนั้นนำยีน AP มา insert เข้าสู่ฝาจมิดลูกผสม pCANTAB-5E+scFv 2C10 โดยใช้ insert gene : vector เท่ากับ 3:1 เติม 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร และ T4 ligase 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ ระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำฝาจมิดลูกผสม 10 ไมโครลิตร ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยวิธี heat shock transformation จากนั้นเติมอาหาร 2xYT 900 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37ºซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน ละลายตะกอนใน PBS และนำไป spread plate บน SOBAC agar ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37ºซ นาน 16 ชั่วโมง ชักนำให้มีการแสดงออกของ Phage scFv-AP โดย helper phage ตามวิธีในข้อที่ 4.

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Phage scFv, Phage scFv-AP และ Anti-AFT IgG (whole molecule IgG) ในการทำปฏิกิริยา ELISA

ใช้วิธี ELISA โดยเคลือบ plate ด้วย B_1-BSA และทำตามวิธีการ Phage ELISA ในข้อ 4. เปรียบเทียบกับ plate ที่เคลือบด้วย BSA ในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ การทำปฏิกิริยาแบบ direct ELISA โดยใช้ Phage scFv-AP (ข้อ 4. และ ภาพที่ 1A) และแบบ Indirect ELISA โดยใช้ Phage scFv ที่ไม่มีการเชื่อม AP หรือ Anti-AFT IgG (ภาพที่ 1B, 1C)

8. การทดสอบความจำเพาะของ Phage scFv-AP กับอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Competitive ELISA

เคลือบหลุม ELISA plate ด้วย B_1-BSA ตามวิธีการในข้อ 4. และให้ทำปฏิกิริยาแบบแข่งขันกับอนุพันธ์อื่นๆ ของ AFT ได้แก่ B_1, B_2, G_1, และ G_2 ความเข้มข้น 200 ppb โดยเติมแต่ละอนุพันธ์ของสารพิษและ Phage scFv-AP ในข้อ 6. อย่างละ 50 ไมโครลิตร ผสมกันในหลุมผสม จากนั้นย้ายไปใส่ในหลุมทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37ºซ นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาล้างถาด ELISA และเติมสับสเตรทแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ (A) Phage scFv-AP (B) Phage scFv ที่ไม่มีการเชื่อม AP และ (C) Anti-AFT whole molecule IgG ในปฏิกิริยา ELISA

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไฮบริโดมา และสังเคราะห์ cDNA library

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไฮบริโดมา และตรวจวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis พบแถบอาร์เอ็นเอ 2 แถบ คือ 18s และ 28s เมื่อนำมาสังเคราะห์ cDNA library พบว่า PCR product มีขนาด 491 bp ตามที่ Deng *et al*., (2000) รายงานไว้

2. การสังเคราะห์ยีน V_K และ ยีน V_H จาก variable regions

การสังเคราะห์ยีน V_K และ ยีน V_H จาก variable regions ของอิมมูโนโกลบูลินจาก cDNA library ที่ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน C10 พบว่ายีน V_K และ V_H มีขนาด 390 bp และ 420 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 2) เมื่อนำยีนทั้งสองมาเชื่อมต่อกันโดย linker $(Gly_4Ser)_3$ พบว่ายีน V_K –linker- V_H มีขนาด 774 bp (ภาพที่ 2)

3. การโคลนยีน scFv และเชื่อมต่อเข้ากับฝาจมิดพาหะ pCANTAB 5E

เมื่อนำยีน V_K –linker- V_H ที่มีการเติมตำแหน่งตัดจำเพาะแล้วมาเชื่อมต่อกับฝาจมิดพาหะ pCANTAB 5E และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TG1 คัดเลือกเซลล์แบคทีเรียสายผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I พบว่าได้ยีน scFv มีขนาด 820 bp (ภาพที่ 2)

4. การทดสอบความจำเพาะของ Phage scFv โดยวิธี Phage ELISA

เมื่อคัดเลือกฝาจมิดลูกผสมมา 2 โคลน และทดสอบการแสดงออกของ Phage scFv ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีความจำเพาะต่ออะฟลาทอกซินบี 1 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ BSA และบัฟเฟอร์ (ตารางที่ 1)

5. การโคลนยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phos phatase) จากแบคทีเรีย *E.coli*

การเพิ่มปริมาณยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* HB2151 เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ยีนที่มีขนาด 1,350 bp (KF387511) โดยมีลำดับนิวคลิโอไทด์ ตามที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AP พบว่าแปลรหัสให้กรดอะมิโนทั้งหมด 450 เรสิดิวส์ เหมือนกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ค่า identity เท่ากับ 96% นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม CLC Main Workbench ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ยีน AP เหมือนกับยีน AP จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ M29664, M29665, M29669, X04586, M29670, M29668, EU905389, EU905386, M13345 และ FJ546461 ที่ค่า bootstrab เท่ากับ 100% และต่างจากยีน AP ของยุง (*Aedes aegypti*) ได้แก่ XM_001663484 และ XM_001663428 ที่ค่า bootstrab เท่ากับ 100% และค่า similarity เท่ากับ 30% ซึ่งสรุปได้ว่ายีน AP ที่ศึกษาเป็นยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

6. การเชื่อมต่อยีนอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเข้ากับยีน scFv ในฝาจมิดพาหะ pCANTAB-5E

จากการสกัดดีเอ็นเอพาหะลูกผสมและตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Not* I พบว่า ยีน scFv- AP มีขนาด 2,170 bp (ภาพที่ 3)

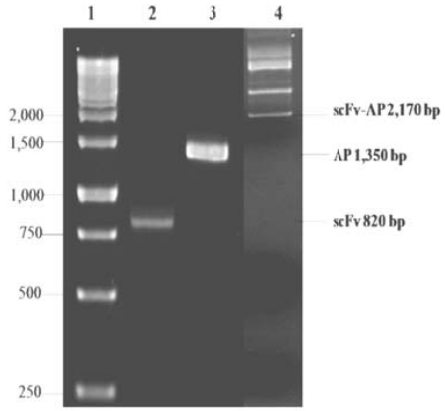
7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Phage scFv (2C10), Phage scFv (2C10)-AP และ Anti-AFB1 IgG (whole molecule IgG) ในการทำปฏิกิริยา ELISA

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Phage scFv, Phage scFv-AP และ whole molecule IgG ในการทำปฏิกิริยา ELISA โดยใช้ AFB_1 เป็นแอนติเจน พบว่า ให้ค่าการดูดกลืนที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.018, 1.022 และ 1.032 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ผลของปฏิกิริยาในภาพรวมพบว่า การทำปฏิกิริยาของ Phage scFv และ Phage scFv-AP มีค่าใกล้เคียงกับแอนติบอดีทั้งโมเลกุล ซึ่งวิธีการที่ใช้แอนติบอดีมาเชื่อมต่อกับเอนไซม์ จะช่วยลดระยะเวลาการทำงานให้สั้นลง ลดการใช้ secondary antibody (antibody-AP conjugate) ซึ่งมีราคาแพง เป็นการลดต้นทุนของการตรวจสอบและสะดวกในการใช้งาน

ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ยีน V_H (แถวที่ 2), V_κ (แถวที่ 3), V_κ-$(Gly_4Ser)_3$- V_H และ scFv ซึ่งมีการเพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะที่ปลาย 5' และ 3' (แถวที่ 4) โดยมีขนาด 420, 390, 774 และ 820 ตามลำดับเปรียบเทียบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp(แถวที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบ Phage scFv โดยวิธี Indirect ELISA

Clone	B1-BSA	BSA	Coating buffer
1C10	0.970	0.124	0.153
2C10	1.018	0.151	0.169



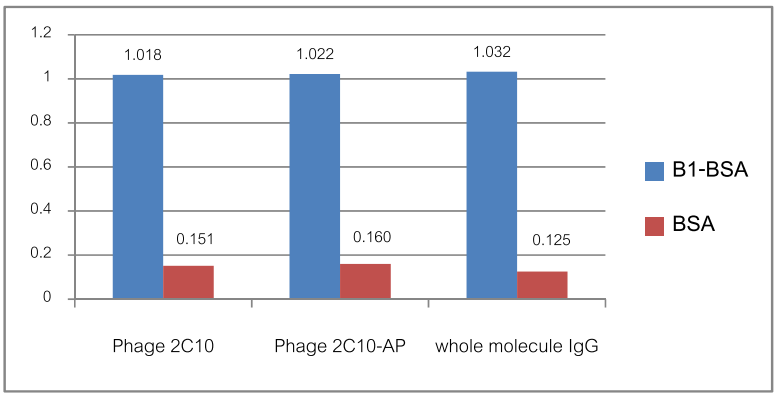
ภาพที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์ยีน scFv-AP พบว่า มีขนาด 2,170 bp (แถว 4) เปรียบเทียบกับยีน scFv (แถว 2) AP (แถว 3) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb markers (Fermentas, USA) (แถว 1)

8. การทดสอบความจำเพาะของ Phage scFv-AP กับอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Competitive ELISA

การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับอนุพันธ์อื่นๆ ของอะฟลาทอกซิน ได้แก่ B_1, B_2, G_1 และ G_2 พบว่า Phage scFv-AP มีปฏิกิริยาข้ามกับอนุพันธ์ B_2, G_1 และ G_2 ใกล้เคียงกับ B1 โดยเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม (non competitive) (ตารางที่ 1) ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงเหมาะกับการตรวจสอบอะฟลาทอกซินรวม ในงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการผลิตฝาจที่มีความจำเพาะกับอะฟลาทอกซินรวมและนำแอนติบอดีชนิด scFv บนผิวฝาจ มาเชื่อมต่อกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นอกจากนั้น scFv จากโคลน C10 ยังเหมาะกับการนำไปใช้ในการพัฒนาอิมมูโนแอฟินิตีคอลัมน์ เพื่อการทำความสะอาดตัวอย่างที่สกัดจากวัตถุดิบก่อนนำไปตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมี เช่น High performance liquid chromatography (HPLC) หรือนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อื่นต่อไป

สรุป

การเพิ่มปริมาณยีน V_K และ V_H จากอิมมูโนโกลบูลินของไฮบริโดมา C10ได้ยีนที่มีขนาด 390 และ 420 bp เมื่อนำยีนทั้งสองมาเชื่อมต่อกันด้วย linker $(Gly_4Ser)_3$ พบว่ายีน V_K-linker- V_H มีขนาด 774 bp หลังจากเพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะที่ปลายทั้งสองข้างแล้วได้ยีน scFv ขนาด 820 bp ที่พร้อมสำหรับการเชื่อมต่อกับฝาจมิดพาหะ การทดสอบการแสดงออกของฝาจมิดลูกผสมบนผิวฝาจ พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน scFv ที่บนผิวฝาจ (Phage scFv) เมื่อคัดเลือกโคลนมาทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า มีความจำเพาะต่ออะฟลาทอกซินบี1 ที่นำมาใช้ทดสอบแต่ไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ BSA และบัฟเฟอร์ จึงเลือกโคลน 2C10 มาใช้ในการทดสอบต่อไป การเพิ่มปริมาณยีน AP จาก *E.coli* HB2151 ได้ยีน AP ขนาด 1,350 bp หลังจากชักนำให้เกิดการแสดงออกของ scFv และ scFv-AP แล้ว นำ Phage scFv, Phage scFv-AP มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ whole molecule IgG ในการทำปฏิกิริยา ELISA พบว่า มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่การใช้ Phage scFv-AP ในวิธี direct ELISA ช่วยลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาให้สั้นลง และเป็นการลดการใช้ secondary antibody ซึ่งทางการค้า AP จะมีราคาแพง ส่วนการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับอนุพันธ์อื่นๆ พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับอนุพันธ์ B_2, G_1 และ G_2 ใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงว่า scFv ที่ผลิตได้มีประโยชน์ในการตรวจอะฟลาทอกซินในภาพรวม



ภาพที่ 4 กราฟแสดงผลที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ELISA โดยใช้ Phage scFv, Phage scFv-AP เปรียบเทียบกับ whole molecule IgG

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับอนุพันธ์อื่นๆ ของอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Competitive ELISA

Phage scFv-AP	Non competitive	Aflatoxin derivatives				Blank	Cross reaction
		B_1	B_2	G_1	G_2		
2C10	0.833	0.165	0.161	0.167	0.166	0.170	B_1, B_2, G_1, G_2

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

เอกสารอ้างอิง

Amersham Biosciences. 1996. Expression Module/ Recombinant Phage Antibody System. USA. p.1-48.

Dong X. Q., L. E. Lindler, M. C. Chu. 2000. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*. *Plasmid*. 43: 144 - 148.

Intrasook, J. 2006. Production and Characterization of Recombinant Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody against Aflatoxin B1. Thesis Degree of Master of Science, Gyeongsang National University, Korea. 67 pp.

Kuntalee R., J. Nanthnit, O.K. Richard, P. Potjamas, Y. Montarop. 2011. One-Step Detection of Aflatoxin-B1 Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library. Mol. Biotechnol. 49 (3): 240-9.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2344 pp.

Suwanna Kladpan, Ratchanee Hongprayoon, Warapa Mahakarnchanakul, Thanayut Jiratpong and Srihunsa Malichan. 2009. Production of monoclonal production antibody against aflatoxin B1 for the development of rapid detection test kit. Full report, Kasetsart University Research and Development Institute. Kasetsart University, Bangkok (in Thai).

Terry Fodey, Paul Leonard, John O' Mahony, Richard O' Kennedy and Martin Danaher. 2011. Developments in the production of biological and synthetic binders for immunoassay and sensor-based detection of small molecules. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 2.