แอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry1Ab และการพัฒนาวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคซีรัมวิทยา

Recombinant Cry1Ab Specific Antibody and Development of Serological Detection Techniques

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ[1,2,4] และรัชนี ฮงประยูร[1,3*]

Adcharapun Chaicharoen[1,2,4] and Ratchanee Hongprayoon[1,3*]

Abstract

The insecticidal crystal proteins encoded by *cry*1Ab gene of *Bacillus thuringiensis* have been widely used both as biopesticides and induce transgenic plants. The objectives of this study was to produce *an* antibody specific for Cry1Ab by using recombinant DNA technology for producing antigen and developing GM crop diagnostic method. The *cry*1Ab gene was cloned and sequenced from the genome of transgenic maize MON 810 by polymerase chain reaction.The open reading frame of *cry*1Ab gene consisted of 2,459 base pairs. DNA sequencing results confirmed that there was no error or unwanted mutation. The recombinant Cry1ab protein (r-Cry1ab) was used as an immunogen for injections into rabbits to produce polyclonal antibody. The results showed that they have high specificity against r-Cry1Ab. Single chain variable fragment (scFv) from naïve mouse library was selected using indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA). Following selection of the phage antibody library, 30 clones of phage showed specific binding activity against transgenic maize containing Cry1Ab. Sandwich ELISA used for the detection of Cry1Ab in transgenic maize. Phage-2G3 was used as a capture antibody and antiserum # 6 as a detecting antibody. The absorbances of Cry1Ab in transgenic and normal maize were 1.432 and 0.491, respectively. An immunochromatographic strip (ICS) was developed for the detection of Cry1Ab. The colloidal gold-labeled scFv2G3 was coated onto a conjugate release pad. The scFv2G3 coated the test line. The

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom, 73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at KamphaengSaen, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom, 73140

[4] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110
Biotechnology Research and Development office, Department of Agriculture, ThanyaburiPathumthani 12110

รับเรื่อง : กันยายน 2558
รับตีพิมพ์ : มกราคม 2559

*Corresponding author: agrrat@ku.ac.th

ICS was capable of specifically detecting Cry1Ab in transgenic maize. There is no cross reaction with normal maize and buffer.

Keywords: GM crop, immunochromatographic strip (ICS), ELISA, *cry*1Ab, scFv

บทคัดย่อ

Cry1Ab เป็นโปรตีนสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถยับยั้งการเติบโตของแมลงศัตรูพืชได้ จึงถูกนำมาใช้ควบคุมแมลงและสร้างเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cry1Ab โดยใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในการผลิตแอนติเจนและนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *cry*1Ab จากข้าวโพด MON 810 ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,459 คู่เบส เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbankพบว่าเหมือนกับยีน *cry*1Ab (NCBI accession No. AY326434) 99 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำไปกระตุ้นสัตว์ทดลองพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน r-Cry1Ab ได้ดี ส่วนการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีชนิด single chain variable fragment (scFv) จากคลังฝาจที่มียีนแอนติบอดีด้วยวิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) ได้ฝาจที่มีความจำเพาะต่อข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่มี Cry1Ab จำนวน 30 โคลน ตรวจความสามารถในการจับกับโปรตีน Cry1Ab ด้วยวิธี sandwich ELISA เมื่อใช้ phage-2G3 เป็น capture antibody และใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 6(AS#6) เป็น detecting antibody พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่มี Cry1Ab และข้าวโพดปกติ ได้ค่า O.D. เท่ากับ 1.432 และ 0.491 ตามลำดับส่วนการพัฒนา Immunochromatographicstrip (ICS) โดยเคลือบ scFv 2G3 พ่วงกับอนุภาคทอง (CG-scFv2G3) บน conjugate release pad เคลือบ scFv2G3 บนตำแหน่ง test line พบว่าชุดตรวจสอบ ICS สามารถตรวจสอบ Cry1Ab ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้ โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นข้าวโพดปกติและบัฟเฟอร์

คำสำคัญ: พืชดัดแปลงพันธุกรรม อิมมูโนสตริป อิไลซ่า ไครวันเอบี แอนติบอดีสายเดี่ยว

คำนำ

การเพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการพาณิชย์สูงถึงกว่า 50 เท่าตัวจากประเทศต่างๆ ทั่วทุกมุมโลก และมีพื้นที่ในการเพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมรวมกันมากกว่า 181 ล้านเฮกตาร์ (ประมาณ 1000 ล้านไร่) ซึ่งปริมาณพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นไม่ได้มีแต่เฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วหรือประเทศที่มีเทคโนโลยีสูงเท่านั้น แต่ประเทศกำลังพัฒนาได้มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว และคาดกันว่าพื้นที่เพาะปลูกจะยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วต่อไป (ISAAA, 2014) ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่าง

มากมาย แต่ก็ยังเป็นข้อกังวลเกี่ยวกับผลกระทบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์

Bt toxin เป็นสารที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ประกอบด้วยโปรตีนไคร (Cry) หลายชนิด สามารถยับยั้งการเติบโตของแมลงศัตรูพืชได้โดยการจับกับจุดเฉพาะบนผนังด้านในของกระเพาะและทำลายช่องท้องของแมลง โปรตีน Cry1Ab เป็นหนึ่งในโปรตีนไครที่มีการนำไปตัดต่อยีนให้แก่พืชหลายชนิดและมีการปลูกเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย เช่น มะเขือเทศ ข้าวโพดมันฝรั่งถั่วเหลือง ฝ้าย อ้อย และข้าว เพื่อให้พืชดังกล่าวสามารถป้องกันตัวเองจากแมลงศัตรูต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงซึ่งเป็นต้นทุนที่สูงและเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภค

ประเทศไทยมีนโยบายให้การสนับสนุนการพัฒนาศักยภาพการวิจัยและพัฒนาพันธุวิศวกรรมให้มีความเข้มแข็ง นำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการเพาะปลูก ยกเว้นเพื่อการศึกษาทดลองเท่านั้น โดยอาศัยกลไกการควบคุมของพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2546 ซึ่งกำหนดให้มีพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นสิ่งต้องห้ามนำเข้า

เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม คือ Enzyme – linked immunesorbent assay (ELISA) เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น โดยหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจพืชดัดแปลงพันธุกรรมต้องซื้อชุดตรวจสอบ ELISA จากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงมาก ประเทศไทยต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในแต่ละปีเป็นจำนวนมากในการซื้อชุดตรวจสอบเหล่านี้ ดังนั้นการผลิตชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้เองภายในประเทศ จะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบให้มีความรวดเร็วและสะดวกในการใช้งานกับพื้นที่ในแปลงปลูกได้อีกประการหนึ่งด้วยงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cry1Ab โดยใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอในการผลิตแอนติเจนและนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบ Cry1Ab ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การสังเคราะห์โปรตีน recombinant Cry1Ab (r-Cry1Ab) เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

โคลนยีน *cry*1Ab โดยแยกสกัด genomic DNA (gDNA) ของ Certified Reference Material (CRM) MON 810 Maize level 5 [ERM-BF413f sample No: 4486] โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) วิธีการตามคู่มือของบริษัท เพิ่มชิ้นส่วนของยีน *cry*1Ab ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (Singh *et al*., 2007) โดยใช้ไพร-เมอร์ จำนวน 2 สาย คือ AbTP-F primer (5'-CA CCGAAACAACCCAAACATCAACGAGTG - 3)' และ Ab-R primer (5'-TTGTCGACGCTACCGAA AGTCCTCGTTCAG-3') เมื่อสังเคราะห์ยีน *cry*1Ab ได้แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับ Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen, USA) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมถ่าย

ฝากใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (Roset-ta) ด้วยวิธีการ heat shock transformation และชักนำการแสดงออกของโปรตีน r-Cry1Ab ด้วย IPTG นาน 4ชั่วโมง ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni-NTA agarose และตรวจสอบขนาดของ r-Cry 1Ab ด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Sambrook *et al*. (1989)

2.การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Cry1Ab

นำ r-Cry1Ab ฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน ใช้ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับ com-plete Freund's adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดให้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) ครั้งต่อมาใช้ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ผสม incomplete Freund's adjuvant (IFA) ปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ติดต่อกันทั้งหมด 2 ครั้ง เริ่มเก็บเลือดครั้งที่ 1 หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งแรก 2 สัปดาห์และเก็บเลือดต่อไปทุกสัปดาห์จนครบ 14 ครั้ง นำเลือดที่เก็บได้ในแต่ละครั้งมาปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเพื่อเก็บส่วนใส (แอนติซีรัม;AS)จากนั้นนำแอนติซีรัมที่ได้มาศึกษาคุณลักษณะและไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Cry1Ab โดยใช้วิธี ELISA

3.การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน Cry1Ab ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฝาจ (Phage Display Technology)

คัดเลือกฝาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv) จำเพาะกับ Cry1Ab ด้วยวิธี Biopanning (*Amersham*Biosciences, 1996) โดยใช้เมล็ดข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่มี Cry1Ab (ข้าวโพด Bt) บดใน coating buffer, pH 9.6 อัตราส่วน 1:20 เติมลงใน Immuno tube (Nunc, Denmark) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิลิตร เติมคลังของฝาจ (Koohapitagtam, 2009) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมงล้างฝาจส่วนเกินออกจาก Immuno tube ด้วย PBST 20 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิลิตร เติมเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ลงใน Immuno tube บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ฝาจที่จำเพาะต่อ Cry1Ab เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร SOBAG นานข้ามคืนคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเลี้ยง 1 โค-โลนีต่อ 1 หลุม จากนั้นเติม helper phage M13 K07 ลงในแต่ละหลุมของเซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณฝาจ เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำส่วนใสที่มี Phage-scFv ที่จำเพาะกับ Cry1Ab ไปทดสอบด้วยวิธี Phage ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kingsbury and Jung-hans (1995) ใช้ข้าวโพด Bt บดใน coating buffer pH 9.6 อัตราส่วน 1:20 เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ส่วนอีกถาดเคลือบด้วยข้าวโพดปกติ เพื่อเป็นถาดควบคุม ลบบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงเติม Phage-scFv ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยวิธี Biopanning ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงล้างถาด ELISA ด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม anti-M13K07 antibody (ห้องปฏิบัติการซีรัมวิทยาและตรวจ

วินิจฉัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงล้างถาด ELISA แล้วเติม goat anti-rabbit IgG (whole molecule)-*alkaline phosphatase antibody* (Sigma, USA) เจือจาง 1:30,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ล้างถาด ELISA และเติมสับสเตรท p-nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (O.D. 405) กำหนดให้ตัวอย่างที่มีค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) (Thermo scientific, 2013) คือค่า O.D. 405 ของข้าวโพด Bt/ค่า O.D. 405 ของข้าวโพดปกติ มากกว่า 1.0 เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก

หลังจากได้ Phage-scFv ที่มีความจำเพาะต่อ Cry1Ab ด้วยวิธี Phage ELISA แล้วนำ Phage-scFv มาเพิ่มปริมาณ ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ HB2151 เพื่อผลิต soluble scFv โดยเติม Phage-scFv ลงใน culture ของแบคทีเรียดังกล่าว และชักนำให้มีการแสดงออกของยีน scFv ด้วย 1 mM IPTG เลี้ยงต่อเป็นเวลา 16 ชั่วโมงจากนั้นละลายตกตะกอนเซลล์ด้วย 1X TES buffer อัตราส่วนอาหารต่อบัฟเฟอร์ คือ 10:1 วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาทีตามวิธีการของ *Amersham* Bio-sciences (1996) เก็บส่วนใสที่มี soluble scFv เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

4.การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ Cry1Ab ด้วยวิธี sandwich ELISA

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากข้อ 2 และ Phage-scFv จากข้อ 3 มาทดสอบความจำเพาะต่อ Cry1Ab ด้วยวิธี sandwich ELISA ดัดแปลงจากวิธีของ Itoh and Suzuki (2002) โดยเปรียบเทียบการใช้ phage-2G3 phage-1F11 phage-2B8 phage-2D8 และ phage-4B3 เป็น capture antibody และใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 6 (AS#6) เจือจาง 1:1000 เป็น detecting antibody

5.การพัฒนาชุดตรวจสอบ Cry1Ab แบบ Immunochromatographicstrip (ICS)

เตรียมชุดตรวจสอบ Cry1Ab แบบ ICS โดยย่อยอนุภาคทองให้มีขนาด 15-20 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Rohiman *et al.* (2011) นำ $HAuCl_4$ (Sigma, USA) ความเข้มข้น 500 mM ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ต้มในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จนเดือด จากนั้นเติม sodium citrate ความเข้มข้น 38.8 mM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต้มต่ออีก 20 นาที ปล่อยให้อนุภาคทอง (colloidal gold; CG) เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เชื่อมอนุภาคทองกับ soluble scFv จากโคลนของ phage-2G3 (scFv2G3) ดัดแปลงจากวิธีการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (2550) นำสารแขวนลอยของอนุภาคทองที่พ่วงกับ scFv2G3 (CG-scFv2G3) พ่นบน standard 17 glass fiber (Whatman, USA) ที่ทำหน้าที่เป็น conjugate release pad (CRP) ด้วยอัตราเร็ว 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร โดยใช้เครื่อง Biojet&Airjet: XYZ Dispensing System (BIODOT, USA) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงจากนั้นเตรียมเส้น test line และ control line โดยพ่น scFv2G3 และ goat anti-rabbit IgG ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Whatman, USA) ที่ตำแหน่ง test line และ controlline ตามลำดับ

ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงประกอบชุดตรวจสอบลงบนแผ่น backing pad (Figure 1) ตัดชุดตรวจสอบให้มีขนาด 0.5x6 เซนติเมตรด้วยเครื่อง Guillotine cutting system (BIODOT, USA)

ทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการพาสารต่างๆ ไปทำปฏิกิริยายังบริเวณ test line และcontrol line โดยนำชุดตรวจสอบ ICS จุ่มลงในบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิดคือ 1x TBS pH 7.4 [buffer 1], BIOREBA general extraction buffer pH 7.4 (Bioreba, 2012) [buffer 2], Agdia extraction buffer pH 7.4 (NAPPO, 2013) [buffer3], ADGEN extraction buffer pH 7.4 (ADGEN Phytodiagnostics, 2012) [buffer 4] และ DOA extraction buffer2 pH 8.6 [buffer 5]ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในบัฟเฟอร์แต่ละชนิดโดยจะต้องเกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line เท่านั้น เมื่อได้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้ว นำข้าวโพด Bt และข้าวโพดปกติบดในบัฟเฟอร์ที่ทดสอบได้ จุ่มส่วน sample pad ลงในตัวอย่าง ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาภายในเวลา 10 นาที

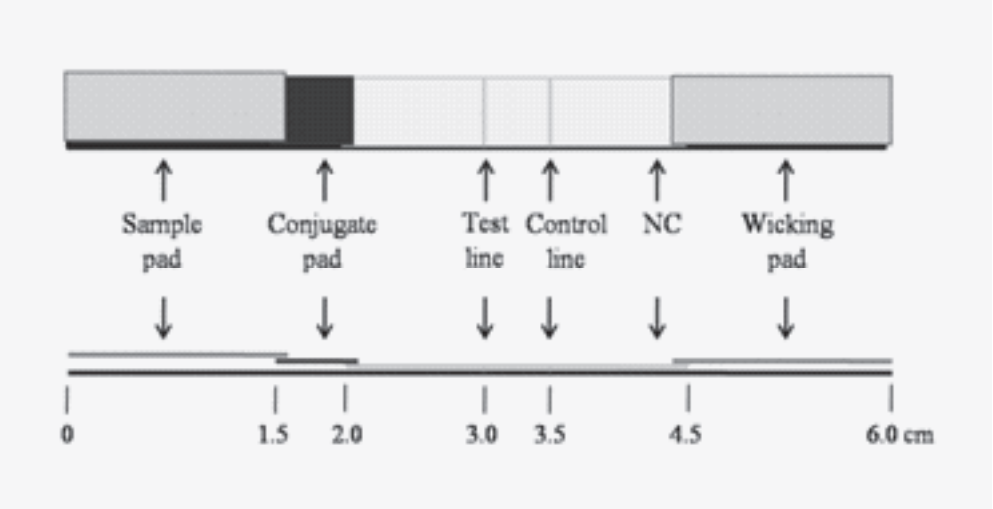

Figure 1 Schematic of the immunochromatographic strip. (Srihunsa, 2008)

ผลและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์โปรตีน r-Cry1Ab เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

การเพิ่มปริมาณยีน cry1Ab จาก genomic DNA ของข้าวโพด MON 810 ด้วยเทคนิค PCR ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,500 คู่เบส (Figure 2 A) นำ PCR product มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cry1Ab ที่โคลนได้เหมือนกับยีน cry1Ab (NCBI accession No. AY326434) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cry1Ab ที่ได้ตรงกับรายงานการใช้ยีน cry1Ab ที่พบในข้าวโพด MON810 ที่ได้มาจาก *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki (Singh et al., 2007) หลังจากเชื่อมยีน cry1Ab เข้ากับ expression vector pET (pEcry1Ab) และชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบแถบของโปรตีน r-Cry1Ab ขนาดประมาณ 110 กิโลดาลตัน (Figure 2B) ซึ่งแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวไม่ปรากฏในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ที่เป็นกลุ่มควบคุมสกัดโปรตีน r-Cry1Ab ให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA agarose วัดความเข้มข้นได้โปรตีนทั้งหมด 20 มิลลิกรัมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 1 ลิตร นอกจากนี้ นำโปรตีนมาทำปฏิกิริยากับ anti-Cry1 Abantibody ทางการค้า (Agdia, USA) เพื่อยืนยันความคงอยู่ของอิพิโทปบนโปรตีนที่ผลิตได้ พบว่าแอนติบอดีทางการค้าสามารถทำปฏิกิริยากับ r-Cry1Ab ได้ (Figure 3) แสดงว่าโปรตีนที่ผลิตได้ยังคงมีอิพิโทปที่เหมือนกับ Cry1Ab ที่ใช้ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงนำไปเป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี รวมทั้งใช้ในการคัดเลือกโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

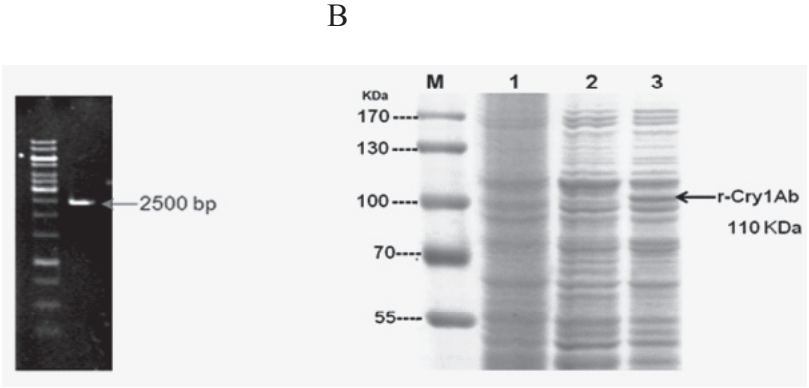

Figure 2 Expression of r-*cry*1Ab gene in *E. coli* (BL21) cell (A) Gel Electrophoresis of the PCR product.The arrow separately indicates the molecular weight of r-cry1Ab gene. (B) SDS-PAGE analysis of the r-Cry1Ab protein expression. Lane M: Protein marker. Lane 1: BL21 bacteria without IPTG induction. Lane 2: BL21 expressing pEcry1Ab bacteria without IPTG induction; Lane 3: BL21 expressing pEcry1Ab bacteria induced by 3 mM IPTG for 4 h.

2. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ r-Cry1Ab (แอนติซีรัม)

นำ r-Cry1Ab ฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ New Zealand White เก็บเลือดทุกสัปดาห์จนครบ 14 ครั้ง นำเลือดที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง มาปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดแดงเพื่อเก็บส่วนใส (แอนติซีรัม;AS) ตรวจหาไตเตอร์ของแอนติบอดีโดยใช้วิธี indirect ELISA และใช้ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน กำหนดให้ค่าที่เป็นบวกจะต้องมีค่า O.D. 405 มากกว่า Negative control 2 เท่าขึ้นไป พบว่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บได้ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 6,400 สัปดาห์ที่ 4 - 7 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 25,600 สัปดาห์ที่ 8 - 10 มีค่าไตเตอร์ลดลงเท่ากับ 12,800 จึงทำการฉีดกระตุ้นด้วย r-Cry1Ab อีกครั้งในสัปดาห์ที่ 10 พบว่าในสัปดาห์ที่ 11-14 มีไตเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 25,600 จากนั้นทดสอบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีจาก AS#6 และ AS#14 เจือจาง 1:1000 กับ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดที่เติม r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดอย่างเดียว ผลการทดลองพบว่าแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับ r-Cry1Ab ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.817 และ 0.868 ตามลำดับ แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดที่เติม r-Cry1Ab มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.817 และ 0.463 ตามลำดับ โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.142 และ 0.190 ตามลำดับ (Figure 4)

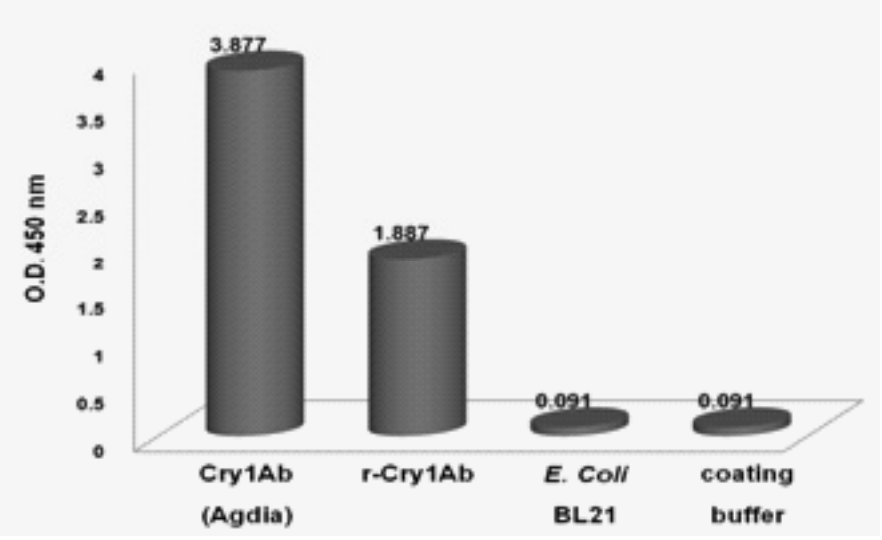

Figure 3 The antigenicity of the r-Cry1Ab was confirmed by ELISA using anti-cry1Ab monoclonal antibody (Agdia)

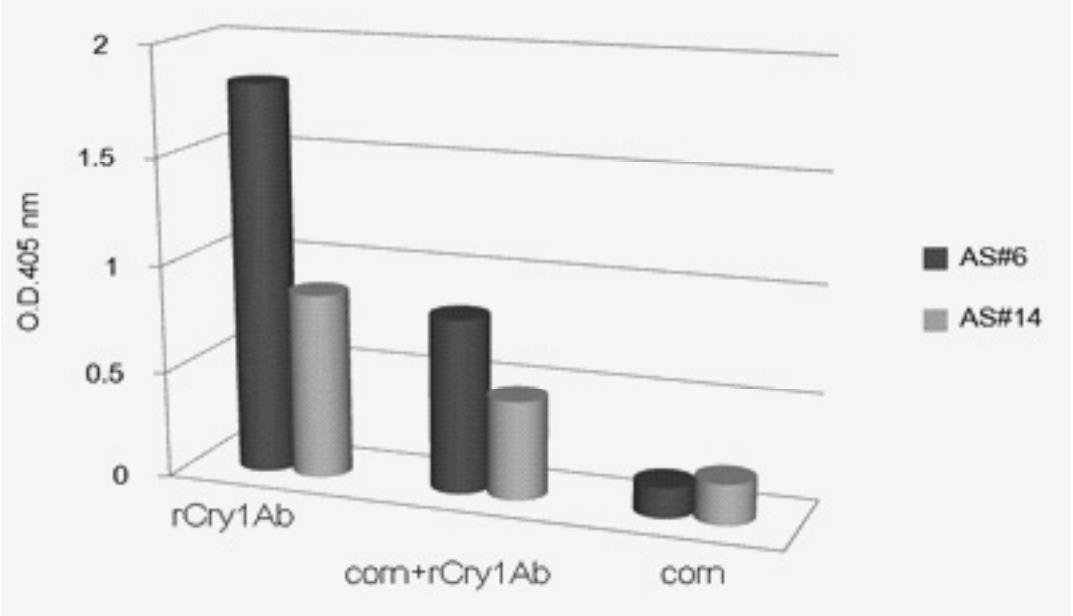

Figure 4 ELISA reactivities of antiserum#6 and antiserum#14 againstr-Cry1Abr-Cry1Ab withcorn sapand corn sap (negative control).

3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน Cry1Ab ด้วยเทคโนโลยีฝาจ (Phage Display Technology)

ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน Cry1Ab ด้วยเทคโนโลยีฝาจ โดยใช้น้ำคั้นจากข้าวโพด Bt และข้าวโพดปกติเป็นแอนติเจนในการคัดเลือกจากคลังฝาจและทดสอบการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี Phage ELISA ทำการคัดเลือก 4 ครั้ง ได้ Phage-scFv ที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน Cry1Ab จำนวน 30 โคลน (Table 1) โดย Phage-scFv ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นจากเมล็ดข้าวโพด Bt และข้าวโพดปกติ วัดค่า O.D. 405 อยู่ในช่วง 0.306 - 0.959 และ 0.142 - 0.714 ตามลำดับ และพบว่า Phage-1G2 ให้ค่า O.D. 405 ต่อน้ำคั้นจากเมล็ดข้าวโพดBt สูงที่สุด คือ 0.959 แต่ก็ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นจากเมล็ดข้าวโพดปกติสูงด้วยเช่นกัน โดยมีค่า O.D.405 เท่ากับ 0.714 ดังนั้นในการคัดเลือก Phage-scFv เพื่อไปทำการทดสอบในขั้นต่อๆ ไปนั้น จึงพิจารณาจาก Phage-scFv ที่มีค่า S/N ratio สูง ซึ่ง Phage-2G3 มีค่า S/N ratio ของปฏิกิริยาสูงที่สุด เท่ากับ 3.58 รองลงมา ได้แก่ Phage-4B3, Phage-2B8, Phage-1F11, Phage-2F3 และ Phage-2D8 ให้ค่า S/N ratio เท่ากับ 3.11, 2.80, 2.67, 2.47 และ 2.16 ตามลำดับ

4. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ Cry1Ab ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Phage-scFv

การตรวจสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยากับข้าวโพด Bt ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Phage-scFv เคลือบถาด ELISA และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี AS#6 เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง กำหนดให้ตัวอย่างที่มีค่า S/N ratio มากกว่า 1.0 เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกพบว่า Phage-scFv ทุกโคลนให้ผลของปฏิกิริยาที่เป็นบวก ทำปฏิกิริยาต่อน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพด Bt และข้าวโพดปกติ วัดค่า O.D. 405 อยู่ในช่วง 0.434 - 1.432 และ 0.262 -

0.491 ตามลำดับ (Table 2) phage-2G3 ให้ค่าS/N ratio ของปฏิกิริยาสูงที่สุด ได้แก่ 2.91 โดยวัดค่า O.D. 405 ต่อน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพด Bt และเมล็ดข้าวโพดปกติ เท่ากับ 1.432 และ 0.491 ตามลำดับ แต่ยังพบว่า ค่า O.D. 405 ต่อน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดปกติค่อนข้างสูง จากรายงานของ Jones (2002) ได้ทำการดูดซับแอนติบอดีด้วยน้ำคั้นจากใบพืชปกติ ก่อนนำมาใช้ในการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี ELISA พบว่าสามารถลดค่า O.D. 405 ต่อน้ำคั้นพืชปกติจาก 1.01 เป็น 0.07 และยังเพิ่มความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยค่า S/N ratio ของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 1.3 เป็น 4.3 ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปฏิกิริยาข้ามกับข้าวโพดปกติ ในการทดสอบครั้งต่อไป ต้องทำการดูดซับแอนติบอดี (cross absorbtion) ด้วยน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดปกติก่อนนำไปใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA

5. การพัฒนาชุดตรวจสอบ Cry1Ab แบบ Immunochromatographic strip

จากการทดสอบบัฟเฟอร์ 5 ชนิดในการบดตัวอย่าง พบว่า ชุดตรวจสอบ ICS ที่จุ่มใน buffer 3 นั้น CG-scFv2G3 ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ถึง wicking pad เร็วที่สุด และทำให้เกิดเส้นบน control line แต่ไม่เกิดเส้นบน test line ส่วน buffer 1 และ 5 ไม่สามารถพา CG-scFv2G3 เคลื่อนที่ไปทำปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสได้แม้บ่มนานกว่า 10 นาที และเมื่อใช้ buffer 2 และ 4 พบปฏิกิริยาแบบ false positive คือ เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line (Figure 5A และ Table 3) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้buffer 3 (Agdia extraction buffer, pH 7.4) ในการบดตัวอย่างในการทดลองต่อไป

การทดสอบความจำเพาะของ ICS ต่อ Cry1Ab โดยบดเมล็ดข้าวโพด Bt ใน buffer 3 และใช้เมล็ดข้าวโพดปกติและบัฟเฟอร์เป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบที่จุ่มในน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพด Bt เกิดสีขึ้นที่บริเวณเส้น control line และ test line ส่วนชุดตรวจสอบ ICS ที่จุ่มในน้ำคั้นข้าวโพดปกติและบัฟเฟอร์ เกิดขึ้นเฉพาะเส้น control line เท่านั้น แสดงว่าชุดตรวจสอบ ICS สามารถตรวจสอบ Cry1Ab ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้ โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นข้าวโพดปกติและบัฟเฟอร์ (Figure 5B) และสามารถอ่านค่าได้ภายในเวลาเพียง 6 - 10 นาที

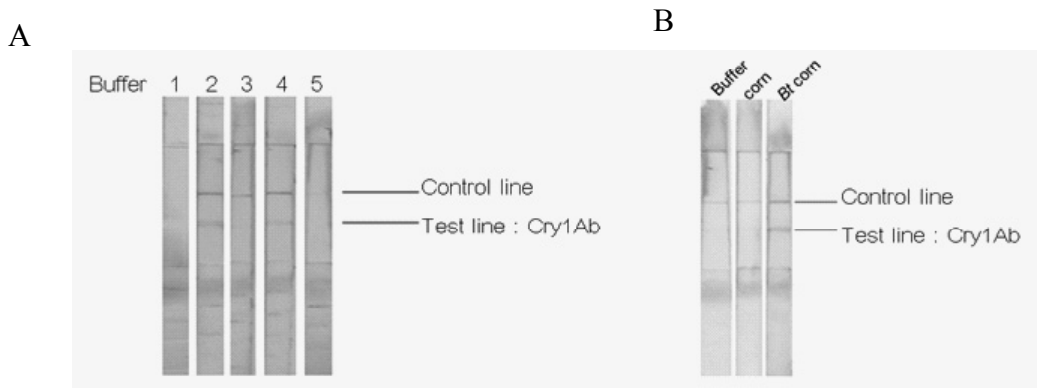

Figure 5 (A)Test results of CG-scFv2G3 movement in 5 types of buffers; 1x TBS, pH 7.4 (buffer 1), BIOREBA general extraction buffer, pH 7.4 (buffer 2), Agdia extraction buffer, pH7.4 (buffer 3), ADGEN extraction buffer, pH 7.4 (buffer 4), และ DOA extraction buffer2 , pH 8.6 (buffer 5) (B) Test results of the detection of Bt corn using immunochromatographic strip.

Table1 Test results of the detection of Bt corn using Phage ELISA

Phage-scFv	O.D.405		S/N ratio	Phage-scFv	O.D.405		S/N ratio
	Bt corn	corn			Bt corn	corn	
Phage-2G3	0.559	0. 156	3.58	Phage-3E6	0.796	0.473	1.68
Phage-4B3	0.441	0.142	3.11	Phage-6H8	0.694	0.392	1.66
Phage-2B8	0.683	0.244	2.80	Phage-1A2	0.535	0.324	1.65
Phage-1F11	0.899	0.337	2.67	Phage-2G1	0.405	0.246	1.64
Phage-2F3	0.386	0.156	2.47	Phage-6H7	0.583	0.357	1.63
Phage-2D8	0.429	0.199	2.16	Phage-6H10	0.612	0.387	1.58
Phage-3B10	0.566	0.282	2.01	Phage-1G1	0.342	0.240	1.42
Phage-4H11	0.803	0.406	1.98	Phage-4H5	0.483	0.342	1.41
Phage-1B3	0.642	0.326	1.97	Phage-3H9	0.370	0.263	1.40
Phage-3C11	0.791	0.402	1.97	Phage-1B2	0.652	0.481	1.36
Phage-6C3	0.586	0.298	1.97	Phage-1G2	0.959	0.714	1.34
Phage-1H11	0.708	0.361	1.96	Phage-5F10	0.636	0.493	1.29
Phage-1B7	0.495	0.261	1.90	Phage-6B3	0.754	0.586	1.29
Phage-1B12	0.408	0.231	1.76	Phage-2H5	0.326	0.190	1.16
Phage-1B2	0.486	0.279	1.74	Phage-2H1	0.306	0.265	1.15

S/N ratio (signal-to-noise ratio) = O.D.405 of Bt corn /O.D.405 of corn

Table 2 Test results of the detection of Bt corn using sandwich ELISA

Phage-scFv	O.D.405		S/N ratio
	Bt corn	corn	
Phage-2G3	1.432	0.491	2.91
Phage-2B8	0.552	0.288	1.92
Phage-4B3	0.434	0.262	1.65
Phage-2D8	0.469	0.320	1.47
Phage-1F11	0.608	0.423	1.44

S/N ratio = O.D.405 of Bt corn /O.D.405 of corn

Table 3 Comparison of the flow time of CG-scFv2G3 movement in each buffers

Sample buffer	Flow time (sec)/1	Visual appearance of line/2	
		Control line	Test line
Buffer 1	147	-	-
Buffer 2	52	✓	✓
Buffer 3	49	✓	-
Buffer 4	54	✓	✓
Buffer 5	53	-	-

/1 average flow time of CG-scFv2G3 movement.

/2 (✓) indicates the present of control line or test line.(-) = indicates the absent of control line or test line..

สรุป

แอนติเจนที่เตรียมได้จากการโคลนยีน *cry*1Ab จากข้าวโพด MON 810 ซึ่งยีนที่โคลนได้เหมือนกับยีน *cry*1Ab จากฐานข้อมูล Genbank (NCBI accession No. AY326434) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ นำยีน *cry*1Ab ไปโคลนเข้าใน expression vector pET และชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สกัดโปรตีน r-Cry1Ab ให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ได้โปรตีนทั้งหมด 20 มิลลิกรัม จากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 1 ลิตร เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทางการค้า (Agdia, USA) เพื่อยืนยันความคงอยู่ของอิพิโทปบนโปรตีน r-Cry1Ab พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ใช้โปรตีน r-Cry1Ab เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นกระต่าย เก็บเลือดได้ทั้งสิ้น 14 ครั้ง การทดสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA และใช้ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน พบว่า ไตเตอร์ของแอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 14 อยู่ในช่วง 6,400-25,600 และมีไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 - 7 และ 11 - 14 เลือกแอนติซีรัมครั้งที่ 6 และ 14 (AS#6 และ AS#14) มาทดสอบโดยเจือจาง 1:1,000 และทำปฏิกิริยากับ r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดที่เติม r-Cry1Ab ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดปกติพบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน r-Cry1Ab ได้ดี และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดปกติ

การผลิต scFv โดยการคัดเลือก Phage-scFv จากคลังฝาจโดยคัดเลือกทั้งหมด 4 ครั้ง ได้ Phage-scFv ที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน Cry1Ab จำนวน 30 โคลนมีค่า O.D.405 ต่อน้ำคั้นจากเมล็ดข้าวโพด Bt และข้าวโพดปกติ เมื่อพิจารณาโดยใช้

ค่า S/N ratio ของปฏิกิริยา พบว่า Phage-2G3 มีค่า S/N ratio ของปฏิกิริยาสูงที่สุด เท่ากับ 3.58 จึงนำมาใช้ในการเตรียม soluble scFv และพัฒนาชุดตรวจสอบ immunochromatographic strip ต่อไปบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการบดตัวอย่าง คือ buffer 3 (Agdiaextraction buffer pH 7.4) เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด Bt พบว่าชุดตรวจสอบสามารถอ่านค่าได้ภายในเวลาเพียง 6 - 10 นาทีโดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นข้าวโพดปกติและบัฟเฟอร์

วิธีการตรวจสอบ Cry1Ab ด้วยวิธี sandwich ELISA ในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับรายงาน Zhang *et al*. (2014) ซึ่งใช้วิธี sandwich ELISA ตรวจสอบโปรตีน Cry1Ab ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ scFv-G9 เป็น capture antibody และ anti-Cry1Ab rabbit PAbs เป็น detecting antibody เช่นเดียวกัน แม้ว่าผลของปฏิกิริยา sandwich ELISA ในงานวิจัยนี้จะให้ผลบวกแต่ค่า O.D. 405 ต่อน้ำคั้นเมล็ดข้าวโพดปกติค่อนข้างสูง ดังนั้นในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบขั้นต่อไป ต้องลดปฏิกิริยาข้ามกับข้าวโพดปกติโดยใช้น้ำคั้นข้าวโพดปกติดูดซับแอนติบอดีก่อนทำปฏิกิริยาวิธี ELISA สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ปริมาณมากในเวลาเดียวกันและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการอื่นๆ แต่ยังคงใช้ระยะเวลาในการอ่านผลนาน 5 - 6 ชั่วโมงส่วนการตรวจสอบข้าวโพด Bt ด้วยชุดตรวจสอบ ICS เป็นวิธีที่ง่ายต่อการนำไปใช้ สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เพียงดูสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และใช้เวลาการอ่านผลภายใน10 นาทีแต่ยังคงต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้การอ่านค่าของปฏิกิริยาเห็นเส้นที่ชัดเจนขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่มี Cry1Ab

เอกสารอ้างอิง

ADGEN Phytodiagnostics. 2012. DAS-ELISA Protocol (PAb and MAb). Available source: http://www.agrifoodtest.nl/ files/media/DAS-ELISA%20PROTOCOL%20(PAb%20and%20MAb.pdf, February 22, 2012.

Amersham Biosciences. 1996. Expression module/recombinant phage antibody system. USA. 48p.

Bioreba. 2012. Technical information buffer formulations. Available source: http://www.bioreba.ch/files/Tecnical_Info/Buffer_formulations.pdf, February 22, 2012.

ISAAA. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops:2014. Available source:http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/default.asp,April 29, 2015.

Itoh, K. and T. Suzuki. 2002. Antibody-guided selection using capture-sandwich ELISA, pp. 195-199. In M. O'.Philippa and R. Aitken, eds. Antibody Phage Display, Methods in Molecular Biology.178, Humana Press,Totowa, New Jersey.

Jones, A.T. 2002. Characterisation of the causal virus of pigeonpea sterility mosaic disease:A step towards attaining sustainability of pigeonpea production in the Indian subcontinent. Scottish Crop Research Institute. United Kingdom. 22 p.

Kingsbury, G.A. and R.P. Junghans. 1995. Screening of phage display immunoglobulin libraries by anti-M13 ELISA and whole phage PCR. Nucleic Acids Res: 23(13): 2563–2564.

Koohapitagtam, M. 2009. Construction of single chain variable fragment (scFv) from naïve mouse splenocytes by phage display technology and its application. Ph.D.Thesis, Kasetsart University.

NAPPO. 2013. NAPPO diagnostic protocols. Available source: http://www.nappo.org/en/data/files/download/Protocols/PD%2001-CTV%20Citrus-05-03-13-e.pdf, December 2, 2013.

Rohiman, A., I. Anshori, A. Surawijaya and I. Idris. 2011. Study of colloidal gold synthesis using turkevich method, pp.39-42. In AIP Conference Proceedings, 1415: 23–25 September 2011, Bali, Indonesia.

Sambrook, J., Fritsch, E, F. and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Singh, C.K., A. Ojha, S. Kamle and D.N. Kachru. 2007. Assessment of cry1Ab transgene cassette in commercial Bt corn MON810: gene, event, construct and GMO specific concurrent characterization. Available source:http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/362, December 2, 2013.

SrihunsaMalichan. 2008. Development of rapid test kit for detection of cucumber mosaic virus by immunochromatographic technique. Thesis, Master Degree. Kasetsart University. 79 pp.

Thermo Scientific. 2013. ELISA technical guide and protocols. Available source:https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf, December 2, 2013.

Zhang, X., C. Xu, C. Zhang, Y. Liu, Y. Xie and X. Liu. 2014. Established a new double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin based single-chain variable fragments from a naïve mouse phage displayed library. Toxicon, 81: 13 – 22.