

การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS เพื่อการตรวจสอบ  
ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

Selection of DNA Aptamers for Detection of CP4 EPSPS Protein  
in GM Soybean

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ<sup>1/, 2/, 3/</sup> รัทณี ฮงประยูร<sup>1/, 2/, 4/</sup>

Adcharapun Chaicharoen<sup>2/, 3/</sup> Ratchanee Hongprayoon<sup>2/, 4/</sup>

**ABSTRACT**

Genetically modified (GM) soybean containing 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (epsps) gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4, which confers resistance to the herbicide glyphosate, have been found with the highest frequency in transgenic plants worldwide. Precise and rapid assay is required to detect the transgenic plants for monitoring the spread of transgenes in the environment. This study focused on the selection of DNA aptamers specific to the CP4 EPSPS protein which can be further applied in the development of GM test kit. The CP4 EPSPS protein (accession No. AAL67577.1) from GM soybean was selected from Genbank and codon optimization was carried out for its gene expression in *E. coli*. Result showed that the recombinant CP4 EPSPS protein still positively reacted with the commercial antibody, therefore its native epitopes were conserved. This protein was used as an aptagen to select CP4 EPSPS specific DNA aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method. Two DNA aptamers designated AptRR-A3 and AptRR-A5 were selected from the binding affinity test with GM soybean sap. The result showed the highest binding activity at an S/N ratio of 1.64 when using clone AptRR-A5 as capture aptamer and AptRR-A3 as detecting aptamer in sandwich ELAA. Sandwich ELAA was applied to detect CP4 EPSPS protein in three transgenic soybean seed samples and the results were in accordance with those from the commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit. However, the sensitivity of the developed sandwich ELAA in this research requires further improvement.

**Key words:** Glyphosate, Enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA, Biotech soybean

<sup>1/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 (Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand)

<sup>2/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 (Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand)

<sup>3/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ. รัษฎบุรี จ. ปทุมธานี (Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperation, Thailand)

<sup>4/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

(Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus)

\*Corresponding author: agrat@ku.ac.th

## บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ซึ่งมียีน *cp4 epsps* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ CP4 มีการปลูกมากที่สุดในโลก การตรวจติดตามที่แม่นยำและรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของพืชดัดแปลงพันธุกรรม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม โดยนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP4 EPSPS (accession No. AAL67577.1) จากถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม มาแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนให้มีโคดอนที่เหมาะสมกับการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย พบว่า โปรตีนลูพผสม CP4 EPSPS ที่ผลิตได้ยังคงอิพิโทปที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทางการค้า จึงนำไปใช้เป็นแอปตาเจนในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ด้วยวิธี Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) การทดสอบปฏิกิริยากับน้ำคั้นจากเมล็ดถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ได้ 2 โคลนคือ AptRR-A3 และ AptRR-A5 เมื่อนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบแบบ indirect enzyme-linked aptamer assay (ELAA) พบว่า โคลน AptRR-A3 ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด คือ 1.56 ส่วนการพัฒนาวิธี sandwich ELAA โดยใช้โคลน AptRR-A5 เป็น capture aptamer และ AptR-A3 เป็น detecting aptamer ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด คือ 1.64 เมื่อนำวิธี sandwich ELAA ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 3 ตัวอย่าง เปรียบเทียบ

กับชุดตรวจสอบทางการค้า พบว่า วิธี sandwich ELAA ให้ผลที่สอดคล้องกัน แต่ยังคงต้องปรับปรุงประสิทธิภาพให้มีความไวสูงขึ้นต่อไป

**คำสำคัญ:** ไกลโฟเสท, เอนไซม์ ลิงค์ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ แอสเซย์, อีโคโนล่า, ถั่วเหลืองไบโอเทค

## บทนำ

การเพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในปี พ.ศ. 2560 มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ถึง 26 ประเทศ รวมพื้นที่ในการเพาะปลูกทั้งหมดประมาณ 185.1 ล้านเฮกตาร์ และพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 91.4 ล้านเฮกตาร์ เป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่มีลักษณะด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท สายพันธุ์ (event) GST 40-3-2 หรือ ถั่วเหลือง Roundup Ready โดยตัดต่อยีน *cp4 epsps* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นยีนที่ได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 และคาดการณ์ว่า พื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว (ISAAA, 2016) ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากมาย และประเทศไทยมีนโยบายให้การสนับสนุนการพัฒนาศักยภาพการวิจัย และพัฒนาพันธุวิศวกรรมให้มีความเข้มแข็ง นำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการเพาะปลูก ดังนั้นจึงต้องมีการคัดกรองพืชดังกล่าวก่อนนำเข้าประเทศ เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม คือ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Randhawa,

et al., 2016; Waminal, et al., 2013) เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น ๆ แต่ขั้นตอนในการผลิตแอนติบอดีนั้นต้องใช้เวลาประมาณมากกว่า 8 เดือน และจำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองในการผลิต

ปัจจุบันมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ อาจเป็น RNA, ssDNA หรือ dsDNA ที่เรียกว่า แอปตาเมอร์ (Aptamer) ซึ่งมีการทำงานคล้ายกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ สามารถจับกับ โมเลกุลเป้าหมายต่าง ๆ ได้อย่างจำเพาะและหลากหลายชนิด เช่น ไอออนโลหะ (Cho et al., 2015) สารพิษ (Wang et al., 2011) ไวรัส (Lautner et al., 2010) และใช้ในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม ดังรายงานของ Yan (2011) ที่คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในพืชดัดแปลงพันธุกรรม และ Jin et al. (2017) รายงานการใช้แอปตาเมอร์ ในการตรวจสอบโปรตีน Cry1Ab ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Impedimetric Microfluidic Analysis สำหรับในประเทศไทยนั้นพบว่า ได้คัดเลือกแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรค (ปัญญาวุฒิ, 2559) นอกจากนี้แอปตาเมอร์จะสามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่หลากหลายแล้ว ข้อดีอีกประการของ แอปตาเมอร์ คือ ไม่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง มีค่าใช้จ่ายน้อย และใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่าการผลิตแอนติบอดีโดยใช้เวลาประมาณ 4 เดือน ในขั้นตอนการคัดเลือกแอปตาเมอร์ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer) ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่มีชนิดดังกล่าว

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การผลิตโปรตีน recombinant CP4-EPSPS (rCP4 EPSPS)

#### 1.1 การสังเคราะห์ rcp4 epsps gene

นำข้อมูลโปรตีน CP4 EPSPS (accession No. AAL67577.1) ในถั่วเหลืองจากฐานข้อมูล GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) มาแปลงลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรหัสพันธุกรรม (codon) เหมาะสำหรับการแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยใช้โปรแกรม Reverse Translate (<http://www.bioinformatics.org/>) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Chin et al, 2014) สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cp4 epsps และเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pET-22b(+) แล้วนำพลาสมิดที่มียีน cp4 epsps สังเคราะห์ ถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารตรวจสอบโคลนที่มีชั้นยีนอยู่โดยเทคนิค colony PCR ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 สาย คือ ไพรเมอร์ T7-primer และ T7 Reverse-primer นำ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8% อะกาโรสเจล

#### 1.2 การตรวจสอบการสังเคราะห์และสกัดโปรตีน rCP4 EPSPS

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ผลิต rCP4 EPSPS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มล. เป็นเวลา 1 คืนที่ 37°C. จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มล. เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD<sub>600</sub>) เท่ากับ 0.5 จากนั้นเติม Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลลาร์

นำ crude extract ที่สกัดได้มาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA (Qiagen, Germany) เก็บสารละลายโปรตีน rCP4 EPSPS ที่ผ่านคอลัมน์ นำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD<sub>280</sub> และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

### 1.3 การตรวจสอบความคงอยู่ของอีพิโทป (epitope) บนโปรตีน rCP4 EPSPS

ใช้ชุดตรวจสอบ Roundup Ready CP4 EPSPS (Agdia, USA) ในการตรวจสอบความคงอยู่ของอีพิโทป (epitope) บนโปรตีนของ rCP4 EPSPS โดยใช้ rCP4 EPSPS เข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม เปรียบเทียบกับ crude extract จากเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้บัฟเฟอร์เป็นชุดควบคุมลบ และโปรตีน CP4 EPSPS เป็นชุดควบคุมบวก

## 2. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีน CP4 EPSPS ด้วยวิธี SELEX

### 2.1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ (DNA aptamer library)

#### การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยว

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเตรียมคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ดังนี้ 5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-(N<sub>40</sub>)TCGGATCGCTATAGTGAGTCGTATTA-3' ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ (N<sub>40</sub>) อยู่บริเวณกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ และบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์โดยวิธี PCR ดังนี้ forward primer (AptF): 5'-TTTCTGCAG-GTCGACTAATACGACTCACTATAGCG-

GA-3'; reverse primer (AptR): 5'-AAAGAAT-TCAAGCT TGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' และสังเคราะห์ไพรเมอร์ AptR-Biotin: (biotin)-5'-AAAGAATTCAAGCTTGCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3' สำหรับติด biotin ที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ การคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีน CP4-EPSPS

คัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับโปรตีน CP4 EPSPS ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ ปัญญาวุฒิ (2559) โดยนำคลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ 1 นาโนโมลลาร์ มาละลายใน Phosphate buffered saline (136 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM KCl, pH 7.4) ที่เติม 0.05% Tween-20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (PBST) ต้มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที จากนั้นเติมโปรตีน rCP4 EPSPS 1 ไมโครกรัม เขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ถ่ายลงคอลัมน์ Vivaspin 500 (GE Healthcare, Sweden) ที่มี molecular weight cut off (MWCO) 50 กิโลดาลตัน (KDa) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย PBST ปริมาตร 1 มล. หมุนเหวี่ยงเช่นเดิม เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง ละลาย aptamer-protein complex ออกจากคอลัมน์ ด้วย PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ aptamer-protein complex ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix (Promega, USA) และไพรเมอร์ AptF และ AptR มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95°C. 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95°C. 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55°C. 30 วินาที (annealing) และ

อุณหภูมิ 72°C .30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล

นำผลผลิตจาก PCR โคลนเข้ากับ pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega, USA) และถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำโคลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร 2YT ที่เติม ampicillin 100 ไมโครกรัม/มล. มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ AptF และ AptR จากนั้นคัดเลือกโคลนีเดี่ยวจำนวน 10 โคลน นำมาติด biotin ที่ปลาย 5' (DNA aptamer-) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AptR-Biotin ในการทำปฏิกิริยา และแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วย Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin (Invitrogen, Norway) ตามวิธีการของผู้ผลิต

## 2.2 การทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ต่อ CP4 EPSPS ด้วยเทคนิค indirect enzyme-linked aptamer assay (indirect ELAA)

นำดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ที่จับกับโปรตีน CP4 EPSPS จำนวน 10 โคลน จากข้อ 2.1 ไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELAA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Barthelmebse, *et al.* (2011) ใช้เมล็ดถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่มี CP4 EPSPS บดใน coating buffer pH 9.6 อัตราส่วน 1:20 เป็นแอนติเจน เคลือบลงในหลุมของถาด ELISA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ขณะที่อีกถาดเคลือบด้วยน้ำคั้นถั่วเหลืองปกติเพื่อเป็นถาดควบคุมลบ บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม. เติม DNA aptamer-biotin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม. ล้างถาด ด้วย PBST ปริมาตร 200

ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เติม AP-Streptavidin conjugate (Invitrogen, USA) เจือจาง 1:1,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม. ล้างถาด และเติม substrate buffer ที่มี p-nitrophenyl phosphate 1 มก./มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม. อ่านค่าปฏิกิริยา ที่ OD<sub>405</sub> ด้วย ELISA reader

## 2.3 การทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์

ใช้วิธี indirect ELAA เช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยเคลือบถาด ELISA ด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ Cry1Ab, Cry2A, Cry3A, Cry3Ab, Cry3Bb, Cry1F และ CP4 EPSPS (Agdia, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C. นานข้ามคืน และทำปฏิกิริยากับ DNA aptamer-biotin ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 2.2 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม.

## 3. การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ ในการทำปฏิกิริยากับ CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค indirect ELAA

ใช้วิธี indirect ELAA เช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์ที่ระดับ 50, 25 และ 12.5 นาโนกรัม/มล. ในการทำปฏิกิริยากับถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

## 4. การทดสอบการทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอมป์ตาเมอร์กับ CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค sandwich ELAA

นำตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ทำการสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานสากล; The Grain and Feed Trade Association (GAFTA) Sampling Rules No. 124 และมีการตรวจสอบด้วยวิธี Real-Time PCR ในตัวอย่างเพื่อยืนยันการมีอยู่ของยีน *cp4 epsps* จากนั้นนำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค sandwich ELAA ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lee *et al.* (2012) ทำการเคลือบถาด ELISA ด้วย capture aptamer ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C. นานข้ามคืน ล้างถาดด้วย PBST เติม Blocking buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 30 นาที ล้างถาดด้วย PBST 3 ครั้ง เติมน้ำคั้นเมล็ดถั่วเหลืองที่มี CP4 EPSPS หรือน้ำคั้นถั่วเหลืองปกติ (อัตราส่วน 1:20 ใน coating buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C. นาน 1 ชม. ล้างถาดด้วย PBST แล้วเติม detecting aptamer ที่จำเพาะต่อ CP4 EPSPS ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม/มล. ขั้นตอนต่อไปทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธี indirect ELAA ในข้อ 2.2

#### 5. การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี sandwich ELAA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

นำวิธี sandwich ELAA เช่นเดียวกับข้อ 4 โดยใช้โคลน AptRR-A5 เป็น capture aptamer และ AptRR-A3 เป็น detecting aptamer เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบ ELISAทางการค้า (Agdia, USA) ในการตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลือง จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีการตรวจสอบยีน *cp4 epsps* ด้วยวิธี Real-Time PCR แล้ว (ตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้รับความอนุเคราะห์จาก

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การผลิตโปรตีน rCP4 EPSPS

การสังเคราะห์โปรตีน rCP4 EPSPS โดยโคลนยีน *rcp4 epsps* เข้ากับพลาสมิดพาหะ pET-22b (+) และถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมเข้าในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส (Figure 1A) จากโคลน pETrCP4EPSPS แสดงว่า โคลนดังกล่าวมีพลาสมิด ลูกผสมที่มียีน *cp4 epsps* สอดแทรกอยู่เมื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชม. มีการแสดงออกของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน (Figure 1B) ซึ่งเป็นน้ำหนักรวมของโปรตีน CP4 EPSPS จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม คือ 47.6 กิโลดาลตัน (Wu *et al.*, 2012) สำหรับการสกัด rCP4 EPSPS ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA ได้โปรตีน rCP4 EPSPS ทั้งหมด 25.68 มก. จากเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นปริมาณ 1 ล. และเมื่อนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับ anti-CP4 EPSPS antibody ทางการค้า (Agdia, USA) เพื่อยืนยันความคงอยู่ของอีพิโทปพบว่า ให้ผลบวก (Figure 1C) แสดงว่า โปรตีนที่ผลิตได้ยังคงมีอีพิโทปที่เหมือนกับ CP4 EPSPS ในพืชดัดแปรพันธุกรรม จึงนำไปเป็นแอนติบอดีในการคัดเลือกดีเอ็นเอแอนติบอดีต่อไป

#### 2. การคัดเลือกดีเอ็นเอแอนติบอดีที่จับกับโปรตีน CP4 EPSPS

คัดเลือกดีเอ็นเอแอนติบอดีที่สามารถจับกับโปรตีน rCP4 EPSPS จากคลังดีเอ็นเอ

แอปตาเมอร์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับโปรตีน rCP4 EPSPS และป็นแยกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ไม่จับกับโปรตีนออกโดยใช้ Vivaspin 500 เนื่องจากดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จับกับ rCP4 EPSPS มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 74 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า MWCO ของ Vivaspin และยังคงอยู่ในหลอด จากนั้นนำ aptamer- rCP4 EPSPS complex ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ aptF และ aptR และเชื่อมต่อกับ pGEM-T Vector คัดเลือกโคลนีเดี่ยวได้ 10 โคลนี เพื่อนำไปพ่วงกับ Biotin ด้วยปฏิกิริยา PCR (DNA aptamer-biotin) ซึ่งทั้ง 10 โคลนี สามารถจับกับโปรตีน CP4 EPSPS ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมได้ โดยมีค่า S/N ration อยู่ในช่วง 1.14-1.36 จึงเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน AptRR-A3 และ AptRR-A5 ซึ่งมีค่า S/N ratio เท่ากับ 1.36 และ 1.25 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

### 3. การทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์

การทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์โคลน AptRR-A3 และ AptRR-A5 ด้วยเทคนิค indirect ELAA พบว่า ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทั้ง 2 โคลน ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีน CP4 EPSPS (Figure 2) เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณลุ่มมีความแตกต่างกัน (Figure 3A) จึงทำให้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ มีโครงสร้างตติยภูมิ (Figure 3B) ที่ประกอบด้วย loop และ hairpin ที่แตกต่างกัน

ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการจับกับโปรตีนเป้าหมาย

### 4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ในการทำปฏิกิริยากับ CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค indirect ELAA

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ โคลน AptRR-A3 และ AptRR-A5 ในการทำปฏิกิริยากับ CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค indirect ELAA พบว่า ที่ความเข้มข้น 12.5 นาโนกรัม/มล. ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ทุกโคลน ให้ค่า S/N ratio อยู่ในช่วง 1.42 - 1.56 ซึ่งสูงกว่าการใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ที่ความเข้มข้น 50 และ 25 นาโนกรัม/มล. จึงเลือกใช้ AptRR-A3 ที่ความเข้มข้น 12.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในการตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมต่อไป (Figure 4A)

### 5. การทำปฏิกิริยาของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์กับ CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค sandwich ELAA

เมื่อใช้ AptRR-A3 เป็น detecting aptamer ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอแอปตาเมอร์จากแต่ละโคลนเป็น capture aptamer ได้ค่า S/N ratio มากกว่า 1.0 (1.33-1.64) แต่เมื่อใช้ AptRR-A5 เป็น capture aptamer และ AptRR-A3 เป็น detecting aptamer ได้ค่า S/N ratio สูงที่สุด คือ 1.64 (Figure 4B)

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี sandwich ELAA เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี sandwich ELAA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบทางการค้า (Agdia ELISA kit) โดยใช้ตัวอย่าง

ถั่วเหลือง จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันทุกตัวอย่าง (Table 1) แต่วิธี sandwich ELAA ที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการยังคงมีค่า S/N ratio ต่ำเมื่อเทียบกับค่า S/N ratio ของชุดตรวจสอบทางการค้าที่มีค่าถึง 13 เมื่อตรวจสอบตัวอย่างเดียวกัน

**Table 1** Comparison of the specificity of the in-house sandwich ELAA and the commercial ELISA kit for the detection of three soybean samples

Sample	Commercial ELISA (S/N ratio)	In-house Sandwich ELAA (S/N ratio)
Soybean 1	1.00	-
Soybean 2	17.30	2.09
Soybean 3	17.07	1.84
Soybean (positive control)	13.00	1.63

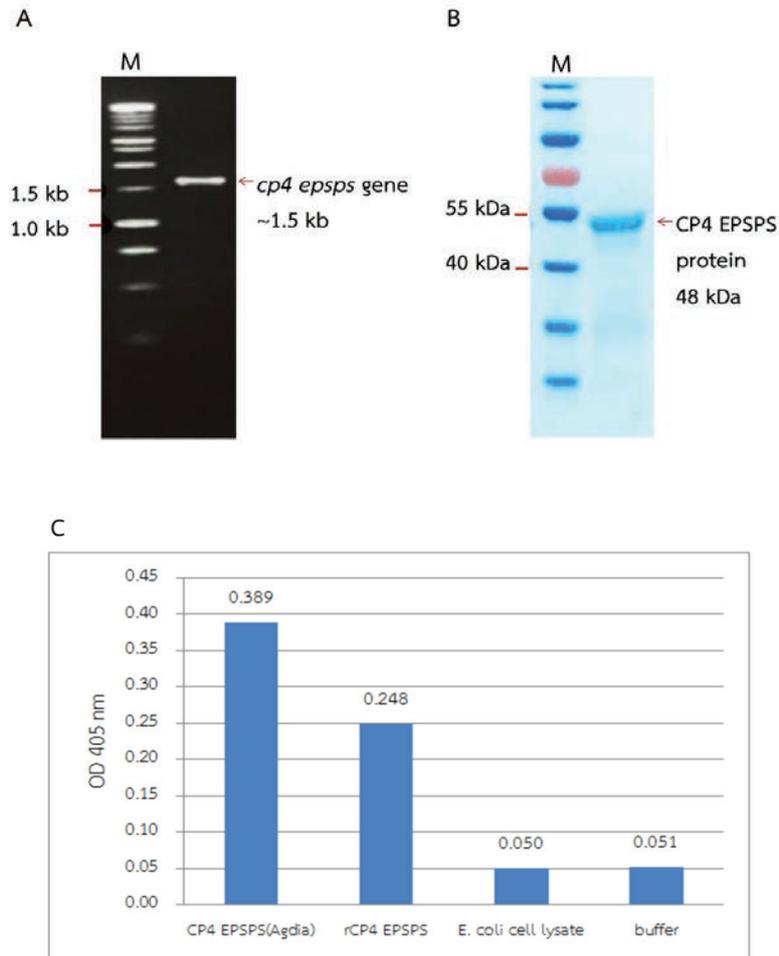
### สรุปผลการทดลอง

แอปตาเจนที่เตรียมได้จากการนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP4 EPSPS จากถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมที่รายงานไว้ใน Genbank มาตัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีโคดอนที่เหมาะสมกับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย พบว่า โปรตีนลูกผสม rCP4 EPSPS ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ แสดงว่ายังคงมีอีพิโทปที่เหมือนกับ CP4 EPSPS จากถั่วเหลืองอยู่ คลังดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยนี้เป็น ดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาด 86 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งบริเวณส่วนกลางของดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ เป็นนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 40 เมอร์ ทำการแยกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่สามารถจับกับโปรตีนลูกผสม rCP4 EPSPS ได้ 10 โคลนี นำไปตัดฉลากด้วย Biotin โดยใช้ปฏิกิริยา PCR (DNA aptamer-biotin) แล้วคัดเลือกดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีน CP4 EPSPS ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี indirect ELAA โดยทดสอบกับน้ำคั้นของเมล็ด

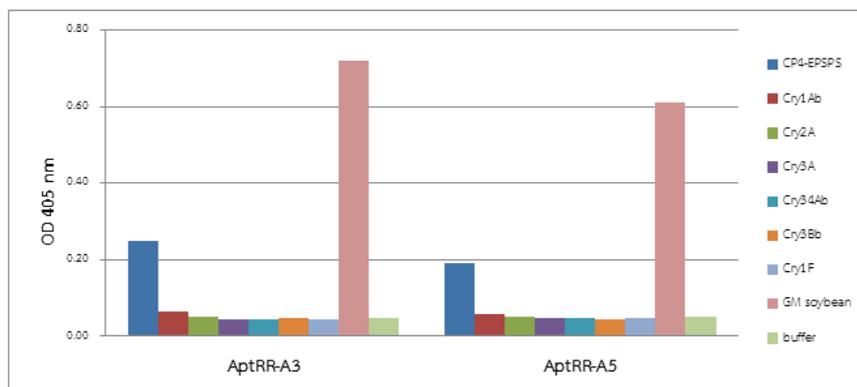
ถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม พบว่า โคลน AptRR-A3 และ AptRR-A5 มีค่า S/N ratio ของปฏิกิริยาสูงสุดคือ 1.36 และ 1.25 ตามลำดับ เมื่อนำดีเอ็นเอแอปตาเมอร์ ทั้ง 2 โคลน มาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบแบบ indirect ELAA และ sandwich ELAA พบว่า วิธี sandwich ELAA ที่ใช้ AptRR-A5 เป็น capture aptamer และใช้ AptRR-A3 เป็น detecting aptamer ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด คือ 1.64 และสามารถตรวจสอบโปรตีน CP4 EPSPS ในถั่วเหลืองให้ผลสอดคล้องกับชุดตรวจสอบทางการค้า

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา



**Figure 1** Expression of *cp4 epsps* gene in *E. coli* (BL21). (A) Gel electrophoresis of 1.5 kb PCR product from pETrCP4EPSPS clone, (B) the SDS-PAGE analysis of the purified rCP4 EPSPS protein of 48 kDa and (C) the antigenicity of the rCP4 EPSPS was confirmed by ELISA using anti-CP4 EPSPS antibody (Agdia) compared with the negative control (*E. coli* cell lysate) and the positive control (CP4 EPSPS protein, Agdia)



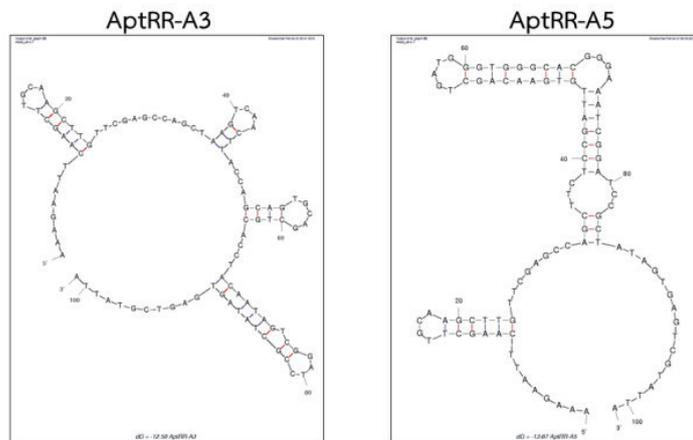
**Figure 2** Binding affinity of 2 aptamers; AptRR-A3 and AptRR-A5, for CP4-EPSPS in GM soybean

A

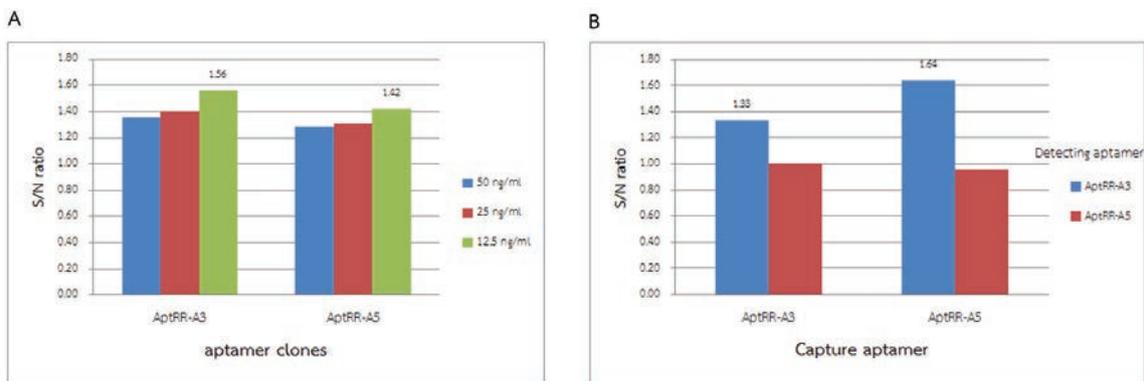
```

>AptRR-A3
Biotin-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTTCGAGCCAGCTAAGTCAACTTACCAGCAGTGCAGCTGCACCTACAATAGTCGGATCCGCTATAGTGAGTCGTATTA
>AptRR-A5
Biotin-AAAGAATTCAAGCTTGAAGCTTGTTTCGAGCCAGCTTCTCCGATTGTGAACAGCTGATGGGTGGGCACGGGAAATCGGATCCGCTATAGTGAGTCGTATTA
  
```

B



**Figure 3** (A) Sequence and (B) secondary structures of AptRR-A3 and AptRR-A5 predicted by Mfold web server (<http://mfold.rna.albany.edu/?=mfold>)



**Figure 4** The binding efficiency of DNA aptamers AptRR-A3 and AptRR-A5 to CP4 EPSPS protein in GM soybean; (A) the test results from indirect ELISA and (B) the test results from sandwich ELISA

กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและขอขอบคุณ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านการผลิตดีเอ็นเอแอปตาเมอร์

### เอกสารอ้างอิง

ปัญญาวุฒิ อัมพูชนินทร์. 2559. *ไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทยและการคัดเลือก Aptamer ที่จำเพาะเพื่อการตรวจสอบโรค*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 103 หน้า.

Barthelmebs, L., J. Jonca, A. Hayat, B. P. Simon and J. L. Marty. 2011. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* 22: 737-743.

Chin, J. X., B. K. S. Chung and D. Y. Lee. 2014. Codon optimization online (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. *Bioinformatics* 30(15): 2210–2212.

Cho, Y. S., E. J. Lee, G. H. Lee and S. S. Hah. 2015. Aptamer selection for shing of palladium ion using graphene oxide-adsorbed nanoparticles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(23): 5536–5539.

ISAAA. 2016. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016*. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, New York.

Jin, S., Z. Ye, Y. Wang and Y. Ying. 2017. A novel impedimetric microfluidic analysis system for transgenic protein Cry1Ab detection. *Sci. Rep.* 7: 43175.

Lautner, G., Z. Balogh, V. Bardczy, T. Mszros and R. E. Gyurcsnyi. 2010. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst* 135(5): 918–926.

Lee, S. J., J. W. Park, I. A. Kim, B. S. Youn and M. B. Gu. 2012. Sensitive detection of adipokines for early diagnosis of type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) assays. *Sens. Actuators B Chem.* 168: 243-248.

Randhawa, G., M. Singh and P. Sood. 2016. DNA-based methods for detection of genetically modied events in food and supply chain. *Curr. Sci.* 110: 1000-1009.

Waminal, N., K. H. Ryu, S. H. Choi and H. H. Kim. 2013. Randomly detected genetically modied (GM) maize (*Zea mays* L.) near a transport route revealed a fragile 45S rDNA phenotype. *PLoS one.* 8: e74060.

- Wang, L., W. Ma, W. Chen, L. Liu and Y. Zhu. 2011. An aptamer-based chromatographic strip assay for sensitive toxin semi-quantitative detection. *Biosens. Bioelectron.* 26: 3059–3062.
- Wu, H., Zhang, Y., Zhu, C., Xiao, X., Zhou, X., Xu, W. Shen and M. Huang. 2012. Presence of CP4-EPSPS component in Roundup Ready soybean-derived food products. *Int. J. Mol. Sci.* 13(2): 1919–1932.
- Yan, L. C. 2011. *Screening and affinity analysis of the aptamers against the CP4-EPSPS transgenic protein*. Master's thesis. Fujian Agriculture and Forestry University, China.