บทนำ

ความเป็นมา

สารพิษที่ปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมการเกษตรของประเทศ และสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมโดยรวม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีที่จะตรวจสอบการปนเปื้อนเหล่านี้ เพื่อป้องกันไม่ให้มีผลผลิตที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และมีแต่เฉพาะผลผลิตที่มีคุณภาพมาตรฐาน เหมาะสมต่อการบริโภคทั้งในประเทศ และเพื่อการส่งออก

สารพิษที่ปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรนั้นส่วนใหญ่เป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก ซึ่งได้แก่สารในกลุ่ม ยาฆ่าเชื้อราและแมลง (pesticides) สารป้องกันการเน่าบูด (food preservative) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ในทางภูมิคุ้มกันวิทยา อาจเรียกสารประกอบเหล่านี้ว่าเป็น haptens (Janeway et al., 2005) วิธีการหลักที่ใช้ในการตรวจสอบและวิเคราะห์สารปนเปื้อนเหล่านี้มี 2 วิธีคือ ทางกายภาพและเคมี และทางชีวภาพ (International, 2006) วิธีการทางกายภาพและเคมีนั้นสามารถทำการวิเคราะห์ได้อย่างแน่นอนและแม่นยำทั้งในทางปริมาณและคุณภาพ (qualitative and quantitative) และเป็นที่ยอมรับตามระเบียบมาตรฐานสากล โดยใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยการคัดแยกผ่านตัวกลาง (chromatography) เช่น HPLC (High Performance Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography), และ TCL (Thin Layer chromatography) การตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลด้วยเครื่อง mass spectrometry หรือใช้หลักการทำปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะเจาะจง เช่น การทำปฏิกิริยากับ functional group ของ antibiotics, hormones, และสารพิษจากเชื้อราบางชนิด (Anderson, 1999; International, 2006; Oka et al., 1995) ข้อจำกัดของวิธีทางกายภาพเหล่านี้คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เพราะต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีความสลับซับซ้อน ราคาแพง รวมทั้งต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญ และในหลายกรณีต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างสารเพื่อการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมต่อการใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตามแหล่งประกอบการทางการเกษตรโดยทั่วไป วิธีการอีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนทางการเกษตรคือการใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) ซึ่งเป็นการใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ในการตรวจสอบ (Schneider et al., 2004; van Amerongen et al., 2005; Zheng et al., 2006) วิธีการนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องการใช้เครื่องมือที่มีความยุ่งยาก และยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย เหมาะแก่การใช้ในการตรวจสอบเพื่อควบคุมคุณภาพผลผลิตจำนวนมากในแหล่งประกอบการต่างๆ หลักการสำคัญที่จะต้องใช้ในการตรวจสอบแบบ ELISA นี้คือ จะต้องมีสารแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงและสามารถจับได้ดีกับสารที่ต้องการตรวจสอบ ในปัจจุบันสามารถเตรียมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงเหล่านี้ได้จากการฉีดสารพิษโมเลกุลเล็กที่ถูกเชื่อมกับโปรตีนนำส่งเช่น BSA (bovine serum albumin) (BSA-conjugated haptens) เข้าไปในสัตว์เช่น แกะ, กระต่าย, หนู เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เหล่านี้ให้สร้าง antibody ต่อ hapten จากนั้นจึงทำการสกัดแยก polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ hapten นั้นๆ ออกมาจาก serum หรือนำมาเข้าสู่กระบวนการทางชีววิทยาเพื่อสร้างเป็น monoclonal antibody ต่อไป (Abbas et al., 2005; Janeway et al., 2005) ในกรณีของการผลิตเป็น polyclonal antibody นั้นมีข้อดีคือ มักจะได้ antibody ที่มีความสามารถในการจับกับ haptens ได้อย่างดีและเฉพาะเจาะจง สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบที่มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสูง และใช้ได้ทั้งการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือวิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และมีปริมาณจำกัด เมื่อใช้หมดแล้วจะต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองใหม่ แต่เนื่องจากในการฉีดกระตุ้นสัตว์แต่ละครั้งนั้นจะผลิตได้เป็น polyclonal antibody ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง (lot) จึงทำให้ต้องเสียเวลาทำการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อในการใช้เป็นสารตรวจสอบใหม่ รวมทั้งอาจทำให้มาตรฐานของชุดตรวจสอบแต่ละ lot ไม่เท่ากัน นอกจากนั้นแล้วยังทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตชุดตรวจสอบต่อหน่วยสูงด้วย ส่วนวิธีการที่ใช้ monoclonal antibody เป็นตัวตรวจสอบนั้นมีข้อดีคือ monoclonal antibody ที่สร้างขึ้นมาได้นั้นสามารถนำมาผลิตได้โดยไม่จำกัด โดยไม่จำเป็นต้องทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองอีก แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ มักได้ antibody ที่ไม่มี

ความจำเพาะเจาะจงสูงและจับได้ดีเพียงพอ โดยเฉพาะในกรณีที่สารที่ต้องการตรวจสอบเป็น haptens คือ มีขนาดโมโลกุลเล็ก นอกจากนั้นแล้ววิธีการในการผลิตให้ได้เป็น monoclonal antibody นั้นยังมีความยุ่งยากมากและต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง เพราะต้องเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงหนูทดลอง และเซลล์ของสัตว์ในสภาวะปลอดเชื้อที่ต้องใช้สารเคมีและครุภัณฑ์ที่มีราคาแพง

วิธีการใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต antibody คือการใช้เทคโนโลยีฟาจ (phage display technology) (Smothers et al., 2002) เพราะสามารถใช้ในการสร้าง antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและจับได้ดีกับสารหลายประเภท ภายในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถผลิตได้ไม่จำกัดโดยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการผลิต monoclonal antibody มาก เพราะใช้หลักการบ่มแบคทีเรียในถังหมักแล้วทำการสกัดให้บริสุทธิ์เหมือนการผลิต recombinant protein โดยทั่วไป ดังนั้นจึงมีการคาดการณ์ว่าในอนาคตเทคโนโลยีนี้จะเข้ามาทดแทนวิธีการผลิต antibody แบบดั้งเดิมทั้งสองแบบที่กล่าวมาข้างต้น (Hoogenboom et al., 1998; Laurino et al., 1999; McCafferty et al., 1990; Rapley, 1995) อย่างไรก็ตามถึงแม้ในระยะยาวจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ต่อสารปนเปื้อนทางการเกษตรชนิดต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัด แต่ในขั้นต้นนั้นจะต้องมีการจัดตั้งห้องปฏิบัติการวิจัยที่มีประสิทธิภาพและมีความชำนาญในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ รวมทั้งจะต้องมีคลังของฟาจที่มีคุณภาพดี เพื่อใช้เป็นแหล่งในการคัดหา antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารพิษต่างๆได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการคัดหา antibody ต่อสารพิษจำพวก haptens ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Persson et al., 2006) ซึ่งยากต่อการคัดหา antibody ที่มีความเจาะจงและมีความสามารถในการจับที่ดี อย่างไรก็ตามเมื่อสามารถพัฒนาคลังของฟาจและวิธีการคัดหาและตรวจสอบคุณลักษะของ antibody ที่มีประสิทธิภาพแล้ว ในระยะยาวจะสามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิต antibody ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาให้เป็นชุดตรวจสอบสารปนเปื้อนทางการเกษตรที่มีความสำคัญที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป รวมทั้งยังอาจพัฒนาเป็น antibody เพื่อใช้ในการรักษาภาวะผิดปกติที่เกิดจากผลของสารพิษ (anti-dote, therapeutic antibody) (Humphreys and Glover, 2001) หรือพัฒนาเป็น biosensors ได้ด้วย (Krska et al., 2005)

วัตถุประสงค์

เพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการผลิตตัวตรวจสอบที่มีความไว และราคาถูก เพื่อใช้ในการตรวจสอบ อะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนทางการเกษตรที่เป็นสารโมเลกุลเล็ก (hapten) เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนามาตราฐานสินค้าเกษตรให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเพื่อการส่งออก แบ่งเป็นหัวข้อย่อยได้ดังนี้

1 เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีฟาจในการคัดหา antibody ต่อ hapten (Aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ปนเปื้อนผลิตผลทางการเกษตร
2 เพื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ antibody ชนิด ScFv ที่มีความสามารถในการจับกับ hapten ได้อย่างเฉพาะเจาะจง
3 เพื่อผลิต antibody ต้นแบบที่สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษทางการเกษตรได้ต่อไป