รหัสโครงการ : RDG4530022

ชื่อโครงการ : การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA KIT ต้นแบบเพื่อตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

ชื่อนักวิจัย : วิเชียร ยงมานิตชัย[1], สุวรรณา กลัดพันธุ์[2]
[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
[2]สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2545 – มิถุนายน 2547

บทคัดย่อ

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งต่อไป สารพิษนี้สร้างโดยบางสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหน้าแล้ง *Microcystis* จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและหนาแน่นมองเห็นเป็นชั้นสีเขียวบนผิวน้ำ วิธีการวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่มีความไวสูง สามารถใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามได้ เพื่อใช้เป็นเฝ้าระวังและเป็นระบบเตือนภัยสำหรับเกษตรกรและสัตว์เลี้ยงที่ต้องอาศัยแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินจาก *Microcystis aeruginosa* ทั้งหมด 66 สายพันธุ์ ที่ได้จาก ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 54 สายพันธุ์ และที่คัดแยกเพิ่มเติมจากแหล่งน้ำภาคตะวันออกและภาคใต้ อีก 12 สายพันธุ์ พบว่าสารพิษส่วนใหญ่ ประกอบด้วย MCYST-RR และพบ MCYST-LR และ MCYST-YR โดยสายพันธุ์ M50058 มีการสะสม MCYST-RR มากที่สุด จึงได้คัดเลือกไว้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษ สำหรับใช้เป็น antigen ในผลิต polyclonal antibody ต่อไป นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ M50020 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ เพื่อทดสอบสภาวะที่อาจเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารพิษ

จากการศึกษาเพื่อปรับปรุงสูตรอาหาร MA ได้ดัดแปลงให้มีส่วนประกอบดังนี้ $Ca(NO_3)_2$ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, KNO_3 150 มิลลิกรัมต่อลิตร, $NaNO_3$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, β-sodium-glycerophosphate 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Bicine 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนประกอบของแร่ธาตุอื่นๆนั้นคงเดิม สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษไมโครซิสติน *M.*

aeruginosa สายพันธุ์ M50058 ได้แก่ pH เริ่มต้นที่ 9.2 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำรับการเจริญ และ 25 องศาเซลเซียส สำหรับการสร้างสารพิษ ความเข้มแสงที่ 250 - 300 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีและพบว่าไม่สามารถเหนี่ยวนำให้สายพันธุ์ M50020 สร้างสารพิษในห้องทดลอง

จากการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ในการเจริญ และการผลิตสารพิษไมโครซิสตินของ *Microcystis aeruginosa* สายพันธ์ M50058 ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA และ modified MA สรุปได้ว่า M50058 สามารถเจริญและผลิตสารพิษไมโครซิสตินในอาหาร modified MA ได้ดีกว่าในอาหาร MA สูตรเดิม โดยได้สารพิษที่ประกอบด้วย MCYST–RR 2.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง MCYST–YR 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ MCYST–LR 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญในห้องปฏิบัติการของ *Microcystis* ยังต่ำมาก ทำให้การผลิตสารพิษไมโครซิสตินต้องใช้ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติ จึงทำให้สามารถผลิต MCYST-RR ได้ในปริมาณมากและสามารถผลิตสารพิษที่มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการเตรียมเป็น antigen เพื่อการผลิตแอนติซีรัม

ในการเตรียม antiserum จากไมโครซิสตินได้เลือก antigen ที่เตรียมจาก protein carrier ชนิด cBSA หรือ BSA จำนวน 20 มิลลิกรัม เชื่อมเข้ากับ MCYST-RR จำนวน 10 มิลลิกรัม โดยการเชื่อมใช้วิธี water-soluble carbodiimide (EDPC) ใช้สารจำนวน 600 มิลลิกรัม และการใช้ 10%EDA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมกับการวิธีการที่จะนำไปเชื่อมกับ MCYST-RR ได้ ทั้งนี้การเตรียม protein carrier- cBSA ได้ทดลองยืนยันแล้วว่า protein carrier ได้มีการเชื่อมโมเลกุลกับ MCYST-RR แล้วจริง ด้วยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 238 และ 278 nm ซึ่ง immungen ที่เตรียมได้จะนำไปฉีดกระตุ้นเข้าสัตว์ทดลองต่อไป ซึ่งพบว่าแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติเจนที่ใช้ MCYST-RR 10 มิลลิกรัม จากการทดสอบหาค่าไตเตอร์ที่ได้จากกระต่ายแต่ละตัวพบ กระต่ายบางตัวมีค่าไตเตอร์สูงกว่า 100,000 และยังให้ผลในการทำปฏิกิริยากับ free MCYST-RR ได้สูงด้วย

ในการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง % of binding ($\%B/B_0$) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน MCYST-RR ที่มีความเข้มข้น 0.2-20 ppb ได้ค่า correlation (R^2 = 0.9889) และพบว่าความเข้มข้นของ MCYST-RR ตั้งแต่ 0.5 ppb ขึ้นไปสามารถมองเห็นความแตกต่างของสีได้ด้วยตาเปล่า นั่นแสดงว่าระดับความไวนี้สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้โดยไม่ต้องการเครื่องตรวจวัด ELISA Reader

สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity) กับสารพิษมาตรฐานไมโครซิสตินชนิดอื่น ได้แก่ MCYST-YR และ MCYST-LR โดยการเทียบกับ MCYST-RR พบว่า MCYST-RR ได้ค่า correlation (R^2=0.9911) และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=66.005e^{-0.5355x}$ ส่วน MCYST-YR และ MCYST-LR ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9792 และ 0.9771 ตามลำดับ และได้สมการเชิงเส้นแบบเอกโพเนนเชียล คือ $y=68.292e^{-0.5186x}$ และ $y=66.115e^{-0.5072x}$ ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีต่อสารพิษมาตรฐาน MCYST-YR ได้ 86.3% และ 94.2%

สำหรับสารพิษ MCYST-LR ทำให้การใช้วิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในแหล่งน้ำได้

ในการทดลองเพื่อหา %recovery ในน้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น และน้ำประปา โดยการเติมสารพิษมาตรฐาน MCYST-RR ลงไป ในอัตรา 0.5, 1, 5 และ 10 ppb แล้วทดสอบด้วยวิธี direct competitive ELISA พบว่า %recovery ของน้ำกลั่นเท่ากับ 96.67, 90.73, 98.6 และ 89.2% ในส่วนของน้ำประปาได้เท่ากับ 92.0, 85.0, 102.3, 88.7 และ 85.1% ตามลำดับ

จากการทดสอบหา limit of detection (LOD) โดยการเติมสารพิษ MCYST-RR 0.2 ppb ลงในน้ำกลั่น น้ำประปา และน้ำบ่อธรรมชาติ แล้วทำการตรวจวัดปริมาณสารพิษด้วยวิธี direct competitive ELISA ได้ค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ได้เติมลงไปนั่นแสดงว่า วิธีการนี้ให้ผลในการตรวจวัดได้ค่อนข้างแม่นยำ ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb เมื่อวัดด้วย ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb

ซึ่งจากผลสำเร็จของโครงการ จึงควรจะทำการผลิตชุดตรวจสอบนี้ในเชิงพาณิชย์ เพื่อนำไปใช้ในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและดูแลคุณภาพน้ำ เช่น การประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค การไฟฟ้าฝ่ายผลิต และกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เป็นต้น อย่างไรก็ตามควรจะมีการวิจัยต่อเนื่องเพิ่มอีกเล็กน้อยในด้านปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบอีไลซา ไมโครซิสติน โพลีโคนอลแอนติบอดี ประเทศไทย

Project Code : RDG4530022

Project Title : Development of ELISA Kit Prototype for Rapid Detection of Microcystin in Water

Investigators : Yongmanitchai W.[1] and Cladpan S.[2]

[1]Faculty of Science, Kasetsart University

[2]Research and Development Institute, Kasetsart University

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

Project Duration : July 2002 – June 2004

Abstract

Microcystin is a highly toxic hepta-cyclic peptide affects liver tissue, tumor promoter and leads to liver cancer. It is produced by most strains of a cyanobacterium in the genus *Microcystis*. They are commonly found in reservoirs all over the kingdom, particularly in dry season. *Microcystis* blooms is recognized by scum of cells on the surface of water. The toxin is usually analyzed by HPLC which is not adequately sensitive at the safe limit recommended by World Health Organization. This project is aiming at developing the prototype of an ELISA kit for detection of microcystin in water. The technique is very sensitive at very low microcystin concentration and can be used at site without any special equipment. Therefore, the kit can be used to monitor and warning system of danger from this toxin for farmers and their livestocks.

Analysis of microcystin content in 66 strains of *Microcystis aeruginosa*, including 54 strains from the collection at the Bioresource Laboratory, Department of Microbiology, Kasetsart University and 12 newly isolates from reservoirs in the Eastern and Southern regions revealed that MCYST-RR was the major toxin while MCYST-LR and MCYST-YR were minor variants. The strain M50058 accumulated largest amounts of MCYST-RR, therefore it was selected for further studies on growth and toxin production which would be used as antigen for polyclonal antibody production. In addition a non-toxic strain, M50020 was chosen for induction of microcystin in laboratory conditions.

Studies on modification of MA culture medium showed that the optimal concentrations of some ingredients should be adjusted, i.e. $Ca(NO_3)_2$ 50 mg/L, KNO_3 150

mg/L, $NaNO_3$ 10 mg/L, β-sodium-glycerophosphate 150 mg/L and Bicine 300 mg/L. Other compounds in the medium remained unchanged. Optimal conditions for growth and toxin production of M50058 were initial pH at 9.2, temperature at 35°C for growth and 25°C for toxin production and light intensity at 250-300 $\mu E/m^2/s$. It is also found that toxin production by the strain M50020 was not inducible under laboratory conditions.

Comparison on kinetics growth and toxin accumulation showed that *Microcystis aeruginosa* strain M50058 grew and produced toxin better in modified MA medium as compare to the original formulae. Toxin yields consisted of MCYST–RR, MCYST–LR and MCYST–YR at 2.22, 0.18 and 0.24 mg/g dry weight. However, it should be noted that growth rate of *Microcystis* in the laboratory was still very low, as well as the amounts of toxin obtained. Therefore, to attain sufficient MCYST-RR for use as antigen at milligrams level, biomass of *Microcystis* was collected from blooming reservoirs for toxin extraction and purification.

Preparation of antiserum from microcystin was done by using antigen obtained from conjugating 20 mg cBSA or BSA to 10 and 15 mg. Conjugation was performed using 600 mg of water-soluble carbodiimide (EDPC) and 1 ml of 10%EDA. Before selecting protein carrier, it was confirmed that cBSA attached to MCYST-RR by comparing changes of absorbance at 238 and 278 nm. The immunogen obtained will be used later for immunization to experimental animals (New Zealand white rabbit). Antibodies reacted well with antigen prepared from 10 mg MCYST-RR by observing titer values which showed that several animals gave the titer higher than 100,000 and also reacted very well with free microcystin.

The relationship between % of binding ($\%B/B_0$) and standard MCYST-RR at various concentrations from 0.2 – 20 ppb yielded very high correlation coefficient ($R^2 = 0.9889$). It is also noted that changes of color could be noticed by naked eye at MCYST-RR concentrations higher than 0.5 ppb which indicated that the sensitivity was sufficiently high to be used in field applications without the needs of ELISA Reader.

Tests on cross reactivity of the antibody with other variants of microcystins, i.e., MCYST-YR and MCYST-LR as compare to MCYST-RR revealed that MCYST-RR gave R^2 at 0.9911 and exponential correlation with the equation of $y=66.005e^{-0.5355x}$. On the other hand, MCYST-YR and MCYST-LR yields R^2 at 0.9792 and 0.9771, respectively which resulted in the correlation equations of $y=68.292e^{-0.5186x}$ and $y=66.115e^{-0.5072x}$, respectively. In conclusion the cross reactivities of antibody to standard MCYST-YR and MCYST-LR

were at 86.3% and 94.2%, respectively suggested that this method could be used effectively for determining total microcystin content of water.

Recovery rates of MYCST-RR at the concentrations of 0.5, 1, 5 และ 10 ppb in distilled water and tap water resulted in surprisingly high values of 96.67, 90.73, 98.6, 89.2% and 92.0, 85.0, 102.3, 88.7, 85.1%, respectively. In addition, determination of limit of detection (LOD) using direct competitive ELISA techniques by spiking 0.2 ppb of standard microcystin in distilled water, tap water and natural pond water revealed the detection values close to the actual amounts and indicated the accuracy while HPLC technique could not detect the toxin at all.

From the results of the above experiments, prototype of an ELISA kit for detection of microcystin in water was successfully developed. The kit could detect toxin at the level as low as 0.2 ppb (by ELISA Reader) or at the level of 0.5 ppb (by naked eye). Both levels were far below safety limit recommended by World Health Organization at 1 ppb.

From the success in development of the kit, commercial production of this kit should be implemented. The product can be used by several organizations that involve in production and monitoring of water quality, for example, Metropolitan Waterwork Authority, Provincial Waterwork Authority, Electric Generating Authority of Thailand and Ministry of Natural Resources and Environment. However, further research on factors affecting efficiency, accuracy and limitation of the kit should be carried out.

Keywords : ELISA Kit, Microcystin, polyclonal antibody, Thailand