รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162

(ภาษาอังกฤษ) Validation method for GM corn events Mon 88017, Mon 89034, MIR604 and MIR162

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้างานวิจัย
นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย
นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ผู้ร่วมงานวิจัย

5. บทคัดย่อ

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 เชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยวิธีมาตรฐาน JRC-EURL ดำเนินการระหว่างปี 2556-2558 ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม อาคารปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ สกัดดีเอ็นเอด้วย GeneScan Extraction buffer นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Wizard Miniprep DNA Purification วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 40 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LightCycler480 ตรวจความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สำหรับแต่ละกรณี และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเทียบกับยีนอ้างอิงพืชโดยไพรเมอร์ Adh1 หรือ hmg ตามกรรมวิธีมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์การเจือปน ผลการทดสอบพบว่าการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพแต่ละคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะในการตรวจยีน Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162 ที่ LOD 0.1% การวิเคราะห์ค่าการทวนซ้ำของวิธี (repeatability) อยู่ในค่ามาตรฐาน RSdr < 0.5 ค่า Slope การทดสอบอยู่ในค่ามาตรฐาน คือ -3.2 ถึง -3.6 ทั้ง target gene และ reference gene ค่า R^2 coefficient สูงกว่า 0.98 ค่าความเที่ยงตรง (Trueness) พบว่ามีบางความเข้มข้นของตัวอย่างวิเคราะห์ได้เปอร์เซ็นต์ค่าความเบี่ยงเบน (bias) สูงกว่ามาตรฐานโดยเฉพาะข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR162 ซึ่งไม่มีค่าอ้างอิงมาตรฐานการ

เจือปน และมีความผิดพลาดการเจือจางให้ตัวอย่างมียีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ ซึ่งไม่สามารถใช้วัสดุอ้างอิงที่ไม่มีการรับรองค่าการปนเปื้อนใช้เทียบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้จึงสามารถใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพเท่านั้น

6. คำนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม มีการวิจัยพัฒนาและอนุญาตปลูกในเชิงการค้าในหลายประเทศ ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นยีนเดี่ยว (single gene) และยีนผสม (stack trait) ปัจจุบันได้รับการอนุญาตจำนวนกว่า 120 กรณี (events) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR 604 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทซินเจนทา เพื่อให้มีคุณสมบัติต้านทานจำเพาะต่อหนอนเจาะราก (Rootworm) ที่เป็นปัญหาแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อข้าวโพดในประเทศแถบยุโรป โดยโปรตีนจากยีนดังกล่าวไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย MIR604 เป็นยีน (trait) ที่ได้รับการรับรองให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ได้เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ และคน สำหรับประเทศในสหภาพยุโรปในปี 1999 (2542) มีชื่อการค้าเป็น Syngenta Agrisure™ RW โดยการโคลนยีนในตระกูล *Cry* ชื่อยีน *mCry3a* gene จากแบคทีเรีย *Bacillus turingenesis* (Bt) แปรรหัสโปรตีน Cry3a บริเวณรากของข้าวโพด โดยใส่ marker gene mpi จากแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งสามารถย่อยน้ำตาลแมนโนสได้ สามารถคัดเลือกได้โดยทดสอบการเจริญบนอาหารที่ผสมน้ำตาลดังกล่าวข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR604 ได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นอาหารสัตว์ อาหารคน ในหลายประเทศได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่นและการรับรองให้นำเข้าได้ในหลายประเทศ ได้แก่ เม็กซิโก ไต้หวัน เกาหลี จีน ฟิลิปปินส์ รัสเซีย ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR604 ห้องปฏิบัติการของ JRC-EC ได้ทำการพัฒนาวิธีการและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เสร็จสิ้นแล้วในปี 2007 (Mazzara et al. 2007)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MON 88017 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ สหรัฐอเมริกา โดยการพัฒนาให้เป็น stack traits โดยการตัดต่อยีนต้านทานแมลง *cry*3Bb1 จาก *Bacillus thuringiensis* (Bt) subspecies *kumamotoensis* แปรรหัสโปรตีน Cry3Bb ซึ่งจะเป็นพิษต่อตัวอ่อนของแมลงที่กินเข้าไป มีผลในการป้องกันแมลง western corn rootworm (*Diabrotica vigifera*) และ northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) และยีน *cp4 epsps* ที่ตัดต่อยีนเข้าไปเพื่อให้ข้าวโพดมีคุณสมบัติทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท โดยการถ่ายยีนสู่ข้าวโพดลูกผสมสายพันธุ์ LH198 โดยแบคทีเรียอโกรแบคทีเรีย ได้รับการรับรองแล้วในหลายประเทศ ตั้งแต่ปี 2005-2009 ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา จีน สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี เม็กซิโก ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ event-specific gene ในเชิงปริมาณ มีวิธีการตามมาตรฐาน JRC48920 (Delobel et al. 2008)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MON 89034 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ สหรัฐอเมริกา โดยแปรรหัสโปรตีน 2 ชนิด จากยีน *cry1A.105* และยีน *cry2Ab2* จากแบคทีเรีย Bacillus *thuringiensis* มีคุณสมบัติต้านทานต่อหนอน lepidopteran เช่น fall armyworm (*Spodoptera* sp.), black cutworm (*Agrotis ipsilon*), european corn borer (*Ostrinia nubilalis*) และ the corn earworm (*Helicoverpa*

zea) ได้รับการรับรอง trait ในหลายประเทศ ตั้งแต่ปี 2007-2009 ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย บราซิล แคนาดา โคลัมเบีย สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ event-specific gene ในเชิงปริมาณ มีวิธีการตามมาตรฐาน JRC48921 (Savini et al. 2008)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR 162 พัฒนาขึ้นโดยบริษัท ซินเจนทา โดยการถ่ายฝากยีน *vip*3Aa20 จาก *B. thuringiensis* strain AB88 เพื่อสร้างโปรตีน vip3Aa ที่เป็นพิษต่อหนอนแมลง Lepidopteran และยีน pmi จาก *E. coli* เพื่อสร้างเอนไซม์ Phosphomannose isomerase (PMI) เพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ซึ่งปัจจุบันมีหลายประเทศ เช่น อาร์เจนตินา บราซิล คานาดา และ สหภาพยุโรป เป็นต้น ที่ยอมรับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ MIR 162 ในเชิงการค้าเพื่อใช้เป็นอาหารและการแปรรูปในอุตสาหกรรม และเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งวิธีการมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ event-specific เชิงปริมาณ ตามมาตรฐาน EURL-GMFF report maize MIR 162 (Delobel et al. 2011)

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon89034, Mon88017 MIR604 และ MIR 162 ได้พัฒนาขึ้นโดยบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มอนซานโต้ และ JRC reference methods โดยปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่ได้จัดทำข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ของยีนทั้ง 4 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดยีนที่มีอยู่ในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency test) ของ USDA-GIPSA งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรมจากข้าวโพดของยีนที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ โดยเป็นข้อมูลสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR 162 เพื่อให้ได้วิธีการและผลการทดสอบถูกต้อง ได้มาตรฐานสากล

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.วัสดุอ้างอิง CRM ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162

2. Lightcycler 480 Probe Master

3. LightCycler 480 Multiwell Plate 96, with sealing foil

4. Real-time PCR model LightCycler 480

5. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมีในการทำสกัดดีเอ็นเอและทดสอบปฏิกิริยา

วิธีการ

1. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162

สืบค้นข้อมูลลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสาร Validation methods ของ JRC-EURL การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

2. การสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วย Lysis buffer (GeneScan extraction method) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยผ่าน Wizard Miniprep DNA Purification Kit ทำการสกัดตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3. ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR และความจำเพาะของไพรเมอร์

ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีมาตรฐาน ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ทดสอบตามกรรมวิธีมาตรฐานดัดแปลงตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธ์อื่นๆ และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม ประกอบด้วย ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017 Mon89034 MIR604 MIR162 Mon810 Bt11 Bt176 GA21 NK603 TC1507 Mon863 CBH351 RR soy และ DP356043

4. ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection)

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมแต่ละกรณี จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีความเข้มข้นหรือจำนวน copies ยีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ จากนั้นทำปฏิกิริยา real-time PCR ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้ทุกซ้ำคือค่า LOD ของการวิเคราะห์

5. ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบที่การปนเปื้อนระดับต่างๆ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ สำหรับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR604 มีตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่การปนเปื้อนระดับต่างๆ ได้แก่ Level1 0.1% Level2 1.0% และ Level3 10% และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมอีก 3 กรณี ไม่มีตัวอย่างวัสดุอ้างอิงระดับการปนเปื้อนต่างๆ จึงต้องคำนวณและทำการเจือจางจาก 10% ให้มีการปนเปื้อน ที่ระดับต่างๆ ได้แก่ U1 (non dilute), U2-10%, U3-5%, U4-1%, U5-0.5% และ U6-0.1%

ทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ยีนเป้าหมาย (ยีนที่ดัดแปรพันธุกรรม) และยีนอ้างอิงของพืช นำค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน กราฟความเข้มข้นมาตรฐานสร้างโดยใช้ค่า crossing point (CP) เป็นแกน Y และค่า log ฐาน 10 ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวน copies ของยีน) เป็นแกน X ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replicates) ทดลองซ้ำ 4 รอบ (repeat)

5.1 วิเคราะห์ค่าความแม่น (Accuracy) ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) และค่าเบี่ยงเบน (Bias) ของการคำนวณปริมาณการปนเปื้อนของยีนจำเพาะที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม

คำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีนจำเพาะ ด้วยวิธี real-time PCR โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำและทำการทดลองซ้ำ 4 รอบจากนั้นจึงหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation: RSD) ในส่วนของความแม่นและความถูกต้องของวิธีการตรวจ ทำการวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีนจำเพาะแต่ละชนิดที่ได้จากการทดลอง เปรียบเทียบกับร้อยละการปนเปื้อนคำนวณค่าที่ระบุไว้ในเอกสารใบรับรองของ ERM-IRMM หรือ AOCS ซึ่งรายงานเป็นค่าการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์

5.2. ตรวจวัดความทวนซ้ำ (repeatability) ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification)

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยดีเอ็นเอข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม ให้มีความเข้มข้นของ copies ยีนในระดับต่างๆ จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมาเพิ่มปริมาณโดยใช้วิธี real-time PCR โดยในแต่ละความเข้มข้น (จำนวน copy ของยีน) จะทดสอบพร้อมกัน 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 4 รอบ จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า CP และคำนวณค่า RSD^r (repeatability relative standard deviation: RSD^r) รวมทั้งหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนจำเพาะที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือไปพร้อมๆ กัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 3 ปี เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162

สืบค้นข้อมูลลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสาร Validation methods ของ JRC-EURL การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีไทด์ไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง
Mon88017-forward	5’-GAGCAGGACCTGCAGAAGCT -3’	Charles Deobel et al.
Mon88017-reverse	5’-TCCGGAGTTGACCATCCA-3’	2008
Mon88017-probe	5’-FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-TAMRA-3’	
Mon89034-forware	5’-TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT-3’	Savini et al. 2008
Mon89034-reverse	5’-CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA-3’	
Mon89034-probe	5’-FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGBNFQ-3	
MIR604-forward	5’-GCGCACGCAATTCAACAG-3’	Mazzara et al. 2007
MIR604-reverse	5’-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3’	

MIR604-probe	5'-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA-3'	
MIR162-forward	5'-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG -3'	Delobel et al. 2011
MIR162-reverse	5'-TGCCTTATTGTTGCCTTCAGA -3'	
MIR162-probe	5'-FAM-TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA-TAMRA-3'	
***hmg* primer1**	5'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'	Savini et al. 2008
***hmg* primer2**	5'-GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3'	Charles Deobel et al.
***hmg* probe**	5'-FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA-3'	2008
Adh1-forward	5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3'	Mazzara et al. 2007
Adh1-reverse	5'-CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3'	Delobel et al. 2011
Adh1-probe	5'-FAM-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-TAMRA-3'	

2. การสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

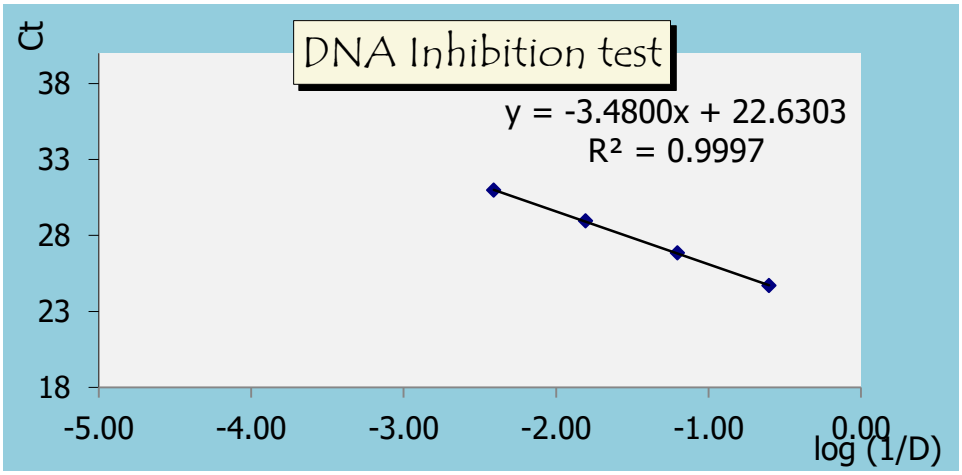
สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม (ตารางที่ 2) ด้วย Lysis buffer (GeneScan extraction method) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยผ่าน Wizard Miniprep DNA Purification Kit ทำการสกัดตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (Thermo Scientific)

ตารางที่ 2 วัสดุอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

GM corn (events)	Product code	Certified Value (g/kg)
Mon88017	AOCS0406-D	>990.5
MON89034	AOCS 0906-E	>994.25 g/kg
MIR604	ERM-BF423 :	
	blank	<0.9 g/kg
	Level1 0.1%	1.0 g/kg
	Level2 1.0%	9.8 g/kg
	Level3 10%	98.5 g/kg
MIR162	AOCS1208-A	Not available
nonGM	0406-A AOCS	< 2.0 g/kg

วิธีการสกัดด้วย GenScan Extraction เป็นวิธีที่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิง โดยปริมาณขั้นต่ำของตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอคือ 0.1 กรัม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ ได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร eluted 50-100 ไมโครลิตร คุณภาพของดีเอ็นเอ คำนวณค่า 260/280 เฉลี่ย 1.8-2.0 OD. ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดย ปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ inhibition test ของดีเอ็นเอที่สกัด 4 ซ้ำ ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9997 และมีค่า ΔCt (extrapolated)=Extrapol. Ct - Mean Ct เท่ากับ 0.28, 0.16, 0.34 และ0.33 (ภาพที่ 1) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือค่าต่ำกว่า 0.5 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัด

ได้จากวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่มีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ และมีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้



ภาพที่ 1 จากการทดสอบ Inhibition test งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR162

3. ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีมาตรฐาน (ตารางที่ 1) ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ทดสอบตามกรรมวิธีมาตรฐานดัดแปลงองค์ประกอบของปฏิกิริยาตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ดังนี้

Component	X 1 reaction (ul)
2X Quantitect Probe (Roach)	10
Forward primer 10 uM	0.3
Reverse primer 10 uM	0.3
Probe 5uM	0.2
Nuclease free water	4.2
DNA template 10 ng/ul	5
Total	20

โปรแกรมการทำปฏิกิริยา LightCycler480 RT PCR

Step	Stage	Temp	Time	Acquisition	Cycles
1	Activation DNA polymerase and denaturation	95C	600s	No	1x
2	Denaturation	95C	15s	No	45x
3	Amplification Annealing and extension	60C	60s	yes	

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมกรณีต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งมีการดัดแปรพันธุกรรมของยีนประกอบด้วย Mon88017(*Cry3 Bb1 + EPSPS*) Mon89034(*Cry1A.105+Cry2Ab2*) MIR604(*Cry3A*) MIR162(*Vip3A*) Mon810 Bt11 Bt167 (*CryIAb*) GA21 NK603(*EPSPS*) TC1507(*CryIF+PAT*) T25 Mon863 CBH351(*Cry9C+PAT*) และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ 40-3-2 (*EPSPS*) DP356043 และ DP305423 ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีมาตรฐาน JRC

วิธีการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR โดยไพรเมอร์และโพรบลำดับนิวคลีโอไทด์ตามตารางที่ 1 กรณี Mon88017 มีความจำเพาะต่อ มีค่า CP เฉลี่ยเท่ากับ 24.23 ไม่พบการสังเคราะห์ในตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมหรือถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น ทั้งนี้คู่ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจเป็น event specific สังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณโครงสร้างของยีนเชื่อมต่อกับยีนพืชมีขนาด 95 bp (Delobel et al. 2010) การตรวจวิเคราะห์ Mon89034 ค่า CP เฉลี่ยเท่ากับ 25.26 ไม่พบการสังเคราะห์ในตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมหรือถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น Savini (2008) ทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่าไพรเมอร์และโพรบสังเคราะดีเอ็นเอขนาด 77 bp ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับกรณี Mon89034 ความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมกรณี MIR162 ทดสอบพบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน MIR604 มีค่า CP เฉลี่ยเท่ากับ 32.48 ไม่พบการสังเคราะห์ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมหรือถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น จากข้อมูลการทดสอบ Savini (2010) คู่ไพรเมอร์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 76 bp ความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมกรณี MIR162 ทดสอบพบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน MIR162 มีค่า CP เฉลี่ยเท่ากับ 24.35 ไม่พบการสังเคราะห์ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมหรือถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น จากข้อมูลการทดสอบ Delobel (2011) คู่ไพรเมอร์จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 92 bp

4. ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนที่ไพรเมอร์สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection)

การวิเคราะห์ค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ยีนที่ได้รับการตัดต่อเข้าสู่ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ทดสอบโดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม กรณี Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162 ให้มีระดับความเข้มข้นหรือจำนวน copies ในระดับต่างๆ

ผลการวิเคราะห์ LOD ของการตรวจ MON88017 เจือจางให้มีความเข้มข้นของ copies ยีน จำนวน 20 10 5 และ 1 ทดสอบรวม 10 ซ้ำ พบว่าเครื่อง real-time PCR Light CyCler 480 และกรรมวิธีที่ทดสอบ

สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างที่มีจำนวน copies ดีเอ็นเอของกรณี Mon88017 จำนวน 20 และ 10 ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มี copies ดีเอ็นเอจำนวน 5 และ 1 ได้ค่า CP ไม่ครบทุกซ้ำ ในการทดสอบใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 100 นาโนกรัม ค่า LOD ในการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 เท่ากับ 10 copies สำหรับการทดสอบค่า LOD ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon89034 MIR604 และ MIR162 ทดสอบโดยคำนวณค่าการเจือจางเป็นอัตราการเจือปนร้อยละ 0.1 และ 0.01 ผลการทดสอบได้ค่า CP การตรวจวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำเฉพาะจากอัตราการเจือปนร้อยละ 0.1 ซึ่งเป็นค่า LOD ขั้นต่ำในการตรวจวิเคราะห์ได้ แต่เนื่องจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม กรณี Mon88017 Mon89034 และ MIR162 ไม่มีตัวอย่างที่ได้รับการรับรองการเจือปนในระดับต่ำ โดยเฉพาะ MIR162 ไม่มีค่า certified จึงไม่สสามารถคำนวณค่าขั้นต่ำได้แน่นอน ทั้งนี้สำหรับกรณี Mon88017 ได้นำตัวอย่างที่มีการคำนวณค่า copies จากการสร้างกราฟมาตรฐานมาใช้ จึงสามารถเจือจางได้ถึงระดับ copies ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวไม่สามารถเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอในขั้นต่ำดังกล่าวได้ทุกครั้ง

5. ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

เตรียมดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ดังนี้ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมกรณี Mon88017 Mon89034 และ MIR162 ดำเนินการโดยสกัดดีเอ็นเอแล้วเจือจางตัวอย่างวัสดุอ้างอิงแต่ละกรณีด้วยดีเอ็นเอข้าวโพดไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม (non GM) ให้มีร้อยละการเจือปนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเท่ากับ 10 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมกรณี MIR604 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้างอิง Level 3 อัตราเจือปนร้อยละ 10 จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้มีให้มีการปนเปื้อนของการดัดแปรพันธุกรรม 5 ระดับ ได้แก่ S1(1), S2 (1:4), S3 (1:16), S4 (1:48) และ S5 (1:144) ให้มีจำนวน copies no. ของยีนที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรมมาตรฐานเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิงของพืช ซึ่งคำนวณค่าอ้างอิงการเจือปนสิ่งดัดแปรพันธุกรรมจากค่าประมาณ 1C value สำหรับดีเอ็นเอข้าวโพด 2.725 พิโคกรัม ดังนั้นในดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม จะมีจีโนมของยีนอ้างอิงพืช 73394 copies และหากตัวอย่างดีเอ็นเอพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการเจือปนยีนดัดแปรพันธุกรรมร้อยละ 10 จะมียีนที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม 7339 copies ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างตั้งต้น 200 นาโนกรัมแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำจะได้ค่าดีเอ็นเออ้างอิงและดีเอ็นเอที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและจำนวน copies ยีน สำหรับกราฟมาตรฐาน

Sample code	S1	S2	S3	S4	S5
Total amount of DNA in reaction (ng)	200	50	12.5	4.2	1.4
Maize genome (Ref. copies)	73394	18349	4587	1529	510
Target copies	7339	1835	459	153	51

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีนเป้าหมายที่จำเพาะต่อการดัดแปรพันธุกรรมแต่ละกรณี เทียบกับยีนอ้างอิงของพืช โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในการทดสอบครั้งเดียวกัน นำค่า CP และ log copies no. มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำค่า CP (crossing point) กับค่า log ของจำนวน copies ของยีน เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหา copies no. ในตัวอย่าง unknown และนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเจือปนของยีนที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมดำเนินการตามการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 อ้างอิง Delobel et al. (2010) Mon89034 อ้างอิง Savini et al. (2008) MIR604 อ้างอิง Mazzara et al. (2007) และ MIR162 อ้างอิง Delobel et al. (2011) โดยการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 และ Mon89034 ทดสอบเทียบกับยีน hmg specific และการตรวจวิเคราะห์ MIR604 และ MIR162 ทดสอบเทียบกับยีน ZmAdh1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 200 นาโนกรัม นำค่า copies no. ของตัวอย่าง unknown ที่วิเคราะห์เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเจือปนได้จากสมการ

GM% = (copies no. Target gene/ copies no. reference gene) x 100

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017 ด้วยวิธี Real-time PCR (อ้างอิงตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ CRL-GMFF:validation report maize Mon88017, JRC-2010) โดยการสกัดดีเอ็นเอของผงข้าวโพดที่เป็นวัสดุอ้างอิง Event Mon88017 Product code AOCS 0406-D Certified Value >990.5 g/kg จะมีเปอร์เซ็นต์การเจือปน GM 99.05% และผงข้าวโพด non-GM 0406 นำมาสกัดด้วย Lysis Extraction buffer (GeneScan Extraction) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Wizard Miniprep DNA Purification ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานที่มีการปนเปื้อนระดับต่ำ จึงต้องเตรียมดีเอ็นเอให้มีการเจือปนการดัดแปรพันธุกรรมร้อยละ 10 โดยการผสมดีเอ็นเอจากตัวอย่าง Mon88017 กับดีเอ็นเอข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม non-GM 0406 ให้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 5 ระดับคือ S1, S2, S3, S4, S5 สำหรับใช้ทดสอบต่อปฏิกิริยา (5 ไมโครลิตร) มีความเข้มข้นดีเอ็นเอ 200, 50, 12.5, 4.2 และ 1.4 ng/4 ul ตามลำดับ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอวิเคราะห์สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ผลการทดสอบ ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Mon88017 และ hmg (reference gene) เฉลี่ย -3.362 และ -3.350 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคือ -3.2 และ -3.6 มีค่า PCR efficiency ปฏิกิริยา 98.98 และ 99.40 ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity (R^2) เท่ากับ 1.0 ทั้งสองยีน การวิเคราะห์การทวนซ้ำได้ของวิธีทดสอบ Repeatability ในการตรวจวิเคราะห์ยีน Mon88017 พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ RSDr เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.54 -2.32 ซึ่งค่าจะต้องไม่เกิน 25% การวิเคราะห์ความแม่นยำ Accuracy และความเที่ยงตรง Precision พบว่าการตรวจวิเคราะห์ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อน (unknown sample) ของตัวอย่างที่เตรียม 6 ระดับคือ

99.05%, 10%, 5%, 1%, 0.5% และ 0.1% ผลการวิเคราะห์มีค่า %Bias ของการวิเคราะห์การปนเปื้อน 99.05% ค่อนข้างสูงถึง -23% โดยค่าวิเคราะห์ที่ 0.1% เกิดจากการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความผิดพลาด การวิเคราะห์ของ unknown sample ที่ 10%, 5%, 1% และ 0.5% ซึ่งมีค่า %Bias เป็น -6, -7, -13 และ -3 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือไม่เกิน ± 25% การวิเคราะห์ค่า LOD โดยการเจือจางดีเอ็นเอให้มี Copies no. ของยีน Mon88017 เป็น 20, 10, 5 และ 1 พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้ง 10 ซ้ำที่จำนวนปนเปื้อน 10 copies โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ RSD 1.18 ทั้งนี้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณจริง จำเป็นต้องมีวัสดุอ้างอิงที่ได้รับการรับรองมาตรฐานการเจือปนการดัดแปรพันธุกรรมในระดับต่ำจึงจะได้ค่าที่เที่ยงตรงและแม่นยำในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับรายงานการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ CRL-GMFF: validation report maize Mon88017 มีค่าการตรวจวิเคราะห์ที่ทวนซ้ำได้ร้อยละ 0.5 และ 8 ทั้งนี้พบว่าสัมประสิทธิค่าการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับการเจือปนต่ำร้อยละ 0.09 สูงเกินค่ามาตรฐานเล็กน้อย

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89034 ดำเนินการโดยการสกัดดีเอ็นเอและเจือจางให้มีเปอร์เซ็นต์การเจือปนยีนที่ดัดแปรพันธุกรรมร้อยละ 10 เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ Mon88017และเนื่องจาก Mon89034 probe ตามวิธีการอ้างอิง มีการติดฉลาก 6-FAM-5’- 3’ – MGBNFQ ซึ่งเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทดลองเปลี่ยนเป็น FAM- TAMRA เช่นเดียวกับโพรบชนิดอื่น ผลการทดสอบพบว่าไม่สามารถใช้ได้ เนื่องจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ค่า CP ไม่แน่นอน จึงจำเป็นต้องสังเคราะห์ติดฉลากตามวิธีอ้างอิงดังกล่าว ผลการทดสอบกราฟมาตรฐาน มีค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Mon89034 และ hmg (reference gene) เฉลี่ย -3.56 และ -3.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน -3.2 และ -3.6 PCR efficiency 88 และ 102.4 ตามลำดับ เมื่อนำมาสร้างกราฟหาค่า Linearity (R^2) ได้ค่าเท่ากับ 0.98 และ 1.0 การวิเคราะห์ Repeatability ในการตรวจวิเคราะห์ยีน Mon89034 มีค่า RSDr เฉลี่ย 2.54 -3.32 การวิเคราะห์ Accuracy และ Precision พบว่าการตรวจวิเคราะห์ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อน (unknown sample) 10%, 5%, 1%, 0.5% และ 0.1% มีค่า %Bias ของการวิเคราะห์การปนเปื้อนสูงมาก ซึ่งเป็นค่าที่นำมาใช้ไม่ได้ เนื่องจากปัญหาจากการเจือจางตัวอย่างที่มีค่าการเจือปนไม่เที่ยงตรง การเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.1

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR604 ตามวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ สกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR604 ประกอบด้วย blank, Level1 0.1%, Level2 1.0%, Level3 10% ด้วย Lysis buffer และทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Wizard DNA clean up resin ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีน ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ต่อยีน Cry3A ของข้าวโพด MIR604 โดยทดสอบกับข้าวโพดสายพันธุ์ MIR604, Mon89034 Mon88017 Mon810 Bt11 Bt176 NK603 GA21 Mon863 TC1507 CBH351 และถั่วเหลืองสายพันธุ์ 40-3-2, 356043 และ

305423 พบการสังเคราะห์จำเพาะกับข้าวโพดสายพันธุ์ MIR604 เจือจางดีเอ็นเอ 10% MIR604 เพื่อวิเคราะห์ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ค่าความชันกราฟมาตรฐานของยีน MIR604 และยีน Adh ได้ -3.281 และ -3.326 ตามลำดับ ค่า R^2 เฉลี่ย 1 และ 0.99 ตามลำดับ PCR efficiency เท่ากับร้อยละ 101.7 และ 99.83 ตามลำดับ ค่าความเที่ยง ที่ 10% และ 1% ได้ค่าวิเคราะห์ 10.5 และ 1.11 ตามลำดับ ส่วนค่าที่ 0.1% วัดได้ 0.07 และค่าเบี่ยงเบนการตรวจวิเคราะห์ ที่ 10% 1% และ 0.1% เท่ากับ 5% 11% และ -26% ตามลำดับ

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR 162 ตามกรรมวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ JRC โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบในการตรวจวิเคราะห์ สกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR162 ไม่มีค่า MU ของการรับรองการปนเปื้อน จึงกำหนดให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และสกัด non GM 0406 จำนวน 4 ซ้ำ ปริมาณซ้ำละ 1 กรัม ด้วยวิธี Lysis buffer ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Wizard DNA clean up resin วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตกราฟี คุณภาพของดีเอ็นเอ OD 260/280 อยู่ระหว่าง 1.8-1.9 จากนั้นนำดีเอ็นเอมาทำการเจือจาง 1:4, 1:16, 1:64 และ 1:256 ทดสอบปฏิกิริยาตรวจวิเคราะห์ inhibition ของดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีน MIR162 การตรวจความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ โดยทดสอบกับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม พบการสังเคราะห์ยีนจำเพาะเฉพาะกับข้าวโพดสายพันธุ์ MIR162 ไม่พบการสังเคราะห์ยีนในข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น การตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะMIR 162 เทียบกับยีนอ้างอิง Adh โดยการเจือจางดีเอ็นเอข้าวโพด MIR162 ด้วยข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม 0406 ให้มีความเข้มข้นของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR162 10% จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ระดับต่างๆ 5 ระดับ ได้แก่ S1 1:4, S2 1:16, S3 1:64, S4 1:256 และ S5 1:1024 ทำการทดสอบปฏิกิริยา Real Time PCR ของดีเอ็นเอ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดสอบ 4 รอบ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานการสังเคราะห์ยีนอ้างอิง ผลการตรวจวิเคราะห์ยีน Adh และ MIR162 มีว่าค่าความชัน (slope) ของกราฟเฉลี่ย -3.55 และ -3.44 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 1.93 และค่า R2 เท่ากับ 1.0 ค่าความเที่ยง (precision) หรือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เฉลี่ยของการวิเคราะห์ยีน Adh และ MIR162 เท่ากับ 2.20 และ 0.49 ตามลำดับ ค่าความแม่นยำ (accuracy) หรือค่าเฉลี่ยร้อยละการเบี่ยงเบน (% bias) จากการเจือจางความเข้มข้นยีน MIR162 กับข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม ตามอัตราส่วน 10%, 1% และ 0.1% มีค่าเฉลี่ย 32, 28 และ 66 ตามลำดับ ค่าการทดสอบซ้ำ (repeatability) ในการตรวจยีน MIR162 เท่ากับ 0.45 โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) คือ 0.1%

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 เชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยวิธีมาตรฐาน JRC-EURL ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ สกัดดีเอ็นเอด้วย GeneScan Extraction buffer ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Wizard Miniprep DNA Purification วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 40 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LightCycler480 ตรวจความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สำหรับแต่ละกรณี โดยใช้ดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 100 นาโนกรัม และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของยีนจำเพาะเทียบกับยีนอ้างอิงพืชโดยไพรเมอร์ Adh1 หรือ hmg ตามกรรมวิธีมาตรฐาน ปริมาณดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 200 นาโนกรัม นำค่า CP และ log copies สร้างกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์การเจือปน พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะในการตรวจยีน คือ Mon88017 ที่ 20 copies และ Mon89034 MIR604 และ MIR162 ที่ LOD 0.1% การวิเคราะห์ค่าการทวนซ้ำของวิธี (repeatability) อยู่ในค่ามาตรฐาน RSdr < 0.5 ค่า Slope การทดสอบอยู่ในค่ามาตรฐาน คือ -3.2 ถึง -3.6 ทั้ง target gene และ reference gene ค่า R^2 coefficient สูงกว่า 0.98 ค่าความเที่ยงตรง (Trueness) พบว่ามีบางความเข้มข้นของตัวอย่างวิเคราะห์ได้เปอร์เซ็นต์ค่าความเบี่ยงเบน (bias) สูงกว่ามาตรฐานเนื่องจากไม่มีวัสดุอ้างอิงรับรองมาตรฐานที่มีการเจือปนของยีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ ต้องเตรียมตัวอย่างเอง จึงทำให้เกิดค่าความเบี่ยงเบนเกินกำหนดจากการเตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมด้วยข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรมให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำ

ข้อเสนอแนะ การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐาน JRC-EURL พบว่าข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon88017 Mon89034 และ MIR162 ไม่มีวัสดุอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองการปนเปื้อนในระดับต่ำ ดังนั้นไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ วิเคราะห์ร้อยละการปนเปื้อนของตัวอย่าง แต่สามารถใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ LOD จะต้องทำการเจือจางให้ได้ตัวอย่างที่มีการเจือปนร้อยละ 0.1 เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำวิธีการทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยดัดแปลงกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล นำมาปรับ

ใช้และจัดทำเป็นคู่มือเป็นวิธีการทดสอบในงานตรวจสอบวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม และใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency Test)ร่วมกับห้องปฏิบัติการอื่นได้

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2543. ความพร้อมและหลักการตรวจสอบพืชที่ได้รับการตัดแต่งสารพันธุกรรมของห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร. หน้า 21-26. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Berdal K.G. and Holst-Jensen A. 2001. Roundup Ready Soybean Event-specific Real-time Qualitative PCR Assay and Estimation of the Practical Detection and Quantification limit in GMO Analysis. European Food Research and Technology. 213 : 432-438.

Clives J. 2014. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2012. ISAAA Briefs No. 49: 2014

Delobel C., Bonini L., Querci M., Mazzara M., Cordeil S., Van den Eede G. 2011. Event-specific method for the quantification of maize MIR162 using real-timePCR. JRC-EURL-GMFF:alidated method maize MIR162. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries /MIR162_validated_Method.pdf

Delobel C., Foti N. Grazioli E., Mazzara M., Van Den E.G. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 88017 using Real-time PCR. *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.

ISO 21571. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-Nucleic acid extraction. International Organization for Standardization. 44 pp.

ISO 24276. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-General Requirement and definition. International Organization for Standardization. 44 pp.

JRC-EURL GMFF. 2008. Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON 88017 Using Real-time PCR. Method development; Monsanto company, CRL-GMFF: protocol MON 88017 maize. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/ MON88017 _validated_ Method_correctedversion1.pdf

JRC-EURL GMFF. Event-specific Method for the Quantification of Maize MIR162 Using Real-time PCR. Method development by Syngenta seeds S.A.S, EURL-GMFF: validated method maize MIR162. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries /MIR162_validated_Method.pdf

Mayer M. 1999. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food. Food Control. 10 : 391-399.

Mazzara M., Savini C., Munaro B., Foti N. and Van Den E.G. 2007. Event-specific method for the quantification of maize line MIR604 using Real-time PCR-Validation report and protocol-maize seeds sampling and DNA extraction. EUR 22913 EN. Luxembourg : OPOCE. *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.

Savini C., Bogni A.,Grazioli E., Munaro B., Mazzara M. and Van Den E.G. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 89034 using Real-time PCr. EUR23700 EN. Luxembourg:OPOCE, *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.

13. ภาคผนวก

Table 1 แสดงความทวนซ้ำได้ (repeatability) ของการตรวจปริมาณยีน Mon88017

DNA (ng)	Copies no.	Repeat	CP value 1	CP value 2	CP value 3	Mean of CP	SD	RSD (%)	Mean CPall	SDr	RSDr(%)
200	7339	1	30.59	30.81	30.42	30.61	0.20	0.64	28.27	0.66	2.32
		2	30.16	31.18	27.73	29.69	1.77	5.97			
		3	24.78	24.89	24.82	24.83	0.06	0.22			
		4	30.48	30.49	30.1	30.36	0.22	0.73			
		5	25.41	27.25	27.14	26.60	1.03	3.88			
		6	27.85	27.55	27.73	27.71	0.15	0.54			
		7	26.24	26.12	26.18	26.18	0.06	0.23			
		8	30.22	30.07	30.26	30.18	0.10	0.33			
50	1835	1	32.69	32.73	32.11	32.51	0.35	1.07	30.13	0.48	1.59
		2	32.42	31.88	29.78	31.36	1.39	4.45			
		3	26.63	26.62	26.57	26.61	0.03	0.12			
		4	32.22	32.22	32.12	32.19	0.06	0.18			
		5	28.04	28.57	28.57	28.39	0.31	1.08			
		6	29.6	29.63	29.78	29.67	0.10	0.33			
		7	27.93	27.98	28.21	28.04	0.15	0.53			
		8	32.25	32.37	32.26	32.29	0.07	0.21			
12.5	459	1	34.67	34.94	34.48	34.70	0.23	0.67	32.30	0.70	2.18
		2	34.8	35.17	31.55	33.84	1.99	5.89			
		3	28.96	28.28	28.53	28.59	0.34	1.20			
		4	34.48	34.47	34.24	34.40	0.14	0.39			
		5	30.69	30.53	30.73	30.65	0.11	0.35			
		6	31.51	31.49	31.55	31.52	0.03	0.10			
		7	30.3	30.41	30.36	30.36	0.06	0.18			
		8	34.48	34.29	34.23	34.33	0.13	0.38			
4.2	153	1	35.84	36.07	36.07	35.99	0.13	0.37	33.90	0.59	1.73
		2	36.29	36.48	33.32	35.36	1.77	5.01			
		3	30.56	29.94	30.16	30.22	0.31	1.04			
		4	36.31	36.66	36.48	36.48	0.18	0.48			
		5	31.77	32.87	32.28	32.31	0.55	1.70			
		6	32.75	33.14	33.32	33.07	0.29	0.88			
		7	31.54	31.76	31.76	31.69	0.13	0.40			
		8	35.88	36.22	36.22	36.11	0.20	0.54			
1.4	51	1	37.34	37.64	38.42	37.80	0.56	1.47	35.50	0.55	1.54
		2	38.03	37.27	34.69	36.66	1.75	4.78			
		3	31.79	31.95	31.75	31.83	0.11	0.33			
		4	38.22	37.8	38.01	38.01	0.21	0.55			
		5	33.34	33.52	34.11	33.66	0.40	1.20			
		6	34.53	35.31	34.69	34.84	0.41	1.18			

Table 2 แสดงค่า ความเที่ยง ความแม่น และการเบี่ยงเบน ของการหาปริมาณยีน Mon88017

Sample	Theoretical (%)	Assay	Experimental (copies) 1	2	3	4	Mean (copies)	SD (copies)	RSDr (%)	experimental (%)	Bias (%)
Unk 1	10	Mon88017	2840	2830	1960	1767	2349.25	566.42	24.11	9.41	-6
		Hmg	25567	28100	21533	24700	24975	2710.42	10.85		
Unk 2	5	Mon88017	1480	1253	785	870	1097	326.55	29.77	4.63	-7
		Hmg	26867	26837	18300	22733	23684.25	4081.04	17.23		
Unk 3	1	Mon88018	286	234	165	167	213	58.28	27.36	0.87	-13
		Hmg	27633	25767	23067	21300	24441.75	2810.75	11.50		
Unk 4	0.5	Mon88019	146	74	120	83	105.75	33.41	31.59	0.48	-3
		Hmg	26700	27200	14900	18500	21825	6101.02	27.95		

Table 3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ของ Mon88017

copy no.	CP value 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean CP	SD	RSD(%)
20	33.92	36.75	33.21	33.57	33.93	34.41	32.72	33.87	33.33	33.65	33.94	1.09	3.22
10	34.65	34.39	34.99	34.74	34.44	33.96	34.48	34.63	34.3	35.46	34.60	0.41	1.18
5	34.92	36.68	36.1	35.49	37.63	36.45	34.57	37.2	34.76	nd	35.98	1.11	3.07
1	nd	36.51	36.42	nd	36.32	nd	35.88	nd	nd	36.49	36.32	0.26	0.71

ตารางที่ 4 แสดงค่า ความเที่ยง ความแม่นและการเบี่ยงเบน ของการหาปริมาณยีน Mon89034 ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ

Theoretical (%)	Assay	Experimental (copies) 1	2	3	SD (copies)	RSD (%)	experimental (%)	Bias (%)
99.05	M89034	59500	51900	16900	22721.21	53.13	219.32	121
	hmg	18700	19600	20200	754.98	3.87		
10	M89034	4160	5340	3160	1091.24	25.86	20.82	108
	hmg	21000	18800	21000	1270.17	6.27		
5	M89034	4510	6340	31400	15024.56	106.68	68.15	1263
	hmg	20100	21200	20700	550.76	2.66		
1	M89034	11700	242	78.4	6663.01	166.29	20.41	1941
	hmg	20700	18700	19500	1006.64	5.13		
0.5	M89034	305	82.6	58.3	135.96	91.47	0.69	-66
	hmg	22600	20900	21200	907.38	4.21		
0.1	M89034	242	168.9	95.8	73.10	43.28	1.13	13
	hmg	15300	14600	14900	351.19	2.35		

ตารางที่ 5 แสดงค่าการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของการตรวจปริมาณยีน MIR604

DNA amount (ng)		Copies no.	Repeat 1	2	CP value 3	SD	RSD (%)	SDr	RSdr(%)
200	7339	1	27.61	27.76	27.78	0.09	0.34	0.07	0.24
		2	29.84	29.52	29.86	0.19	0.64		
		3	28.6	28.52	28.5	0.05	0.19		
		4	30.78	30.43	30.75	0.19	0.63		
50	1835	1	29.73	29.55	29.63	0.09	0.30	0.05	0.15
		2	31.65	31.61	31.9	0.16	0.50		
		3	30.4	30.67	30.6	0.14	0.46		
		4	32.7	32.59	32.61	0.06	0.18		
12.5	459	1	31.77	31.39	31.67	0.20	0.62	0.16	0.47
		2	33.93	33.81	33.84	0.06	0.18		
		3	31.77	32.24	32.65	0.44	1.37		
		4	34.97	34.7	34.46	0.26	0.74		
4.2	153	1	32.85	33.35	32.76	0.32	0.96	0.10	0.28
		2	35.48	35.31	35.11	0.19	0.52		
		3	34.33	34.02	34.5	0.24	0.71		
		4	36.19	36.04	36.18	0.08	0.23		
1.4	51	1	35.26	35.22	34.77	0.27	0.78	0.07	0.20
		2	36.76	36.76	36.57	0.11	0.30		
		3	35.5	35.14	35.51	0.21	0.60		
		4	37.52	37.75	37.79	0.15	0.39		

ตารางที่ **6** แสดงค่า ความเที่ยง ความแม่นและการเบี่ยงเบน ของการหาปริมาณยีน MIR604 ที่ระดับการปนเปื้อนต่างๆ

		Experimental (copies)							
Theoretical (%)	Assay	1	2	3	4	SD	RSDr (%)	Experimental (%)	Bias (%)
10	MIR604	876	1116	261	766	360.15	47.72	10.50	5
	Adh	9130	11690	3056	4890	3932.49	54.68		
1	MIR604	123	70	38	87	35.41	44.54	1.11	11
	Adh	8873	6006	4303	9363	2399.96	33.63		
0.1	MIR604	24	7.9	7.8	4.6	8.75	79.02	0.07	-26
	Adh	19566	19433	5890	14833	6416.14	42.97		

ตารางที่ 7 แสดงค่าการทวนซ้ำได้ (repeatability) ของการตรวจปริมาณยีน MIR162

concentration (Copy number)	Repeat	Crossing Point (CP) Replicate 1	2	3	Mean of CP	Mean of all CPs	Mean of experimental copy number	Log experimental copy number	Mean of all experimental copy numbers	Mean of all log experimental copy number
7340	1	30.33	30.36	30.35	30.35	31.34	7576.67	3.88	7369.17	3.87
	2	30.34	30.32	30.11	30.26		7660.00	3.88		
	3	33.25	33.17	33.91	33.44		7006.67	3.85		
	4	31.48	31.27	31.2	31.32		7233.33	3.86		
1835	1	32.95	33.01	32.65	32.87	33.54	1513.33	3.18	1685.00	3.23
	2	31.91	32.96	32.33	32.40		1716.67	3.23		
	3	35.4	35.88	35.26	35.51		1636.67	3.21		
	4	33.42	33.28	33.46	33.39		1873.33	3.27		
459	1	34.33	34.27	35.1	34.57	35.37	524.67	2.72	515.50	2.71
	2	34.35	34.24	33.56	34.05		518.67	2.71		
	3	37.24	36.84	37.39	37.16		600.33	2.78		
	4	35.45	36.02	35.64	35.70		418.33	2.62		
115	1	36.76	36.06	36.72	36.51	37.46	150.00	2.18	133.23	2.12
	2	35.5	35.66	36.37	35.84		143.37	2.16		
	3	39.65	40.24	39.41	39.77		124.00	2.09		
	4	38.33	37.52	37.3	37.72		115.53	2.06		
29	1	37.82	40.34	39.28	39.15	39.88	33.70	1.53	29.38	1.46
	2	38.62	37.21	38.3	38.04		31.57	1.50		
	3	42.42	41.94	42.97	42.44		24.57	1.39		
	4	39.84	40.37	39.48	39.90		27.70	1.44		

ตารางที่ 8 การแสดงค่าการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR162

Theoretical	Assay	Experimental (copies) 1	2	3	4	5	6	Mean	SD	RSDr (%)	experimental	Bias (%)
(%)								(copies)	(copies)		(%)	
10	MIR162	4026.00	3746	7106	3620	7783	3626	4984.5	1923.14	38.58	13.21	32
	Adh	24200.00	25500	66766	26966	52400	30500	37722	17658.25	46.81		
1	MIR162	233	352	904	445	754	409	516.166667	257.16	49.82	1.28	28
	Adh	31866	28500	75433	27300	49400	29400	40316.5	19054.23	47.26		
0.1	MIR162	13	30	113	58	101	42	59.5	39.81	66.91	0.17	66
	Adh	24566	25033	69466	22566	43333	29866	35805	18125.27	50.62		