รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) **การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม**

(ภาษาอังกฤษ) **Standard Plasmid Construction for Transgenic Papaya Detection.**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	อรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	พงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	ศรีเมฆ ชาวโพงพาง	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในตัวอย่างมะละกอผลสดและผลิตภัณฑ์ ที่มีมะละกอเป็นส่วนประกอบ ด้วยเทคนิค Real-time PCR ของห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวัสดุอ้างอิงมาเป็นตัวควบคุมผลการทดสอบ แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวัสดุอ้างอิงสำหรับมะละกอทำออกมาจำหน่ายทางการค้า จึงได้พัฒนาดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมขึ้น โดยการสังเคราะห์ชุดยีนขึ้นมาสามชุด คือ 1) ชุดยีน GMOs-Hawaii ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii และยีน *papain* ขนาดประมาณ 624 คู่เบส 2) ชุดยีน GMOs-SC ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และยีน *papain* ขนาดประมาณ 502 คู่เบส และ 3) ชุดยีน GMOs-DOA ประกอบด้วยยีน *CaMV 35S, gus, nos*, *cp*-DOA และยีน *papain* ขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส โดยชุดยีนทั้งสามเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ทำให้ได้ชุดพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ขนาดประมาณ 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาดประมาณ 2,795 คู่เบส และพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ขนาดประมาณ 3,657 คู่เบส พลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 เพิ่มปริมาณภายในเซลล์ คัดเลือกโคลนและสกัดพลาสมิด นำมาทดสอบความถูกต้องด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าทุกโคลนให้ผลเป็นบวก และ

วิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่สร้างขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้นแบบที่ออกแบบเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พบว่ามีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีนต่าง ๆ ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่า LOD ของดีเอ็นเอมาตรฐานทั้ง 3 ชุด อยู่ที่ระดับ 25-250 ชุด (copies) ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นสามารถพัฒนาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR เชิงปริมาณต่อไป

6. คำนำ

มะละกอมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carica papaya* เป็นพืชที่เจริญเติบโตดีบริเวณประเทศเขตร้อน มีการปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนและปลูกเพื่อการค้า นิยมบริโภคทั้งในรูปผลสุกและผลดิบ อีกทั้งยางมะละกอมีเอนไซม์ปาเปนที่ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การฟอกหนัง เครื่องสำอาง ยารักษาโรค เป็นต้น แต่จากการระบาดของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก ทำให้ผลผลิตมะละกอลดลงจนกระทั่งไม่ให้ผลผลิตเลย โรคดังกล่าวแพร่ระบาดในทุกระยะของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งระยะให้ผลผลิต โดยมีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยอ่อน ซึ่งใช้ระยะเวลาเพียง 10-30 วินาที ทำให้การใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค (วิชัย และคณะ, 2542) แม้จะมีการปรับปรุงสายพันธุ์มะละกอให้ได้สายพันธุ์ใหม่และการปลูกวัคซีนให้แก่มะละกอ แต่สายพันธุ์มะละกอที่ได้ก็ไม่สามารถต้านทานโรคได้อย่างแท้จริง

จึงมีการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมให้ต้านทานต่อไวรัส PRSV ขึ้นในหลายประเทศ เช่น ในปี 1992 Fitch *et al*. ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน *coat protein* (*cp*) ของไวรัส PRSV เข้าสู่โซมาติคเอมบริโอมะละกอสายพันธุ์ sunset โดยวิธี Microprojectile bombardment ด้วยพลาสมิด ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* ที่ขนาบด้วยยีน *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*) และยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ซึ่งมะละกอสายพันธุ์นี้ถูกนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์ Sun up (55-1 × 55-1) และสายพันธุ์ Rain bow (sun up × Kapoho) (Manshardt, 1998) ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้าในฮาวาย ส่วนในประเทศไต้หวัน Cheng *et al.* (1996) ได้สร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* เป็นตัวส่งถ่ายยีน *cp* ของไวรัส PRSV สายพันธุ์ไต้หวัน (PRSV-P YK) ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* PRSV ที่ขนาบด้วยยีน *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*) และยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) เข้าสู่เนื้อเยื่อเอมบริโอมะละกอสายพันธุ์ Tainung No. 2 ที่ทำให้เกิดบาดแผลด้วย carborundum ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมหลายสายพันธุ์ ได้แก่ GCP 16-0, GCP 17-0 และ GCP 17-1 ที่มีความสามารถสูงในการต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไต้หวันได้ สำหรับประเทศไทยมีการวิจัยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยนักวิทยาศาสตร์จากกรมวิชาการเกษตรร่วมกับ

นักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยคอร์แนล ประเทศสหรัฐอเมริกา ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวลและแขกดำที่ได้รับการถ่ายยีน *cp* ของไวรัสสายพันธุ์ประเทศไทยจากจังหวัดขอนแก่น โดยพัฒนามะละกอดัดแปรพันธุกรรมพันธุ์แขกนวลได้ 3 สายพันธุ์ และพันธุ์แขกดำ 1 สายพันธุ์ ที่สามารถต้านทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนในประเทศไทยได้ (Mendoza *et al*., 2008) ในเวลาเดียวกัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (มก-ศช) ก็ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยการถ่ายยีน *cp* ของไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ (PRSV-CMI) ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* PRSV-CMI ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *CaMV 35S* และ *nos terminator* และมี *npt II* (*neomycin phosphotransferase II*) เป็นยีนคัดเลือก เข้าสู่ somatic embryo ของมะละกอพันธุ์แขกนวล ด้วยวิธี particle bombardment ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรม ได้แก่ สายพันธุ์ KN 1.2.3, KN 13.2.3 และ KN 49 ที่มีความสามารถในการต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ได้ดี และมีแนวโน้มในการต้านทานไวรัส PRSV จากจังหวัดนครปฐม, ราชบุรี, สุราษฎร์ธานี, สกลนคร และยโสธร ซึ่งเป็นไวรัสตัวแทนสายพันธุ์ไวรัส PRSV ในแต่ละภาคของประเทศไทย ยกเว้นพันธุ์ KN 1.2.3 ซึ่งมีแนวโน้มที่จะอ่อนแอต่อไวรัส PRSV จากจังหวัดยโสธร (นุชนาถ และคณะ, มปป.)

แม้ในหลายประเทศอนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเพื่อการค้าได้ แต่ประเทศไทยยังไม่มีการอนุญาตให้ปลูกพืชดังกล่าวเพื่อการค้า แต่สามารถปลูกเพื่อการศึกษาวิจัยได้ โดยจะต้องได้รับการอนุมัติจากกรมวิชาการเกษตร อีกทั้งในการควบคุมสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้หลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรมในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับที่เข้มงวดขึ้น โดยกำหนดให้ต้องตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต จะต้องติดฉลากที่ระบุข้อความว่า “This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547) ซึ่งกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรมนี้ ส่งผลให้ประเทศไทยมีอุปสรรคในการส่งออกสินค้าเกษตร เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า และแอบแฝงการกีดกันทางการค้า อีกทั้งพบมีการลักลอบปลูกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมพันธุ์ฮาวายในประเทศไทย และมีการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากการสุ่มตรวจมะละกอส่งออก ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ในปี พ.ศ. 2554 และในปี พ.ศ. 2555 สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรป ได้รายงานปัญหาสินค้าเกษตรของไทยที่ส่งออกมายังสหภาพยุโรปผ่านระบบเตือนภัยด้านอาหารและอาหารสัตว์ของสหภาพยุโรป หรือ Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) ตั้งแต่เดือนมกราคม-พฤศจิกายน 2555 ว่ามีการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากไทยทั้งหมด 10 ครั้ง โดยประเทศสมาชิกอียูที่ตรวจพบมากที่สุด ได้แก่

ฝรั่งเศส (5 ครั้ง), เยอรมนี (3 ครั้ง) และฟินแลนด์ (2 ครั้ง) เป็นต้น (สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรป, 2555)

เมื่อมีการพัฒนาสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมขึ้นมาหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม *Mon 810, Bt176* ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม *cp4-epsps* ฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม *CrylAb/Ac* และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 55-1, YK เป็นต้น และความกังวลในเรื่องความปลอดภัยของสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ รวมถึงสภาพแวดล้อม จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมควบคู่กันไปด้วย เพื่อประโยชน์ในการตรวจติดตาม และควบคุมสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมเหล่านี้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ในหลายระดับ เช่น ระดับโปรตีน (protein-based) ได้แก่ วิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) และ Lateral flow sticks การตรวจสอบระดับ trait-based เช่น Herbicide bioassays เป็นต้น และการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งแม้วิธีการตรวจสอบมีหลายวิธีด้วยกัน แต่เทคนิคที่ยอมรับในการทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมทางการค้า คือ วิธีพีซีอาร์ (Tripathi, 2005) เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะน่าเชื่อถือ อีกทั้งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับตามวัตถุประสงค์ของกฎระเบียบการควบคุมพืช อาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ดัดแปรพันธุกรรมระหว่างประเทศ (ประสาร สืบสุข และคณะ, 2554)

ซึ่งวิธีพีซีอาร์ สามารถตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชดัดแปรพันธุกรรมได้ โดยเฉพาะการตรวจสอบ event-specific ด้วยวิธีพีซีอาร์ สามารถจำแนกพืชดัดแปรพันธุกรรมแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันที่ยีนและโครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนเพื่อสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมเหล่านั้น ในการตรวจสอบยีนยันยีนที่มีการแปลรหัส (coding gene) โปรโมเตอร์ และเทอร์มิเนเตอร์ เป็นต้น (Holst-Jensen *et al.*, 2003) เช่น Kim *et al.* (2010) พัฒาการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในประเทศเกาหลี ด้วยวิธี Duplex PCR ให้สามารถตรวจสอบได้ทั้งตัวอย่างสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีน *papain* (endogenous gene ของมะละกอ) และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับ event gene ที่เจาะจงกับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ผลสามารถตรวจสอบและจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 จากพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ และมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมได้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพ ต่อมา Nakamura *et al*. (2011) พัฒนาวิธีการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-YK ซึ่งเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ได้รับการรับรองในผลิตภัณฑ์ที่มีมะละกอเป็นส่วนประกอบหลัก ด้วยวิธี Real-time PCR เชิงคุณภาพ โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากมะละกอสายพันธุ์ Sunset เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ ซึ่งเป็นการตรวจสอบแบบ construct specific ที่ใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับส่วนของยีน *CaMV35s* ที่เชื่อมต่อกับยีน *cp* ของ PRSV-YK และใช้ยีน *chymopapain* เป็นยีนตัวควบคุมภายใน (internal control gene) ในปี 2013 Nakamura *et al*. ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในผลิตภัณฑ์ที่มีมะละกอเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ มะละกอกระป๋อง มะละกอดอง ผลไม้อบแห้ง ชาใบมะละกอ แยม น้ำผลไม้ และขนมหวานแช่แข็ง โดยวิธี Real-time PCR ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชิงปริมาณของมะละกอ

ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Sunup และ Rainbow ซึ่งปนเปื้อนในตัวอย่างมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม ที่ระดับ 0.001% และ 0.01% ตามลำดับ และ LOD ของการตรวจสอบอยู่ในระดับ เท่ากับ 250 copies เมื่อเทียบกับพลาสมิดมาตรฐานที่เจือจางกับดีเอ็นเอของมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม และในปี 2014 Nakamura *et al*. ได้จำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์มะละกออบแห้งที่นำเข้าจากต่างประเทศในท้องตลาดของประเทศญี่ปุ่น ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของเวคเตอร์และยีน *cp* ที่ต้านทานต่อไวรัส PRSV สายพันธุ์จากประเทศไทย จึงให้ชื่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ว่า PRSV-SC และพัฒนาวิธีการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ ด้วยวิธี Real-time PCR เชิงคุณภาพ โดยการตรวจสอบแบบ construct specific โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีน *cp* ของ PRSV-SC และมียีน *chymopapain* เป็นยีนตัวควบคุมภายใน

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่า มีความพยายามในการพัฒนาการตรวจสอบมะละกอให้สามารถจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม รวมถึงตรวจสอบจำแนกจากพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ ด้วย ทั้งในรูปตัวอย่างสด และผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปรพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใดนั้น การตรวจสอบการปนเปื้อนเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ โดยวัสดุอ้างอิงนี้อยู่ในรูปตัวอย่างสดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ทราบสายพันธุ์ หรืออาจอยู่ในรูปพลาสมิดมาตรฐานซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *CaMV35s*, *Nos*, *cp*-55-1 และยีน *Gus* (Nakamura *et al*., 2013) ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของพลาสมิดเป็นวัสดุอ้างอิงนั้น สามารถเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์การปะปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม และยังเป็นตัวเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนว่ามีมากน้อยเพียงใดได้ โดยการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปพลาสมิดควรมียีนที่มีการแสดงออกปกติในพืชนั้นเชื่อมต่ออยู่กับยีนแปลกปลอมที่ถ่ายเข้าสู่พืชอยู่บนพลาสมิดเดียวกัน มีงานวิจัยหลายชิ้นใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายเป็นวัสดุอ้างอิง เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอในพืชดัดแปรพันธุกรรมหลายชนิด เช่น Wang *et al*. (2011) ได้สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปพลาสมิด pTLE8 ที่มีส่วนของยีน *LecI* (endogenous), *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *PAT*, *RRS*, *CryIA(c)*, *SadI* (endogenous), *RRS EPSPS* เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดและฝ้ายดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR เชิงปริมาณ และมีการสร้างพลาสมิดลักษณะเดียวกันนี้ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม เป็นต้น (Guan *et al*., 2011 และ Wang *et al*., 2014)

ดังนั้นการทดลองสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปของพลาสมิดเพื่อเป็นวัสดุอ้างอิงในการควบคุมการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการ น่าจะช่วยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสำหรับการตรวจสอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณให้ได้มาตรฐาน และถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น อีกทั้งช่วยลดการนำเข้าวัสดุอ้างอิงซึ่งมีราคาแพงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และ

เมื่อการตรวจสอบมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ย่อมส่งผลเชิงบวกต่อการควบคุมคุณภาพสินค้าส่งออกทางการเกษตรให้ปลอดการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรม และเฝ้าระวังการแพร่กระจายของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในพื้นที่ปลูกภายในประเทศ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Gene Amp® PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณตามสภาพจริง qT0wer 2.0 (analytikjena, Geramany)
3. เครื่องวัดปริมาณสารดีเอ็นเอ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific,USA)
4. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส
5. เครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอน (Centrifuge)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
8. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
9. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
10. หลอดไมโครเซนทริฟิวทิวป์
11. ไมโครปิเปต
12. ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Gene ruler DNA Ladder (Fermentas, UK) และ 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder (SibEnzyme Ltd., Russia)
13. อาหารลี้ยงเชื้อ 2xYT
14. competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10
15. สารปฏิชีวนะ kanamycin
16. เอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII
17. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอจากเจล Hiyield ™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC bioscience, Taiwan)
18. ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับสกัดพลาสมิด HiYield™ Plasmid Kit mini (RBC bioscience, Taiwan)
19. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ
20. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR

21. ชุด Big dye dideoxy termination kit (Bioneer, Korea)

22. มะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ PRSV-55-1, PRSV-SC และ PRSV-DOA

23. มะละกอไม่ดัดแปรพันธุกรรม

วิธีการ

1. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน

1.1 สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล

สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*), ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*), ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*), ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) และสายพันธุ์จากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) และยีน *papain* ของมะละกอ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR จากวารสารระดับนานาชาติ blast เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi? PROGRAM =blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

1.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus*, ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii, *cp*-SC, *cp*-DOA และยีน *Papain* มาเรียงกัน และเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน เพื่อประโยชน์ในการเพิ่มเติมหรือลดยีนที่ต้องการในภายหลัง จากนั้นใช้โปรแกรม Primer map (http://www.bioinformatics.org/sms2/primer_ map.html) ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมายที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ฮาวาย) และ GMOs-SC (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์เชียงใหม่) และ GMOs-DOA (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ขอนแก่น)

1.3 การสร้างชุดยีนสังเคราะห์และการสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สั่งสังเคราะห์ชุดยีนสังเคราะห์ที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus,* ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii และยีน *papain* ซึ่งมีขนาดประมาณ 624 bp, ชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-SC ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ขนาดประมาณ 502 bp และชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_DOA และ *papain* ขนาดประมาณ 1,379 bp โดยบริษัท Lifetechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนไพรเมอร์และโพรบสั่งสังเคราะห์โดยบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.4 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA เข้าสู่ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 โดยวิธีการ heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/L (อาหารคัดเลือก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นานข้ามคืน แล้วคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารใหม่ เพื่อสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี alkaline lysis โดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบขนาดเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล และตรวจความถูกต้องของพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์

2. การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.1 การทดสอบโคลนโดยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณยีน *CaMV 35S* และ *nos* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

1. Sterile water (Wisent Inc., Canada)	13.375	ไมโครลิตร
2. 5x Green Go Taq® Flexi buffer (Promega, USA)	5.00	ไมโครลิตร
3. 25 mM MgCl2 (Promega, USA)	1.50	ไมโครลิตร
4. 10 mM dNTP (Fermentas, Canada)	0.50	ไมโครลิตร
5. 20 µM ไพรเมอร์ 35s_F (Qiagen, Germany)	1.00	ไมโครลิตร
6. 20 µM ไพรเมอร์ 180R (Qiagen, Germany)	1.00	ไมโครลิตร
7. Go Taq® DNA Polymerase (Promega, USA)	0.125	ไมโครลิตร
8. plasmid DNA template (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2.50	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.00	ไมโครลิตร

ผสมสารทั้งหมดในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Gene Amp® PCR System 9700 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation	94	5 นาที	
Amplification	94	30 วินาที	40 รอบ
	52	30 วินาที	
	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	
Hold	4	∞	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide (0.5 mg/ml) ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 50 นาที กระแสไฟ 135 โวลต์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation

2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดพลาสมิดจากโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป HiYield™ Plasmid Kit mini จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดด้วยชุด Big dye dideoxy termination kit ด้วยไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำบนเวคเตอร์ คือ ไพรเมอร์ T7 promoter forward (5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´) จากนั้นเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานที่สังเคราะห์ขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs ต้นแบบที่ได้ออกแบบไว้ทั้งสามชุด ด้วยโปรแกรม ClustalW2, Multiple Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

3. การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1 เพื่อตรวจสอบยีน *cp*-SC และยีน *cp*-Hawaii ตามลำดับ ด้วยวิธี Real-time PCR ในดีเอ็นเอของพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง *RR* และข้าวโพด *Mon 863* เป็นต้น โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

Water,PCR grade (Roche, Switzerland)		3.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ F (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ R (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
10 µM โพรบ (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
2x Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland)		10	ไมโครลิตร
DNA template	Genomic DNA (10 ng/ul)	5.0	ไมโครลิตร
	หรือ Plasmid DNA (0.1 ng/ul)	5.0	ไมโครลิตร
	ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ hydrolysis โพรบ ด้วยเครื่อง qT0wer 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Pre-Incubation	95 °C	10 นาที	
Amplification	95	15 วินาที	50 รอบ
	60	1 นาที	

4. การศึกษาจำนวนชุด (copy number) ของดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.1 การเตรียมพลาสมิดมาตรฐานให้อยู่ในรูปเส้นตรงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดภายในเซลล์แบคทีเรีย และสกัดพลาสมิดดังกล่าวจากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Plasmid Kit mini วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer จากนั้นตัดดีเอ็นเอมาตรฐานทุกชุดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III โดยทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังนี้

- ปฏิกิริยาสำหรับดีเอ็นเอมาตรฐาน GMOs-Hawaii-C1

10x NEB buffer 2	5	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-Hawaii-C1	37.5	ไมโครลิตร (~3 ไมโครกรัม)
dH_2O	7.5	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-SC-C1

10x NEB buffer 2	8.5	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-SC-C1	47.5	ไมโครลิตร (~3 ไมโครกรัม)
dH_2O	18	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	3	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	85	ไมโครลิตร

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-DOA-C1

10x NEB buffer 2	8	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-DOA-C1	45	ไมโครลิตร (~1.2 ไมโครกรัม)
dH_2O	25	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	80	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตรวจสอบการตัดดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดให้เป็นเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad)

4.2 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เป็นเส้นตรงด้วยชุด Hiyield ™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่ให้ชื่อว่า linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ด้วยเครื่อง Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer

4.3 การคำนวณจำนวนชุด (copy number) ของพลาสมิดมาตรฐาน

คำนวณจำนวน copy number ของพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุด โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้คือ (Wei *et al*., 2012)

Number of copies = (amount * 6.022×10^{23}) / (length * 1×10^{9} * 650)

5. การหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR

หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีนที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี Real-time PCR ได้แก่ linear pGMOs-Hawaii-C1 ทดสอบด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R และ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 ส่วน linear pGMOs-SC-C1 ทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R และ SC-F_new/SC-R และ linear pGMOs-DOA-C1 ทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 3 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งหมดจะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100, 10, 1 ชุดต่อไมโครลิตร (copies/µl) นำไปทดสอบในปฏิกิริยา Real-time PCR แต่ละปฏิกิริยาปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบจะอยู่ที่ระดับ 250, 25 และ 2.5 ชุด (copies) ทำการทดสอบ จำนวน 9 ซ้ำ ในแต่ละไพรเมอร์ ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก คือ ดีเอ็นเอจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งสามสายพันธุ์ คือ PRSV-Hawaii, PRSV-SC และ PRSV-DOA ที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางกับดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ได้เปอร์เซ็นต์ความปนเปื้อนเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ คือ ดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR 1ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

Water, PCR grade (Roche, Switzerland)	6.0	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ F (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ R (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 µM โพรบ (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
2x Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland)	10	ไมโครลิตร
DNA template	2.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

ซึ่งสารเคมีข้างต้นจะถูกเตรียมแล้วหยอดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ hydrolysis โพรบ ด้วยเครื่อง qT0wer 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Pre-Incubation	95 °C	10 นาที	
Amplification	95	15 วินาที	50 รอบ
	60	1 นาที	

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลา : เดือนกันยายน 2557 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน

1.1 สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) และสายพันธุ์จากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) และยีน *papain* ของมะละกอ พบว่างานวิจัยของ Xu *et al*. (2008), Nakamura *et al*. (2013) และ Nakamura *et al*. (2014) ได้รายงานการตรวจสอบยีนที่กล่าวมาข้างต้นโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะด้วยวิธี Real-time PCR ดังแสดงในตารางที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น และโพรบจำนวน 6 เส้น

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)	reference
CaMV35S	35S-F	5' GCCTCTGCCGACAGTGGT 3'	82	Nakamura *et al.* (2013)
	35S-R	5' AAGACGTGGTTGGAACGTCTT 3'		
	35S-P	5' FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA 3'		
Gus	GUS Primer	5' GGCCGTCGAGTTTTTTGATTT 3'	75	Nakamura *et al.* (2013)
	P35S Primer	5' GATCCCCGGGTGGTCAGT 3'		
	GUS-P35S probe	5' FAM-CAGGACGTAACATAAGG-MGBNFQ 3'		
Nos	180-F	5' CATGTAATGCATGACGTTATTTATG 3'	84	Nakamura *et al.* (2013)
	180-R	5' TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT 3'		
	TM-180	5' FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA 3'		
*cp*_Hawaii	55-1 Primer 1	5' CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA 3'	71	Nakamura *et al.* (2013)
	55-1 Primer 2	5' TCCGCCTCCATCCAGTCTATT 3'		
	55-1 Probe	5' FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA 3'		
Papain	Papain-B1	5' AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA 3'	91	Xu *et al.* (2008)
	Papain-B2	5' AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG 3'		
	Papain-P	5' FAM-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-TAMRA 3'		
cp-SC	SC-F new	5'- CATTTCATTTGGAGAGAACACG-3'	70	Nakamura *et al.* (2014)
	SC-R	5' ACCAGCATCCACAGCTTC 3'		
	SC-P	5' FAM-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-TAMRA 3'		

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม blast เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn ก็ทำให้เราพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่เราต้องการศึกษา ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Zea mays transgenic* line NK603 promoter region เลข ACCESSION: KJ608140 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 82 คู่เบส

gaaaggccatcgttgaagatGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCaaagcaagtggattgatgt

ภาพที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) มีขนาด 82 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีเหลือง)

1.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase* (uidA), *coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 ในส่วนของยีน *gus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 75 คู่เบส

atccagactgaatgcccacaGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCctctagagtcccccgtgttc

ภาพที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) มีขนาด 75 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีเขียว)

1.1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase* (*uidA*), *coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 84 คู่เบส

gttaagcatgtaataattaaCATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAaatatagcgcgcaaactagg

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nos terminator* มีขนาด 84 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีเทา)

1.1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase (uidA)*, *coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 ในส่วนของยีน *coat protein* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 71 คู่เบส

tcgtgtatccacgattaatgCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAGTCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAtaaagttgcaggaccacttc

ภาพที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) มีขนาด 71 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีชมพู)

1.1.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *papain* ของมะละกอ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya papain mRNA*, complete cds เลข ACCESSION: M15203 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 91 คู่เบส

ccttggagtgcacttcaattAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGaaaggtccttatgcagccaa

ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *papain* ของมะละกอ มีขนาด 91 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีฟ้า)

1.1.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *coat protein (cp)* gene สายพันธุ์ Samut Sakhon SMK1 , Kanjanaburi KJR1 และ Chiangmai ที่มีเลข ACCESSION: DQ085864, DQ085859 และ DQ085856 ตามลำดับ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 70 คู่เบส

ttcctctatataaggaagttCATTTCATTTGGAGACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTcttaatgataagctcaaaga

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) ของมะละกอ มีขนาด 70 คู่เบส (แสดงในส่วนของตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่และระบายสีม่วง)

1.1.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *coat protein* (*cp*) gene ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Chiangmai, Chumporn, Ratchaburi ที่มีเลข ACCESSION: DQ085856, AY010713.1, AY010721.1 ตามลำดับ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 866 คู่เบส

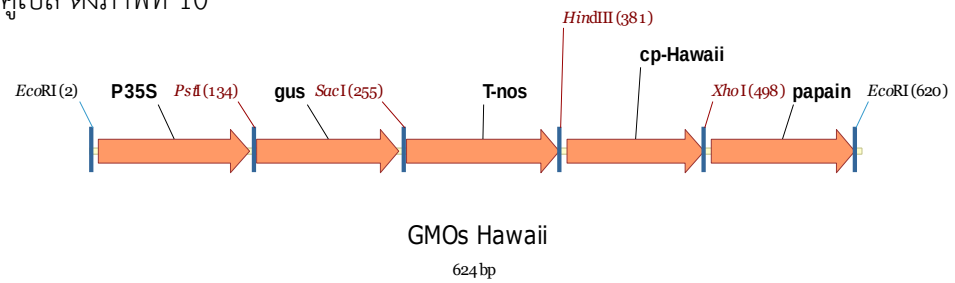
atggtccaagaatgaagctgtggatgctggtcttaatgagaagttcaaagataaagaaaaacagaaagaagaaaaagataaacaaaaaggtaaagaaaata
atgaagctagtgacggaaatgatgtgtcaactagcacaaaaactggagagagagatagagatgtcaatgccggaactagtggtactttcactgttccgagaata
aaattatttaccgacaagatgattttaccaagaattaagggaaaaactgtccttagtttaaatcatcttcttacgtataatccgcaacaaatagacatctcaaac
actcgtgccactcaatctcaattcgaaaagtggtatgagggagtgaggaatgattacggtcttaatgataacgaaatgcaagtgatgttaaatggtttgatggttt
ggtgccatcgaaaatggaacatccccagacatatctggtgtctgggtgatgatggatggggaaacccaagtcgattatcccatcaagccttttgatcgaacatgc
aactccttcgttcaggcaaatcatggctcacttcagtaacgcggcagaggcatacatcgcaaagaggaatgctactgagaggtacatgccgcggtatggaatc
aagaggaatctgactgacattagtctcgctagatatgctttcgacttctatgaggtgaactcaaaaacacctgatagggctcgtgaagctcatatgcagatgaag
gctgcagcgctgcgcaacactgatcgcagaatgtttggaatggacggcagtgtcagtaacaaggaagaaaacacggagagacacacagtggaagatgtcaac
agagacatgcactctctcctaggtatgcgcaattga

ภาพที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) ของมะละกอ มีขนาด 866 คู่เบส

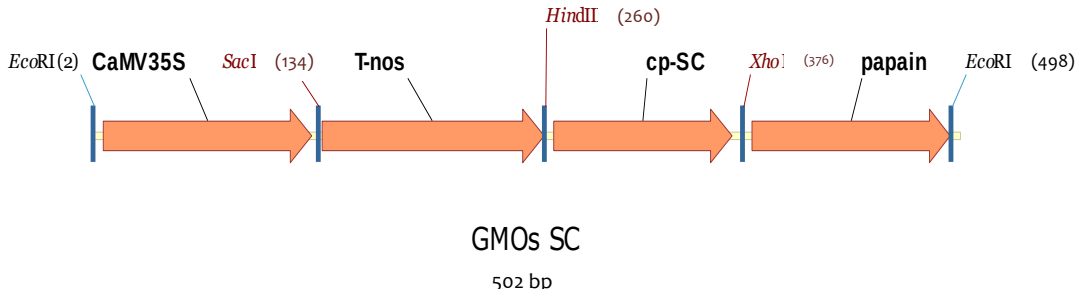
1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย

1.2.1 การออกแบบชุดยีนของดีเอ็นเอมาตรฐาน

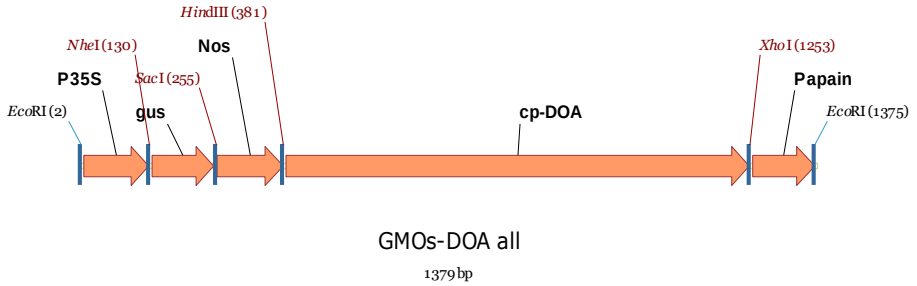
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus*, ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii, *cp*-SC, *cp*-DOA และยีน *Papain* มาเรียงกัน และเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-Hawaii มีขนาด 624 คู่เบส ดังภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs_SC มีขนาด 502 คู่เบส ดังภาพที่ 9 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs_DOA มีขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs-Hawaii ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii, papain ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, PstI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ



ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs-SC ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs_DOA ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_DOA และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, NheI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ

1.2.2 วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบจากตารางที่ 1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii, ชุดยีน GMOs-SC และชุดยีน GMOs-DOA โดยใช้โปรแกรม Primer map พบว่าไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมีความจำเพาะเจาะจงต่อชุดยีนทั้งสามชุด โดยชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 55-1, Gus, 180 และ papain ส่วนชุดยีน GMOs-SC ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35s, 180, papain และ SC และชุดยีน GMOs-DOA ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 180, Gus, และ papain เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 11-13

ตารางที่ 2 แสดงความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii, ชุดยีน GMOs-SC และชุดยีน GMOs-DOA โดยใช้โปรแกรม Primer map

ลำดับ	ยีน	Primer:	Sequence	ชุดยีน GMOs_Hawaii	ชุดยีน GMOs_SC	ชุดยีน GMOs_DOA
1	*CaMV35S*	35S-F	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	+	+	+
2		35S-R	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	+	+	+
3		35S-P	5'-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-3'	+	+	+
4	*cp*_Hawaii	55-1_Primer1	5'-CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3'	+	-	-
5		55-1_Primer2	5'-TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3'	+	-	-
6		55-1_Probe	5'-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-3'	+	-	-
7	*gus*	GUS_Primer	5'-GGCCGTCGAGTTTTTTGATTT-3'	+	-	+
8		P35S_Primer	5'-GATCCCCGGGTGGTCAGT-3'	+	-	+
9		GUS-P35S_probe	5'-CAGGACGTAACATAAGG-3'	+	-	+
10	*nos*	180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	+	+	+
11		180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT-3'	+	+	+
12		TM-180	5'-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-3'	+	+	+
13	*papain*	Papain-B1	5'-AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA-3'	+	+	+
14		Papain-B2	5'-AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG- 3'	+	+	+
15		Papain-P	5'-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-3'	+	+	+
16	*cp*_SC	SC-F_new	5'- CATTTCATTTGGAGAGAACACG-3'	-	+	-
17		SC-R	5'-ACCAGCATCCACAGCTTC-3'	-	+	-
18		SC-P	5'-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-3'	-	+	-

*หมายเหตุ + คือ detected และ – คือ not detected

```
                                                >>>35S-P>>> 47 to 68
                                >>>35S-F>>> 27 to 44
  1 E  F  E  R  P  S  L  K  M  P  L  P  T  V  V  P  K  M  D  P
  1 gaattcgaaaggccatcgttgaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccc
  1          10        20        30        40        50
  1 cttaagctttccggtagcaacttctacggagacggctgtcaccagggtttctacctggggg
                                <<<35S-R<<< 87 to 108
 21 H  P  R  G  A  S  W  K  K  K  T  F  Q  P  R  L  Q  S  K  W
 61 cacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtgg
 61          70        80        90        100       110
 61 gtgggtgctcctcgtagcaccttttttcttctgcaaggttggtgcagaagtttcgttcacc
                                        >>>GUS_Primer>>> 155 to 175
 41 I  D  V  C  R  S  R  L  N  A  H  R  P  S  S  F  L  I  S  R
121 attgatgtctgcagatccagactgaatgcccacaggccgtcgagtttttgatttcacgg
121         130       140       150       160       170
121 taactacagacgtctaggtctgacttacgggtgtccggcagctcaaaaaactaaagtgcc
                >>>GUS-P35S_probe>>> 194 to 210
                                    <<<P35S_Primer<<< 212 to 229
 61 V  G  V  S  T  G  R  N  I  R  D  *  P  P  G  D  P  L  E  S
181 gttggggtttctacaggacgtaacataagggactgaccacccggggatcctctagagtcc
181         190       200       210       220       230
181 caaccccaaagatgtcctgcattgtattccctgactggtgggcccctaggagatctcagg
                                        >>>180-F>>> 276 to 300
 81 P  V  F  E  L  V  K  H  V  I  I  N  M  *  C  M  T  L  F  M
241 cccgtgttcgagctcgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatttatg
241         250       260       270       280       290
241 gggcacaagctcgagcaattcgtacattattaattgtacattacgtactgcaataaatac
      >>>TM-180>>> 303 to 330
                                        <<<180-R<<< 335 to 359
101 R  W  V  F  M  I  R  V  P  Q  L  Y  I  *  Y  A  I  E  N  K
301 agatgggtttttatgattagagtcccgcaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaa
301         310       320       330       340       350
301 tctacccaaaaatactaatctcagggcgttaatatgtaaattatgcgctatcttttgttt
                                                >>>55-1_Primer1>>> 406 to 430
121 I  *  R  A  N  *  E  A  F  V  Y  P  R  L  M  Q  P  *  M  L
361 atatagcgcgcaaactaggaagctttcgtgtatccacgattaatgcagccttagatgctt
361         370       380       390       400       410
361 tatatcgcgcgtttgatccttcgaaagcacataggtgctaattacgtcggaatctacgaa
                >>>55-1_Probe>>> 432 to 454
                                        <<<55-1_Primer2<<< 456 to 476
141 Q  E  K  S  L  L  A  S  R  Q  Q  L  I  D  W  M  E  A  D  K
421 caagaaaagagtcttctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaa
421         430       440       450       460       470
421 gttcttttctcagaagatcgaagggccgttgttaattatctgacctacctccgcctattt
                                            >>>Papain-B1>>> 523 to 550
161 V  A  G  P  L  P  R  A  L  E  C  T  S  I  S  G  S  I  W  Y
481 gttgcaggaccacttcctcgagccttggagtgcacttcaattagtggctcaatatggtat
481         490       500       510       520       530
481 caacgtcctggtgaaggagctcggaacctcacgtgaagttaatcaccgagttataccata
                >>>Papain-P>>> 552 to 585
                                                <<<Papain-B2<<< 587 to 598
181 S  L  Q  K  Y  L  P  I  *  G  S  A  T  L  L  S  L  K  G  E
541 tcactacagaaatacttacccatatgagggagtgcaacgttattgtcgctcaagggagaa
541         550       560       570       580       590
541 agtgatgtctttatgaatgggtatactccctcacgttgcaataacagcgagttccctctt
201 R  S  L  C  S  Q  E  F
601 aggtccttatgcagccaagaattc
601         610       620
601 tccaggaatacgtcggttcttaag
```

ภาพที่ 11 แสดงการตรวจพบชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 55-1, Gus, 180 และ papain ของชุดยีน GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 624 คู่เบส โดยโปรแกรม primer map

```
                                                >>>35S-P>>> 47 to 68
                                >>>35S-F>>> 27 to 44
  1 E  F  E  R  P  S  L  K  M  P  L  P  T  V  V  P  K  M  D  P
  1 gaattcgaaaggccatcgttgaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccc
  1          10        20        30        40        50
  1 cttaagctttccggtagcaacttctacggagacggctgtcaccagggtttctacctgggg
                                <<<35S-R<<< 87 to 108
 21 H  P  R  G  A  S  W  K  K  K  T  F  Q  P  R  L  Q  S  K  W
 61 cacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtgg
 61          70        80        90        100       110
 61 gtgggtgctcctcgtagcaccttttttcttctgcaaggttggtgcagaagtttcgttcacc
                                          >>>180-F>>> 155 to 179
 41 I  D  V  S  S  L  S  M  *  *  L  T  C  N  A  *  R  Y  L  *
121 attgatgtgagctcgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatttatga
121         130       140       150       160       170
121 taactacactcgagcaattcgtacattattaattgtacattacgtactgcaataaatact
     >>>TM-180>>> 182 to 209
                                        <<<180-R<<< 214 to 238
 61 D  G  F  L  *  L  E  S  R  N  Y  T  F  N  T  R  *  K  T  K
181 gatgggtttttatgattagagtcccgcaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaaa
181         190       200       210       220       230
181 ctacccaaaaatactaatctcagggcgttaatatgtaaattatgcgctatcttttgtttt
                                                  >>>SC-F_new>>> 285 to 306
 81 Y  S  A  Q  T  R  K  L  F  L  Y  I  R  K  F  I  S  F  G  E
241 tatagcgcgcaaactaggaagcttttcctctatataaggaagttcatttcatttggagag
241         250       260       270       280       290
241 atatcgcgcgtttgatccttcgaaaaggagatatattccttcaagtaaagtaaacctctc
              >>>SC-P>>> 311 to 332
                                            <<<SC-R<<< 337 to 354
101 N  T  G  D  S  R  G  S  M  S  K  N  E  A  V  D  A  G  L  N
301 aacacgggggactctagaggatccatgtccaaaaatgaagctgtggatgctggtcttaat
301         310       320       330       340       350
301 ttgtgccccctgagatctcctaggtacaggtttttacttcgacacctacgaccagaatta
                                                >>>Papain-B1>>> 401 to 428
121 D  K  L  K  D  S  S  L  G  V  H  F  N  *  W  L  N  M  V  F
361 gataagctcaaagactcgagccttggagtgcacttcaattagtggctcaatatggtattc
361         370       380       390       400       410
361 ctattcgagtttctgagctcggaacctcacgtgaagttaatcaccgagttataccataag
              >>>Papain-P>>> 430 to 463
                                                  <<<Papain-B2<<< 465 to 476
141 T  T  E  I  L  T  H  M  R  E  C  N  V  I  V  A  Q  G  R  K
421 actacagaaatacttacccatatgagggagtgcaacgttattgtcgctcaagggagaaag
421         430       440       450       460       470
421 tgatgtctttatgaatgggtatactccctcacgttgcaataacagcgagttccctctttc
161 V  L  M  Q  P  R  I
481 gtccttatgcagccaagaattc
481         490       500
481 caggaatacgtcggttcttaag
```

ภาพที่ 12 แสดงการตรวจพบชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 180, papain และ SC ของชุดยีน GMOs-SC ที่มีขนาด 502 คู่เบส โดยโปรแกรม primer map

```
                                                >>>35S-P>>> 47 to 68
                                >>>35S-F>>> 27 to 44
  1 E  F  E  R  P  S  L  K  M  P  L  P  T  V  V  P  K  M  D  P
  1 gaattcgaaaggccatcgttgaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagatggacccc
  1          10        20        30        40        50
  1 cttaagctttccggtagcaacttctacggagacggctgtcaccagggtttctacctgggg
                                <<<35S-R<<< 87 to 108
 21 H  P  R  G  A  S  W  K  K  K  T  F  Q  P  R  L  Q  S  K  W
 61 cacccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtgg
 61          70        80        90        100       110
 61 gtgggtgctcctcgtagcaccttttcttctgcaaggttggtgcagaagtttcgttcacc
                                        >>>GUS_Primer>>> 155 to 175
 41 I  D  V  L  A  S  R  L  N  A  H  R  P  S  S  F  L  I  S  R
121 attgatgtgctagcatccagactgaatgcccacaggccgtcgagtttttgatttcacgg
121         130       140       150       160       170
121 taactacacgatcgtaggtctgacttacgggtgtccggcagctcaaaaaactaaagtgcc
                >>>GUS-P35S_probe>>> 194 to 210
                                <<<P35S_Primer<<< 212 to 229
 61 V  G  V  S  T  G  R  N  I  R  D  *  P  P  G  D  P  L  E  S
181 gttggggtttctacaggacgtaacataagggactgaccacccggggatcctctagagtcc
181         190       200       210       220       230
181 caaccccaaagatgtcctgcattgtattccctgactggtgggcccctaggagatctcagg
                                        >>>180-F>>> 276 to 300
 81 P  V  F  E  L  V  K  H  V  I  I  N  M  *  C  M  T  L  F  M
241 cccgtgttcgagctcgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacgttatttatg
241         250       260       270       280       290
241 gggcacaagctcgagcaattcgtacattattaattgtacattacgtactgcaataaatac
      >>>TM-180>>> 303 to 330
                                        <<<180-R<<< 335 to 359
101 R  W  V  F  M  I  R  V  P  Q  L  Y  I  *  Y  A  I  E  N  K
301 agatgggtttttatgattagagtcccgcaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaa
301         310       320       330       340       350
301 tctacccaaaaatactaatctcagggcgttaatatgtaaattatgcgctatcttttgttt
121 I  *  R  A  N  *  E  A  Y  G  P  R  M  K  L  W  M  L  V  L
361 atatagcgcgcaaactaggaagcttatggtccaagaatgaagctgtggatgctggtctta
361         370       380       390       400       410
361 tatatcgcgcgtttgatccttcgaataccaggttcttacttcgacacctacgaccagaat
141 M  R  S  S  K  I  K  K  N  R  K  K  K  K  I  N  K  K  V  K
421 atgagaagttcaaagataaagaaaaacagaaagaagaaaaagataaacaaaaaggtaaag
421         430       440       450       460       470
421 tactcttcaagtttctatttctttttgtctttcttcttttctatttgtttttccatttc
161 K  I  M  K  L  V  T  E  M  M  C  Q  L  A  Q  K  L  E  R  E
481 aaaataatgaagctagtgacggaaatgatgtgtcaactagcacaaaaactggagagagag
481         490       500       510       520       530
481 ttttattacttcgatcactgcctttactacacagttgatcgtgtttttgacctctctctc
181 I  E  M  S  M  P  E  L  V  V  L  S  L  F  R  E  *  N  Y  L
541 atagagatgtcaatgccggaactagtggtactttcactgttccgagaataaaattattta
541         550       560       570       580       590
541 tatctctacagttacggccttgatcaccatgaaagtgacaaggctcttattttaataaat
201 P  T  R  *  F  Y  Q  E  L  R  E  K  L  S  L  V  *  I  I  F
601 ccgacaagatgattttaccaagaattaagggaaaaactgtccttagtttaaatcatcttc
601         610       620       630       640       650
601 ggctgttctactaaaatggttcttaattcccttttttgacaggaatcaaatttagtagaag
221 L  R  I  I  R  N  K  *  T  S  Q  T  L  V  P  L  N  L  N  S
661 ttacgtataatccgcaacaaatagacatctcaaacactcgtgccactcaatctcaattcg
661         670       680       690       700       710
661 aatgcatattaggcgttgtttatctgtagagtttgtgagcacggtgagttagagttaagc
241 K  S  G  M  R  E  *  G  M  I  T  V  L  M  I  T  K  C  K  *
721 aaaagtggtatgagggagtgaggaatgattacggtcttaatgataacgaaatgcaagtga
721         730       740       750       760       770
721 ttttcaccatactccctcactccttactaatgccagaattactattgctttacgttcact
261 C  *  M  V  *  W  F  G  A  I  E  N  G  T  S  P  D  I  S  G
781 tgttaaatggtttgatggtttggtgccatcgaaaatggaacatccccagacatatctggt
781         790       800       810       820       830
781 acaatttaccaaactaccaaaccacggtagcttttaccttgtaggggtctgtatagacca
281 V  W  V  M  M  D  G  E  T  Q  V  D  Y  P  I  K  P  L  I  E
841 gtctgggtgatgatggatggggaaacccaagtcgattatcccatcaagcctttgatcgaa
841         850       860       870       880       890
841 cagacccactactacctacccctttgggttcagctaatagggtagttcggaaactagctt
301 H  A  T  P  S  F  R  Q  I  M  A  H  F  S  N  A  A  E  A  Y
901 catgcaactccttcgttcaggcaaatcatggctcacttcagtaacgcggcagaggcatac
901         910       920       930       940       950
```

```
 901 gtacgttgaggaagcaagtccgtttagtaccgagtgaagtcattgcgccgtctccgtatg
 321 I  A  K  R  N  A  T  E  R  Y  M  P  R  Y  G  I  K  R  N  L
 961 atcgcaaagaggaatgctactgagaggtacatgccgcggtatggaatcaagaggaatctg
 961          970       980       990       1000      1010
 961 tagcgtttctccttacgatgactctccatgtacggcgccataccttagttctccttagac
 341 T  D  I  S  L  A  R  Y  A  F  D  F  Y  E  V  N  S  K  T  P
1021 actgacattagtctcgctagatatgctttcgacttctatgaggtgaactcaaaaacacct
1021          1030      1040      1050      1060      1070
1021 tgactgtaatcagagcgatctatacgaaagctgaagatactccacttgagtttttgtgga
 361 D  R  A  R  E  A  H  M  Q  M  K  A  A  A  L  R  N  T  D  R
1081 gatagggctcgtgaagctcatatgcagatgaaggctgcagcgctgcgcaacactgatcgc
1081          1090      1100      1110      1120      1130
1081 ctatcccgagcacttcgagtatacgtctacttccgacgtcgcgacgcgttgtgactagcg
 381 R  M  F  G  M  D  G  S  V  S  N  K  E  E  N  T  E  R  H  T
1141 agaatgtttggaatggacggcagtgtcagtaacaaggaagaaaacacggagagacacaca
1141          1150      1160      1170      1180      1190
1141 tcttacaaaccttacctgccgtcacagtcattgttccttcttttgtgcctctctgtgtgt
 401 V  E  D  V  N  R  D  M  H  S  L  L  G  M  R  N  *  L  E  P
1201 gtggaagatgtcaacagagacatgcactctctcctaggtatgcgcaattgactcgagcct
1201          1210      1220      1230      1240      1250
1201 caccttctacagttgtctctgtacgtgagagaggatccatacgcgttaactgagctcgga
                                                >>>Papain-P>>> 1307 to 1340
                        >>>Papain-B1>>> 1278 to 1305
 421 W  S  A  L  Q  L  V  A  Q  Y  G  I  H  Y  R  N  T  Y  P  Y
1261 tggagtgcacttcaattagtggctcaatatggtattcactacagaaatacttacccatat
1261          1270      1280      1290      1300      1310
1261 acctcacgtgaagttaatcaccgagttataccataagtgatgtctttatgaatgggtata
                            <<<Papain-B2<<< 1342 to 1353
 441 E  G  V  Q  R  Y  C  R  S  R  E  K  G  P  Y  A  A  K  N
1321 gagggagtgcaacgttattgtcgctcaagggagaaaggtccttatgcagccaagaattc
1321          1330      1340      1350      1360      1370
1321 ctccctcacgttgcaataacagcgagttccctctttccaggaatacgtcggttcttaag
```

ภาพที่ 13 แสดงการตรวจพบชุดไพรเมอร์และโพรบ 35s, 180, gus และ papain ของชุดยีน GMOs_DOA ที่มีขนาด 1,379 คู่เบส โดยโปรแกรม primer map

1.3 การสร้างชุดยีนสังเคราะห์และการสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างชุดดีเอ็นเอมาตรฐานและสั่งสังเคราะห์ชุดยีนสังเคราะห์ ได้ชุดยีนสังเคราะห์เพื่อสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานจำนวน 3 ชุด ที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S* ยีน *gus* ยีน *nos* ยีน *cp*-Hawaii และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 624 bp, ชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-SC ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*-SC และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 502 bp และชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S*, *gus*, *nos, cp*-DOA และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 1,379 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนที่สังเคราะห์ได้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไดท์ของชุดยีน GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA ที่ออกแบบไว้ สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 14, ภาพที่ 15, ภาพที่ 16 และภาพที่ 16 (ต่อ) ตามลำดับ) ซึ่งชุดยีนสังเคราะห์ทั้งสามชุดที่สังเคราะห์ขึ้นได้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ได้พลาสมิดลูกผสม ชื่อ GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่มีขนาด 2,795 คู่เบส และพลาสมิด GMOs-DOA มีขนาด 3,657 คู่เบส ซึ่งบนพลาสมิด backbone ของชุดยีนทั้งสามมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker สามารถใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin คัดเลือกโคลนที่ได้รับชุดยีนสังเคราะห์ในขั้นตอนการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมได้ (ภาพที่ 17, ภาพที่ 18 และภาพที่ 19 ตามลำดับ)

Name of the gene **GMOs_Hawaii**

optimized for Non optimized

Upper sequence: as provided
Lower sequence: as sequenced

Sequence identity: 100%

```
                                                        GAATTCGAAAG
                                                        ||||||||||||
     CGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGGCGCGCCAGAATTCGAAAG
   1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG
  61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTCTG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTCTG
 121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     CAGATCCAGACTGAATGCCCACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTC
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     CAGATCCAGACTGAATGCCCACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTC
 181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TACAGGACGTAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGA
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TACAGGACGTAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGA
 241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GCTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTT
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     GCTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTT
 301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGC
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGC
 361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     AAACTAGGAAGCTTTCGTGTATCCACGATTAATGCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     AAACTAGGAAGCTTTCGTGTATCCACGATTAATGCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAG
 421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
 481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     ACTTCCTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAA
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ACTTCCTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAA
 541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATG
 601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     CAGCCAAGAATTC
     |||||||||||||
     CAGCCAAGAATTCATTAATTAATGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACT
 661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GC
 721 --
```

ภาพที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-Hawaii ที่สังเคราะห์ยีนขึ้น (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นล่าง) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-Hawaii ที่ออกแบบไว้ (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นบน) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน 100 เปอร์เซ็นต์

Name of the gene **GMOs-SC_new**

optimized for Non optimized

Upper sequence: as provided
Lower sequence: as sequenced

Sequence identity: 100%

```
                                                  ------------------------------------------------GAATTCGAAAG
                                                                                                  ||||||||||||
                                                  CTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCAGAATTCGAAAG
                                                1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG
                                               61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAG
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAG
                                              121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  CTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTT
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  CTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTT
                                              181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  ATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCA
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  ATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCA
                                              241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  AACTAGGAAGCTTTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGA
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  AACTAGGAAGCTTTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGA
                                              301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  CTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAA
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  CTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAA
                                              361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  AGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAAT
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  AGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAAT
                                              421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  ACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCA
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                                  ACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCA
                                              481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                                  GCCAAGAATTC-----------------------------------------------
                                                  ||||||||||||
                                                  GCCAAGAATTCATTAATTAACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGCCCGCTTTCCAGT
                                              541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
```

ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-SC ที่สังเคราะห์ยีนขึ้น (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นล่าง) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-SC ที่ออกแบบไว้ (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นบน) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน 100 เปอร์เซ็นต์

Name of the gene **GMOs-DOA_all**

optimized for Non optimized

Upper sequence: as provided
Lower sequence: as sequenced

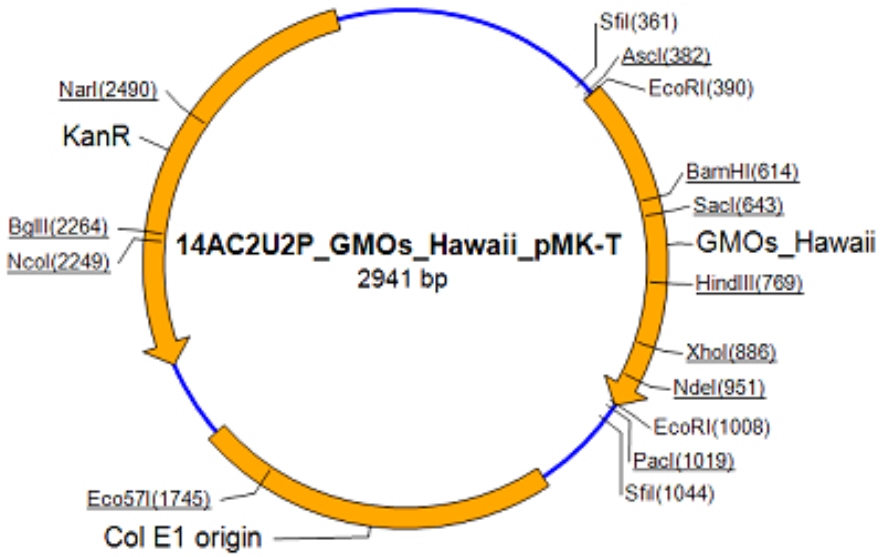
Sequence identity: 100%

```
                                         ----------------------------------------GAATTCGAAAGGCCATCGTT
                                                                                 ||||||||||||||||||||
                                         CACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGAATTCGAAAGGCCATCGTT
   1                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         GAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTG
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         GAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTG
  61                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         GAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGCTAGCATCCAG
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         GAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGCTAGCATCCAG
 121                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         ACTGAATGCCCACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACG
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         ACTGAATGCCCACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACG
 181                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         TAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGAGCTCGTTAA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         TAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGAGCTCGTTAA
 241                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAG
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAG
 301                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         AGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         AGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGA
 361                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         AGCTTATGGTCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGTTCAAAGATAAA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         AGCTTATGGTCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGTTCAAAGATAAA
 421                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         GAAAAACAGAAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGAC
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         GAAAAACAGAAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGAC
 481                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         GGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         GGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGA
 541                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

                                         ACTAGTGGTACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                         ACTAGTGGTACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCA
 601                                     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
```

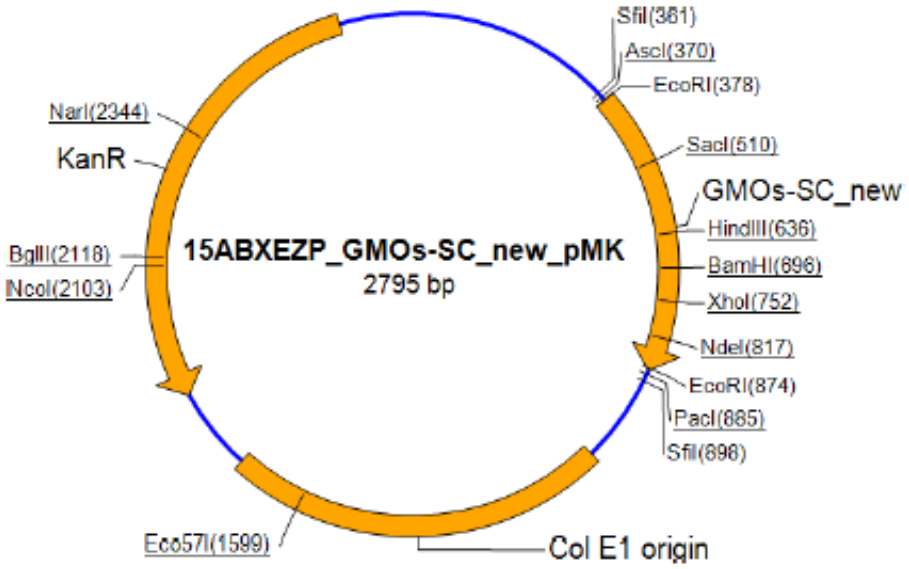
ภาพที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-DOA ที่สังเคราะห์ยีนขึ้น (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นล่าง) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-Hawaii ที่ออกแบบไว้ (ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นบน) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน 100 เปอร์เซ็นต์

```
     AGAATTAAGGGAAAAACTGTCCTTAGTTTAAATCATCTTCTTACGTATAATCCGCAACAA
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     AGAATTAAGGGAAAAACTGTCCTTAGTTTAAATCATCTTCTTACGTATAATCCGCAACAA
 661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     ATAGACATCTCAAACACTCGTGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGTGGTATGAGGGAGTG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ATAGACATCTCAAACACTCGTGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGTGGTATGAGGGAGTG
 721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     AGGAATGATTACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAAGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTT
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     AGGAATGATTACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAAGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTT
 781 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TGGTGCCATCGAAAATGGAACATCCCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATGGATGG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TGGTGCCATCGAAAATGGAACATCCCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATGGATGG
 841 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GGAAACCCAAGTCGATTATCCCATCAAGCCTTTGATCGAACATGCAACTCCTTCGTTCAG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     GGAAACCCAAGTCGATTATCCCATCAAGCCTTTGATCGAACATGCAACTCCTTCGTTCAG
 901 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GCAAATCATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATGCTAC
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     GCAAATCATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATGCTAC
 961 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGGAATCTGACTGACATTAGTCTCGCTAG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGGAATCTGACTGACATTAGTCTCGCTAG
1021 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     ATATGCTTTCGACTTCTATGAGGTGAACTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCA
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ATATGCTTTCGACTTCTATGAGGTGAACTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCA
1081 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACACTGATCGCAGAATGTTTGGAATGGACGG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACACTGATCGCAGAATGTTTGGAATGGACGG
1141 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     CAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGA
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     CAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGA
1201 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     CATGCACTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGT
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     CATGCACTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGT
1261 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     GGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     GGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG
1321 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     TCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTC---------------------
     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTCCTGGGCCTCATGGGCCTTCCT
1381 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+

     --------------------
     TTCACTGCCCGCTTTCCAG
1441 ---------+---------
```

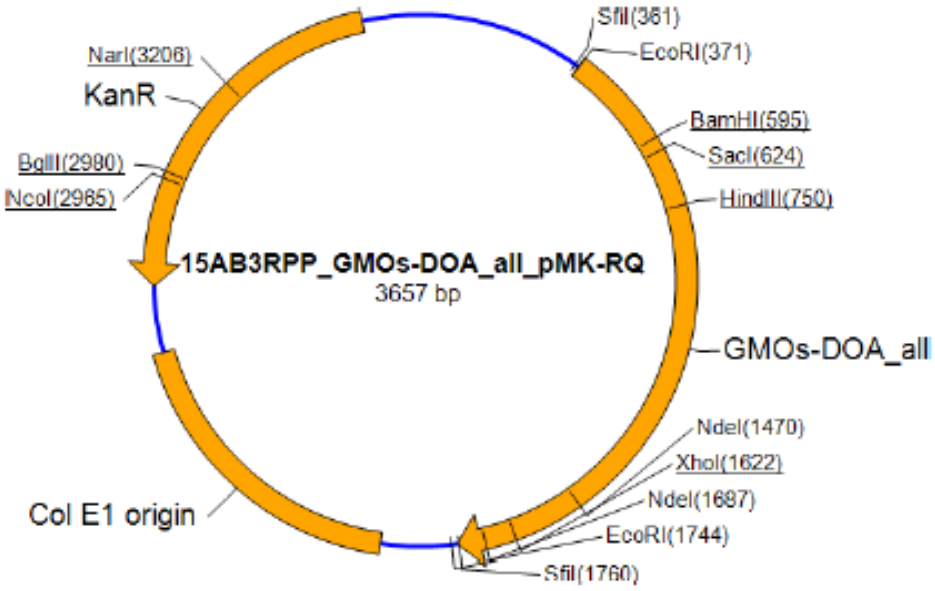
ภาพที่ 16 (ต่อ)



ภาพที่ 17 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ขนาด 2,941 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-Hawaii ขนาด 624 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker



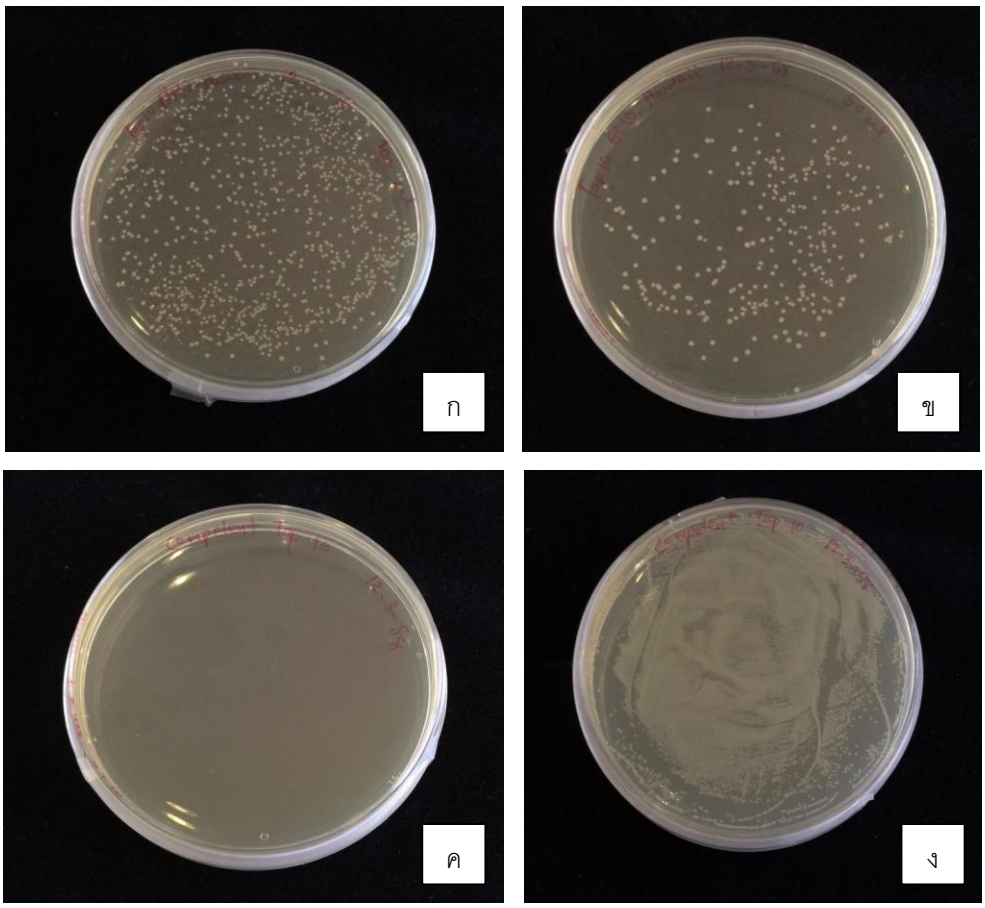
ภาพที่ 18 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาด 2,795 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-Sc ขนาด 502 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker



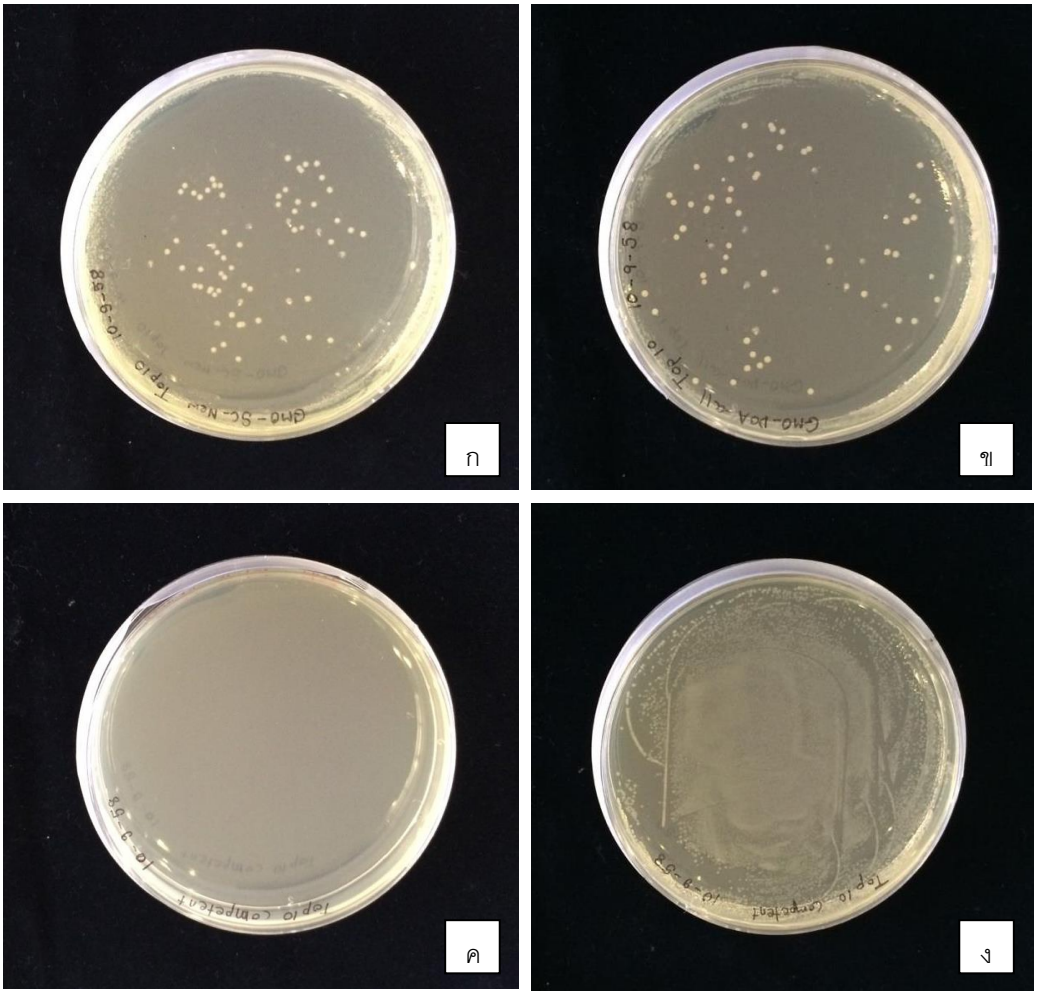
ภาพที่ 19 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ขนาด 3,657 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ขนาด 1,379 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker

1.4 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

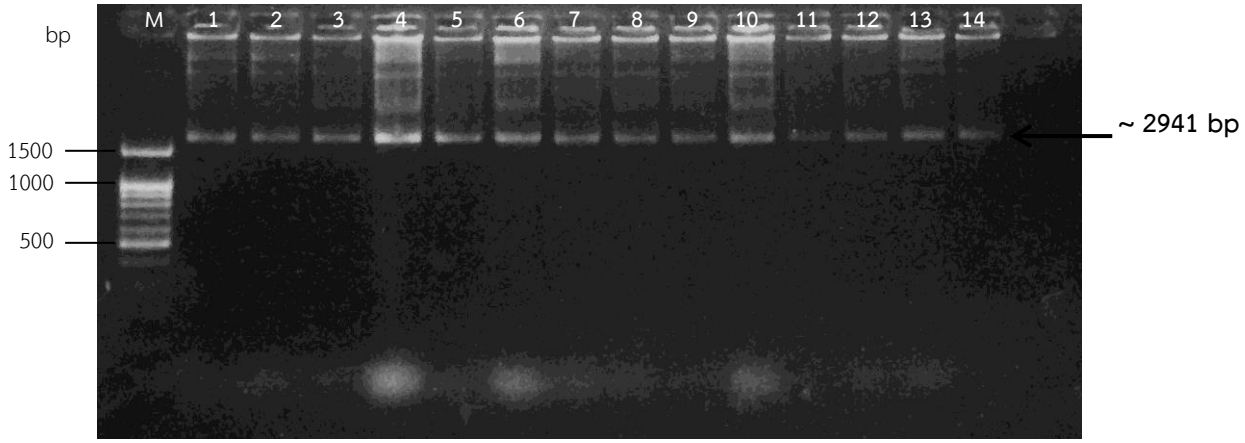
ผลการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาด 2,795 คู่เบส และ GMOs-SDOA ขนาด 3,657 คู่เบส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดลูกผสมจำนวนมากสามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/L ได้ (อาหารคัดเลือก) (GMOs-Hawaii ภาพที่ 20 ก และข) (GMOs-SC ภาพที่ 21 ก และ GMOs-DOA ภาพที่ 21 ข) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม พบว่าไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้เลย (ภาพที่ 20 ค และภาพที่ 21 ค) แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ (ภาพที่ 20 ง และภาพที่ 21 ง) ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชนิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide พบว่าพลาสมิด GMOs-Hawaii จาก 14 โคโลนี, พลาสมิด GMOs-SC จาก 10 โคโลนี และพลาสมิด GMOs-DOA จาก 10 โคโลนี มีขนาด >1500 คู่เบส ทุกโคลน เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 22 และ 23)



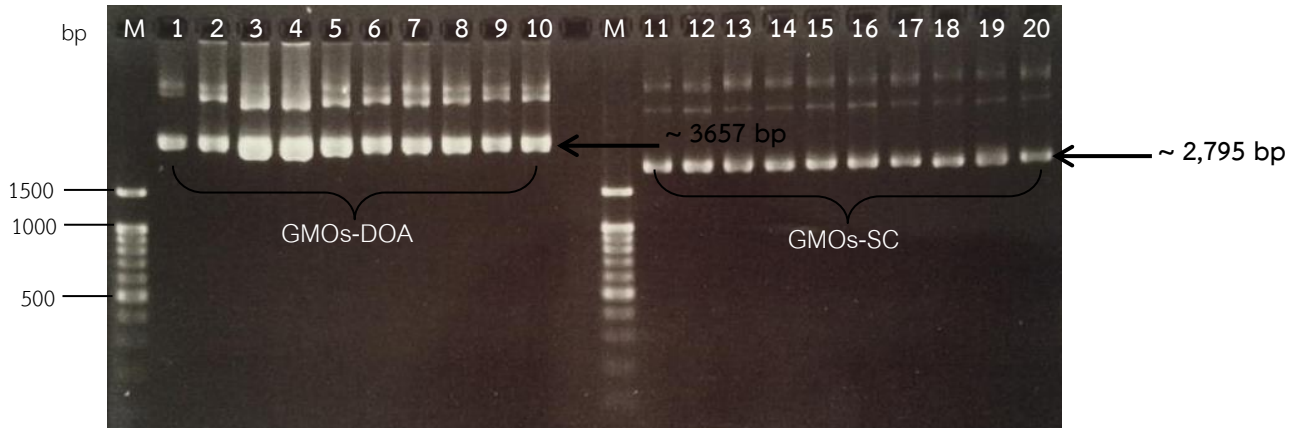
ภาพที่ 20 แสดงการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 2,941 คู่เบส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 (ก) โคลนที่คาดว่าจะได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก (ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำ heat-shock 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก) (ข) โคลนที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดลูกผสมซึ่งสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก (ใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำ heat-shock ปริมาตร 50ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก) (ค) แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (ง) แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเลี้ยงบนบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ



ภาพที่ 21 แสดงการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่มีขนาด 2,795 คู่เบส และ GMOs-DOA ที่มีขนาด 3,657 คู่เบส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 (ก) โคลนที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่เจริญเติบโตบนคัดเลือก, (ข) โคลนที่คาดว่าจะได้พลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ที่เจริญเติบโตบนคัดเลือก, (ค) แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก, (ง) แบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ



ภาพที่ 22 แสดงขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารจำนวนทั้งหมด 14 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 14 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ



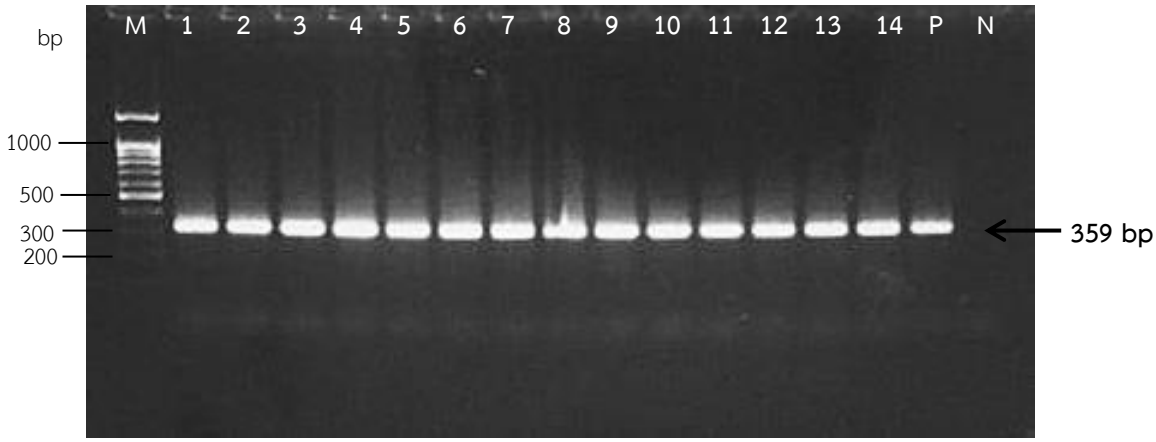
ภาพที่ 23 แสดงขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารจำนวนทั้งหมด 10 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิด GMOs-DOA ที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 10 ช่องที่ 11 ถึง 20 คือ พลาสมิด GMOs-SC ที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 10

2. การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน

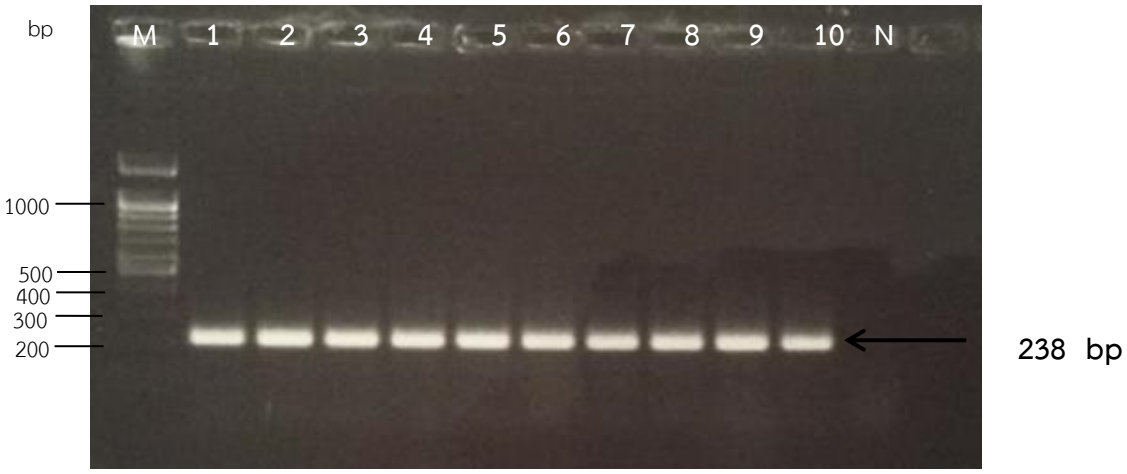
2.1 การทดสอบโคลนโดยวิธีพีซีอาร์

ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii และ GMOs-DOA จากทุกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก (ภาพที่ 24 และ 26) และตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC จากทุกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกเช่นกัน

(ภาพที่ 25) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่พบมีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในชุดพลาสมิดสังเคราะห์ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก และไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ

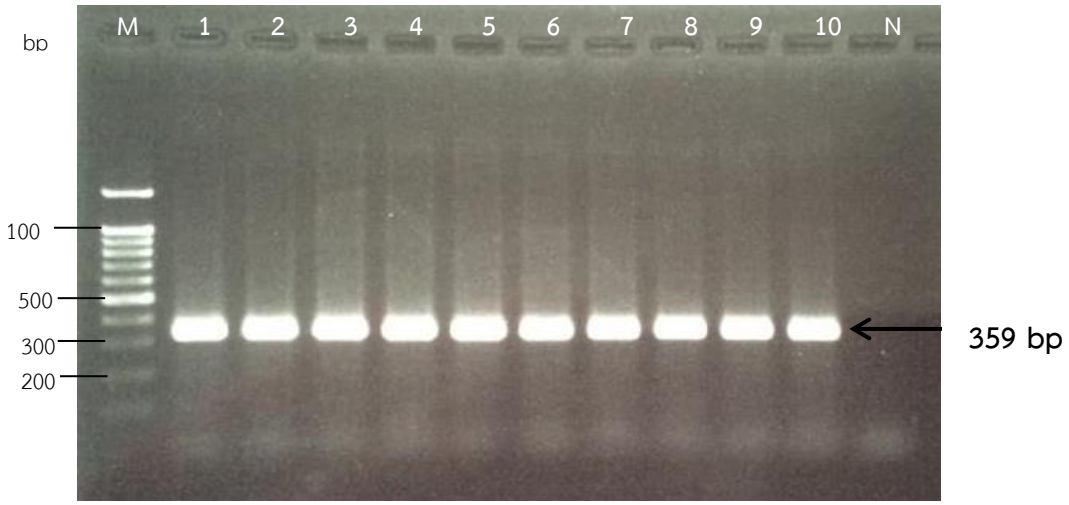


ภาพที่ 24 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส ด้วยวิธีพีซีอาร์ บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก จำนวนทั้งสิ้น 14 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 14 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ ส่วนช่องที่ 15 คือ Positive control (พลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่สังเคราะห์ขึ้น) และช่องที่ 15 คือ negative control (dH_2O)



ภาพที่ 25 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก ด้วยวิธีพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน GMOs-SC โคโลนีที่ 1 ถึง 10 และช่องที่ 11 คือ negative control (dH_2O)



ภาพที่ 26 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ด้วยวิธี PCR เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน GMOs-DOA โคโลนีที่ 1 ถึง 10 และช่องที่ 11 คือ negative control (dH_2O)

2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-Hawaii ด้วยเครื่องอัตโนมัติ พบว่าลำดับนิวคลีโอไดท์จากพลาสมิดลูกผสมโคโลนีที่ 1 (GMOs-Hawaii-c1) วิเคราะห์ได้ความยาวประมาณ 668 คู่เบส ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมโคโลนีที่ 8 (GMOs-Hawaii-c8) วิเคราะห์ความยาวได้ประมาณ 702 คู่เบส เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ต้นแบบที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-Hawaii-c1 และ GMOs-Hawaii-c8 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ต้นแบบ (ในส่วนของชุดยีน GMOs-Hawaii) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 27) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-SC จากโคโลนีที่ 1 (GMOs-SC-c1) วิเคราะห์ได้ความยาวประมาณ 582 คู่เบส, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-DOA จากโคโลนีที่ 1 (GMO DOA-c1) วิเคราะห์ความยาวได้ประมาณ 1,392 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC และ GMOs-DOA ต้นแบบที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-SC-c1 และ GMOs-DOA-c1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมต้นแบบ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 28 และ 29)

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
GMO_Hawaii          ------------------------GAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 36
GMO_hawaii-c8       CACGTGTCTTGTCCAGGCGCGCCAGAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 60
GMO_hawaii-C1       -------------CAGGCGCGCCAGAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCG 47
                                             ************************************

GMO_Hawaii          ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTC 96
GMO_hawaii-c8       ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTC 120
GMO_hawaii-C1       ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTC 107
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTCTGCAGATCCAGACTGAATGCCCACAGG 156
GMO_hawaii-c8       CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTCTGCAGATCCAGACTGAATGCCCACAGG 180
GMO_hawaii-C1       CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTCTGCAGATCCAGACTGAATGCCCACAGG 167
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          CCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACATAAGGGACTGA 216
GMO_hawaii-c8       CCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACATAAGGGACTGA 240
GMO_hawaii-C1       CCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACGTAACATAAGGGACTGA 227
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          CCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGAGCTCGTTAAGCATGTAATAATTAAC 276
GMO_hawaii-c8       CCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGAGCTCGTTAAGCATGTAATAATTAAC 300
GMO_hawaii-C1       CCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCGAGCTCGTTAAGCATGTAATAATTAAC 287
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          ATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATAC 336
GMO_hawaii-c8       ATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATAC 360
GMO_hawaii-C1       ATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATAC 347
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          ATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGAAGCTTTCGTGTATCCA 396
GMO_hawaii-c8       ATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGAAGCTTTCGTGTATCCA 420
GMO_hawaii-C1       ATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGAAGCTTTCGTGTATCCA 407
                    ************************************************************


GMO_Hawaii          CGATTAATGCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAGTCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 456
GMO_hawaii-c8       CGATTAATGCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAGTCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 480
GMO_hawaii-C1       CGATTAATGCAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGAGTCTTCTAGCTTCCCGGCAACAATTA 467
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCCTCGAGCCTTGGAGTGCACT 516
GMO_hawaii-c8       ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCCTCGAGCCTTGGAGTGCACT 540
GMO_hawaii-C1       ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCCTCGAGCCTTGGAGTGCACT 527
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          TCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCA 576
GMO_hawaii-c8       TCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCA 600
GMO_hawaii-C1       TCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCA 587
                    ************************************************************

GMO_Hawaii          ACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTC------------ 624
GMO_hawaii-c8       ACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTCATTAATTAATGG 660
GMO_hawaii-C1       ACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTCATTAATTAATGG 647
                    ***********************************************

GMO_Hawaii          ------------------------------------------
GMO_hawaii-c8       AGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGCCCGCT 702
GMO_hawaii-C1       AGCACAAGACTGGCCTCATGG--------------------- 668
```

ภาพที่ 27 แสดงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMO Hawaii-c1 และ GMO Hawaii-c8 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMO Hawaii ต้นแบบ (ในส่วนของชุดยีน GMO Hawaii) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

```
GMO_SC             1 GAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA     50
                                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1          1 ------------CCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA     38

GMO_SC            51 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAC    100
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1         39 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAC     88

GMO_SC           101 CACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAGCTCGTTAAGCATGTAATAA    150
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1         89 CACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAGCTCGTTAAGCATGTAATAA    138

GMO_SC           151 TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGA    200
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        139 TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGA    188

GMO_SC           201 GTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGC    250
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        189 GTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGC    238

GMO_SC           251 AAACTAGGAAGCTTTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAG    300
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        239 AAACTAGGAAGCTTTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAG    288

GMO_SC           301 AACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTGTGGATGC    350
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        289 AACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTGTGGATGC    338

GMO_SC           351 TGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATT    400
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        339 TGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATT    388

GMO_SC           401 AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAG    450
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        389 AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAG    438

GMO_SC           451 TGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAAT    500
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_SC_C1        439 TGCAACGTTATTGTCGCTCAAGGGAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAAT    488

GMO_SC           501 TC-------------------------------------------------    502
                     ||
GMO_SC_C1        489 TCATTAATTAACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGCCCGCTTTCCAG    538

GMO_SC           503 ---------------------------------------------          502

GMO_SC_C1        539 TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTG          582
```

ภาพที่ 28 แสดงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-SC-c1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ต้นแบบ (ในส่วนของชุดยีน GMOs-SC) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

```
GMO_DOA            1 GAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA     50
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1         1 GAATTCGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA     50

GMO_DOA           51 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAC    100
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1        51 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAC    100

GMO_DOA          101 CACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGCTAGCATCCAGACTGAATGCC    150
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       101 CACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGCTAGCATCCAGACTGAATGCC    150

GMO_DOA          151 CACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACG    200
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       151 CACAGGCCGTCGAGTTTTTTGATTTCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGACG    200

GMO_DOA          201 TAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCG    250
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       201 TAACATAAGGGACTGACCACCCGGGGATCCTCTAGAGTCCCCCGTGTTCG    250

GMO_DOA          251 AGCTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATG    300
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       251 AGCTCGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATG    300

GMO_DOA          301 AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGAT    350
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       301 AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGAT    350

GMO_DOA          351 AGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGAAGCTTATGGTCCAAGAATGA    400
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       351 AGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGAAGCTTATGGTCCAAGAATGA    400

GMO_DOA          401 AGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGTTCAAAGATAAAGAAAAACAGA    450
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       401 AGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGTTCAAAGATAAAGAAAAACAGA    450

GMO_DOA          451 AAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGAC    500
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       451 AAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGAC    500

GMO_DOA          501 GGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGT    550
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       501 GGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGT    550

GMO_DOA          551 CAATGCCGGAACTAGTGGTACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTA    600
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       551 CAATGCCGGAACTAGTGGTACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTA    600

GMO_DOA          601 CCGACAAGATGATTTTACCAAGAATTAAGGGAAAAACTGTCCTTAGTTTA    650
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       601 CCGACAAGATGATTTTACCAAGAATTAAGGGAAAAACTGTCCTTAGTTTA    650

GMO_DOA          651 AATCATCTTCTTACGTATAATCCGCAACAAATAGACATCTCAAACACTCG    700
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       651 AATCATCTTCTTACGTATAATCCGCAACAAATAGACATCTCAAACACTCG    700

GMO_DOA          701 TGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATT    750
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       701 TGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATT    750
```

ภาพที่ 29 แสดงความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-DOA-c1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ต้นแบบ (ในส่วนของชุดยีน GMOs-DOA) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

```
GMO_DOA          751 ACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAAGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTT    800
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       751 ACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAAGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTT    800

GMO_DOA          801 TGGTGCCATCGAAAATGGAACATCCCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGA    850
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       801 TGGTGCCATCGAAAATGGAACATCCCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGA    850

GMO_DOA          851 TGATGGATGGGGAAACCCAAGTCGATTATCCCATCAAGCCTTTGATCGAA    900
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       851 TGATGGATGGGGAAACCCAAGTCGATTATCCCATCAAGCCTTTGATCGAA    900

GMO_DOA          901 CATGCAACTCCTTCGTTCAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTAACGCGGC    950
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       901 CATGCAACTCCTTCGTTCAGGCAAATCATGGCTCACTTCAGTAACGCGGC    950

GMO_DOA          951 AGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATGCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGT   1000
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1       951 AGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATGCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGT   1000

GMO_DOA         1001 ATGGAATCAAGAGGAATCTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTC   1050
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1001 ATGGAATCAAGAGGAATCTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTC   1050

GMO_DOA         1051 GACTTCTATGAGGTGAACTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCA   1100
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1051 GACTTCTATGAGGTGAACTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCA   1100

GMO_DOA         1101 TATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACACTGATCGCAGAATGTTTG   1150
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1101 TATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACACTGATCGCAGAATGTTTG   1150

GMO_DOA         1151 GAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACA   1200
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1151 GAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACA   1200

GMO_DOA         1201 GTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCACTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTG   1250
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1201 GTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCACTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTG   1250

GMO_DOA         1251 ACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACT   1300
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1251 ACTCGAGCCTTGGAGTGCACTTCAATTAGTGGCTCAATATGGTATTCACT   1300

GMO_DOA         1301 ACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGG   1350
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1301 ACAGAAATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTGTCGCTCAAGG   1350

GMO_DOA         1351 GAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTC-------------          1379
                     ||||||||||||||||||||||||||||||
GMO_DOA_C1      1351 GAGAAAGGTCCTTATGCAGCCAAGAATTCCTGGGCCTCATGG          1392
```

ภาพที่ 29 (ต่อ)

3. การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ 55-1 และ SC เพื่อตรวจสอบยีน *cp*-Hawaii และยีน *cp*-SC ตามลำดับ ด้วยวิธี Real-time PCR ในดีเอ็นเอของพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น ๆ ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม *RR* และและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม *Mon 863* เป็นต้น พบว่าไพรเมอร์ทั้งคู่มีความจำเพาะเจาะจง โดยไพรเมอร์และโพรบ 55-1 ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในตัวอย่างดีเอ็นเอ

มะละกอ GM6 (Hawaii genomic DNA) เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนไพรเมอร์และโพรบ SC ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในตัวอย่างดีเอ็นเอมะละกอ GM9 (SC genomic DNA) เท่านั้น แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ 55-1 เพื่อทดสอบยีน *cp*-Hawaii ด้วยวิธี Real-time PCR

ชื่อตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ค่า ct			Result
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
1. RR 0.1%	R1 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
2. Mon 863	R1 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
3. GM6 (Hawaii genomic DNA)	R1 Negative control	**34.92**	**33.46**	**36.09**	**Detected**
	R2 Negative control	**36.03**	**33.86**	**35.41**	**Detected**
	R3 Negative control	**35.93**	**34.77**	**35.52**	**Detected**
4. GM9 (SC genomic DNA)	R1 Positive control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Positive control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Positive control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
5. Non GMO papaya	R1 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
6. NTC	R1 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ SC เพื่อทดสอบยีน *cp*-SC ด้วยวิธี Real-time PCR

ชื่อตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ค่า ct			Result
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
1. RR 0.1%	R1 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
2. Mon 863	R1 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Unknown	No ct	No ct	No ct	Not Detected
3. GM6 (Hawaii genomic DNA)	R1 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
4. GM9 (SC genomic DNA)	R1 Positive control	**34.22**	**34.12**	**34.22**	**Detected**
	R2 Positive control	**33.59**	**34.71**	**33.59**	**Detected**
	R3 Positive control	**34.22**	**34.54**	**34.22**	**Detected**
5. Non GMO papaya	R1 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 Negative control	No ct	No ct	No ct	Not Detected
6. NTC	R1 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R2 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected
	R3 NTC	No ct	No ct	No ct	Not Detected

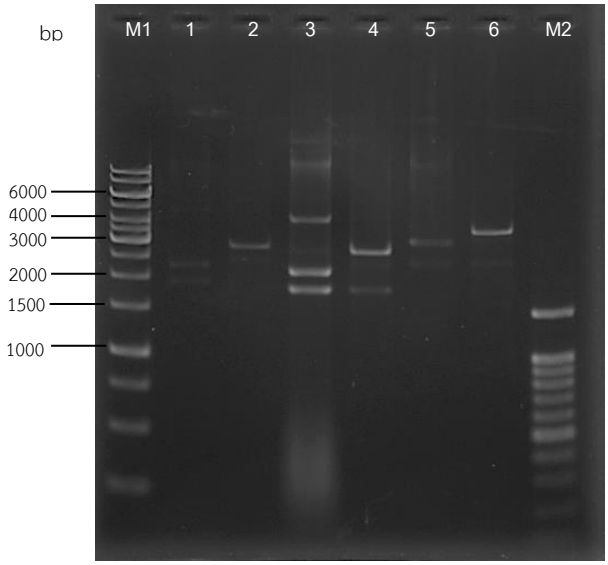
4. การศึกษาจำนวนชุด (copy number) ของดีเอ็นเอมาตรฐาน

พลาสมิดมาตรฐานที่สกัดจากชุดน้ำยาสำเร็จรูปทุกชุดมีปริมาณและความบริสุทธิ์มากพอ (ตารางที่ 5) เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII เป็นเวลาข้ามคืน ก็สามารถตัดให้พลาสมิดมาตรฐานทุกชุดอยู่ในรูปเส้นตรงได้ เมื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส โดยก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพลาสมิดทุกชุดจะอยู่ในรูปแบบขดเป็นวง (supercoiled) ทำให้มีขนาดเล็กจึงเคลื่อนที่บนเจลอะกาโรสได้รวดเร็วกว่าพลาสมิดที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรง (lineared) ซึ่งมีขนาดตรงกับพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุดที่ออกแบบไว้ คือ พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-Hawaii มีขนาด 2,941 คู่เบส, พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-SC มีขนาด 2,795

คู่เบส และพลาสมิดมาตรฐาน GMOs-DOA มีขนาด 3,657 คู่เบส (ภาพที่ 30) ดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่อยู่ในรูปเส้นตรงนี้ ให้ชื่อว่า linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 นำไปทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งปริมาณที่ได้มากพอที่จะใช้ในการทดสอบ Real-time PCR และความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกคำนวณกลับให้อยู่ในรูป copy number (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดมาตรฐานที่ทำบริสุทธิ์ได้

ชื่อพลาสมิดมาตรฐาน	**ค่า A_{260}/A_{280}**	**ความเข้มข้น (ng/ul)**
1. GMOs-Hawaii-c1	2.21	80.35
2. GMOs-SC-C1	2.08	114.8
3. GMOs-DOA-C1	2.28	34.1



ภาพที่ 30 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Gene ruler DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii (uncut) ช่องที่ 2 คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 2,941 คู่เบส ช่องที่ 3 พลาสมิด GMOs-SC (uncut) ช่องที่ 4 คือ พลาสมิด GMOs-SC ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 2,795 คู่เบส ช่องที่ 5 คือ พลาสมิด GMOs-DOA (uncut) ช่องที่ 6 คือ พลาสมิด GMOs-DOA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 3,657 คู่เบส และ M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนชุดของดีเอ็นเอมาตรฐานจากการคำนวณ

ชื่อดีเอ็นเอมาตรฐาน	ค่า A_{260}/A_{280}	ความเข้มข้น (ng/ul)	จำนวนชุด (copy number)
1. linear GMOs-Hawaii-c1	1.76	5.9	1.86×10^{9} copies
2. linear GMOs-SC-C1	1.75	20.45	6.78×10^{9} copies
3. linear GMOs-DOA-C1	1.70	13.75	3.48×10^{9} copies

5. การหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR

หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน เท่ากับ 250, 25 และ 2.5 ชุด (copy) ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนต่าง ๆ ที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *papain, CaMV35s, nos, cp-Hawaii* และ *cp-SC* พบว่า 1. คู่ไพรเมอร์ Papain-B1/Papain-B2 สามารถตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ปริมาณต่ำสุด (LOD) เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 เท่ากับ 250 copies 2. คู่ไพรเมอร์ 35S-F/35S-R สามารถตรวจสอบยีน *CaMV35S* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 3. คู่ไพรเมอร์ 180-F/180-R สามารถตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 4. คู่ไพรเมอร์ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 สามารถตรวจสอบยีน *cp*_Hawaii บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 5. ไพรเมอร์ SC-F/SC-R สามารถตรวจสอบยีน *cp*-SC บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies (ตารางที่ 7 และ8) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nakamura *et al*., (2013) ที่ได้ใช้ดีเอ็นเอพลาสมิดเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกในการตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Hawaii ในผลิตภัณฑ์มะละกอ ด้วยวิธี Real-time PCR ก็พบว่าค่า LOD อยู่ที่ 250 ชุด (copies) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 7 แสดง LOD ของไพรเมอร์และโพรบ ในการตรวจสอบดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ด้วยวิธี Real-time PCR

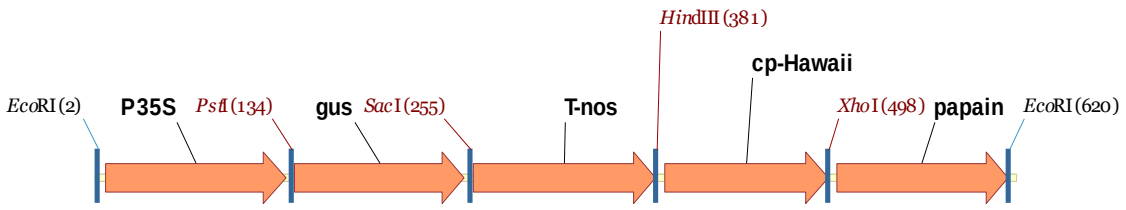
Template copies	linear pGMOs-Hawaii-C1		linear pGMOs-SC-C1		linear pGMOs-DOA-C1	
	Total repeats/ (positive signal)	Mean Ct	Total repeats/ (positive signal)	Mean Ct	Total repeats/ (positive signal)	Mean Ct
Papain						
250	9/9	36.32	9/9	39.33	9/9	38.34
25	9/9	40.50	2/9	42.69	2/9	44.70
2.5	2/9	42.48	0/9	-	0/9	-
35S						
250	9/9	35.02	9/9	37.27	9/9	33.72
25	7/9	40.29	6/9	41.23	5/9	39.22
2.5	3/9	41.07	1/9	41.50	1/9	39.89
Nos						
250	9/9	31.14	9/9	34.94	9/9	32.46
25	9/9	34.53	5/9	38.75	5/9	37.76
2.5	7/9	37.56	3/9	39.53	0/9	-
55-1						
250	9/9	35.44	-	-	-	-
25	7/9	39.74	-	-	-	-
2.5	1/9	40.19	-	-	-	-
SC						
250	-	-	9/9	35.52	-	-
25	-	-	4/9	38.04	-	-
2.5	-	-	0/9	-	-	-

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) สำหรับตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Real-time PCR

คู่ไพรเมอร์และโพรบ	**ค่า LOD ของดีเอ็นเอมาตรฐาน**		
	linear pGMOs-Hawaii-C1 (copy number)	linear pGMOs-SC-C1 (copy number)	linear pGMOs-DOA-C1 (copy number)
Papain-B1/Papain-B2	25	250	250
35S-F/35S-R	250	250	250
180-F/180-R	25	250	250
55-1 Primer 1/55-1 Primer 2	250	-	-
SC-F/SC-R	-	250	-

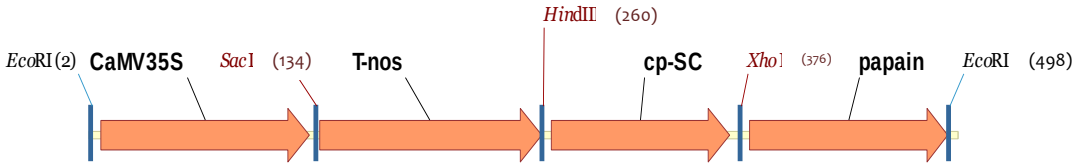
9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ที่มีรายงานในวารสารระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลาสมิดมาตราฐานใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่อไปนี้ ได้แก่ ยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ขนาด 82 คู่เบส, ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ขนาด 75 คู่เบส, ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ขนาด 84 คู่เบส, ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (cp-Hawaii) ขนาด 71 คู่เบส, ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (cp-SC) มีขนาด 70 คู่เบส, , ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) มีขนาด 866 คู่เบส และยีน *papain* ของมะละกอ ขนาด 91 คู่เบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กล่าวมาข้างต้น มาเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน ทำให้สามารถออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนมาตรฐานได้สามชุดด้วยกัน ประกอบด้วย 1) ชุดยีน GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 624 คู่เบส ซึ่งชุดยีนนี้ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii, *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, PstI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ 2) ชุดยีน GMOs-SC ขนาด 502 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ และ3 ชุดยีน GMOs-DOA ขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV 35S, gus, nos*, *cp*-DOA และยีน *Papain* ที่คั่นด้วยจุดจดจำของเอนไซม์ EcoRI, NheI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ



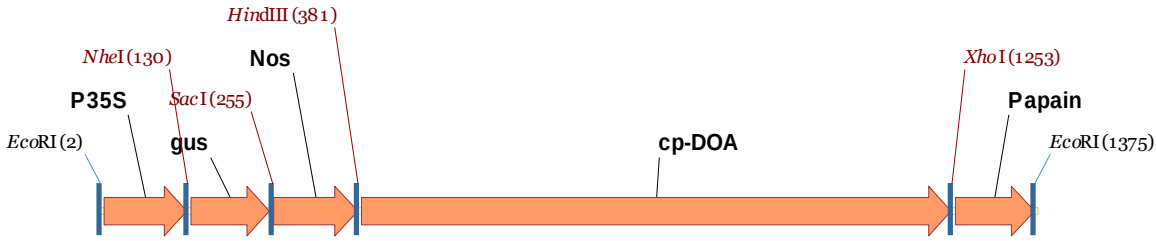
GMOs Hawaii

624 bp



GMOs SC

502 bp



GMOs-DOA all

1379 bp

โดยเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนทั้งสามชุดด้วยไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบยีนทุกยีนในการจำแนกมะละกดดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR ด้วยโปรแกรม Primer map พบว่าชุดยีน GMOs-Hawaii สามารถตรวจสอบได้ด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 55-1, Gus, 180 และ papain ส่วนชุดยีน GMOs_SC สามารถตรวจสอบได้ด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 180, papain และ *cp*_SC และชุดยีน GMOs-DOA สามารถตรวจสอบได้ด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบ 35s, Gus, 180 และ papain ซึ่งไพรเมอร์และโพรบแต่ละเส้นมีความอิสระต่อกัน ไม่ซ้อนทับกัน ถือว่ามีความจำเพาะเจาะจง สามารถจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้สามสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากประเทศฮาวาย, สายพันธุ์ของประเทศไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ และจากจังหวัดขอนแก่น จึงได้ดำเนินการสังเคราะห์ชุดยีนสามชุดด้วยกัน แต่ละชุดยีนให้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ทำให้ได้ชุดพลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-Hawaii ขนาดประมาณ 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-SC ขนาดประมาณ 2795 คู่เบส และพลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-DOA ขนาดประมาณ 3,657 คู่เบส โดยพลาสมิดมาตรฐานทุกชุดสามารถเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ได้ คัดเลือกเอาโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ ซึ่งคาดว่าเป็น

โคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ จำนวน 10-14 โคลน มาตรวจสอบขนาดของพลาสมิด พบว่าขนาดพลาสมิดจากทุกโคลนที่คัดเลือกมา มีขนาดใหญ่กว่า 1,500 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และตรวจสอบพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส ในพลาสมิดที่สกัดจากโคลนของ GMOs-Hawaii และ GMOs-DOA ส่วนพลาสมิดที่สกัดจากโคลน GMOs-SC ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส ในทุกโคลน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ทั้งเมื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดยีนจากโคลนที่ 1 (GMOs-Hawaii-c1, GMOs-SC-c1, GMOs-DOA-c1) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมต้นแบบแต่ละชนิด พบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1 กับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ SC และ Hawaii, ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม RR และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 863 พบว่าไพรเมอร์และโพรบ SC จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ SC (GM 9) ส่วนไพรเมอร์และโพรบ 55-1 จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Hawaii (GM 6) เท่านั้น ดังนั้นไพรเมอร์และโพรบทั้งคู่นี้เหมาะสมในการใช้เพื่อจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้

ทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนต่าง ๆ ที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *papain, CaMV35s, nos, cp-Hawaii* และ *cp-SC* พบว่า 1. คู่ไพรเมอร์ Papain-B1/Papain-B2 สามารถตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ปริมาณต่ำสุด (LOD) เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 เท่ากับ 250 copies 2. คู่ไพรเมอร์ 35S-F/35S-R สามารถตรวจสอบยีน *CaMV35S* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 3. คู่ไพรเมอร์ 180-F/180-R สามารถตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 4. คู่ไพรเมอร์ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 สามารถตรวจสอบยีน *cp*_Hawaii บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 5. ไพรเมอร์ SC-F/SC-R สามารถตรวจสอบยีน *cp*-SC บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies

สรุปได้ว่าการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานขึ้นมาสามชุด คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA เพื่อเป็นดีเอ็นเออ้างอิงสำหรับการตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จำนวนสามสายพันธุ์ ประกอบด้วยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ฮาวาย, สายพันธุ์ของประเทศไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ และสายพันธุ์ของประเทศไทยจากจังหวัดขอนแก่น ในการตรวจสอบด้วยวิธี

Real-time PCR เชิงคุณภาพได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นเป็นชุดยีนที่เชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pMK-T และได้ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานได้อย่างรวดเร็ว และเพิ่มได้จำนวนไม่จำกัดภายในเซลล์ ด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณที่ต้องการและสกัดพลาสมิดเพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุอ้างอิงได้ ภายในระยะเวลาไม่นาน และสามารถพัฒนาใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรงมาเปรียบเทียบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR ต่อไปได้ในอนาคต และความรู้ที่ได้ยังเป็นพื้นฐานความรู้ในการพัฒนาสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นได้อีกด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธีการ Real-time PCR เชิงคุณภาพ ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องตรงกับข้อมูลที่มีรายงานในวารสารระดับนานาชาติ ดังนั้นดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นจึงยืนยันความถูกต้องของผลการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการได้

2. ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นและถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้อยู่ในรูปเส้นตรงสามารถพัฒนาไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธีการ Real-time PCR เชิงปริมาณได้

3. ความรู้ที่ได้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ

11. เอกสารอ้างอิง

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

http://www2.moc.go.th/main.php?filename=status (25-04-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

http://www.safetybio.agri.kps.ku.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=952&Itemid=42 (25-04-2013)

นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, อัญจนา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โฆสิตรัตน และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. 605 หน้า.

วิชัย โฆสิตรัตน ฉลองชัย แบบประเสริฐ อดิศักดิ์ บ้วนกียาพันธุ์ รัชนี ฮงประยูร กุลวดี ตรองพาณิชย์ สุจินต์ ภัทรภูวดล สมนึก เชื้อวงศ์สกุล และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2542. มะละกอและโรคใบด่างจุดวงแหวน เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 68 หน้า.

สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรป. 2555. รายงานปัญหาสินค้าเกษตรของไทยที่ส่งออกมายังสหภาพยุโรป ในปี ๒๕๕๕. http://www2.thaieurope.net/ 3 พฤษภาคม พ.ศ. 2556.

Cheng, Y.H., J.S. Yang and S.D. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by Agrobacterium following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. Plant Cell Reports. 16:127-132.

Guan, Q., X. Wang, D. Teng, Y. Yang, F. Tian. Q. Yin and J. Wang. Construction of a standard reference plasmid for detecting gm cottonseed meal. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 165: 24-34

Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio.Technology, 10: 1466-1472.

Kim, S.A., M. Lee, S.J. Yoo, J.H. Kim, H. Lee, K.S. Park, J. Jeong and H.Y. Kim. 2010. Detection of GM Papaya Event 55-1 in Fresh and Processed Papaya Using Duplex PCR. Appl. Biol. Chem. 53(2): 237-242.

Manshardt, R. M. 1998. 'UH Rainbow' papaya. University of Hawaii College of Tropical Agriculture and Human Resources. Germplasm G-1, 2pp.

Mendoza, M.C.T., A.C. Laurena and J.R. Botella. 2008. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. Biotechnol Annu Rev. 14: 423-62.

Nakamura, K., H. Akiyama, Y. Takahashi, T. Kobayashi, A. Noguchi, K. Ohmori, M. Kasahara, K. Kitta, H. Nakazawa, K. Kondo and R. Teshima. 2013. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. **Food Chem.** 136: 895-901

Nakamura, K., K. Kazunari, K. Tomoko, N. Akio, O. Kiyomi, T. Reona, K. Kazumi, A. Hiroshi, T. Reiko and N.M. Tomoko. 2014. Identification and Detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. **Biol. Pharm. Bull.** 37(1): 1-5

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1–3.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 12(74): 5463-5467.

Tripathi Leena. 2005. Techniques for detecting genetically modified crops and products. **African Journal of Biotechnology**. 4(13): 1472-1479.

Wang, X., D. Teng, Y. Yang. F. Tian, Q. Guan and J. Wang. 2011. Construction of a reference plasmid molecule containing eight target for the detection of genetically of genetically modified crops. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 90: 721-731

Wang, X., Q. Tang, L. Dong, Y. Dong, Y. Su, S. Jia and Z. Wang. 2014. Construction of a standard reference plasmid containing seven target genes for the detection of transgenic cotton. **Plasmid**. 74: 39-44.

Wei, T., B.S.M. Lebas, J.B. Shiller, B.D. Quinn and G.R.G. Clover. 2012. Detection of five viruses infecting dormant bulbs by TaqMan-based real-time-RT-PCR. **Australasian Plant Pathol**. 41: 93:98.

Xu, W., B. Weibin, G. Feng, L. Yunbo, Y. Yanfang and H. Kunlun. 2008. A papaya-specific gene ‘papain’ used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic papayas. **Eur. Food Res. Technol**. 228 : 301-309