รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : -

2. โครงการวิจัยเดี่ยว : พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล

3. ชื่อการทดลอง

(ภาษาไทย) วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

(ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Event Specific Mon810 and NK603 Identification using Multiplex real-time PCR Technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง :	นางสาวปิยนุช ศรชัย	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายธีระ ชูแก้ว	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

5. บทคัดย่อ /Abstract

ในปัจจุบันนี้พืชดัดแปรพันธุกรรมได้รับการยอมรับในหลายประเทศ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมได้รับการอนุญาตให้มีการขายเชิงพาณิชย์มากที่สุด โดยข้าวโพดทนทานสารกำจัดวัชพืช (NK603 event) และต้านทานแมลง (MON810 event) มีการอนุญาตใช้มากสุด แต่สำหรับบางประเทศการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรมีความจำเป็นต้องทำการตรวจวิเคราะห์รายละเอียดของยีนหรือระบุสายพันธุ์ของพืชดัดแปรพันธุกรรมนั้นๆ ก่อน ซึ่งเป็นที่มาของการศึกษาการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยการตรวจสอบความจำเพาะและความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Event Specific Mon810 NK603 และยีน *HMG* แบบ Multiplex ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบมีความจำเพาะสำหรับการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ Mon810 NK603 และ HMG ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR คือ 0.15 0.3 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบ Mon810 NK603 และ HMG ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 0.05 0.15 และ0.025 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่าวิธีดังกล่าวมีความสามารถในการจำแนกยีนโดยค่าพารามิเตอร์

ของการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ดังนี้ ค่า PCR efficiency 97-112 เปอร์เซ็นต์ (ค่าที่ยอมรับของวิธี Multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์) ค่า Linearity (R^2) และ ค่า Slope เท่ากับ 0.99 และอยู่ในช่วง -3.38 ถึง -3.07 ตามลำดับ เทคนิคนี้มีขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ (LOD) ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิคการตรวจสอบ Mon810 NK603 และยีน *HMG* รวมกันในปฏิกิริยาเดียวกันแบบ Multiplex Real-time PCR สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีนของตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดได้

คำสำคัญ: ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม, เทคนิค multiplex real-time PCR, Mon810, NK603 และ การทดสอบความใช้ได้

Nowadays several countries widely accept GMOs. Genetically modified maize is the most events that has been approved for commercialization especially lepidopteran insect resistance (Mon810) and glyphosate herbicide tolerance (NK603). However, import and export of GM products of some countries is necessary to be analyzed the construct of the gene or GM event. The aim of this study was to develop GM maize, Mon810 and NK603, detection method using multiplex real-time PCR technique. The specificity and the final concentrations of Mon810, NK603 and HMG primers and probes were investigated. The results revealed that Mon810, NK603 and HMG primers and probes were specific to Mon810 and NK603 maize. The final concentrations of Mon810, NK603 and HMG primer were 0.15, 0.3 and 0.05 μM, respectively. The final concentrations of Mon810, NK603 and HMG probe were 0.05, 0.15 and 0.025 μM, respectively. Subsequently, the Event-specific Mon810 and NK603 and endogenous gene identification method, in the same reaction, were validated using multiplex real-time PCR. The parameters of this multiplex real-time PCR method were within the acceptable parameter standard including 97 to 112 percentage of PCR efficiency, -3.38 to -3.07 of slope, 0.99 of linearity (R^2), limit of detection in 0.1 percentage and no false positive or negative results. In summary, multiplex real-time PCR in this study can be used for the events screening method of GM maize and maize products

Key-words: Genetically Modified maize, multiplex real-time PCR technique, Mon810, NK603 and validation

6. คำนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเป็นพืชที่มีการปลูกในเชิงพาณิชย์มากที่สุด 232 สายพันธุ์ โดยข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 ซึ่งประกอบด้วยยีน *Cry1A(b)* ที่มีความสามารถต้านทานแมลงและข้าวโพด NK603 ที่ประกอบด้วยยีน *cp4epsps* ที่ทนทานต่อยากำจัดวัชพืช และได้รับการยอมรับให้สามารถวางขายในตลาดสหภาพยุโรปได้ (Kramkowska *et al.,* 2013; ISAAA, 2018) แต่อย่างไรก็ตามการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรในบางประเทศจะต้องระบุชนิดของพืชดัดแปรพันธุกรรม (event) หรือต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์รายละเอียดของพืชดัดแปรพันธุกรรม เช่น โปรโมเตอร์ เทอร์มิเนเตอร์ ยีนต่างๆ เช่น construct หรือ event specific เป็นต้น

สำหรับการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมที่เป็นมาตรฐานสากล (JRC-EU) ได้แบ่งระดับของการตรวจวิเคราะห์เป็น 3 ระดับคือ 1.การตรวจคัดกรอง (screening method) ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ หรือเทอร์มิเนเตอร์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในพืชดัดแปรพันธุกรรมเกือบทุกชนิดแต่ไม่สามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชดัดแปรพันธุกรรม 2.การตรวจวิเคราะห์ยีนที่ถูกถ่ายเข้าในพืชดัดแปรพันธุกรรม (target or construct gene) ซึ่งมีความจำเพาะต่อลักษณะของพืชดัดแปรพันธุกรรมเป็นกลุ่มๆ เช่น ยีน *Cry*1Ab ยีน *CP4EPSPS* เป็นต้น 3. การตรวจจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชดัดแปรพันธุกรรม (Event specific) จะตรวจสอบบริเวณเอกลักษณ์คือตำแหน่งที่ยีนถูกถ่ายเข้าไปต่อกับส่วนของจีโนมพืช จึงมีความจำเพาะต่อชนิดพืชดัดแปรพันธุกรรมสูง ซึ่งส่งผลกับค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ด้วย

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการระดับสากลตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ซึ่งเป็นการตรวจสอบยีนพร้อมกัน 3 ยีนในปฏิกิริยาเดียวกันโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจต่างกัน และโพรบที่ติดด้วย Reporter ที่แตกต่างกันทำให้สามารถเปล่งแสงที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน แต่สำหรับการตรวจจำแนกชนิดพืชดัดแปรพันธุกรรมยังคงใช้เทคนิค Simplex real-time PCR (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) เป็นการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาแต่ละยีนแยกปฏิกิริยากัน ซึ่งต้องใช้เวลา สารเคมี และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์มาก จึงเป็นที่มาการศึกษาครั้งนี้คือ การนำเทคนิค Multiplex real-time PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 พร้อมกัน แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาวิธีการตรวจสอบของห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานระบบ ISO17025 ต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Validation) ทุกวิธีการ โดยค่าพารามิเตอร์ของวิธีการที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้เช่น ความแม่นยำ ความถูกต้อง ประสิทธิภาพของวิธีการ และขีดจำกัดของวิธีจะต้องอยู่ในมาตรฐานที่กำหนดของวิธีการนั้นๆ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและศึกษาความใช้ได้ของวิธีตรวจจำแนกชนิดข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR

7. วิธีดำเนินการ

7.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุอ้างอิง

สำหรับการศึกษานี้ใช้วัสดุอ้างอิง (certificate reference material) ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 NK603 Bt11 Bt 176 และ GA 21 ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ RR (GTS 40-3-2) และ DP305423-1ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของพืชดัดแปรพันธุกรรมในระดับที่แตกต่างกันดังตาราง ที่ 1 (Table1) ซึ่งได้รับมาตรฐานจาก Institute for Reference Materials and Measurements นอกจากนี้ยังใช้พลาสมิดของข้าวดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt63 และ มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 (ขนิษฐา และคณะ, 2558) เป็นตัวอย่างอ้างอิง และสำหรับตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

Table1 GM certified reference materials information in this study

Plant	Source/code	Event	%GM (± uncertainty)	Event Specific	
				Mon810	NK603
Maize	ERM-BF413ak	Mon810 ak	<0.09	+	-
	ERM-BF413ck	Mon810 ck	0.49 ± 0.1	+	-
	ERM-BF413ek	Mon810 ek	1.98 ± 0.15	+	-
	ERM-BF413gk	Mon810 gk	9.9 ± 0.5	+	-
	ERM-BF415a	NK603 a	<0.4	-	+
	ERM-BF415b	NK603 b	0.1 ± 0.04	-	+
	ERM-BF415c	NK603 c	0.49 ± 0.05	-	+
	ERM-BF415d	NK603 d	0.98 ± 0.07	-	+
	ERM-BF411f	Bt176	5 ± 0.18	-	-
	ERM-BF412f	Bt11	4.89 ± 0.21	-	-
	ERM-BF414f	GA21	42.9± 0.17	-	-
Soybean	ERM-BF410k	GTS 40-3-2	10 ± 0.7	-	-
	ERM-BF426d	DP305423-1	10 ± 0.7	-	-

Notes: + (positive) = Event Specific Mon810 or NK603 was should detected

- (negative) = Event Specific Mon810 or NK603 was should not detected

2. LightCycler480 Multiwell Plate 96, with sealing foil

3. Real-Time PCR equipment model LightCycler 480(Roche Technologies, Santa Clara, CA)

4. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมีในการทำสกัดดีเอ็นเอและทดสอบปฏิกิริยา

5.ไพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Aldrich Biotechnolgoy)

Table 2 Oligonucleotide sequences of primer and probe of Event Specific and endogenous gene

Gene	GM event	Primer/ Probe	Sequence (5'-3')	Reference
Event - Specific	NK603 (1)	NK603-F	GACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGC	Shrestha *et al.* (2010)
		NK603-R	CGAGAAGAGATAACAGGATCCACTC	
		NK603-P	FAMTACCACGCGACACACTBHQ1	
	NK603 (2)	NK603-F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		NK603-R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
		NK603-P	FAMTGGTACCACGCGACACACTTCCACTCBHQ1	
	Mon810 (1)	MON810-F	CACTTCTCCTTGGACATCGATG	Shrestha *et al.* (2010)
		MON810-R	GCAAGCAAATTCGGAAATGAA	
		MON810-P	HEXAGGACTTTCGGTAGCCTTBHQ1	
	Mon810 (2)	MON810-F	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		MON810-R	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	
		MON810-P	HEXAACATCCTTTGCCATTGCCCAGCBHQ1	
Endogenous gene	*Zein*	Zein-F	GCTTGCCAGCTTGATGGCGT	Shrestha *et al.* (2010)
		Zein-R	GGCATCGTCTGAAGCGGTAAGG	
		Zein-P	Cy5ATGCTGCAGCAACTGBHQ3	
	Adh	Adh-F	CCAGCCTCATGGCCAAAG	Mazzara *et al.* (2005); JRC-EURL-GMFF- ENGL (2011)
		Adh-R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG	
		Adh-P	Cy5CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTTCCCTBHQ3	
	HMG	HMG-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	Charles *et al.* (2008); JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		HMG-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
		HMG-P	Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ3	

Noted: F= Forward primer, R= Reverse primer, P=probe, (1)= the first primer and probe set, (2) = the second primer and probe set

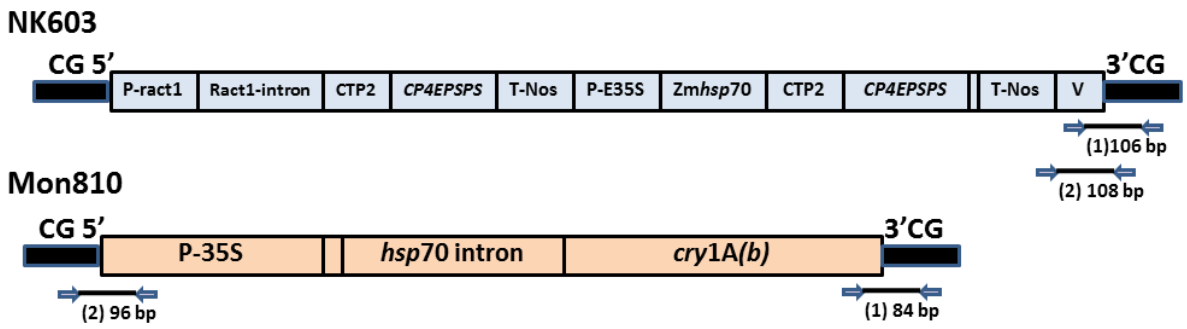

Figure1 Construct maps of NK603 and Mon810 GM Maize events referring the region amplification of Event Specific Real-time PCR primer and probes (1: the amplification area of 1st primer and probe, 2: the amplification area of 2nd primer and probe)

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Table1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ด้วยวิธีดัดแปลงจากวิธี GeneScan ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985) โดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น และนำมาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Wizard™ minicolumn (Promega) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2. ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex

นำดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Table1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด มาทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Simplex โดยใช้

ไพรเมอร์และโพรบดังตารางที่ 2 (Table 2) ซึ่งมีตำแหน่งของการเข้าจับไพรเมอร์และโพรบที่แตกต่างกันสำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ดังภาพที่ 1 (Fig.1) และยีนอ้างอิงพืชสำหรับตรวจสอบข้าวโพดที่แตกต่างกัน 3 ยีนได้แก่ ยีน *Zein* ยีน *Alcohol dehydrogenase* (*Adh*) และยีน *High Mobility Group* of maize (*HMG*) ใช้สภาวะปฏิกิริยาการทำ PCR ดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing และ extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้ น้ำ (PCR grade; Roche, Switzerland) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร สาร Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 2x ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (Sornchai et al, 2018) นำผลการตรวจสอบการตรวจพบยีนต่างๆ มาเปรียบเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1 (Table1) แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeders *et al*, 2014

3. ศึกษาอิทธิพลของตำแหน่งของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex

ตรวจสอบอิทธิพลของตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์และโพรบด้วยการนำดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Table1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบดังตารางที่ 2 (Table 2) ซึ่งไพรเมอร์และโพรบแต่ละชุดมีตำแหน่งของการเข้าจับไพรเมอร์และโพรบที่แตกต่างกันสำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ดังภาพที่ 1 (Fig.1) และยีนอ้างอิงพืชสำหรับตรวจสอบข้าวโพดที่แตกต่างกัน 3 ยีนได้แก่ ยีน *Zein* ยีน *Alcohol dehydrogenase* (*Adh*) และยีน *High Mobility Group* of maize (*HMG*) ใช้สภาวะปฏิกิริยาการทำ PCR ดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing และ extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน ที่ 2 จำนวน 40 รอบ ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้ น้ำ (PCR grade; Roche, Switzerland) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร สาร Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 2x ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (Sornchai *et al*, 2018) ตรวจสอบผลค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากเครื่อง Real time PCR รุ่น LC480 Cycler (Roche Technologies, Santa Clara,

CA) เปรียบเทียบกับข้อมูลการที่ได้จากการทดลองเทียบกับตารางที่ 1 (Table1) และเปรียบเทียบค่า Ct ของไพรเมอร์แต่ละชุด และคัดเลือกชุดไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

จากการทดลองที่ 3 สามารถทำการจัดกลุ่มเพื่อศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาของยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 ซึ่งทำให้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 ศึกษายีน *Zein* ควบคู่กับไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 และ NK603 ชุดที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ศึกษายีน *HMG* ควบคู่กับไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 และ NK603 ชุดที่ 2 โดยนำดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon 810 และ NK603 มาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 และ NK603 และ ยีน endogenous (*Zein* และ *HMG*) ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาแบบ Duplex และแบบ Multiplex Real-time PCR

4.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 ชุดที่ 1 และ *Zein*)

นำดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon 810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 เปอร์เซ็นต์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 และ NK603 และ ยีน *Zein* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex (Mon810/*Zein*, NK603/*Zein*) และ Multiplex (Mon810/NK603/*Zein*) เพื่อการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอรวม 100 นาโนกรัมและสารเคมีประกอบปฏิกิริยาดังตารางที่ 3 (Table 3) และทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบและไพรเมอร์ดังตารางที่ 4 (Table 4) สำหรับความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของกรรมวิธีที่ 1 อ้างอิงจากความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของ Shrestha *et al.* (2010) ในการตรวจสอบ Event Specific Mon810 และ NK603 แบบ Multiplex และ เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ขึ้นในกรรมวิธีที่ 2 ถึงกรรมวิธีที่ 8 (Table 4)

4.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 ชุดที่ 2 และ *HMG*)

ดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon 810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 เปอร์เซ็นต์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 และ NK603 และ ยีน *HMG* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาแบบ Real-time PCR แบบ Duplex (Mon810/*HMG*, NK603/*HMG*) และ Multiplex (Mon810/NK603/*HMG*) เพื่อการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอรวม 100 นาโนกรัมและสารเคมีประกอบปฏิกิริยา (Table 3) และทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบและไพรเมอร์ (Table 4) โดยกรรมวิธีที่ 1 เป็นความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ตามคำแนะนำของ JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011) ในการตรวจสอบ Event Specific Mon810 และ NK603 แบบ Simplex สำหรับกรรมวิธีที่ 2 เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์เป็น 2 เท่า และสำหรับกรรมวิธีที่ 3 จะเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของ Event-Specific Mon810 และ NK603 เป็น 10 และ 3.3 เท่า ตามลำดับ และเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของการตรวจสอบยีน *HMG* เป็น 4 เท่า และในกรรมวิธีที่ 4 เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและ

ไพรเมอร์ของ Event-Specific Mon810 และ NK603 เป็น 10 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของยีน *HMG* เป็น 5 ไมโครโมลาร์ (Table 5)

Table 3 The component of PCR reaction for Mon810, NK603 and endogenous gene detection using duplex and multiplex real-time PCR

Reagent	Volume of chemical reagents (ul)		
	Duplex		Triplex
	Mon810/*HMG*	NK603/*HMG*	Mon810/NK603/*HMG*
2XLightCycer master mix	12.5	12.5	12.5
Mon810-F primer	0.5	-	0.5
Mon810-R primer	0.5	-	0.5
Mon810-Probe	0.5	-	0.5
NK603-F primer	-	0.5	0.5
NK603-R primer	-	0.5	0.5
NK603-Probe	-	0.5	0.5
Endogenous-F primer	0.5	0.5	0.5
Endogenous-R primer	0.5	0.5	0.5
Endogenous -Probe	0.5	0.5	0.5
DNA template 20ng/ul	5	5	5
Dionized water	4.5	4.5	3
Total reaction volume	25	25	25

Table 4 The final concentrations of probe and primer for Mon810 and NK603 GM maize detection using duplex and multiplex real-time PCR

Tr.	Final concentrations of probe and primer (uM)													
	Duplex								Multiplex					
	Mon810/Zein				NK603/Zein				Mon810/NK603/Zein					
	Mon 810		Zein		NK603		Zein		Mon 810		NK603		Zein	
	Pri	Pro	Pri	Pro	Pro	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro
1	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5
2	10	10	10	10	10	10	10	10	20	10	5	5	5	5
3	15	15	15	15	15	15	15	15	20	20	5	5	5	5
4	20	20	20	20	20	20	20	20	30	15	5	5	5	5
5	10	5	10	5	10	5	10	5	30	30	5	5	5	5
6	20	10	10	5	20	10	20	10	40	20	5	5	5	5
7	30	15	10	5	30	15	30	15	20	20	10	10	5	5
8	40	20	10	5	40	20	40	20	30	30	10	10	5	5

Notes: Tr: Treatment , Pri: Primer concentration, Pro: Probe concentration, Mon810 and NK603 primers and probes from the Shrestha *et al*., (2010)

Table 5 The final concentrations of probe and primer for Mon810 and NK603 GM maize detection using duplex and multiplex real-time PCR

Tr.	Final concentrations of probe and primer (uM)													
	Duplex								Multiplex					
	Mon810/HMG				NK603/HMG				Mon810/NK603/HMG					
	Mon 810		HMG		NK603		HMG		Mon 810		NK603		HMG	
	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro	Pri	Pro
1	0.15	0.05	0.05	0.025	0.30	0.15	0.05	0.025	0.15	0.05	0.30	0.15	0.05	0.025
2	0.30	0.10	0.10	0.05	0.60	0.30	0.10	0.05	0.50	0.20	0.50	0.20	0.10	0.05
3	1.00	0.50	0.20	0.10	1.00	0.50	0.20	0.10	1.00	0.50	1.00	0.50	0.10	0.05
4	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5

Notes: Tr: Treatment , Pri: Primer concentration, Pro: Probe concentration, Mon810 and NK603 primers and probes from the JRC-EURL GMFF-ENGL (2011)

5. ทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ (Practicability and Specificity) ต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม events ต่างๆ ได้แก่ Bt 11, Bt176, Mon810 และ NK603 ที่มีโครงสร้างของยีน และเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ และตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม เช่น ข้าวโพด มาทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 4 นำมาตรวจวิเคราะห์ยีน Event-Specific Mon 810 Event-Specific NK603 และยีนอ้างอิงข้าวโพด (ยีน *HMG*) ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบตรวจตัวอย่างทีละยีน (Simplex) เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์ แบบ Multiplex ที่ตรวจยีน Event-Specific Mon 810 และ NK603 ร่วมกับ ยีนอ้างอิงข้าวโพด *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกัน ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ บันทึก ค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากปฏิกิริยาของแต่ละวิธี นำค่า Ct ที่ได้มาตรวจสอบผลความเหมาะสมของไพรเมอร์โพรบจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Ct ที่ได้จากวิธี Multiplex กับ วิธี Simplex ของแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธี Pair Sample T-test และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์โพรบจากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate

6. การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เจือจางดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยน้ำบริสุทธิ์ (deionized water) ที่สัดส่วน 1:2, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดยแต่ละลำดับทำ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 4 รอบ นำมาทดสอบปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR หลังจากนั้นนำผลของค่า Ct ของแต่ละยีน Event Specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงข้าวโพด (ยีน *HMG*) มาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Broeders *et al* (2014) จากสมการของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานนำมาคำนวณหา ค่า PCR efficiency, ค่า Linearity (R^2) และค่า Slope และนำค่าดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์มาตรฐานต่างๆ ของเทคนิค Multiplex Real-time PCR จาd JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)

7. การทดสอบหาการปนเปื้อนและจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection and Limited of: LOD)

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (deionized water) ในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 0.002 ถึง 2% โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR จำนวน 12 ซ้ำ นำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR และหาค่าระดับการปนเปื้อนต่ำที่สุดของ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ และนำความเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนระดับต่ำที่สุดนั้นมาหาจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้

8.การทดสอบความเที่ยงตรง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และNK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR 4 ครั้ง ครั้งละ 12 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct โดยคำนวณหาค่าความเที่ยงของวิธีการตรวจสอบด้วยการคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของค่า Ct ของแต่ละยีน สำหรับค่าความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบคำนวณโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธ์ความแปรผัน (Coefficient of variation: CV) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ของการตรวจสอบแต่ละครั้งและรวมทั้ง 4 ครั้ง (Broeders *et al*., 2014)

9. การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR จำนวนตัวอย่างละ 12 ซ้ำ บันทึกค่า Ct เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยได้จากความเข้มข้นของดีเอ็นเริ่มต้นที่แตกต่าง

10.การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Multiplex Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์คัดกรองพร้อมตรวจยีนอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาเดียวกันแบบ Multiplex Real-time PCR เตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างแบบ blind sample ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน *HMG* ด้วยการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่าง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุด เดือนสิงหาคม 2562

สถานที่: ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธี GeneScan ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1980) (Table 5) พบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงจากข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมอยู่ในช่วงระหว่าง 1,439±179 ถึง 1,656±244 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีคุณภาพของดีเอ็นเอ (A260/A280) อยู่ในช่วงระหว่าง 1.84±0.12 ถึง 1.94±0.04 แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าวโพดสามารถแบ่งผลของการสกัดดีเอ็นเอได้สองกลุ่มคือกลุ่มที่ได้ความเข้มข้นสูงและคุณภาพของดีเอ็นอยู่ในช่วง 1.8-2.0 คือ เมล็ดข้าวโพด และข้าวโพดกระป๋อง ในขณะที่ ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพดและเกร็ดข้าวโพดสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ต่ำกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และคุณภาพดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.74-1.78 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผ่านกระบวนการด้านอุตสาหกรรมมาจึงทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ทำให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต่ำกว่าเกณฑ์ (Sornsomboon *et al*, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองและข้าวต่ำกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่คุณภาพดีเอ็นเอยังอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งการเติม Proteinase K และ Chloroform และ Isoamyl alcohol มีส่วนช่วยให้คุณภาพดีเอ็นเอของข้าวและถั่วเหลืองยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับผลการทดลองในภาพรวมแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ส่งผลต่อการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cankar *et al* (2006) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากซึ่งอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ สารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) ที่เกิดจากสารภายในตัวอย่าง เช่น สารฟีนอลิค หรือ ที่เกิดจากขั้นตอนการสกัด เช่น ฟีนอล คลอโรฟอร์ม หรือ ไอโซเอมิล เป็นต้น ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่นการตรวจสอบจากการวัดคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร หรือการนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR หรือ Real-time PCR เป็นต้น และจากการรายงานของ Turkec *et al* (2015) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นส่งผลต่อการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมจึงจำเป็นต้องมีวิธีการสกัดที่สามารถให้คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ดีรวมถึงสามารถดึงเอาสาร Inhibitor ต่างๆ ออกได้มากที่สุด

2. ศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบกับพืชดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 (positive)และ ข้าวโพดดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์อื่นๆ เช่น Bt11 Mon863 Bt176 GA21 และข้าวโพด Non GM รวมถึงถั่วเหลืองสายพันธุ์ 305423 และ GT40-3-2 ข้าวสายพันธุ์ Bt63 และมะละกอ ด้วยการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า

ไพรเมอร์และโพรบที่ทำการคัดเลือกมีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 ทั้ง 2 ตำแหน่งสามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 ทุกระดับการปนเปื้อน ในขณะเดียวกันไพรเมอร์และโพรบของ NK603 ทั้ง 2 ตำแหน่งสามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ทุกระดับการปนเปื้อน แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณจากพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นและผลิตภัณฑ์ต่างๆ

สำหรับยีนอ้างอิงพืช (endogenous gene) พบว่า ทั้งสามไพรเมอร์ ที่ตรวจสอบยีน *Zein Adh* และ *HMG* นั้นสามารถตรวจจับสัญญาณได้ในตัวอย่างข้าวโพดทุกตัวอย่างแต่ไม่พบสัญญาณในตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ เช่น มะละกอสายพันธุ์ 55-1 ถั่วเหลือง ข้าว (Table 6) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์และโพรบยีนอ้างอิงพืชทั้งสามที่นำมาใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างข้าวโพด

3. ผลการศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex

จากการศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบทั้งหมดที่ทำการคัดเลือกในตารางที่ 2 (Table 2) มีความสามารถในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์กล่าวคือ ไพรเมอร์และโพรบของยีนอ้างอิงข้าวโพดทั้งสามยีน *Zein Adh* และ *HMG* นั้น สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์ได้ในตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและข้าวโพดที่ไม่ดัดแปรพันธุกรรม แต่พบว่าเครื่องสามารถตรวจจับสัญญาณได้แตกต่างดังนี้ สัญญาณของยีน *HMG* และ *Adh* ตรวจพบเร็วที่สุด (ค่า Ct น้อยที่สุด) ซึ่งมีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 25.84 และ 25.65 ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจจับสัญญาณได้เร็วกว่า ยีน *Zein* ที่มีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 28.33 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามลำดับ

ส่วนไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 แต่ไม่พบสัญญาณในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม NK603 และข้าวโพดที่ไม่ดัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้พบว่า ตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 ที่อยู่บริเวณด้านปลาย 5’สามารถตรวจพบสัญญาณได้ดีกว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ที่อยู่บริเวณด้านปลาย 3’ ถึง 2 Cycles (ค่า Ct น้อยกว่า 2 Cycles) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของไพรเมอร์เช่น อุณหภูมิ ความยาว และ ค่า GC content (Bustin *et al*., 2004) และลักษณะทางกายภาพของโพรบและไพรเมอร์ เช่นการเกิด hairpin และการเกิด primer dimer (Vallone and Butler, 2004) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ตัวไพรเมอร์ที่ทำการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ตำแหน่ง 3’ (Reverse) มีค่า GC content ต่ำเพียง 38.10 เปอร์เซ็นต์ และโพรบของชุดที่ 1 มีความยาวเพียง 18 ลำดับเบส จึงทำให้มีอุณหภูมิในการจับเกาะดีเอ็นเอต่ำเพียง 54 องศาเซลเซียสซึ่งไม่สอดคล้องกับอุณหภูมิของไพรเมอร์ที่สูงถึง 60 องศาเซลเซียสแต่ในทางกลับกันพบว่าไพรเมอร์ชุดที่ 2 มีความยาวใกล้เคียงกันระหว่างเส้น Forward ด้าน 5’ และเส้น Reverse ด้าน 3’ และโพรบมีความยาวของลำดับเบสใกล้เคียงกันกับไพรเมอร์ชุดที่ 2 จึงทำให้มีความสามารถในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ดีกว่าชุดที่ 1

Table 6 The results of DNA concentration, DNA purity and specificity of Mon810, NK603 and endogenous probe and primer

Plant	GM Event	DNA Concentration (ng/ul)	DNA Purity (A260/280 Ratio)	Specificity of probe and primer				
				Event-specific		Endogenous gene		
				Mon810	NK603	*Zein*	*Adh*	*Hmg*
Maize	Mon810 ak	1,630±347	1.89±0.05	+	-	+	+	+
	Mon810 ck	1,539±179	1.90±0.07	+	-	+	+	+
	Mon810 ek	1,708±287	1.94±0.04	+	-	+	+	+
	Mon810 gk	1,439±179	1.84±0.12	+	-	+	+	+
	NK603 a	1,620±347	1.87±0.07	-	+	+	+	+
	NK603 b	1,450±216	1.85±0.09	-	+	+	+	+
	NK603 c	1,535±345	1.89±0.03	-	+	+	+	+
	NK603 d	1,656±244	1.87±0.04	-	+	+	+	+
	Bt176	1,498±320	1.89±0.13	-	-	+	+	+
	Bt11	1,539±179	1.89±0.05	-	-	+	+	+
	GA21	1,654±142	1.87±0.12	-	-	+	+	+
Soy bean	GTS 40-3-2	830±247	1.78±0.23	-	-	-	-	-
	305423	973±254	1.75±0.28	-	-	-	-	-
Rice	Bt63	930±255	2.00±0.04	-	-	-	-	-
Papaya	55-1	1,456±239	1.82±0.14	-	-	-	-	-
Pro-duct	Maize seed	1,832±142	1.89±0.09	-	-	+	+	+
	Canned Corn	1,273±152	1.89±0.15	-	-	+	+	+
	Cream corn	330±145	1.75±0.24	-	-	+	+	+
	Maize powder	630±210	1.78±0.18	-	-	+	+	+
	Corn grit	870±260	1.74±0.23	-	-	+	+	+

Notes: + detected, - not detected

สำหรับส่วนไพรเมอร์และโพรบของยีน NK603 ให้ผลสอดคล้องกับยีน Mon810 คือสามารถตรวจจับสัญญาณได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 แต่ไม่พบสัญญาณในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้พบว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 สามารถตรวจพบสัญญาณได้ดีกว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ถึง 3 Cycles โดยพบว่าโพรบของชุดที่ 1 มีความยาวเพียง 16 ลำดับเบสจึงทำให้มีอุณหภูมิในการจับเกาะดีเอ็นเอต่ำเพียง 53.5 องศาเซลเซียสซึ่งไม่สอดคล้องกับอุณหภูมิของไพรเมอร์ที่สูงถึง 62 องศาเซลเซียส โดยวีระพงศ์ (2557) กล่าวว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดของการเพิ่ม

ปริมาณยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR คือการออกแบบไพรเมอร์และโพรบให้ถูกต้องและมีความจำเพาะต่อยีนนั้นๆ ที่ต้องการตรวจสอบและหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์เช่นการเกิด dimer หรือ การเกิด hairpin loop หรือ การเกิด self-dimer เป็นต้น นอกจากนี้ Bustin *et al* (2004) ได้รายงานว่าการออกแบบโพรบควรให้มีความสามารถที่จะยึดเกาะดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ (Tm) อยู่ในช่วง 68 ถึง 70 องศาเซลเซียสหรือมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิ (Tm) ของไพรเมอร์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

จากผลการตรวจสอบตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบของยีน Event Specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืชทั้ง 3 ยีน คือ ยีน *Zein* ยีน *HMG* และ ยีน *Adh* สามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งและลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบมีผลต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al*. (2015) ที่กล่าวว่า การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค Real-time PCR นอกจากนี้การทดสอบความใช้ได้ของโพรบและไพรเมอร์ก่อนจะใช้ก็มีความสำคัญเช่นกันถึงแม้ว่าจะใช้โปรแกรมที่น่าเชื่อถือในการออกแบบ และจากการทดลองเลือกใช้ไพรเมอร์โพรบยีน Event Specific Mon810 ชุดที่ 2 และ Event Specific NK603 ชุดที่2 และยีนอ้างอิงพืชทั้ง 3 ยีนมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ถึงแม้ว่ายีน *Zein* จะให้ค่าในการตรวจสอบช้ากว่ายีนอื่นๆ แต่การตรวจสอบยีนอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาแบบ Multiplex Real-time PCR เป็นการควบคุมคุณภาพการตรวจสอบเท่านั้น โดยเป้าหมายหลักของการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมคือยีน Event Specific Mon810 และ NK603 (Hugo *et al*., 2002)

สำหรับการทดลองขั้นต่อไปทำการจัดกลุ่มดังนี้เลือกยีน *Zein* ศึกษาควบคู่กับไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 และ NK603 ชุดที่ 1 และยีน *HMG* ศึกษาควบคู่กับไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 และ NK603 ชุดที่ 2 โดยนำมาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์

4. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

4.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 และ *Zein*)

จากการศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 NK603 และ ยีน *Zein* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex และ Multiplex ในการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า การตรวจ Event Specific ของ Mon810 ควบคู่กับยีน *Zein* ในปฏิกิริยาเดียวกัน มีเพียงกรรมวิธีที่ 1 ที่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของ Mon810 5 ไมโครโมลาร์ ที่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณ Event Specific ของ Mon810 ได้ สำหรับไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของยีน *Zein* ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เป็นต้นไป สามารถตรวจจับสัญญาณของยีน *Zein* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ Mon 810 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และโพรบที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ นั้นสามารถตรวจจับสัญญาณ Event Specific ของ Mon810 ได้ แต่ตรวจพบในระยะสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา (Ct เฉลี่ย = 36.14) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำ Real-time PCR โดยความเข้มข้นของไพร์เมอร์และโพรบของ Mon810 ที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ ไม่ต่ำกว่า10

ไมโครโมลาร์ ส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบของยีน *Zein* ที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ ไม่ต่ำกว่า 5 ไมโครโมลาร์ (Fig.2A) สำหรับการตรวจ Event Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน *Zein* พบว่าในทุกกรรมวิธีสามารถตรวจพบสัญญาณของทั้งสองยีนได้ โดยพบว่าในการตรวจสอบ Event Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน *Zein* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของ NK603 และยีน *Zein* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ไมโครโมลาร์ ขึ้นไป (Fig.2B) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการตรวจจับสัญญาณของยีน *Zein* พบเจอได้แม้ความเข้มข้นของไพร์เมอร์และโพรบจะอยู่ในระดับต่ำทั้งนี้เนื่องมาจากยีน *Zein* เป็นยีนอ้างอิงพืช (endogenous gene) ที่มีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลาและทุกเนื้อเยื่อหรือ ที่เรียกว่า constitutive gene (Sinha *et al*., 2015) จึงสามารถตรวจจับสัญญาณได้รวดเร็ว (ค่า Ct ต่ำ) ส่วนการตรวจจับ Event Specific ของ NK603 ก็สามารถตรวจจับสัญญาณได้รวดเร็วคล้ายกับยีน *Zein* ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Shrestha *et al*. (2010) ที่ทำการตรวจสอบยีน NK603 ยีน Mon810 ร่วมกับ ยีน *Zein* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่า ระดับความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่เท่ากันแต่สามารถตรวจจับสัญญาณของ Mon810 ได้ช้ากว่ายีน NK603 และ ยีน *Zein*

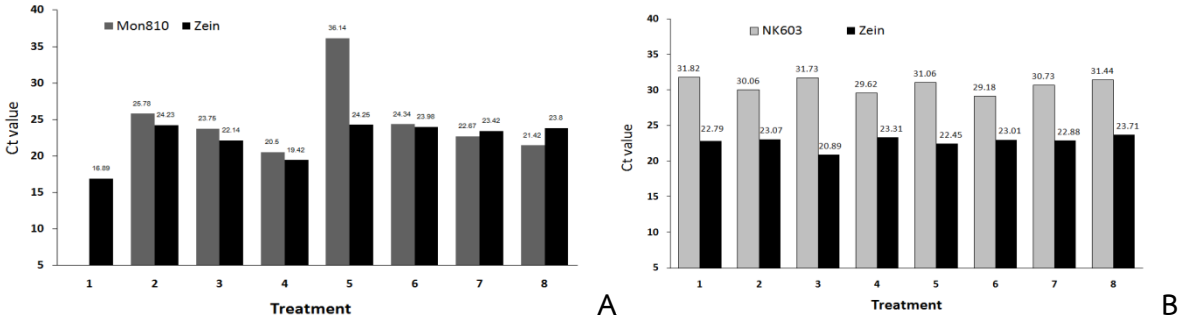

Figure 2 The Ct value of each treatment that suitable for Duplex (Mon810 area 1/Zein, A) and (NK603 area 1 /Zein, B) Real-time PCR techniques.

สำหรับการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 NK603 ชุดที่ 1 ควบคู่กับยีน *Zein* พบว่าทุก กรรมวิธีตรวจพบสัญญาณทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ Event Specific ของ Mon810 และ NK603 และยีน *Zein* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมแบบ Duplex ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ของ NK603 และ ยีน *Zein* คือ 5 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพร์เมอร์ของ Mon810 คือ 10 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ซึ่งความเข้มข้นของโพรบและ ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของ Mon810 NK603 และยีน *Zein* สำหรับการศึกษาครั้งนี้คือ 10 5 และ 5 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (Fig.3)

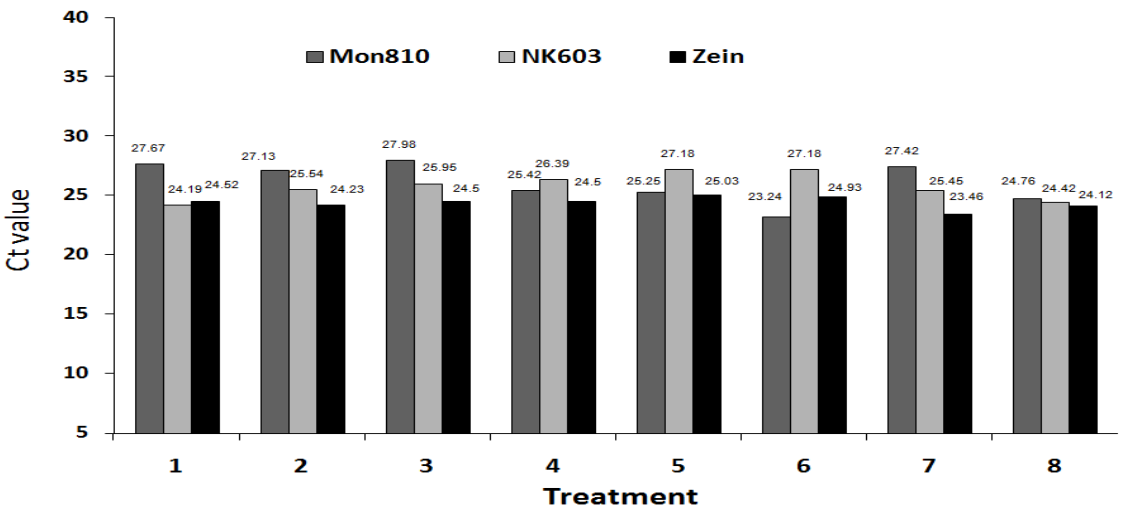

Figure 3 The Ct value of each treatment that suitable for multiplex (Mon810/NK603 area1/Zein) Real-time PCR technique.

4.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 ชุดที่ 2 และ *HMG*)

จากการศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพร์เมอร์และโพรบ Mon 810 NK603 และ ยีน *HMG* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex และ Multiplex ในการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 ผลการทดลองพบว่า ในการทำปฏิกิริยาแบบ Duplex (Mon810ชุดที่ 2/*HMG*) ทุกกรรมวิธีสามารถตรวจพบสัญญาณของยีน Event-Specific Mon810 และ ยีน *HMG* โดยพบว่าในการตรวจสอบ Event-Specific ของ Mon810 ควบคู่กับยีน *HMG* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไปและโพรบของ Event-Specific Mon810 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนยีน *HMG* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และโพรบของยีน *HMG* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป (Fig.2B) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ทำให้การตรวจพบสัญญาณของแต่ละยีนรวดเร็วมากขึ้น (Ct น้อย) ดังภาพที่ 4 (Fig.4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจจับสัญญาณของยีน Event-Specific NK603 และยีน *HMG* ที่สามารถตรวจจับสัญญาณของยีนทั้งสองได้ทุกกรรมวิธีโดยในการตรวจสอบ Event-Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน *HMG* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ Event-Specific NK603 ตั้งแต่ 0.3 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไปและโพรบของ Event-Specific NK603 ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนยีน *HMG* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และโพรบของยีน *HMG* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบก็สามารถตรวจจับสัญญาณของทั้งสองยีนได้เร็วขึ้นเช่นเดียวกัน โดยสอดคล้องกับผลการทดลองของการตรวจสอบความเข้มข้นสุดท้ายของ โพรบและไพรเมอร์ของปฏิกิริยาแบบ Duplex ที่รายงานโดย JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)

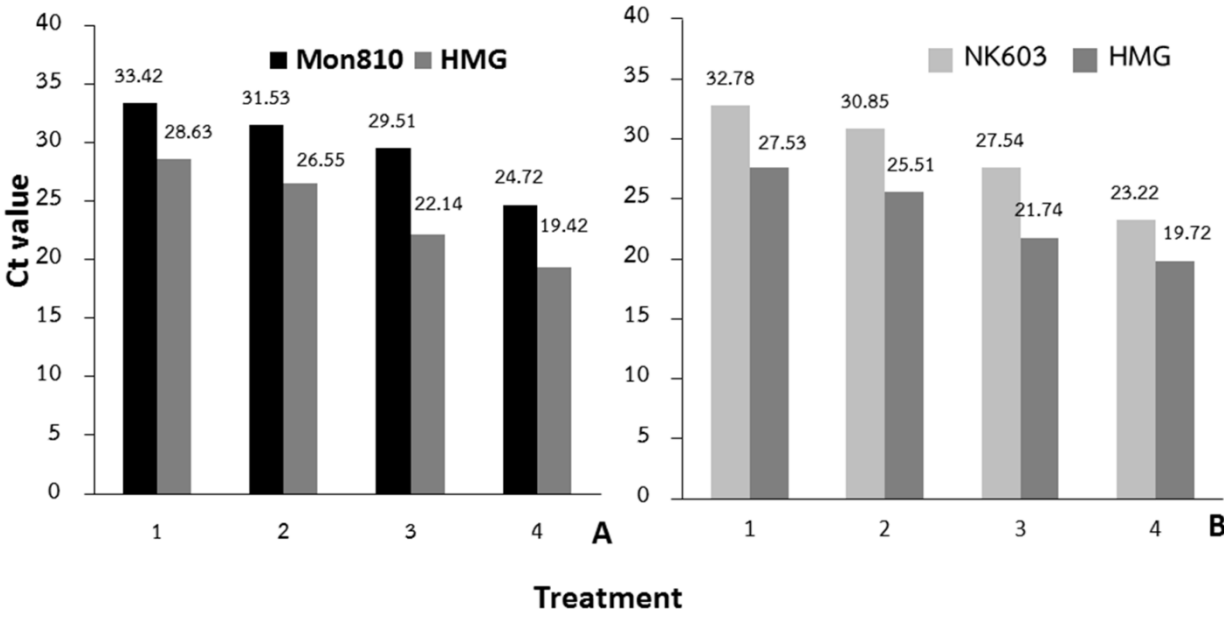

Figure 4 The Ct value of each treatment that suitable for Duplex (Mon810 area 2/*HMG*, A) and (NK603 area 2 /*HMG*, B) Real-time PCR techniques.

สำหรับการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 NK603 ควบคู่กับยีน *HMG* พบว่า ทุก ๆ กรรมวิธีตรวจพบสัญญาณทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ Event-Specific ของ Mon810 และ NK603 และยีน *HMG* (Fig.5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมแบบ Duplex ซึ่งความเข้มข้นในระดับนี้เหมาะสมกับการวิเคราะห์แยก Event (quality Test) เพียงเท่านั้น เพราะให้คำตอบในการตรวจสอบเพียงตรวจพบหรือตรวจไม่พบ แต่อาจไม่เหมาะสมกับการหาปริมาณของแต่ละยีนนั้นๆ (quantitative Test) ที่หาระดับการมีอยู่ของยีนนั้น ว่ามีปริมาณเท่าไหร่มากน้อยเพียงใด นอกจากปัจจัยเรื่องความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่ส่งผลต่อค่า Ct แล้วยังมีปัจจัยของโพรบที่ติดบริเวณตำแหน่ง 5' และบริเวณ3' ที่ถูกติดด้วยสีที่แตกต่างกันเช่น FAM HEX Cy5 หรือติดด้วย BHQ ซึ่งสีที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการแผ่รังสีในช่วงคลื่นที่แตกต่างกัน และสำหรับการติดปลายบริเวณ 3' ที่ถูกติดด้วย BHQ สามารถตรวจสอบได้ดีกว่าการติดโพรบด้วยสีอื่นๆ เพราะการแผ่รังสีของแสงทั้งสองด้านซึ่งอาจจะซ้อนทับกันทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก (Johansson, 2006) และสำหรับปัจจัยสุดท้ายซึ่งเกี่ยวข้องกับความคุ้มทุนการนำไปใช้ประโยชน์ คือเรื่องของราคาโพรบซึ่งในการทดลองนี้ความเข้มข้น โพรบที่ต่ำที่สุดสามารถตรวจเจอจึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์คัดแยก Event ในเชิงคุณภาพ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Simplex Duplex และ Multiplex พบว่าระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์แบบ Simplex และ Duplex ใช้เวลานานกว่าเนื่องจากต้องทำแต่ละยีนแยกกัน ทำให้ต้องใช้เวลามากขึ้น และมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ส่วนการตรวจวิเคราะห์แบบ Multiplex ใช้เวลาในการตรวจรวดเร็วกว่าและให้ผลของค่า Ct ไม่แตกต่างกันกับการตรวจสอบ

ด้วย Simplex และ Duplex ที่ความเข้มข้นโพรบและไพรเมอร์ชุดเดียวกัน นอกจากนี้ยังประหยัดต้นทุนเรื่องสารเคมี และอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์ (Debode *et al*., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lab Life-Real-Time PCR (2015) ที่รายงานการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Multiplex ว่าดีกว่าการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Simplex ในหลายด้าน เช่น สามารถตรวจสอบได้หลายยีนในคราวเดียวกันและใช้สารเคมีเทียบเท่าการทำ Simplex แต่ให้ผลการตรวจสอบหลายยีนต่อครั้งต่อปฏิกิริยา ลดความเสี่ยงที่เกิดในขั้นตอนปฏิบัติงานแต่ละครั้ง และช่วยประหยัดเวลาในการทำงาน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการตรวจสอบแบบ Multiplex มีความจำเป็นจะต้องทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงและความเหมาะสมความเข้มข้นของไพรเมอร์โพรบ และองค์ประกอบหรือสภาวะของสารเคมีร่วมกันก่อนที่จะปฏิบัติงานจริง ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานเช่น Alary *et al*., 2003; Waiblinger *et al.,* 2008; Cottent *et al*., 2013; Huber *et al*., 2013; Broeders *et al*., 2014; Fraiture *et al*., 2015; Peng *et al*., 2016)

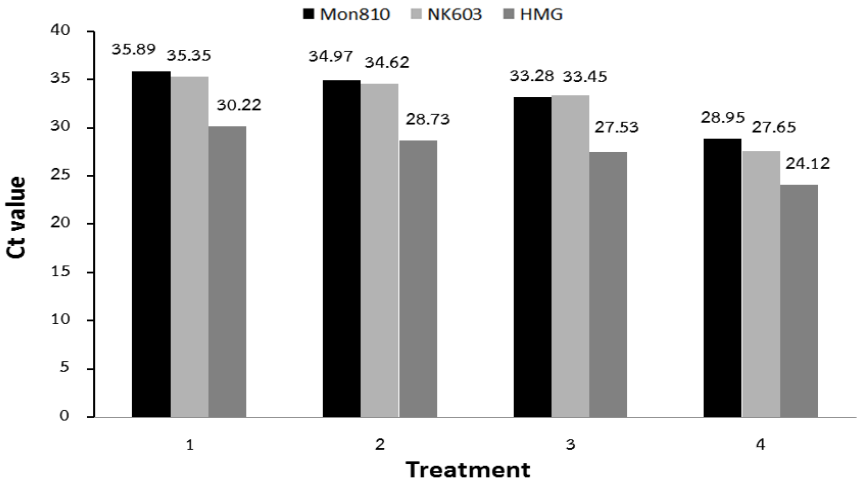

Figure 5 The Ct value of each treatment that suitable for multiplex (Mon810/NK603 area 2 */HMG*) Real-time PCR technique.

จากการทดลองที่ 3 และ 4 สามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งและความเหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งผลต่อความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในปฏิกิริยาโดยไพรเมอร์และโพรบที่มีการจับเกาะได้ดีจะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายต่ำจากการทดลองจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ของทั้งการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่าไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 ถึง 100 เท่า สอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al*. (2015) ที่กล่าวว่า การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค Real-time PCR และควรจะทำการทดสอบความใช้ได้ของโพรบและไพรเมอร์ก่อนจะใช้ถึงแม้ว่าไพรเมอร์และโพรบดังกล่าวจะใช้โปรแกรมที่น่าเชื่อถือในการออกแบบ

5. ผลการทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (Practicability and Specificity) ต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม events ต่างๆ ได้แก่ Mon810, Bt 11, Bt176, NK603 และตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR เปรียบเทียบกับ Multiplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ทำการคัดเลือกมีความจำเพาะเฉพาะกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 ทุกระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่ไม่พบสัญญาณดังกล่าวในการตรวจสอบข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรมและพืชชนิดอื่นๆ ในขณะเดียวกันไพรเมอร์และ โพรบของ NK603 สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ในทุกระดับตั้งแต่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปและไม่สามารถตรวจจับสัญญาณจากพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่นเดียวกัน สำหรับยีนอ้างอิงข้าวโพด (*HMG*) พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในตัวอย่างข้าวโพดทุกตัวอย่างแต่ไม่พบสัญญาณในตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ (Table 6) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์และโพรบที่นำมาใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างข้าวโพด ดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603

เมื่อเปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้จากการตรวจจับสัญญาณด้วยเทคนิค Simplex และ Multiplex Real-time PCR (Table7) พบว่าเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีความเหมาะสมและประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์จำแนกยีนเทียบเท่ากับเทคนิค Simplex Real-time PCR ซึ่งเมื่อตรวจสอบค่า Ct เฉลี่ยยีน Event Specific NK603 ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่ทุกระดับการปนเปื้อนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับค่า Ct เฉลี่ยของการตรวจสอบยีน Event Specific NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex แต่สำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ในระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ 0.01 ถึง 10% โดยค่า Ct เฉลี่ยของยีน Event Specific Mon810 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex มีค่าต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์จากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeders *et al* (2014) พบว่า การใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 สามารถตรวจสอบได้ถูกต้องไม่พบการเกิด False negative และ False positive

นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีข้อดีหลายประการดังนี้ ประหยัดเวลาในการทำงาน ตรวจสอบได้หลายยีนในครั้งเดียวกัน และใช้สารเคมีน้อยกว่าหรือเทียบเท่ากัน ลดความเสี่ยงของผลการทดสอบจากการปฏิบัติงานหลายครั้ง (Life-Real-Time PCR, 2015) และ สามารถตรวจคัดกรองสองยีนพร้อมกับการตรวจยีนจำเพาะพืชเพื่อการควบคุมคุณภาพได้ในคราวเดียวกัน (ปิยรัตน์และคณะ, 2562; Alary *et al.*, 2003; Debode *et al.*, 2013)

Table 7 Comparison of Event Specific Mon810 and NK603 and endogenous gene detection using Simplex and Multiplex Real-time PCR

Event	GM Conta-minated (%)	Ct Mean of								
		Event Specific						Endogenous gene		
		Mon810			NK603			*HMG*		
		Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test
Mon810 ak	<0.09	ND	37.62	*	ND	ND	ns	28.82	27.65	ns
Mon810 ck	0.5	35.44	34.25	*	ND	ND	ns	28.52	27.47	ns
Mon810 ek	2	33.76	31.8	*	ND	ND	ns	28.40	27.94	ns
Mon810 gk	10	31.24	28.04	*	ND	ND	ns	28.48	27.92	ns
NK603 a	0.1	ND	ND	ns	36.60	37.19	ns	28.27	28.14	ns
NK603 b	0.5	ND	ND	ns	33.30	33.92	ns	27.94	28.32	ns
NK603 c	1	ND	ND	ns	31.97	31.98	ns	28.32	27.98	ns
NK603 d	2	ND	ND	ns	30.31	29.72	ns	28.23	27.97	ns
Bt176	5	ND	ND	ns	ND	ND	ns	25.43	24.77	ns
Bt11	5	ND	ND	ns	ND	ND	ns	25.31	24.89	ns
Non-GM Maize	0	ND	ND	ns	ND	ND	ns	24.33	25.07	ns

Notes: ND=Not detected, ns= non-significant, * = significant at p value < 0.05

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า เทคนิค Multiplex Real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ในระดับการเจือจางดีเอ็นเอตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:16 หรือระดับการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมตั้งแต่ 0.125% ถึง 2% โดยอัตราการเจือจางที่อัตรา 1: 256 ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้ โดยค่า Ct ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณ Copy number ที่ลดลง เมื่อนำค่า Ct ที่ได้ของแต่ละระดับการเจือจางมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Del Gaudio *et al*. (2012) พบว่า ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Event-specific Mon810 และ NK603 และ *HMG* เฉลี่ยคือ -3.10 -3.07 และ -3.38 ตามลำดับ ค่าประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยา (PCR efficiency) ของปฏิกิริยายีน Event-specific Mon810 และ NK603 และ *HMG* เท่ากับ 110.17 111.71 และ 97.63 ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิของการทำปฏิกิริยาของทุกยีนเท่ากับ 0.99 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค

Multiplex Real-time PCR (Broeders *et al*., 2014) ดังนี้ ค่าSlope -3.1 ถึง -3.6 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 80 ถึง 120 และค่าสัมประสิทธิของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 (Table 8)

Table 8 The PCR efficiency and Slope of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

Dilution Rate GM: total Volume	% GMO level	DNA conc.	Target Copies No.	Ct of target gene detection		
				Mon810	NK603	*HMG*
1:0	2%	100	7339.4	28.04±0.12	27.18±0.15	24.23±0.02
1:2	1%	50	3669.7	30.90±0.13	30.18±0.12	27.46±0.08
1:4	0.5%	25	1834.9	34.24±0.25	33.27±0.36	31.32±0.14
1:16	0.125%	6.25	458.7	37.21±0.32	36.30±0.27	34.22±0.61
1:256	0.008%	0.39	28.67	-	-	37.54±0.4
PCR efficiency (%)				110.17	111.71	97.63
Slope				-3.10	-3.07	-3.38

7. ผลการทดสอบหาการปนเปื้อนและจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD)

สำหรับการทดสอบหาร้อยละการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) ของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Event-specific Mon810 และ NK603 พร้อมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมตั้งแต่ 369.7 ถึง 7,339 Copies ได้ครบทั้ง 12 ซ้ำ ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม 73.39 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณของยีน Event-specific Mon810 และ NK603 ได้ครบทุกซ้ำ ยกเว้น ยีน *HMG* ซึ่งเป็นยีน endogenous สามารถตรวจพบสัญญาณได้ตั้งแต่ 7.34-7,339 Copies เป็นต้นไป ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าร้อยละการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ที่ระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 9 (Table 9)

Table 9 The limited of detection of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

GM Conta-minated	DNA copy No.	Ct average	Replicate 1	2	3	4	% detection	ค่าเฉลี่ย Ct	SD	RSD (%)
2%	7,339	Mon810	31.14	31.52	31.78	31.80	100 %	31.56	0.27	0.84
		NK603	31.53	31.51	31.88	31.13	All gene	31.51	0.26	0.84
		HMG	25.54	25.83	25.59	25.99		25.74	0.18	0.71
0.2%	733.9	Mon810	35.34	35.61	35.63	35.46	100 %	35.51	0.12	0.33
		NK603	34.81	34.66	34.60	34.85	All gene	34.73	0.10	0.30
		HMG	29.10	29.61	29.54	29.47		29.43	0.19	0.66
0.1%	369.7	Mon810	36.76	37.34	37.40	37.69	100%	37.29	0.33	0.90
		NK603	36.17	37.32	37.19	36.82	All gene	36.87	0.45	1.21
		HMG	30.67	30.41	30.74	30.80		32.66	0.15	0.46
0.02%	73.39	Mon810	nd	nd	nd	nd	Only	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	*HMG*	-	-	-
		HMG	34.61	34.72	34.75	34.02	100%	34.52	0.34	0.99
0.002%	7.339	Mon810	nd	nd	nd	nd	Only	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	*HMG*	-	-	-
		HMG	36.16	35.93	36.71	36.60	100%	36.35	0.32	0.87
0.0002%	0.734	Mon810	nd	nd	nd	nd	0%	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	All	-	-	-
		HMG	nd	nd	nd	nd	gene	-	-	-

Noted: nd = not detected

8. ผลการทดสอบความเที่ยงตรง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และNK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

การทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของวิธีนั้นบ่งบอกถึงความสามารถของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 โดยค่าความเที่ยงตรงและค่าความแม่นยำของวิธีสามารถตรวจสอบโดยจากค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) และค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Standard Deviation: SD) ของการหาปริมาณยีน Event-specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืช *HMG* จากการทำตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 4 รอบ ผลการทดลองพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD และ SD ของการหายีน Event-specific Mon810 มีค่าเท่ากับ 1.84 และ 0.67 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ RSD และ SD ของการหายีน Event-specific NK603 มีค่า 1.63

และ 0.61เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเที่ยงตรงและความแม่นยำของทั้งสองยีนมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR (Broeders *et al*., 2014) คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD ต้องไม่เกิน 25% ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Del Gaudio *et al*. (2012) ที่ได้รายงานว่าการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงคุณภาพต้องมีความเที่ยงในการตรวจสอบไม่ควรเกิน 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเทคนิค Multiplex Real-time PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 มีประสิทธิภาพคงที่ นอกจากนี้อาจกล่าวได้ว่า อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ รวมถึงวิธีการที่เกี่ยวข้องเช่น การเตรียมตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอ มีความสม่ำเสมอสามารถทำให้ผลการตรวจจำแนกยีนที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ

Table 10 The repeatability and reproducibility of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

Sample	Repli-cate	Target Gene	Assign Average Copy number	AVG Ct	Accuracy			Precision	
					Assay Average Copy number	Assay conta-minate Value (%)	Bias(%)	Repeat-ability (SD)	Reproduci-bility (% RSDr)
Mon810: NK603 (1:1) 0.1% Assign conta-minate value	1	Mon810	369.7	36.33	366.15	0.0991	0.9	0.43	
		NK603	369.7	36.80	369.44	0.0997	0.3	0.35	
		HMG	733,940	27.93	734,234	100.04	0.04	0.07	
	2	Mon810	369.7	36.93	368.37	0.0996	0.4	0.32	
		NK603	369.7	37.50	372.03	0.1006	-0.6	0.36	
		HMG	733,940	27.77	733,059	99.880	0.12	0.05	
	3	Mon810	369.7	37.16	369.21	0.0999	0.1	0.31	
		NK603	369.7	37.58	372.32	0.1007	-0.7	0.28	
		HMG	733,940	27.73	732,766	99.840	0.16	0.12	
	4	Mon810	369.7	35.72	363.90	0.0984	1.6	0.31	
		NK603	369.7	36.21	367.26	0.0993	0.7	0.37	
		HMG	733,940	27.69	732,472	99.800	0.2	0.04	
Standard information		Mon810	369.7	37.29	Results of Precision, Repeatability and Reproducibility		0.75	0.67	1.84
		NK603	369.7	36.87			0.58	0.61	1.63
		HMG	733,940	27.89			0.13	0.14	0.49

9. ผลการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นในปฏิกิริยา Real-time PCR ที่แตกต่าง 50 100 150 และ 200 นาโนกรัม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON 810 และ NK603 ในระดับที่ต่างๆ กันส่งผลให้การตรวจจับสัญญาณแตกต่างกัน (ค่า Ct ที่แตกต่างกัน) ในทุกๆ ยีน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 นาโนกรัม ให้ค่า Ct ที่ได้จากการตรวจสอบยีน Event-specific Mon810 เท่ากับ 33.39±0.06 และยีน Event-specific NK603 เท่ากับ 35.12±1.19 ซึ่งมีค่ามากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า Ct ที่ได้จากความเข้มข้นดีเอ็นเริ่มต้นที่ 100 150 และ 200 นาโนกรัม ที่มีค่า Ct เฉลี่ยจากการตรวจสอบยีน Event-specific Mon810 เท่ากับ 31.27±1.06 และ ยีน Event-specific NK603 เท่ากับ 32.33±1.27 นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นให้ค่า Ct ของ ยีน *HMG* ซึ่งเป็น endogenous gene ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR คือ 100 นาโนกรัม และจากการรายงานของ Cankar *et al* (2006)และ Turkec *et al* (2016) ที่กล่าวว่า การสกัด ดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ Real-time PCR โดยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จะแปรผกผันกับค่า Ct ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงจะมีได้ค่า Ct ที่ต่ำและในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาต่ำจะทำได้ค่า Ct ที่สูง แต่ในทางกลับกัน Ellison *et al*. (2006) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาใน Real-time PCR แต่ copy number ในดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยแต่ถ้ามี copy number ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบระดับตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไปก็จะทำเกิดปฏิกิริยา Real-time PCR ได้ตามทฤษฎี

10.ผลการตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Multiplex Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ Event Specific ของ Mon810 และ NK603 พร้อมตรวจยีนอ้างอิงพืช *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกันแบบ Multiplex Real-time PCR ในตัวอย่างแบบ blind sample เปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ให้ผลการทดสอบเหมือนกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ 100 % โดยไม่พบการเกิด False positive และ False negative (Table 11)

Table 11 The event screening test results of blind samples were tested using Multiplex Real-time PCR technique (Mon810/NK603/*HMG*) compared with simplex Real-time PCR technique

No. Sample	Result of Screening test using				
	Multiplex Real-time PCR			simplex Real-time PCR	
	Mon810	NK603	*HMG*	Mon810	NK603
0065	-	-	-	-	-
0066	-	-	-	-	-
0137	-	-	-	-	-
0808	-	-	-	-	-
0862	-	+	+	-	+
0863	+	+	+	+	+
0864	+	+	+	+	+
0865	+	+	+	+	+
0866	+	+	+	+	+
0867	+	+	+	+	+
0868	+	+	+	+	+
0869	-	-	+	-	-
0876	-	-	-	-	-
0929	-	-	-	-	-
0936	-	-	-	-	-
0997	-	-	-	-	-
0998	-	-	-	-	-
0982	-	-	-	-	-
0983	-	-	-	-	-
Mon810	+	-	+	+	-
NK603	-	+	+	-	+
Deionized water	-	-	-	-	-

Notes: + (positive), GM detected; - (negative) Not detected

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR โดยการตรวจจำแนกยีน Event-specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงข้าวโพด *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกันมีประสิทธิภาพสามารถใช้ในตรวจจำแนกยีนดังกล่าว โดยโพรบและไพรเมอร์มีความจำเพาะและเหมาะสมต่อการจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 อีกทั้งค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดสอบวิธี Multiplex Real-time PCR อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ และเมื่อทดสอบใช้ในการจำแนกยีนพบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถจำแนกยีนได้ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มี False positive/negative โดยมีค่าขีดจำกัดการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถตรวจได้คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) นำผลงานไปจัดทำเอกสารวิธีการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 พร้อมกับยีน endogenous gene (*HMG*) ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR เพื่อขยายขอบข่ายการทดสอบเข้าสู่ระบบ ISO/IEC17025:2017 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม

2) นำผลงานที่ได้ถ่ายทอดให้กับหน่วยงานเอกชนหรือภาคราชการอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจจำแนกข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 เชิงคุณภาพ

3) ตีพิมพ์ผลงานเผยแพร่ทางวารสารวิชาการจำนวน 2 ฉบับ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ผู้มีส่วนช่วยดำเนินการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ภิยุรดา ดนัยศิริพงษ์ อรรคพล ภูมีศรี พงศกร สรรค์วิทยากุล และศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2558.การสร้างดีเอ็นเอมาตราฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม. รายงานโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร. กรมวิชาการเกษตร

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ปิยนุช ศรชัย ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และพงศกร สรรค์วิทยากุล. 2562. การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025. วารสารวิชาการเกษตร. ปีที่ 36 ฉบับที่ 3: 316-331

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2557. เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ Real-time PCR. บริษัท ดีทรีโอ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 157 หน้า

Alary, R., A. Serin, D. Maury and P. Joudrier. 2003. Comparison of simplex and duplex Real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. Food control 13:235-244.

Broeders, S., I, Huber, L. Grohamann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens and D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative Real-time PCR methods. Trends in Food Science and Technology 37:115-126.

Bustin, SA., T. Nalon. 2004. Primer and Probes. Pages 279-328. In: Bustin SA. Eds. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, California: International university line.

Cankar, K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by Real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quntification of GMO. BMC Biotechnology. 15pp.

Charles Delobel, C., E. Grazioli, S. Larcher, M. Mazzara and G. Van Den Eede. 2008. Event Specific method for the quantification of maize line LY038 using Real-time PCR-Validation report and protocol. EUR 23647 EN. Luxembourg: Publication office of the European Union. JRC48919 (ISBN 978-92-79-11047-4).

Cottent, G., C. Blancpain, V. Sonnard and P. F. Chuah. 2013. Development and validation of multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. Anal Bioanal. Chem. 405: 6831-6844.

Debode, F., E. Janssen and G. Berben. 2013. Developement of 10 new screening PCR assays for GMo detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminator (t35S, tE9, tOCS, tg7). Eur. Food Res. Technol. 236:659-669.

Del Gaudio, S., Cirillo, A., Di Bernardo, G. and M. Cipollaro. 2012. Verification of Real-time PCR methods for qualitative and quantitative testing of genetically modified organism. J. Food Qual. 35: 442-447.

Ellison, S.LR., C. A. English, M. J. Burns and J. T. Keer. 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using Real-time PCR. BMC Biotechnology. 11 pp.

Fraiture, M-A., P. Herman, I. Taverniers, M. DeLoose, D. Deforce and N. H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International 22 pp.

Huber, I., A. Block, D. Sebah and et al.2013. Development and validation of duplex, triplex and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. J. Agr. Food Chem. 61: 10293-1301.

Hugo, R.P., I.R. Martin and H.V. Ruben. 2002. Detection and quantification of transgenes in grains by Multiplex and Real time PCR. J. Agric. Food Chem. 50(16): 4431-4436.

ISAAA. 2018. ISAAA's GM Approval Database. http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/.

Johansson M.K. 2006. Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. In: Didenko V.V. (ed) Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Methods in Molecular Biology™, vol 335. Humana Press

JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011. JRC- Compendium of reference methods for GMO analysis. Luxembourg: Publication office of the European Union. 259 p. (http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/22754/1/gmo-jrc_reference%20report_2011_publ.pdf)

Kramkowska, M., T. Grzelak and K. Czyzewska. 2013. Benefits and risks associated with genetically modified food products. Ann. Agr. Envir. Med. 20(3): 413-419.

Lab Life-Real-Time PCR. 2015. Compare and contrast: Multiplex vs singleplex PCR. Roche Life Science. Posted on September 19,2015. Available at: (https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/Real-time-pcr/compare-and-contrast-Multiplex-vs-singleplex-pcr.html) AccessedL 12 August, 2018.

Mazzara M., C. Paoletti, J. Puumalaainen, D. Rasulo and G. van Den Eede. 2005. Event-specific method for the quantitation of maize line NK603 using Real-time PCR-Validation Report and Protocol. EUR 21825 EN. Luxembourg: Publication office of the European Union. JRC32103 (ISBNL 92-79-00106-x).

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

Peng, C., P. Wang, X. Xu, X. Wang, W. Wei, X. Chen and J. Xu. 2016. Development of qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. Springer Plus. 5: 889.

Rogriguez, A., M. Rodriguez, J.J. Cordoba and MJ. Andrade. 2015. Design of primers and probes for quantitiative Real-time PCR method. Methods Mol Biol. 1275:31-56

Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology. 5:69-76.

Shrestha H.K., H. Kae-Kang and C. Men-Chi. 2010. Detection of genetically modified maize (Zea mays L.) in seed samples from Nepal. Afr. J. Biotechnol. 9(34): 5581-5589.

Sinha P., R.K. Saxena, V.K. Singh, L. Krishnamurthy and R.K. Varshney. 2015. Selection and validation of housekeeping Genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (Cajanus cajan) under heat and salt stress conditions. Front. Plant Sci. 6:1071.

Sornsomboon, N., P. Na Nakorn and T. Theerachai. 2016. Detection of genetically modified maize and soybean using PCR. J. Sci. Technol. 5(3): 1-7.

Sornchai, P., T. chookaew, N. Kaewnuy, T. Assawamongkolsiri and K. Wongwathanarat. 2018. Developing of Genetically Modified Maize, Mon810 and NK603 Detection Method using Multiplex Real-time PCR technique. Pages 27-40. In: Proc. 15th KU-KPS National Conference Proceeding. Dec. 6-7,2018. Nakhon Pathom.

Turkec, A., H. Kazan, B. Karacanli and S. J. Lucas. 2015. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modified organism (GMOs)) in maize food and fee products. J. Food Sci. Technol. 52(8): 5164-5171.

Vallone, PM. And JM. Butler. 2004. Auto dimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. Biotechniuqes. 37: 226-231.

Waiblinger, H. U., B. Ernst, A. Anderson and K. Pietsch. 2008. Validation and collaborative study of a P35S and T nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organism in food product. Eur. Food Res. Technol. 226: 1221-1228.

13. ภาคผนวก

ไม่มี