# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

**1. แผนงานวิจัย** : -

**2. โครงการวิจัย** : พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม

**กิจกรรมที่ 1** : พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล

**3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR

**ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Detection of Genetically Modified Papaya and Processed Papaya Products with Real-Time PCR

**4. คณะผู้ดำเนินงาน**

**หัวหน้าการทดลอง** : นายธีระ ชูแก้ว สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

**ผู้ร่วมงาน** : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

: นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ กรมการข้าว

: นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**5. บทคัดย่อ**

วิธีการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งการตรวจสอบเชิงปริมาณและคุณภาพ ส่วนใหญ่เป็นการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ย่อมส่งผลต่อวิธีการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป การทดลองนี้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้แก่ ผลมะละกอสุก ผลมะละกอดิบ เมล็ดมะละกอ ใบมะละกอสด ใบชามะละกอ แยมมะละกอ บ๊วยเค็มมะละกอ มะละกออบแห้งและน้ำผลไม้ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 5 วิธีคือ 2%CTAB, Guanidinium-Chloroform, GeneScan, Cell breaking และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy mericon Food Kit) เปรียบเทียบผลการสกัดระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านและไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification พบว่า ตัวอย่างและวิธีการสกัดที่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์คือ ใบมะละกอสด เมล็ดมะละกอสกัดด้วยวิธี GeneScan ใบชามะละกอสกัดด้วยวิธี 2%CTAB ผลมะละกอดิบสกัดด้วยวิธี Cell breaking ผลมะละกอสุกสกัดด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform สำหรับวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับตัวอย่าง น้ำผลไม้ มะละกออบแห้ง บ๊วยเค็มมะละกอและแยมมะละกอคือ ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ การทดสอบคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบยีน Papain endogenous จำนวน 5 คู่ พบว่า ทุกคู่ไพร์เมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสม่ำเสมอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่อ่านได้จากกราฟความเข้มข้นมาตรฐานกับความเข้มข้นในช่วงที่กำหนดมีความถูกต้องและแม่นยำ สำหรับค่าความแม่น (Accuracy, %Bias) ค่าความเที่ยง (Precision, %RSD) ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability, RSD$^{r}$)

และความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility, $RSD^R$) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC พบว่า อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยอยู่ในช่วงค่าไม่เกิน 25% แสดงว่า วิธีทดสอบมีความเหมาะสมและเป็นไปตามที่ข้อกำหนดระบุ ค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) และความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) ของการตรวจวิเคราะห์มะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ 12.5 copies และ 125 copies ตามลำดับ

The qualitative and quantitative detection of genetically modified (GM) papaya depend on the different DNA extraction methods as well as affect the analytical results. Thus, comparison of different DNA extraction methods with purified and unpurified DNA using Wizard®Miniprep DNA Purification was investigated. Various fresh papaya and processed papaya products, including ripe papaya, unripe papaya, papaya seeds, papaya leaf, papaya-leaf tea, jam, dried salted papaya, dried sweetened papaya, and juice, were examined. Five DNA extraction methods were studied including 2%CTAB, Guanidinium-Chloroform, GeneScan, Cell breaking, and DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Results showed that the suitable extraction method for papaya leaf and papaya seeds achieved from GeneScan with purified, whereas the suitable extraction method for papaya-leaf tea and unripe papaya obtained from 2%CTAB and Cell breaking, respectively, with purified. The Guanidinium-Chloroform with purified was found to be the best method to extract DNA from a ripe papaya. Moreover, jam, dried salted papaya, dried sweetened papaya, and juice was suitable for DNeasy mericon Food Kit without purified. The suitable papain endogenous primers for PCR amplification were tested. The results found that all five different papain endogenous primers achieved consistent results for PCR amplification. The development on validation of analytical method for detecting GM papaya line 55-1 and PRSV-SC with real-time PCR using GMOs-Hawaii-C1 and GMOs-SC-C1 plasmid were determined. Results indicated that $R^2$ value and slope from a standard curve, as well as PCR efficiency, were within an acceptable range. Accuracy (%Bias), Precision (%RSD), Repeatability ($RSD^r$) and Reproducibility ($RSD^R$) of analytical method for papaya line 55-1 and PRSV-SC were less than 25%, which was considered acceptable. Limit of detection (LOD) obtained from validation results for papaya line 55-1 and PRSV-SC were 12.5 copies, respectively. In regard to limit of quantification (LOQ), the results demonstrated that the LOQ of analytical method for papaya line 55-1 and PRSV-SC were 125 copies, respectively.

**6. คำนำ**

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีบริเวณเขตร้อน (Kwon *et al*., 2015) มีการปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนและเพื่อการค้า แต่เนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (*Papaya ringspot virus,* PRSV) ทำให้ผลผลิตมะละกอลดลง ส่งผลกระทบต่อเกษตรกร รวมทั้งภาคอุตสาหกรรมของไทย หลายประเทศพัฒนามะละกอดัดแปรพันธุกรรมเพื่อให้ต้านทานต่อไวรัส PRSV เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ซึ่งนิยมปลูกเพื่อการค้าในฮาวาย (Ohmori *et al*., 2013) ประเทศไต้หวันสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ไต้หวัน (PRSV-P YK) และประเทศจีนสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 63-1 สายพันธุ์ X17-2 และสายพันธุ์ Huanong No. 1 (Ohmori *et al*., 2013; Li *et al*., 2012) ถึงแม้ว่าหลายประเทศอนุญาตให้ปลูกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเพื่อการค้า แต่ประเทศไทยยังไม่มีการอนุญาตให้ปลูกพืชดังกล่าว แต่สามารถปลูกเพื่อการศึกษาวิจัยได้โดยจะต้องได้รับการอนุมัติจากกรมวิชาการเกษตรตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542

ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2558 ประเทศไทยได้รับการแจ้งเตือนจากสหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและเกาหลี เรื่องการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่นำเข้าจากประเทศไทยจำนวน 43 ครั้ง และในปี 2559 ประเทศไทยก็ได้รับการแจ้งเตือนจากญี่ปุ่นและเกาหลี 5 ครั้งซึ่งเป็นการแจ้งเตือนการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์แปรรูป นอกจากนี้สหภาพยุโรปได้ประกาศผ่านระบบเตือนภัยด้านอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) เกี่ยวกับมะละกอที่นำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งนอกจากส่งผลกระทบต่อการส่งออกมะละกอของไทยแล้ว สินค้าไทยอื่นๆ ยังถูกเพ่งเล็งและต่างประเทศยังขาดความเชื่อมั่นกับระบบการจัดการในการแก้ปัญหาการแพร่กระจายพืชดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทย (RASFF, 2015; RASFF, 2016) นอกจากนี้ Nakamura *et al.* (2014) จำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์มะละกออบแห้งที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งวางจำหน่ายในท้องตลาดของประเทศญี่ปุ่นด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการจำแนกพบว่า เป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์จากประเทศไทยที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของเวคเตอร์และยีน *cp* ที่ต้านทานต่อไวรัส PRSV ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์สมุทรสาครจึงให้ชื่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ว่า PRSV-SC

ปัจจุบันกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ออกประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ การส่งออกนอกราชอาณาจักรไปยังประเทศในสหภาพยุโรป นอร์เวย์ สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์และสาธารณรัฐประชาชนจีน ต้องดำเนินการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และการส่งออกไปยังญี่ปุ่นต้องดำเนินการตรวจยีนจำเพาะของพืชดัดแปรพันธุกรรม (Event-specific) เพิ่มเติมจากยีนดังกล่าวด้วย (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) สำหรับการนำเข้ามะละกอก็เช่นเดียวกัน ด่านตรวจพืชต้องมีการตรวจคุมเข้มเพื่อป้องกันการลักลอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเข้ามาในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีตรวจสอบเพื่อป้องกันและเฝ้าระวังมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการส่งออกมะละกอของไทยได้

การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกดดัดแปรพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณหรือการตรวจสอบเชิงคุณภาพ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอถือว่าเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญที่สุดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่

เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป (Tan *et al*., 2013) เนื่องจากการเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสม ย่อมส่งผลต่อกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ได้ (Kwon *et al*., 2015) อย่างไรก็ตาม วิธีการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปมีงานวิจัยที่เผยแพร่ค่อนข้างน้อย ถึงแม้ว่ามีการรายงานวิธีสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเผยแพร่ แต่ก็ยังไม่ครอบคลุมทุกผลิตภัณฑ์ของมะละกอแปรรูป (Nakamura *et al*., 2013; Ohmori *et al*., 2013) นอกจากนี้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนนั้น ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายเรื่องใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของ พลาสมิดเป็นวัสดุอ้างอิงเพื่อตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม เช่น Wang *et al*. (2011) สร้างพลาสมิดมาตรฐาน pTLE8 ที่มีส่วนของยีน *LecI*, *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *PAT*, *RRS*, *CryIA(c)*, *SadI*, *RRS, EPSPS* ตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดและฝ้ายดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR Kim *et al.* (2015) พัฒนาพลาสมิดมาตรฐาน pGEM-PAPAYA3 เพื่อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ได้แก่ 55-1, 16-0-1 และ Huanong No.1 โดยพลาสมิดมาตรฐานมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิงของพืชดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบผงที่เรียกว่า Certified Reference Material (CRM) คือ พลาสมิดมาตรฐานสามารถตรวจสอบยีนจำเพาะที่ต้องการได้หลายยีนในพลาสมิดมาตรฐาน 1 ชนิด จึงทำให้งานวิจัยการใช้พลาสมิดมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เพิ่มขึ้น

สำหรับวัสดุอ้างอิงของมะละกอที่มีการจำหน่ายในรูปแบบพลาสมิดมาตรฐานนั้น คือ สายพันธุ์ 55-1 ซึ่งมีราคาที่สูงมาก (ปริมาณ 50 ไมโครลิตรราคา 11,275 บาท) และไม่มียีน Endogenous ที่ใช้เป็นยีนควบคุม จึงตรวจได้เฉพาะยีนเป้าหมายเท่านั้น (http://www.wonilchem.co.kr/GMO.html) นอกจากนี้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบพลาสมิดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการผลิตออกมาทางการค้าหรือมีการผลิตออกมาใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบภายในประเทศ ทั้งๆ ที่สายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกว่ามาจากประเทศไทย ขนิษฐาและคณะ (2558) สร้างพลาสมิดมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมเพื่อรองรับการออกประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ซึ่งได้ดำเนินการสังเคราะห์ชุดยีน GMOs-Hawaii และ GMOs-SC เพื่อตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ โดยภายในพลาสมิดมาตรฐานประกอบด้วยยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, Papain endogenous ซึ่งมีข้อดีคือสามารถตรวจยีนเป้าหมายเพื่อจำแนกสายพันธุ์ได้และสามารถตรวจยีน Endogenous ซึ่งเป็นยีนควบคุมได้ อีกทั้งยังสามารถตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้อีกด้วย (Screening test)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

2. เพื่อหาวิธีการตรวจวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ ๕๕-๑ และ PRSV-SC ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดของ GMOs-Hawaii และ GMOs-SC

**7. วิธีดำเนินการ**

**วัสดุอุปกรณ์**

1. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Gene Amp® PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณตามสภาพจริง qTower 2.0 (analytikjena, Germany)
3. เครื่องวัดปริมาณสารดีเอ็นเอ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
4. เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
5. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation) (Bio-Rad)
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ
7. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิด
8. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR
9. ดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดของ GMOs-Hawaii และ GMOs-SC
10. ตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป
11. ตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองแล้ว (Certified reference material: CRM)
12. ไพร์เมอร์และโพรบ (Sigma-Proligo, Singapore)

**วิธีการ**

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

1.1 รวบรวมข้อมูลวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอและวิธีการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากวิธีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่

1.1.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

1.1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2%CTAB (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)

1.1.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan (ดัดแปลงจาก Rogers and Bendich, 1985)

1.1.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking (ดัดแปลงจาก Alexander *et al*., 2007)

1.1,5 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)

1.1.6 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification (Qiagen, 2009)

1.2 รวมรวบตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 9 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างที่รวบรวมจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้แก่

ใบมะละกอสด ผลมะละกอดิบ ผลมะละกอสุก เมล็ดมะละกอ ใบชามะละกอ มะละกออบแห้ง บ๊วยเค็มมะละกอ แยมมะละกอ และน้ำผลไม้ที่มีมะละกอเป็นส่วนผสม

1.3 สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

นำตัวอย่างมะละกอทั้ง 9 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวบรวมได้ทั้ง 5 วิธี สกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ก่อนการสกัดอีเอ็นเอ นำตัวอย่างทั้ง 9 ชนิดมาผ่านการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเบื้องต้นแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** วิธีการเตรียมตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

| ตัวอย่าง | วิธีการเตรียมเบื้องต้น | อ้างอิง |
|---|---|---|
| ใบมะละกอสด | บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว | Morgante *et al*. (2013) |
| ผลมะละกอดิบ | หั่นและสับเป็นชิ้นเล็กๆ | ดัดแปลงจาก Ovesna and Hodek, (2009) |
| ผลมะละกอสุก | หั่นและสับเป็นชิ้นเล็กๆ | ดัดแปลงจาก Ovesna and Hodek, (2009) |
| เมล็ดมะละกอ | ปั่นบดละเอียดด้วยโถปั่น | ดัดแปลงจาก Guo *et al*. (2012) |
| ใบชามะละกอ | บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว | Morgante *et al*. (2013) |
| แยมมะละกอ | ไม่ผ่านการเตรียมเบื้องต้น | Ohmori *et al*. (2013) |
| มะละกออบแห้ง | หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 รอบ อบที่ 65 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว | Kim *et al*. (2010) |
| บ๊วยเค็มมะละกอ | หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 รอบ อบที่ 65 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว | ดัดแปลงจาก Kim *et al*. (2010) |
| น้ำผลไม้ | ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง | Kwon *et al*. (2015) |

1.4 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 5 วิธีจากตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปโดยใช้เครื่อง UV Spectrophotometer ที่ความความคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรโดยเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification

1.5 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบประสิทธิภาพการเพิ่มยีน Papain endogenous ด้วยวิธี PCR

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำ PCR ทดสอบโดยใช้ยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R โดยมีลำดับนิวคลีไทด์ดังตารางที่ 2 (Bonfini *et al*., 2007) ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบดวยสวนผสมตอ 1 หลอดดังแสดงในตารางที่ 3 นำสวนผสมทั้งหมดผสมตามสัดสวนลงในหลอด PCR เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เปนบวก คือ ดีเอ็นเอของมะละกอ (Positive control) ตัวควบคุมที่เปนลบ คือ ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (Negative control) และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆาเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ (Non template control) หลังจากนั้นนำหลอด PCR เขาเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีรอบการทำ PCR ดังตารางที่ 4 แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล โดยเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification

**ตารางที่ 2** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีไทด์ (5’⟶ 3’) |
|---|---|
| papain 5F | GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA |
| papain 3R | CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC |

**ตารางที่ 3** ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

| ความเข้มข้นของสาร | ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร) |
|---|---|
| 5X Green GoTaq Flexi Reaction Buffer | 5 |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.5 |
| 10 mM dNTP Mix | 0.5 |
| 50 pmol Papain 5 Forward primer | 0.5 |
| 50 pmol Papain 3 Reverse primer | 0.5 |
| 5 U/µl *Taq* DNA Polymerase (Promega) | 0.125 |
| 50 ng/µl DNA template | 5 |
| Distilled water | 11.88 |
| Total | 25 |

**ตารางที่ 4** อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | จำนวนรอบ |
|---|---|---|---|
| 1. Initial denaturation | 94 | 5 | |
| 2. Denaturation | 94 | 0.20 | 40 |

| | | |
|---|---|---|
| Annealing | 55 | 0.40 |
| Extension | 72 | 1 |
| 3. Final extension | 72 | 7 |

1.6 การศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยวิธี PCR

สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยวิธีที่เหมาะสมกับแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาข้างต้นโดยสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นด้วย UV spectrophotometer ที่ความความคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3 และ 4 (ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยกว่า 50 ng/µl สามารถนำไปทำ PCR ได้) (Nakamura *et al*., 2013) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล

**ตารางที่ 5** ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

| ยีนเป้าหมาย | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’→ 3’) | ความยาว (bp) | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| Endogenous gene (Papain) | papain 5F<br>papain 3R | GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA<br>CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC | 211 | Goda *et al*. (2001) |
| Endogenous gene (Chy) | Q-Chy-1 F2<br>Q-Chy-2R | CCA TGC GAT CCT CCC A<br>CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA | 72 | Nakamura *et al*. (2013) |
| Endogenous gene (Papain) | Papain SS11F<br>Papain SS11R | TAC GGG TGC AAT GGA GGT TA<br>GCG ACA ATA ACG TTG CAC TC | 108 | Kim *et al*. (2010) |
| Endogenous gene (Papain) | Papain-A1<br>Papain-A2 | GGC TCA ATA TGG TAT TCA CTA CAG AAA T<br>CAT CGG TTT TGG CTG CAT AA | 363 | Nageswara-Rao *et al*. (2013) |
| Endogenous gene (Papain) | Papain-B1<br>Papain-B2 | AGT GGC TCA ATA TGG TAT TCA CTA CAG A<br>AAA ATG TAG ATA TAC CTC CCT TGA GCG | 91 | Nageswara-Rao *et al*. (2013) |

2. การศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.1 การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดมาตรฐาน

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ GMOs-Hawaii-Top10 และ GMOs-Sc-Top10 ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง 2xYT มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอาหารเก่าทิ้งไป เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียไว้

2.2 การเตรียมพลาสมิดมาตรฐานให้อยู่ในรูปเส้นตรงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Plasmid Kit mini วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากนั้นตัดดีเอ็นเอมาตรฐานทุกชุดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III โดยทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังนี้

- ปฏิกิริยาสำหรับดีเอ็นเอมาตรฐาน GMOs-Hawaii-C1

| | | |
|---|---|---|
| 10x NEB buffer 2 | 6 | ไมโครลิตร |
| Plasmid GMOs-Hawaii-C1 | 35 | ไมโครลิตร |
| $dH_2O$ | 17 | ไมโครลิตร |
| Enzyme HindIII | 2 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 60 | ไมโครลิตร |

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-SC-C1

| | | |
|---|---|---|
| 10x NEB buffer 2 | 10 | ไมโครลิตร |
| Plasmid GMOs-SC-C1 | 70 | ไมโครลิตร |
| $dH_2O$ | 18 | ไมโครลิตร |
| Enzyme HindIII | 2 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 100 | ไมโครลิตร |

เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตรวจสอบการตัดดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดให้เป็นเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสบน 1% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล

2.3 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิดมาตรฐาน

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เป็นเส้นตรงด้วยชุด Hiyield ™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดโดยให้ชื่อว่า Linear pGMOs-Hawaii-C1 และ Linear pGMOs-SC-C1

2.4 การคำนวณจำนวน Copy number

คำนวณจำนวน Copy number ของดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุด (Chaouachi *et al*., 2008) ดังนี้

จำนวน Copy number = (ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน x $6.022 \times 10^{23}$) / (ขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน x $1 \times 10^{9}$ x 650)

2.5 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR

การเพิ่มปริมาณยีน Papain endogenous และยีน Event-specific (55-1 และ PRSV-SC) โดยวิธี Real-time PCR โดยดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งหมดจะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกใช้ดีเอ็นเอจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางกับดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ได้ร้อยละความปนเปื้อนเท่ากับ 0.1% และตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบใช้ดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใชปริมาณดีเอ็นเอแตละตัวอยางใหความเขมขนสุดทายเทากับ 25 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR 1 ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารเคมี 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 10 ng/μl | 2.5 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 20.00 | ไมโครลิตร |

ซึ่งสารเคมีข้างต้นจะถูกเตรียมแล้วหยอดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโพรบด้วยเครื่อง qTower 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมคือ เริ่มด้วยการกระตุ้นปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที และ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาทีแล้วต่อด้วยขั้นตอน Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยมีรอบของการทำปฏิกิริยา 50 รอบ จากนั้นจึงต่อด้วย Cooling step ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิของการทำงานเครื่องและปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Kwon *et al*., 2015; Nakamura *et al*., 2014) การศึกษาครั้งนี้ ค่า Ct มากกว่า 40 กำหนดให้รายงานผลเป็นลบ และค่า Ct ต่ำกว่า 40 กำหนดให้รายงานผลเป็นบวก

2.6 การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบ

คัดเลือกไพร์เมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC จากรายงานที่มีการศึกษาแล้วว่าสามารถใช้ได้และมีความจำเพาะกับตัวอย่างมะละกอสายพันธุ์ดังกล่าว ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้สังเคราะห์โดยบริษัท Sigma ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบแสดงไว้ในตารางที่ 6 เมื่อได้โพรบและไพร์เมอร์มาแล้ว ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร โดยป้องกันไม่ให้โพรบที่ได้รับการติดฉลากสีสัมผัสกับแสง แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการใช้งาน

ทดสอบความใช้ได้ของไพร์เมอร์และโพรบโดยใช้ตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ GMOs-DOA ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอสายพันธุ์ 55-1 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอสายพันธุ์ PRSV-SC ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอไม่ดัดแปรพันธุกรรม และทดสอบกับตัวอย่างพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ โดยใช้ CRM ของข้าวสายพันธุ์ Bt63 ข้าวโพดสายพันธุ์ GA21 TC1507 Mon863 NK603 Mon810 ถั่วเหลืองสายพันธุ์ DP305423 Mon89788 DP356043 Roundup Ready ที่มีระดับการปนเปื้อนที่ 0.1% โดยการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพร์เมอร์และโพรบเป็นการทดสอบเพื่อตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR

**ตารางที่ 6** แสดงข้อมูลไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

| ยีนเป้าหมาย | ชื่อไพร์เมอร์และโพรบ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶ 3') | ความยาว (bp) | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| 55-1 | 55-1 P1 | CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA | 71 | Kwon *et al.* (2015) |
| | 55-1 P2 | TCCGCCTCCATCCAGTCTATT | | |
| | 55-1 Probe | FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA | | |
| Papain | Papain-B1 | AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA | 91 | Nageswara-Rao *et al.* (2013) |
| | Papain-B2 | AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG | | |
| | Papain-P | FAM-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-TAMRA | | |
| PRSV-SC | SC-F | CATTTCATTTGGAGAGAACACG | 70 | Nakamura *et al.* (2014) |
| | SC-R | ACCAGCATCCACAGCTTC | | |
| | SC-P | FAM-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-TAMRA | | |

2.7 การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

ใช้ค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR เป็นแกน Y และค่า Log ฐาน 10 ของความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็นแกน X เพื่อสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน โดยการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอ

ของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นลำดับ แต่ละลำดับต่างกัน 4 เท่าในอัตราส่วน 1, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดยแต่ละลำดับทำ 3 ซ้ำ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งทำการทดลองไปพร้อมกันทุกซ้ำ และทดลองซ้ำทั้งหมด 4 รอบ บันทึกค่า Ct และจำนวน Copy number ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct และจำนวน Copy number ในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วคำนวณค่า [Log จำนวน Copy number] ของทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Del Gaudio *et al*., 2012)

2.8 การวัดความเที่ยง (Precision) และความแม่น (Accuracy) ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific

เจือจางดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Real-time PCR โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และทดลองซ้ำ 4 รอบ แล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวน Copy number ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR โดยค่า Precision แสดงในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หรือ RSD (Relative standard deviation) ในการทดลองนี้ ค่า RSD เป็นค่าที่คำนวณจากจำนวน Copy number ของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific (55-1 หรือ PRSV-SC) ทั้ง 3 ซ้ำในแต่ละรอบการทดลอง สำหรับค่า Accuracy ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ คำนวณได้โดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific (55-1 หรือ PRSV-SC) ที่ได้จากการทดลองกับร้อยละการปนเปื้อนจริง ซึ่งค่า Accuracy จะรายงานผลในรูปของ %Bias ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Broeders *et al*., 2014)

2.9 การวัดความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) และความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility)

เจือจางดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ให้ได้จำนวน Copy number ระดับต่างๆ (0.01-100%) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Real-time PCR โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และทดลองซ้ำ 4 รอบ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR โดยค่า Repeatability อยู่ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวัดซ้ำได้หรือ $RSD^r$ (Repeatability relative standard deviation) และค่า Reproducibility อยู่ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความสามารถในการให้ผลซ้ำได้หรือ $RSD^R$ (Reproducibility relative standard deviation) (Jiang *et al*., 2010)

2.10 การวัดความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification: LOQ)

เจือจางดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ให้ได้จำนวน Copy number ในระดับต่างๆ (0.001-100%) แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real-time PCR ค่า LOD พิจารณาว่าความเข้มข้นน้อยสุดระดับใดที่เครื่อง Real-time PCR ยังคงสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ (ค่า Ct) สำหรับการหาค่า LOQ พิจารณาจากผลการทดลองว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในระดับใดที่เครื่อง Real-time PCR ยังคงสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ครบทุกซ้ำ (Baeumler *et al*., 2006; Broeders *et al*., 2014)

**เวลาและสถานที่**

ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2560

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

**8. ผลการทดลองและวิจารณ์**

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

1.1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดไดดวยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 5 วิธีของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปพบว่า การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากสุดกับตัวอย่างใบมะละกอสด มะละกออบแห้งและน้ำผลไม้ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 3,313.57 ng/µL และ 2,624.38 ng/µL ตามลำดับสำหรับตัวอย่างใบมะละกอสด 14.20 ng/µL และ 8.83 ng/µL ตามลำดับสำหรับตัวอย่างมะละกออบแห้ง 217.28 ng/µL และ 147.33 ng/µL ตามลำดับสำหรับตัวอย่างน้ำผลไม้ (ตารางที่ 7 และ 8)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform พบว่า ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากสุดกับตัวอย่างผลมะละกอสุก เมล็ดมะละกอและบ๊วยเค็มมะละกอ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 93.23 ng/µL และ 85.42 ng/µL ตามลำดับสำหรับตัวอย่างผลมะละกอสุก 278.78 ng/µL และ 95.63 ng/µL ตามลำดับสำหรับตัวอย่างเมล็ดมะละกอ 51.97 ng/µL และ 37.80 ng/µL ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างบ๊วยเค็มมะละกอ วิธีนี้ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอมากสุดกับตัวอย่างผลมะละกอสุก เมล็ดมะละกอและบ๊วยเค็มมะละกอ เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีการเติม Chloroform: Isoamyl alcohol ถึง 2 ครั้ง ซึ่ง Chloroform: Isoamyl alcohol มีคุณสมบัติเป็นสาร Detergent ทำหน้าที่ในการจับและทำลายพันธะของโปรตีนหรือสารอื่นที่ติดอยู่กับผนังเซลล์พืช เช่นเข้าไปจับกับสารแทนนินในเมล็ดมะละกอหรือเข้าไปจับกับส่วนผสมที่ยังเหลืออยู่ในบ๊วยเค็มมะละกอไว้ จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากขึ้น (Sambrook, 1989) (ตารางที่ 7 และ 8)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking พบว่า ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากสุดกับตัวอย่างผลมะละกอดิบ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 150.87 ng/µL และ 117.40 ng/µL ตามลำดับ วิธีนี้ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากสุดกับตัวอย่างผลมะละกอดิบซึ่งอาจเป็นเพราะใช้บัฟเฟอร์ในการสกัด 2 ชนิดคือ Homogenization buffer และ Lysis buffer ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทำลายผนังเซลล์พืชในผลมะละกอดิบดีกว่าวิธีการสกัดอื่นๆ นอกจากนี้ Homogenization buffer ยังมี Mercaptoethanol เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง Mercaptoethanol มีคุณสมบัติช่วยลดการแตกหักของดีเอ็นเอและยังมีคุณสมบัติเป็น Antioxidant หรือ Chelating agents ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพเซลล์ไว้ (รัชนี, 2549) (ตารางที่ 7 และ 8)

ตัวอย่างใบชามะละกอพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากสุด 3,868.60 ng/µL แต่หลังการทำบริสุทธิ์พบว่า การสกัดด้วยวิธี 2%CTAB ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากสุด (2,725.08 ng/µL) (ตารางที่ 7 และ 8)

ตัวอย่างแยมมะละกอพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Cell breaking ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากสุด 92.48 ng/µL แต่หลังการทำบริสุทธิ์พบว่า การสกัดด้วยวิธี GeneScan ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากสุด (19.43 ng/µL) (ตารางที่ 7 และ 8)

เมื่อวิเคราะห์คุณภาพหรือค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 5 วิธีของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปโดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 พบว่า ดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ใกล้เคียง 1.8-2.0 ซึ่งเป็นค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ให้การยอมรับ (สุรินทร์, 2545) โดยสามารถบ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป มีความบริสุทธิ์สามารถแยกสารปนเปื้อนอื่นๆ ออกจากสารละลายดีเอ็นเอได้ดี สำหรับค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอื่นๆ ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 มีค่าต่ำกว่า 1.8 และสูงกว่า 2.0 บ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่ได้อาจมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มโปรตีนและฟีนอลบางส่วน (ตารางที่ 7 และ 8)

**ตารางที่ 7** ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากวิธีการสกัด 5 วิธีโดยไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

| ตัวอย่าง | วิธีการสกัด | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป | | 2%CTAB | | GeneScan | | Cell breaking | | Guanidinium-Chloroform | |
| | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 |
| ใบมะละกอสด | 277.32 | 2.13 | 2,624.30 | 1.87 | 3,313.57 | 1.80 | 3,058.02 | 1.92 | 2,597.08 | 2.02 |
| ผลมะละกอดิบ | 27.48 | 1.59 | 67.32 | 2.15 | 110.95 | 2.17 | 150.87 | 2.18 | 78.92 | 2.08 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ผลมะละกอสุก | 8.32 | 2.14 | 21.35 | 2.23 | 25.28 | 2.59 | 34.22 | 2.29 | 93.23 | 2.33 |
| เมล็ดมะละกอ | 24.88 | 1.73 | 159.77 | 1.75 | 197.18 | 1.44 | 256.46 | 1.49 | 278.78 | 1.44 |
| ใบชามะละกอ | 114.22 | 1.87 | 3,437.57 | 1.14 | 3,513.88 | 1.20 | 3,124.03 | 1.68 | 3,868.60 | 1.05 |
| แยมมะละกอ | 7.43 | 1.56 | 21.02 | 0.99 | 57.08 | 1.26 | 92.48 | 1.32 | 76.87 | 1.60 |
| มะละกออบแห้ง | 5.47 | 1.48 | 5.94 | 1.20 | 14.20 | 1.50 | 9.75 | 1.51 | 8.9 | 1.46 |
| บ๊วยเค็มมะละกอ | 4.58 | 1.53 | 2.27 | 1.09 | 9.33 | 1.17 | 8.27 | 1.47 | 51.97 | 1.44 |
| น้ำผลไม้ | 10.20 | 1.88 | 98.33 | 2.15 | 217.28 | 2.02 | 148.93 | 2.06 | 44.73 | 1.51 |

**ตารางที่ 8** ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากวิธีการสกัด 5 วิธีโดยผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

| ตัวอย่าง | วิธีการสกัด | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป | | 2%CTAB | | GeneScan | | Cell breaking | | Guanidinium-Chloroform | |
| | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/µL) | A260/A280 |
| ใบมะละกอสด | 145.35 | 2.11 | 962.33 | 2.02 | 2,624.38 | 2.08 | 1,833.90 | 2.05 | 1,325.02 | 2.08 |
| ผลมะละกอดิบ | 19.72 | 1.88 | 61.73 | 2.07 | 88.32 | 2.05 | 117.40 | 1.96 | 66.22 | 1.94 |
| ผลมะละกอสุก | 3.96 | 2.09 | 18.70 | 2.03 | 20.88 | 2.16 | 22.90 | 1.79 | 85.42 | 2.03 |
| เมล็ดมะละกอ | 23.03 | 2.02 | 18.97 | 1.81 | 93.33 | 2.03 | 59.73 | 1.76 | 95.63 | 1.75 |
| ใบชามะละกอ | 98.88 | 1.88 | 2,725.08 | 2.01 | 1,838.87 | 2.02 | 1,797.62 | 2.03 | 1,237.67 | 1.62 |
| แยมมะละกอ | 2.78 | 1.70 | 6.92 | 1.60 | 19.43 | 1.78 | 8.78 | 1.58 | 13.48 | 1.76 |
| มะละกออบแห้ง | 3.5 | 1.81 | 4.60 | 1.62 | 8.83 | 1.83 | 4.95 | 1.88 | 5.55 | 1.61 |
| บ๊วยเค็มมะละกอ | 1.58 | 1.80 | 1.33 | 1.60 | 5.40 | 1.23 | 2.78 | 1.42 | 37.80 | 1.86 |
| น้ำผลไม้ | 3.08 | 1.81 | 30.32 | 2.05 | 147.33 | 1.99 | 47.25 | 1.98 | 33.48 | 1.63 |

1.2 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบประสิทธิภาพการเพิ่มยีน Papain endogenous ด้วยวิธี PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ PCR ทดสอบโดยใช้ยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R แล้วตรวจผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีสพบว่า การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Guanidinium-chloroform, GeneScan, 2%CTAB และ Cell breaking พบว่า เหมาะสำหรับตัวอย่างมะละกอสด แต่ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เนื่องจากไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอภายหลังจากการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส แม้ว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านั้นจะผ่านการทำบริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมีการปนเปื้อนของสารปรุงแต่งต่างๆ หรือดีเอ็นเอที่มีอยู่เกิดการเสียสภาพไประหว่างการแปรรูปทำให้ยากต่อการตรวจสอบ (Kwon *et al*., 2015)

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอกับทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 9) เนื่องจากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit สามารถกำจัดสารปนเปอนจำพวกโปรตีน สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) และสารพวกโพลีแซคคาไรด (Polysaccharide) ที่มีในตัวอย่างออกไปไดดีกว่าวิธีการสกัดอื่นๆและเมื่อนำไปทำ PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่นๆ เมื่อนำมาผ่านการทำบริสุทธิ์ทำให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอยิ่งลดลง ส่งผลให้จำนวนซ้ำที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอลดลงด้วย ดังนั้นหากตองการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส การใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit จึงเป็นทางเลือกที่ดีโดยสามารถนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการทำบริสุทธิ์อีกรอบ

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปพบว่า ตัวอย่างใบมะละกอสด ใบชามะละกอ ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก (ภาพที่ 1) สามารถพบแถบดีเอ็นในทุกวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ นอกจากนี้พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไดแถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณไดมากกว่าดีเอ็นเอที่ไมผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้เป็นเพราะตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยจึงสามารถสกัดดีเอ็นเอได้มาก

ตัวอย่างแยมมะละกอก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียง 2 ซ้ำซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากจากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit หลังจากการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำ โดยพบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit และวิธี Cell breaking (ภาพที่ 1)

ตัวอย่างบ๊วยเค็มมะละกอก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ทั้ง 3 ซ้ำแต่หลังจากการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำจากการสกัดด้วยวิธี GeneScan (ภาพที่ 1)

ตัวอย่างมะละกออบแห้งก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอ 3 ซ้ำจากวิธีการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit และพบแถบดีเอ็นเอ 2 ซ้ำจากการสกัดด้วยวิธี GeneScan แต่หลังจากทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking (ภาพที่ 1)

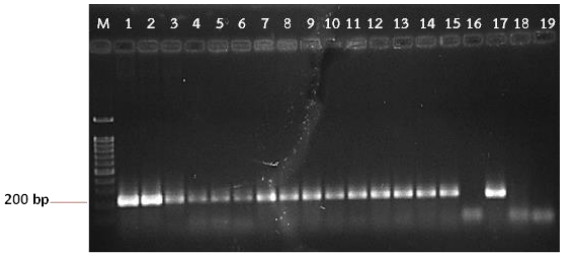
ตัวอย่างน้ำผลไม้ก่อนทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอ 3 ซ้ำจากวิธีการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit แต่หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากทุกวิธีการสกัด (ภาพที่ 1) ตัวอย่างเมล็ดมะละกอ ก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากทุกวิธีการสกัดแต่หลังจากการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food

Kit, 2%CTAB และการสกัดด้วยวิธี GeneScan การที่ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากในเมล็ดมะละกอมีสารแทนนินซึ่งจับอยู่กับดีเอ็นเอที่ต้องการ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีประสิทธิภาพจึงไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ (ภาพที่ 1) (Nageswara-Rao *et al*., 2013)

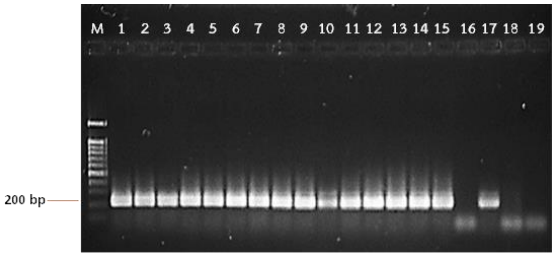
**ตารางที่ 9** การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดไดดวยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีสโดยการตรวจยีน Papain endogenous ระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านและไม่ผ่านการบริสุทธิ์ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

| ตัวอย่าง | วิธีการสกัด | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป | | 2%CTAB | | GeneScan | | Cell breaking | | Guanidinium-chloroform | |
| | ไม่ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ไม่ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ไม่ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ไม่ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ไม่ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ | ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ |
| ใบมะละกอสด | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| ผลมะละกอดิบ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| ผลมะละกอสุก | +++ | +++ | + | ++ | + | ++ | + | ++ | +++ | +++ |
| เมล็ดมะละกอ | - | +++ | - | +++ | - | +++ | - | - | - | - |
| ใบชามะละกอ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| แยมมะละกอ | ++ | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| มะละกออบแห้ง | ++ | - | - | - | ++ | - | - | + | - | - |
| บ๊วยเค็มมะละกอ | +++ | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| น้ำผลไม้ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

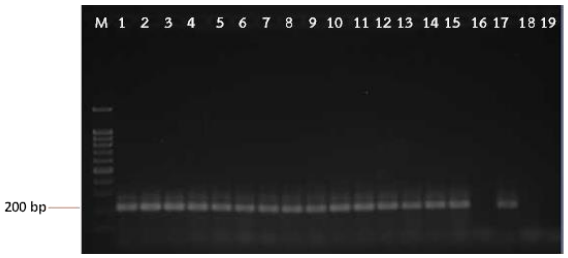
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย
+ หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายจางมาก
++ หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ม
+++ หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเข้มมาก



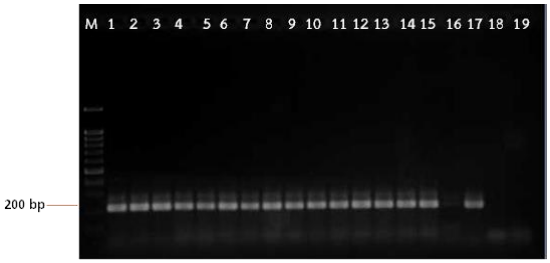

ใบมะละกอสดไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



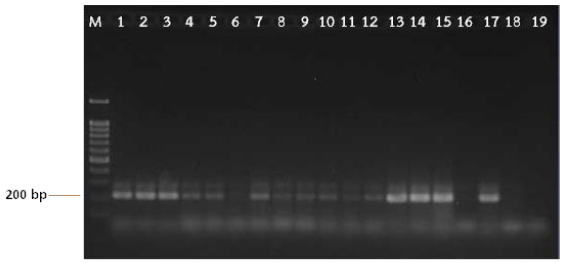

ใบมะละกอสดผ่านการทำบริสุทธิ์



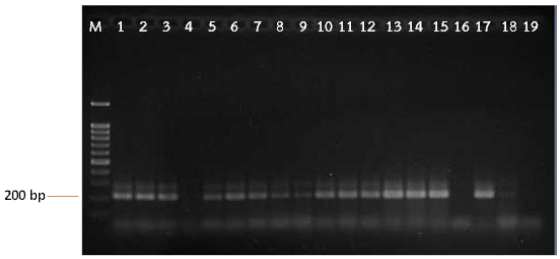

ผลมะละกอดิบไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์




ผลมะละกอดิบผ่านการทำบริสุทธิ์

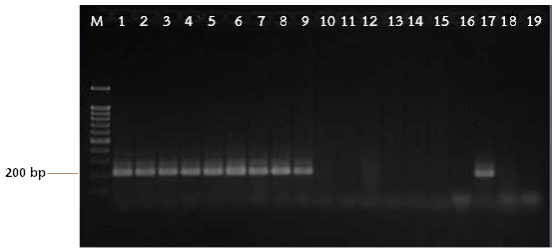



ผลมะละกอสุกไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์

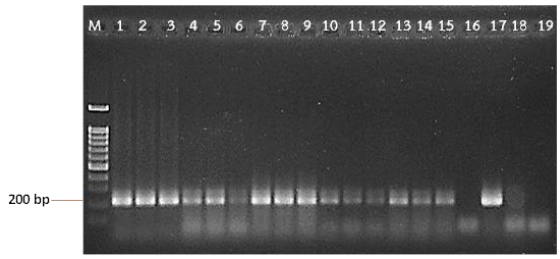



ผลมะละกอสุกผ่านการทำบริสุทธิ์

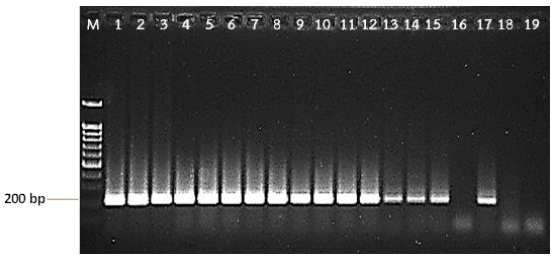
เมล็ดมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



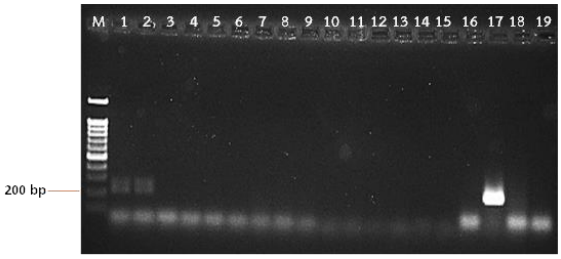

เมล็ดมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์

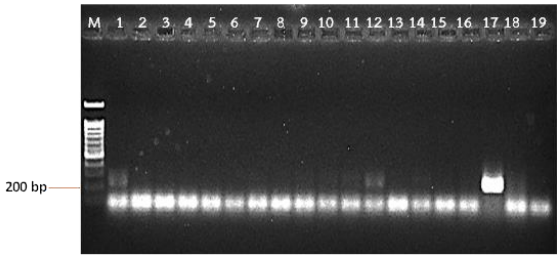



ใบชามะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์

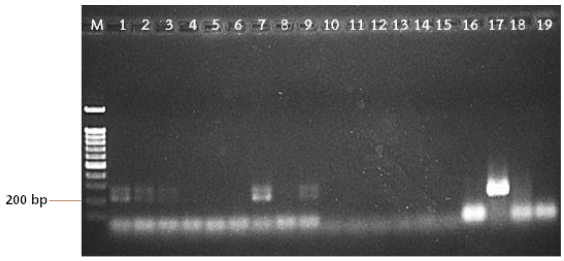



ใบชามะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์

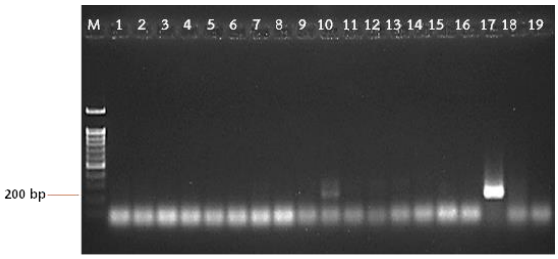


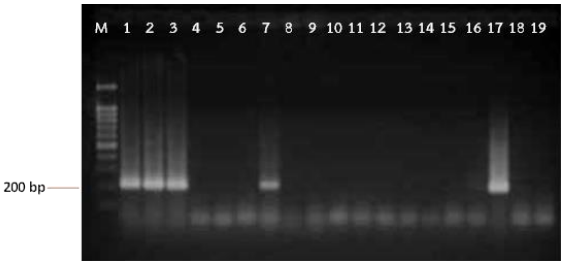
แยมมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



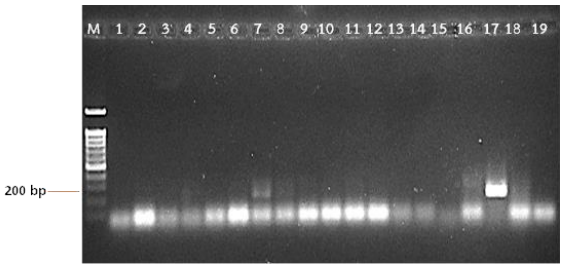

แยมมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์



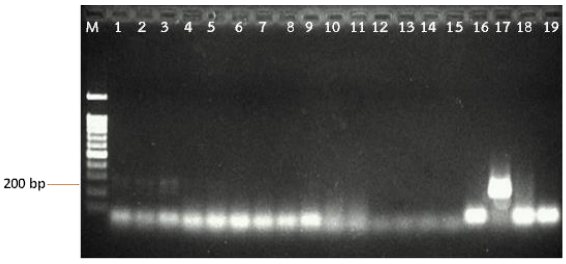

มะละกออบแห้งไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



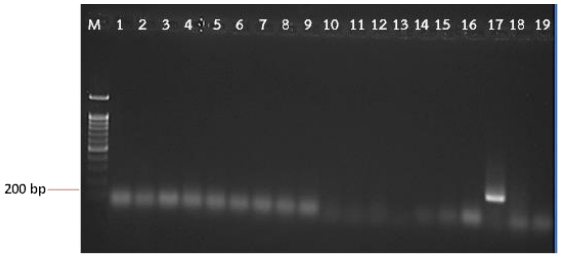

มะละกออบแห้งผ่านการทำบริสุทธิ์




บ๊วยเค็มมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์




บ๊วยเค็มมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์




น้ำผลไม้ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์

น้ำผลไม้ผ่านการทำบริสุทธิ์

**ภาพที่ 1** การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ โดยแถว 1-3 สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy mericon Food Kit); 4-6 สกัดวิธี 2%CTAB; 7-9 สกัดวิธี GeneScan; 10-12 สกัดวิธี Cell breaking; 13-15 สกัดวิธี Guanidinium-chloroform; 16 Blank ของการสกัด; 17 Positive control (มะละกอ); 18 Negative control (ข้าวโพด); 19 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker

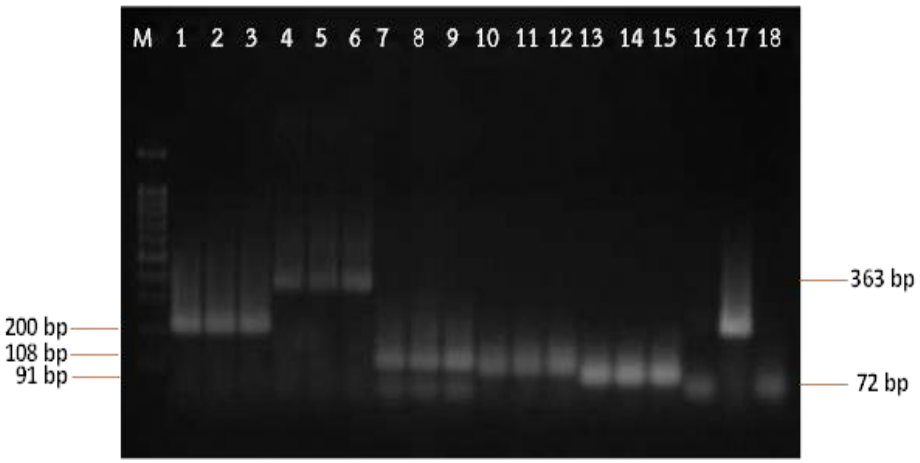
1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยวิธี PCR

การทดสอบคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ใช้คู่ไพร์เมอร์ที่แตกต่างกันจำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 5) เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วย

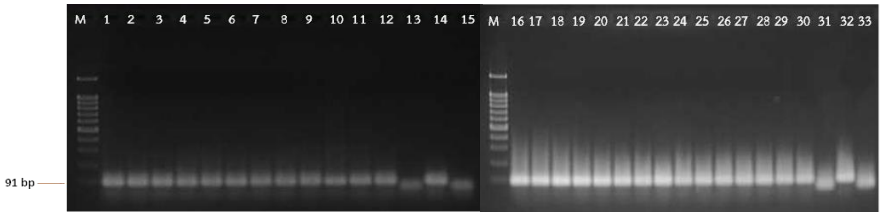
วิธีการสกัดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า (ผลการสกัดดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 10) และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพร์เมอร์ทั้ง 5 คู่ โดยพบว่า ไพร์เมอร์ทั้ง 5 คู่ สามารถใช้สภาวะในการทำ PCR เช่นเดียวกับคู่ไพร์เมอร์ papain 5F และ papain 3R ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ควบคุมและเป็นไพร์เมอร์ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (ภาพที่ 2) จากนั้นทดสอบไพร์เมอร์ที่แตกต่างกันต่อตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ผลการทดลองพบว่า ทุกคู่ไพร์เมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสม่ำเสมอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป (ภาพที่ 3)

**ตารางที่ 10** ผลการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพร์เมอร์สำหรับตรวจยีน Papain endogenous

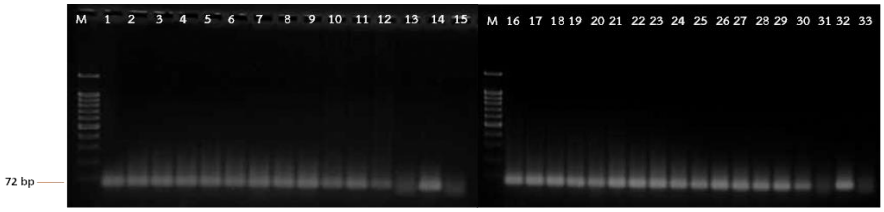
| ตัวอย่าง | ความเข้มข้น (ng/µl) | A260/A280 |
|---|---|---|
| ใบมะละกอสด | 247.55 | 2.09 |
| ผลมะละกอดิบ | 29.61 | 1.71 |
| ผลมะละกอสุก | 9.17 | 2.04 |
| เมล็ดมะละกอ | 25.23 | 2.04 |
| ใบชามะละกอ | 119.55 | 1.8 |
| แยมมะละกอ | 8.5 | 1.65 |
| มะละกออบแห้ง | 6.36 | 1.53 |
| บ๊วยเค็มมะละกอ | 5.52 | 1.64 |
| น้ำผลไม้ | 9.41 | 1.81 |



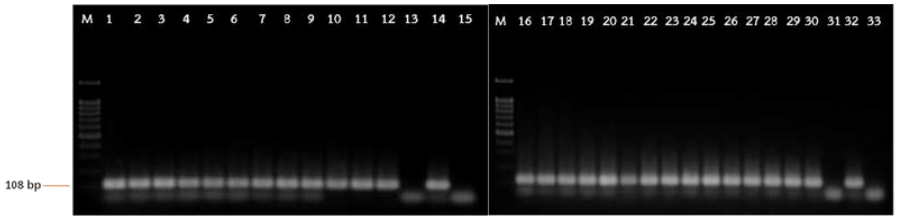

**ภาพที่ 2** การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ที่แตกต่างกันต่อตัวอย่างใบมะละกอสดซึ่งทดสอบโดยการใช้สภาวะในการทำ PCR เช่นเดียวกับไพร์เมอร์ papain 5F และ papain 3R โดยแถว 1-3 ไพร์เมอร์ papain 5F และ papain 3R; 4-6 ไพร์เมอร์ Papain-A1 และ Papain-A2; 7-9 ไพร์เมอร์ Papain SS11F และ Papain SS11R; 10-12 ไพร์เมอร์ Papain-B1 และ Papain-B2; 13-15 ไพร์เมอร์ Q-Chy-1 F2 และ Q-Chy-2R; 16 Negative control (ถั่วเหลือง); 17 Positive control (ไพร์เมอร์ papain 5F และ papain 3R); 18 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker



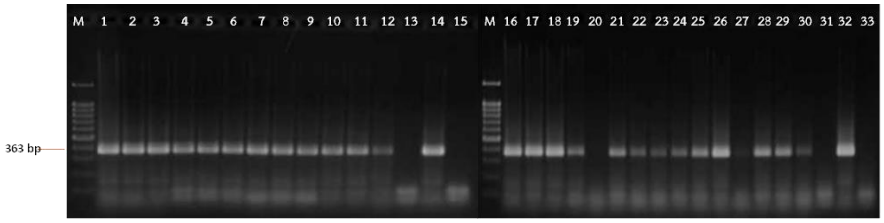

ไพร์เมอร์ Papain-B1 และ Papain-B2



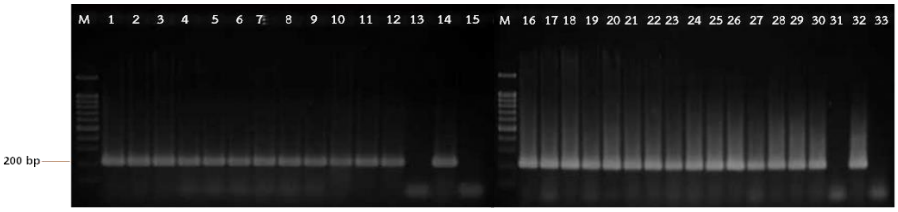
ไพร์เมอร์ Q-Chy-1 F2 และ Q-Chy-2R




ไพร์เมอร์ Papain SS11F และ Papain SS11R




ไพร์เมอร์ Papain-A1 และ Papain-A2



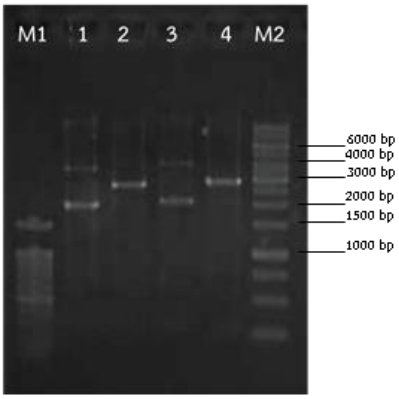

ไพร์เมอร์ papain 5F และ papain 3R

**ภาพที่ 3** การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ที่ต่างกันต่อตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป โดยแถว 1-3 ใบมะละกอสด; 4-6 ผลมะละกอดิบ; 7-9 ผลมะละกอสุก; 10-12 เมล็ดมะละกอ; 16-18 ใบชามะละกอ; 19-21 มะละกออบแห้ง; 22-24 บ๊วยเค็มมะละกอ; 25-27 แยมมะละกอ; 28-30 คือ น้ำผลไม้; 13,31 Negative control (ถั่วเหลือง); 14,32 Positive control; 15,33 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker

2. การศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดเพื่อใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

เมื่อนำพลาสมิดมาตรฐานไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III เป็นเวลาข้ามคืนและตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพลาสมิดทั้งสองชุดอยู่ในรูปแบบขดเป็นวง (Supercoiled) ทำให้มีขนาดเล็ก เคลื่อนที่บนเจลอะกาโรสได้รวดเร็วกว่าพลาสมิดที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรง (Lineared) ซึ่งมีขนาดตรงกับพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุดที่ออกแบบไว้ คือ พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-Hawaii มีขนาด 2,941 คู่เบส และพลาสมิดมาตรฐาน GMOs-SC มีขนาด 2,795 คู่เบส (ภาพที่ 4) ดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่อยู่ในรูปเส้นตรงนี้ ให้ชื่อว่า Linear pGMOs-Hawaii-C1 และ Linear pGMOs-SC-C1 เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์และคำนวณจำนวน Copy number จะได้ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดสอบ Real-time PCR (ตารางที่ 11)




**ภาพที่ 4** แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III และตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจลที่ผสม Ethidium bromide ช่อง M1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA; แถว 1 พลาสมิด GMOs-SC (ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III); แถว 2 พลาสมิด GMOs-SC ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III มีขนาด 2,795 คู่เบส; แถว 3 พลาสมิด GMOs-Hawaii (ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III); แถว 4 พลาสมิด GMOs-Hawaii ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III มีขนาด 2,941 คู่เบส; M2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Gene ruler DNA ladder

**ตารางที่ 11** แสดงจำนวน Copy number ของดีเอ็นเอมาตรฐานหลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์

| ชื่อพลาสมิด | A260/A280 | ความเข้มข้น (ng/ul) | จำนวน Copy number |
|---|---|---|---|
| Linear GMOs-Hawaii-c1 | 1.23 | 13.3 | $4.19\times10^{9}$ copies |
| Linear GMOs-SC-C1 | 1.28 | 22.5 | $7.46\times10^{9}$ copies |

2.2 การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบต่อดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

การทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบต่อดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งการทดสอบใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น 10 สายพันธุ์ (ตารางที่ 12) สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำเป็น Negative control เปรียบเทียบกับตัวอย่าง Positive control ซึ่งเป็นตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC จำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดสอบพบว่า ไพร์เมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะกับตัวอย่าง Positive control ที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น โดยสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ (Ct value) แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่าง Negative control สำหรับการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบต่อยีน Papain endogenous ใช้ Negative control คือ พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ และ Positive control คือตัวอย่างมะละกอสายพันธุ์ 55-1, PRSV-SC, DOA และมะละกอไม่ผ่านการดัดแปรพันธุกรรม (Non GM) จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่า ไพร์เมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะต่อตัวอย่าง Positive control ที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น โดยสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ แต่ไม่ตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์กับตัวอย่าง Negative control

**ตารางที่ 12** แสดงการทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

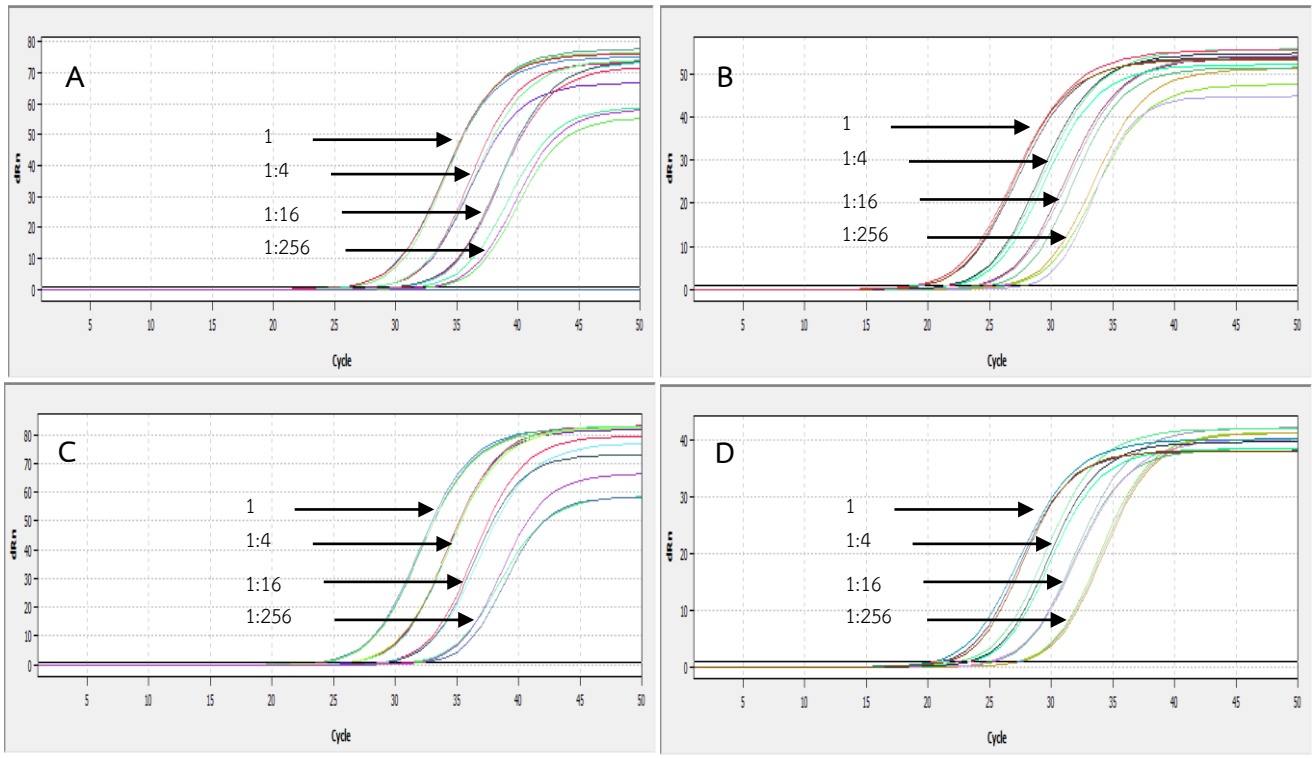
| ตัวอย่างทดสอบ | ยีนที่ตรวจ | | |
|---|---|---|---|
| | 55-1 | PRSV-SC | Papain |
| ข้าว Bt63 | - | - | - |
| ข้าวโพด GA21 | - | - | - |
| ข้าวโพด TC1507 | - | - | - |
| ข้าวโพด Mon863 | - | - | - |
| ข้าวโพด NK603 | - | - | - |
| ข้าวโพด Mon810 | - | - | - |
| ถั่วเหลือง DP305423 | - | - | - |
| ถั่วเหลือง Mon89788 | - | - | - |
| ถั่วเหลือง DP356043 | - | - | - |
| ถั่วเหลือง Roundup Ready | - | - | - |
| มะละกอ DOA | - | - | + |
| มะละกอ 55-1 | + | - | + |
| มะละกอ PRSV-SC | - | + | + |

| | | | |
|---|---|---|---|
| มะละกอ Non GM | - | - | + |

+ คือ Detected; - คือ Not detected

2.3 การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อการทดสอบเชิงปริมาณ

การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific เทียบกับยีน Papain endogenous ที่มีอยู่ในมะละกอ โดยการเปรียบเทียบจะแสดงผลเป็นเป็นร้อยละการปนเปื้อน (%) ดังนั้นการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific จะต้องหาปริมาณยีน Event-specific และยีน Papain endogenous ไปพร้อมกันแล้วคำนวณหาปริมาณยีน Event-specific และยีน Papain endogenous โดยการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งสร้างโดยใช้ค่าเฉลี่ย Ct เป็นแกน X และค่าเฉลี่ย Log ของจำนวน Copy number เป็นแกน Y (ภาพที่ 5) สำหรับค่าเฉลี่ย Ct และ Log ของจำนวน Copy number ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้งยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ที่นำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานแสดงในตารางที่ 13 โดยกราฟแสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในการตรวจวิเคราะห์ยีน Papain endogenous และยีน Event-specific จากการใช้ Copy number จำนวน 56700, 14125, 3544 และ 221 พบว่า สามารถตรวจวัดได้ทุกระดับการเจือจาง โดยค่า Ct จะเพิ่มขึ้นแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณจำนวน Copy number ที่ลดลง (ภาพที่ 6)

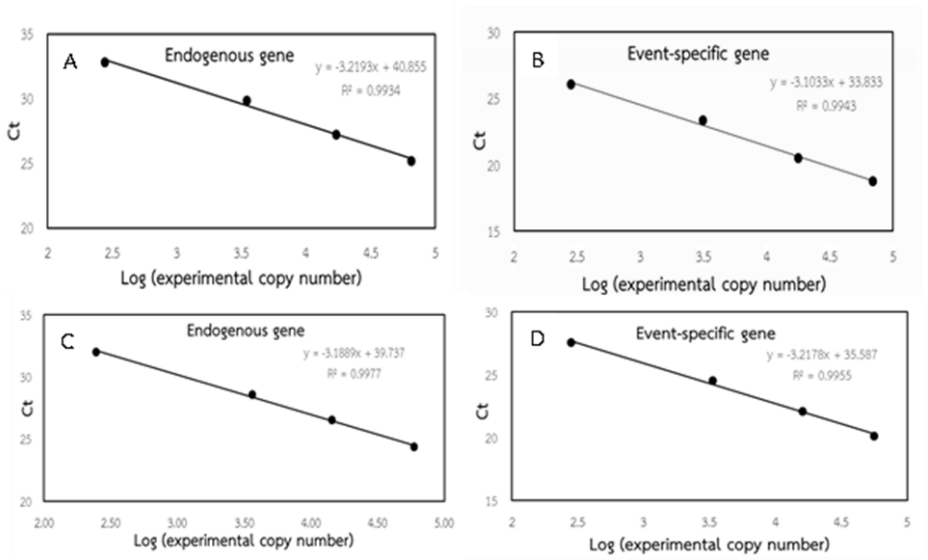


**ภาพที่ 5** แสดง Amplification curve จากเครื่อง Real-time PCR ที่ได้จากการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในอัตราส่วน 1, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดย A และ B เป็น Amplification curve ของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ตามลำดับ C และ D เป็น Amplification curve ของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ตามลำดับ

**ตารางที่ 13** แสดงค่า Ct และ จำนวน Log Copy number ของยีน 55-1 และ PRSV-SC ที่นำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

| ยีน | จำนวน Copy number ที่แท้จริง | Papain Endogenous | | | Event-specific | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ค่า Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | Log จำนวน Copy number | ค่า Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | Log จำนวน Copy number |
| 55-1 | 56700 | 25.16 | 65434 | 4.82 | 18.76 | 69323 | 4.84 |
| | 14125 (1:4) | 27.25 | 17012 | 4.23 | 20.50 | 17738 | 4.24 |
| | 3544 (1:16) | 29.83 | 3464 | 3.53 | 23.34 | 3108 | 3.49 |
| | 221 (1:256) | 32.79 | 275 | 2.44 | 26.07 | 281 | 2.44 |
| PRSV-SC | 56700 | 24.37 | 58897 | 4.77 | 20.12 | 56321 | 4.75 |
| | 14125 (1:4) | 26.56 | 14377 | 4.16 | 22.10 | 16064 | 4.20 |
| | 3544 (1:16) | 28.56 | 3614 | 3.56 | 24.53 | 3329 | 3.52 |
| | 221 (1:256) | 31.99 | 246 | 2.39 | 27.53 | 282 | 2.45 |

จากตารางที่ 13 เมื่อใช้ค่า Ct เป็นแกน X และค่าจำนวน Log Copy number ของยีนที่ได้จากการทดลองเป็นแกน Y สามารถสร้างเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ในมะละกอของ 2 ชนิด ดังนี้




**ภาพที่ 6** ภาพ A และ C แสดงความเข้มข้นมาตรฐานของยีน Papain endogenous สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ ภาพ B และ D แสดงความเข้มข้นมาตรฐานของยีน Event-specific ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ

ข้อมูลตารางที่ 14 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในส่วนของยีน Papain endogenous แสดงให้เห็นว่า กราฟมีค่า Slope เท่ากับ -3.2193 ค่า $R^2$ เท่ากับ 0.9934 ซึ่งทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่า $R^2$ เป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของค่าบนแกน X และแกน Y โดยบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือในการประมาณค่าบนแกน X โดยใช้ค่าบนแกน Y หรือการใช้ค่าบนแกน Y ในการประมาณค่าบนแกน X ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จำนวน Copy number ที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับรอบการตรวจจับแสงฟลูออเรสเซนต์มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับค่า PCR efficiency นั้น มีค่าอยู่ที่ 104.46% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากรายงานของ Del Gaudio et al, (2012) ซึ่งระบุข้อกำหนดการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ ด้วยการทดสอบภายใต้กฎระเบียบของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 17025 พบว่า ค่า $R^2$ ต้องมีค่าของเกณฑ์การยอมรับอยู่ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ค่า Slope มีค่าเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง -3.1 ถึง -3.6 และค่า PCR efficiency อยู่ระหว่าง 90-110% ซึ่งหากค่าที่ได้จากการทดลองมีช่วงค่าอยู่ในเกณฑ์ดังกล่าว การทดลองในรอบนั้นๆ มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำและมีความสัมพันธ์กันระหว่างค่าของจำนวน Copy number และรอบการตรวจจับได้ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ สำหรับยีน Event-specific ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 พบว่า ค่า $R^2$ เท่ากับ 0.9943 ค่า Slope เท่ากับ -3.1033 และค่า PCR efficiency เท่ากับ 110.00% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้น กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้งของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific มีความเป็นเส้นตรง (Linearity) สูง จึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 ในการคำนวณปริมาณของ

ยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ได้อย่างน่าเชื่อถือ

สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ข้อมูลจากตารางที่ 14 พบว่า ในส่วนของยีน Papain endogenous กราฟมีค่า Slope -3.1889 ค่า $R^2$ 0.9977 และค่า PCR efficiency 105.86% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับยีน Event-specific ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC พบว่า ค่า $R^2$ 0.9955 ค่า Slope -3.2170 และค่า PCR efficiency 104.57% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 กราฟในการคำนวณปริมาณของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ได้อย่างน่าเชื่อถือ

**ตารางที่ 14** แสดงค่าความชันของกราฟ ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากการตรวจวิเคราะห์ยีน Event-specific และยีน Papain endogenous ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

| | ยีน Event-specific | | | ยีน Papain endogenous | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R^2$ | Slope | PCR efficiency | $R^2$ | Slope | PCR efficiency |
| ค่าปกติ | ≥0.98 | -3.1ถึง-3.6 | 90% ถึง 110% | ≥0.98 | -3.1ถึง-3.6 | 90% ถึง 110% |
| สายพันธุ์ 55-1 | 0.9943 | -3.1033 | 110.00 | 0.9934 | -3.2193 | 104.46 |
| สายพันธุ์ PRSV-SC | 0.9955 | -3.2170 | 104.57 | 0.9977 | -3.1889 | 105.86 |

2.4 การวัดค่าความเที่ยง (Precision) และความแม่น (Accuracy) ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

**ตารางที่ 15** แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นในการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

| | | | | | ค่าความเที่ยง (Precision) | | ค่าความแม่น (Accuracy) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| มะละกอสายพันธุ์ | ร้อยละการปนเปื้อนที่แท้จริง (%) | จำนวนรอบการทดลอง | ยีนที่ตรวจสอบ | ค่าเฉลี่ยจำนวน Copy number | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%) | ร้อยละการปนเปื้อนที่ได้ (%) | ร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%Bias) | ค่าเฉลี่ยร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%Bias) |
| | | 1 | Papain | 652789 | 60427 | 9.25 | 0.10 | -1.35 | |
| | | | 55-1 | 661603 | 92299 | 13.95 | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | Papain | 571508 | 90092 | 15.76 | 0.11 | -5.75 | |
| 55-1 | 0.1% | | 55-1 | 604408 | 112576 | 18.62 | | | 4.83 |
| | | 3 | Papain | 569398 | 62572 | 10.98 | 0.09 | 3.87 | |
| | | | 55-1 | 547326 | 103669 | 18.94 | | | |
| | | 4 | Papain | 572720 | 50876 | 8.88 | 0.11 | -8.35 | |
| | | | 55-1 | 620547 | 27298 | 4.39 | | | |
| | | 1 | Papain | 920222 | 104614 | 11.36 | 0.12 | -15.05 | |
| | | | PRSV-SC | 1058806 | 70640 | 6.67 | | | |
| | | 2 | Papain | 1091673 | 73058 | 6.69 | 0.09 | 9.01 | |
| PRSV-SC | 0.1% | | PRSV-SC | 993276 | 147091 | 14.80 | | | 7.74 |
| | | 3 | Papain | 98755 | 110890 | 11.22 | 0.09 | 2.55 | |
| | | | PRSV-SC | 962347 | 65646 | 6.82 | | | |
| | | 4 | Papain | 968839 | 128484 | 13.26 | 0.10 | -4.36 | |
| | | | PRSV-SC | 1011122 | 78092 | 7.72 | | | |

การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific เทียบกับยีน Papain endogenous โดยการเปรียบเทียบจะใช้ปริมาณการปนเปื้อนที่ 0.1% ตารางที่ 15 พบว่า ค่าความเที่ยงซึ่งรายงานโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของการหาปริมาณยีนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในการทดลองทั้ง 4 รอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 4.39 - 18.93 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC มีค่าอยู่ระหว่าง 6.67-14.80 โดยค่าความเที่ยงของทั้งสองสายพันธุ์มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งการวัดค่า RSD (%) จะอยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ไม่เกิน 25% (Del Gaudio *et al*., 2012) แสดงว่า อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจที่มีความเที่ยง ในส่วนของความแม่นของวิธีการตรวจสอบ ศึกษาโดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ได้จากการทดลองกับร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ใช้ในการศึกษา คือ 0.1% โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าการปนเปื้อนจริง จากนั้นคำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ได้จากการทดลอง โดยความแม่นของการตรวจวิเคราะห์จะรายงานในรูปร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%Bias) ตารางที่ 15 พบว่า ค่า %Bias ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.35 - 8.35% และค่า %Bias ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC มีค่าอยู่ระหว่าง 2.55 - 15.05% โดยมีค่าเฉลี่ยของ %Bias คือ 4.83% และ 7.74% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ของทั้งสองยีนอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน±25%) ดังนั้น อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงกับค่าจริง

อย่างไรก็ตาม ค่าความแม่นของการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific มักจะรายงานผลที่ได้จากการใช้ CRM ในการศึกษา โดยการใช้ดีเอ็นเอจากพลาสมิดมาตรฐานมักจะไม่นิยมรายงานค่าดังกล่าว เนื่องจากการใช้ CRM ให้ค่าการปนเปื้อนที่แท้จริงได้อย่างถูกต้อง (True value) ซึ่งค่าดังกล่าวนำไปใช้ในการ

คำนวณ %Bias โดย %Bias คำนวณได้จาก |True value – Experimental value|x100/True value (Yang *et al*., 2006) ซึ่งการทราบค่า True value ที่แท้จริงจะทำให้ผลการทดลองวิธีการตรวจสอบความใช้ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

2.5 การวัดความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) และความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility) ของการหาปริมาณการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

ค่า Repeatability คือค่าความสามารถในการวัดซ้ำได้ซึ่งรายงานอยู่ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวัดซ้ำได้หรือ $RSD^r$ (Repeatability relative standard deviation) เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละครั้งมีความแปรปรวนมากน้อยเพียงใดเมื่อทำการตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ ควรมีค่าความสามารถในการวัดซ้ำอยู่ในเกณฑ์ดี ซึ่งค่า $RSD^r$ ที่ยอมรับได้ควรมีค่าไม่เกิน 25% (Broeders *et al*., 2014) สำหรับค่า Reproducibility เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ระดับความใกล้ของค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด ในเวลาที่แตกต่างกันหรือค่าความสามารถในการให้ผลซ้ำ โดยการวัดครั้งหนึ่ง ๆ มีเปลี่ยนแปลงเงื่อนไข เช่น สภาวะแวดล้อม (Hubner *et al*., 2001) ซึ่งรายงานอยู่ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความสามารถในการให้ผลซ้ำได้หรือ $RSD^R$ (Reproducibility relative standard deviation) ซึ่งค่า $RSD^R$ ที่ยอมรับได้ควรมีค่าไม่เกิน 25%

ค่า Repeatability และ Reproducibility ของการหาปริมาณการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 (ตารางที่ 16 และ 17) และ PRSV-SC (ตารางที่ 18 และ 19) พบว่า ค่า $RSD^r$ และ $RSD^R$ ของการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous สำหรับมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในทุกระดับความเข้มข้น มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน 25%) สำหรับการวัดค่า $RSD^r$ และ $RSD^R$ ของการเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ใช้วิธีการเดียวกับการวัดค่า Repeatability และ Reproducibility ของยีน Papain endogenous แต่จะใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน Event-specific เท่านั้น การเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ด้วยวิธี Real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมๆกับการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous โดยค่า $RSD^r$ และ $RSD^R$ ของการเพิ่มจำนวนยีน 55-1 และ PRSV-SC ในทุกระดับความเข้มข้นมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน 25%) ดังนั้น การทดสอบความใช้ได้สำหรับวิธีตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC สามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

**ตารางที่ 16** แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน Papain endogenous ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนรอบการทดลอง | ค่าเฉลี่ย Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | $SD^r$ | $RSD^r$ (%) | $SD^R$ | $RSD^R$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50000 | 1 | 24.09 | 70718 | 0.51 | 2.14 | 1.24 | 4.96 |
| | 2 | 25.64 | 48536 | 0.13 | 0.51 | | |
| | 3 | 24.04 | 73205 | 0.48 | 2.03 | | |
| | 4 | 26.62 | 57191 | 0.94 | 3.53 | | |
| 5000 | 1 | 27.89 | 5293 | 1.26 | 4.53 | 1.54 | 5.15 |
| | 2 | 31.02 | 5240 | 0.98 | 3.18 | | |
| | 3 | 29.68 | 5023 | 0.29 | 1.00 | | |
| | 4 | 31.15 | 4965 | 0.27 | 0.86 | | |
| 500 | 1 | 33.21 | 458 | 0.20 | 0.62 | 1.08 | 3.19 |
| | 2 | 34.96 | 487 | 0.02 | 0.05 | | |
| | 3 | 33.01 | 470 | 0.26 | 0.79 | | |
| | 4 | 34.07 | 539 | 1.65 | 4.85 | | |
| 50 | 1 | 36.53 | 53 | 0.74 | 2.04 | 0.59 | 1.64 |
| | 2 | 36.61 | 55 | 0.56 | 1.55 | | |
| | 3 | 36.21 | 60 | 0.82 | 2.28 | | |
| | 4 | 36.49 | 51 | 0.51 | 1.40 | | |
| 5 | 1 | 36.75 | 6 | 0.46 | 1.25 | 0.59 | 1.60 |
| | 2 | 37.49 | 5 | 0.51 | 1.38 | | |
| | 3 | nd | nd | nd | nd | | |
| | 4 | nd | nd | nd | nd | | |

$RSD^r$ คือ Repeatability relative standard deviation

$RSD^R$ คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

**ตารางที่ 17** แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน 55-1 ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนรอบการทดลอง | ค่าเฉลี่ย Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | $SD^r$ | $RSD^r$ (%) | $SD^R$ | $RSD^R$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50000 | 1 | 18.34 | 54539 | 0.42 | 2.31 | 1.57 | 7.66 |
| | 2 | 21.71 | 62009 | 0.64 | 2.98 | | |
| | 3 | 20.45 | 74601 | 1.08 | 5.28 | | |
| | 4 | 21.47 | 58436 | 1.10 | 5.13 | | |
| 5000 | 1 | 22.92 | 4397 | 0.49 | 2.15 | 2.05 | 8.02 |
| | 2 | 26.41 | 6835 | 0.84 | 3.19 | | |
| | 3 | 25.61 | 4602 | 2.18 | 8.53 | | |
| | 4 | 27.50 | 4634 | 0.54 | 1.96 | | |
| 500 | 1 | 26.25 | 537 | 1.16 | 4.43 | 2.01 | 7.02 |
| | 2 | 31.43 | 418 | 0.34 | 1.09 | | |
| | 3 | 28.65 | 600 | 0.77 | 2.69 | | |
| | 4 | 28.49 | 443 | 0.25 | 0.90 | | |
| 50 | 1 | 31.74 | 42 | 0.41 | 1.29 | 1.64 | 4.85 |
| | 2 | 34.79 | 54 | 1.05 | 3.02 | | |
| | 3 | 33.54 | 50 | 1.24 | 3.70 | | |
| | 4 | 35.45 | 59 | 0.33 | 0.93 | | |
| 5 | 1 | 34.77 | 6 | 0.29 | 0.83 | 1.89 | 5.19 |
| | 2 | 38.16 | 4 | 0.54 | 1.43 | | |
| | 3 | nd | nd | nd | nd | | |
| | 4 | nd | nd | nd | nd | | |

$RSD^r$ คือ Repeatability relative standard deviation

$RSD^R$ คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

**ตารางที่ 18** แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน Papain endogenous ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนรอบการทดลอง | ค่าเฉลี่ย Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | $SD^r$ | $RSD^r$ (%) | $SD^R$ | $RSD^R$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50000 | 1 | 24.12 | 64661 | 0.07 | 0.29 | 2.25 | 8.26 |
| | 2 | 29.54 | 53142 | 1.07 | 3.64 | | |
| | 3 | 28.05 | 53249 | 1.71 | 6.11 | | |
| | 4 | 27.49 | 56606 | 0.54 | 1.99 | | |
| 5000 | 1 | 28.12 | 4871 | 0.41 | 1.45 | 1.71 | 5.60 |
| | 2 | 31.12 | 4911 | 0.07 | 0.24 | | |
| | 3 | 31.44 | 4837 | 1.80 | 5.74 | | |
| | 4 | 31.74 | 5363 | 0.38 | 1.21 | | |
| 500 | 1 | 31.63 | 501 | 0.17 | 0.53 | 1.28 | 3.86 |
| | 2 | 33.43 | 530 | 0.37 | 1.13 | | |
| | 3 | 33.90 | 486 | 0.12 | 0.36 | | |
| | 4 | 33.64 | 474 | 2.01 | 5.99 | | |
| 50 | 1 | 34.55 | 50 | 0.72 | 2.09 | 1.32 | 3.69 |
| | 2 | 35.32 | 58 | 0.24 | 0.68 | | |
| | 3 | 36.20 | 55 | 0.96 | 2.67 | | |
| | 4 | 37.52 | 61 | 0.90 | 2.42 | | |
| 5 | 1 | 36.90 | 5 | 0.91 | 2.46 | 1.12 | 2.97 |
| | 2 | 37.97 | 5 | 0.58 | 1.54 | | |
| | 3 | 38.54 | 5 | 1.34 | 3.49 | | |
| | 4 | nd | nd | nd | nd | | |

$RSD^r$ คือ Repeatability relative standard deviation

$RSD^R$ คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

**ตารางที่ 19** แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน PRSV-SC ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนรอบการทดลอง | ค่าเฉลี่ย Ct | จำนวน Copy number จากการทดลอง | $SD^r$ | $RSD^r$ (%) | $SD^R$ | $RSD^R$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50000 | 1 | 20.08 | 57952 | 0.38 | 1.93 | 0.85 | 4.02 |
| | 2 | 21.89 | 63725 | 0.13 | 0.62 | | |
| | 3 | 21.19 | 60464 | 0.33 | 1.57 | | |
| | 4 | 21.56 | 51961 | 0.97 | 4.50 | | |
| 5000 | 1 | 23.44 | 4440 | 0.96 | 4.09 | 1.67 | 6.59 |
| | 2 | 26.05 | 4537 | 0.46 | 1.79 | | |
| | 3 | 25.01 | 4703 | 1.84 | 7.39 | | |
| | 4 | 27.05 | 5022 | 0.40 | 1.50 | | |
| 500 | 1 | 27.50 | 428 | 0.20 | 0.74 | 1.75 | 5.94 |
| | 2 | 29.32 | 581 | 0.45 | 1.55 | | |
| | 3 | 29.27 | 547 | 0.82 | 2.81 | | |
| | 4 | 31.85 | 546 | 1.25 | 3.94 | | |
| 50 | 1 | 30.22 | 59 | 0.21 | 0.71 | 1.43 | 4.57 |
| | 2 | 32.39 | 47 | 0.18 | 0.55 | | |
| | 3 | 30.33 | 52 | 1.49 | 4.91 | | |
| | 4 | 32.86 | 50 | 0.80 | 2.45 | | |
| 5 | 1 | 34.16 | 5 | 0.28 | 0.81 | 1.19 | 3.46 |
| | 2 | 35.04 | 4 | 1.71 | 4.88 | | |
| | 3 | nd | nd | nd | nd | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 4 | nd | nd | nd | nd |

$RSD^r$ คือ Repeatability relative standard deviation

$RSD^R$ คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

2.6 การวัดความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification: LOQ)

การเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ด้วยวิธี Real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous เพื่อที่จะคำนวณความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ ซึ่ง LOQ จะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้โดยที่เครื่องยังคงตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ ครบทุกรอบการทดลอง การคำนวณความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน 55-1 (ตารางที่ 20) และยีน PRSV-SC (ตารางที่ 21) พบว่า สามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำที่ 50 Copies (125 Copies ต่อปฏิกิริยา) อย่างไรก็ตาม ค่า LOQ ที่ได้จากการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 25 ng ซึ่งอาจส่งผลให้ค่า LOQ ที่ได้มีความแตกต่างจากค่า LOQ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ศึกษากับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 เช่น Baeumler et al. (2006) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng, Hubner et al. (2001) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 200 ng, Nakamura et al. (2013) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 25 ng ส่วนค่า LOQ ของการศึกษาในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการรายการผลการศึกษา

สำหรับค่า LOD ของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 (ตารางที่ 20) และ PRSV-SC (ตารางที่ 21) พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างที่มียีน Event-specific จำนวน 50,000, 5,000, 500 และ 50 Copies ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มีจำนวน 5 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณ

ฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ และตัวอย่างที่มีจำนวน 0.5 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ ดังนั้น ความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน 55-1 และ PRSV-SC ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ คือ 5 Copies (12.5 Copies ต่อปฏิกิริยา) อย่างไรก็ตาม ค่า LOD ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ที่ได้จากการทดลองอื่นพบว่า มีค่า 25 Copies (Nakamura *et al*., 2013) ส่วนค่า LOD ของการศึกษาในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการรายการผลการศึกษา

**ตารางที่ 20** แสดงค่า LOD and LOQ ของการตรวจปริมาณยีน 55-1 ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนซ้ำการทดลอง | ค่า Ct | | | รอบที่ตรวจจับสัญญาณได้ (Positive signals) | ค่าเฉลี่ย Ct | SD | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 50000 | 1 | 17.92 | 18.35 | 18.77 | 12/12 | 20.49 | 1.57 | 7.66 |
| | 2 | 21.83 | 21.02 | 22.3 | | | | |
| | 3 | 19.39 | 21.55 | 20.43 | | | | |
| | 4 | 20.2 | 22.15 | 22.07 | | | | |
| 5000 | 1 | 23.49 | 22.63 | 22.64 | 12/12 | 25.61 | 2.05 | 8.02 |
| | 2 | 25.44 | 26.82 | 26.97 | | | | |
| | 3 | 23.19 | 26.2 | 27.44 | | | | |
| | 4 | 28.1 | 27.38 | 27.04 | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 500 | 1 | 26.23 | 27.43 | 25.1 | 12/12 | 28.70 | 2.01 | 7.02 |
| | 2 | 31.81 | 31.35 | 31.14 | | | | |
| | 3 | 28.11 | 28.32 | 29.54 | | | | |
| | 4 | 28.59 | 28.2 | 28.69 | | | | |
| 50 | 1 | 31.8 | 32.13 | 31.31 | 12/12 | 33.88 | 1.64 | 4.85 |
| | 2 | 35.66 | 35.09 | 33.62 | | | | |
| | 3 | 32.52 | 33.19 | 34.93 | | | | |
| | 4 | 35.41 | 35.14 | 35.8 | | | | |
| 5 | 1 | 34.62 | 35.11 | 34.59 | 6/12 | 36.46 | 1.89 | 5.19 |
| | 2 | 37.75 | 37.95 | 38.78 | | | | |
| | 3 | nd | nd | nd | | | | |
| | 4 | nd | nd | nd | | | | |
| 0.5 | 1 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| | 2 | nd | nd | nd | | | | |
| | 3 | nd | nd | nd | | | | |
| | 4 | nd | nd | nd | | | | |

nd คือ Not detected

**ตารางที่ 21** แสดงค่า LOD and LOQ ของการตรวจปริมาณยีน PRSV-SC ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC

| จำนวน Copy number ที่แท้จริง | จำนวนซ้ำการทดลอง | ค่า Ct | | | รอบที่ตรวจจับสัญญาณได้ (Positive signals) | ค่าเฉลี่ย Ct | SD | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 50000 | 1 | 20.35 | 19.64 | 20.27 | 12/12 | 21.18 | 0.85 | 4.02 |
| | 2 | 21.99 | 21.74 | 21.96 | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 21.39 | 20.81 | 21.39 | | | | |
| | 4 | 21.05 | 22.68 | 20.95 | | | | |
| 5000 | 1 | 24.42 | 23.41 | 22.5 | 12/12 | 25.38 | 1.67 | 6.59 |
| | 2 | 25.52 | 26.24 | 26.4 | | | | |
| | 3 | 26.47 | 22.93 | 25.63 | | | | |
| | 4 | 27.1 | 26.62 | 27.43 | | | | |
| 500 | 1 | 27.58 | 27.66 | 27.27 | 12/12 | 29.48 | 1.75 | 5.94 |
| | 2 | 29.71 | 29.44 | 28.82 | | | | |
| | 3 | 29.27 | 28.45 | 30.1 | | | | |
| | 4 | 30.4 | 32.57 | 32.58 | | | | |
| 50 | 1 | 30.03 | 30.19 | 30.46 | 12/12 | 31.45 | 1.43 | 4.57 |
| | 2 | 32.21 | 32.57 | 32.41 | | | | |
| | 3 | 28.93 | 30.18 | 31.9 | | | | |
| | 4 | 32.12 | 33.72 | 32.74 | | | | |
| 5 | 1 | 34.01 | 34 | 34.49 | 6/12 | 34.60 | 1.19 | 3.46 |
| | 2 | 35.76 | 33.09 | 36.28 | | | | |
| | 3 | nd | nd | nd | | | | |
| | 4 | nd | nd | nd | | | | |
| 0.5 | 1 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| | 2 | nd | nd | nd | | | | |
| | 3 | nd | nd | nd | | | | |
| | 4 | nd | nd | nd | | | | |

nd คือ Not detected

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

1. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป พบว่า ตัวอย่างและวิธีการสกัดที่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification คือ ใบมะละกอสด เมล็ดมะละกอสกัดด้วยวิธี GeneScan ใบชามะละกอสกัดด้วยวิธี 2%CTAB ผลมะละกอดิบสกัดด้วยวิธี Cell breaking ผลมะละกอสุกสกัดด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform สำหรับวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับตัวอย่างน้ำผลไม้ มะละกออบแห้ง บ๊วยเค็มมะละกอและแยมมะละกอคือ ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอสำหรับการทดสอบคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบยีน Papain endogenous พบว่า ทุกคู่ไพร์เมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสม่ำเสมอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

2. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับ

มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC พบว่า ค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ตรวจวัดจากการทดลอง (ตารางที่ 22) อยู่ในช่วงค่าปกติของเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นสามารถใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เพื่อเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เชิงปริมาณได้

**ตารางที่ 22** สรุปค่าพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

| พารามิเตอร์ | ค่าที่วัดได้ในห้องปฏิบัติการ | | | | ค่าปกติ |
|---|---|---|---|---|---|
| | 55-1 | | PRSV-SC | | |
| | ยีน endogenous | ยีน event-specific | ยีน endogenous | ยีน event-specific | |
| **Linearity:** | | | | | |
| $R^2$ | 0.9934 | 0.9943 | 0.9977 | 0.9955 | ≥0.98 |
| Slope | -3.2193 | -3.1033 | -3.1889 | -3.2170 | -3.1 ถึง -3.6 |
| PCR efficiency | 104.46 | 110.00 | 105.86 | 104.57 | 90 ถึง 110% |
| **Accuracy และ Precision:** | | | | | |
| Relative standard deviation (RSD) | 11.22 | 13.97 | 10.63 | 9.00 | <25% |
| %Bias | - | 4.83 | - | 7.74 | ±25% |
| **Repeatability และ Reproducibility:** | | | | | |
| Repeatability relative standard deviation ($RSD^r$) | 3.51 | 5.46 | 4.40 | 4.92 | <25% |
| Reproducibility relative standard deviation ($RSD^R$) | 3.31 | 6.55 | 4.88 | 4.91 | <25% |
| **Limit of quantification (LOQ)** | - | 125 Copies | - | 125 Copies | - |
| **Limit of detection (LOD)** | - | 12.5 Copies | - | 12.5 Copies | - |

**10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC โดยการใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 สำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้จากการทดลองนี้ ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ต้องการการตรวจรับรองสำหรับการนำเข้า-ส่งออกสินค้าระหว่างประเทศได้ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ เพื่อตอบสนองต่อระเบียบมาตรการในการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมกับประเทศคู่ค้าที่มีการกำหนดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนขั้นต่ำ

ไว้ นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการสามารถนำข้อมูลไปขยายขอบเขตตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025

**11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -**

**12. เอกสารอ้างอิง**


ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ภิยุรดา ดนัยศิริพงษ์ อรรคพล ภูมีศรี พงศกร สรรค์วิทยากุล ศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2558. รายงานเรื่อง การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม. 45 หน้า.

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.wonilchem.co.kr/GMO.html (17-09-2560)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2015.pdf (27-01-2561)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf (27-01-2561)

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ (ฉบับที่ 2), 2558

รัชนี ฮงประยูร. 2549. บทปฏิบัติการซีรัมวิทยาทางด้านโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 87 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 115 น.

Alexander, P.J., Rajanikanth, G., Bacon, C.D. and Bailey, C.D. 2007. Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. Mol. Ecol. Notes. 7: 5-9.

Baeumler, S., Wulff, D., Tagliani, L. and Song, P. 2006. A real-time quantitative PCR detection method specific to widestrike transgenic cotton (event 281-24-236/3006-210-23). J. Agric. Food Chem. 6: 6527-6534.

Bonfini, L., Moens, W., Ben, E., Querci, M., Aygun, B., Corbisier, P., Morisset, D., Zel, J. and Van den Eede, G. 2007. Analytes and related PCR primers used for GMO detection and quantification. Luxembourg: European Communities, Report No. EUR 23059-EN.

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N. and Morisset, D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends Food Sci. Technol. 37: 115-126.

Chaouachi, M., Fortabat, M.N., Geldreich, A., Yot, P., Kerlan, C., Kebdani, N., Audeon, C., Romaniuk, M. and Bertheau, Y. 2008. An accurate real-time PCR test for the detection and quantification of cauliflower mosaic virus (CaMV): Applicable in GMO screening. Eur. Food. Res. Technol. 227: 789-798.

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

EN ISO 21571:2005. 2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction., [Online]. Available: https://www.iso.org/standard/34616.html.

Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A. and Toyoda, M. 2001. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 42: 231-236.

Guo, J., Chen, L., Liu, X., Gao, Y., Zhang, D. and Yang, L. 2012. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs. Food Chem. 132: 1566-1573.

Hubner, P., Waiblinger, H.U., Pietsch, K. and Brodmann, P. 2001. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. J. AOAC. Int. 84: 1855-1864.

Jiang, L., Yang, L., Rao, J., Guo, J., Wang, S., Liu, J., Lee, S. and Zhang, D. 2010. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. J. Sci. Food Agric. 90: 402-408.

Kim, J.H., Park, S.B., Roh, H.J., Woo, H.B, Shin, M.K., Moon, G.I., Hong, J.H., Zhang, D. and Kim, H.Y. 2015. Event-specific qualitative and quantitative detection of three genetically modified papaya events using a single standard reference molecule. Food Control. 55: 127-132.

Kim, S.A., Lee, M., Yoo, S.J., Kim, J.H., Lee, H., Park, K.S., Jeong, J. and Kim, H.Y. 2010. Detection of GM papaya event 55-1 in fresh and processed papaya using duplex PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53: 237-242.

Kwon, Y.J., Chung, S.Y., Cho, K.C., Park, J.E., Koo, E.J., Seo, D.H, Kim, E., Whang, J., Park, S.S., Choi, S.O. and Lim, C.J. 2015. Establishment and application of a qualitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. Anal. Sci. Technol. 28: 117-124.

Li, P., Jia, J.W., Jiang, L.X., Zhu, H., Bai, L., Wang, J.B., Tang, X.M. and Pan, A.H. 2012. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of the GMO carnation (*Dianthus caryophyllus*) variety Moonlite based upon the 5'-transgene integration sequence. Genet. Mol. Res. 11: 1117-1129.

Morgante, P.G., Vicente, F.F., Coffani-Nunes, J.V. and Moreno, P.R.H. 2013. Establishment of simple and efficient methods for plant material harvesting and storage to allow DNA extraction from a *Myrtaceae* Species with medicinal potential. Int. J. Genomic Med. 1: 1-5.

Nageswara-Rao, M., Kwit, C., Agarwal, S., Patton, M.T., Skeen, J.A., Yuan, J.S., Manshardt, R.M. and Stewart, C.N. 2013. Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.). BMC Biotechnology. 13: 1472-1483.

Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K. and Teshima R. 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., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. and Nishimaki-Mogamia, T. 2014. Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. Biol. Pharm. Bull. 37: 1-5.

Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K.,Teshima, R. and Akiyama, H. 2013. A DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. Food Control. 32: 728-735.

Ovesna, J. and Hodek, J. 2009. Detection of transgenic papaya lines: Extraction protocol optimisation and verification of DNA quality by PCR assay. *Czech J. Food Sci.* 27: 75-81.

Qiagen. 2009. Wizard® PCR Preps DNA Purification System., [Online]. Available: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-pcr-preps-dna-purification-system-quick-protocol.pdf.

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Tan, H., Huang, H., Tie, M., Ma, J. and Li, H. 2013. Comparative analysis of six DNA extraction methods in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). J. Agr. Sci. 7: 82-90.

Wang, X., Teng, D., Yang, Y., Tian, F., Guan, Q. and Wang, J. 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.

Yang, L., Pan, A., Zhang, K., Yin, C., Qian, B., Chen, J., Huang, C. and Zhang, D. 2006. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. Transgenic Res. 14: 817-831.

**13. ภาคผนวก**

1. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

ชั่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Food lysis buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนสุด ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ปริมาตรหลอดละ 250 ไมโครลิตร เติม PB buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำ QIA quick spin column ใส่ใน Collection tube ดูดของเหลวปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ QIA quick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที เทของเหลวใน Collection tube ทิ้ง เติม AW2 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ QIA quick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที เทของเหลวใน Collection tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที จากนั้นย้าย QIA quick spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม EB

buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปบน QIA quick spin column เพื่อละลายดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2%CTAB (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)

ชั่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม 2%CTAB ที่มี 0.1% β-mercaptoethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำหลอดไปบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนใสที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanal ที่แช่เย็นไว้ จำนวน 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan (ดัดแปลงจาก Rogers and Bendich, 1985)

ชั่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanal ที่แช่เย็นไว้ จำนวน 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร

100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

4. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking (ดัดแปลงจาก Alexander *et al*., 2007)

ชั่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Homogenization buffer (Solution I buffer) (ที่เติม 1% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer เติม Lysis buffer (Solution II buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Precipitation buffer (Solution III buffer) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

5. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)

ชั่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5M Guanidine-HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanal ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex

mixer จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

6. การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification (Qiagen, 2009)

นำดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สกัดได้จากวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธี เติม Miniprep DNA purification resin ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) มาเชื่อมกับ Minicolumn และใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA purification resin ลงใน Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยๆ ดันสารละลายลง ทิ้งส่วนของเหลวที่อยู่ด้านล่าง เติม 80% Isopropanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน Syringe หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยๆ ดันเพื่อล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ Minicolumn ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกจนหมด นำ Minicolumn ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น (อุ่น) นึ่งฆ่าเชื้อ ลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn