รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : -
2. **โครงการวิจัยเดี่ยว** : **พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม**

   กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of GM corn Mon810 and NK603 using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	: นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภพ
	นางสาวปิยนุช ศรชัย	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภพ
	นางสาวฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

การตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) โดยการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ดัดแปลงวิธีการของ Randhawa *et al.* (2013) และ Lee *et al.* (2009) ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ทดสอบความจำเพาะและความไว ในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ และตัวอย่างพืช ได้แก่ข้าวโพดและมะละกอ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 BT 11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS40-3-2 สกัดวิธี GeneScan ตัวอย่างพืชสด ข้าวโพด มะละกอ และเฟื่องฟ้า ใช้วิธี CTAB ปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วย 2X *Bst* buffer, 0.4mM dNTPs, 0.5M Betaine, 0.2µM F3-B3 & FIP-BIP primers, 0.1µM Loop primers, 8 unit *Bst* polymerase, DNA 50-200 ng ชุดไพรเมอร์ตรวจ CaMV 35S promoter บ่มปฏิกิริยาที่ 60 °C 1 ชั่วโมง และ Nos terminator บ่มปฏิกิริยาที่ 55 °C 2 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาโดยการเติมสาร SYBR greenI ตัวอย่างที่ตรวจพบยีนพืชดัดแปรพันธุกรรมจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวอมเหลือง ตัวอย่างพืชไม่ดัดแปรพันธุกรรมจะเป็นสีส้มเหมือนเดิม สอดคล้องกับผลตรวจการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอบน 2% Agarose gel electrophoresis

การตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ และตัวอย่างพืชสด ให้ผลถูกต้องตรงกับข้อมูลการดัดแปรพันธุกรรมและผลการทดสอบ Real-time PCR ตัวอย่าง Mon810, BT176 ตรวจพบยีน 35S promoter และไม่พบ Nos terminator ตัวอย่าง BT11, NK 603, Mon89034 ตรวจพบยีน 35S promoter และ Nos terminator โดยตัวอย่าง MIR604, MIR162 ตรวจพบ Nos terminator และตรวจไม่พบ 35S promoter ปฏิกิริยา LAMP มีความไวของวิธีทดสอบที่ขีดจำกัด (LOD) <0.04% (NK603 100 ng) สามารถใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรองเฝ้าระวังการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมในภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้

Abstract

Genetically Modified Maize detection via loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was successfully validated on screening test using CaMV 35S promoter and Nos terminator. This study was experimented base on Randhawa *et al.* (2013) and Lee *et al.* (2009) method. Optimal and appropriated condition for detection (primer concentration, temperature, duration of activity, specificity and sensitivity) were tested to develop GM plant detection method. Different maize CRMs and in-house positive samples were used such as Mon810, Bt11, BT 176, NK603, MIR604, MIR162, Mon89034 maize and GTS40-3-2 soybean. The results demonstrated that the samples contaminated with GM DNA will change the color from orange to green-yellow however Non-GM sample stayed always orange, the positive agreement and negative agreement results matched with the PCR-base detection result and shown the DNA band on agarose gel accordingly.

Screening test via LAMP developed in this study for CaM35S promoter and NOS terminator detection on different maize CRMs and in-house positive samples, the positive agreement and negative agreement results matched with the Real-time PCR-base detection result. 35S promoter can be detected in Mon810, BT176, BT11, NK 603, Mon 89034. NOS terminator can be detected in BT11, NK 603, Mon 89034, MIR604 and MIR162 using LAMP. The Limit of Detection of the method was tested using NK603 100g and shown that the method can detect GM copies <0.04% contamination. The method developed in this study shown promising result to be implemented in field detection or in small GM analysis laboratory.

6. คำนำ

สถานการณ์การปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมในปี 2559 มีประเทศที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ 28 ประเทศ พืชที่ปลูกมากในหลายประเทศ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนล่า และฝ้าย (ISAAA, 2016) ข้าวโพดเป็นพืชที่มีสายพันธุ์และลักษณะการดัดแปรพันธุกรรมมากที่สุด (231 events) ทั้งแบบยีนเดี่ยวและยีนรวม ข้าวโพดต้านทานแมลงสายพันธุ์ MON810 และทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทสายพันธุ์ NK603 ได้รับการอนุมัติปลูกในหลายประเทศทั่วโลกรวมถึงฟิลิปปินส์และเวียดนาม จึงมีโอกาสเล็ดลอดเข้ามาสู่ประเทศไทย นอกจากนี้การนำเข้าเมล็ดข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเพื่อการอุตสาหกรรมเป็นข้อยกเว้นของ พ.ร.บ. กักพืช ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะที่เป็นหน่วยงานกำกับดูแล ซึ่งไม่อนุญาตให้มีการนำเข้าและปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม ยกเว้นเพื่อการศึกษาทดลอง ต้องวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว สำหรับใช้ตรวจสอบเฝ้าระวังการปนเปื้อนในพื้นที่ภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้หลักพื้นฐานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นวิธีที่มีการใช้แพร่หลายในการตรวจสอบความปลอดภัยอาหาร (food safety) แลตรวจพิสูจน์โรคคน สัตว์ และพืช ข้อดีของเทคนิค LAMP คือเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ต้นทุนต่ำ ตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ มีศักยภาพในการใช้เป็นวิธีการตรวจสอบในพื้นที่จริง เทคนิคดังกล่าวมีรายงานการนำมาใช้ตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมครั้งแรกโดย Fukuta el al (2004) ซึ่งต่อมามีการพัฒนาตรวจยีนคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกหลายชนิด ได้แก่ T-nos, P-35S, P-nos, pat (Li et al. 2015) Lee et al. (2009) ตรวจคัดกรองยีน 35S promoter และ Nos terminator โดยการออกแบบชุดไพรเมอร์ที่ฟอร์มเป็น loop สำหรับตรวจยีน T-nos และ CaMV 35S Promoter โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์เพิ่มสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 55 C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจผลปฏิกิริยาบนอะกาโรสเจล พบว่ามีความจำเพาะและความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ 0.01% GMO สามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนในระดับต่ำได้ Randhawa et al. (2013) วิจัยพัฒนาเทคนิค LAMP ร่วมกับ Real-time PCR ในการตรวจยีน P35S CaMV, P-FMV และ marker ยีน aadA, nptII, uidA ของฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ตรวจได้ภายในเวลา 35 นาที และมีความไวในการตรวจได้ถึง 4 copies ข้อดีของการตรวจด้วยเทคนิค LAMP คือสามารถใช้อุปกรณ์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่มีในห้องปฏิบัติการ เช่น heating block, Thermal cycler, Real-time PCR และ Isothermal Real-time system สามารถประยุกต์ใช้ตรวจสอบในภาคสนาม ตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนี้เทคนิค LAMP มีความไวต่ำต่อการเกิดปฏิกิริยายับยั้งของพีซีอาร์ แต่มีความจำเพาะและความไวต่อดีเอ็นเอเป้าหมายสูง ปัจจุบันมีการศึกษาและนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนมาก การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบและประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยเฉพาะตัวอย่างพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกร ในพื้นที่ภาคสนาม โดยเก็บตัวอย่างทดสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กของหน่วยงานส่วนภูมิภาค เป็นการเฝ้าระวังการปนเปื้อนในพื้นที่แปลงเกษตรกร และควบคุมกำกับดูแลตาม พ.ร.บ.กักพืช

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยวิธีการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator จากนั้นจะพัฒนาเพื่อตรวจจำแนกยีนจำเพาะสายพันธุ์ข้าวโพดต้านทานแมลง event Mon810 และข้าวโพดทนทานสารกำจัดวัชพืช event NK603

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์ : วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ event Mon810, Bt11, Bt176, NK603, MIR604, MIR162, Mon89034, วัสดุอ้างอิงมาตรฐานถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS-40-3-2, ตัวอย่างที่สกัดจากพืชสด ได้แก่ ข้าวโพด มะละกอ และเฟื่องฟ้า

ชุดไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP ตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV35S promoter และ Nos terminator อ้างอิงวิธี Gurinder (2013) และ Lee (2008)

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ Bst DNA polymerase, MgCl ,dNTPs, betaine,

สารเคมีและอุปกรณ์ในการตรวจสอบปฏิกิริยา Agarose gel electrophoresis, SYBR GreenI, Gel-Documentation magnesium pyrophosphate

7.2 วิธีการ

1. ตัวอย่างทดสอบและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานพืชดัดแปรพันธุกรรม (IRMM-ERM, AOCS) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan ดัดแปลงจาก Roger และ Bendich (1985) โดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 มก. ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มล. เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น

ตัวอย่างพืชสด ได้แก่ ใบข้าวโพด ใบมะละกอ และใบเฟื้องฟ้า สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ISO 21571 (2005) โดยบดตัวอย่างพืชสด ใช้ 0.2 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร เติม 2% CTAB และ 0.1% B-mercaptoethanol ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่

ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น

ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Multiskan GO, Thermo Scientific) แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอสำหรับทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. ชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับการตรวจสอบคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรม

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP จะเป็นชุดไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2-3 คู่ ประกอบด้วย Displacement primers (outer primers), Lamp primers (inner primers) และ Loop primers สามารถใช้โปรแกรมการออกแบบไพรเมอร์ อาทิ LAMP Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) หรือ Primer Explorer version 4 (http://primerexplorer.jp/e)

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้เลือกทดสอบชุดไพรเมอร์อ้างอิงจาก Lee et al. (2009) เพื่อทดสอบการตรวจวิเคราะห์คัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมยีน CaMV35S promoter และ Nos terminator ซึ่งออกแบบจาก OSR events MS8 และ RF3 และไพรเมอร์อ้างอิงจาก Randhawa et al. (2013) ออกแบบสำหรับตรวจคัดกรองยีน P35S CaMV ของฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม

การทดลองครั้งนี้สังเคราะห์ชุดไพรเมอร์ LAMP การตรวจวิเคราะห์ CaMV35S Promoter และ Nos terminator (Sigma) จากบริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัด ลำดับเบสไพรเมอร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของชุดไพรเมอร์สำหรับการทดลองในครั้งนี้

Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
CaMV35P LampF(FIC-F2)	GTCTTCAAAGCAAGTGGTTTTGGATAGTGGGATTGTGCG	Lee et al, 2009
CaMV35P LampR(BI-B2C)	TTCCACGATGCTCCTCGTTTTCCTCTGCCGACAGTGG	
CaMV35P LoopF(LoopFc)	TCCACTGACGTAAGGG	
CaMV35P LoopR(LoopB)	GGGGTCCATCTTTGGG	
CaMV35P DisplF(F3)	AGGAAGGGTCTTGCG	
CaMV35P DisplR(B3c)	ATAAAGGAAAGGCCATCG	
T-nos LampF(Fic-F2)	AGATGGTTTTTATGATTAGTTTTATTTATCCTAGTTTGCGC	Lee et al, 2009
T-nos LampR(BI-B2C)	TAATTCAACAGAATTATATGTTTTAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG	
T-nos LoopF(LoopFc)	CAATTATACATTTAATACGCG	
T-nos LoopR(LoopB)	TGCAAGACCGGC	
T-nos DisplF(F3)	CATAGATGACACCGCG	
T-nos DisplR(B3c)	GATCGTTCAAACATTTGG	

F3-p35S	CTCCTCGGATTCCATTGC	Randhawa
B3-p35S	TCTACAGGACGGACCATG	et al,2013
FIP-p35S	ACGATGCTCCTCGTGGGTCATCGTTGAAGATGCCTCT	
BIP-p35S	CGTTCCAACCACGTCTTCAAGTCTTGCGAAGGATAGTGG	
LoopF-p35S	ATCTTTGGGACCACTGTCG	
LoopB-p35S	TGATATCTCCACTGACGTAAGG	

3. ทดสอบสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาเทคนิค LAMP

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วย 10X Bst polymerase buffer (NEB, UK), 0.4mM dNTPs, 10 uM primers (Incl. Displ primers, Lamp primers, Loop primers), 5M Betaine, *Bst* polymerase, DNA template 100 ng (Mon810 และ NK603) และ paraffin oil

ทดสอบปริมาณความเข้มข้นของแต่ละคู่ไพรเมอร์ Displacement primers, Lamp primers และ Loop primers อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (55-60 องศาเซลเซียส) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (60-120 นาที) และปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทดสอบ (50, 100, 150 และ 200 ng)

การอ่านและบันทึกผลของปฏิกิริยา LAMP เพื่อยืนยันผล โดยการทดสอบวิธี 4 แบบ ได้แก่ การเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาเมื่อการเติมสาร SyBR GreenI (Sigma) ทดสอบดูความขุ่นและการตกตะกอนของแมกนีเซียม ไพโรฟอสเฟต (magnesium pyrophosphate) ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้ UV transilluminator หรือ Dark reader และตรวจดูแถบดีเอ็นเอ บน 2% agarose electrophoresis

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP

ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Mon810 BT 11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS40-3-2 ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับข้อมูลการตัดต่อพันธุกรรมที่มีองค์ประกอบของยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และหรือ Nos terminator

ความไวของปฏิกิริยา ตรวจสอบโดยใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนต่างๆ กัน อ้างอิงตามใบรับรองวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certificate of CRM) ดังนี้ Mon810 ak (<0.9%), Mon810 ck (0.5%), Mon810 ek (1.98%), Mon810gk (9.9%), NK603a (<0.04), NK603b (0.1%), NK603c (0.49%), NK603d (0.98%), NK603e (1.96%), NK603f (4.91%), MIR604a (<0.09%), MIR604c (0.98%), MIR604d (9.85%)

5. การตรวจสอบยืนคัดกรองการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP

ทำการตรวจสอบยืน CaMV35Spromoter และ Nos terminator ของตัวอย่างทดสอบที่ได้จากการตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชสด และตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ อาทิ ตัวอย่างข้าวโพด ถั่วเหลือง มะละกอ โดยทำการทดสอบ 2 ซ้ำ ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 (0.1% และ 0.5% GM) เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบผลบวกแสดงการตรวจพบ และใช้น้ำเป็นตัวอย่างควบคุมผลลบแสดงว่าตรวจไม่พบ ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยการเติมสาร SyBR GreenI ปริมาตร (0.1-0.2 ไมโครลิตร) การอ่านค่าและสรุปผลการทดสอบจะต้องได้ค่าการเปลี่ยนสีหรือไม่เปลี่ยนสีของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมือนกันทั้งสองซ้ำ หากมีหลอดทดลองที่ให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน ต้องทำการทดสอบซ้ำ ถ้าผลการทดสอบยังเหมือนเดิม ให้สกัดดีเอ็นเอและทดสอบใหม่

<u>7.3 เวลาและสถานที่</u> ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558-กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างทดสอบและการสกัดดีเอ็นเอ

การทดลองนี้ใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ event Mon810, Bt11, Bt176, NK603, MIR604, MIR162, Mon89034, วัสดุอ้างอิงมาตรฐานถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS-40-3-2 โดยใช้วิธี GeneScan ในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างพืชสด ได้แก่ ข้าวโพด มะละกอ และเฟื่องฟ้า ใช้วิธี CTAB ในการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี GeneScan มีปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ 1,035 -1,897 ng/ul, โดยมีค่า ratio 260/280 เฉลี่ย 1.85-2.0 วิธี CTAB ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย 750 ng/ul ค่า ratio 260/280 เฉลี่ย 1.84-2.01 ซึ่งมีปริมาณและคุณภาพในระดับดีมาก โดยไม่ต้องทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ผ่านเรซิ่น สามารถนำไปทดสอบปฏิกิริยา ต่อด้วยเทคนิค LAMP ทำให้ลดขั้นตอนประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เนื่องจากเทคนิค LAMP มีความไวต่อปฏิกิริยายับยังต่ำ จึงทำให้ลดขั้นตอนและประหยดต้นทุนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ผ่านเรซิ่น ทั้งนี้ในขั้นตอนการตรวจสอบด้วย Real-time PCR ของห้องปฏิบัติการต้องนำดีเอ็นเอผ่านเรซิ่นเพื่อลดปริมาณสารยับยั้ยปฏิกิริยาพีซีอาร์ก่อน วิธีการสกัดโดยไม่ต้องทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ สอดคล้องกับรายงานของ Li et al (2015) ซึ่งเทคนิค LAMP มีความไวต่อสารยับยั้งปฏิกิริยาต่ำ สามารถเป็นวิธีทดสอบในภาคสนาม อย่างไรก็ตามควรต้องพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้มีขั้นตอนที่ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีราคาแพง เมื่อสกัดแล้วสามารถนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค LAMP ต่อได้เลย

สำหรับรายการวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน และค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMOs องค์ประกอบยีนคัดกรอง (อ้างอิง: ISAAA, 2017 และ CBD Biosafety clearing house) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายการวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน ค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMOs และยีนคัดกรอง

IRMM-ERM	Event	%GM	GM construct		DNA conc. (ng/ul) /Ratio 260/280
			35S promoter	Nos terminator	
ERM-BF413ak	Mon810 ak	<0.09	+	-	1,035/1.87
ERM-BF413ck	Mon810 ck	0.49 ± 0.1	+	-	1,570/1.89
ERM-BF413ek	Mon810 ek	1.98 ± 0.15	+	-	1,640/1.90
ERM-BF413gk	Mon810 gk	9.9 ± 0.5	+	-	1,642/1.88
ERM-BF411f	BT176	5 ± 0.18	+	-	1,745/1.89
ERM-BF412f	BT11	4.89 ± 0.21	+	+	1,348/1.88
ERM-BF415a	NK603 a	<0.04	+	+	1,630/1.89
ERM-BF415b	NK603 b	0.1 ± 0.04	+	+	1,539/1.87
ERM-BF415c	NK603 c	0.49 ± 0.05	+	+	1,008/1.84
ERM-BF415d	NK603 d	0.98 ± 0.07	+	+	1,156/1.86
ERM-BF415e	NK603 e	1.96 ± 0.09	+	+	1,038/1.91
ERM-BF415f	NK603 f	4.91 ± 0.13	+	+	1,299/1.90
ERM-BF423a	MIR604 a	<0.09	-	+	1,897/1.93
ERM-BF423b	MIR604 b	0.1 (-0.03;+0.1)	-	+	1,540/1.95
ERM-BF423c	MIR604 c	0.98 (-0.09;+0.13)	-	+	1,795/1.97
ERM-BF423d	MIR604 d	9.85 (-0.26;+0.29)	-	+	1,499/1.97
AOCS 0607-A2	MIR604	100	-	+	1,356/2.0
AOCS 1208-A	MIR162	100	-	+	1,560/1.89
AOCS 0906-E	Mon89034	99.425	+	+	1,353/2.0
AOCS 0406-D	Mon88017	99.05	+	+	1,258/1.87
ERM-BF414f	GA21	4.29 ± 0.17	-	+	1,235/1.87
ERM-BF410gk	GTS 40-3-2	10 ± 0.7	+	+	1,560/1.94

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงการดัดแปรพันธุกรรมมียีน CaMV 35S promoter และหรือNos terminator

; - (negative) หมายถึงไม่มียีน CaMV 35S promoter และหรือNos terminator

2. ชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับการตรวจสอบคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรม

การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีการตรวจคัดกรอง ทดสอบวิธีตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter โดยชุดไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ LAMP CaMV35P LampF(FIC-F2) /CaMV35P LampR (BI-B2C) ไพรเมอร์ Loop CaMV35P LoopF(LoopFc)/ LoopR(LoopB) และไพรเมอร์ Displacement CaMV35P DisplF(F3)/ CaMV35P DisplR(B3c) (Lee et al. 2009) ทดสอบปฏิกิริยา ตาม

วิธีของ Lee et al. (2009) ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่าง CRM ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย SyBR GreenI ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจสอบยีน 35S promoter ได้แต่ไม่มีความสม่ำเสมอของค่าการทดสอบซ้ำ จึงสังเคราะห์ไพรเมอร์ชุดใหม่ F3-p35S/ B3-p35S, FIP-p35S/BIP-p35S, LoopF-p35S/LoopB-p35S (Rostamkhani et al. 2011) ทดสอบปฏิกิริยา LAMP ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไพรเมอร์ชุดใหม่มีความสม่ำเสมอของผลการทดสอบ จึงเลือกใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับการทดสอบครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียสสูงกว่าไพรเมอร์ชุดแรกที่ 55 องศาเซลเซียส จึงทำให้ผลการทดสอบมีความสม่ำเสมอได้ดีกว่า

การตรวจคัดกรองยีน Nos terminator ใช้ชุดไพรเมอร์อ้างอิง Lee et al. (2009) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ T-nos LampF(Fic-F2)/ T-nos LampR(BI-B2C), T-nos LoopF(LoopFc)/ T-nos LoopR(LoopB), T-nos DisplF(F3)/ T-nos DisplR(B3c) ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่าง CRM ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย SyBR GreenI ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจสอบยีน Nos terminator ได้ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับข้อมูลการดัดแปรพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

สำหรับชุดไพรเมอร์ LAMP มีการพัฒนาเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ยีนคัดกรองและยีนจำเพาะพืชดัดแปรพันธุกรรม รวมถึงการพัฒนาร่วมกับเทคนิคอื่น เช่น real-time PCR (Randhawa et al 2013), DNAzyme-lateral flow biosensor (Cheng et al. 2017)

3. ทดสอบสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาเทคนิค LAMP

ทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา LAMP ได้แก่ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยา LAMP ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละคู่ ความเข้มข้นดีเอ็นเอ รวมถึงการใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ platform ต่างๆ

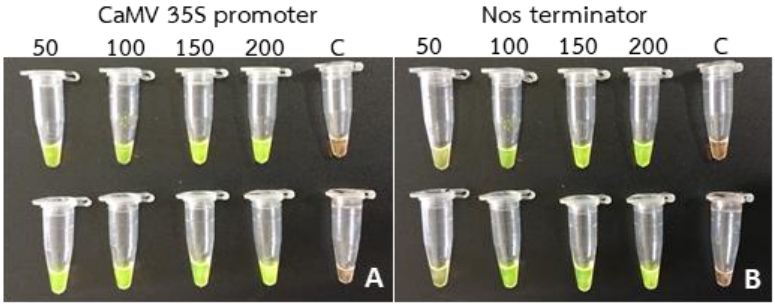
3.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP โดยเตรียมสารเคมีทดสอบปฏิกิริยารวม master mix ประกอบด้วย 2X Bst buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.5M Betaine, 0.2 μM ไพรเมอร์ F3 & B3 (Displacement, outer primers), 0.2 μM ไพรเมอร์ FIP&BIP (LAMP primers), 0.1 μM ไพรเมอร์ LoopF & LoopB, Bst polymerase 8 unit จากนั้นแบ่งใส่หลอดละ 15 μl เติมดีเอ็นเอตัวอย่างทดสอบ (20 ng/ μl) ปริมาตร 5 μl (100 ng) แล้วปิดทับด้วยพาราฟินออย หลอดละ 10 μl เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก aerosol จากนั้นนำไปบ่มที่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตามวิธีการสำหรับแต่ละยีน เมื่อครบกำหนดเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำแข็ง 5-10 นาที แล้วตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาโดยแบ่งตัวอย่าง 5 μl ตรวจการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ บน 2% agarose gel electrophoresis ปฏิกิริยา LAMP ที่เหลือเติม SyBR greenI หลอดละ 0.1-0.2 μl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน ตรวจดูการเปลี่ยนสีของสารเคมีในหลอดทดลอง การเปลี่ยนสีจากสีตั้งต้นของสาร SYBR ซึ่งเป็นสารสีส้ม เมื่อเติมลงในหลอดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีเขียวเรืองแสง เกิดจากการจับของสาร SYBR ซึ่งเป็นสาร Fluorochrome ที่มีคุณสมบัติในการเข้าจับสายดีเอ็นเอสายคู่ตรงตาแหน่ง minor groove โดยหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ยีนมีการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอทำให้สาร SyBR จับกับดีเอ็นเอ LAMP product ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสงอัตราไวโอเลตจะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนต์ทำให้เห็นการเรืองแสงสีเขียวชัดเจนมากขึ้น อ่านค่าผลปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า แต่ในขณะที่ดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมจะไม่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับหลอดทดลองควบคุมที่ใช้น้ำ จะไม่พบการเปลี่ยนสีของสาร SYBR

3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP (amplification range) ในการตรวจยีน CaMV35Spromoter ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810ek และตรวจยีน Nos terminator ทดสอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603e โดยเปรียบเทียบการใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับคือ 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัม พบว่าทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอสามารถอ่านผลของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ได้ โดยการตรวจ Nos terminator อ่านผลการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาเป็นสีเขียวอมเหลืองได้ชัดเจนที่ปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมสีจะอ่อนกว่าที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมขึ้นไป เมื่อพิจารณาจากจำนวน Copies no. ของยีนดัดแปรพันธุกรรม มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยอื่นๆ ทั้งนี้ปฏิกิริยาการทดสอบสามารถใช้ช่วงดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ 50-200 นาโนกรัม โดยไม่เกิดปฏิกิริยายับยั้งจากความไม่บริสุทธิ์ของตัวอย่าง (ตารางที่ 3, ภาพที่ 1) จากผลการทดสอบดังกล่าวจึงเลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม 100 ng ในการทดสอบ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอและ copies no. ในการตรวจยีน CaMV 35S promoter (Mon810) และ Nos terminator(NK603) ด้วย LAMP

Event (GM %)	DNA concentration	Copies no.	Result
Mon810 ek (1.98% GM)	50 ng	380	++
	100 ng	760	++
	150 ng	1140	++
	200 ng	1520	++
NK603 e (1.96% GM)	50 ng	377	+
	100 ng	754	++
	150 ng	1131	++
	200 ng	1508	++



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ 50, 100, 150, 200 นาโนกรัม ในการตรวจยีน CaMV 35S promoter (A) และ Nos terminator (B) อ่านผลปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี SyBR GreenI

ผลการทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสม สำหรับชุดไพรเมอร์ CaMV 35S promoter บ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และชุดไพรเมอร์ Nos terminator บ่มปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จะได้ผลการทดสอบที่สามารถอ่านค่าการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาได้ตรงกับการตรวจสอบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับการทดสอบสภาวะการบ่มปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิต่างๆ พบว่าการทำปฏิกิริยา LAMP สามารถใช้อุปกรณ์ที่ควบคุมอุณหภูมิในระดับ 55- 60 องศาเซลเซียสได้ อาทิ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) heating block หรือเครื่องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ) สอดคล้องกับรายงานของ Randhawa et al. (2013) การทำปฏิกิริยา LAMP สามารถใช้ heating block, Thermal cycler, Real-time PCR และ Isothermal Real-time system ทำให้เทคนิค LAMP เป็นวิธีที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมในภาคสนาม และขยายผลการทดสอบตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นเพื่อการเฝ้าระวัง

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP

ตรวจความจำเพาะและความไวปฏิกิริยาโดยเทคนิค LAMP ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Mon810 BT11 BT176 NK603 GA21 MIR604 MIR162 Mon88017 Mon89034 จำนวน 21 รายการ ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GM ระดับต่างๆ ตั้งแต่การปนเปื้อนระดับต่ำถึงระดับสูง พบว่าปฏิกิริยาโดยชุดไพรเมอร์ LAMP F3-p35S/ B3-p35S, FIP-p35S/BIP-p35S, LoopF-p35S/LoopB-p35S (Rostamkhani et al. 2011) และ T-nos LampF(Fic-F2)/ T-nos LampR(BI-B2C), T-nos LoopF(LoopFc)/ T-nos LoopR(LoopB), T-nos DisplF(F3)/ T-nos DisplR(B3c) (Lee et al. 2009) ให้ผลการทดสอบที่มีความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีนพืชดัดแปรพันธุกรรม CaMV 35S promoter และ Nos terminator ตามลำดับ ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 2, 3) ซึ่งจัดแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ตรวจพบยีน 35S promoter/ไม่พบ Nos terminator ได้แก่ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 และ BT176 ระดับการปนเปื้อน <0.09 – 9.9 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ตรวจพบยีน 35S promoter และ Nos terminator ได้แก่ ข้าวโพดดัดแปร

พันธุกรรม สายพันธุ์ BT11, NK603, Mon89034, Mon88017 โดยระดับการปนเปื้อนต่ำสุดคือข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ปนเปื้อน <0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดปริมาณดีเอ็นเอที่มีโอกาสปนเปื้อนใน 100 ng เท่ากับ 15.38 copies และระดับการเจือปนสูงสุด สายพันธุ์ Mon89034 99.42 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 ตรวจพบยีน Nos terminator และไม่พบยีน 35S promoter ได้แก่ GA21 MIR604 และ MIR162 ระดับการปนเปื้อนต่ำสุด <0.09 – 100เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการตรวจยีนคัดกรองด้วยเทคนิค LAMP ถูกต้องตรงกับข้อมูล gene construction ของ events การดัดแปรพันธุกรรม (ที่มา: ISAAA, 2017 และ CBD Biosafety clearing house)

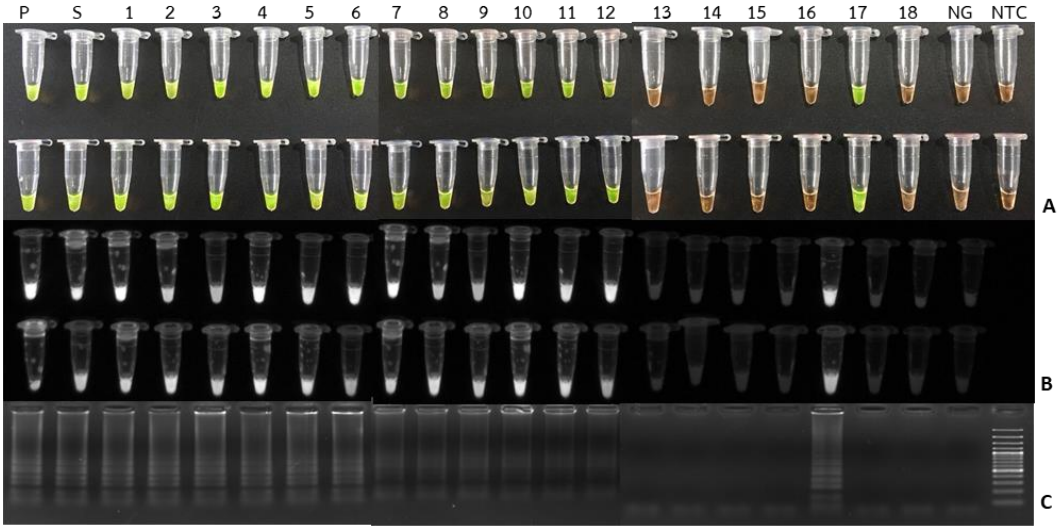
ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยเทคนิค LAMP

Event	GM construct (Visual inspection)		2% agarose gel inspection	
	35S promoter	Nos terminator	35S promoter	Nos terminator
Mon810 ak	+	-	+	-
Mon810 ck	+	-	+	-
Mon810 ek	+	-	+	-
Mon810 gk	+	-	+	-
BT176	+	-	+	-
BT11	+	+	+	+
NK603 a	+	+	+	+
NK603 b	+	+	+	+
NK603 c	+	+	+	+
NK603 d	+	+	+	+
NK603 e	+	+	+	+
NK603 f	+	+	+	+
MIR604 a	-	+	-	+
MIR604 b	-	+	-	+
MIR604 c	-	+	-	+
MIR604 d	-	+	-	+
MIR604	-	+	-	+
MIR162	-	+	-	+
Mon89034	+	+	+	+
Mon88017	+	+	+	+
GA21	-	+	-	+
GTS 40-3-2	+	+	+	+

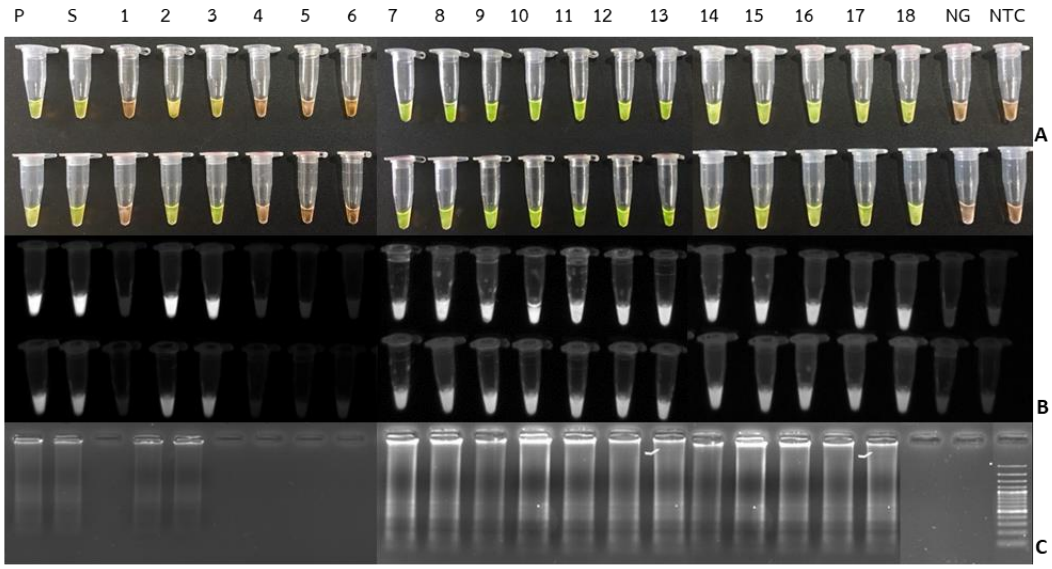
หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และหรือNos terminator ;

- (negative) หมายถึงตรวจไม่พบ

ความไวของปฏิกิริยา ตรวจสอบโดยใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนต่างๆ กัน อ้างอิงตามใบรับรองวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certificate of CRM) พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ได้ต่ำกว่า 0.04% ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนยีนคัดกรองจากการดัดแปรพันธุกรรม 15.38 copies จากรายงานของ Singh et al (2015) ที่พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้งแบบยีนเดี่ยวและยีนรวม พบว่าสามารถตรวจได้ต่ำสุด 2 copies โดย Lee et al. (2009) รายงานความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ต่ำสุด 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในการตรวจคัดกรองพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ Chen et al. (2012) ตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ได้ต่ำถึง 0.01-0.005 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อใช้ปฏิกิริยา LAMP ร่วมกับเทคนิค Real-time PCR Rostamkhani et al. (2011) รายงานว่ามีความไวในการตรวจมากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR ถึง 100 เท่า



ภาพที่ 2 การตรวจยีน CaMV 35S promoter ด้วย LAMP, P= Positive, S;GTS-40-3-2, 1;BT176, 2; BT11, 3:MON810ak, 4;MON810ck, 5;MON810ek, 6;MON810gk, 7;NK603a, 8;NK603b, 9; NK603c, 10:NK603d, 11;NK603e, 12;NK603f 13;MIR604a, 14;MIR604c, 15; MIR604d, 16;MIR604, 17;Mon89034 18;MIR162, NG; เฟื่องฟ้า, NTC;water (A) การเปลี่ยนสีของสาร SYBR Green I (B) การเรืองแสงภายใต้ UV (C) แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ M; 100 bp ladder



ภาพที่ 3 การตรวจยีน Nos terminator ด้วย LAMP, P= Positive, S;GTS-40-3-2, 1;BT176, 2; BT11, 3:MON810ak, 4;MON810ck, 5;MON810ek, 6;MON810gk, 7;NK603a, 8;NK603b, 9; NK603c, 10:NK603d, 11;NK603e, 12;NK603f 13;MIR604a, 14;MIR604c, 15; MIR604d, 16;Mon89034 17;MIR162, NG; เฟื่องฟ้า, NTC;water (A) การเปลี่ยนสีของสาร SYBR Green I (B) การเรืองแสงภายใต้ UV (C) แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ M; 100 bp ladder

5. ตรวจคัดกรองการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP

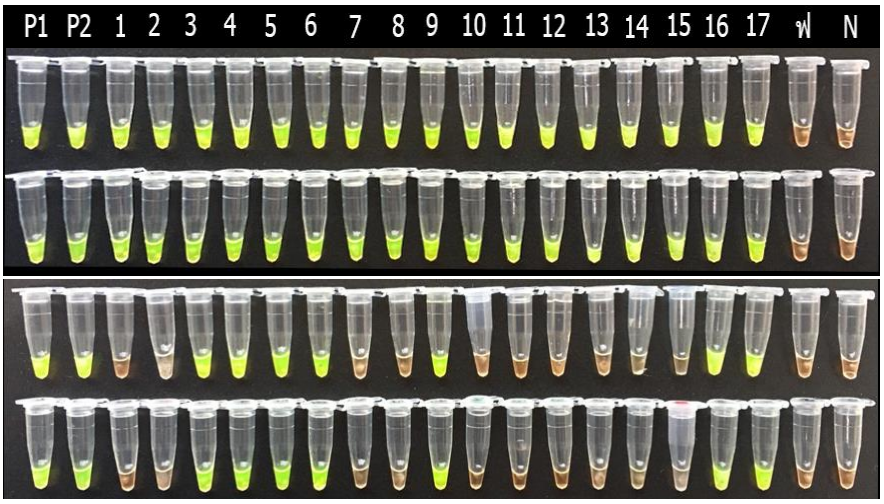
การตรวจสอบยีน CaMV35Spromoter และ Nos terminator ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวโพด 17 ตัวอย่าง (ต่างพันธุ์กัน) และใช้ดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน NK603 ที่มีการปนเปื้อน 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นการทดสอบควบคุมตรวจพบ (positive control) ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเฟื่องฟ้าซึ่งไม่เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรม และน้ำเป็นการทดลองควบคุมตรวจไม่พบ (negative control) และทดสอบตรวจคัดกรองในตัวอย่างมะละกอ 4 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ การอ่านผลตรวจพบหรือตรวจไม่พบผลการทดสอบต้องได้เหมือนกันทั้งสองซ้ำ เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ multiplex Real-time PCR

ผลการทดสอบตัวอย่างข้าวโพดรหัส 1895 จำนวน 17 ตัวอย่าง ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter 17/17 ตัวอย่าง และตรวจพบยีน Nos terminator 7/17 ตัวอย่าง โดยให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex Real-time โดยการทดลองควบคุมที่ใช้ดีเอ็นเอ NK603 ที่มี 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์พืชดัดแปรพันธุกรรมตรวจพบยีนคัดกรอง CaMV35S promoter และ Nos terminator โดยการทดลองเปรียบเทียบที่ใช้ดีเอ็นเอเฟื่องฟ้าและน้ำ ตรวจไม่พบปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเรืองแสง SyBR (ตารางที่ 5 ภาพที่ 4)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจคัดกรองข้าวโพดด้วยเทคนิค LAMP เทียบผลกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

พืช	รหัสตัวอย่างทดสอบ	ตรวจสอบด้วย SyBR		ผลการตรวจ Real-time PCR	
		35S CaMV	T-Nos	35S CaMV	T-Nos
ข้าวโพด	1895/1	+	-	+	-
	1895/2	+	-	+	-
	1895/3	+	+	+	+
	1895/4	+	+	+	+
	1895/5	+	+	+	+
	1895/6	+	+	+	+
	1895/7	+	-	+	-
	1895/8	+	-	+	-
	1895/9	+	+	+	+
	1895/10	+	-	+	-
	1895/11	+	-	+	-
	1895/12	+	-	+	-
	1895/13	+	-	+	-
	1895/14	+	-	+	-
	1895/15	+	-	+	-
	1895/16	+	+	+	+
	1895/17	+	+	+	+
มะละกอ	1960	-	+	+	+
	4910	+	+	+	+
	4911	-	+	+	+
	Positive papaya	+	+	+	+
Positive control	NK603 0.1% GM	+	+	+	+
	NK603 0.5% GM	+	+	+	+
Negative control	เฟื่องฟ้า	-	-	-	-
Negative control	น้ำกลั่น	-	-	+	+

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงตรวจพบยีน; - (negative) หมายถึงตรวจไม่พบ



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมด้วย LAMP, P;positive NK603 0.1%, P2; positive NK603 0.5%, no. 1-17 unknown sample, ฟ;nonGM (เฟื่องฟ้า), N;NTC ตรวจดูการเปลี่ยนสีเขียวอมเหลืองของสารSYBR Green I (A) ตรวจยีน 35S promoter, (B) ตรวจยีน Nos terminator

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เทคนิค LAMP โดยชุดไพรเมอร์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม ปฏิกิริยาประกอบด้วย 2X *Bst* buffer, 0.4mM dNtPs, 0.5M Betaine, 0.2µM F3-B3 และ FIP-BIP primers, 0.1µM Loop primers, *Bst* polymerase โดยใช้ DNA template ได้ตั้งแต่ 50-200 ng (การทดลองครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอ 100 ng) บ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาโดยการเติมสาร SYBR greenI 0.2 µl อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างที่เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวอมเหลือง โดยตัวอย่างพืชไม่ดัดแปรพันธุกรรมและตัวอย่างควบคุมที่ใช้น้ำเป็นการทดลองเปรียบเทียบจะยังเป็นสีส้มเช่นเดิม สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย 2% gel electrophoresis

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 BT 11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS40-3-2 ด้วยวิธี GeneScan ตัวอย่างพืชสด ได้แก่ ข้าวโพด มะละกอ และเฟื่องฟ้า สกัดวิธี CTAB ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ และเจือจางความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. ผลการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (GTS40-3-2) จากการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ถูกต้องตรงกับข้อมูลการดัดแปรพันธุกรรม และผลทดสอบด้วย Real-time PCR อาทิ ตัวอย่าง Mon810, BT176 ให้ผลบวกของ CaMV35S promoter และผลลบของ Nos terminator สำหรับตัวอย่าง BT11, NK

603, Mon89034 ตรวจพบทั้งยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ตัวอย่าง MIR604, MIR162 ให้ผลลบของ CaMV 35S promoter และผลบวกของ Nos terminator

4. ปฏิกิริยา LAMP มีความไวของวิธีทดสอบที่ขีดจำกัด (LOD) 0.1% 100 ng NK603 ซึ่งเทคนิค LAMP สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองเฝ้าระวังการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในหน่วยงานส่วนภูมิภาคได้

ข้อเสนอแนะ

การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจคัดกรองเฝ้าระวังข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมในพื้นที่แปลงปลูกของประเทศไทย สามารถทำได้ด้วยการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับใช้ในภาคสนาม จากนั้นทำการตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter ตามวิธีการข้างต้น ซึ่งใช้ระยะเวลาบ่มปฏิกิริยาเพียง 1 ชั่วโมง อ่านผลปฏิกิริยาโดยเติมสารเรืองแสง SyBR GreenI สำหรับตัวอย่างที่ตรวจไม่พบยีน CaMV 35S promoter ให้ทำการตรวจสอบยีน Nos terminator ด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับ Nos terminator หากตรวจพบยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และหรือ Nos terminator สามารถนำดีเอ็นเอไปตรวจจำแนกยีนจำเพาะที่ตัดต่อเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรมต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

-จัดทำเอกสารวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม โดยการตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยเทคนิค LAMP

-ขยายผลการใช้ประโยชน์งานวิจัย โดยออกแบบจัดทำเป็นชุดตรวจสอบภาคสนาม และห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก และอบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้กับเจ้าหน้าที่ทดสอบ ของหน่วยงานส่วนภูมิภาค เพื่อเฝ้าระวังพืชดัดแปรพันธุกรรม

-นำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR ช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์และเพิ่มความไวในการตรวจสอบตามที่มีการตีพิมพ์เอกสารวิชาการนานาชาติ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม นักศึกษาฝึกงาน ผู้มีส่วนช่วยดำเนินการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. 2554. เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). บทความพิเศษ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 21(3) 201-206 กรกฎาคม-กันยายน 2554.

Bhoge, R.K., Chhabra, R., Randhawa, G., Sathiyabama, M. and Siingh, M. 2015. Event-specific analytical methods for six genetically modified maize events using visual and real-time loop mediated isothermal amplification. Food Control. 55: 18-30.

Chen, X., Wang, X., Jin, N., Zhou, Y., Huang, S., Miao, Q., Zhu, Q. and Xu, J. 2012. Endpoint visual detection of three genetically modified ride events by Loop-Mediated Isothermal amplification. Int. J. Mol. Sci. 13:14421-14433.

Chen, J., Huang, C., Zhang, X., Yu, R. and Wu, Z. 2011. Detection of herbicide-resistant maize by using loop-mediated isothermal amplification of the pat selectable marker gene. Africal Journal of Biotechnology. 10(75) 17055-17061.

Cheng, N., Shang, Y., Xu, Y., Zhang, L., Luo, Y. and Huang, K. 2017. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNAzyme-lateral flow biosensor. Biosensors and Bioelectronics. 91: 408-416.

Huang, X., Chem, L., Xu, J., Ji, H-F., Zhu, S. and Chen, H. 2014. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. Food Chemistry (156) 184-189.

Lee, D., Mura, M.L., Allnutt, T. R. and Powell, W. 2009. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequence. BMC Biotechnology 9:7 doi:10.1186/1472-6750-9-7

Li, R., Wang, C., Ji, L., Zhao, X., Liu, M., Zhang, D. and Shi, J. 2015. Loop0mediated isothermal Amplification (LAMP) assay for GMO on: recent progresses and future perspectives. Open Access Library Journal, 2: e1264.

Randhawa, G. J., Singh, M., Morisset, D., Sood, P. and Zel, J. 2013. Loop-mediated isothermal amplification: rapid visual and Real-Time methods for detection of genetically modified crops. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, *61* (47), pp 11338–11346

Rostamkhni, N., Haghnazari, A., Tohidfar, M. and Moradi, A. 2011. Rapid identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. Czech J. Genaet. Plant Breed. 47(4) :140-148.

Shen, P., Geng, F., Yu, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Li, Z., Zhang, W., Shu, C., Zhang, Y. and Tan J. 2016. A rapid loop-mediated isothermal amplification method for detection of the modified GM *cry1A* gene in transgenic insect-resistant cotton and rice Food control. 62: 357-364.

Singh, M., Randhawa, G.J., Sood, P. and Bhoge, R.K. 2015. Loop-mediated isothermal amplification targeting insect resistant and herbicide tolerant transgenes: Monitoring for GM contamination in supply chain. Food Control. 51: 283-292.

Xu, J., Zheng, Q., Yu, L., Liu, R., Zhao, X., Wang, G. and Wang, Q. 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25. Food Science & Nutrition 1(6):432-438.

13. ภาคผนวก

สารเคมีปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ LAMP ตรวจยีน CaMV35S Promoter และ Nos terminator

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Distilled water	8	-
10x Bst buffer	5	2X
10 mM dNTPs	1	0.4 mM
5M Betaine	2.5	0.5 M
10 µM F3	0.5	0.2 µM
10 µM B3	0.5	0.2 µM
10 µM FIP	0.5	0.2 µM
10 µM BIP	0.5	0.2 µM
10 µM LoopF	0.25	0.1 µM
10 µM LoopB	0.25	0.1 µM
DNA 20 ng/µl	5	100 ng/µl
Bst polymerase	1	
Paraffin oil	10	

ชุดไพรเมอร์ CaMV 35S promoter บ่มปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที, ชุดไพรเมอร์ Nos terminator บ่มปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที

เมื่อครบกำหนดเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำแข็ง 5-10 นาที แล้วตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาโดยแบ่งตัวอย่าง 5 µl ตรวจการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ บน 2% agarose gel electrophoresis ปฏิกิริยา LAMP ที่เหลือเติม SyBR greenI หลอดละ 0.2 µl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน ตรวจดูการเปลี่ยนสีของสารเคมีในหลอดทดลอง