รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : -

2. โครงการวิจัย : พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม

กิจกรรมที่ 2 : วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรุ่มวิทยา

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of ELISA Test Kit on the Commercial Scale for the Detection of CP4EPSPS Protein in Genetically Modified Soybean

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายธีระ ชูแก้ว สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

: นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองสายพันธุ์ GTS 40-3-2 ได้รับการตัดต่อยีน CP4EPSPS ทำให้สามารถต้านทานไกลโพเสทซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช ชุดตรวจสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้นเป็นการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี ELISA ชนิด Plate-trapped antigen direct ELISA (PTA-direct ELISA) โดยศึกษาประสิทธิภาพการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) และ Horseradish peroxidase (HRP) ต่อประสิทธิภาพของการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัม ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ได้ในระดับต่ำสุด 1 ไมโครกรัม เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้น IgG-CP4EPSPS-HRP มีความเข้มของสีที่สังเกตได้ด้วยสายตามากกว่า IgG-CP4EPSPS-ALP การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน CP4EPSPS พบว่าใช้อัตราส่วนเมล็ดถั่วเหลืองต่อ Extraction buffer 1:10 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS โดยใช้ IgG-CP4EPSPS-HRP แล้วเติม TMB สับสเตรท สามารถอ่านและวิเคราะห์ผลการตรวจสอบได้ด้วยสายตาที่ระยะเวลา 30 นาที โดยใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA กับวิธี Real-time PCR พบว่า มีความถูกต้องร้อยละ 70 ผลการทดลองดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ โดยสามารถตรวจได้ 48 ตัวอย่างต่อ 1 ไมโครเพลท (จำนวน 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับวิธี Real-time PCR โดยใช้ตัวอย่างใบและเมล็ดถั่วเหลืองที่สุ่มจากห้องปฏิบัติการและจากแปลงปลูกของเกษตรกรจำนวน 143 ตัวอย่างพบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์มีความถูกต้องร้อยละ 90

The soybean line GTS 40-3-2, contained *CP4EPSPS* gene, was developed to increase the tolerance of glyphosate herbicide as a weed control option. The direct ELISA with plate-trapped antigen ELISA (PTA-ELISA) type for the detection of CP4EPSPS protein was developed. The influencing parameters for ELISA test were established including IgG-CP4EPSPS conjugated with enzyme (Alkaline phosphatase: ALP and Horseradish peroxidase: HRP), CP4EPSPS protein concentrations (1-5 microgram). The results showed that both of enzyme conjugated with IgG-CP4EPSPS can detect CP4EPSPS protein with the minimum protein concentration of 1 microgram. Nonetheless, the IgG-CP4EPSPS-HRP was more efficient than IgG-CP4EPSPS-ALP and IgG-CP4EPSPS-control in terms of clear color detection for protein assay. Subsequently, the ratio of samples and extraction buffer were optimized for CP4EPSPS protein assay by visual detection with ELISA kit. The addition of IgG-CP4EPSPS-HRP with TMB substrate after protein extraction from soybean seeds using the ratio of sample and extraction buffer 1:10 (gram/mL) exhibited clear visual detection within 30 minutes, results of total processes can be obtained within 5 hours. In addition, the ELISA test was validated with Real-time PCR method, which the accuracy of 70% was obtained. These results could be the further application for the ELISA test kit of CP4EPSPS protein in genetically modified soybean on the commercial scale with can be detected 48 samples for 1 micro plate. Moreover, the ELISA test as commercial scale was repeatedly validated with Real-time PCR method using leaf and seed of soybean (143 samples). The accuracy of 90% allows a rapid and reliable method to determine CP4EPSPS protein in genetically modified soybean.

6. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่ประเทศไทยประสบปัญหาการผลิตเพื่อใช้ภายในประเทศไม่เพียงพอ รัฐบาลจึงอนุญาตให้นำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศ (ขนิษฐาและคณะ, 2553) ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร ปี 2550 มีปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง 1.54 ล้านตัน มูลค่า 19 หมื่นล้านบาท ในปี 2559 พบว่า ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง 2.95 ล้านตัน มูลค่า 43 หมื่นล้านบาท ซึ่งมีแนวโน้มการนำเข้าเพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) การนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศประมาณร้อยละ 80 มาจากสหรัฐอเมริกาและประเทศในแถบอเมริกาใต้ ซึ่งถั่วเหลืองจากประเทศดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (ขนิษฐาและคณะ, 2548) โดยเป็นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ GST 40-3-2 เพื่อให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโพเสทหรือเรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ มีการตัดต่อยีน *CP4EPSPS* เข้าไปทำให้ถั่วเหลืองสามารถสร้างเอนไซม์ EPSPS ได้ในปริมาณมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ EPSPS

ที่สร้างมาจากยีน *CP4EPSPS* นี้เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโพเสท ทำให้ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโพเสทได้ (Wu *et al*., 2012)

อย่างไรก็ตาม กรมวิชาการเกษตรยังคงมีการตรวจพบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนำเข้า ซึ่งการตรวจพบการปนเปื้อนสิ่งดัดแปรพันธุกรรม จัดเป็นสิ่งต้องห้าม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 (ฉบับที่ 10) พ.ศ.2553 นอกจากนี้การปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีจำนวนมากขึ้นของประเทศเพื่อนบ้าน ทำให้สินค้าเกษตรที่มีโอกาสปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมหลุดลอดเข้ามาในประเทศได้ง่าย เพื่อเป็นการควบคุมและป้องกันไม่ให้พืชดัดแปรพันธุกรรมหลุดลอดเข้าสู่แหล่งปลูกภายในประเทศ กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายให้ดูแลสินค้าเกษตร นำเข้า ส่งออก และดูแลในเรื่องคุณภาพสินค้าเกษตร ต้องหาแนวทางป้องกันเพื่อไม่ให้ส่งผลต่อการส่งออกโดยรวมในอนาคต

การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมนิยมตรวจหายีนที่ตัดตอเขาไปโดยใชวิธี PCR หรือ Real-time PCR หองปฏิบัติการหลายแห่งใช้วิธีนี้เปนมาตรฐานในการใหบริการตรวจวิเคราะห์พืชและสินคาดัดแปรพันธุกรรม (Broeders *et al*., 2014) อย่างไรก็ตามวิธี PCR ไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์กรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากเนื่องจากใช้เวลานาน ขณะเดียวกันวิธี Real-time PCR ก็มีความซับซ้อน จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและผู้มีประสบการณ์ในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นวิธีดังกล่าวจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อระบุการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนนั้นจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ให้มีความง่าย วิเคราะห์ผลได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม มีหน้าที่ในการวิจัยพัฒนาระบบการตรวจสอบเพื่อให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติกักพืช จึงต้องหาแนวทางการแก้ไขให้สอดคล้องกับปัญหาดังกล่าว โดยการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและเหมาะสมกับการวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก เพื่อช่วยให้การตรวจการปนเปื้อนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นการควบคุมและป้องกันไม่ให้เกิดการหลุดลอดเข้าสู่แหล่งปลูกภายในประเทศ

การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ชุดตรวจสอบ (Test kit) เป็นวิธีการตรวจที่ง่าย ใช้ระยะเวลารวดเร็ว ผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องใช้ความรู้ความชำนาญทางด้านเทคนิคชีวโมเลกุล ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการตรวจติดตามได้ แต่ราคาของชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมทางการค้านั้นมีราคาสูงเช่น ชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมของบริษัท Agdia (RoundUp Ready® ELISA Kit, 288 test wells) ราคาประมาณ 33,000 บาทต่อกล่อง (1 กล่องมี 4 ชุด) ซึ่งการพัฒนาชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมใช้ภายในประเทศ เป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบ ลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างนำเข้าโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการเกษตรใช้ตรวจติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายในแปลง นอกจากนี้เกษตรกรสามารถใช้ตรวจคัดกรองเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกลงแปลงได้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์จึงต้องดำเนินการศึกษา เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมหรือการพัฒนาเป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ และเพื่อให้การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมมีประสิทธิภาพสำหรับการกำกับดูแลสินค้าเกษตรของไทย

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. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีน
8. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR
9. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA
10. ตัวอย่างใบและเมล็ดถั่วเหลือง
11. ไพร์เมอร์และโพรบ (Sigma-Proligo, Singapore)

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณ การทำบริสุทธิ์ การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน CP4EPSPS

การทดลองนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยเรื่อง การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ (ขนิษฐาและคณะ, 2558) โดยโปรตีน CP4EPSPS ได้จากการโคลนยีน *CP4EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เชื่อมต่อกับพลาสมิด Expression vector pET200 TOPO และถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* BL21 ที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเริ่มจากเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (Starter) จากนั้นชักนำให้เซลล์ตั้งต้นเกิดการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายโดยการเติม IPTG (1 M IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM และเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะเช่นเดิมนาน 5 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่มีการชักนำให้ผลิตโปรตีน CP4EPSPS มาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตะกอนเซลล์ 1 กรัม มาละลายด้วย 1X Phosphate

buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Lysozyme แล้วบ่มที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาผ่านเครื่อง Ultra schall Bandelin Sonoplus HD รุ่น 2200 เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกจนได้สารละลายใส นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเก็บส่วนใส (Supernatant) ไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Column NI-NTA super flow (Qiagen)

การทำบริสุทธิ์โปรตีน CP4EPSPS ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA Super flow เริ่มจากการบรรจุคอลัมน์ด้วย Ni-NTA ปริมาตร 6 มิลลิลิตร รอให้ Ni-NTA จัดเรียงตัว ประมาณ 20 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Buffer B ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตร Ni-NTA Resin จากนั้นนำ Supernatant ทั้งหมดมาผ่าน คอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ (Flow through) ล้างคอลัมน์ด้วย Washing buffer C (pH 6.3) ที่เติม Triton X 100 ให้มีความเข้มข้น 1% ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ในหลอดเรียกว่า Wash I และชะคอลัมน์ (Elute) ด้วย Elution buffer D (pH 5.9) ที่เติม Triton X 100 ให้มีความเข้มข้น 1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรแล้วทำการชะ (Elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย Elution buffer pH 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาจำนวน 10 ส่วน (Fraction) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรส่วนละ 1 มิลลิลิตร แต่ละส่วนเติม Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เพื่อปรับสภาพให้โปรตีนอยู่ในสภาวะ pH ที่เป็นกลาง ตรวจสอบปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธีการ Dialysis ในสารละลาย 1XPBS pH 7.4 ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ผ่านการทำบริสุทธิ์อีกครั้งโดยชุดตรวจสอบปริมาณโปรตีน 2-D Quant kit

การตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดย 2-D Quant kit เริ่มจากเตรียม BSA ตั้งต้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดใส่หลอดปริมาณ 0, 5, 10, 15, 20, 25 ไมโครลิตร เติม Precipitant หลอดละ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติม 500 ไมโครลิตรของ Co-precipitant ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสให้คงเหลือไว้แต่ตะกอน จากนั้นเติม Copper solution เพื่อละลายตะกอนปริมาณ 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 400 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน แล้วเติม 1 มิลลิลิตรของ Working color reagent ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลาย BSA มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครกรัม ทำจำนวน 4 ซ้ำ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที อ่านผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงที่เหมาะสมด้วย Least square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน EPSPS แทนค่าในสมการเส้นตรงเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีน CP4EPSPS

2. การศึกษาชนิดเอนไซม์ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ

ใช้เอนไซม์ 2 ชนิดคือ Alkaline phosphatase (ALP) และ Horseradish peroxidase (HRP) ต่อประสิทธิภาพการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้โปรตีน CP4EPSPS ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 ไมโครกรัม (ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร) ที่เจือจาง 1:200 เคลือบหลุมไมโครเพลท แล้วบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Goat anti-Rabbit IgG-

alkaline phosphatase และ Goat anti-Rabbit IgG-horseradish peroxidase ในอัตราส่วน 1:5,000 และบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับการตรวจสอบผลของเอนไซม์ Alkaline phosphatase อ่านผลการตรวจสอบที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร ที่ระยะเวลา 30 นาทีหลังจากเติมด้วยสับสเตรท p-Nitrophenyl phosphate (PNPP) สำหรับการตรวจสอบผลของเอนไซม์ Horseradish peroxidase อ่านผลการตรวจสอบที่ค่าการดูดกลืนแสง 650 นาโนเมตรที่ระยะเวลา 30 นาทีหลังจากเติมด้วยสับสเตรท 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) ซึ่งการเปรียบเทียบชนิดเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพของการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆนั้นคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและชัดเจน สามารถอ่านผลการตรวจสอบด้วยสายตาได้ เพื่อที่จะประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้า

การศึกษาประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ใช้ IgG-CP4EPSPS ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) และ Horseradish peroxidase (HRP) เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้าด้วยเทคนิค Direct ELISA โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 5 ตัวอย่าง เริ่มจากปรับความเข้มข้นของ IgG ให้ได้ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ IgG ไปผ่านกระบวนการ Desalting โดยใช้สารละลาย 100 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0 ซึ่ง IgG ที่ผ่านกระบวนการ Desalting แล้วนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG สำหรับการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ด้วย ALP (Abcam, England) (IgG-CP4EPSPS-ALP) เริ่มจากเติมสารละลาย Modifier 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง IgG-CP4EPSPS 10 ไมโครลิตร ผสมขึ้นลง จากนั้นดูดสารละลาย IgG-CP4EPSPS ที่ผสมกับ Modifier เติมใน Lyophilized material ที่อยู่ในหลอดสีชา บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 นาที แล้วเติมสารละลาย Quencher 1 ไมโครลิตร ต่อ IgG-CP4EPSPS ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นเก็บ IgG-CP4EPSPS-ALP ในหลอดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ด้วย HRP (IgG-CP4EPSPS-HRP) ใช้ชุด EZ-Link ™ Plus Activated Peroxidase (Thermo, USA) เริ่มจากเตรียม IgG-CP4EPSPS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 1XPBS pH 7.4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EZ-Link Plus Activated Peroxidase ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใน IgG-CP4EPSPS ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม 10 ไมโครลิตรของสารละลาย Sodium Cyanoborohydride (ปฏิบัติในตู้ Fume hood) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Quenching buffer 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 15 นาที เก็บ IgG-CP4EPSPS-HRP ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS นั้นนำ IgG-CP4EPSPS-ALP และ IgG-CP4EPSPS-HRP เจือจาง 1:100 แล้วตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS โดยสกัดตัวอย่างใช้เมล็ดถั่วเหลืองต่อ Extraction buffer อัตราส่วน 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบผลการตรวจสอบด้วย IgG-CP4EPSPS ทางการค้าและตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อศึกษาความถูกต้องในการทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ต่อการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

4. การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

การศึกษาชนิดสารละลายบัฟเฟอร์และอัตราส่วนตัวอย่างสำหรับใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลือง ใช้เมล็ดถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองดังกล่าวมาบดให้เป็นผงละเอียดและชั่งน้ำหนัก 1 และ 0.1 กรัม ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ 1XPBS และ Extraction buffer (0.01M Tris HCL, 0.08M EDTA pH 8.0, 0.01M NaCL, 1%SDS, 0.02M Guanidine HCL) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมตัวอย่างผงเมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดกับสารละลายบัฟเฟอร์ นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาแตกต่างกันคือ 0, 15, 30, 45, 60, 120 นาที ทดสอบผลโดยการนำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นตกตะกอน 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสไปตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยเทคนิค Direct ELISA

5. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจากผู้ประกอบการที่ส่งตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปเปรียบเทียบผลการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี PCR และ Real-time PCR หาค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (Accuracy) ดังนี้ (มาศวลัยและคณะ, 2556)

- ค่าความไว (Sensitivity) = [ผลบวกจริง/(ผลบวกจริง + ผลลบปลอม)] × 100
- ค่าความจำเพาะ (Specificity) = [ผลลบจริง/(ผลลบจริง + ผลบวกปลอม)] × 100
- ค่าความถูกต้องของชุดทดสอบ (Accuracy) = จำนวนตัวอย่างชุดทดสอบที่ให้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน × 100/จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด

5.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)

ชั่งตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดจำนวน 5 กรัม เติม Extraction buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5M Guanidine-HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ 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 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

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

นำดีเอ็นเอที่ได้เติม Miniprep DNA purification resin ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร มาเชื่อมกับ Minicolumn และใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอ ที่ผสมกับ 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 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn

5.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดไดดวยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดและผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ มาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง UV Spectrophotometer คำนวณค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี PCR และวิธี Real-time PCR

5.4 การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี PCR

การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ใช้คู่ไพรเมอร์ EPSPS1 และ EPSPS2 โดยมีลำดับนิวคลีไทด์ดังตารางที่ 1 (Bonfini *et al*., 2007) ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบดวยสวนผสมตอ 1 หลอดดังแสดงในตารางที่ 2 นำสวนผสมทั้งหมดผสมตามสัดสวนลงในหลอด PCR เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เปนบวก คือ ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (Positive control) ตัวควบคุมที่เปนลบ คือ ดีเอ็นเอของมะละกอ (Negative control) และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆาเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ (Non template control) หลังจากนั้นนำหลอด PCR เขาเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีรอบการทำ PCR ดังตารางที่ 3 แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสอบยีน *CP4EPSPS*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีไทด์ (5’⟶ 3’)

EPSPS1	GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC
EPSPS2	CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC
EPSPS-P	FAM-TTC ATG TTC GGC GGT CTC GCG-TAMRA

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ EPSPS1 และ EPSPS2

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
5X Green GoTaq Flexi Reaction Buffer	5
25 mM $MgCl_2$	1.5
10 mM dNTP Mix	0.5
50 pmol EPSPS1 Forward primer	0.5
50 pmol EPSPS2 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 3 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ EPSPS1 และ EPSPS2

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	94	5	
2. Denaturation	94	0.30	40
Annealing	58	0.30	
Extension	72	1	
3. Final extension	72	5	

5.5 การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ไพร์เมอร์และโพรบดังตารางที่ 1 (Bonfini *et al*., 2007) โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 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		2.5	ไมโครลิตร
	ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

สารเคมีข้างต้นจะถูกเตรียมแล้วหยอดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท 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 45 รอบ จากนั้นจึงต่อด้วย Cooling step ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิของการทำงานเครื่องและปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Bonfini *et al*., 2007)

6. การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาขึ้นเป็นการพัฒนาจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ ชนิดเอนไซม์ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้า อัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS และข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของของชุดตรวจสอบ ELISA ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนั้นนำมาจัดทำเป็นคู่มือการใช้งาน (Protocol) เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่มีความง่ายต่อการใช้งานและรวดเร็ว

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจากตลาดและห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างใบถั่วเหลืองสุ่มจากแปลงปลูกของเกษตรกร จากนั้นตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาได้เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR และวิธี Real-time PCR โดยหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (มาศวลัยและคณะ, 2556)

8. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

นำชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ไปถ่ายทอดองค์ความรู้กับนักวิชาการของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก และประเมินผลการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เวลาและสถานที่

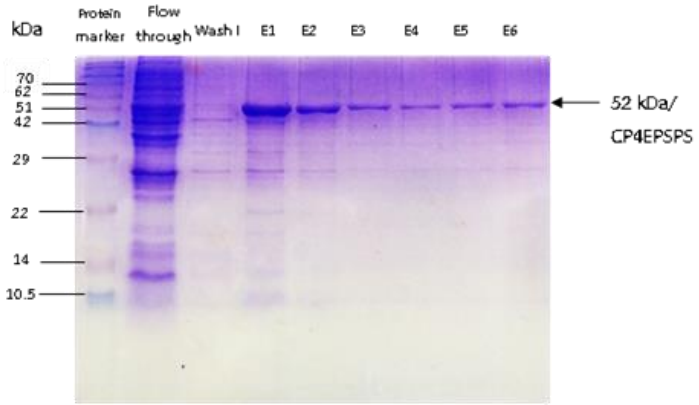
ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2560

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

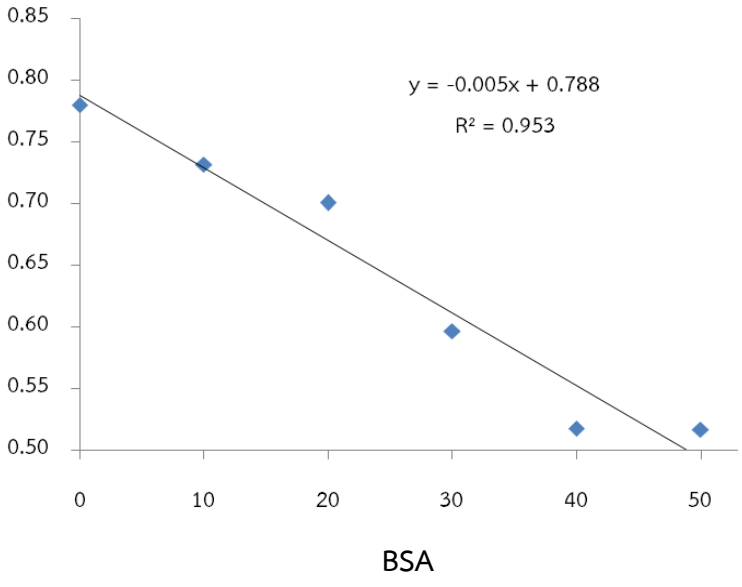
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเพิ่มปริมาณ การทำบริสุทธิ์ การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน CP4EPSPS

การทำบริสุทธิ์โปรตีน CP4EPSPS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในระบบเซลล์แบคทีเรีย แล้วตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีน CP4EPSPS มีขนาด 52 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 1) เมื่อตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน โดยเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครกรัม แล้วอ่านผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เมื่อนำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรมาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงพบว่า ได้สมการเส้นตรง y= -0.0059x + 0.788 (ภาพที่ 2) โดยโปรตีน CP4EPSPS มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7428 เมื่อนำมาคำนวณปริมาณความเข้มข้นโดยการแทนค่าในสมการจะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 10.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



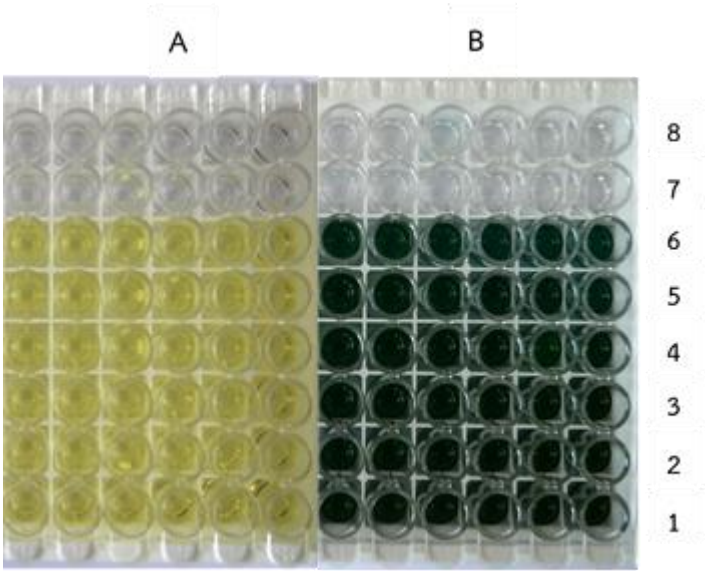
ภาพที่ 1 แสดงแถบโปรตีนขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมซึ่งพบในส่วน Flow through, Wash I และ E1-E6 ตามลำดับ โดยทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE



ภาพที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS โดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน (BSA) 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครกรัม

2. การศึกษาชนิดเอนไซม์ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ

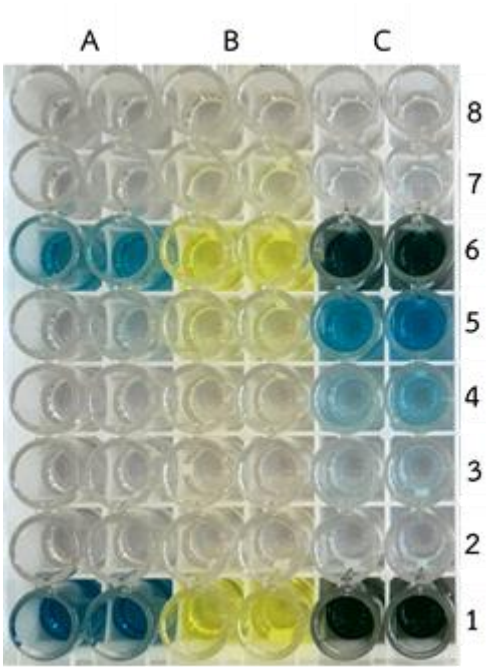
การศึกษาชนิดเอนไซม์ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ ใช้เอนไซม์ 2 ชนิดคือ ALP และ HRP และใช้โปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 ไมโครกรัม ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรพบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นและสามารถตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ได้ในระดับต่ำสุดคือ 1 ไมโครกรัม นอกจากนี้การตรวจสอบที่ได้ไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลบวกปลอม (Fault Positive) กับตัวอย่าง Extraction buffer, Negative control และไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลลบปลอม (Fault Negative) กับตัวอย่าง Positive control (ภาพที่ 3) สำหรับการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปนั้นนอกจากจะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแล้ว ยังต้องให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนสามารถอ่านผลการตรวจสอบด้วยสายตาได้ เพื่อที่จะประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ HRP ให้สีจากการทำปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ ALP ซึ่งสะดวกแก่ผู้นำชุดตรวจสอบ ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบหาโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากสามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ด้วยสายตาภายในระยะเวลา 30 นาที ซึ่งสะดวกแก่ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 3 แสดงประสิทธิภาพการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ต่อเอนไซม์ Alkaline phosphatase (A) และ Horseradish peroxidase (B) ที่ความเข้มข้นโปรตีนระดับต่างๆ โดยแถวที่ 1 Positive control, แถวที่ 2 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 1 ไมโครกรัม, แถวที่ 3 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 2 ไมโครกรัม, แถวที่ 4 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 3 ไมโครกรัม, แถวที่ 5 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 4 ไมโครกรัม, แถวที่ 6 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 5 ไมโครกรัม, แถวที่ 7 Negative control และแถวที่ 8 Extraction buffer

3. การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้า

การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ด้วยเอนไซม์ ALP และ HRP ต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้าด้วยเทคนิค Direct ELISA โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่า IgG-CP4EPSPS-ALP และ IgG-CP4EPSPS-HRP ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อโปรตีน CP4EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองและสามารถตรวจพบตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 3 ตัวอย่างจากถั่วเหลืองทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ในขณะที่ IgG-CP4EPSPS ทางการค้าตรวจพบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม 1 ตัวอย่างจากถั่วเหลืองทั้งหมด 5 ตัวอย่าง และผลการตรวจสอบที่ได้ไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลบวกปลอม (Fault Positive) กับตัวอย่าง Extraction buffer, Negative control และไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลลบปลอม (Fault Negative) กับตัวอย่าง Positive control (ภาพที่ 4) เมื่อศึกษาความถูกต้องในการทดสอบประสิทธิภาพและความใช้ได้ของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ต่อการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS โดยเปรียบเทียบผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่า การตรวจสอบด้วยวิธี PCR ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไปในทิศทางเดียวกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยวิธี PCR สามารถตรวจพบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งประสิทธิภาพในการตรวจสอบคิดเป็นความถูกต้องร้อยละ 87.5 ซึ่งผลการพัฒนาการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยเทคนิค ELISA แสดงให้เห็นว่า IgG-CP4EPSPS-ALP และ IgG-CP4EPSPS-HRP ที่ใช้ในการศึกษามีประสิทธิภาพในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม ดังนั้นจึงคัดเลือก IgG-CP4EPSPS-HRP ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์เนื่องจากการทดสอบด้วยสายตาในผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่า IgG-CP4EPSPS-ALP



ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ระหว่าง IgG-CP4EPSPS ทางการค้า (A), IgG-CP4EPSPS-ALP (B) และ IgG-CP4EPSPS-HRP (C) ต่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลือง 5 ตัวอย่าง (แถวที่ 1-5), แถวที่ 6 Positive control, แถวที่ 7 Negative control และแถวที่ 8 Extraction buffer

4. การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลือง โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองมาบดให้เป็นผงและชั่งน้ำหนัก 1 และ 0.1 กรัม ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ 1XPBS และ Extraction buffer พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิดและอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อการตรวจสอบหาโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม โดยการใช้เมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะเวลาต่างๆ ชัดเจนกว่าการใช้ตัวอย่างปริมาณ 0.1 กรัมทั้งสารละลายบัฟเฟอร์ 1XPBS และ Extraction buffer เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า การใช้ Extraction buffer ในการสกัดโปรตีน CP4EPSPS ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะเวลาต่างๆ ชัดเจนกว่าการใช้สารละลาย 1XPBS โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรของอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัมต่อ Extraction buffer และสารละลาย 1XPBS ที่ระยะเวลา 0-120 นาที มีค่าอยู่ในช่วง 0.309-0.425 และ 0.228-0.407 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สำหรับการอ่านผลการตรวจสอบด้วยสายตาพบว่าหลังจากเติมสับสเตรท TMB แล้วสามารถอ่านและวิเคราะห์ผลได้ด้วยสายตาที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาภายในระยะเวลา 30 นาที

ตารางที่ 4 การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ

อัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดบัฟเฟอร์	ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$) ที่ระยะเวลาต่างๆ (นาที)					
	0	15	30	45	60	120
Control 1XPBS	0.094	0.093	0.097	0.108	0.112	0.107

Negative 1XPBS	0.112	0.104	0.104	0.104	0.107	0.113
Positive 1XPBS	0.665	0.726	0.696	0.667	0.681	0.765
1 g : 1XPBS 10 ml	0.228	0.220	0.293	0.410	0.344	0.407
0.1 g : 1XPBS 10 ml	0.167	0.166	0.153	0.181	0.198	0.199
Control Extraction buffer	0.099	0.101	0.101	0.102	0.105	0.114
Negative Extraction buffer	0.108	0.103	0.114	0.118	0.112	0.112
Positive Extraction buffer	0.833	0.911	0.908	0.946	1.060	1.076
1 g : Extraction buffer 10 ml	0.309	0.335	0.395	0.416	0.381	0.425
0.1 g : Extraction buffer 10 ml	0.305	0.316	0.337	0.326	0.331	0.364

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี PCR และ วิธี Real-time PCR กับถั่วเหลือง 20 ตัวอย่าง พบว่า ถั่วเหลือง 9 ตัวอย่างให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันทั้ง 3 วิธี 12 ตัวอย่างตรวจพบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี Real-time PCR ถั่วเหลืองจำนวน 14 ตัวอย่างให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นบวกเมื่อตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ ELISA โดยอ่านผลด้วยค่าการดูดกลืนแสง (กำหนดค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของ Negative control ให้ผลการทดสอบเป็นบวก) และวิเคราะห์ด้วยสายตา ตามลำดับ (ตารางที่ 5) นอกจากนี้พบว่าถั่วเหลือง 14 ตัวอย่างให้ผลการตรวจที่เหมือนกันระหว่างการตรวจสอบด้วย ELISA (วิเคราะห์ด้วยสายตา) และวิธี Real-time PCR โดยคิดเป็นค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 83 ค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 50 และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (Accuracy) ร้อยละ 70

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA เปรียบเทียบกับวิธี PCR และ Real-time PCR สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
				ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
	Negative	-	-	0.084	-
	Positive	+	+	0.509	+
1	2779	-	+	0.138	-
2	2780	-	+	0.275	+
3	2858	-	+	0.453	+
4	3359	-	+	0.254	+
5	3360	-	+	0.282	+
6	5629	+	+	0.245	+
7	5630	-	-	0.351	+
8	5631	-	-	0.100	-
9	5643	+	+	0.249	+
10	5644	-	-	0.356	+
11	5659	-	-	0.085	-
12	5660	-	-	0.056	-
13	5667	-	-	0.251	+
14	5669	+	+	0.165	-
15	5670	+	+	0.275	+
16	5718	-	-	0.148	-
17	5719	-	+	0.268	+
18	5792	-	-	0.268	+
19	5793	+	+	0.281	+
20	5794	+	+	0.233	+

หมายเหตุ + ตรวจพบโปรตีน CP4EPSPS, - ตรวจไม่พบโปรตีน CP4EPSPS

6. การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ 1 ชุดประกอบด้วย (ภาพที่ 5)

1. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (ตรวจได้ 48 ตัวอย่าง, ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)
2. สารละลาย Extraction buffer 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
3. สารละลาย Extraction buffer 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. Positive control ปริมาตร 420 ไมโครลิตร

5. Antibody (IgG-CP4EPSPS-HRP) ปริมาตร 220 ไมโครลิตร

6. สารละลาย Substrate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

7. Nonfat dried milk ปริมาตร 0.5 กรัม

8. 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

9. สารละลาย Stop solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10. Tween-20 1 หลอด

<u>สารละลายที่ต้องเตรียมเบื้องต้น</u>

1. เตรียม Washing solution

เจือจาง 10X PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1X PBS จากนั้นเติม Tween-20 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 100 ไมโครลิตรของ Washing solution ผสมให้เข้ากัน

2. เตรียม Blocking solution

เติม Nonfat dried milk 0.5 กรัมในสารละลาย 1x PBS ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เตรียม Antibody (IgG-CP4EPSPS-HRP)

เจือจาง Antibody ในสารละลาย Blocking solution โดยใช้อัตราส่วน 1:200

<u>ขั้นตอนการตรวจสอบ</u> (ภาพที่ 6)

1. เตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยบดตัวอย่างถั่วเหลือง (ใบหรือเมล็ด) ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย Extraction buffer 1 และ สารละลาย Extraction buffer 2 คือ 1:9:1 โดยบดตัวอย่างกับสารละลาย Extraction buffer 1 จากนั้นเติมสารละลาย Extraction buffer 2 สำหรับตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองให้เขย่าสารละลายที่ได้เพิ่มอีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

2. เติมตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในไมโครเพลทปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้ตัวอย่าง Positive control และ Negative control ปริมาณ 200 ไมโครลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท

3. เทตัวอย่างที่อยู่ในไมโครเพลททิ้ง จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมสารละลาย Blocking solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

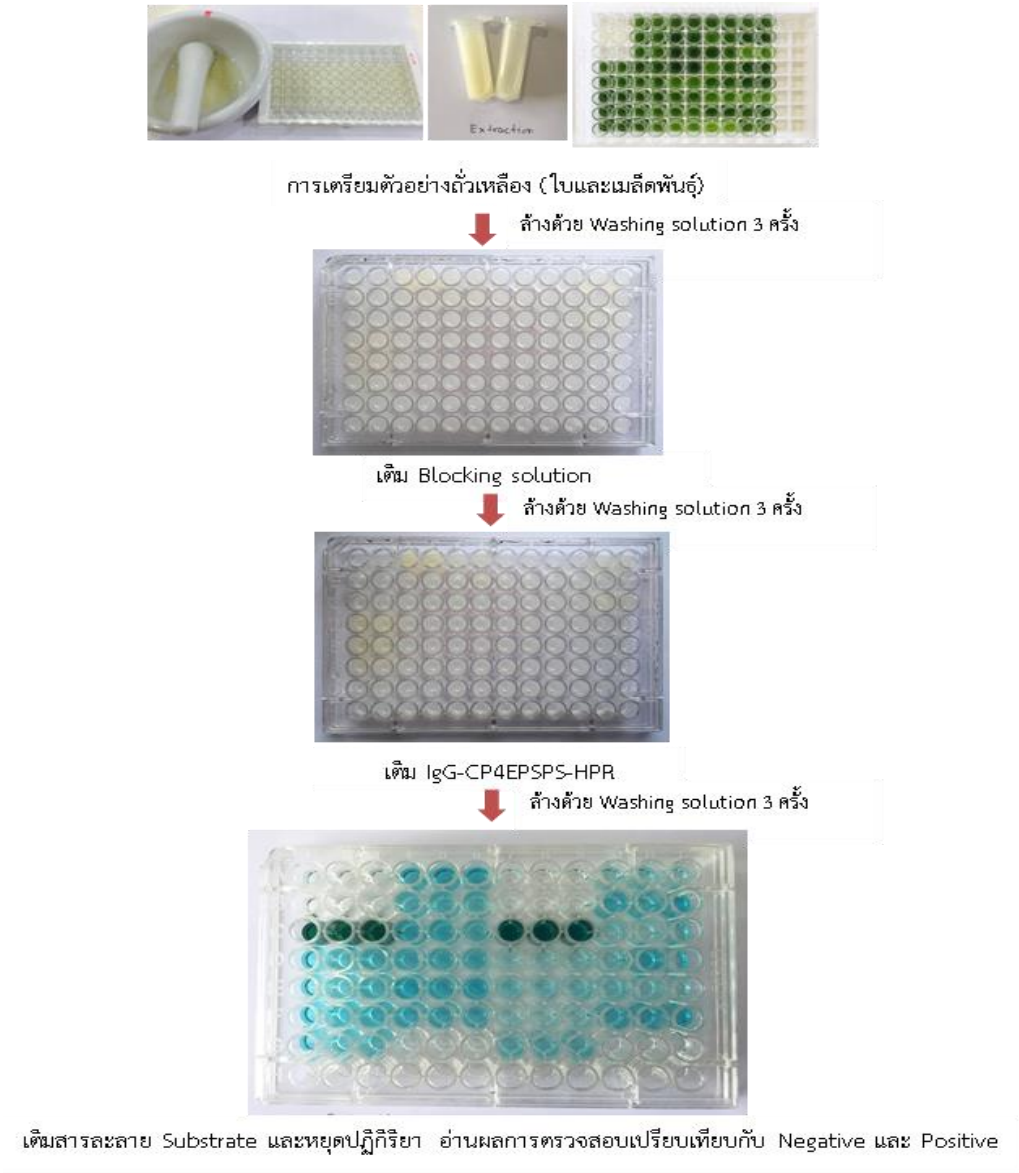
5. ตรวจสอบโปรตีนโดยเติม Antibody ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 60 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6. เติมสารละลาย Substrate ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

<u>การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบ</u>

วิเคราะห์ผลการตรวจสอบโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (กำหนดค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของ Negative control ให้ผลการทดสอบเป็นบวก) หรือสามารถวิเคราะห์ผลการตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นระหว่าง Negative control, Positive control, และตัวอย่างทดสอบ ถ้าตัวอย่างที่ตรวจสอบให้ผลเป็นสีฟ้าเช่นเดียวกับ Positive control ผลการทดสอบคือบวก (เป็นตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม) และถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้ผลไม่มีสีเช่นเดียวกับ Negative control ผลการทดสอบคือลบ (ไม่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม) โดยการตรวจสอบตามวิธีการดังกล่าวใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง

ภาพที่ 5 ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม



ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมกับวิธี PCR และ วิธี Real-time PCR ใช้ตัวอย่าง 143 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 31 ตัวอย่าง (รหัสตัวอย่าง 2780-6274) ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากตลาด 43 ตัวอย่าง (Survey 1-5 และ Survey 1/1–5/37) และตัวอย่างใบถั่วเหลืองจากแปลงปลูกของเกษตรกร อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย 59 ตัวอย่าง (V3125-V3194) พบว่า ถั่วเหลือง 121 ตัวอย่างให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันทั้ง 3 วิธี 19 ตัวอย่างตรวจพบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี Real-time PCR ถั่วเหลืองจำนวน

23 และ 22 ตัวอย่างให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นบวกเมื่อตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ โดยอ่านผลด้วยค่าการดูดกลืนแสง (กำหนดค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของ Negative control ให้ผลการทดสอบเป็นบวก) และวิเคราะห์ด้วยสายตา ตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้พบว่าถั่วเหลือง 130 ตัวอย่างให้ผลการตรวจที่เหมือนกันระหว่างการตรวจสอบด้วย ELISA (วิเคราะห์ด้วยสายตา) และวิธี Real-time PCR โดยคิดเป็นค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 74 ค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 94 และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (Accuracy) ร้อยละ 90

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA เปรียบเทียบกับวิธี PCR และวิธี Real-time PCR สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
1	2780	√		-	+	0.275	+
2	2858	√		-	+	0.453	+
3	3359	√		-	+	0.254	+
4	3360	√		-	+	0.282	+
5	5629	√		+	+	0.245	+
6	5630	√		-	-	0.351	+
7	5631	√		-	-	0.100	-
8	5643	√		+	+	0.249	+
9	5644	√		-	-	0.356	+
10	5659	√		-	-	0.085	-
11	5660	√		-	-	0.056	-
12	5667	√		-	-	0.251	+
13	5670	√		+	+	0.275	+
14	5718	√		-	-	0.148	-
15	5719	√		-	+	0.268	+
16	5792	√		-	-	0.268	+
17	5793	√		+	+	0.281	+
18	5794	√		+	+	0.233	+
19	5806	√		-	-	0.164	+
20	6017	√		+	-	0.145	-
21	6018	√		+	-	0.113	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
22	6026	√		-	-	0.250	-
23	6128	√		-	-	0.201	+
24	6129	√		-	-	0.319	+
25	6130	√		-	-	0.319	+
26	6138	√		+	+	0.098	-
27	6139	√		+	+	0.105	-
28	6140	√		-	-	0.119	-
29	6141	√		+	+	0.110	-
30	6165	√		+	+	0.236	+
31	6274	√		+	+	0.149	-
32	Survey1	√		+	+	0.295	+
33	Survey 2	√		+	+	0.243	+
34	Survey 3	√		-	-	0.118	-
35	Survey 4	√		+	+	0.103	-
36	Survey 5	√		+	+	0.301	+
37	V3125		√	-	-	0.114	-
38	V3126		√	-	-	0.108	-
39	V3127		√	-	-	0.126	-
40	V3128		√	-	-	0.110	-
41	V3129		√	-	-	0.118	-
42	V3130		√	-	-	0.108	-
43	V3131		√	-	-	0.106	-
44	V3132		√	-	-	0.111	-
45	V3133		√	-	-	0.120	-
46	V3134		√	-	-	0.120	-
47	V3135		√	-	-	0.110	-
48	V3136		√	-	-	0.080	-
49	V3137		√	-	-	0.102	-
50	V3138		√	-	-	0.104	-
51	V3139		√	-	-	0.108	-
52	V3140		√	-	-	0.112	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
53	V3141		√	-	-	0.128	-
54	V3142		√	-	-	0.116	-
55	V3143		√	-	-	0.106	-
56	V3144		√	-	-	0.094	-
57	V3145		√	-	-	0.085	-
58	V3146		√	-	-	0.092	-
59	V3147		√	-	-	0.114	-
60	V3148		√	-	-	0.112	-
61	V3149		√	-	-	0.126	-
62	V3150		√	-	-	0.114	-
63	V3151		√	-	-	0.108	-
64	V3152		√	-	-	0.102	-
65	V3153		√	-	-	0.106	-
66	V3154		√	-	-	0.102	-
67	V3155		√	-	-	0.108	-
68	V3156		√	-	-	0.105	-
69	V3157		√	-	-	0.112	-
70	V3158		√	-	-	0.104	-
71	V3159		√	-	-	0.114	-
72	V3160		√	-	-	0.112	-
73	V3161		√	-	-	0.103	-
74	V3162		√	-	-	0.100	-
75	V3163		√	-	-	0.108	-
76	V3164		√	-	-	0.114	-
77	V3165		√	-	-	0.122	-
78	V3166		√	-	-	0.098	-
79	V3167		√	-	-	0.104	-
80	V3168		√	-	-	0.128	-
81	V3169		√	-	-	0.105	-
82	V3170		√	-	-	0.105	-
83	V3171		√	-	-	0.118	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
84	V3172		√	-	-	0.085	-
85	V3173		√	-	-	0.110	-
86	V3174		√	-	-	0.112	-
87	V3175		√	-	-	0.118	-
88	V3176		√	-	-	0.101	-
89	V3177		√	-	-	0.091	-
90	V3178		√	-	-	0.098	-
91	V3179		√	-	-	0.104	-
92	V3180		√	-	-	0.084	-
93	V3181		√	-	-	0.104	-
94	V3182		√	-	-	0.121	-
95	V3183		√	-	-	0.110	-
96	V3184		√	-	-	0.105	-
97	V3185		√	-	-	0.104	-
98	V3186		√	-	-	0121	-
99	V3187		√	-	-	0.103	-
100	V3188		√	-	-	0.091	-
101	V3189		√	-	-	0.108	-
102	V3190		√	-	-	0.118	-
103	V3192		√	-	-	0.105	-
104	V3193		√	-	-	0.105	-
105	V3194		√	-	-	0.088	-
106	Survey 1-1		√	-	-	0.084	-
107	Survey 1-2		√	-	-	0.086	-
108	Survey 1-3		√	-	-	0.094	-
109	Survey 1-4		√	-	-	0.108	-
110	Survey 1-5		√	-	-	0.118	-
111	Survey 1-6		√	-	-	0.098	-
112	Survey 1-7		√	-	-	0.085	-
113	Survey 1-8		√	-	-	0.083	-
114	Survey 4-7		√	-	-	0.110	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{650}$)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
115	Survey 4-8		√	-	-	0.102	-
116	Survey 4-9		√	-	-	0.093	-
117	Survey 4-10		√	-	-	0.116	-
118	Survey 4-11		√	-	-	0.094	-
119	Survey 4-12		√	-	-	0.114	-
120	Survey 4-13		√	-	-	0.128	-
121	Survey 4-14		√	-	-	0.112	-
122	Survey 4-15		√	-	-	0.105	-
123	Survey 4-16		√	-	-	0.094	-
124	Survey 4-17		√	-	-	0.110	-
125	Survey 4-18		√	-	-	0.108	-
126	Survey 4-19		√	-	-	0.102	-
127	Survey 5-20		√	-	-	0.110	-
128	Survey 5-21		√	-	-	0.123	-
129	Survey 5-22		√	-	-	0.111	-
130	Survey 5-23		√	-	-	0.120	-
131	Survey 5-24		√	-	-	0.090	-
132	Survey 5-26		√	-	-	0.088	-
133	Survey 5-27		√	-	-	0.094	-
134	Survey 5-28		√	-	-	0.110	-
135	Survey 5-29		√	-	-	0.115	-
136	Survey 5-30		√	-	-	0.122	-
137	Survey 5-31		√	-	-	0.097	-
138	Survey 5-32		√	-	-	0.098	-
139	Survey 5-33		√	-	-	0.099	-
140	Survey 5-34		√	-	-	0.099	-
141	Survey 5-35		√	-	-	0.095	-
142	Survey 5-36		√	-	-	0.097	-
143	Survey 5-37		√	-	-	0.096	-

หมายเหตุ + ตรวจพบโปรตีน CP4EPSPS, - ตรวจไม่พบโปรตีน CP4EPSPS

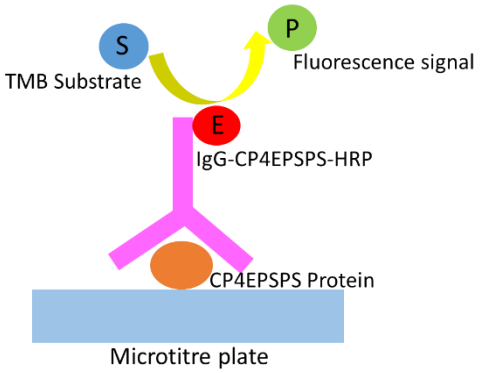
8. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

จากการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับนักวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก (ภาพที่ 7) พบว่า นักวิชาการเกษตรให้ความสนใจในการนำชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมไปใช้ เนื่องจากศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกรับผิดชอบงานด้านการตรวจเมล็ดพันธุ์พืชโดยตรง และมีบริษัทเอกชนติดต่อเข้ามาให้ตรวจสอบการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมเนื่องจากมีความสะดวกมากกว่าที่จะส่งมาตรวจที่กรุงเทพฯ แต่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกก็ไม่มีอุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้ ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ยังมีราคาถูกกว่าชุดตรวจสอบทางการค้า และการใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่น้อยกว่า

ภาพที่ 7 การถ่ายทอดองค์ความรู้กับนักวิชาการเกษตรของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก

การใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาได้ เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการตรวจสอบกับการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ ด้วยวิธี ELISA ที่มีรายงานการศึกษา (Kamle *et al*., 2011) พบว่า ใช้ระยะเวลาการตรวจสอบที่รวดเร็วกว่า เนื่องจาก ELISA ที่พัฒนาขึ้นเป็นแบบ Plate-trapped antigen direct ELISA (PTA-direct ELISA) โดยแอนติเจนที่ตองการตรวจสอบจะถูกเคลือบหลุมไมโครเพลท

ภายหลังจากเติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนซึ่งถูกติดฉลากไวด้วยเอนไซมแลว สามารถตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรท (ภาพที่ 8) ในขณะที่การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ ใช้ Triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) โดยใชแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน 2 ชนิดในการทำปฏิกิริยา โดยใชแอนติบอดีตัวแรกในการเคลือบหลุมไมโครเพลทเพื่อทำหนาที่จับกับแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่มีจำเพาะกับแอนติเจนและแอนติบอดีตัวที่สามซึ่งถูกติดฉลากไวด้วยเอนไซมและมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่สอง แล้วตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรท ซึ่ง TAS-ELISA ดังกล่าวมีขั้นตอนที่มากกว่าและใช้เวลาที่นานกว่า อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ได้ยังต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติมเช่น ศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของโปรตีนที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD) และทดสอบการตรวจสอบเชิงปริมาณต่อไป



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ที่พัฒนาได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่พัฒนาได้ใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับวิธี Real-time PCR พบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์มีค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบร้อยละ 90

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ได้จากการทดลองนี้ ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ระยะเวลาที่เร็วขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างซึ่งเหมาะสมกับการวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้การใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบ

เชิงพาณิชย์ผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องใช้ความรู้ความชำนาญทางด้านเทคนิคชีวโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างนำเข้าโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการเกษตรใช้ตรวจติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายในแปลง นอกจากนี้เกษตรกรสามารถใช้ตรวจคัดกรองเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกลงแปลงได้

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนันตธร ดนัยสิริชัยชล พงศกร สรรควิทยากุล อรรคพล ภูมีศรี. 2558. การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย. หน้า 20-30. ใน รายงานโครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินคาเกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ พยุงศักดิ์ รวยอารี ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข อัญชลี ศรีสุวรรณ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2549. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป. หน้า 228-298. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2548. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สุรภี กีรติยะอังกูร กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และ อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2553. การโคลนยีน EPSPS และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรียเพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). หน้า 1 - 20. ใน ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2553. กรมวิชาการเกษตร.

มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ วลัยลักษณ์ เมธาภัทร และสุขศรี อึ้งบริบูรณ์ไพศาล. 2556. การพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลเร็ว สำหรับคลอแรมเฟนิคอล ในเภสัชเคมีภัณฑ์. ว. กรมวิทย์ พ. 55: 214-223.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ถั่วเหลือง: ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ารายเดือน ปี 2550-2559. แหล่งที่มา URL http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/import_result.php สืบค้นเมื่อ 13 สิงหาคม 2560

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.

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/3 4616.html.

Kamle, S., Ojha, A. and Kumar, A. 2011. Development of an enzyme linked immunosorbant assay for the detection of Cry2Ab protein in transgenic plants. GM Crops. 2: 118-125.

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.

Wu, H., Zhang, Y., Zhu, C., Xiao, X., Zhou, X., Xu, S., Shen, W. and Huang, M. 2012. Presence of CP4-EPSPS component in roundup ready soybean-derived food products. Int. J. Mol. Sci. 13: 1919-1932.

13. ภาคผนวก

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ 1 ชุดประกอบด้วย

1. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม (ตรวจได้ 48 ตัวอย่าง, ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)
2. สารละลาย Extraction buffer 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
3. สารละลาย Extraction buffer 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. Positive control ปริมาตร 420 ไมโครลิตร
5. Antibody (IgG-CP4EPSPS-HRP) ปริมาตร 220 ไมโครลิตร
6. สารละลาย Substrate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
7. Nonfat dried milk ปริมาตร 0.5 กรัม
8. 10X PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
9. สารละลาย Stop solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
10. Tween-20 1 หลอด

<u>สารละลายที่ต้องเตรียมเบื้องต้น</u>

1. เตรียม Washing solution

เจือจาง 10X PBS ให้ได้ความเข้มข้น 1X PBS จากนั้นเติม Tween-20 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 100 ไมโครลิตรของ Washing solution ผสมให้เข้ากัน

2. เตรียม Blocking solution

เติม Nonfat dried milk 0.5 กรัมในสารละลาย 1x PBS ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เตรียม Antibody (IgG-CP4EPSPS-HRP)

เจือจาง Antibody ในสารละลาย Blocking solution โดยใช้อัตราส่วน 1:200

<u>ขั้นตอนการตรวจสอบ</u>

1. เตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยบดตัวอย่างถั่วเหลือง (ใบหรือเมล็ด) ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย Extraction buffer 1 และ สารละลาย Extraction buffer 2 คือ 1:9:1 โดยบดตัวอย่างกับสารละลาย Extraction buffer 1 จากนั้นเติมสารละลาย Extraction buffer 2 สำหรับตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองให้เขย่าสารละลายที่ได้เพิ่มอีก 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2. เติมตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในไมโครเพลทปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้ตัวอย่าง Positive control และ Negative control ปริมาณ 200 ไมโครลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน ในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท
3. เทตัวอย่างที่อยู่ในไมโครเพลททิ้ง จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติมสารละลาย Blocking solution 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. ตรวจสอบโปรตีนโดยเติม Antibody ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 60 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้องในกล่องความชื้นที่ปิดฝาสนิท จากนั้นล้างด้วย Washing solution (จำนวน 3 ครั้ง) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. เติมสารละลาย Substrate ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย Stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

<u>การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบ</u>

วิเคราะห์ผลการตรวจสอบโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (กำหนดค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของ Negative control ให้ผลการทดสอบเป็นบวก) หรือสามารถวิเคราะห์ผลการตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นระหว่าง Negative control, Positive control, และตัวอย่างทดสอบ ถ้าตัวอย่างที่ตรวจสอบให้ผลเป็นสีฟ้าเช่นเดียวกับ Positive control ผลการทดสอบคือบวก (เป็นตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม) และถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้ผลไม่มีสีเช่นเดียวกับ Negative control ผลการทดสอบคือลบ (ไม่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม)