รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย: การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย: การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร
กิจกรรม

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Research and development on validation of analytical method for Mon 89788, 356043 and 305423 genetically modified soybeans.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง: นายอรรคพล ภูมีศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน: นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 ด้วยวิธี real-time PCR ได้ค่า R^2 ความชัน ของกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน และ PCR efficiency อยู่ในช่วงค่าปกติ ส่วนถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 และ DP356043 พบว่า ค่า R^2 ความชัน และ PCR efficiency อยู่นอกช่วงค่าปกติ ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยมีค่าการเบี่ยงเบนไม่เกินร้อยละ 25 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) ไม่เกินร้อยละ 25 ในส่วนของความทวนซ้ำได้ (repeatability) พบว่า วิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความทวนซ้ำได้ (RSDr) อยู่ในเกณฑ์ปกติคือ ไม่เกินร้อยละ 25 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043 เท่ากับร้อยละ 0.1, 0.5 และ 0.5 ตามลำดับ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) เท่ากับร้อยละ 0.05, 0.5 และ 0.1 ตามลำดับ

Results from validation of analytical method for MON89788 soybean using real-time PCR indicated that R^2 value and slope from a standard curve, as well as PCR efficiency, were within an acceptable range. In contrast, DP305423 and DP356043 validation results showed that R^2 value, slope, including PCR efficiency, were not within an acceptable range. Accuracy and precision of analytical method for MON89788, DP305423 and DP356043 were considered acceptable as %bias and relative standard deviation (RSD) were not greater than 25%. As for repeatability, the measurement results revealed that repeatability relative standard deviation (RSDr) from all three GM soybeans were less than 25%, which was considered acceptable. Limit of quantification (LOQ) obtained from validation results for MON89788, DP305423 and DP356043 were 0.1%, 0.5%, and 0.5%, respectively. In regard to limit of detection (LOD), the results demonstrated that the LOD of analytical method for MON89788, DP305423, and DP356043 were 0.05%, 0.5%, and 0.1%, respectively.

6. คำนำ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่มีบริการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043 เป็นงานประจำ แต่เนื่องจากการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมีจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ และประเทศไทยต้องเปิดการค้าเสรี ทำให้สินค้าเกษตรจากประเทศเพื่อนบ้านและประเทศอื่นๆเข้ามาในประเทศได้ง่าย ส่งผลให้สินค้าเกษตรของไทยมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมโดยเฉพาะถั่วเหลืองที่มีการปลูกเพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการส่งออกสินค้าเกษตร จึงต้องเตรียมการและพัฒนาเทคนิคการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356423 ให้ได้ตามมาตรฐานสากล เพื่อให้ประเทศคู่ค้าเกิดความมั่นใจ ข้อมูลโดยสังเขปของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 1 ดังนี้ (Meyer, J., *et al*., 2006) (Pavely, C., *et al*. 2006) (Rood, A., *et al*., 2006)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่นำมาทดสอบ

ชนิดถั่วเหลือง	บริษัทผู้ผลิต	ยีนที่ตัดต่อเข้าไป	คุณสมบัติ
MON89788	Monsanto	CP4EPSPS	ต้นถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืชจำพวก Glyphosate
DP305423	DuPont Pioneer	FAD2-1	เมล็ดถั่วเหลืองที่มีปริมาณกรดโอเลอิคสูง แต่มีปริมาณกรดไลโนเลอิคต่ำ
DP356043	DuPont Pioneer	gat4601, gm-hra	ต้นถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืชจำพวก Glyphosate และ ALS-inhibiting

โดยปกติ เมื่อต้องพัฒนาวิธีการตรวจยีนชนิดใหม่ ห้องปฏิบัติการฯ จะตรวจวิเคราะห์และจำแนกยีนโดยอ้างอิงวิธีการอ้างอิง (reference method) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรป (the European Network of GMO

Laboratories ENGL) ห้องปฏิบัติการฯ จะอ้างอิงลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบเป็นไพรเมอร์และโพรบ รวมไปถึงอุณหภูมิในวงจรการทำงานของวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ถึงแม้ว่าจะนำวิธีการจากห้องปฏิบัติการอ้างอิงมาใช้ แต่ก็ไม่สามารถทำตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระบุไว้ได้ทั้งหมด เนื่องจากห้องปฏิบัติการฯ มีปัจจัยทางด้านอุปกรณ์ สารเคมี แตกต่างจากห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรป จึงมีความจำเป็นที่ต้องดัดแปลงวิธีการบางขั้นตอนเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรได้ และต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการเพื่อพิจารณาว่า วิธีการดัดแปลง (in-house method) นี้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สามารถใช้ได้กับอุปกรณ์ และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการฯหรือไม่ วิธีการดัดแปลงที่จะใช้ในห้องปฏิบัติการฯมีความแตกต่างจากวิธีการอ้างอิง (Delobel, C., *et al*. 2008) (Mazzara M., et al., 2009) ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการอ้างอิง (Reference method) และวิธีการดัดแปลง (In-house method)

รายการเปรียบเทียบ	ส่วนประกอบ	วิธีการอ้างอิง					วิธีการดัดแปลง
		MON89788	DP305423		DP356043		event-specific และ Lectin ยีน
		event-specific กับ Lectin ยีน	DP305423 event-specitic	Lectin	DP356043 event-specific	Lectin	
ความเข้มข้นของไพรเมอร์/ปฏิกิริยา	Forward primer	150 nM	800 nM	550 nM	750 nM	650 nM	10 uM
	Reverse primer	150 nM	500 nM	550 nM	750 nM	650 nM	10 uM
	Probe	50 nM	220 nM	100 nM	200 nM	180 nM	10 uM
ปริมาณของสาร (uL/ปฏิริยา)	PCR master mix	25.00	12.50	12.50	12.50	12.50	10.00
	Forward primer	0.75	2.00	1.375	1.875	1.625	0.50
	Reverse primer	0.75	1.25	1.375	1.875	1.625	0.50
	Probe	0.50	0.55	1.375	1.875	0.45	0.50
	Nuclease-free water	19.00	3.70	4.50	3.25	3.80	3.50
	ดีเอ็นเอต้นแบบ	4.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบ (ng/uL)		50	ไม่เกิน 100	ไม่เกิน 100	ไม่เกิน 100	ไม่เกิน 100	10
ปริมาณรวมใน 1 ปฏิกิริยา PCR (uL)		50	25	25	25	25	20

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ใช้พารามิเตอร์หลายอย่างในการพิจารณาว่า สามารถใช้วิธีการที่ดัดแปลงในห้องปฏิบัติการได้หรือไม่ พารามิเตอร์เหล่านั้นได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน ความแม่น ความเที่ยง ความเบี่ยงเบน ความทวนซ้ำได้ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยในงานวิจัยมีวิธีการดำเนินการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

7. วิธีดำเนินการ

7.1 วัสดุอุปกรณ์

7.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ใช้สารมาตรฐานที่ได้รับการรับรองแล้ว (Certified reference material: CRM) 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043 ในระดับการปนเปื้อนร้อยละ 10 โดย CRM ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในรูปผงละเอียดซึ่งได้จากการบดเมล็ดถั่วเหลืองให้เป็นเนื้อเดียวกัน

CRM ของ MON89788 จัดซื้อจาก American Oil Chemists' Society (AOCS) (Urbana, IL, USA) ส่วน CRM ของ DP305423 และ DP356043 จัดซื้อจาก Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (Geel, Belgium)

7.1.2 ไพรเมอร์และโพรบ

ใช้ฐานข้อมูล Online วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่จัดทำโดยห้องปฏิบัติการสหภาพยุโรป (Delobel, C., *et al*. 2008) (Mazzara M., et al., 2009) ซึ่งระบุลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์และโพรบไว้ในเอกสารวิธีการตรวจวิเคราะห์ ทั้งไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการสังเคราะห์โดยบริษัท SIGMA ลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบแสดงไว้ในตารางที่ 3 ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ลำดับเบส (5' – 3')	ขนาด (base pair)	วัตถุประสงค์	ความจำเพาะ
Lec for2	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC	20	ตรวจยีน	
GMO3-126 Rev	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC	29	endogenous	ยีนถั่วเหลือง
Lec probe*	CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC	24	(lectin)	
MON89788-F	TCC CGC TCT AGC GCT TCA AT	20	ตรวจยีน MON89788	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน MON89788
MON89788-R	TCG AGC AGG ACC TGC AGA A	19	event-specific	(Transgene-soybean genome junction site)
MON89788-P*	CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT CTG	24		
DP305-f1	CGT GTT CTC TTT TTG GCT AGC	21	ตรวจยีน DP305423	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน DP305423
DP305-r5	GTG ACC AAT GAA TAC ATA ACA CAA ACT A	28	event-specific	(Transgene-soybean genome junction site)
DP305-p*	TGA CAC AAA TGA TTT TCA TAC AAA AGT CGA GA	32		
DP356-f1	GTC GAA TAG GCT AGG TTT ACG AAA AA	26	ตรวจยีน DP356043	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน DP356043
DP356-r1	TTT GAT ATT CTT GGA GTA GAC GAG AGT GT	29	event-specific	(Transgene-soybean genome junction site)
Dp356-p*	CTC TAG AGA TCC GTC AAC ATG GTG GAG CAC	30		

*เส้นโพรบติดฉลากด้วย 5'-6-carboxy-fluorescein (FAM) และ 3' tetramethylrhodamine (TAMRA)

7.1.3 การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneScan ร่วมกับ lysis buffer ของ Eurofins (Hamburg, Germany) ในการสกัดดีเอ็นเอจาก CRM ทั้ง 3 ชนิด และใช้ Wizard mini column ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ แล้วประมาณการความ

เข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี real-time PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

7.1.4 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

การเพิ่มปริมาณยีน endogenous และยีน event-specific โดยวิธี real-time PCR ใช้เครื่อง LightCycler®480 แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม LightCycler®480 Software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา real-time PCR คือ 20 ไมโครลิตร (uL) โดยมีสารชนิดต่างๆตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 ดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงชนิดสารและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร		ปริมาณ (uL)/1 ปฏิกิริยา
น้ำยาโพรบ master	Master mix	10
Forward ไพรเมอร์	Master mix	0.5
Reverse ไพรเมอร์	Master mix	0.5
โพรบ	Master mix	0.5
น้ำ	Master mix	3.5
ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA)		5
ปริมาณรวม (Master mix + ดีเอ็นเอต้นแบบ)		20

ยีนทั้ง 3 ชนิดได้รับการเพิ่มปริมาณโดยวิธี real-time PCR ซึ่งมีขั้นตอน อุณภูมิ และจำนวนรอบการทำงานตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 ดังนี้ (Delobel, C., *et al*. 2008) (Mazzara M., et al., 2009)

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ และจำนวนรอบการทำงานของปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน		จำนวนรอบการทำงาน	อุณหภูมิ (^{O}C)	ระยะเวลา (วินาที)
UNG*		1	50	120
Initial denaturation		1	95	600
Amplification	Denaturation	45	95	15
	Annealing และ Extension		60	60

*เป็นขั้นตอนที่ใช้กับยีน MON89788 เท่านั้น ส่วนยีน DP305423 และ DP356043 ให้เริ่มที่ขั้นตอน Initial denaturation

7.2 วิธีการทดลอง

7.2.1 สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

ใช้ค่า crossing point (CP) เป็นแกน Y และค่า log ฐาน 10 ของความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็นแกน X ในการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน ขั้นตอนแรก CRM ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นในระดับต่างๆ (serial dilution) 4 ระดับ โดยมีจำนวน copy ดีเอ็นเอตั้งแต่ 21645 ถึง 338 แต่ละความเข้มข้นมี 3 ซ้ำ (replicate) การคำนวณหาจำนวน copy ดีเอ็นเอใน 1 ปฏิกิริยา ทำได้โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{จำนวน } copy \text{ ดีเอ็นเอ} = \frac{\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ใช้ (ng/uL)} \times \text{ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ใน } 1 \text{ ปฏิกิริยา (uL)}}{\text{น้ำหนักดีเอ็นเอจำนวน } 1\ copy}$$

การทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และใน 1 ปฏิกิริยาใช้สารละลายดีเอ็นเอจำนวน 5 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงมีดีเอ็นเอรวมในปฏิกิริยาเท่ากับ 50 นาโนกรัม (10X5=50) ดีเอ็นเอถั่วเหลืองจำนวน 1 copy มีน้ำหนัก 2.31 พิโคกรัม (2.13×10^{-12} กรัม) (Arumuganathan และ Earle, 1991) เมื่อนำไปแทนค่าในสมการและคำนวณออกมา ก็จะได้จำนวน copy ยีน 21645 copy เป็นความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น ดังสมการ

$$\text{จำนวน } copy \text{ ดีเอ็นเอ} = \frac{10\ \text{ng/uL} \times 5\ \text{uL}}{2.31\ pg} = 21645$$

จากนั้นจึงเจือจางดีเอ็นเอแบบ serial dilution ให้มี 4 ระดับความเข้มข้น แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นโดยวิธี real-time PCR โดยทำการทดลองไปพร้อมกันทุกซ้ำ และทดลองซ้ำทั้งหมด 4 รอบ (repeat) บันทึกค่า CP และจำนวน copy ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่อง real-time PCR จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า CP และจำนวน copy ดีเอ็นเอในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วคำนวณค่า [log จำนวน copy ดีเอ็นเอ] ของทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

7.2.2 วัดความเที่ยง (precision) ความแม่น (accuracy) และร้อยละความเบี่ยงเบน (%bias) ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน event-specific

Precision แสดงในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หรือ RSD (relative standard deviation) ซึ่งในการทดลองนี้ ค่า RSD ที่คำนวณได้ เป็นค่าที่คำนวณจากจำนวน copy ของยีน lectin และยีน event-specific ทั้ง 3 ซ้ำในแต่ละรอบการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel ช่วยในการคำนวณ

Accuracy ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ คำนวณได้โดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ได้จากการทดลองกับร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM ซึ่ง Accuracy จะรายงานผลในรูปค่า %bias ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ สมการที่ใช้ในการคำนวณ %bias คือ

$$\%\text{bias} = \frac{|\text{true value} - \text{experimental value}| \text{ x } 100}{\text{true value}}$$

จากสมการข้างต้น True value หรือ ‘ค่าจริง’ ในการทดลองนี้คือค่าร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM ส่วน experimental value หรือ ‘ค่าที่ได้จากการทดลอง’ เป็นค่าร้อยละการปนเปื้อนที่ได้จากการทดลองจริงโดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ของห้องปฏิบัติการฯที่ผู้วิจัยทำการทดลอง

การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific (transgene) ด้วยวิธี real-time PCR ได้ทำการทดสอบซ้ำ 4 รอบ โดยร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific คำนวณได้จากการคูณจำนวน copy ดีเอ็นเอของยีน event-specific ด้วย 100 แล้วหารด้วยจำนวน copy ดีเอ็นเอของยีน endogenous หรือ taxon-specific gene ซึ่งในการทดลองนี้ ยีน endogenous คือยีน lectin สมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนของ transgene} = \frac{\text{จำนวน copy ดีเอ็นเอของ transgene x 100}}{\text{จำนวน copy ดีเอ็นเอของ taxon} - \text{specific gene}}$$

7.2.3 วัดความทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification: LOQ)

ดำเนินการโดยการเจือจางดีเอ็นเอของยีน lectin และยีน event-specific ด้วย non-GM soybean ให้ได้จำนวน copy ดีเอ็นเอในระดับต่างๆ จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย real-time PCR โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และทดลองซ้ำ 4 รอบ จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า CP ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR และวัด repeatability ซึ่งอยู่ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความทวนซ้ำได้หรือ RSDr (repeatability relative standard deviation) ค่า RSDr ได้จากการนำค่า CP ทั้งหมดในแต่ระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอใส่เข้าไปในโปรแกรมคำนวณบนเว็บไซต์ MiniWebtool©2004

การหาค่า LOQ พิจารณาจากผลการทดลองว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในระดับใดที่เครื่อง real-time PCR ยังคงสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ครบทุกซ้ำ โดยต้องอยู่ภายใต้เงื่อนไขที่ว่า ระดับความเข้มข้นที่เป็น LOQ ต้องมี precision ของค่า CP อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

7.2.4 วัดความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD)

การหาค่า LOD ดำเนินการโดยการเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดจาก CRM ให้ได้ระดับความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีนตั้งแต่ 100 ไปจนถึง 1 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมแต่ละชนิด ในแต่ละระดับ copy มีทั้งหมด 10 ซ้ำ จากนั้นจึงพิจารณาว่าความเข้มข้นต่ำสุดระดับใดที่เครื่อง real-time PCR ยังคงสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ครบทุกซ้ำ จากนั้นจึงนำจำนวน copy ต่ำสุดนั้นไปเทียบกับจำนวน copy ของยีน endogenous ใน 1 ปฏิกิริยา PCR ซึ่งในการทดลองนี้คือยีน lectin จำนวน 21645 copy แล้วรายงานผลเป็น %LOD (copy/copy%) ตามสมการดังนี้

$$\%\mathrm{LOD} = \frac{\textbf{จำนวน copy ต่ำสุดของยีน event-specific ที่ยังคงสามารถตรวจพบสัญญาณฯได้}}{21645} \times 100$$

7.3 เวลาและสถานที่ เวลาเริ่มต้น พ.ศ. 2555 เวลาสิ้นสุด พ.ศ. 2557 ณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน endogenous พบว่า ไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนยีน lectin ในถั่วเหลือง CRM ได้ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าถั่วเหลือง CRM ที่นำมาทดลองมียีน lectin อยู่จริง และสามารถนำไปทดลองในงานวิจัยขั้นต่อไปได้ นอกจากนี้ ไพรเมอร์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในตัวอย่างที่เป็นข้าวและข้าวโพด แสดงว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะกับยีน lectin ในถั่วเหลืองเท่านั้น

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มจำนวนยีน event-specific ทั้ง 3 ชนิดนั้น ได้นำยีน event-specific ชนิดอื่นๆ เช่น GA21 NK603 และ Roundup Ready มาทดสอบด้วย ผลการทดสอบชี้ว่า ไพรเมอร์และโพรบสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับยีน event-specific เป้าหมาย และไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับยีนอื่นๆได้

8.2 การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

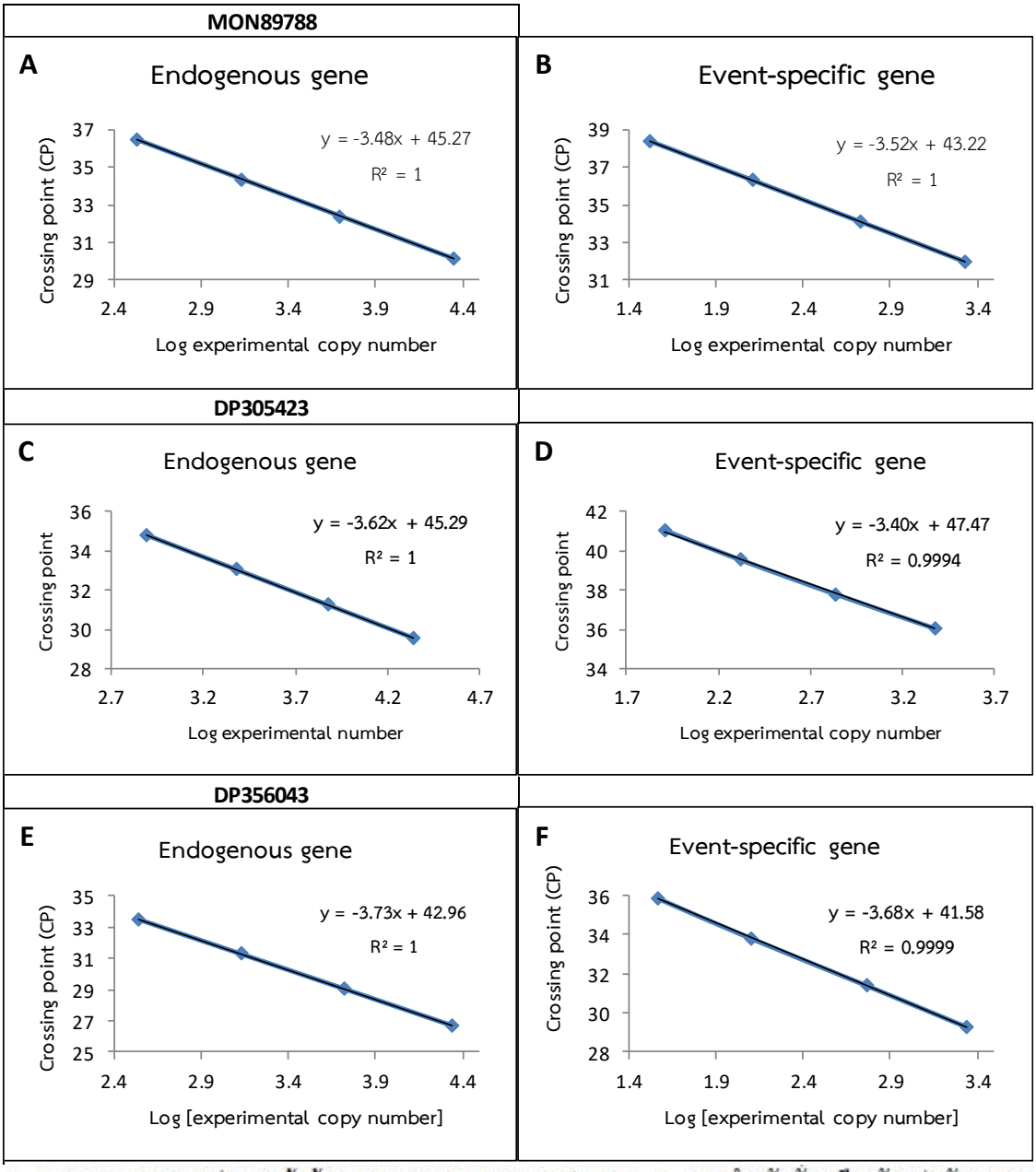
การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043 เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน event-specific เทียบกับยีน endogenous (ในการทดลองนี้คือยีน lectin) ซึ่งเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ที่มีอยู่แล้วในถั่วเหลือง โดยการเปรียบเทียบจะแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ (%) การปนเปื้อน (ดูวิธีการคำนวณร้อยละการปนเปื้อนในข้อ 7.2.2) ดังนั้นการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific จะต้องหาปริมาณทั้งยีน event-specific และยีน endogenous ควบคู่ไปพร้อมกันเสมอ การคำนวณหาปริมาณของยีน event-specific และยีน endogenous สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของทั้งยีน event-specific และยีน endogenous กราฟความเข้มข้นมาตรฐานเป็นกราฟที่สร้างโดยใช้ค่าเฉลี่ย crossing point (CP) เป็นแกน X และค่าเฉลี่ย [log ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ] เป็นแกน Y

ค่าเฉลี่ย CP และ log ของจำนวน copy ดีเอ็นเอในระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้งยีน endogenous และยีน event-specific ที่จะนำมาสร้างเป็นกราฟแสดงไว้ในตารางที่ 6 ดังนี้

ตารางที่ 6 แสดงค่า CP และ Log [จำนวน copy ยีน] เฉลี่ยที่นำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

ชื่อยีน event-specific	จำนวน copy ยีน ในทางทฤษฎี	ยีน Endogenous (Lectin)			ยีน event-specific (ที่การปนเปื้อนร้อยละ 10)		
		Crossing point (CP)	จำนวน copy ยีนที่ได้จากการทดลอง	Log [จำนวน copy ยีนที่ได้จากการทดลอง]	Crossing point (CP)	จำนวน copy ยีนที่ได้จากการทดลอง	Log [จำนวน copy ยีนที่ได้จากการทดลอง]
MON89788	21645	30.13	22450	4.351	31.50	2156	3.334
	5410 (1:4)	32.40	5005	3.698	33.62	538	2.730
	1352 (1:16)	34.37	1360	3.133	35.81	130	2.111
	338 (1:256)	36.45	343	2.535	37.88	33	1.518
DP305423	21645	29.57	22017	4.343	36.06	2352	3.371
	7215 (1:3)	31.26	7650	3.878	37.80	681	2.833
	2405 (1:9)	33.05	2421	3.384	39.54	210	2.320
	801 (1:27)	34.81	786	2.895	41.05	82	1.913
DP356043	21645	26.76	22109	4.343	29.29	2184	3.339
	5410 (1:4)	29.05	5325	3.726	31.40	588	2.765
	1352 (1:16)	31.28	1361	3.129	33.81	129	2.099
	338 (1:256)	33.48	347	2.537	35.84	37	1.566

จากตารางที่ 6 เมื่อใช้ค่า crossing point (CP) เป็นแกน X และค่า [log จำนวน copy ยีนที่ได้จากการทดลอง] เป็นแกน Y ก็สามารถสร้างเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน lectin และยีน event-specific ในถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ดังนี้



A, C และ E แสดงกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ Lectin endogenous gene สำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON 89788, DP305423 และ DP356043 ตามลำดับ B, D และ F แสดงกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ Transgene ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON 89788, DP305423 และ DP356043 ตามลำดับ

ในส่วนของข้าวโพด MON89788 นั้น ข้อมูลบนกราฟ A ซึ่งเป็นกราฟสำหรับยีน lectin บ่งชี้ว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.48 และมีค่า R^2 เท่ากับ 1 ซึ่งทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่า R^2 เป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของค่าบนแกน X และแกน Y โดยบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือในประมาณค่าบนแกน X โดยใช้ค่าบนแกน Y หรือการใช้ค่าบนแกน Y ในการประมาณค่าบนแกน X ค่า R^2 ที่ยอมรับได้ควรมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 0.98

ความชันของกราฟมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา PCR (PCR efficiency) ค่าความชันที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ควรอยู่ระหว่าง -3.1 ถึง -3.6 ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 97.1 ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยควรมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 95 กับ 105 (Hougs, L. และ Žel, J., 2011)

สำหรับยีน event-specific (กราฟ B) พบว่าค่า R^2 เท่ากับ 1 พบว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.52 และมีค่า R^2 ซึ่งทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR ก็มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 96.35 ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้อีกเช่นกัน จึงสามารถกล่าวได้ว่า กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของทั้งยีน endogenous และยีน event-specific มีความเป็นเส้นตรง (linearity) สูง ดังนั้นจึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 กราฟในการคำนวณปริมาณของยีน endogenous และยีน event-specific ในถั่วเหลือง MON89788 ได้อย่างน่าเชื่อถือ

สำหรับถั่วเหลือง DP305423 นั้น เมื่อพิจารณากราฟ C ซึ่งเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานในการหาปริมาณของยีน endogenous ก็พบว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.62 ซึ่งมีค่าออกนอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย ส่วนค่า R^2 นั้นมีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 94.7 ซึ่งอยู่นอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย สำหรับกราฟ D ในส่วนของยีน event-specific พบว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.40 และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9994 ซึ่งทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR ก็มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 102.9 ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้อีกเช่นกัน จึงสามารถกล่าวได้ว่า กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน event-specific มีความเป็นเส้นตรงสูง แต่กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน endogenous (กราฟ C) มีความเป็นเส้นตรงที่คลาดเคลื่อนไปจากค่าปกติ ซึ่งอาจส่งผลต่อความแม่นยำและความน่าเชื่อถือในการคำนวนปริมาณยีน lectin ในถั่วเหลือง DP305423

ในขณะเดียวกัน กราฟ E ที่เป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานในการหาปริมาณยีน endogenous ในถั่วเหลือง DP356043 นั้น เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.73 ซึ่งออกนอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 87.5 ซึ่งอยู่นอกช่วงค่าปกติ สำหรับกราฟ F ในส่วนของยีน event-specific พบว่า กราฟมีความชันอยู่ที่ -3.68 ซึ่งอยู่นอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย และค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR ก็มีค่าอยู่ที่ร้อยละ 88.5 ซึ่งถือว่าอยู่นอกช่วงค่าปกติเช่นกัน

สาเหตุที่ทำให้ค่าความชัน R^2 และ PCR efficiency ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 และ DP356043 ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติ อาจเกิดจากการมี PCR inhibitor หรือตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR รวมไปถึงความไม่สอดคล้องกันของปริมาณไพร์เมอร์/โพรบ กับจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยอาจมีสารชนิดใดชนิดหนึ่งน้อยหรือมากจนเกินไป ส่งผลให้ไพรเมอร์/โพรบ ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างสมบูรณ์ ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ PCR จึงลดลง ส่งผลให้ได้ค่า R^2 ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติ และ PCR efficiency ต่ำกว่าปกติเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาปริมาณไพรเมอร์/โพรบ และดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการทดลองนี้ซึ่งเป็นวิธีการดัดแปลงหรือ

in-house method ก็พบว่าวิธีการดัดแปลงใช้ความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์มากกว่าที่ใช้ในวิธีการอ้างอิง (reference method) และวิธีการดัดแปลงก็ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบน้อยกว่าวิธีการอ้างอิงด้วย (ดูตารางที่ 2 เพิ่มเติม) นอกจากไพรเมอร์/โพรบ ดีเอ็นเอต้นแบบ วิธีการดัดแปลงก็มีส่วนผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR หลายอย่างในปริมาณที่แตกต่างไปจากวิธีการอ้างอิง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อความเป็นเส้นตรงของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานในส่วนของความชัน R^2 และ PCR efficiency

ในภาพรวม กราฟความเข้มข้นมาตรฐานสำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 และ DP356043 มีความเป็นเส้นตรงที่คลาดเคลื่อนไปจากค่าปกติ ซึ่งอาจส่งผลต่อความแม่นยำและความน่าเชื่อถือในการคำนวนปริมาณยีน endogenous กับยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 2 ชนิดนี้

8.3 การวัดความเที่ยง (precision) ความแม่น (accuracy) และร้อยละการเบี่ยงเบน (%bias) ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน event-specific

ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นถั่วเหลืองที่มียีน event-specific ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณร้อยละ 10 ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบว่า อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลง สามารถให้ผลการตรวจที่มี ‘ความแม่น’ และ ‘ความเที่ยง’ ในการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific เพียงใด รวมทั้งตรวจสอบว่าห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงหรือเบี่ยงเบนไปจากปริมาณการปนเปื้อนที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ที่ร้อยละ 10 หรือไม่

เมื่อได้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของทั้งยีน endogenous และยีน event-specific สำหรับถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิดแล้ว ก็สามารถตรวจหาปริมาณ copy ของทั้ง 2 ยีนได้ รวมทั้งสามารถคำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ได้ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ใช้วิธี real-time PCR โดยใช้ดีเอ็นเอถั่วเหลืองจำนวน 50 นาโนกรัม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำ 4 รอบ ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเที่ยง ความแม่น และการเบี่ยงเบน ในการหาร้อยละการปนเปื้อนของ Transgene

ชนิดถั่วเหลือง	ร้อยละการปนเปื้อนจริง (%)	การทดลองครั้งที่	Assay	จำนวน copy ยีนจากการทดลอง ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของ copy ยีนจากการทดลอง	Standard deviation (SD) of experimental copy number	RSD (%)	ร้อยละการปนเปื้อนที่ได้จากการทดลอง (%)	Bias (%)	ค่าเฉลี่ยของ %Bias
MON 89788	10%	1	Lectin	20100	21600	22400	21367	1168	5.46	11.01	10.10	4.75
			MON89788	2330	2620	2110	2353	256	10.87			
		2	Lectin	21100	22000	21400	21500	458	2.13	10.47	4.60	
			MON89788	2150	2390	2210	2250	125	5.55			
		3	Lectin	21300	23600	22800	22567	1168	5.17	10.38	3.80	
			MON89787	2320	2300	2410	2343	59	2.50			
		4	Lectin	19900	20900	23100	21300	1637	7.69	10.05	0.50	
			MON89788	2230	2020	2170	2140	108	5.05			
DP305423	10%	1	Lectin	23200	21000	21400	21867	1172	5.36	10.83	8.30	6.82
			DP305423	2300	2060	2750	2370	350	14.78			
		2	Lectin	19500	25100	21300	21967	2859	13.01	11.19	11.90	
			DP305423	2070	3000	2310	2460	483	19.63			
		3	Lectin	21000	22100	21300	21467	569	2.65	10.71	7.10	
			DP305423	2520	2190	2190	2300	191	8.28			
		4	Lectin	20000	26700	21600	22767	3499	15.37	10.00	0.00	
			DP305423	2680	2020	2130	2277	354	15.53			
DP356043	10%	1	Lectin	23085	18785	19975	20615	2220	10.77	11.07	10.70	10.33
			DP356043	2032	2547	2268	2282	257	11.30			
		2	Lectin	21842	21902	29811	24518	4583	18.69	9.02	-9.80	
			DP356043	2559	2550	1523	2211	595	26.94			
		3	Lectin	19787	20516	20985	20429	604	2.95	10.90	9.00	
			DP356043	2365	2510	1802	2226	374	16.80			
		4	Lectin	24003	22075	22539	22872	1006	4.40	8.82	-11.80	
			DP356043	2273	1906	1871	2017	223	11.04			

จากตารางที่ 7 พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation: RSD) ของการหาปริมาณยีน endogenous (lectin) และยีน event-specific ทั้ง 3 ชนิด ในการทดลองทั้ง 4 รอบ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยการวัดค่า RSD (%) ในการหาปริมาณยีน event-specific ชนิด MON89788 DP305423 และ DP356043 ทั้ง 4 รอบ อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ คือ ไม่เกินร้อยละ 25 (Hougs, L. และ Žel, J., 2011) แสดงว่าอุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถให้ผลการตรวจที่มีความเที่ยงสูง นั่นคือจำนวน copy ของ endogenous gene (lectin) และยีน event-specific ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละครั้งมีความใกล้เคียงกัน และจำนวน copy ยีนไม่แกว่งออกไปจากค่าเฉลี่ยมากนัก ยกเว้นการทดลองครั้งที่ 2 ในการหาปริมาณยีน event-specific ในถั่วเหลือง DP356043 ที่ได้ค่า RSD เท่ากับร้อยละ 26.94 (ดูตารางที่ 7) ซึ่งออกนอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย

ในส่วนของความแม่นของวิธีการตรวจ จะตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ได้จากการทดลอง กับร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM ซึ่งก็คือร้อยละ 10 โดยเปรียบเทียบว่า ค่าที่ได้จากการทดลองมีความใกล้เคียงกับค่าที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM เพียงใด การคำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ได้จากการทดลอง สามารถคำนวณโดยใช้สมการในข้อ 7.2.2

ในการทดลองนี้ ความแม่นของการตรวจวิเคราะห์ (accuracy) จะรายงานในรูปร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%bias) โดยพารามิเตอร์นี้บ่งชี้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองมีความเบี่ยงเบนไปจากค่าจริงคิดเป็นร้อยละเท่าใด ในกรณีนี้ 'ค่าจริง' คือค่าร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM ซึ่งก็คือ ร้อยละ 10 และร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ หรือ '%bias' สามารถคำนวณโดยใช้สมการในข้อ 7.2.2

ตัวอย่างเช่น ในการทดลองรอบที่ 1 ร้อยละการปนเปื้อนของยีน MON89788 ที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 11.01 (ดูตารางที่ 7) และร้อยละการปนเปื้อนจริง (true value) ที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM คือ ร้อยละ 10 จากนั้นให้แทนค่าในสมการ

$$\%\text{bias} = \frac{|10 - 11.01| \text{ x } 100}{10} = 10.01\%$$

เมื่อแทนค่าในสมการแล้ว จึงคำนวณออกมาได้ร้อยละการเบี่ยงเบนเท่ากับร้อยละ 10.01 สำหรับการทดลองรอบที่ 1 จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยในการทดลองทั้ง 4 รอบ โดยค่าเฉลี่ยร้อยละการเบี่ยงเบน (%bias) สำหรับการทดลองทั้ง 4 รอบ มีค่าเท่ากับร้อยละ 4.75 (ดูตารางที่ 7) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (±25%)

สำหรับยีน DP305423 และ DP356043 นั้น การคำนวณหาร้อยละการเบี่ยงเบนใช้สมการเดียวกันกับยีน MON89788 ซึ่งผลการคำนวณบ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ย %bias ในการตรวจหาปริมาณยีน DP305423 และ DP356043 มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.82 และ 10.33 ตามลำดับ (ดูตารางที่ 7) โดยทั้ง 2 ค่าอยู่ในช่วงค่าปกติ (±25%) (Hougs, L. และ Žel, J., 2011) ดังนั้น อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงกับค่าจริง ถึงแม้ว่าร้อยละการปนเปื้อนที่ได้จากการทดลองจะมีความเบี่ยงเบน แต่ก็เบี่ยงเบนไปจากค่าจริงในระดับที่สามารถยอมรับได้

8.4 การวัดความทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification: LOQ)

ความทวนซ้ำได้เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ว่า ค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละครั้งมีความแปรปรวนมากน้อยเพียงใดเมื่อทำการตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ ควรมีความทวนซ้ำได้อยู่ในเกณฑ์ดี โดยความทวนซ้ำได้จะรายงานผลในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความทวนซ้ำได้ (relative repeatability standard deviation: RSDr) ซึ่งค่า RSDr ที่ยอมรับได้ควรมีค่าไม่เกินร้อยละ 25 (Hougs, L. และ Žel, J., 2011)

ผลการคำนวณค่า RSDr ของ endogenous gene และยีน event-specific ในถั่วเหลือง MON89788 แสดงในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน lectin ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
21645	1	29.59	29.53	29.50	29.54	0.05	0.16	30.69	0.222	0.707
	2	28.34	28.37	28.60	28.44	0.14	0.50			
	3	33.58	34.06	34.13	33.92	0.30	0.88			
	4	31.49	30.70	30.42	30.87	0.55	1.80			
10000	1	29.81	30.50	30.86	30.39	0.53	1.76	32.40	0.273	0.866
	2	29.54	29.67	29.73	29.65	0.10	0.33			
	3	36.78	36.56	36.87	36.74	0.16	0.43			
	4	32.10	33.10	33.32	32.84	0.65	1.98			
1000	1	34.62	34.74	35.01	34.79	0.20	0.57	36.57	0.433	1.011
	2	33.57	33.41	33.33	33.44	0.12	0.37			
	3	41.04	42.54	40.52	41.37	1.05	2.54			
	4	36.86	36.76	36.40	36.67	0.24	0.66			
100	1	37.33	41.68	41.41	40.14	2.44	6.07	39.61	1.864	4.710
	2	37.88	37.68	38.10	37.89	0.21	0.55			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	41.49	39.71	41.21	40.80	0.96	2.35			
10	1	nd	40.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

ผลการทดลองจากตารางที่ 8 บ่งชี้ว่า ค่า RSDr (%) ของการเพิ่มจำนวนยีน endogenous (lectin) ในทุกระดับความเข้มข้น มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกินร้อยละ 25) ดังนั้น วิธีการดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

การวัดค่าความทวนซ้ำได้ของยีน event-specific ใช้วิธีการเดียวกับการวัดค่าความทวนซ้ำได้ของยีน lectin แต่จะใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน event-specific หรือ MON89788 เท่านั้น และความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีน event-specific จะน้อยกว่ายีน lectin อยู่ 10 เท่า เนื่องจากเป็นการปนเปื้อนที่ร้อยละ 10

การเพิ่มจำนวนยีน event-specific ด้วยวิธี real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมๆกันกับการเพิ่มจำนวนยีน endogenous เพื่อที่จะคำนวณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน MON89788 ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
2164	1	32.45	32.27	32.60	32.44	0.165	0.51	31.42	1.010	3.220
	2	29.91	29.75	29.87	29.84	0.083	0.28			
	3	31.84	31.86	31.79	31.83	0.036	0.11			
	4	31.51	31.66	31.53	31.57	0.081	0.26			
1000	1	33.64	33.79	33.65	33.69	0.084	0.25	32.68	1.034	3.160
	2	31.05	31.01	31.15	31.07	0.072	0.23			
	3	33.29	33.00	33.22	33.17	0.151	0.46			
	4	32.77	32.64	32.99	32.80	0.177	0.54			
100	1	37.93	38.07	37.67	37.89	0.203	0.54	36.35	1.259	3.460
	2	34.90	34.50	34.28	34.56	0.314	0.91			
	3	36.35	36.67	36.88	36.63	0.267	0.73			
	4	36.19	36.37	36.43	36.33	0.125	0.34			
20	1	41.35	40.48	40.96	40.93	0.436	1.06	39.08	1.584	4.050
	2	36.41	36.83	37.25	36.83	0.420	1.14			
	3	38.96	39.04	40.06	39.35	0.613	1.56			
	4	39.40	39.50	38.69	39.20	0.442	1.13			
10	1	41.78	nd	nd	nd	nd	nd	40.06	1.095	2.730
	2	38.34	38.59	nd	38.47	0.177	0.46			
	3	40.51	40.84	39.60	40.32	0.642	1.59			
	4	40.70	40.28	39.90	40.29	0.400	0.99			
1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

ผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่า RSDr (%) ของทุกระดับ copy ยีน event-specific ในถั่วเหลือง MON89788 มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกินร้อยละ 25) ดังนั้น วิธีการดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ในเรื่องของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific (MON89788) ที่ยังคงสามารถหาปริมาณได้ (LOQ) โดยที่เครื่องยังคงสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ ครบทุกรอบการทดลอง และต้องมีความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 20 copy (ดูตารางที่ 9) จากนั้นจึงเทียบกับยีน lectin จำนวน 21,645 copy ซึ่งเป็นปริมาณยีน lectin ที่ใช้ในการทดลองในแต่ละปฏิกิริยา (reaction) เพื่อที่จะหาร้อยละการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนของยีน MON89788} = \frac{\text{จำนวน copy ของยีน MON89788 x 100}}{\text{จำนวน copy ของยีน lectin}}$$

เมื่อแทนค่าในสมการ จะได้

ร้อยละการปนเปื้อนของยีน $\text{MON89788} = \frac{20 \text{ x } 100}{21645} = 0.092$

ดังนั้น ร้อยละ 0.092 หรือประมาณร้อยละ 0.1 (copy/copy%) คือ ร้อยละของการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดของยีน MON89788 ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification: LOQ)

เมื่อเปรียบเทียบค่า LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (reference method) ซึ่งระบุว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 0.09 และค่า LOQ ที่ได้จากวิธีการดัดแปลง (in-house method) ในการทดลองนี้ ก็พบว่ามีความใกล้เคียงกันพอสมควร

ในส่วนของความทวนซ้ำได้ของการเพิ่มจำนวนยีน endogenous และยีน event-specific ในถั่วเหลือง DP305423 พบว่า ค่า RSDr (%) ของทุกระดับ copy ยีน มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกินร้อยละ 25) (ดูตารางที่ 10 และ 11) ดังนั้น วิธีการทดลองดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 10 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน lectin ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
21645	1	29.54	29.70	29.67	29.64	0.085	0.29	29.57	0.354	1.200
	2	29.39	28.99	29.25	29.21	0.203	0.69			
	3	30.09	30.00	30.06	30.05	0.046	0.15			
	4	29.58	29.15	29.47	29.40	0.223	0.76			
10000	1	30.81	31.00	30.87	30.89	0.097	0.31	30.88	0.281	0.910
	2	30.65	30.62	30.47	30.58	0.096	0.32			
	3	31.41	31.24	31.21	31.29	0.108	0.34			
	4	30.72	30.79	30.78	30.76	0.038	0.12			
1000	1	34.79	34.30	34.21	34.43	0.312	0.91	34.42	0.346	1.010
	2	34.05	34.16	34.24	34.15	0.095	0.28			
	3	34.85	34.76	34.99	34.87	0.116	0.33			
	4	34.18	34.50	33.97	34.22	0.267	0.78			
100	1	42.59	37.12	39.60	39.77	2.739	6.89	39.20	1.520	3.880
	2	38.21	40.86	38.31	39.13	1.502	3.84			
	3	39.06	39.89	38.07	39.01	0.911	2.34			
	4	37.85	38.63	40.20	38.89	1.197	3.08			
10	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

ตารางที่ 11 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน DP305423 ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
2164	1	34.90	35.06	34.65	34.87	0.207	0.59	36.06	1.400	3.900
	2	38.55	38.03	38.40	38.33	0.268	0.70			
	3	35.30	35.49	35.48	35.42	0.107	0.30			
	4	35.40	35.79	35.72	35.64	0.208	0.58			
1000	1	38.69	38.21	37.90	38.27	0.398	1.04	39.41	1.597	4.050
	2	41.86	41.93	42.15	41.98	0.151	0.36			
	3	39.15	38.46	38.20	38.60	0.491	1.27			
	4	38.72	38.38	39.30	38.80	0.465	1.20			
100	1	40.25	38.68	39.22	39.38	0.798	2.03	40.53	1.634	4.030
	2	43.78	42.70	42.85	43.11	0.585	1.36			
	3	39.80	39.88	40.31	40.00	0.274	0.69			
	4	39.63	39.33	40.03	39.66	0.351	0.89			
20	1	nd	42.02	nd	nd	nd	nd	42.50	1.001	2.350
	2	44.17	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	42.25	nd	nd	nd			
	4	nd	42.54	41.54	42.04	0.707	1.68			
10	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

ในเรื่องของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific (DP305423) ที่ยังคงสามารถหาปริมาณได้เมื่อเทียบกับยีน endogenous ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 พบว่า ความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีนที่น้อยที่สุดที่หาปริมาณได้ (LOQ) โดยเครื่องต้องสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ ครบทุกรอบการทดลอง และต้องมีความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 100 copy (ดูตารางที่ 11) จากนั้นจึงเทียบกับยีน lectin จำนวน 21,645 copy เมื่อแทนค่าในสมการแล้ว ก็ได้ผลลัพธ์ดังนี้

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนของยีน } \mathrm{DP305423} = \frac{100 \text{ x } 100}{21645} = 0.462$$

ดังนั้น ร้อยละ 0.462 หรือประมาณร้อยละ 0.5 (copy/copy%) คือ ร้อยละของการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดของยีน event-specific หรือยีน DP305423 ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) อย่างไรก็ตาม ค่า LOQ ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าค่า LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.08) สาเหตุอาจเกิดจากวิธีการดัดแปลงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอ้างอิง โดยในวิธีการอ้างอิงระบุว่า สามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 100 ng/uL แต่ในวิธีการดัดแปลงนี้ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นเพียง 10 ng/uL เท่านั้น ซึ่งอาจส่งผลให้ค่า LOQ ที่ตรวจวัดในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างจากค่า LOQ ของวิธีการอ้างอิง

นอกจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 และ DP305423 ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การตรวจวัดความทวนซ้ำได้ยังดำเนินการในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ด้วย โดยพบว่า ค่า RSDr (%) ของทุกระดับ copy ยีน มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกินร้อยละ 25) (ดูตารางที่ 12 และ 13) ดังนั้น วิธีการทดลองดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 12 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน lectin ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
21645	1	26.75	27.07	26.98	26.93	0.165	0.61	26.73	1.203	4.500
	2	28.69	28.68	28.15	28.51	0.309	1.08			
	3	25.59	25.53	25.49	25.54	0.050	0.20			
	4	25.88	26.01	25.98	25.96	0.068	0.26			
10000	1	27.85	28.08	28.07	28.00	0.130	0.46	28.11	1.284	4.570
	2	30.04	30.08	30.27	30.13	0.123	0.41			
	3	27.03	26.87	26.97	26.96	0.081	0.30			
	4	27.27	27.30	27.45	27.34	0.096	0.35			
1000	1	31.92	31.34	31.38	31.55	0.324	1.03	31.53	1.457	4.620
	2	33.13	33.89	34.05	33.69	0.492	1.46			
	3	29.59	30.28	30.31	30.06	0.407	1.35			
	4	31.01	31.02	30.38	30.80	0.367	1.19			
100	1	36.94	34.67	35.59	35.73	1.142	3.20	35.60	1.599	4.490
	2	37.14	36.78	38.19	37.37	0.733	1.96			
	3	35.11	32.91	33.75	33.92	1.110	3.27			
	4	36.83	34.03	35.25	35.37	1.404	3.97			
1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

ตารางที่ 13 แสดงความทวนซ้ำได้ของการตรวจปริมาณยีน DP356043 ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043

จำนวน copy ยีน	การทดลองครั้งที่	Crossing point (CP) ซ้ำที่ 1	2	3	ค่าเฉลี่ยของค่า CP	SD	RSD (%)	Mean of all CPs	SDr	RSDr (%)
2164	1	28.81	28.45	28.64	28.63	0.180	0.63	29.29	0.703	2.400
	2	29.32	29.33	30.17	29.61	0.488	1.65			
	3	28.66	28.58	29.05	28.76	0.251	0.87			
	4	29.95	30.25	30.28	30.16	0.182	0.61			
1000	1	31.99	32.21	32.33	32.18	0.172	0.54	32.86	0.828	2.520
	2	32.80	32.94	33.01	32.92	0.107	0.32			
	3	32.47	31.91	32.34	32.24	0.293	0.91			
	4	33.92	34.46	33.88	34.09	0.324	0.95			
100	1	33.09	33.21	33.32	33.21	0.115	0.35	33.93	0.727	2.140
	2	34.06	34.03	33.92	34.00	0.074	0.22			
	3	33.28	33.87	33.57	33.57	0.295	0.88			
	4	35.32	34.31	35.18	34.94	0.547	1.57			
20	1	36.22	36.57	35.70	36.16	0.438	1.21	36.58	1.020	2.790
	2	35.88	37.11	nd	36.50	0.870	2.38			
	3	36.38	36.23	36.41	36.34	0.096	0.27			
	4	nd	36.07	39.27	37.67	2.263	6.01			
10	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	38.09	1.361	3.570
	2	37.44	36.88	nd	37.16	0.396	1.07			
	3	36.73	37.35	40.08	38.05	1.782	4.68			
	4	38.42	39.75	nd	39.09	0.940	2.41			
1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	38.78	1.570	4.050
	2	39.89	37.67	nd	38.78	1.570	4.05			
	3	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	4	38.50	nd	nd	nd	nd	nd			

nd = not detected

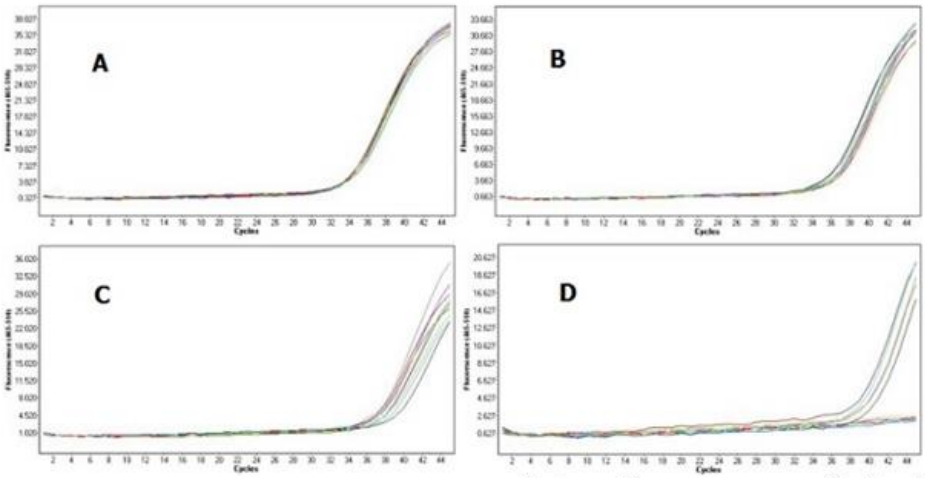
ในเรื่องของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่ยังคงสามารถหาปริมาณได้เมื่อเทียบกับยีน endogenous ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP3560433 พบว่า ความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีนที่น้อยที่สุดที่หาปริมาณได้ (LOQ) โดยเครื่องต้องสามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ ครบทุกรอบการทดลอง และต้องมีความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 100 copy (ดูตารางที่ 13) จากนั้นจึงเทียบกับยีน lectin จำนวน 21,645 copy เมื่อแทนค่าในสมการแล้ว ก็ได้ผลลัพธ์ดังนี้

$$\text{ร้อยละการปนเปื้อนของยีน } \mathrm{DP356043} = \frac{100 \text{ x } 100}{21645} = 0.462$$

ดังนั้น ร้อยละ 0.462 หรือประมาณร้อยละ 0.5 (copy/copy%) คือ ร้อยละของการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดของยีน event-specific หรือยีน DP356043 ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) อย่างไรก็ตาม ค่า LOQ ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าค่า LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.08) โดยสาเหตุอาจเกิดจากวิธีการดัดแปลงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอ้างอิง ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วในเรื่องค่า LOQ สำหรับการตรวจวัดปริมาณยีน even-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423

8.5 การหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD)

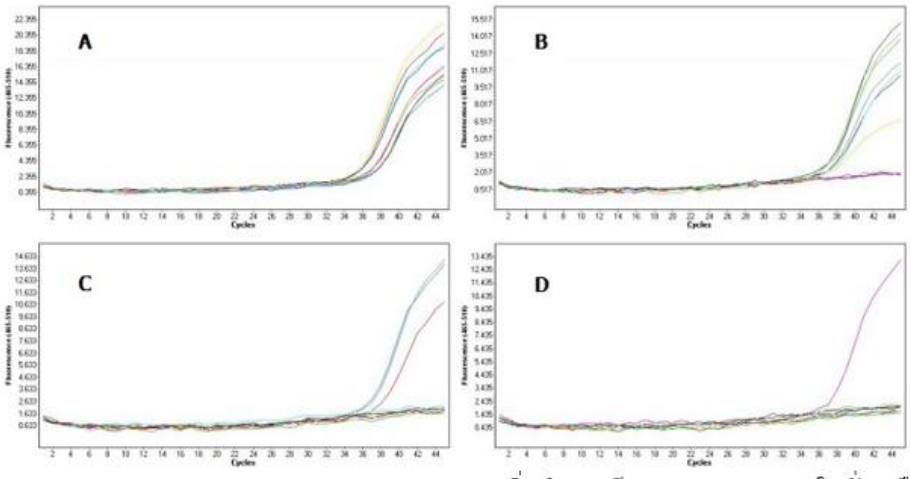
ในส่วนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 ยีน even-specific ในแต่ละระดับความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีน ให้กราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification curve) ด้วยวิธี real-time PCR ดังนี้



กราฟ A, B, C และ D แสดง amplification curve ของการเพิ่มจำนวนยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 ที่มีจำนวน copy ยีน 100, 20, 10 และ 1 ตามลำดับ

จากกราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 4 กราฟ พบว่า เครื่อง real-time PCR สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างที่มียีน event-specific จำนวน 100, 20 และ 10 copy ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มีจำนวน 1 copy พบว่า เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฯ ได้ครบทุกซ้ำ ดังนั้น ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยวิธี real-time PCR คือ 10 copy ของยีน หรือร้อยละ 0.05 (copy/copy%) เมื่อเทียบกับ lectin ยีนจำนวน 21,645 copy (ดูสมการที่ใช้คำนวณ %LOD ในข้อ 7.2.4) ซึ่งแตกต่างไปจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิงเล็กน้อย (ร้อยละ 0.045)

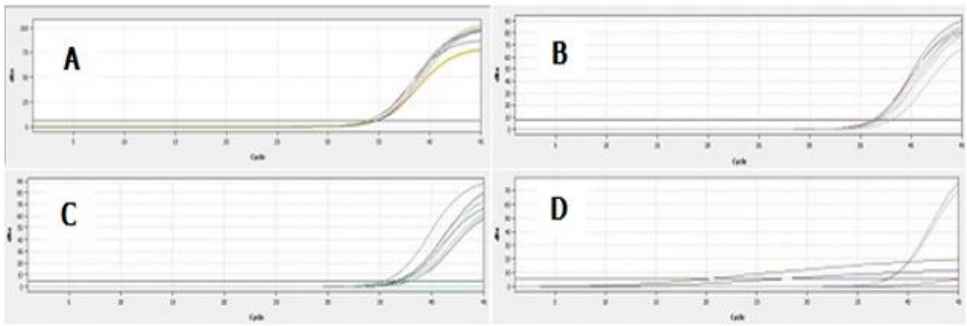
สำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 นั้น ยีน even-specific ในแต่ละระดับความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีน ให้กราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification curve) ด้วยวิธี real-time PCR ดังนี้



กราฟ A, B, C และ D แสดง amplification curve ของการเพิ่มจำนวนยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 ที่มีจำนวน copy ยีน 100, 20, 10 และ 1 ตามลำดับ

จากกราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 4 กราฟ พบว่า เครื่อง real-time PCR สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างที่มียีน event-specific จำนวน 100 copy ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มี copy ยีน จำนวน 20, 10 และ 1 copy พบว่า เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฯ ได้ครบทุกซ้ำ ดังนั้น ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยวิธี real-time PCR คือ 100 copy ของยีน หรือร้อยละ 0.5 (copy/copy%) เมื่อเทียบกับ lectin ยีนจำนวน 21,645 copy อย่างไรก็ตาม ค่า LOD ที่ได้จากวิธีการดัดแปลงนี้แตกต่างจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.04) พอสมควร ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากวิธีการดัดแปลงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ (10 ng/uL) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในวิธีการอ้างอิง (ไม่เกิน 100 ng/uL) (ดูข้อมูลในตารางที่ 2 เพิ่มเติม)

ในส่วนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ยีน event-specific ในแต่ละระดับความเข้มข้นหรือจำนวน copy ของยีน ให้กราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (amplification curve) ด้วยวิธี real-time PCR ดังนี้



กราฟ A, B, C และ D แสดง amplification curve ของการเพิ่มจำนวนยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ที่มีจำนวน copy ยีน 100, 20, 10 และ 1 ตามลำดับ

จากกราฟการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้ง 4 กราฟ พบว่า เครื่อง real-time PCR สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างที่มียีน event-specific จำนวน copy 100 และ 20 ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มี copy ดีเอ็นเอจำนวน 10 และ 1 พบว่า เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฯ ได้ครบทุกซ้ำ ดังนั้น ความเข้มข้นหรือจำนวน copy ดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือโดยวิธี real-time PCR คือ 20 หรือร้อยละ 0.1 (copy/copy%) เมื่อเทียบกับ lectin ยีนจำนวน 21,645 copy อย่างไรก็ตาม ค่า LOD ที่ได้จากวิธีการดัดแปลงนี้แตกต่างจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.04) พอสมควร เช่นเดียวกันกับการตรวจวัดค่า LOD ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ค่าพารามิเตอร์ต่างที่ตรวจวัดได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ สำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 14 ดังนี้

ตารางที่ 14 สรุปค่าพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043

พารามิเตอร์	ค่าที่วัดได้ในห้องปฏิบัติการ						ค่าปกติ*
	MON89788		DP305423		DP356043		
	ยีน endogenous	ยีน event-specific	ยีน endogenous	ยีน event-specific	ยีน endogenous	ยีน event-specific	
Linearity:							
R^2	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999	0.98-1.000
Slope	-3.48	-3.52	-3.62	-3.40	-3.73	-3.68	-3.1 ถึง -3.6
PCR efficiency	97.10%	96.35%	94.70%	102.90%	87.50%	88.50%	95% - 105%
Accuracy และ precision:							
%Bias	-	4.75%	-	6.82%	-	10.33%	±25%
Relative standard deviation (RSD)	5.11%	5.99%	9.10%	14.56%	9.20%	16.52%	<25%
Repeatability:							
Relative repeatability standard deviation (RSDr)	4.24%	3.32%	1.75%	3.99%	4.55%	2.35%	<25%
Limit of quantification (LOQ)	-	0.10%	-	0.50%	-	0.50%	-
Limit of detection (LOD)	-	0.05%	-	0.50%	-	0.10%	-

*Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL)

จากข้อมูลในตารางที่ 14 สามารถสรุปได้ว่า ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 อยู่ในช่วงค่าปกติทั้งหมด

ในส่วนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 นั้น พารามิเตอร์ของความเป็นเส้นตรง (Linearity) ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติ ซึ่งได้แก่ ความชัน (slope) และ PCR efficiency ของยีน endogenous นอกจากนี้ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ก็มีความชันและ PCR efficiency ของทั้งยีน endogenous และยีน event-specific ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติเช่นกัน โดยอาจมีสาเหตุตามที่ได้กล่าวมาแล้วในผลการทดลองและวิจารณ์

นอกจากพารามิเตอร์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากวิธีการดัดแปลงก็แตกต่างไปจากที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง โดยเฉพาะค่า LOD และ LOQ ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 และ DP356043

หากต้องนำวิธีการดัดแปลงนี้ไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการ อาจต้องเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นเพื่อให้ได้ค่า LOD และ LOQ ใกล้เคียงกับที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ (method validation) ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON89788 DP305423 และ DP356043 โดยวิธี Real-time PCR

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี):-

12. เอกสารอ้างอิง

Arumuganathan, K, and Earle E. D., 1991, Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species, Plant Molecular Biology Reporter, Volume 9(3), Page 208-218

Charles Delobel C., Bogni A., Pinski G., Mazzara M., Van Den Eede G, 2008, "Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON89788 - Validation Report and Protocol", European commission, Joint research center

Chloe Pavely, Maria Fedorova, Natalie Weber, 2006, Petition for the Determination of Nonregulated Status for High Oleic 305423 Soybean, Pioneer Hi-Bred International, Inc, Johnston, Iowa, USA

Jiaying J. Meyer, Michael Horak, Eric Rosenbaum, Ronald Schneider, 2006, Petition for the Determination of Nonregulated Status for Roundup RReady2Yield™ Soybean MON 89788, Monsanto Company, Missouri, USA

Mazzara M., Munaro B., Grazioli E., Savini C., Charles Delobel C., Van Den Eede G, 2009, "Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol", European commission, Joint research center,

Mazzara M., Munaro B., Grazioli E., Savini C., Charles Delobel C., Van Den Eede G., 2009, "Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-356043-5 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol", European commission, Joint research center

MiniWebtool©2004, http://www.miniwebtool.com/relative-standard-deviation-calculator/

Lotte Hougs and Jana Žel, 2011, Verification of Analytical Methods for GMO Testing when Implementing Interlaboratory Validated Methods: Guidance Document from the European Network of GMO Laboratories (ENGL), European Commission : Joint Research Centre : Institute for Health and Consumer Protection

Tracy A. Rood, Natalie Weber, Annie Tang Gutsche, Padma Commuri, Maria Fedorova, 2006, Petition for the Determination of Nonregulated Status for Herbicide Tolerant 356043 Soybean, Pioneer Hi-Bred International, Inc, Johnston, Iowa, USA

13. ภาคผนวก:-