



รายงานโครงการวิจัย

พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม
Development on Techniques of Detecting of GM Plant

หัวหน้าโครงการวิจัย
นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
MRS. Khanitha Wongwathanarat

มีนาคม
ปี พ.ศ. ๒๕๖๓



รายงานโครงการวิจัย

พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม
Development on Techniques of Detecting of GM Plant

หัวหน้าโครงการวิจัย
นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
MRS. Khanitha Wongwathanarat

มีนาคม
ปี พ.ศ. ๒๕๖๓

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	iv
ผู้วิจัย	v
บทนำ	1
หลักการและเหตุผล	1
วัตถุประสงค์ของการโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทคัดย่อ	7
กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล	10
การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์ แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR	11
บทคัดย่อ	11
คำนำ	12
วิธีดำเนินการ	14
ผลการทดลองและวิจารณ์	22
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	45
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	46
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	50
การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	53
บทคัดย่อ	53
คำนำ	54
วิธีดำเนินการ	55
ผลการทดลองและวิจารณ์	58
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	66
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	67
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การทดลองที่ 1.3 วิจัยพัฒนาการตรวจ GM Construct specific เพื่อจำแนกมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรม	70
บทคัดย่อ	70
คำนำ	71
วิธีดำเนินการ	73
ผลการทดลองและวิจารณ์	84
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	105
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	105
เอกสารอ้างอิง	106
การทดลองที่ 1.4 วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR	108
บทคัดย่อ	108
คำนำ	109
วิธีดำเนินการ	110
ผลการทดลองและวิจารณ์	118
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	132
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	133
เอกสารอ้างอิง	133
การทดลองที่ 1.5 ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี Multiplex real-time PCR	137
บทคัดย่อ	137
คำนำ	138
วิธีดำเนินการ	138
ผลการทดลองและวิจารณ์	142
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	155
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	156
เอกสารอ้างอิง	156

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรัมวิทยา	159
การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม	160
บทคัดย่อ	160
คำนำ	161
วิธีดำเนินการ	163
ผลการทดลองและวิจารณ์	169
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	184
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	184
เอกสารอ้างอิง	185
ภาคผนวก	186
กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์	188
การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal Antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance	189
บทคัดย่อ	189
คำนำ	190
วิธีดำเนินการ	192
ผลการทดลองและวิจารณ์	198
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	210
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	211
เอกสารอ้างอิง	211
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	214

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มีระยะเวลาเริ่มต้น 2559 และ สิ้นสุด 2562 รวม 4 ปี โดยเล็งเห็นประโยชน์การดูแลสินค้าเกษตรนำเข้า ส่งออก ในเรื่องคุณภาพสินค้าเกษตรไม่ให้เป็นพืช GMOs ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องวิจัยพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจสอบพืชที่อาจมีการนำเข้า ส่งออก และตรวจติดตามการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตรตามพระราชบัญญัติกักพืชและสร้างมาตรการควบคุม และตรวจสอบการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรม ซึ่งกรมวิชาการเกษตรเป็นผู้กำกับดูแลและควบคุมพันธุ์พืชที่มีการตัดต่อยีนให้ได้อย่างทันทั่วถึงและมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้เข้ากับภาวะการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของโลกในปัจจุบัน

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้ และกรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ทั้งครุภัณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ และสาธารณูปโภคตลอดในการดำเนินการวิจัยจนลุล่วงด้วยดี รวมทั้งคณะผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ได้เสียสละเวลาในการให้ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ และแนวทางปรับปรุงแก้ไข จนสามารถดำเนินงานได้ตามวัตถุประสงค์

ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และคณะ
มีนาคม 2563

ผู้วิจัย

1. นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ หัวหน้าโครงการวิจัย
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม
หน่วยงาน: สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
โทรศัพท์ 08-6026-1346
โทรสาร 0-2579-1533
อีเมลล์ kwongwath@yahoo.com
2. นายธีระ ชูแก้ว
สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร
3. นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
4. นายพงศกร สรรค์วิทยากุล
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
5. นางสาวปิยนุช ศรชัย
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
6. นางสาวฐิติรัตน์ อัครวมงคลศิริ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
7. นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล
ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว
8. นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

จากข้อมูลขององค์การ International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) พบว่าในปี 2559 (ค.ศ. 2016) มี 28 ประเทศที่มีการปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมครอบคลุมพื้นที่ถึง 1,123 ล้านไร่ (444 ล้านเอเคอร์) จัดเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา (Developing) 20 ประเทศ และประเทศอุตสาหกรรม (Industrial) 8 ประเทศ และประเทศที่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อใช้ประโยชน์แต่ไม่อนุญาตให้ปลูกทั้งหมด 31 ประเทศรวมถึงประเทศไทย ซึ่งประเทศที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในโลก สามอันดับแรก คือ สหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา โดยในปัจจุบันมียีนพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Genetically modified event; GM event) เพิ่มขึ้นเป็น 404 event แบ่งเป็น พืชไร่เศรษฐกิจ (Crops) 356 events ไม้ผล (Fruits) 22 events ไม้ยืนต้น (Trees) 23 events และไม้ดอกไม้ประดับ (ornamental) 3 events โดยพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่นิยมปลูกมากเป็น 5 อันดับแรก ได้แก่ ข้าวโพด (148 event) ฝ้าย (58 event) มันฝรั่ง (45 event) คาโนลา (38 event) และถั่วเหลือง (34 event) (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: ISAAA, 2016) ประเทศที่อนุญาตปลูก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล แคนาดา อินเดีย และ จีน สำหรับประเทศในแถบเอเชียที่อนุญาตปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมเชิงการค้าแล้ว ได้แก่ อินเดีย (ฝ้าย) จีน (ฝ้าย มะละกอ poplar มะเขือเทศ sweet pepper) ปากีสถาน (ฝ้าย) ฟิลิปปินส์ (ข้าวโพด) เมียนมาร์ (ฝ้าย) อินโดนีเซีย (อ้อย) และเวียดนาม (ข้าวโพด)

ประเทศไทยเป็นประเทศผลิตสินค้าเกษตรที่สำคัญสินค้าเกษตรหลักที่ส่งออกได้แก่ ข้าว ยางพารา อ้อย ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน มันสำปะหลัง เป็นต้น ส่งออกทั้งในรูปผลิตภัณฑ์ผลสด และผลิตภัณฑ์แปรรูปโดยปี 2555 ประเทศไทยมีมูลค่าสินค้าส่งออกทั้งหมด 7,091,162 ล้านบาทเป็นสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์ 1,349,335 ล้านบาทซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มสินค้าเกษตรและอาหาร 993,861 ล้านบาทกลุ่มสินค้าเกษตรเพื่ออุตสาหกรรม 355,474 ล้านบาทสินค้านอกการเกษตรมีมูลค่า 5,741,827 ล้านบาท(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) อย่างไรก็ตามประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาในเรื่องการตรวจพบการปนเปื้อนพืช GMOs ในสินค้าเกษตรของไทย และนับวันทวีมากขึ้น เช่น ในปี 2550 ประเทศจีนตรวจพบการปนเปื้อน GMOs ในข้าวไทย ปี 2552 สหภาพยุโรปตรวจพบการปนเปื้อนข้าว Bt63 ในเส้นก๋วยเตี๋ยวที่นำเข้าจากประเทศไทย ปี 2555-57 สหภาพยุโรปตรวจพบมะละกอ GMOs นำเข้าจากประเทศไทย และ ปี 2556 ญี่ปุ่นตรวจพบการปนเปื้อนมะละกอ GMOs ในผลิตภัณฑ์อาหารที่นำเข้าจากประเทศไทย จนเป็นเหตุให้เกิดการระงับการส่งออกจนทำให้เกิดผลกระทบต่อภาพลักษณ์ของประเทศไทยและรายได้จากการค้า เป็นต้น

ดังนั้นหากจะรักษามาตรฐานสินค้าเกษตรไทย เพื่อให้เป็นที่เชื่อถือของประเทศคู่ค้าโดยเฉพาะกรณีการปนเปื้อนของพืช GMOs จำเป็นที่ประเทศไทยต้องมีเทคโนโลยีการตรวจสินค้าพืช GMOs ที่มีประสิทธิภาพแม่นยำ รวดเร็ว และมีมาตรฐานการตรวจสอบเป็นที่ยอมรับ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้กับประเทศคู่ค้า

นอกจากนี้ยังมีปัญหาในเรื่องการนำเข้าสินค้าเกษตร ซึ่งได้แก่เมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้ามาขาย หรือปลูกในประเทศไทยในปัจจุบันได้มีการตรวจพบการปนเปื้อนพืชตัดแปรพันธุกรรมกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้ามาจากประเทศฟิลิปปินส์, ปากีสถาน, อินเดีย และ สหรัฐอเมริกา หลายครั้งรวมทั้งปี 2553 ประเทศไทยต้องเปิดการค้าเสรี และสินค้าเกษตรจากต่างประเทศได้นำเข้ามาปริมาณมากขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดความเสี่ยงที่พืชตัดแปรพันธุกรรมอาจเล็ดลอดเข้ามาแพร่กระจายในประเทศไทย

จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายให้ดูแลสินค้าเกษตรนำเข้าส่งออก และดูแลในเรื่องคุณภาพสินค้าเกษตรไม่ให้ปนเปื้อนพืช GMOs ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องวิจัยพัฒนา

ด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจสอบพืชที่อาจมีการนำเข้า ส่งออก และตรวจติดตามการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตรตามพระราชบัญญัติกักพืชและสร้างมาตรการควบคุม และตรวจสอบการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรม ซึ่งกรมวิชาการเกษตรเป็นผู้กำกับดูแลและควบคุมพันธุ์พืชที่มีการตัดต่อยีนให้ได้อย่างทันทั่วทั้งที่มีประสิทธิภาพ และเพื่อให้เข้ากับภาวะการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของโลกในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจรับรองสินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรมให้ได้ตามมาตรฐานสากล และรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นมาตรฐานของ ISO/IEC17025 และเพิ่มศักยภาพในการตรวจสอบรับรองสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร
2. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน เพื่อใช้คัดกรองคุณภาพพืช GMOs ในภาคสนาม หรือสามารถติดตามการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็วตลอดจนภาคเอกชนสามารถคัดกรองวัตถุดิบ ได้แก่ พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้านทานสารกำจัดวัชพืช
3. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลแบบไบโอเซนเซอร์ด้วยเทคนิค ปฏิกริยาการสั่นของอนุภาคควอนตัมแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว (Surface Plasmon Resonance) ได้แก่ การวิจัยพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII กับโพลีโคบอล แอนติบอดี เพื่อพัฒนาเป็น Protein chip ใช้ในการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 3 กิจกรรมคือ

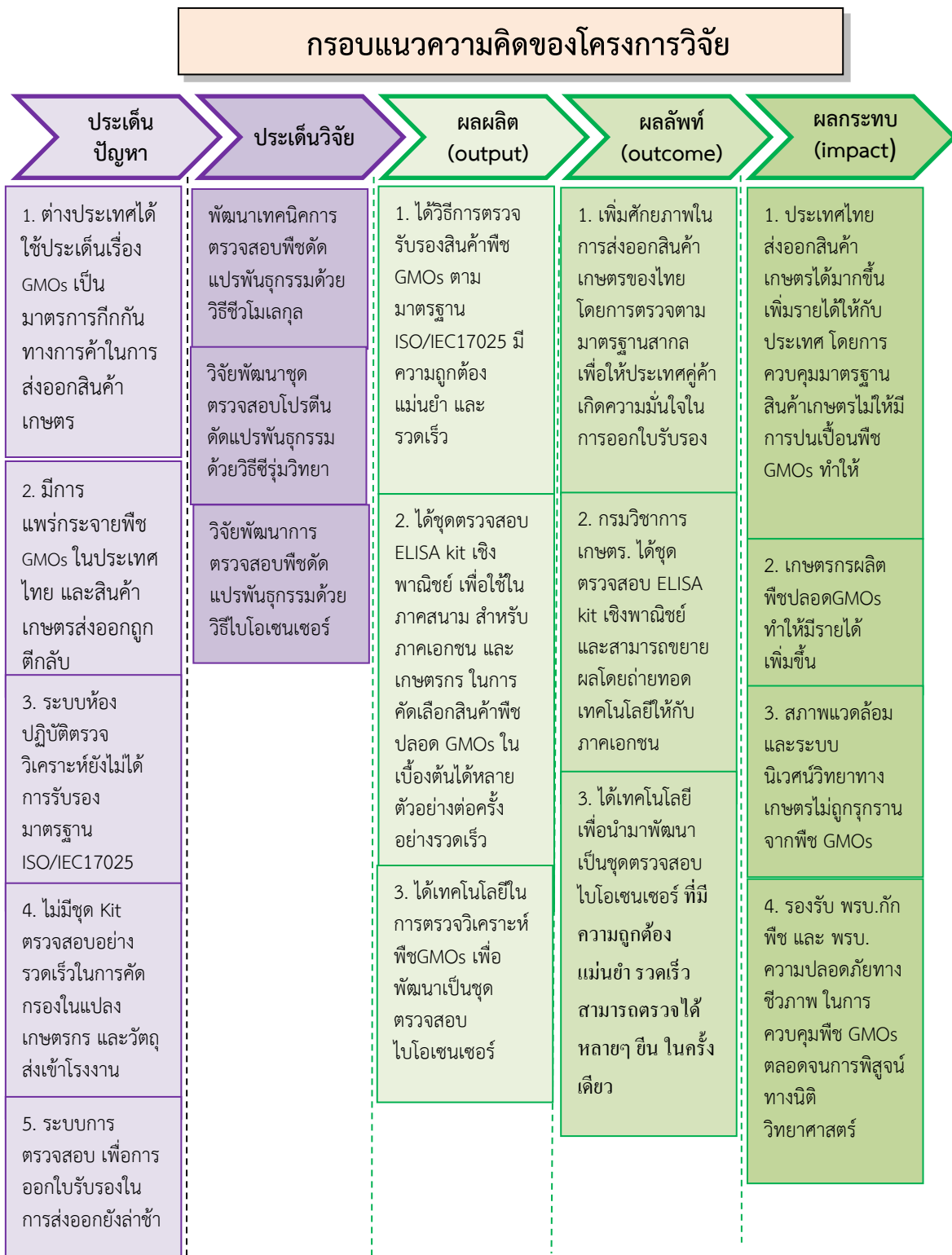
กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล เป็นการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สินค้าเกษตรรูปแบบต่างๆ เพื่อให้ได้คุณภาพดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ตรวจจำแนกทางชีวโมเลกุล การศึกษาดีเอ็นเอตัวตรวจ (primers และ probes) รวมถึงการออกแบบเพื่อใช้จำแนกยีนที่มีความจำเพาะเจาะจง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ Real-time PCR และการพัฒนาการตรวจแบบ Multiplex Real-time PCR รวมไปถึงการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification

กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรัมวิทยา เป็นการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมโดยการสังเคราะห์ยีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม แล้วโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด expression vector จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์โปรตีนตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน ทำโปรตีนบริสุทธิ์ให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายในลักษณะผงแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจง (specificity) และค่าความเจือจาง (dilution) ของโปรตีนที่ยังคงทำปฏิกริยากับแอนติบอดี CP4EPSPS เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีนถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม (ELISA kit) ในเชิงพาณิชย์โดยนำ recombinant protein CP4EPSPS ที่บริสุทธิ์มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดี CP4EPSPS มาใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการแสดงผลการวิเคราะห์ถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้าชุด ELISA kit จาก

ต่างประเทศ พร้อมทั้งผลักดันองค์ความรู้การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA สู่ภาคเอกชน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์
เป็นการศึกษาวิธีการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance โดยผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก ยีน *nptII* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตโพลีโคลนอล แอนติบอดีโดยกระตุ้นด้วยแอนติเจนสังเคราะห์จากยีน *nptII* ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิด Interaction ระหว่าง โพลีโคลนอล แอนติบอดีและ โปรตีนNPTII โดยเทคนิค Surface Plasmon Resonance นำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูป และโปรตีนชิปเพื่อตรวจจับโปรตีน NPTII

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย



ยุทธศาสตร์การวิจัยด้านอาหารและความมั่นคงด้านอาหารแห่งชาติ/
การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ

โครงการวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปร

เป้าหมาย:1. ได้วิธีการตรวจรับรอง
สินค้าพืช GMOs ตามมาตรฐาน
ISO/IEC17025 มีความถูกต้อง
แม่นยำ และรวดเร็ว

เป้าหมาย:2. ได้ชุดตรวจสอบ ELISA
kit เชิงพาณิชย์อย่างรวดเร็ว เพื่อใช้ใน
ภาคสนาม

เป้าหมาย:3. ได้เทคโนโลยีในการ
ตรวจวิเคราะห์พืชGMOs เพื่อพัฒนา
เป็นชุดตรวจสอบไบโอเซนเซอร์

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการ
ตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม
ด้วยวิธีชีวโมเลกุล

กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุด
ตรวจสอบโปรตีนตัดแปรพันธุกรรม
ด้วยวิธีซีรัมวิทยา

กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการ
ตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม
ด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์

การตรวจสอบการปนเปื้อนของ
มะละกอดัดแปรพันธุกรรมและ
ผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิคReal-
time PCR

การตรวจสอบข้าวโพดตัดแปร
พันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ
NK603ด้วยเทคนิค Loop-
mediated Isothermal
Amplification (LAMP)

วิจัยพัฒนาการตรวจ GM Construct
specific เพื่อจำแนกมะละกอดัดแปร
พันธุกรรม

วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพด
ตัดแปรพันธุกรรม Mon 810 และ
NK603 ด้วยเทคนิคMultiplex Real-
time PCR

ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจ
วิเคราะห์ CaMV 35S promoter
และ Nos terminator ด้วยวิธี
Multiplexreal-time PCR

การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิง
พาณิชย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4
EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปร
พันธุกรรม

การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย
Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค
Surface Plasmon Resonance

ภาพความเชื่อมโยงของโครงการวิจัย และกิจกรรม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย และฐานข้อมูลในการใช้ประโยชน์ ต่อไป
 - ได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับมะละกอและผลิตภัณฑ์ของมะละกอที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่ได้มาตรฐาน
 - ได้โปรตีนมาตรฐานที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรตีนควบคุมของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA
 - สามารถนำข้อมูลไปพัฒนาต่อยอดในการพัฒนาโปรตีน Chip และ AptasensorChip เพื่อใช้ตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมได้
 - สามารถนำข้อมูลไปพัฒนาต่อยอดในการพัฒนาชุดตรวจสอบชนิด Portable เพื่อการตรวจสอบ On-site ได้
 - สามารถนำงานวิจัยไปพัฒนาเป็น Validate Protocol ในการตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรมได้
 - ได้เทคโนโลยีและเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนโปรตีน NPTII (ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ GMOs ได้) ที่มีความจำเพาะเจาะจงและรวดเร็ว
 - ได้เทคนิคการตรวจข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ทานทานสารกำจัดวัชพืช NK603 และต้านทานแมลง MON810 ที่สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในพื้นที่ภาคสนาม สำหรับเจ้าหน้าที่และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และยังสามารถนำไปประยุกต์พัฒนาร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR ช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์และเพิ่มความไวในการตรวจสอบ
2. เป็นประโยชน์ต่อกลุ่มเป้าหมายและสามารถนำไปใช้ประโยชน์
 - ได้วิธีการตรวจสอบมะละกอตัดแปรพันธุกรรม เพื่อใช้ในการรับรองการส่งออก
 - จัดทำเอกสารขั้นตอนการปฏิบัติงาน และวิธีทดสอบ สำหรับถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้กับเจ้าหน้าที่ทดสอบของห้องปฏิบัติการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาในเรื่องการตรวจพบการปนเปื้อนพืช GMOs ในสินค้าเกษตรของไทย และต่างประเทศได้ใช้ประเด็นเรื่อง GMOs เป็นมาตรการกีดกันทางการค้าในการส่งออกสินค้าเกษตร ดังนั้นประเทศไทยจำเป็นต้องมีระบบตรวจสอบย้อนกลับที่มีประสิทธิภาพ และได้มาตรฐาน เพื่อควบคุมสินค้าเกษตรทั้งการนำเข้าส่งออก และการผลิตสินค้าเกษตรให้ปลอดภัยการปนเปื้อนพืช GMOs จึงจำเป็นต้องวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม โดยมีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจรับรองสินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรมให้ได้ตามมาตรฐานสากล และรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นมาตรฐานของ ISO/IEC17025 และเพิ่มศักยภาพในการตรวจสอบรับรองสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร (2) เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนเพื่อใช้คัดกรองคุณภาพพืช GMOs ในภาคสนาม หรือสามารถติดตามการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็วตลอดจนภาคเอกชนสามารถคัดกรองวัตถุดิบ (3) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลแบบไบโอเซนเซอร์ เพื่อพัฒนาเป็น Protein chip ใช้ในการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 3 กิจกรรม ได้แก่

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล ประกอบด้วย 5 การทดลอง ได้แก่ 1.1) การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC; 1.2) วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon 810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ;1.3) ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี Multiplex real-time PCR ซึ่งทั้ง 3 การทดลองนี้ (1.1, 1.2 และ 1.3) เป็นการตรวจสอบรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรในการขอรับรอง ISO/IEC17025 และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจให้รวดเร็ว; 1.4) การตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เป็นวิธีการตรวจภาคสนามอย่างง่าย และรวดเร็ว และ 1.5) การพัฒนาเทคนิคการตรวจจำแนกมะละกอตัดแปรพันธุกรรม เป็นการพัฒนาเทคนิคเพื่อจำแนกสายพันธุ์มะละกอ GMOs

กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรัมวิทยา มี 1 การทดลอง คือ การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิซย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม ผลการวิจัยได้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิซย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม ชุดตรวจได้ใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิซย์กับวิธี Real-time PCR พบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิซย์มีค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบร้อยละ 90

กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์ มี 1 การทดลอง คือ การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance เทคนิคนี้สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 µg/ml หรือ 5 ng/µl แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี เทคนิคนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

Abstract

Thailand has started to encounter problems in detecting genetically modified (GM) plant contamination in Thai agricultural products. Foreign countries use GMOs as a measure to prevent trade in exports of agricultural products. Therefore, Thailand needs to have a standard and efficient traceability system in order to control agricultural products both import and export and the production of agricultural products to be free from contaminated GM plants. It is needed to research and develop techniques for examining GM plants with the objective (1) to develop methods for certification of transgenic plant products to meet international standards, accrediting laboratory to be a standard of ISO / IEC17025 and increase the capability of agricultural product inspection for export and import of agricultural products. (2) to develop protein based detection kits for screening the quality of GM plants in the field or for quickly tracking the spread of transgenic plants in the field, including screening raw materials by the ability of the private sector itself. (3) to develop bio-molecular analysis technology using biosensors through a protein chip for rapid and accurate detection of transgenic plants. This research project consists of 3 activities which are

Activity 1 Develop a technique for examining genetically modified plants using biomolecules. This activity consists of 5 experiments which are 1.1) Detection of GM papaya contamination and processed products by Real-time PCR technique as results the optimum DNA extraction method of papaya samples and processed papaya products and the methods for analysis of GM papaya, strains 55-1 and PRSV-SC were obtained; 1.2) Research, Development and Analysis of GM Corn Mon 810 and NK603 with Multiplex Real-time PCR; 1.3) Validation of screening methods for CaMV35S promoter and Nos terminator of GM corn using Multiplex real-time PCR. Experiment 1.1, 1.2 and 1.3 are the inspection and certification of agricultural products for export and import of agricultural products in requesting the certification of ISO / IEC17025 and increase the efficiency of the inspection quickly; 1.4) Detection of GM Corn Mon810 and NK603 by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique which is a quick and easy method of field inspection and 1.5) Development of techniques for identification of GM papaya. It is a technique developed to identify papaya varieties of GMOs.

Activity 2 Research and development on GM plant protein screening kits by serology method. It consists of 1 experiment which is development of commercial ELISA test kit for the detection of CP4EPSPS protein of transgenic soybean. The research results obtained a commercial prototype ELISA test kit for the detection of CP4EPSPS protein in GM soybeans. The test kit takes no more than 5 hours to inspect all steps. When comparing the performance of the commercial prototype ELISA test kit with Real-time PCR, It was found that the ELISA test kit has 90 percent accuracy of the inspection.

Activity 3 Research and development on inspection of GM plants using biosensors. This activity consists of 1 experiment which is development of detecting NPTII protein by polyclonal

antibody using Surface Plasmon Resonance technique. This technique can detect proteins up to a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ or 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$. It is demonstrated the effectiveness of the protein chip that could bind to the target molecules at low doses was very well. This technique can be a prototype for the development of the detection kit further

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล

ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR

หัวหน้าการทดลองที่ 1.1	นายธีระ ชูแก้ว	สังกัด	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สังกัด	ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว
	นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพรงพง	สังกัด	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค

Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

หัวหน้าการทดลองที่ 1.2	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวปิยนุช ศรชัย	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวฐิติรัตน์ อัครมงคลศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 1.3 วิจัยพัฒนาการตรวจ GM Construct specific เพื่อจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

หัวหน้าการทดลองที่ 1.3	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สังกัด	ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว

การทดลองที่ 1.4 วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 810 และ NK603 ด้วยเทคนิค

Multiplex Real-time PCR

หัวหน้าการทดลองที่ 1.4	นางสาวปิยนุช ศรชัย	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวฐิติรัตน์ อัครมงคลศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายธีระ ชูแก้ว	สังกัด	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

การทดลองที่ 1.5 ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี Multiplex real-time PCR

หัวหน้าการทดลองที่ 1.5	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวปิยนุช ศรชัย	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวฐิติรัตน์ อัครมงคลศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอตัดแปรรูปพันธุ์กรรมและผลิตภัณฑ์แปรรูป
ด้วยเทคนิค Real-time PCR

Detection of Genetically Modified Papaya and Processed Papaya Products
with Real-Time PCR

ธีระ ชูแก้ว^{1/} ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล^{2/} ศรีเมฆ ชาวโพงพาง^{3/}
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจสอบมะละกอตัดแปรรูปพันธุ์กรรมทั้งการตรวจสอบเชิงปริมาณและคุณภาพ ส่วนใหญ่เป็นการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ย่อมส่งผลต่อวิธีการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป การทดลองนี้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้แก่ ผลมะละกอสุก ผลมะละกอดิบ เมล็ดมะละกอ ใบมะละกอสด ใบชามะละกอ แยมมะละกอ บัวยเค็มมะละกอ มะละกออบแห้งและน้ำผลไม้ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 5 วิธีคือ 2%CTAB, Guanidinium-Chloroform, GeneScan, Cell breaking และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy mericon Food Kit) เปรียบเทียบผลการสกัดระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านและไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Wizard[®] Miniprep DNA Purification พบว่า ตัวอย่างและวิธีการสกัดที่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์คือ ใบมะละกอสด เมล็ดมะละกอสกัดด้วยวิธี GeneScan ใบชามะละกอสกัดด้วยวิธี 2%CTAB ผลมะละกอดิบสกัดด้วยวิธี Cell breaking ผลมะละกอสุกสกัดด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform สำหรับวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับตัวอย่าง น้ำผลไม้ มะละกออบแห้ง บัวยเค็มมะละกอและแยมมะละกาคือ ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบยีน Papain endogenous จำนวน 5 คู่ พบว่า ทุกคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสม่ำเสมอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่อ่านได้จากกราฟความเข้มข้นมาตรฐานกับความเข้มข้นในช่วงที่กำหนดมีความถูกต้องและแม่นยำ สำหรับค่าความแม่นยำ (Accuracy, %Bias) ค่าความเที่ยง (Precision, %RSD) ค่าความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability, RSD^I) และความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility, RSD^R) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC พบว่า อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยอยู่ในช่วงค่าไม่เกิน 25% แสดงว่า วิธีทดสอบมีความเหมาะสมและเป็นไปตามที่ข้อกำหนดระบุ ค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) และความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) ของการตรวจวิเคราะห์มะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ 12.5 copies และ 125 copies ตามลำดับ

1/ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

2/ ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว

3/ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

Abstract

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

คำนำ

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

ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2558 ประเทศไทยได้รับการแจ้งเตือนจากสหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและเกาหลี เรื่อง การตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่นำเข้ามาจากประเทศไทยจำนวน 43 ครั้ง และในปี 2559 ประเทศไทยก็ ได้รับการแจ้งเตือนจากญี่ปุ่นและเกาหลี 5 ครั้งซึ่งเป็นการแจ้งเตือนการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมใน ผลิตภัณฑ์แปรรูป นอกจากนี้สหภาพยุโรปได้ประกาศผ่านระบบเตือนภัยด้านอาหารและอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) เกี่ยวกับมะละกอนำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งนอกจากส่งผลกระทบต่อ การส่งออกมะละกอของไทยแล้ว สินค้าไทยอื่นๆ ยังถูกเพ่งเล็งและต่างประเทศยังขาดความเชื่อมั่น กับระบบการจัดการในการแก้ปัญหาการแพร่กระจายพืชดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทย (RASFF, 2015; RASFF, 2016) นอกจากนี้ Nakamura *et al.* (2014) จำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สามารถระบุ สายพันธุ์ได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์มะละกอบแห้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งวางจำหน่ายในท้องตลาดของ ประเทศญี่ปุ่นด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการจำแนกพบว่า เป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ จากประเทศไทยที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของเวกเตอร์และยีน *cp* ที่ต้านทานต่อไวรัส PRSV ซึ่งมีความคล้ายคลึง กับสายพันธุ์สมุทรสาครจึงให้ชื่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ว่า PRSV-SC

ปัจจุบันกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ออกประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ การส่งออกนอก ราชอาณาจักรไปยังประเทศในสหภาพยุโรป นอร์เวย์ สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์และสาธารณรัฐ ประชาชนจีน ต้องดำเนินการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และการส่งออกไปยังญี่ปุ่น ต้องดำเนินการตรวจยีนจำเพาะของพืชดัดแปรพันธุกรรม (Event-specific) เพิ่มเติมจากยีนดังกล่าวด้วย (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) สำหรับการนำเข้ามะละกอก็เช่นเดียวกัน ด้านตรวจพืชต้อง มีการตรวจคุมเข้มเพื่อป้องกันการลักลอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเข้ามาในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็น ที่จะต้องหาวิธีตรวจสอบเพื่อป้องกันและเฝ้าระวังมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ การส่งออก มะละกอของไทยได้

การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบเชิงปริมาณหรือ การตรวจสอบเชิงคุณภาพ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอถือว่าเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญที่สุดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่ เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป (Tan *et al.*, 2013) เนื่องจากการเลือก วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสม ย่อมส่งผลกระทบต่อกระบวนการตรวจวิเคราะห์ได้ (Kwon *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม วิธีการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปมีงานวิจัยที่เผยแพร่ค่อนข้างน้อย ถึงแม้ว่ามีการรายงานวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเผยแพร่ แต่ก็ยังไม่ครอบคลุมทุกผลิตภัณฑ์ ของมะละกอแปรรูป (Nakamura *et al.*, 2013; Ohmori *et al.*, 2013) นอกจากนี้ในขั้นตอนการตรวจ วิเคราะห์การปนเปื้อนนั้น ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายเรื่องใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของ พลาสมิดเป็น วัสดุอ้างอิงเพื่อตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม เช่น Wang *et al.* (2011) สร้างพลาสมิดมาตรฐาน pTLE8 ที่มี ส่วนของยีน *Lecl*, *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *PAT*, *RRS*, *CryIA(c)*, *SadI*, *RRS*, *EPSPS* ตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดและฝ้ายดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR Kim *et al.* (2015) พัฒนาพลาสมิดมาตรฐาน pGEM-PAPAYA3 เพื่อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ได้แก่ 55-1, 16-0-1 และ Huanong No.1 โดยพลาสมิดมาตรฐานมีข้อดีเมื่อ เปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิงของพืชดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบผงที่เรียกว่า Certified Reference Material (CRM) คือ พลาสมิดมาตรฐานสามารถตรวจสอบยีนจำเพาะที่ต้องการได้หลายยีนในพลาสมิดมาตรฐาน 1 ชนิด จึงทำให้งานวิจัยการใช้พลาสมิดมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เพิ่มขึ้น

สำหรับวัสดุอ้างอิงของมะละกอที่มีการจำหน่ายในรูปแบบพลาสมิดมาตรฐานนั้น คือ สายพันธุ์ 55-1 ซึ่ง มีราคาที่สูงมาก (ปริมาณ 50 ไมโครลิตรราคา 11,275 บาท) และไม่มียีน Endogenous ที่ใช้เป็นยีนควบคุม จึง

ตรวจได้เฉพาะยีนเป้าหมายเท่านั้น (<http://www.wonilchem.co.kr/GMO.html>) นอกจากนี้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบพลาสมิดของมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการผลิตออกมาทางการค้าหรือมีการผลิตออกมาใช้ในห้องปฏิบัติการทดสอบภายในประเทศ ทั้งๆ ที่สายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกว่ามาจากประเทศไทย ชนิษฐาและคณะ (2558) สร้างพลาสมิดมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์มะละกอตัดแปรพันธุกรรมเพื่อรองรับการออกประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ซึ่งได้ดำเนินการสังเคราะห์ชุดยีน GMOs-Hawaii และ GMOs-SC เพื่อตรวจสอบมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ โดยภายในพลาสมิดมาตรฐานประกอบด้วยยีน *CaMV35S promoter*, *NOS terminator*, *Papain endogenous* ซึ่งมีข้อดีคือสามารถตรวจยีนเป้าหมายเพื่อจำแนกสายพันธุ์ได้และสามารถตรวจยีน *Endogenous* ซึ่งเป็นยีนควบคุมได้ อีกทั้งยังสามารถตรวจคัดกรองเบื้องต้นได้อีกด้วย (Screening test)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป
2. เพื่อหาวิธีการตรวจวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ ๕๕-๑ และ PRSV-SC ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดของ GMOs-Hawaii และ GMOs-SC

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. เครื่องเจลอเล็กโทรโฟรีซิส
5. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation) (Bio-Rad)
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ
7. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิด
8. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR
9. ดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดของ GMOs-Hawaii และ GMOs-SC
10. ตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป
11. ตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองแล้ว (Certified reference material: CRM)
12. ไพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Proligo, Singapore)

วิธีการ

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

1.1 รวบรวมข้อมูลวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอและวิธีการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากวิธีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่

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

- 1.1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2%CTAB (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)
- 1.1.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan (ดัดแปลงจาก Rogers and Bendich, 1985)
- 1.1.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking (ดัดแปลงจาก Alexander *et al.*, 2007)
- 1.1.5 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform (ดัดแปลงจาก EN ISO 21571, 2005)
- 1.1.6 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification (Qiagen, 2009)

1.2 รวบรวมตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 9 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างที่รวบรวมจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรมของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้แก่ ใบมะละกอสด ผลมะละกอดิบ ผลมะละกอสุก เมล็ดมะละกอ ใบชามะละกอ มะละกอบแห้ง บัวเค็มมะละกอ แยมมะละกอ และน้ำผลไม้ที่มีมะละกอเป็นส่วนผสม

1.3 สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

นำตัวอย่างมะละกอทั้ง 9 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวบรวมได้ทั้ง 5 วิธี สกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ก่อนการสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างทั้ง 9 ชนิดมาผ่านการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเบื้องต้นแสดงในตารางที่ 1.1.1

ตารางที่ 1.1.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปก่อนการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่าง	วิธีการเตรียมเบื้องต้น	อ้างอิง
ใบมะละกอสด	บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว	Morgante <i>et al.</i> (2013)
ผลมะละกอดิบ	หั่นและสับเป็นชิ้นเล็กๆ	ดัดแปลงจาก Ovesna and Hodek, (2009)
ผลมะละกอสุก	หั่นและสับเป็นชิ้นเล็กๆ	ดัดแปลงจาก Ovesna and Hodek, (2009)
เมล็ดมะละกอ	ปั่นบดละเอียดด้วยโถปั่น	ดัดแปลงจาก Guo <i>et al.</i> (2012)
ใบชามะละกอ	บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว	Morgante <i>et al.</i> (2013)
แยมมะละกอ	ไม่ผ่านการเตรียมเบื้องต้น	Ohmori <i>et al.</i> (2013)
มะละกอบแห้ง	หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 รอบ อบที่ 65 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นบด ให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว	Kim <i>et al.</i> (2010)
บัวเค็มมะละกอ	หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 รอบ อบที่ 65 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นบด ให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว	ดัดแปลงจาก Kim <i>et al.</i> (2010)
น้ำผลไม้	ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง	Kwon <i>et al.</i> (2015)

1.4 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

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

1.5 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบประสิทธิภาพการเพิ่มยีน Papain endogenous ด้วยวิธี PCR

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำ PCR ทดสอบโดยใช้ยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1.1.2 (Bonfini *et al.*, 2007) ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสวนผสมต่อ 1 หลอดดังแสดงในตารางที่ 1.1.3 นำสวนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ ดีเอ็นเอของมะละกอ (Positive control) ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (Negative control) และใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื่อมสารละลายดีเอ็นเอ (Non template control) หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีรอบการทำ PCR ดังตารางที่ 4 แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล โดยเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification

ตารางที่ 1.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
papain 5F	GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA
papain 3R	CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC

ตารางที่ 1.1.3 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำ PCR ของคูไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาณที่ใช้ (ไมโครลิตร)
5X Green GoTaq Flexi Reaction Buffer	5
25 mM MgCl ₂	1.5
10 mM dNTP Mix	0.5
50 pmol Papain 5 Forward primer	0.5
50 pmol Papain 3 Reverse primer	0.5
5 U/μl Taq DNA Polymerase (Promega)	0.125
50 ng/μl DNA template	5
Distilled water	11.88
Total	25

ตารางที่ 1.1.4 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ของคูไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	94	5	} 40
2. Denaturation	94	0.20	
Annealing	55	0.40	
Extension	72	1	
3. Final extension	72	7	

1.6 การศึกษาประสิทธิภาพของคูไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยวิธี PCR

สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยวิธีที่เหมาะสมกับแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาข้างต้นโดยสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วย UV spectrophotometer ที่ความความคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคูไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1.1.5) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 1.1.3 และ 1.1.4 (ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยกว่า 50 ng/μl สามารถนำไปทำ PCR ได้) (Nakamura *et al.*, 2013) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล

ตารางที่ 1.1.5 ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

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

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

2.1 การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดมาตรฐาน

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

2.2 การเตรียมพลาสมิดมาตรฐานให้อยู่ในรูปเส้นตรงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

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

- ปฏิกิริยาสำหรับดีเอ็นเอมาตรฐาน GMOs-Hawaii-C1

10x NEB buffer 2	6	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-Hawaii-C1	35	ไมโครลิตร
dH ₂ O	17	ไมโครลิตร
Enzyme HindIII	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	60	ไมโครลิตร

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-SC-C1

10x NEB buffer 2	10	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-SC-C1	70	ไมโครลิตร

dH ₂ O	18	ไมโครลิตร
Enzyme HindIII	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตรวจสอบการตัดดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดให้เป็นเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1% อะกาโรสเจล แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล

2.3 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสติกมาตรฐาน

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

2.4 การคำนวณจำนวน Copy number

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

จำนวน Copy number = (ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน × 6.022×10²³) / (ขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน × 1×10⁹ × 650)

2.5 สภาพที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR

การเพิ่มปริมาณยีน Papain endogenous และยีน Event-specific (55-1 และ PRSV-SC) โดยวิธี Real-time PCR โดยดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งหมดจะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมที่ให้ผลเป็นลบใช้ดีเอ็นเอจากมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางกับดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ตัดแปรพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ได้ร้อยละความปนเปื้อนเท่ากับ 0.1% และตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบใช้ดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ตัดแปรพันธุกรรมความเข้มข้นเท่ากับ 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 μ M ไพรเมอร์ F (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 μ M ไพรเมอร์ R (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 μ M โพรบ (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
2x Light Cycler [®] 480 Probes Master (Roche, Switzerland)	10	ไมโครลิตร
DNA template 10 ng/ μ l	2.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

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

2.6 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

คัดเลือกไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับตัวอย่างมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC จากรายงานที่มีการศึกษาแล้วว่าสามารถใช้ได้และมีความจำเพาะกับตัวอย่างมะละกอสายพันธุ์ดังกล่าว ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้สังเคราะห์โดยบริษัท Sigma ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบแสดงไว้ในตารางที่ 1.1.6 เมื่อได้โพรบและไพรเมอร์มาแล้ว ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร โดยป้องกันไม่ให้โพรบที่ได้รับการติดฉลากสีสัมผัสกับแสง แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการใช้งาน

ทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบโดยใช้ตัวอย่างมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ GMOs-DOA ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอสายพันธุ์ 55-1 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอสายพันธุ์ PRSV-SC ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% มะละกอไม่ตัดแปรพันธุกรรม และทดสอบกับตัวอย่างพืชตัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ โดยใช้ CRM ของข้าวสายพันธุ์ Bt63 ข้าวโพดสายพันธุ์ GA21 TC1507 Mon863 NK603 Mon810 ถั่วเหลืองสายพันธุ์ DP305423 Mon89788 DP356043 Roundup Ready ที่มีระดับการปนเปื้อนที่ 0.1% โดยการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบเป็นการทดสอบเพื่อตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตารางที่ 1.1.6 แสดงข้อมูลไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์และโพรบ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ความยาว (bp)	อ้างอิง
55-1	55-1 P1	CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA	71	Kwon <i>et al.</i> (2015)
	55-1 P2	TCCGCCTCCATCCAGTCTATT		
	55-1 Probe	FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCAACAAT-TAMRA		
Papain	Papain-B1	AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA	91	Nageswara-Rao <i>et al.</i> (2013)
	Papain-B2	AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG		
	Papain-P	FAM-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-TAMRA		
PRSV-SC	SC-F	CATTTTCATTTGGAGAGAACACG	70	Nakamura <i>et al.</i> (2014)
	SC-R	ACCAGCATCCACAGCTTC		
	SC-P	FAM-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-TAMRA		

2.7 การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

ใช้ค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR เป็นแกน Y และค่า Log ฐาน 10 ของความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็นแกน X เพื่อสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน โดยการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นลำดับ แต่ละลำดับต่างกัน 4 เท่าในอัตราส่วน 1, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดยแต่ละลำดับทำ 3 ซ้ำ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นโดยวิธี Real-time PCR ซึ่งทำการทดลองไปพร้อมกันทุกซ้ำ และทดลองซ้ำทั้งหมด 4 รอบ บันทึกค่า Ct และจำนวน Copy number ที่ได้จากเครื่อง Real-time PCR จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct และจำนวน Copy number ในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้วคำนวณค่า [Log จำนวน Copy number] ของทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Del Gaudio *et al.*, 2012)

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

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

2.9 การวัดความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) และความสามารถในการให้ผลซ้ำ (Reproducibility)

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

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

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

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2560

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

1.1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 5 วิธีของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปพบว่า การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากที่สุดกับตัวอย่างใบมะละกอสด มะละกออบแห้งและน้ำผลไม้ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 3,313.57 ng/ μ L และ 2,624.38 ng/ μ L ตามลำดับสำหรับตัวอย่างใบมะละกอสด 14.20 ng/ μ L และ 8.83 ng/ μ L ตามลำดับสำหรับตัวอย่างมะละกออบแห้ง 217.28 ng/ μ L และ 147.33 ng/ μ L ตามลำดับสำหรับตัวอย่างน้ำผลไม้ (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform พบว่า ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากที่สุดกับตัวอย่างผลมะละกอสุก เมล็ดมะละกอและบิวยเค็มมะละกอ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 93.23 ng/ μ L และ 85.42 ng/ μ L ตามลำดับสำหรับตัวอย่างผลมะละกอสุก 278.78 ng/ μ L และ 95.63 ng/ μ L ตามลำดับสำหรับตัวอย่างเมล็ดมะละกอ 51.97 ng/ μ L และ 37.80 ng/ μ L

ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างบิวเค็มมะละกอ วิธีนี้ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอมากที่สุดกับตัวอย่างผลมะละกอสูง เมล็ดมะละกอและบิวเค็มมะละกอ เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีการเติม Chloroform: Isoamyl alcohol ถึง 2 ครั้ง ซึ่ง Chloroform: Isoamyl alcohol มีคุณสมบัติเป็นสาร Detergent ทำหน้าที่ในการจับและทำลายพันธะของโปรตีนหรือสารอื่นที่ติดอยู่กับผนังเซลล์พืช เช่นเข้าไปจับกับสารแทนนินในเมล็ดมะละกอหรือเข้าไปจับกับส่วนผสมที่ยังเหลืออยู่ในบิวเค็มมะละกอไว้ จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากขึ้น (Sambrook, 1989) (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking พบว่า ให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอทั้งก่อนและหลังทำบริสุทธิ์มากที่สุดกับตัวอย่างผลมะละกอดิบ โดยให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอก่อนและหลังทำบริสุทธิ์ 150.87 ng/ μ L และ 117.40 ng/ μ L ตามลำดับ วิธีนี้ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดกับตัวอย่างผลมะละกอดิบซึ่งอาจเป็นเพราะใช้บัฟเฟอร์ในการสกัด 2 ชนิดคือ Homogenization buffer และ Lysis buffer ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทำลายผนังเซลล์พืชในผลมะละกอดิบดีกว่าวิธีการสกัดอื่นๆ นอกจากนี้ Homogenization buffer ยังมี Mercaptoethanol เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง Mercaptoethanol มีคุณสมบัติช่วยลดการแตกหักของดีเอ็นเอ และยังมีคุณสมบัติเป็น Antioxidant หรือ Chelating agents ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพเซลล์ไว้ (รัชณี, 2549) (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

ตัวอย่างใบขามะละกอพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Guanidinium-Chloroform ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากที่สุด 3,868.60 ng/ μ L แต่หลังการทำบริสุทธิ์พบว่าการสกัดด้วยวิธี 2%CTAB ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากที่สุด (2,725.08 ng/ μ L) (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

ตัวอย่างแยมมะละกอพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Cell breaking ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากที่สุด 92.48 ng/ μ L แต่หลังการทำบริสุทธิ์พบว่าการสกัดด้วยวิธี GeneScan ให้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากที่สุด (19.43 ng/ μ L) (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

เมื่อวิเคราะห์คุณภาพหรือค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างการทำบริสุทธิ์และไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ก็บววิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 5 วิธีของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปโดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 พบว่า ดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ใกล้เคียง 1.8-2.0 ซึ่งเป็นค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ให้การยอมรับ (สุรินทร์, 2545) โดยสามารถบ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป มีความบริสุทธิ์ สามารถแยกสารปนเปื้อนอื่นๆ ออกจากสารละลายดีเอ็นเอได้ดี สำหรับค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีอื่นๆ ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 มีค่าต่ำกว่า 1.8 และสูงกว่า 2.0 บ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่ได้ อาจมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มโปรตีนและฟีนอลบางส่วน (ตารางที่ 1.1.7 และ 1.1.8)

ตารางที่ 1.1.7 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากวิธีการสกัด 5 วิธีโดยไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่าง	วิธีการสกัด									
	ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป		2%CTAB		GeneScan		Cell breaking		Guanidinium-Chloroform	
	ความเข้มข้น (ng/μL)	A260/A280	ความเข้มข้น (ng/μL)	A260/A280	ความเข้มข้น (ng/μL)	A260/A280	ความเข้มข้น (ng/μL)	A260/A280	ความเข้มข้น (ng/μL)	A260/A280
ใบมะละกอสด	277.32	2.13	2,624.30	1.87	3,313.57	1.80	3,058.02	1.92	2,597.08	2.02
ผลมะละกอดิบ	27.48	1.59	67.32	2.15	110.95	2.17	150.87	2.18	78.92	2.08
ผลมะละกอสุก	8.32	2.14	21.35	2.23	25.28	2.59	34.22	2.29	93.23	2.33
เมล็ดมะละกอ	24.88	1.73	159.77	1.75	197.18	1.44	256.46	1.49	278.78	1.44
ใบขามะละกอ	114.22	1.87	3,437.57	1.14	3,513.88	1.20	3,124.03	1.68	3,868.60	1.05
แย้มมะละกอ	7.43	1.56	21.02	0.99	57.08	1.26	92.48	1.32	76.87	1.60
มะละกอบแห้ง	5.47	1.48	5.94	1.20	14.20	1.50	9.75	1.51	8.9	1.46
บ้วยเค็มมะละกอ	4.58	1.53	2.27	1.09	9.33	1.17	8.27	1.47	51.97	1.44
น้ำผลไม้	10.20	1.88	98.33	2.15	217.28	2.02	148.93	2.06	44.73	1.51

ตารางที่ 1.1.8 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ได้จากวิธีการสกัด 5 วิธีโดยผ่านการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

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

1.2 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบประสิทธิภาพการเพิ่มยีน Papain endogenous ด้วยวิธี PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ PCR ทดสอบโดยใช้ยีน Papain endogenous ของมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ Papain 5F และ Papain 3R แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Guanidinium-chloroform, GeneScan, 2%CTAB และ Cell breaking พบว่า เหมาะสำหรับตัวอย่างมะละกอสด แต่ไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เนื่องจากไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอภายหลังจากการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แม้ว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านั้นจะผ่านการทำ

บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมีการปนเปื้อนของสารปรุงแต่งต่างๆ หรือดีเอ็นเอที่มีอยู่เกิดการเสียสภาพไประหว่างการแปรรูปทำให้ยากต่อการตรวจสอบ (Kwon *et al.*, 2015)

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอกับทุกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 1.1.9) เนื่องจากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit สามารถกำจัดสารปนเปื้อนจำพวกโปรตีน สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) และสารพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ที่มีในตัวอย่างออกไปได้ดีกว่าวิธีการสกัดอื่นๆ และเมื่อนำไปทำ PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่นๆ เมื่อนำมาผ่านการทำบริสุทธิ์ทำให้ความเข้มข้นดีเอ็นเอยิ่งลดลง ส่งผลให้จำนวนซ้ำที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอลดลงด้วย ดังนั้นหากต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส การใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit จึงเป็นทางเลือกที่ดีโดยสามารถนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้โดยไม่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์อีกรอบ

เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปพบว่า ตัวอย่างใบมะละกอสด ใบชามะละกอ ผลมะละกอดิบ และผลมะละกอสุก (ภาพที่ 1.1.1) สามารถพบแถบดีเอ็นเอในทุกวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ นอกจากนี้พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่าดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้เป็นเพราะตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยจึงสามารถสกัดดีเอ็นเอได้มาก

ตัวอย่างแยมมะละกอก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียง 2 ซ้ำซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำ โดยพบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit และวิธี Cell breaking (ภาพที่ 1.1.1)

ตัวอย่างบ๊วยเค็มมะละกอก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit ทั้ง 3 ซ้ำแต่หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำจากการสกัดด้วยวิธี GeneScan (ภาพที่ 1.1.1)

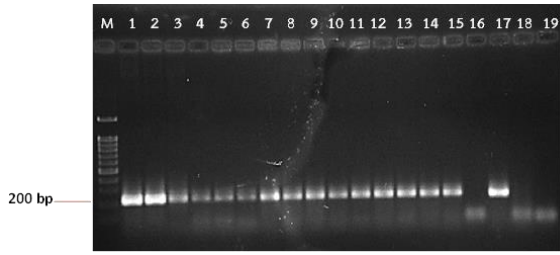
ตัวอย่างมะละกออบแห้งก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอ 3 ซ้ำจากวิธีการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit และพบแถบดีเอ็นเอ 2 ซ้ำจากการสกัดด้วยวิธี GeneScan แต่หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 ซ้ำจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cell breaking (ภาพที่ 1.1.1)

ตัวอย่างน้ำผลไม้ก่อนทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอ 3 ซ้ำจากวิธีการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit แต่หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากทุกวิธีการสกัด (ภาพที่ 1.1.1) ตัวอย่างเมล็ดมะละกอ ก่อนการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากทุกวิธีการสกัดแต่หลังการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอจากการสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy mericon Food Kit, 2%CTAB และการสกัดด้วยวิธี GeneScan การที่ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากในเมล็ดมะละกอมีสารแทนนินซึ่งจับอยู่กับดีเอ็นเอที่ต้องการ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีประสิทธิภาพจึงไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอก่อนการทำบริสุทธิ์ (ภาพที่ 1.1.1) (Nageswara-Rao *et al.*, 2013)

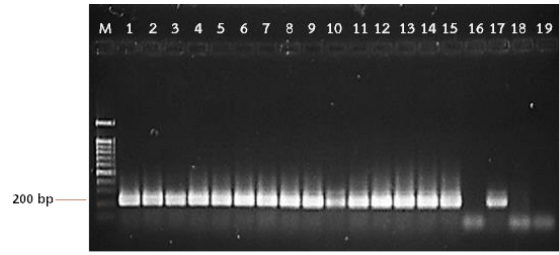
ตารางที่ 1.1.9 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยการตรวจยีน Papain endogenous ระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านและไม่ผ่านการบริสุทธิ์ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป

ตัวอย่าง	วิธีการสกัด									
	ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป		2%CTAB		GeneScan		Cell breaking		Guanidinium-chloroform	
	ไม่ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ไม่ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ไม่ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ไม่ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ไม่ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ	ทำ บริสุทธิ์ ดีเอ็นเอ
ใบมะละกอสด	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
ผลมะละกอดิบ	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
ผลมะละกอสุก	+++	+++	+	++	+	++	+	++	+++	+++
เมล็ดมะละกอ	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	-
ใบชามะละกอ	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
แย้มมะละกอ	++	+	-	-	-	-	-	+	-	-
มะละกอบแห้ง	++	-	-	-	++	-	-	+	-	-
บ้วยเค็มมะละกอ	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-
น้ำผลไม้	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

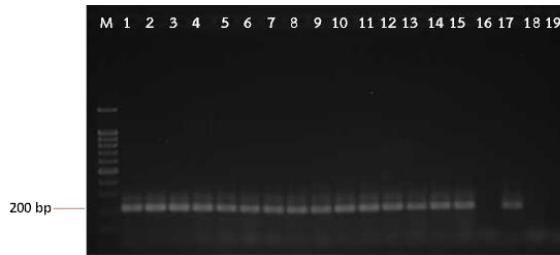
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย
 + หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายจางมาก
 ++ หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ม
 +++ หมายถึง แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเข้มมาก



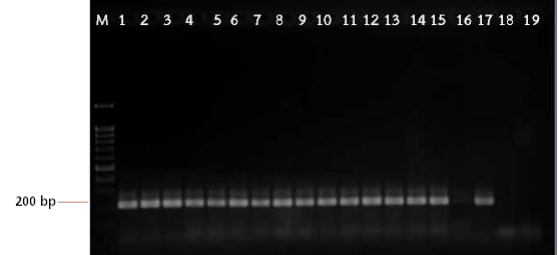
ใบมะละกอสดไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



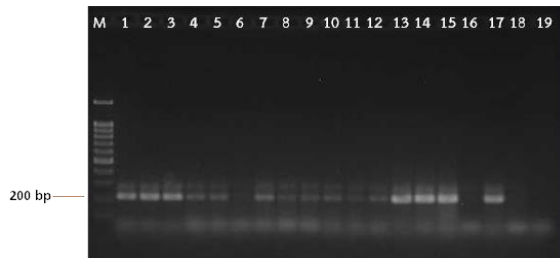
ใบมะละกอสดผ่านการทำบริสุทธิ์



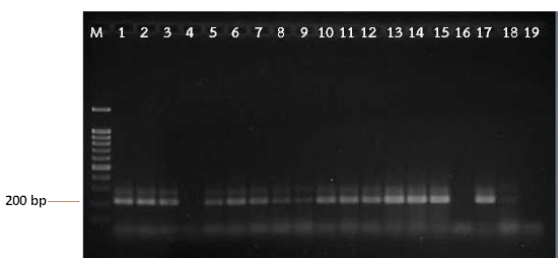
ผลมะละกอดิบไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



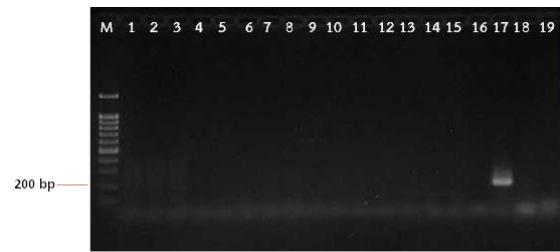
ผลมะละกอดิบผ่านการทำบริสุทธิ์



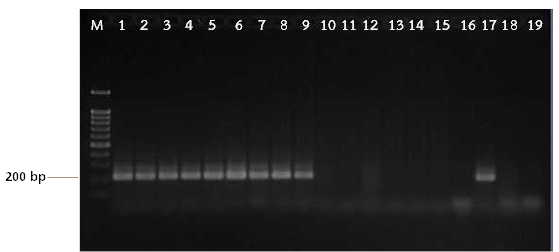
ผลมะละกอสุกไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



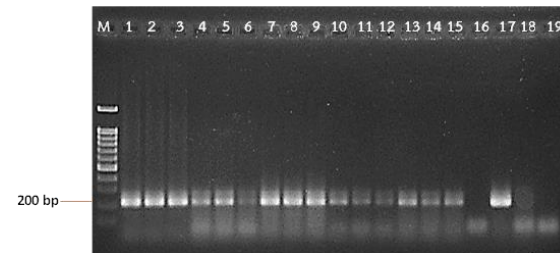
ผลมะละกอสุกผ่านการทำบริสุทธิ์



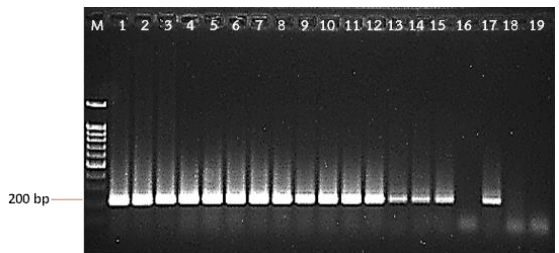
เมล็ดมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



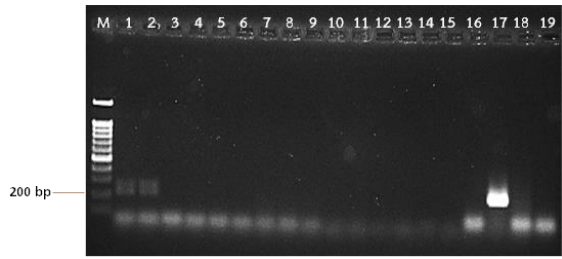
เมล็ดมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์



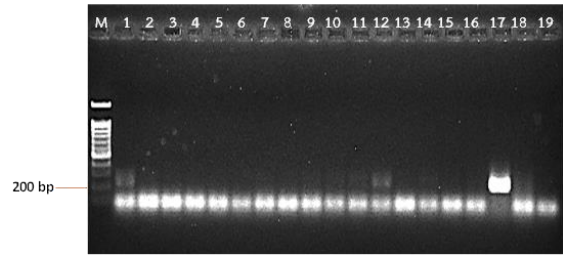
ใบขามะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



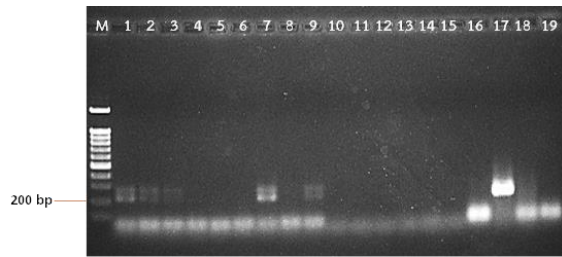
ใบขามะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์



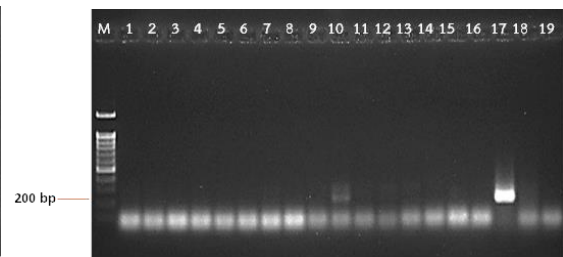
แย้มมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



แย้มมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์



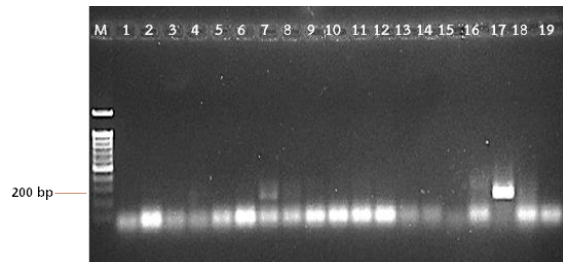
มะละกอบแห้งไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



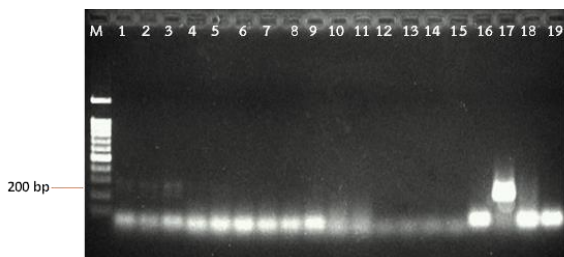
มะละกอบแห้งผ่านการทำบริสุทธิ์



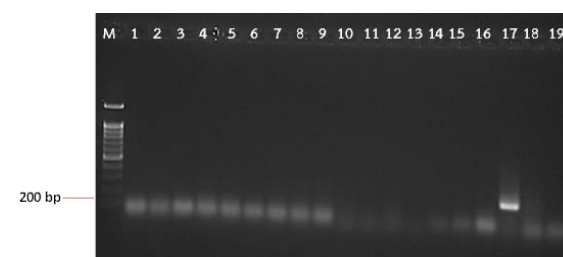
บ๊วยเค็มมะละกอไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



บ๊วยเค็มมะละกอผ่านการทำบริสุทธิ์



น้ำผลไม้ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์



น้ำผลไม้ผ่านการทำบริสุทธิ์

ภาพที่ 1.1.1 การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ โดยแถว 1-3 สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNeasy mericon Food Kit); 4-6 สกัดวิธี 2%CTAB; 7-9 สกัดวิธี GeneScan; 10-12 สกัดวิธี Cell breaking; 13-15 สกัดวิธี Guanidinium-chloroform; 16 Blank ของการสกัด; 17 Positive control (มะละกอ); 18 Negative control (ข้าวโพด); 19 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker

1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยวิธี PCR

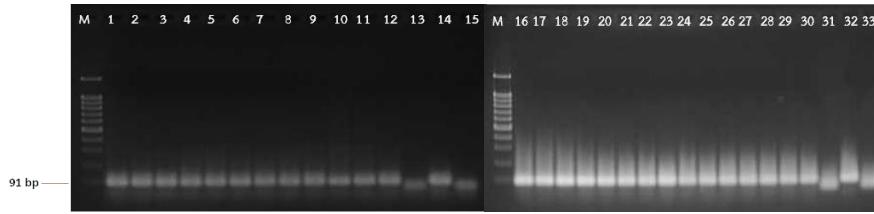
การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับตรวจยีน Papain endogenous ใช้คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันจำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 1.1.5) เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยวิธีการสกัดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า (ผลการสกัดดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 1.1.10) และทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ โดยพบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ สามารถใช้สถานะในการทำ PCR เช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ papain 5F และ papain 3R ซึ่งเป็นไพรเมอร์ควบคุมและเป็นไพรเมอร์ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรรูปธุรกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (ภาพที่ 1.1.2) จากนั้นทดสอบไพรเมอร์ที่แตกต่างกันต่อตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการทดลองพบว่า ทุกคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสม่ำเสมอกับตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป (ภาพที่ 1.1.3)

ตารางที่ 1.1.10 ผลการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปเพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจยีน Papain endogenous

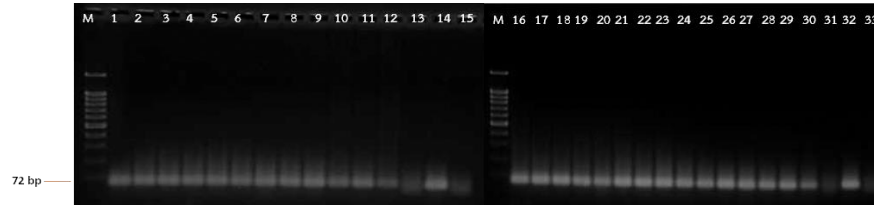
ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/ μ l)	A260/A280
ใบมะละกอสด	247.55	2.09
ผลมะละกอดิบ	29.61	1.71
ผลมะละกอสุก	9.17	2.04
เมล็ดมะละกอ	25.23	2.04
ใบชามะละกอ	119.55	1.8
แยมมะละกอ	8.5	1.65
มะละกอบแห้ง	6.36	1.53
บ๊วยเค็มมะละกอ	5.52	1.64
น้ำผลไม้	9.41	1.81



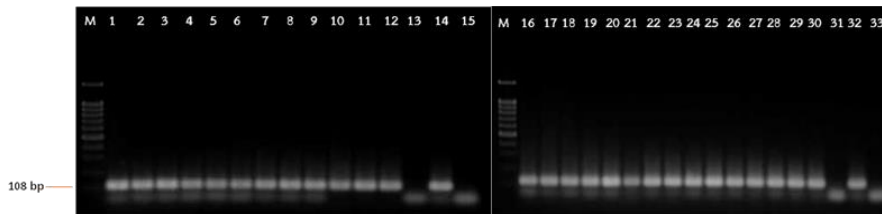
ภาพที่ 1.1.2 การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันต่อตัวอย่างใบมะละกอสดซึ่งทดสอบโดยใช้สภาวะในการทำ PCR เช่นเดียวกับไพรเมอร์ papain 5F และ papain 3R โดยแถว 1-3 ไพรเมอร์ papain 5F และ papain 3R; 4-6 ไพรเมอร์ Papain-A1 และ Papain-A2; 7-9 ไพรเมอร์ Papain SS11F และ Papain SS11R; 10-12 ไพรเมอร์ Papain-B1 และ Papain-B2; 13-15 ไพรเมอร์ Q-Chy-1 F2 และ Q-Chy-2R; 16 Negative control (ถ้วยเหลือง); 17 Positive control (ไพรเมอร์ papain 5F และ papain 3R); 18 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker



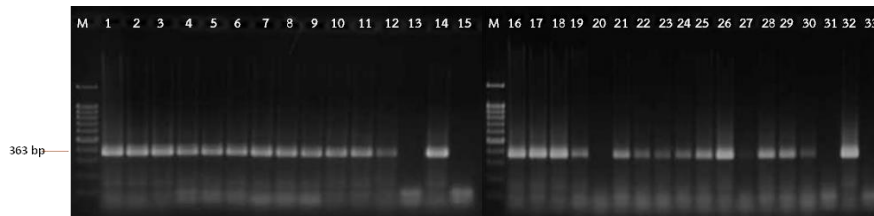
ไพรเมอร์ Papain-B1 และ Papain-B2



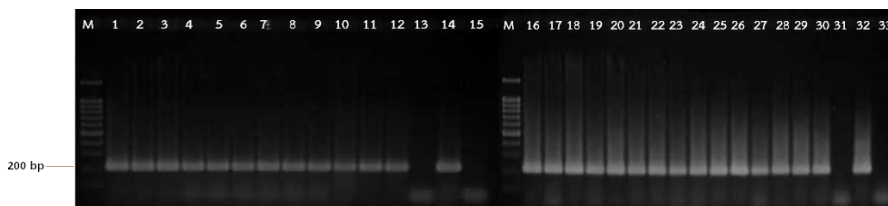
ไพรเมอร์ Q-Chy-1 F2 และ Q-Chy-2R



ไพรเมอร์ Papain SS11F และ Papain SS11R



ไพรเมอร์ Papain-A1 และ Papain-A2



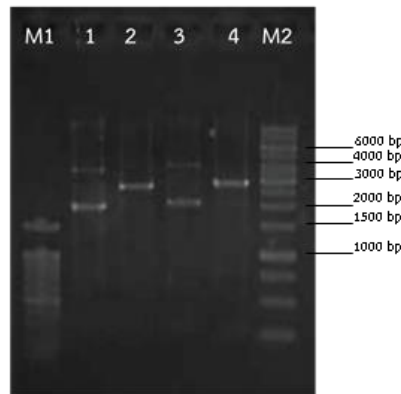
ไพรเมอร์ papain 5F และ papain 3R

ภาพที่ 1.1.3 การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ต่างกันต่อตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป โดยแถว 1-3 ใบมะละกอสด; 4-6 ผลมะละกอดิบ; 7-9 ผลมะละกอสุก; 10-12 เมล็ดมะละกอ; 16-18 ใบชามะละกอ; 19-21 มะละกอบแห้ง; 22-24 บัวเค็มมะละกอ; 25-27 แยมมะละกอ; 28-30 คือ น้ำผลไม้; 13,31 Negative control (ถ้วยเหลือง); 14,32 Positive control; 15,33 Non template control (น้ำกลั่น); M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker

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

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดเพื่อใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

เมื่อนำพลาสมิดมาตรฐานไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III เป็นเวลาข้ามคืนและตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพลาสมิดทั้งสองชุดอยู่ในรูปแบบขดเป็นวง (Supercoiled) ทำให้มีขนาดเล็ก เคลื่อนที่บนเจลอะกาโรสได้รวดเร็วกว่าพลาสมิดที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรง (Lineared) ซึ่งมีขนาดตรงกับพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุดที่ออกแบบไว้ คือ พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-Hawaii มีขนาด 2,941 คู่เบส และพลาสมิดมาตรฐาน GMOs-SC มีขนาด 2,795 คู่เบส (ภาพที่ 1.1.4) ดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่อยู่ในรูปเส้นตรงนี้ ให้ชื่อว่า Linear pGMOs-Hawaii-C1 และ Linear pGMOs-SC-C1 เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์และคำนวณจำนวน Copy number จะได้ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดสอบ Real-time PCR (ตารางที่ 1.1.11)



ภาพที่ 1.1.4 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III และตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจลที่ผสม Ethidium bromide ช่อง M1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA; แถว 1 พลาสมิด GMOs-SC (ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III); แถว 2 พลาสมิด GMOs-SC ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III มีขนาด 2,795 คู่เบส; แถว 3 พลาสมิด GMOs-Hawaii (ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III); แถว 4 พลาสมิด GMOs-Hawaii ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Hind III มีขนาด 2,941 คู่เบส; M2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Gene ruler DNA ladder

ตารางที่ 1.1.11 แสดงจำนวน Copy number ของดีเอ็นเอมาตรฐานหลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์

ชื่อพลาสมิด	A260/A280	ความเข้มข้น (ng/ul)	จำนวน Copy number
Linear GMOs-Hawaii-c1	1.23	13.3	4.19×10^9 copies
Linear GMOs-SC-C1	1.28	22.5	7.46×10^9 copies

2.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อดีเอ็นเอมาตรฐานจากพลาสมิดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งการทดสอบใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น 10 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1.1.12) สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำเป็น Negative control เปรียบเทียบกับตัวอย่าง Positive control ซึ่งเป็นตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC จำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะกับตัวอย่าง Positive control ที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น โดยสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ (Ct value) แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับตัวอย่าง Negative control สำหรับการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อยีน Papain endogenous ใช้ Negative control คือ พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ และ Positive control คือตัวอย่างมะละกอสายพันธุ์ 55-1, PRSV-SC, DOA และมะละกอไม่ผ่านการดัดแปรพันธุกรรม (Non GM) จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะต่อตัวอย่าง Positive control ที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น โดยสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แต่ไม่ตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับตัวอย่าง Negative control

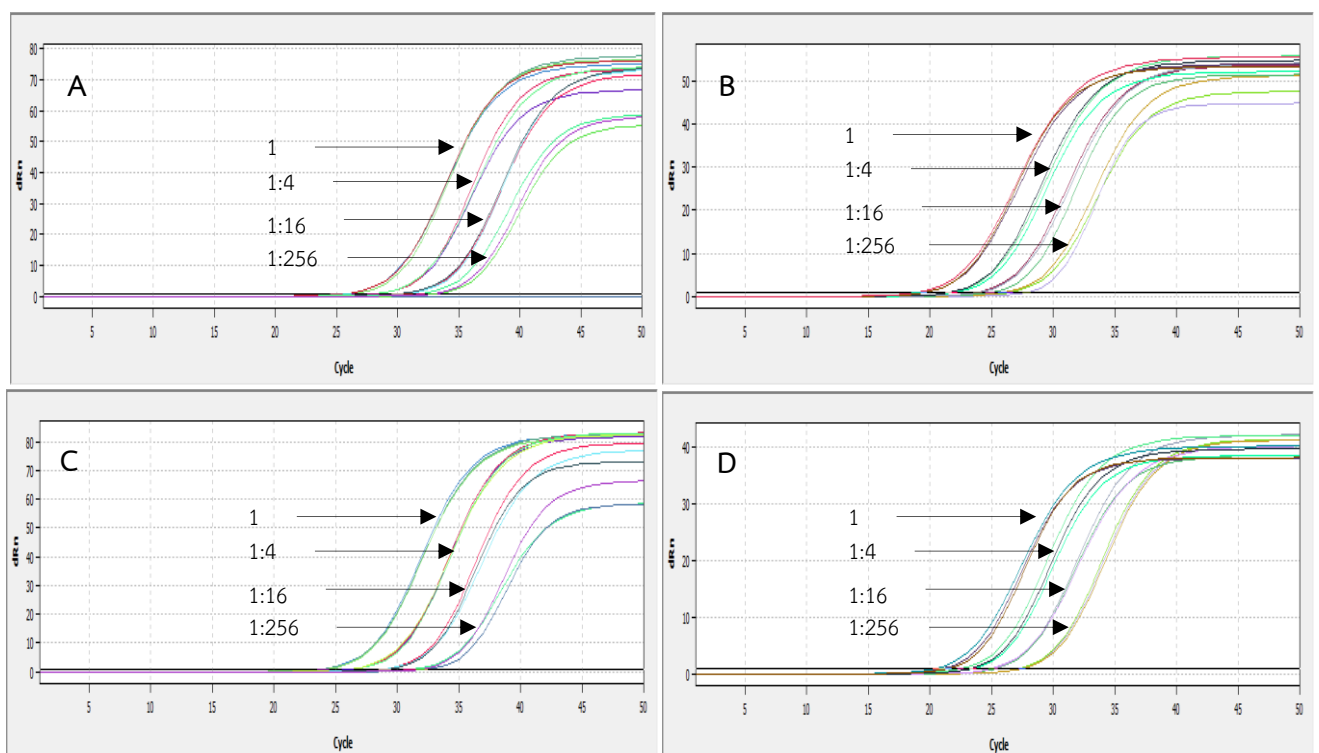
ตารางที่ 1.1.12 แสดงการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

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

+ คือ Detected; - คือ Not detected

2.3 การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อการทดสอบเชิงปริมาณ การหาลอยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific เทียบกับยีน Papain

endogenous ที่มีอยู่ในมะละกอ โดยการเปรียบเทียบจะแสดงผลเป็นเป็นร้อยละการปนเปื้อน (%) ดังนั้น การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific จะต้องหาปริมาณยีน Event-specific และยีน Papain endogenous ไปพร้อมกันแล้วคำนวณหาปริมาณยีน Event-specific และยีน Papain endogenous โดยการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งสร้างโดยใช้ค่าเฉลี่ย Ct เป็นแกน X และค่าเฉลี่ย Log ของจำนวน Copy number เป็นแกน Y (ภาพที่ 1.1.5) สำหรับค่าเฉลี่ย Ct และ Log ของจำนวน Copy number ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้งยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ที่นำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานแสดงในตารางที่ 1.1.13 โดยกราฟแสดงผลการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในการตรวจวิเคราะห์ยีน Papain endogenous และยีน Event-specific จากการใช้ Copy number จำนวน 56700, 14125, 3544 และ 221 พบว่า สามารถตรวจวัดได้ทุกระดับการเจือจาง โดยค่า Ct จะเพิ่มขึ้นแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณจำนวน Copy number ที่ลดลง (ภาพที่ 1.1.6)

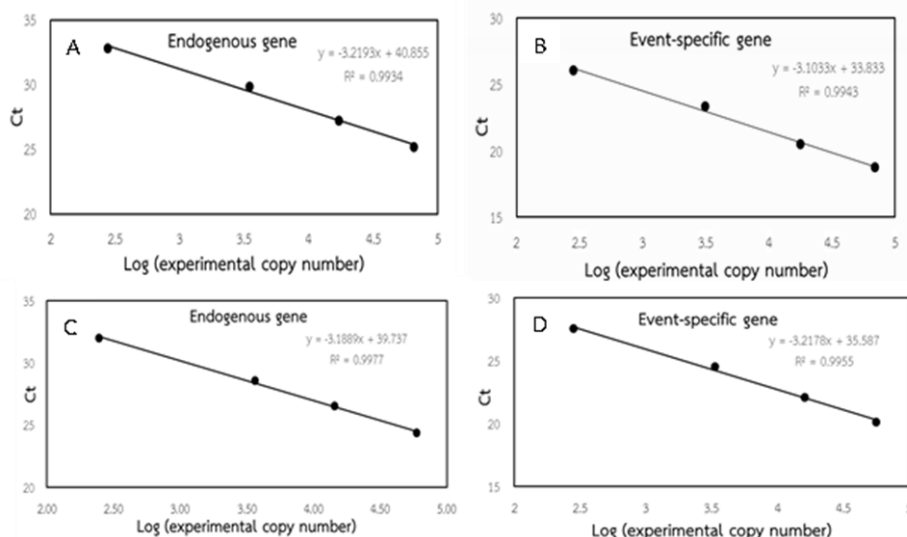


ภาพที่ 1.1.5 แสดง Amplification curve จากเครื่อง Real-time PCR ที่ได้จากการเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในอัตราส่วน 1, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดย A และ B เป็น Amplification curve ของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ตามลำดับ C และ D เป็น Amplification curve ของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ตามลำดับ

ตารางที่ 1.1.13 แสดงค่า Ct และ จำนวน Log Copy number ของยีน 55-1 และ PRSV-SC ที่นำมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

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

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



ภาพที่ 1.1.6 ภาพ A และ C แสดงความเข้มข้นมาตรฐานของยีน Papain endogenous สำหรับมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ ภาพ B และ D แสดงความเข้มข้นมาตรฐานของยีน Event-specific ในมะละกอตัดแปรพันธุกรรม 55-1 และ PRSV-SC ตามลำดับ

ข้อมูลตารางที่ 14 ละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในส่วนของยีน Papain endogenous แสดงให้เห็นว่า กราฟมีค่า Slope เท่ากับ -3.2193 ค่า R² เท่ากับ 0.9934 ซึ่งทั้งสองค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่า R² เป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของค่าบนแกน X และแกน Y โดยบ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือในการประมาณค่าบนแกน X โดยใช้ค่าบนแกน Y หรือการใช้ค่าบนแกน Y ในการประมาณค่าบนแกน X ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จำนวน Copy number ที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับรอบการตรวจจับแสงฟลูออเรสเซนต์มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับค่า PCR efficiency นั้น มีค่าอยู่ที่ 104.46% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้จากรายงานของ Del Gaudio et al, (2012) ซึ่งระบุข้อกำหนดการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พีซีดีดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ ด้วยการทดสอบภายใต้กฎระเบียบของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 17025 พบว่า ค่า R² ต้องมีค่าของเกณฑ์การยอมรับอยู่ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ค่า Slope มีค่าเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง -3.1 ถึง -3.6 และค่า PCR efficiency อยู่ระหว่าง 90-110% ซึ่งหากค่าที่ได้จากการทดลองมีช่วงค่าอยู่ในเกณฑ์ดังกล่าว การทดลองในรอบนั้นๆ มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำและมีความสัมพันธ์กันระหว่างค่าของจำนวน Copy number และรอบการตรวจจับได้ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สำหรับยีน Event-specific ของละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 พบว่าค่า R² เท่ากับ 0.9943 ค่า Slope เท่ากับ -3.1033 และค่า PCR efficiency เท่ากับ 110.00% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้น กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้งของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific มีความเป็นเส้นตรง (Linearity) สูง จึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 ในการคำนวณปริมาณของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ในละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ได้อย่างน่าเชื่อถือ

สำหรับละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ข้อมูลจากตารางที่ 1.1.14 พบว่า ในส่วนของยีน Papain endogenous กราฟมีค่า Slope -3.1889 ค่า R² 0.9977 และค่า PCR efficiency 105.86% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับยีน Event-specific ของละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC พบว่าค่า R² 0.9955 ค่า Slope -3.2170 และค่า PCR efficiency 104.57% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้น จึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 กราฟในการคำนวณปริมาณของยีน Papain endogenous และยีน Event-specific ในละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ได้อย่างน่าเชื่อถือ

ตารางที่ 1.1.14 แสดงค่าความชันของกราฟ ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากการตรวจวิเคราะห์ยีน Event-specific และยีน Papain endogenous ในละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

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

2.4 การวัดค่าความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (Accuracy) ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific ในละเอียดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

ตารางที่ 1.1.15 แสดงค่าความเที่ยงและความแม่นยำในการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ใน มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

มะละกอ สายพันธุ์	ร้อยละ การ ปนเปื้อน ที่แท้จริง (%)	จำนวน รอบ การ ทดลอง	ยีนที่ ตรวจสอบ	ค่าเฉลี่ย จำนวน Copy number	ค่าความเที่ยง (Precision)		ค่าความแม่นยำ (Accuracy)		
					ค่า	ค่า	ร้อยละ การ ปนเปื้อน ที่ได้ (%)	ร้อยละการ เบี่ยงเบนของ วิธีการตรวจ วิเคราะห์ (%Bias)	ค่าเฉลี่ยร้อยละ การเบี่ยงเบน ของวิธีการ ตรวจวิเคราะห์ (%Bias)
					เบี่ยงเบน มาตรฐาน มาตรฐาน	เบี่ยงเบน สัมพัทธ์ (%)			
55-1	0.1%	1	Papain	652789	60427	9.25	0.10	-1.35	4.83
			55-1	661603	92299	13.95			
		2	Papain	571508	90092	15.76	0.11	-5.75	
			55-1	604408	112576	18.62			
		3	Papain	569398	62572	10.98	0.09	3.87	
			55-1	547326	103669	18.94			
		4	Papain	572720	50876	8.88	0.11	-8.35	
			55-1	620547	27298	4.39			
PRSV-SC	0.1%	1	Papain	920222	104614	11.36	0.12	-15.05	7.74
			PRSV-SC	1058806	70640	6.67			
		2	Papain	1091673	73058	6.69	0.09	9.01	
			PRSV-SC	993276	147091	14.80			
		3	Papain	98755	110890	11.22	0.09	2.55	
			PRSV-SC	962347	65646	6.82			
		4	Papain	968839	128484	13.26	0.10	-4.36	
			PRSV-SC	1011122	78092	7.72			

การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific เทียบกับยีน Papain endogenous โดยการเปรียบเทียบจะใช้ปริมาณการปนเปื้อนที่ 0.1% ตารางที่ 1.1.15 พบว่า ค่าความเที่ยงซึ่งรายงานโดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของการหาปริมาณยีนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ในการทดลองทั้ง 4 รอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 4.39 - 18.93 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC มีค่าอยู่ระหว่าง 6.67-14.80 โดยค่าความเที่ยงของทั้งสองสายพันธุ์มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งการวัดค่า RSD (%) จะอยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ไม่เกิน 25% (Del Gaudio *et al.*, 2012) แสดงว่า อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลง สามารถให้ผลการตรวจที่มีความเที่ยง ในส่วนของความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบ ศึกษาโดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ได้จากการทดลองกับร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ใช้ในการศึกษาคือ 0.1% โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าการปนเปื้อนจริง จากนั้นคำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีน Event-specific ที่ได้จากการทดลอง โดยความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์จะรายงานในรูปร้อยละการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%Bias) ตารางที่ 1.1.15 พบว่า ค่า %Bias ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.35 - 8.35% และค่า %Bias ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC มีค่าอยู่ระหว่าง 2.55 - 15.05% โดยมีค่าเฉลี่ยของ %Bias คือ 4.83% และ 7.74% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ของ

ทั้งสองยืนอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน $\pm 25\%$) ดังนั้น อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงกับค่าจริง

อย่างไรก็ตาม ค่าความแม่นยำของการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน Event-specific มักจะรายงานผลที่ได้จากการใช้ CRM ในการศึกษา โดยการใช้ดีเอ็นเอจากพลาสมิดมาตรฐานมักจะไม่นิยมรายงานค่าดังกล่าว เนื่องจากการใช้ CRM ให้ค่าการปนเปื้อนที่แท้จริงได้อย่างถูกต้อง (True value) ซึ่งค่าดังกล่าวนำไปใช้ในการคำนวณ %Bias โดย %Bias คำนวณได้จาก $|True\ value - Experimental\ value| \times 100 / True\ value$ (Yang *et al.*, 2006) ซึ่งการทราบค่า True value ที่แท้จริงจะทำให้ผลการทดลองวิธีการตรวจสอบความใช้ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

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

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

ค่า Repeatability และ Reproducibility ของการหาปริมาณการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 (ตารางที่ 1.1.16 และ 1.1.17) และ PRSV-SC (ตารางที่ 1.1.18 และ 1.1.19) พบว่า ค่า RSD^r และ RSD^R ของการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous สำหรับมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC ในทุกระดับความเข้มข้น มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน 25%) สำหรับการวัดค่า RSD^r และ RSD^R ของการเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ใช้วิธีการเดียวกันกับการวัดค่า Repeatability และ Reproducibility ของยีน Papain endogenous แต่จะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน Event-specific เท่านั้น การเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ด้วยวิธี Real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมๆกับการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous โดยค่า RSD^r และ RSD^R ของการเพิ่มจำนวนยีน 55-1 และ PRSV-SC ในทุกระดับความเข้มข้นมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (ไม่เกิน 25%) ดังนั้น การทดสอบความใช้ได้สำหรับวิธีตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC สามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 1.1.16 แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน Papain endogenous ในมะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

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

RSD^r คือ Repeatability relative standard deviation

RSD^R คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

ตารางที่ 1.1.17 แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน 55-1 ในมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

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

RSD^r คือ Repeatability relative standard deviation

RSD^R คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

ตารางที่ 1.1.18 แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน Papain endogenous ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC

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

RSD^r คือ Repeatability relative standard deviation

RSD^R คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

ตารางที่ 1.1.19 แสดงค่า Repeatability และ Reproducibility ของการตรวจปริมาณยีน PRSV-SC ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC

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

RSD^r คือ Repeatability relative standard deviation

RSD^R คือ Reproducibility relative standard deviation

nd คือ Not detected

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

การเพิ่มจำนวนยีน Event-specific ด้วยวิธี Real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนยีน Papain endogenous เพื่อที่จะคำนวณความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ ซึ่ง LOQ จะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน Event-specific ที่สามารถหาปริมาณได้โดยที่เครื่องยังคงตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำ ครบทุกรอบการทดลอง การคำนวณความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน 55-1 (ตารางที่ 1.1.20) และยีน PRSV-SC (ตารางที่ 1.1.21) พบว่า สามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ครบทุกซ้ำที่ 50 Copies (125 Copies ต่อปฏิกิริยา) อย่างไรก็ตาม ค่า LOQ ที่ได้จากการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 25 ng ซึ่งอาจส่งผลให้ค่า LOQ ที่ได้มีความแตกต่างจากค่า LOQ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ศึกษากับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 เช่น Baemler et al. (2006) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng, Hubner et al. (2001) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 200 ng, Nakamura et al.

(2013) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 25 ng ส่วนค่า LOQ ของการศึกษาในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการรายงานผลการศึกษา

สำหรับค่า LOD ของมะละกอสายพันธุ์ 55-1 (ตารางที่ 1.1.20) และ PRSV-SC (ตารางที่ 1.1.21) พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในตัวอย่างที่มียีน Event-specific จำนวน 50,000, 5,000, 500 และ 50 Copies ได้ครบทุกซ้ำ ส่วนตัวอย่างที่มีจำนวน 5 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ครบทุกซ้ำ และตัวอย่างที่มีจำนวน 0.5 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ดังนั้น ความเข้มข้นน้อยที่สุดของยีน 55-1 และ PRSV-SC ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ คือ 5 Copies (12.5 Copies ต่อปฏิกิริยา) อย่างไรก็ตาม ค่า LOD ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ที่ได้จากการทดลองอื่นพบว่า มีค่า 25 Copies (Nakamura *et al.*, 2013) ส่วนค่า LOD ของการศึกษาในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-SC ยังไม่มีการรายงานผลการศึกษา

ตารางที่ 1.1.20 แสดงค่า LOD and LOQ ของการตรวจปริมาณยีน 55-1 ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1

จำนวน Copy number ที่แท้จริง	จำนวนซ้ำการทดลอง	ค่า Ct			รอบที่ตรวจจับสัญญาณได้ (Positive signals)	ค่าเฉลี่ย Ct	SD	RSD (%)
		1	2	3				
50000	1	17.92	18.35	18.77	12/12	20.49	1.57	7.66
	2	21.83	21.02	22.3				
	3	19.39	21.55	20.43				
	4	20.2	22.15	22.07				
5000	1	23.49	22.63	22.64	12/12	25.61	2.05	8.02
	2	25.44	26.82	26.97				
	3	23.19	26.2	27.44				
	4	28.1	27.38	27.04				
500	1	26.23	27.43	25.1	12/12	28.70	2.01	7.02
	2	31.81	31.35	31.14				
	3	28.11	28.32	29.54				
	4	28.59	28.2	28.69				
50	1	31.8	32.13	31.31	12/12	33.88	1.64	4.85
	2	35.66	35.09	33.62				
	3	32.52	33.19	34.93				
	4	35.41	35.14	35.8				
5	1	34.62	35.11	34.59	6/12	36.46	1.89	5.19
	2	37.75	37.95	38.78				
	3	nd	nd	nd				
	4	nd	nd	nd				
0.5	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd				
	3	nd	nd	nd				
	4	nd	nd	nd				

nd คือ Not detected

ตารางที่ 1.1.21 แสดงค่า LOD and LOQ ของการตรวจปริมาณยีน PRSV-SC ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ PRSV-SC

จำนวน Copy number ที่แท้จริง	จำนวนซ้ำการทดลอง	ค่า Ct			รอบที่ตรวจจับสัญญาณได้ (Positive signals)	ค่าเฉลี่ย Ct	SD	RSD (%)
		1	2	3				
50000	1	20.35	19.64	20.27	12/12	21.18	0.85	4.02
	2	21.99	21.74	21.96				
	3	21.39	20.81	21.39				
	4	21.05	22.68	20.95				
5000	1	24.42	23.41	22.5	12/12	25.38	1.67	6.59
	2	25.52	26.24	26.4				
	3	26.47	22.93	25.63				
	4	27.1	26.62	27.43				
500	1	27.58	27.66	27.27	12/12	29.48	1.75	5.94
	2	29.71	29.44	28.82				
	3	29.27	28.45	30.1				
	4	30.4	32.57	32.58				
50	1	30.03	30.19	30.46	12/12	31.45	1.43	4.57
	2	32.21	32.57	32.41				
	3	28.93	30.18	31.9				
	4	32.12	33.72	32.74				
5	1	34.01	34	34.49	6/12	34.60	1.19	3.46
	2	35.76	33.09	36.28				
	3	nd	nd	nd				
	4	nd	nd	nd				
0.5	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd				
	3	nd	nd	nd				
	4	nd	nd	nd				

nd คือ Not detected

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

2. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับมะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC พบว่า ค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ตรวจวัดจากการทดลอง (ตารางที่ 22) อยู่ในช่วงค่าปกติของเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นสามารถใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 เพื่อเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC เชิงปริมาณได้

ตารางที่ 1.1.22 สรุปค่าพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC โดยการใช้พลาสมิดของ GMOs-Hawaii-C1 และ GMOs-SC-C1 สำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้จากการทดลองนี้ ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปที่ต้องการการตรวจรับรองสำหรับการนำเข้า-ส่งออกสินค้าระหว่างประเทศได้ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ เพื่อตอบสนองต่อระเบียบมาตรการในการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมกับประเทศคู่ค้าที่มีการกำหนดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนขั้นต่ำไว้ นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการสามารถนำข้อมูลไปขยายขอบเขตตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025

เอกสารอ้างอิง

ชนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์ ภิยุรดา ดนัยศิริพงษ์ อรรถพล ภูมิศรี พงศกร สรรค์วิทยากุล ศรีเมฆ ชาวโพงพาง.

2558. รายงานเรื่อง การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม. 45 หน้า.

เข้าถึงได้จากอินเทอร์เน็ต :

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

เข้าถึงได้จากอินเทอร์เน็ต :

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

เข้าถึงได้จากอินเทอร์เน็ต :

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

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ (ฉบับที่ 2), 2558

รัชณี ฮงประยูร. 2549. บทปฏิบัติการชีวะมวิทยาทางด้านโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 87 น.

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

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

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

- Bonfini, L., Moens, W., Ben, E., Querci, M., Aygun, B., Corbisier, P., Morisset, D., Zel, J. and Van den Eede, G. 2007. Analytes and related PCR primers used for GMO detection and quantification. Luxembourg: European Communities, Report No. EUR 23059-EN.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N. and Morisset, D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci. Technol.* 37: 115-126.
- Chaouachi, M., Fortabat, M.N., Geldreich, A., Yot, P., Kerlan, C., Kebdani, N., Audeon, C., Romaniuk, M. and Bertheau, Y. 2008. An accurate real-time PCR test for the detection and quantification of cauliflower mosaic virus (CaMV): Applicable in GMO screening. *Eur. Food. Res. Technol.* 227: 789-798.
- Del Gaudio, S., Cirillo, A., Di Bernardo, G. and Cipollaro, M. 2012. Verification of real-time PCR methods for qualitative and quantitative testing of genetically modified organisms. *J. Food Qual.* 35: 442-447.
- EN ISO 21571:2005. 2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction., [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/34616.html>.
- Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A. and Toyoda, M. 2001. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42: 231-236.
- Guo, J., Chen, L., Liu, X., Gao, Y., Zhang, D. and Yang, L. 2012. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs. *Food Chem.* 132: 1566-1573.
- Hubner, P., Waiblinger, H.U., Pietsch, K. and Brodmann, P. 2001. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J. AOAC. Int.* 84: 1855-1864.
- Jiang, L., Yang, L., Rao, J., Guo, J., Wang, S., Liu, J., Lee, S. and Zhang, D. 2010. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. *J. Sci. Food Agric.* 90: 402-408.
- Kim, J.H., Park, S.B., Roh, H.J., Woo, H.B, Shin, M.K., Moon, G.I., Hong, J.H., Zhang, D. and Kim, H.Y. 2015. Event-specific qualitative and quantitative detection of three genetically modified papaya events using a single standard reference molecule. *Food Control.* 55: 127-132.

- Kim, S.A., Lee, M., Yoo, S.J., Kim, J.H., Lee, H., Park, K.S., Jeong, J. and Kim, H.Y. 2010. Detection of GM papaya event 55-1 in fresh and processed papaya using duplex PCR. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 237-242.
- Kwon, Y.J., Chung, S.Y., Cho, K.C., Park, J.E., Koo, E.J., Seo, D.H, Kim, E., Whang, J., Park, S.S., Choi, S.O. and Lim, C.J. 2015. Establishment and application of a qualitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Anal. Sci. Technol.* 28: 117-124.
- Li, P., Jia, J.W., Jiang, L.X., Zhu, H., Bai, L., Wang, J.B., Tang, X.M. and Pan, A.H. 2012. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of the GMO carnation (*Dianthus caryophyllus*) variety Moonlite based upon the 5'-transgene integration sequence. *Genet. Mol. Res.* 11: 1117-1129.
- Morgante, P.G., Vicente, F.F., Coffani-Nunes, J.V. and Moreno, P.R.H. 2013. Establishment of simple and efficient methods for plant material harvesting and storage to allow DNA extraction from a *Myrtaceae* Species with medicinal potential. *Int. J. Genomic Med.* 1: 1-5.
- Nageswara-Rao, M., Kwit, C., Agarwal, S., Patton, M.T., Skeen, J.A., Yuan, J.S., Manshardt, R.M. and Stewart, C.N. 2013. Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.). *BMC Biotechnology.* 13: 1472-1483.
- Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K. and Teshima R. 2013. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chem.* 136: 895-901.
- Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. and Nishimaki-Mogamia, T. 2014. Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 1-5.
- Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R. and Akiyama, H. 2013. A DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control.* 32: 728-735.

- Ovesna, J. and Hodek, J. 2009. Detection of transgenic papaya lines: Extraction protocol optimisation and verification of DNA quality by PCR assay. *Czech J. Food Sci.* 27: 75-81.
- Qiagen. 2009. Wizard® PCR Preps DNA Purification System., [Online]. Available: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-pcr-preps-dna-purification-system-quick-protocol.pdf>.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Tan, H., Huang, H., Tie, M., Ma, J. and Li, H. 2013. Comparative analysis of six DNA extraction methods in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). *J. Agr. Sci.* 7: 82-90.
- Wang, X., Teng, D., Yang, Y., Tian, F., Guan, Q. and Wang, J. 2011. Construction of a reference plasmid molecule containing eight target for the detection of genetically of genetically modified crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 721-731.
- Yang, L., Pan, A., Zhang, K., Yin, C., Qian, B., Chen, J., Huang, C. and Zhang, D. 2006. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. *Transgenic Res.* 14: 817-831.

ภาคผนวก

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

ซึ่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Food lysis buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนสุด ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ปริมาตรหลอดละ 250 ไมโครลิตร เติม PB buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำ QIA quick spin column ใส่ใน Collection tube ดูดของเหลวปริมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่ QIA quick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที เทของเหลวใน Collection tube ที่เติม AW2 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ QIA quick spin column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที เทของเหลวใน Collection tube ที่เติม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที จากนั้นย้าย QIA quick spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม EB buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปบน QIA quick spin column เพื่อละลายดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1.30 นาที

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

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

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

ซึ่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanol ที่แช่เย็นไว้ จำนวน 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน ดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดปั่นไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

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

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

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

ซึ่งตัวอย่าง 200 มิลลิกรัม ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5M Guanidine-HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol

(อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลว ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 100% Isopropanol ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เเทส่วนของเหลวที่ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอดปั่นไว้ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาทีหรือจนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

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

นำดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สกัดได้จากวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธี เติม Miniprep DNA purification resin ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) มาเชื่อมกับ Minicolumn และใช้หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA purification resin ลงใน Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยๆ ดันสารละลายลง ทั้งส่วนของเหลวที่อยู่ด้านล่าง 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) นิ่งฆ่าเชื้อ ลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn

การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603
ด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)
Detection of GM corn Mon810 and NK603 using Loop-mediated Isothermal
Amplification (LAMP) Technique

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ นายพงศกร สรรค์วิทยากุล
นางสาวปิยนุช ศรชัย นางสาวฐิติรัตน์ อัครวมงคลศิริ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

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

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

Abstract

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

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

คำนำ

สถานการณ์การปลูกพืชตัดแปรพันธุกรรมในปี 2559 มีประเทศที่ปลูกพืชตัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ 28 ประเทศ พืชที่ปลูกมากในหลายประเทศ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนล่า และฝ้าย (ISAAA, 2016) ข้าวโพดเป็นพืชที่มีสายพันธุ์และลักษณะการตัดแปรพันธุกรรมมากที่สุด (231 events) ทั้งแบบยืนเดียวและยืนรวม ข้าวโพดต้านทานแมลงสายพันธุ์ MON810 และทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทสายพันธุ์ NK603 ได้รับการอนุมัติปลูกในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงฟิลิปปินส์และเวียดนาม จึงมีโอกาสเล็ดลอดเข้ามาสู่ประเทศไทย นอกจากนี้การนำเข้าเมล็ดข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมเพื่อการอุตสาหกรรมเป็นช้อยกเว้นของ พ.ร.บ. กักพืช ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะที่เป็นหน่วยงานกำกับดูแล ซึ่งไม่อนุญาตให้มีการนำเข้าและปลูกพืชตัดแปรพันธุกรรม ยกเว้นเพื่อการศึกษาค้นคว้า ต้องวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว สำหรับใช้ตรวจสอบเฝ้าระวังการปนเปื้อนในพื้นที่ภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้หลักพื้นฐานของปฏิกิริยาพหิวัยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นวิธีที่มีการใช้แพร่หลายในการตรวจสอบความปลอดภัยอาหาร (food safety) แลตรวจพิษสุนัขโรคคน สัตว์ และพืช ข้อดีของเทคนิค LAMP คือเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ต้นทุนต่ำ ตรวจสอบด้วยตาเปล่าไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ มีศักยภาพในการใช้เป็นวิธีการตรวจสอบในพื้นที่จริง เทคนิคดังกล่าวมีรายงานการนำมาใช้ตรวจคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมครั้งแรกโดย Fukuta *et al.* (2004) ซึ่งต่อมามีการพัฒนาตรวจยีนคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมอีกหลายชนิด ได้แก่ T-nos, P-35S, P-nos, pat (Li *et al.* 2015) Lee *et al.* (2009) ตรวจคัดกรองยีน 35S

promoter และ Nos terminator โดยการออกแบบชุดไพรเมอร์ที่ฟอร์มเป็น loop สำหรับตรวจยีน T-nos และ CaMV 35S Promoter โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์เพิ่มสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 55 C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจผลปฏิกิริยาบนอะกาโรสเจล พบว่ามีความจำเพาะและความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่ 0.01% GMO สามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนในระดับต่ำได้ Randhawa et al. (2013) วิจัยพัฒนาเทคนิค LAMP ร่วมกับ Real-time PCR ในการตรวจยีน P35S CaMV, P-FMV และ marker ยีน aadA, nptII, uidA ของฝ้ายตัดแปรพันธุกรรม พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ตรวจได้ภายในเวลา 35 นาที และมีความไวในการตรวจได้ถึง 4 copies ข้อดีของการตรวจด้วยเทคนิค LAMP คือสามารถใช้อุปกรณ์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่มีในห้องปฏิบัติการ เช่น heating block, Thermal cycler, Real-time PCR และ Isothermal Real-time system สามารถประยุกต์ใช้ตรวจสอบในภาคสนาม ตรวจคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนี้เทคนิค LAMP มีความไวต่ำต่อการเกิดปฏิกิริยายับยั้งของพีซีอาร์ แต่มีความจำเพาะและความไวต่อดีเอ็นเอเป้าหมายสูง ปัจจุบันมีการศึกษาและนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรมจำนวนมาก การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบและประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจสอบคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะตัวอย่างพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกร ในพื้นที่ภาคสนาม โดยเก็บตัวอย่างทดสอบในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กของหน่วยงานส่วนภูมิภาคเป็นการเฝ้าระวังการปนเปื้อนในพื้นที่แปลงเกษตรกร และควบคุมกำกับดูแลตาม พ.ร.บ.กักพืช

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ : วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ event Mon810, Bt11, Bt176, NK603, MIR604, MIR162, Mon89034, วัสดุอ้างอิงมาตรฐานถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม GTS-40-3-2, ตัวอย่างที่สกัดจากพืชสด ได้แก่ ข้าวโพด มะละกอ และเฟืองฟ้า

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

สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ Bst DNA polymerase, MgCl₂, dNTPs, betaine,

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

วิธีการ

1. ตัวอย่างทดสอบและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานพืชตัดแปรพันธุกรรม (IRMM-ERM, AOCS) ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม และถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี GeneScan ดัดแปลงจาก Roger และ Bendich (1985) โดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 มก. ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มล. เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากัน

ด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น

ตัวอย่างพืชสด ได้แก่ ใบข้าวโพด ใบมะละกอ และใบเฟื่องฟ้า สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน ISO 21571 (2005) โดยบดตัวอย่างพืชสด ใช้ 0.2 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร เติม 2% CTAB และ 0.1% B-mercaptoethanol ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น

ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Multiskan GO, Thermo Scientific) แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอสำหรับทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. ชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับการตรวจสอบคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม

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

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้เลือกทดสอบชุดไพรเมอร์อ้างอิงจาก Lee et al. (2009) เพื่อทดสอบการตรวจวิเคราะห์คัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมยีน CaMV35S promoter และ Nos terminator ซึ่งออกแบบจาก OSR events MS8 และ RF3 และไพรเมอร์อ้างอิงจาก Randhawa et al. (2013) ออกแบบสำหรับตรวจคัดกรอง ยีน P35S CaMV ของฝ้ายตัดแปรพันธุกรรม

การทดลองครั้งนี้สังเคราะห์ชุดไพรเมอร์ LAMP การตรวจวิเคราะห์ CaMV35S Promoter และ Nos terminator (Sigma) จากบริษัท ซีระเทรตติ้ง จำกัด ลำดับเบสไพรเมอร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1.2.1

ตารางที่ 1.2.1 ลำดับเบสของชุดไพรเมอร์สำหรับการทดลองในครั้งนี้

Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
CaMV35P LampF(FIC-F2)	GTCTTCAAAGCAAGTGGTTTTGGATAGTGGGATTGTGCG	Lee et al, 2009
CaMV35P LampR(BI-B2C)	TTCCACGATGCTCCTCGTTTTCTCTGCCGACAGTGG	
CaMV35P LoopF(LoopFc)	TCCACTGACGTAAGGG	
CaMV35P LoopR(LoopB)	GGGGTCCATCTTTGGG	
CaMV35P DisplF(F3)	AGGAAGGGTCTTGCG	
CaMV35P DisplR(B3c)	ATAAAGGAAAGGCCATCG	
T-nos LampF(Fic-F2)	AGATGGTTTTATGATTAGTTTTATTTATCCTAGTTTGCGC	Lee et al, 2009
T-nos LampR(BI-B2C)	TAATTCAACAGAATTATATGTTTTAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTG	
T-nos LoopF(LoopFc)	CAATTATACATTTAATACGCG	
T-nos LoopR(LoopB)	TGCAAGACCGGC	
T-nos DisplF(F3)	CATAGATGACACCGCG	
T-nos DisplR(B3c)	GATCGTTCAAACATTTGG	
F3-p35S	CTCCTCGGATTCCATTGC	Randhawa et al,2013
B3-p35S	TCTACAGGACGGACCATG	
FIP-p35S	ACGATGCTCCTCGTGGTGCATCGTTGAAGATGCCTCT	
BIP-p35S	CGTTCCAACCACGTCTCAAGTCTTGCGAAGGATAGTGG	
LoopF-p35S	ATCTTTGGGACCACTGTGCG	
LoopB-p35S	TGATATCTCCAAGTACGTAAGG	

3. ทดสอบสภาวะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาเทคนิค LAMP

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

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

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

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

ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอไวรัสอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Mon810 BT 11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 ถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม GTS40-3-2 ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับข้อมูลการตัดต่อพันธุกรรมที่มีองค์ประกอบของยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และหรือ Nos terminator

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

5. การตรวจสอบยีนคัดกรองการปนเปื้อนพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP

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

เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558-กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ตัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างทดสอบและการสกัดดีเอ็นเอ

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

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี GeneScan มีปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ 1,035 -1,897 ng/ul, โดยมีค่า ratio 260/280 เฉลี่ย 1.85-2.0 วิธี CTAB ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย 750 ng/ul ค่า ratio 260/280 เฉลี่ย 1.84-2.01 ซึ่งมีปริมาณและคุณภาพในระดับดีมาก โดยไม่ต้องทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ผ่านเรซิน สามารถนำไปทดสอบปฏิกิริยา ต่อด้วยเทคนิค LAMP ทำให้ลดขั้นตอนประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เนื่องจากเทคนิค LAMP มีความไวต่อปฏิกิริยายับยั้งต่ำ จึงทำให้ลดขั้นตอนและประหยัดต้นทุนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ผ่านเรซิน ทั้งนี้ในขั้นตอนการตรวจสอบด้วย Real-time PCR ของห้องปฏิบัติการต้องนำดีเอ็นเอผ่านเรซินเพื่อลดปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ก่อน วิธีการสกัดโดยไม่ต้องทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ สอดคล้องกับรายงานของ Li et al (2015) ซึ่งเทคนิค LAMP มีความไวต่อสารยับยั้งปฏิกิริยา ต่ำ สามารถเป็นวิธีทดสอบในภาคสนาม อย่างไรก็ตามควรต้องพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้มีขั้นตอนที่ง่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์เครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีราคาแพง เมื่อสกัดแล้วสามารถนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค LAMP ต่อได้เลย สำหรับ

รายการวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน และค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMOs องค์ประกอบยีนคัดกรอง (อ้างอิง: ISAAA, 2017 และ CBD Biosafety clearing house) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงใน ตารางที่ 1.2.2

ตารางที่ 1.2.2 แสดงรายการวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน ค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMOs และยีนคัดกรอง

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

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

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

2. ชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับการตรวจสอบคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม

การตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีการตรวจสอบคัดกรอง ทดสอบวิธีตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter โดยชุดไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ LAMP CaMV35P LampF(FIC-F2)/CaMV35P LampR (BI-B2C) ไพรเมอร์ Loop CaMV35P LoopF(LoopFc)/ LoopR(LoopB) และไพรเมอร์ Displacement CaMV35P DisplF(F3)/ CaMV35P DisplR(B3c) (Lee et al. 2009) ทดสอบปฏิกิริยา ตามวิธีของ Lee et al. (2009) ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่าง CRM ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วย SyBR GreenI ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจสอบยีน 35S promoter ได้แต่ไม่มีความสม่ำเสมอของค่าการทดสอบซ้ำ จึงสังเคราะห์ไพรเมอร์ชุดใหม่ F3-p35S/ B3-p35S, FIP-p35S/BIP-p35S, LoopF-p35S/LoopB-p35S (Rostamkhani et al. 2011) ทดสอบปฏิกิริยา LAMP ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าไพรเมอร์ชุดใหม่มีความสม่ำเสมอของผลการทดสอบ จึงเลือกใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับการทดสอบครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียสสูงกว่าไพรเมอร์ชุดแรกที่ 55 องศาเซลเซียส จึงทำให้ผลการทดสอบมีความสม่ำเสมอได้ดีกว่า

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

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

3. ทดสอบสถานะ (condition) ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาเทคนิค LAMP

ทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา LAMP ได้แก่ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยา LAMP ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละคู่ ความเข้มข้นดีเอ็นเอ รวมถึงการใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ platform ต่างๆ

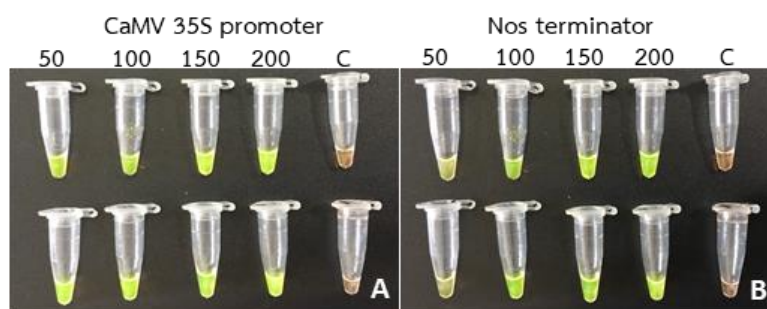
3.1 สถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP โดยเตรียมสารเคมีทดสอบปฏิกิริยารวม master mix ประกอบด้วย 2X Bst buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.5M Betaine, 0.2 μ M ไพรเมอร์ F3 & B3 (Displacement, outer primers), 0.2 μ M ไพรเมอร์ FIP&BIP (LAMP primers), 0.1 μ M ไพรเมอร์ LoopF & LoopB, Bst polymerase 8 unit จากนั้นแบ่งใส่หลอดละ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

พลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ทำให้เห็นการเรืองแสงสีเขียวชัดเจนมากขึ้น อ่านค่าผลปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า แต่ในขณะที่ดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่เป็นพีซีดีแปรพันธุกรรมจะไม่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับหลอดทดลองควบคุมที่ใช้น้ำ จะไม่พบการเปลี่ยนสีของสาร SYBR

3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP (amplification range) ในการตรวจยีน CaMV35Spromoter ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810ek และตรวจยีน Nos terminator ทดสอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603e โดยเปรียบเทียบการใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับคือ 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัม พบว่าทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอสามารถอ่านผลของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ได้ โดยการตรวจ Nos terminator อ่านผลการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาเป็นสีเขียวอมเหลืองได้ชัดเจนที่ปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมสีจะอ่อนกว่าที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมขึ้นไป เมื่อพิจารณาจากจำนวน Copies no. ของยีนตัดแปรพันธุกรรม มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยอื่นๆ ทั้งนี้ปฏิกิริยาการทดสอบสามารถใช้ช่วงดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ 50-200 นาโนกรัม โดยไม่เกิดปฏิกิริยายับยั้งจากความไม่บริสุทธิ์ของตัวอย่าง (ตารางที่ 1.2.3, ภาพที่ 1.2.1) จากผลการทดสอบดังกล่าวจึงเลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม 100 ng ในการทดสอบ

ตารางที่ 1.2.3 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอและ copies no. ในการตรวจยีน CaMV 35S promoter (Mon810) และ Nos terminator(NK603) ด้วย LAMP

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



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

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

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

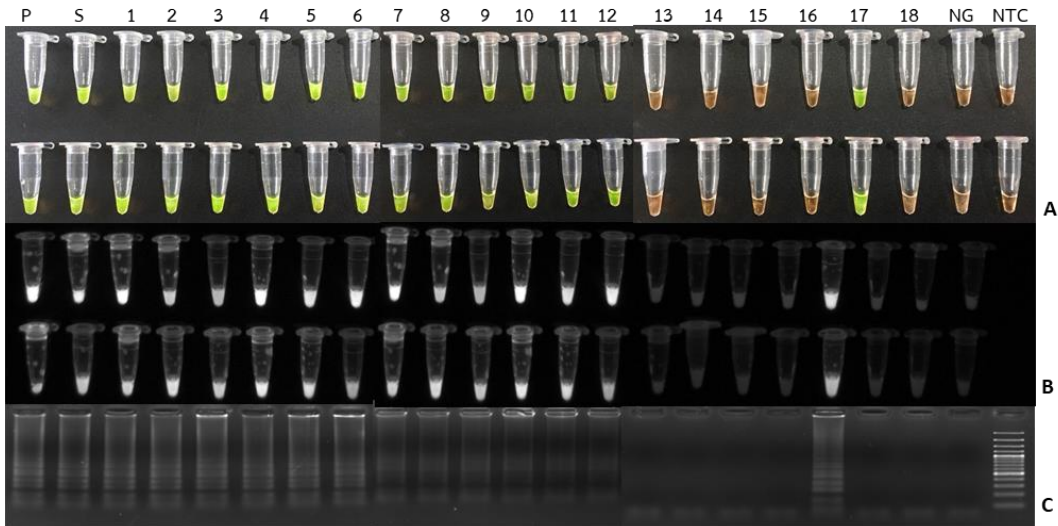
ตรวจความจำเพาะและความไวปฏิกิริยาโดยเทคนิค LAMP ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Mon810 BT11 BT176 NK603 GA21 MIR604 MIR162 Mon88017 Mon89034 จำนวน 21 รายการ ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GM ระดับต่างๆ ตั้งแต่การปนเปื้อนระดับต่ำถึงระดับสูง พบว่าปฏิกิริยาโดยชุดไพรเมอร์ LAMP F3-p35S/ B3-p35S, FIP-p35S/BIP-p35S, LoopF-p35S/LoopB-p35S (Rostamkhani et al. 2011) และ T-nos LampF(Fic-F2)/ T-nos LampR(BI-B2C), T-nos LoopF(LoopFc)/ T-nos LoopR(LoopB), T-nos DisplF(F3)/ T-nos DisplR(B3c) (Lee et al. 2009) ให้ผลการทดสอบที่มีความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีนพืชตัดแปรพันธุกรรม CaMV 35S promoter และ Nos terminator ตามลำดับ ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1.2.4, ภาพที่ 2, 3) ซึ่งจัดแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ตรวจพบยีน 35S promoter/ไม่พบ Nos terminator ได้แก่ ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 และ BT176 ระดับการปนเปื้อน <0.09 – 9.9 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ตรวจพบยีน 35S promoter และ Nos terminator ได้แก่ ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ BT11, NK603, Mon89034, Mon88017 โดยระดับการปนเปื้อนต่ำสุดคือข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ปนเปื้อน <0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดปริมาณดีเอ็นเอที่มีโอกาสปนเปื้อนใน 100 ng เท่ากับ 15.38 copies และระดับการเจือปนสูงสุด สายพันธุ์ Mon89034 99.42 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 ตรวจพบยีน Nos terminator และไม่พบยีน 35S promoter ได้แก่ GA21 MIR604 และ MIR162 ระดับการปนเปื้อนต่ำสุด <0.09 – 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการตรวจยีนคัดกรองด้วยเทคนิค LAMP ถูกต้องตรงกับข้อมูล gene construction ของ events การตัดแปรพันธุกรรม (ที่มา: ISAAA, 2017 และ CBD Biosafety clearing house)

ตารางที่ 1.2.4 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยเทคนิค LAMP

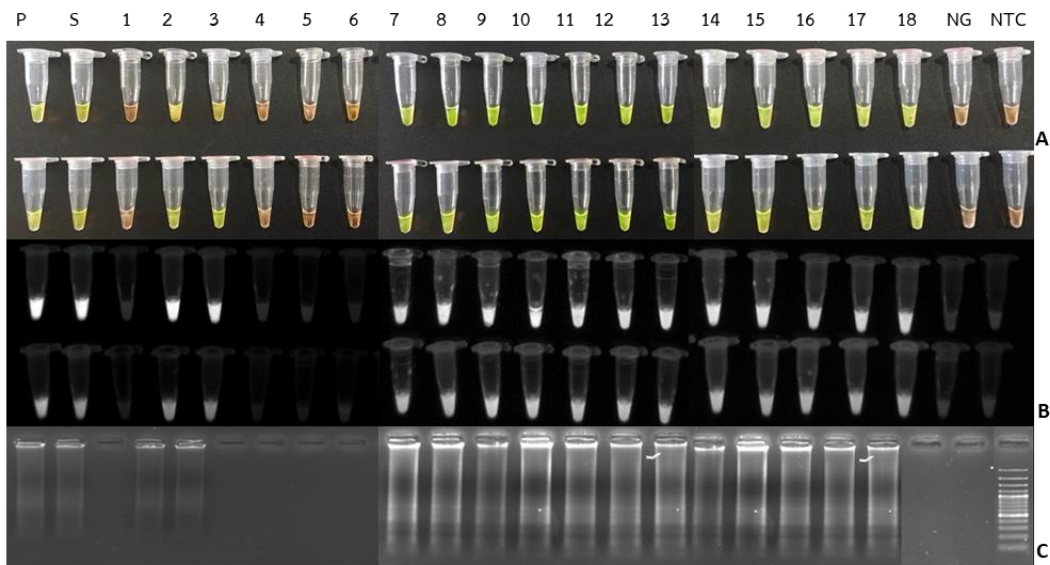
Event	GM construct (Visual inspection)		2% agarose gel inspection	
	35S promoter	Nos terminator	35S promoter	Nos terminator
Mon810 ak	+	-	+	-
Mon810 ck	+	-	+	-
Mon810 ek	+	-	+	-
Mon810 gk	+	-	+	-
BT176	+	-	+	-
BT11	+	+	+	+
NK603 a	+	+	+	+
NK603 b	+	+	+	+
NK603 c	+	+	+	+
NK603 d	+	+	+	+
NK603 e	+	+	+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

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ/หรือNos terminator ;
 - (negative) หมายถึงตรวจไม่พบ

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



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



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

5. ตรวจสอบการปนเปื้อนพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP

การตรวจสอบยีน CaMV35Spromoter และ Nos terminator ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวโพด 17 ตัวอย่าง (ต่างพันธุ์กัน) และใช้ดีเอ็นเอไวรัสคู่อ้างอิงมาตรฐาน NK603 ที่มีการปนเปื้อน 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นการศึกษาทดสอบควบคุมตรวจพบ (positive control) ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเฟืองฟ้าซึ่งไม่เป็นพืชตัดแปรพันธุกรรม และน้ำเป็นการทดลองควบคุมตรวจไม่พบ (negative control) และทดสอบตรวจคัดกรองใน

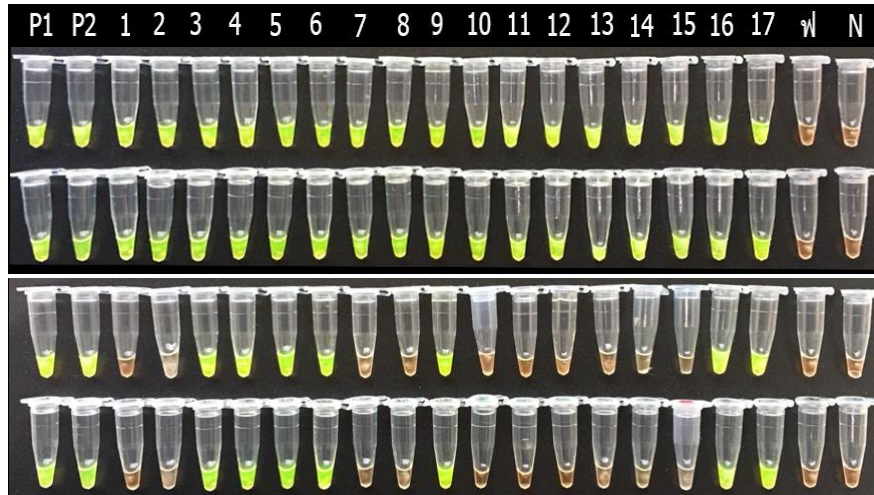
ตัวอย่างมะละกอ 4 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ การอ่านผลตรวจพบหรือตรวจไม่พบ ผลการทดสอบต้องได้เหมือนกันทั้งสองซ้ำ เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ multiplex Real-time PCR

ผลการทดสอบตัวอย่างข้าวโพดรหัส 1895 จำนวน 17 ตัวอย่าง ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter 17/17 ตัวอย่าง และตรวจพบยีน Nos terminator 7/17 ตัวอย่าง โดยให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex Real-time โดยการทดลองควบคุมที่ใช้ดีเอ็นเอ NK603 ที่มี 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์พืชตัดแปรพันธุกรรมตรวจพบยีนคัดกรอง CaMV35S promoter และ Nos terminator โดยการทดลองเปรียบเทียบที่ใช้ดีเอ็นเอเฟืองฟ้าและน้ำ ตรวจไม่พบปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเรืองแสง SyBR (ตารางที่ 1.2.5 ภาพที่ 4)

ตารางที่ 1.2.5 ผลการตรวจคัดกรองข้าวโพดด้วยเทคนิค LAMP เทียบผลกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

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

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



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาการตรวจคัดกรองข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมด้วย LAMP, P; positive NK603 0.1%, P2; positive NK603 0.5%, no. 1-17 unknown sample, F; nonGM (เฟืองฟ้า), N; NTC ตรวจสอบการเปลี่ยนสีเขียวอมเหลืองของสาร SYBR Green I (A) ตรวจยีน 35S promoter, (B) ตรวจยีน Nos terminator

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เทคนิค LAMP โดยชุดไพรเมอร์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม ปฏิกริยาประกอบด้วย 2X *Bst* buffer, 0.4mM dNTPs, 0.5M Betaine, 0.2µM F3-B3 และ FIP-BIP primers, 0.1µM Loop primers, *Bst* polymerase โดยใช้ DNA template ได้ตั้งแต่ 50-200 ng (การทดลองครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอ 100 ng) บ่มปฏิกริยาที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดปฏิกริยาโดยการเติมสาร SYBR green I 0.2 µl อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างที่เป็นพืชตัดแปรพันธุกรรม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวอมเหลือง โดยตัวอย่างพืชไม่ตัดแปรพันธุกรรมและตัวอย่างควบคุมที่ใช้น้ำเป็นการทดลองเปรียบเทียบจะยังเป็นสีส้มเช่นเดิม สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย 2% gel electrophoresis

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon810 BT 11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 ถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม GTS40-3-2 ด้วยวิธี GeneScan ตัวอย่างพืชสด ได้แก่ ข้าวโพด มะละกอ และเฟืองฟ้า สกัดวิธี CTAB ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ และพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. ผลการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ และถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม (GTS40-3-2) จากการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ถูกต้องตรงกับข้อมูลการตัดแปรพันธุกรรม และผลทดสอบด้วย Real-time PCR อาทิ ตัวอย่าง Mon810, BT176 ให้ผลบวกของ CaMV35S promoter และผลลบของ Nos terminator สำหรับตัวอย่าง BT11, NK 603, Mon89034 ตรวจพบทั้งยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ตัวอย่าง MIR604, MIR162 ให้ผลลบของ CaMV 35S promoter และผลบวกของ Nos terminator

4. ปฏิบัติการ LAMP มีความไวของวิธีทดสอบที่ขีดจำกัด (LOD) 0.1% 100 ng NK603 ซึ่งเทคนิค LAMP สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองเผ่าละวังการปนเปื้อนพืชตัดแปรพันธุกรรม โดยใช้ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในหน่วยงานส่วนภูมิภาคได้

ข้อเสนอแนะ

การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจคัดกรองเผ่าละวังข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมในพื้นที่แปลงปลูกของประเทศไทย สามารถทำได้ด้วยการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับใช้ในภาคสนาม จากนั้นทำการตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter ตามวิธีการข้างต้น ซึ่งใช้ระยะเวลาบ่มปฏิบัติการเพียง 1 ชั่วโมง อ่านผลปฏิบัติการโดยเติมสารเรืองแสง SyBR GreenI สำหรับตัวอย่างที่ตรวจไม่พบยีน CaMV 35S promoter ให้ทำการตรวจสอบยีน Nos terminator ด้วยชุดไพรเมอร์ LAMP สำหรับ Nos terminator หากตรวจพบยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และหรือ Nos terminator สามารถนำดีเอ็นเอไปตรวจจำแนกยีนจำเพาะที่ตัดต่อเข้าพืชตัดแปรพันธุกรรมต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

-ขยายผลการใช้ประโยชน์งานวิจัย โดยออกแบบจัดทำเป็นชุดตรวจสอบภาคสนาม และห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก และอบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้กับเจ้าหน้าที่ทดสอบ ของหน่วยงานส่วนภูมิภาค เพื่อเผ่าละวังพืชตัดแปรพันธุกรรม

-นำเทคนิค LAMP ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR ช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์และเพิ่มความไวในการตรวจสอบตามที่มีการตีพิมพ์เอกสารวิชาการนานาชาติ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ตัดแปรพันธุกรรม นักศึกษาฝึกงาน ผู้มีส่วนช่วยดำเนินการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

อมรรัตน์ ร่มพฤษ. 2554. เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). บทความ

พิเศษ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 21(3) 201-206 กรกฎาคม-กันยายน 2554.

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

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

- Chen, J., Huang, C., Zhang, X., Yu, R. and Wu, Z. 2011. Detection of herbicide-resistant maize by using loop-mediated isothermal amplification of the pat selectable marker gene. *Africal Journal of Biotechnology*. 10(75) 17055-17061.
- Cheng, N., Shang, Y., Xu, Y., Zhang, L., Luo, Y. and Huang, K. 2017. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNAzyme-lateral flow biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 91: 408-416.
- Huang, X., Chem, L., Xu, J., Ji, H-F., Zhu, S. and Chen, H. 2014. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Chemistry* (156) 184-189.
- Lee, D., Mura, M.L., Allnutt, T. R. and Powell, W. 2009. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequence. *BMC Biotechnology* 9:7 doi:10.1186/1472-6750-9-7
- Li, R., Wang, C., Ji, L., Zhao, X., Liu, M., Zhang, D. and Shi, J. 2015. Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) assay for GMO on: recent progresses and future perspectives. *Open Access Library Journal*, 2: e1264.
- Randhawa, G. J., Singh, M., Morisset, D., Sood, P. and Zel, J. 2013. Loop-mediated isothermal amplification: rapid visual and Real-Time methods for detection of genetically modified crops. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61 (47), pp 11338–11346
- Rostamkhni, N., Haghazari, A., Tohidfar, M. and Moradi, A. 2011. Rapid identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47(4) :140-148.
- Shen, P., Geng, F., Yu, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Li, Z., Zhang, W., Shu, C., Zhang, Y. and Tan J. 2016. A rapid loop-mediated isothermal amplification method for detection of the modified GM *cry1A* gene in transgenic insect-resistant cotton and rice *Food control*. 62: 357-364.
- Singh, M., Randhawa, G.J., Sood, P. and Bhoge, R.K. 2015. Loop-mediated isothermal amplification targeting insect resistant and herbicide tolerant transgenes: Monitoring for GM contamination in supply chain. *Food Control*. 51: 283-292.
- Xu, J., Zheng, Q., Yu, L., Liu, R., Zhao, X., Wang, G. and Wang, Q. 2013. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25. *Food Science & Nutrition* 1(6):432-438.

1.

ภาคผนวก

สารเคมีปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ LAMP ตรวจยีน CaMV35S Promoter และ Nos terminator

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

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

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

การทดลองที่ 1.3 วิจัยพัฒนาการตรวจ GM construct specific เพื่อการจำแนก
มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

Development of GM construct specific detection method to identify GM papaya variety

พงศกร สรรค์วิทยากุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ อีระ ชูแก้ว^{1/}
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

นับตั้งแต่ปี 2555 เป็นต้นมา มะละกอผลสดส่งออกของไทยสู่สหภาพยุโรปได้รับการแจ้งเตือนว่ามีการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาตหลายครั้งและมีการตรวจพบการปนเปื้อนในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตร เช่น ในประเทศญี่ปุ่น เป็นผลให้คณะตรวจติดตามของ FVO จากสหภาพยุโรปเดินทางมาตรวจประเมินปัญหาการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อพิจารณาหากจะต้องระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากประเทศไทย หากสินค้าถูกตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนจะถูกตีกลับหรือทำลายและไม่สามารถเข้าวางขายในประเทศนั้นๆ ได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจนและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ตรวจพบปนเปื้อนในการส่งออกที่ดำเนินการทดสอบความใช้ได้แล้ว โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์แบบ Screening test เท่านั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาตและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus เมื่อทดสอบความใช้ได้แล้วพบว่าค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2 อยู่ที่ 10 copies/ μ l (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พบว่า ค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น และสามารถทดสอบเชิงปริมาณได้โดยมีค่า % Bias ที่ 9.94% วิธีการทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS จะช่วยยกระดับการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการและช่วยป้องกันการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในการส่งออกและการปลูกภายในประเทศได้

^{1/} สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ทั้งนี้ตั้งแต่ปี 2555 เป็นต้นมา มาตรการผลส่งออกของไทยสู่สหภาพยุโรปได้รับการแจ้งเตือนจากระบบ RASFF ของสหภาพยุโรปว่ามีการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาต ถึง 37 ครั้ง (Reference no. 2012.BBD, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) of European Commission, 14 May, 2012) และมีการตรวจพบการปนเปื้อนในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตรในประเทศญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของมะละกอซึ่งส่งออกจากไทยไปญี่ปุ่นจึงจะต้องถูกสุ่มตรวจ 100% ทุกเที่ยว

เป็นผลให้คณะตรวจติดตามของ FVO จากสหภาพยุโรปเดินทางมาตรวจประเมินปัญหาการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในมะละกอผลส่งออกจากไทยเพื่อพิจารณาหากจะต้องระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากประเทศไทยหากสถานการณ์ยังไม่ดีขึ้นและนอกจากมะละกอผลสดแล้วยังเกิดปัญหาการตรวจพบผลิตภัณฑ์ซึ่งมีส่วนผสมของมะละกอปนเปื้อน GM event ในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตรซึ่งนำเข้าสู่ญี่ปุ่นเป็นต้น โดยหากสินค้าที่ออกถูกตรวจพบว่าการปนเปื้อนจะถูกตีกลับหรือทำลายและไม่สามารถผ่านด่านตรวจสินค้าเพื่อเข้าวางขายในประเทศนั้นๆได้ ความเสียหายที่เกิดขึ้นมีมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี ทำให้ผู้ประกอบการหลายรายจำเป็นต้องหยุดส่งออكمะละกอเพื่อตัดปัญหาต้นทุนจากระบบควบคุมคุณภาพที่สูงเกินไป และหากทางสหภาพยุโรประงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากไทยอีกจะเกิดผลกระทบในวงกว้างเนื่องด้วยประเทศอื่นๆอาจจะระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากไทยตามยุโรปด้วยซึ่งจะทำให้ ธุรกิจส่งออกมะละกอของประเทศไทยประสบปัญหาขั้นรุนแรงได้

อนึ่งการส่งออกสินค้าดัดแปรพันธุกรรมไปยังประเทศต่างๆ ต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของแต่ละประเทศหรือทวีปในการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมสู่ประเทศนั้นๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่น การนำเข้าสินค้าซึ่งประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมจะต้องปฏิบัติตามกฎหมายการประเมินความเสี่ยงของอาหารที่ผลิตจากหรือมีส่วนผสมของสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม ลงวันที่ 1 เมษายน 2544 (Kosuke *et al.*, 2014) และสหภาพยุโรป ต้องปฏิบัติตามระเบียบ 2001/18/EC ในการลงทะเบียนสินค้า GMOs (Directive 2001/18/EC on the deliberate release of GMOs into the environment) เป็นต้น

ทั้งนี้หลังจากการตรวจติดตามของคณะ FVO จากสหภาพยุโรป คณะผู้แทนถาวรแห่งสหภาพยุโรปประจำประเทศไทยได้สนับสนุนการฝึกอบรมโดยผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจวิเคราะห์สินค้าดัดแปรพันธุกรรม และมีการวางแผนการปฏิบัติงานเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวซึ่งเป็นที่มาของงานวิจัยในเรื่องการตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และสืบหาที่มาของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนอยู่ในสินค้าส่งออกและในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย

หลักการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของ GMOs โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและสินค้าเกษตรที่มีความเสี่ยงนั้นวางอยู่บนพื้นฐานการตรวจ 2 หลักการใหญ่คือ การตรวจหาโปรตีน Marker เช่นโปรตีนที่ผลิตจาก Antibiotic resistance ยีนซึ่งใช้ในการดัดแปรพันธุกรรมและการตรวจหาดีเอ็นเอพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงของสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี PCR หรือ Real-time PCR โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 1.การตรวจ Screening เพื่อสืบหา GM Element specific (DNA) ในตัวอย่าง เช่น GM Promoter หรือ GM Terminator ซึ่งไม่ได้มีอยู่ตามธรรมชาติของตัวอย่างนั้นๆ 2.การตรวจโครงสร้างของ Insert gene และ GM element ที่อยู่ในจีโนมของตัวอย่าง (GM construct) ซึ่งช่วยให้สามารถระบุแหล่งที่มาของ GMOs ชนิดนั้นได้ว่าใครเป็นผู้ผลิตขึ้น 3.การตรวจ Event specific เป็นการตรวจระบุที่จำเพาะเจาะจงมากที่สุดซึ่งสามารถระบุแหล่งที่มาของ GMOs และตำแหน่งที่ตั้งของ GM construct บนจีโนม อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวิธีนี้ถึงแม้จะละเอียดมากที่สุด แต่

เทคโนโลยีในปัจจุบันก้าวหน้าไปมากมีการถ่าย GM construct ชนิดเดียวกันเข้าไปในพืชหลากหลายชนิดซึ่ง GM construct นั้นๆ เข้าไปอยู่ในจีโนมแบบสุ่มดังนั้นการตรวจโดยวิธี Event specific อาจตรวจไม่พบหากมีการเปลี่ยนชนิดพืชและไม่ใช้พืชตั้งต้นที่ใช้ผลิต GMOs หรือเกิดการกลายตามธรรมชาติ การตรวจแบบ Event specific จึงเหมาะสมสำหรับการระบุสายพันธุ์แบบจำเพาะเจาะจงของผู้ผลิต GMOs มากกว่าที่จะใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการจึงเป็นการตรวจวิเคราะห์โดยการตรวจแบบ Screening และ GM construct เพื่อที่จะสามารถยืนยันว่าตัวอย่างนั้นปนเปื้อน GMOs รวมทั้งสามารถระบุที่มาได้อีกด้วย

การวิเคราะห์ผลการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี Matrix approach จากการตรวจวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมยีน CP (ข้อมูลงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผชช.ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) พบว่ามีการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ในตัวอย่างที่ได้จากการสุ่ม นอกจากนี้จากการที่ประเทศญี่ปุ่นตรวจพบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์แปรรูปส่งออกจากไทย กระทรวงสาธารณสุขของญี่ปุ่นได้ตรวจพบ GM Construct specific ชนิด PRSV-SC และได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Construct specific เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของมะละกอ GM ชนิด PRSV-SC ที่ตรวจพบใน ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากประเทศไทย (Kosuke *et al.*, 2014) นอกจากนี้ทางญี่ปุ่นยังใช้วิธีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบเดียวกันในการพัฒนาวิธีการตรวจหา การปนเปื้อนของมะละกอ GM ชนิด PRSV-YK ซึ่งเป็นของไต้หวัน (Kosuke *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจของญี่ปุ่นยังเป็นวิธีที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากปริมาณตัวอย่างที่ใช้มีจำกัดและได้มาจากมะละกอซึ่งแปรรูปแล้วอยู่ในผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจทำให้ DNA ที่ใช้ในการทดลองไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอและไม่มีการใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานเป็นเพียงการนำตัวอย่าง Positive มาวิเคราะห์เนื่องจากในมะละกอยังไม่มีการผลิตวัสดุอ้างอิงเชิงการค้าและไม่มีการ Validate วิธีการตรวจวิเคราะห์ การนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีมาตรฐานจึงทำได้ยาก

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางการแปรรหัสสายพันธุกรรมมีความก้าวหน้าไปมากเช่นระบบ NGS หรือ Next Generation Sequencing ทำให้สามารถสร้าง Genomic profiling ได้ง่ายขึ้นและด้วยความรวดเร็วกว่าในอดีตมาก เพราะในปัจจุบันเราสามารถถอดรหัส Genome ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ ได้ภายในเวลาไม่ถึง 5 วัน และถ้าขนาดของ Genome ไม่ใหญ่มากก็สามารถทำได้ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงด้วยงบประมาณที่ถูกลงกว่าในอดีต (Alisa W. *et al.*, 2012) นอกจากระบบ NGS จะเข้ามาปฏิวัติการศึกษาด้าน Genomic แล้วห้องปฏิบัติการอ้างอิงในสหภาพยุโรปเริ่มมีการนำระบบ NGS มาใช้ในการสืบหา Unapproved GM product หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน GMOs ที่ไม่ได้รับการอนุญาตเพื่อใช้ในการสืบหา GM Construct ที่มีหลากหลายชนิดและมากขึ้นเรื่อยๆ (UGMMONITOR project: Development of a molecular biology platform and a database (safety assessment) to detect unauthorized GMOs in the European food/feed chain)

ในการทดลองนี้จะเป็นการนำตัวอย่างมะละกอที่รวบรวมได้จากโครงการเฝ้าระวังการปนเปื้อน GMOs และยืนยันเบื้องต้นจากการตรวจ Screening ว่าเป็น GMOs (ข้อมูลงานวิจัยและตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จาก ผชช.ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์) มาใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ GM Construct specific โดยวิธีการวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมแบบ Real-time PCR เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ GM Papaya Construct specific และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งแบบ Qualitative และ Quantitative ที่ตรวจพบจากการส่งออกมะละกอของไทยประเทศไทย

นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้จะช่วยให้ภาครัฐสามารถระบุที่มาของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนในสินค้าส่งออกและในสิ่งแวดล้อมได้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นช่วยแก้ปัญหาการส่งออก และสามารถระบุได้

ว่าเป็นการหลุดออกสู่ธรรมชาติโดยความผิดพลาดของสถาบันวิจัยหรือเป็นการลักลอบนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศมาปลูกซึ่งจะช่วยให้สามารถบังคับใช้กฎหมายได้ง่ายขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ในสภาพจริง Roche Applied Science LightCycler 480
2. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (GeneAmp PCR System 9700)
3. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Gel-electrophoresis
4. Vortex mixer
5. Water bath
6. เครื่องปั่นตกตะกอน Centrifuge
7. เครื่องวัดปริมาณ DNA GeneQuant II RNA/DNA
8. UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอมะละกอด้วยวิธี Cell breaking

ดำเนินการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอมะละกอด้วยวิธี Cell breaking หรือสกัดโดยชุดสกัด DNeasy mericon Food Kit โดยชั่งตัวอย่างหนัก 0.2-0.25 กรัม ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลูกปืนสแตนเลส ซึ่งนั่งฆ่าเชื้อมาแล้วลงไปหลอด จำนวน 3 เม็ด เติม Homogenization buffer (Solution I buffer) (ที่เติม β -mercaptoethanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้บัพเฟอร์เข้ากับตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการใส่ทิวบ์เข้ากับช่องใส่ทิวบ์ของเครื่องตี ตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเปิดให้เครื่องทำงาน จำนวน 5 รอบ (ใช้เวลานาน 1 นาที ต่อบรอบ) เติม Lysis buffer (Solution II buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลาย ผสมกันนำไปบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Precipitation buffer (Solution III buffer) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาที ตูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งไป เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไปแล้วเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง GeneQuant II RNA/DNA

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan การผสมตัวอย่างมะละกอ GM และ Non-GM เพื่อทดสอบความใช้ได้เชิงคุณภาพและปริมาณ

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai 2 และ ใบมะละกอ Non-GM โดยบดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วตักใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 200 mg สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan

(Rogers *et al.* 1985) โดย เติม Lysis buffer และ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่บรรจุตัวอย่างไว้แล้ว 200 mg (2 ซ้ำ) โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อ Lysis buffer และ Proteinase K ดังนี้

ตารางที่ 1.3.1. แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างต่อการใช้ Buffer

Test portion	Lysis buffer (มิลลิลิตร)	Proteinase K (ไมโครลิตร)
0.1-0.3 กรัม	0.80 - 1.30	20

จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 ชั่วโมง วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ปิดเปิดส่วนใส่ใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส่ที่ปิดเปิดได้ เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ปิดเปิดของหลอดที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่

เติม 100% Isopropanol ที่แช่เย็นไว้จำนวน 2 ใน 3 ของปริมาตรของหลอดที่ปิดเปิดได้เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปแช่ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของหลอดทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เท Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมน้ำกลั่นหนึ่งซ้าเชื้อ จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard™ minicolumn โดยเติม Miniprep DNA Purification Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) ติดกับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ปิดเปิดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA Purification Resin จากข้อ 4.4.1 ลงใน syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.2 หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยดันสารละลายลงจนหมด ดีเอ็นเอจะเกาะติดกับ Silica ใน Minicolumn ส่วนของหลอดจะไหลออก ทิ้งส่วนของหลอดนั้นไปเติม 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อล้างดีเอ็นเอ 1 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม 80% Isopropanol ให้ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติด Syringe กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของหลอดส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (อุ่น) หนึ่งซ้าลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

นำ GM และ Non-GM Genomic DNA ที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ ความเข้มข้น 40 ng/μl เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.* 1991) สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/μl (Arumuganathan K. *et al.* 1991) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 & (\text{ความเข้มข้น DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 1,000) / \text{papaya haploid genome (in pg)} \\
 & = (40 \times 1,000) / 0.39 \\
 & \approx 102,564 \text{ Copies/}\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

นำ Stock Genomic DNA GM ไปเจือจางด้วย Non-GM Genomic DNA จนได้ความเข้มข้น GM genome copies 100 Copies/ μ l จากนั้นนำ DNA Genomic GM (100 Copies/ μ l) และ Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.2. แสดงขั้นตอนการผสม GM และ Non-GM Genomic DNA เพื่อเตรียมทดสอบ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5	Dilution 6
Volume used GM genomic DNA (μ l)	40.00	20.00	10.00	4.00	5.00	5.00
Volume used Non-GM genomic DNA (μ l)	60.00	80.00	90.00	96.00	95.00	95.00
Total	100	100	100	100	100	100
	จุด GM DNA จาก 100 copies/ μ l	จุด GM DNA จาก 100 copies/ μ l	จุด GM DNA จาก 100 copies/ μ l	จุด GM DNA จาก 100 copies/ μ l	จุด GM DNA จาก 40 copies/ μ l	จุด GM DNA จาก 20 copies/ μ l
Final GM concentration	40 copies/ μ l	20 copies/ μ l	10 copies/ μ l	4 copies/ μ l	2 copies/ μ l	1 copies/ μ l
GM Genome Copies number (in 20 μ l mix)	200	100	50	20	10	5
Total Genome Copies number (in 20 μ l mix)	307,892	410,356	461,588	492,328	487,190	487,185
% Contamination ((GM Genome/Total Genome)X100)	0.065	0.0244	0.01	0.0041	0.00205	0.00103

3. การทำปฏิกิริยา PCR Screening test และ PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

การทำปฏิกิริยา PCR Screening test ดำเนินการโดยใช้ GoTaq® Green Master Mix ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.3. แสดงขั้นตอนการเตรียม Master-mix สำหรับ Screening test PCR

Combination	Final concentration	Volume (µL)
GoTaq® Green Master Mix, 2X	2X	12.5 µL
10 pmol/ul forward primer	500 nM	1.25 µL
10 pmol/ul reverse primer	500 nM	1.25 µL
DNA template	50 ng	NA
Nuclease-Free Water to		เติมจนได้ปริมาตร 25 µL
Total volume		25

ดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.4 แสดง program การทำ Screening test PCR

Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	95°C	2 min
Denaturation	95°C	30 sec
Binding	45-60 °C	30 sec
Extension	72°C	30 sec - 1 min
Cooling	4°C	10 min

X 35 Cycles

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมด้วยคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R ขนาด 1,164 bp ดำเนินการโดยใช้ Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.5 แสดงการเตรียม Master-mix เพื่อการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

Combination	Final concentration	Volume (μL)
5X Phusion HF or GC Buffer	1X	4 μL
10 mM dNTPs	200 μM	0.4 μL
10 pmol/ μL forward primer	500 nM	1 μL
10 pmol/ μL reverse primer	500 nM	1 μL
DNA template	50 ng	NA
Phusion DNA Polymerase	0.5 units/25	0.2 μL
Nuclease-Free Water to		เติมจนได้ปริมาตร 20 μL
Total volume		20

ดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.6 แสดงการเตรียม program Phusion® High-Fidelity PCR

Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	98°C	30 sec
Denaturation	98°C	10 sec
Binding	61 °C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Cooling	4°C	10 min

X 35 Cycles

4. การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method โดยวิธี Real-time PCR

ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอใบมะละกอ GM 4 ตัวอย่างเพื่อทดสอบ Construct specific detection method ที่ออกแบบเบื้องต้นด้วยวิธี Real-time PCR ปรับความเข้มข้น DNA ให้เป็น 20 ng/ μL แล้วเตรียม Real-time PCR Master-mix ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.7 แสดงการเตรียม Master Mix การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method โดยวิธี Real-time PCR

Combination	Final concentration	Volume (μL)
LightCycler probe master	1X	10 μL
10 mM dNTPs	200 μM	0.4 μL
10 pmol/ μL forward primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ μL reverse primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ μL probe	250 nM	0.5 μL
DNA template (40 ng/ μL)	50 ng	5 μL
Nuclease-Free Water to		3.5 μL
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.8 แสดงการเตรียม Real-time PCR program สำหรับ Construct specific 35S-CM2-NOS detection

Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45
Cycles

5. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method และปริมาณต่ำสุดที่ วิธีการตรวจวิเคราะห์จะตรวจพบสำเนาของจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR โดย คัด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว Dilution 1-6 Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 4 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 16 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.9 แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR
Construct specific 35S-CM2-NOS detection validation

Combination	Final concentration	Volume (μL)
LightCycler probe master	1X	10 μL
10 mM dNTPs	200 μM	0.4 μL
10 pmol/ μL forward primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ μL reverse primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ μL probe	250 nM	0.5 μL
DNA template (40 ng/ μL)	200 ng	5 μL
Nuclease-Free Water to		3.5 μL
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.10 แสดง Real-time PCR program สำหรับ
Construct specific 35S-CM2-NOS detection method validation

Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45
Cycles

6. การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai 2
40 ng/ μL และ ตัวอย่างกล้วยเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่า เป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/ μL เป็น Background
DNA เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.* 1991)
สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/ μL (Arumuganathan K. *et al.* 1991) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 & (\text{ความเข้มข้น DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 1,000) / \text{papaya haploid genome (in pg)} \\
 & = (40 \times 1,000) / 0.39 \\
 & \approx 102,564 \text{ Copies/}\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/ μ l มี haploid genome (in pg) = 1.13 pg

$$\begin{aligned}
 & (\text{ความเข้มข้น DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 1,000) / \text{soybean haploid genome (in pg)} \\
 & = (100 \times 1,000) / 1.13 \\
 & \approx 88,496 \text{ Copies/}\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

นำ DNA Genomic GM และ Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาตรเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.11 แสดงขั้นตอนการผสม GM และ Non-GM Genomic DNA

เพื่อเตรียมทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5
Volume used GM genomic DNA (μ l)	15.60	8.00	8.00	8.00	4.00
Volume used Non-GM genomic DNA (μ l)	64.40	72.00	72.00	72.00	76.00
Total (μ l)	80	80	80	80	80
GM DNA pipeted	ดูดจาก Stock	ดูดจาก 20kcopies/ μ l	ดูดจาก 2kcopies/ μ l	ดูดจาก 200copies/ μ l	ดูดจาก 200copies/ μ l
Final concentration GM copies/ μ l (5 μ l)	20,000 copies/ μ l	2,000 copies/ μ l	200 copies/ μ l	20 copies/ μ l	10 copies/ μ l
GM Genome Copies number (in 20 μ l mix)	100,000	10,000	1,000	100	50
Total Genome Copies number (in 20 μ l mix)	456,195	408,230	399,230	398,330	420,404
% Contamination ((GM Genome/Total Genome) \times 100)	22%	2.45%	0.25%	0.025%	0.01%

ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR โดย คัด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว Dilution 1-5 Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 2 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 8 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.12 แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR
Construct specific 35S-CM2-NOS detection validation

Combination	Final concentration	Volume (μ L)
LightCycler probe master	1X	10 μ L
10 mM dNTPs	200 μ M	0.4 μ L
10 pmol/ μ l forward primer	250 nM	0.5 μ L
10 pmol/ μ l reverse primer	250 nM	0.5 μ L
10 pmol/ μ l probe	250 nM	0.5 μ L
DNA template (40 ng/ μ l)	200 ng	5 μ L
Nuclease-Free Water to		3.5 μ L
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.13 แสดง Real-time PCR program สำหรับ
Construct specific 35S-CM2-NOS detection method validation

Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45
Cycles

7. การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของยีน Papain

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai 2 40 ng/μl และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/μl เป็น Background DNA เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.* 1991) สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/μl (Arumuganathan K. *et al.* 1991) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} & (\text{ความเข้มข้น DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 1,000) / \text{papaya haploid genome (in pg)} \\ & = (40 \times 1,000) / 0.39 \\ & \approx 102,564 \text{ Copies/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/μl มี haploid genome (in pg) = 1.13 pg

$$\begin{aligned} & (\text{ความเข้มข้น DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 1,000) / \text{soybean haploid genome (in pg)} \\ & = (100 \times 1,000) / 1.13 \\ & \approx 88,496 \text{ Copies/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

นำ DNA Genomic มะละกอ และ ถั่วเหลือง Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางที่ 1.3.1.

ตารางที่ 1.3.14 แสดงขั้นตอนการผสม DNA มะละกอ และ ถั่วเหลือง Non-GM Genomic DNA เพื่อเตรียมทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของยีน Papain

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5
Volume used papaya genomic DNA (μl)	15.60	8.00	8.00	8.00	4.00
Volume used Soy Non-GM genomic DNA (μl)	64.40	72.00	72.00	72.00	76.00
Total (μl)	80	80	80	80	80
Papaya DNA pipetted	ดูดจาก Stock	ดูดจาก 20kcopies/μl	ดูดจาก 2kcopies/μl	ดูดจาก 200copies/μl	ดูดจาก 200copies/μl
Final concentration Papaya genome copies/ μl (5 μl)	20,000 copies/ μl	2,000 copies/μl	200 copies/ μl	20 copies/ μl	10 copies/ μl
Papaya Genome Copies number (in 20 μl mix)	100,000	10,000	1,000	100	50
Total Genome Copies number (in 20 μl mix)	456,195	408,230	399,230	398,330	420,404
% Papaya genome DNA ((Papaya Genome/Total Genome)X100)	22%	2.45%	0.25%	0.025%	0.01%

ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหา ยีน Papain ของ Wei J. *et al.* 2016 โดย คัด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว 5 Dilution Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 2 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 8 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังตารางที่ 1.3.2.

ตารางที่ 1.3.15 แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR
Papain detection

Combination	Final concentration	Volume (μ L) (1x)
Sterile water		3.5
LightCycler probe master	1x	10
10 μ mol/ μ l forward primer	0.25 μ mol/ μ l	0.5
10 μ mol/ μ l reverse primer	0.25 μ mol/ μ l	0.5
10 μ mol/ μ l probe	0.25 μ mol/ μ l	0.5
DNA template (40 ng/ μ l)	200 ng	5
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรม ตารางที่ 1.3.16.

ตารางที่ 1.3.16 แสดง Real-time PCR program สำหรับ
Papain detection method

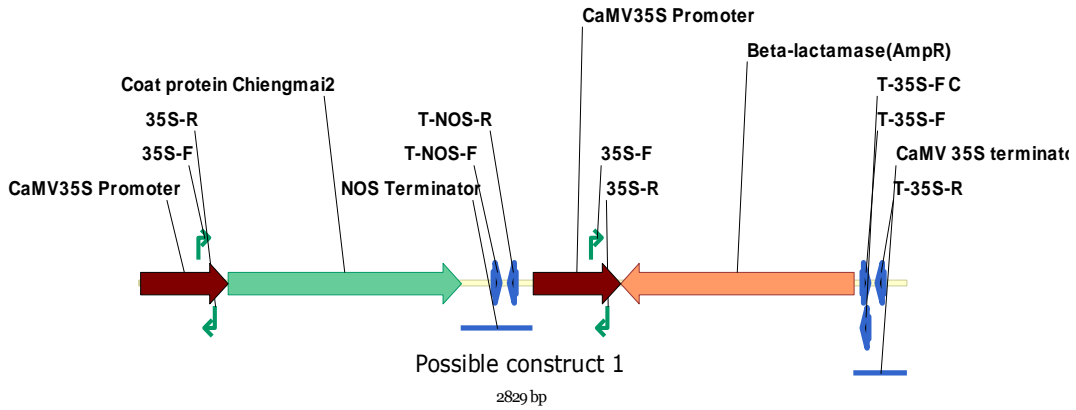
Step	Temperature	Time
1 st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	4°C	10 min

X 45
Cycles

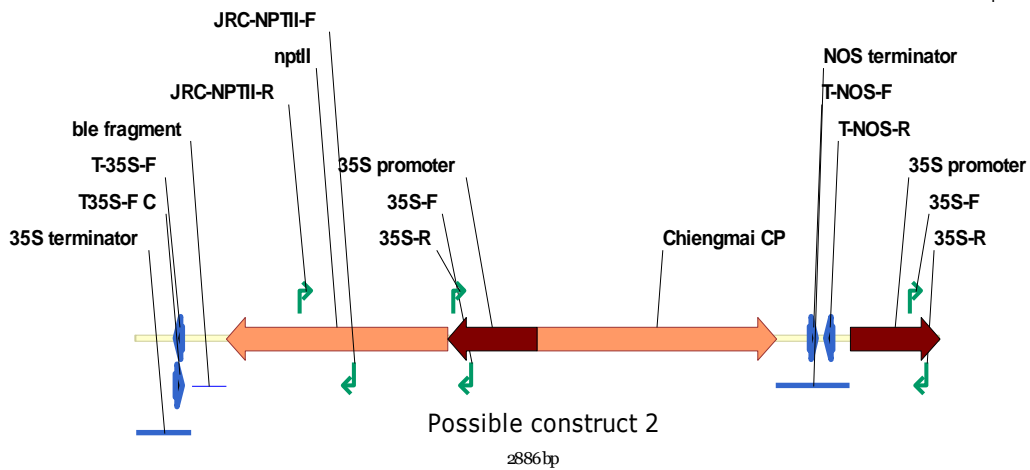
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. สืบค้นและรวบรวมข้อมูล ชิ้นส่วนและโครงสร้างของรหัสพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าไปในมะละกอ GMOs

จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลต่างๆ สามารถตั้งสมมุติฐานโครงสร้างของรหัสพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าไปในมะละกอ GMOs ที่เป็นไปได้ 2 โครงสร้าง (ภาพที่ 1, 2)



ภาพที่ 1.3.1 แสดงลักษณะ GM construct ที่เป็นไปได้แบบที่ 1 ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม



ภาพที่ 1.3.2. แสดงลักษณะ GM construct ที่เป็นไปได้แบบที่ 2 ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

จากโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เป็นไปได้ทั้งสองโครงสร้างนั้นสามารถออกแบบและสังเคราะห์ primer เพื่อใช้ในการนำไปถอดรหัสสายพันธุกรรมเพื่อยืนยันรูปแบบโดยละเอียดได้ดังนี้



ตารางที่ 1.3.17 แสดง Primer และ probe สำหรับตรวจวิเคราะห์ GM elements และใช้สำหรับ GM papaya genome sequencing

Reference	Name	Sequence(5'-3')
Kosuke N. <i>et al.</i> 2014	p324-F	GACATCTCCACTGACGTAAGGG
Kosuke N. <i>et al.</i> 2014	p323-R	CTATCRCTCTCTCCAGTTTTTG
Kosuke N. <i>et al.</i> 2014	SC-F	CATTTTCATTTGGAGAGAACACG
Kosuke N. <i>et al.</i> 2014	SC-R	ACCAGCATCCACAGCTTC
Kosuke N. <i>et al.</i> 2014	SC-P	(FAM)-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-(TAMRA)
JRC method(QL-ELE-00-002)	JRC-NPTII-F	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA
JRC method(QL-ELE-00-002)	JRC-NPTII-R	CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-TMP	(FAM)-CAAAGATGGACCCCAACCCACG-(TAMRA)
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-P	(FAM)-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-(TAMRA)
This study	T-35S-F	ATGTGTGAGTAGTCCAGATAAGG
This study	T-35S-F_C	CCTTATCTGGGAAGTACTCACACAT

2. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

นำตัวอย่าง Genomic DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง Positive มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR จาก primer ที่ได้จากการออกแบบตามสมมุติฐาน เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมในตัวอย่างที่ตรวจพบได้ผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 1.3.18 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR จาก primers ที่ออกแบบตามสมมุติฐานบนตำแหน่งของ GM construct ต่างๆจากตัวอย่าง GM positive 5 ตัวอย่าง

NO.	Primers	GM DOA	GM KU	Tree 1	KD-26	KD-27
1	35S-F + 35S-R	 (82 bp)	 (82 bp)	 (82 bp)	 (82 bp)	 (82 bp)
2	T-NOS-F + T-NOS-R	 (84 bp)	 (84 bp)	 (84 bp)	 (84 bp)	 (84 bp)
3	JRC-NPTII-F + JRC-NPTII-R	 (215 bp)	 (215 bp)	 (215 bp)	 (215 bp)	 (215 bp)
4	35S-F + T-NOS-R	-	 (1171 bp?)	 (1171 bp?)	 (1171 bp?)	 (1171 bp?)
5	T-35S-F + JRC-NPTII-R	-	 (~1000 bp)	 (~1000 bp)	 (>1500 bp)	 (>1500 bp)
6	T-35S-F + 35S-F (1/5/60)	-	-	-	 (>1500 bp)	 (~500 bp)
5	T-35S-F + JRC-NPTII-R	-	 (~1000 bp)	 (~1000 bp)	 (>1500 bp)	 (>1500 bp)
6	T-35S-F + 35S-F (1/5/60)	-	-	-	 (>1500 bp)	 (~500 bp)
7	T-35S-F + 35S-F (25/5/60)	-	-	-	 (>1500 bp)	 (>1500 bp)
7	T-35S-F + 35S-R	-	-	-	 (>1500 bp)	 (>1500 bp)
8	T-35S-F_C + JRC-NPTII-R	-	 (~1200 bp)	 (~1200 bp)	 (~1200 bp)	 (~1200 bp)
9	T-35S-F_C + 35S-F	-	-	-	-	-
10	T-35S-F_C + 35S-R	-	-	-	-	-
11	T-35S-F + T-NOS-F	-	-	-	-	-
12	T-35S-F + T-NOS-R	-	-	-	-	-
13	T-35S-F_C + T-NOS-F	-	-	-	-	-
14	T-35S-F_C + T-NOS-R	-	-	-	-	-
15	T-35S-F + JRC-NPTII-F	-	-	-	-	-
16	T-NOS-F + 35S-R	-	-	-	-	-
17	T-35S-F_C + JRC-NPTII-F	-	-	-	-	-

จากการทดลองพบว่า มีความแตกต่างของผล PCR ที่ได้จากตัวอย่าง Positive ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยพบว่าผลการทดลองในส่วนของ GM_DOA มีความแตกต่างจาก GM_Ku, Tree1 และ KD26-27

อย่างเห็นได้ชัดซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า GM_Ku, Tree1 และ KD26-27 เป็นกลุ่ม มะละกอ GM ที่มาจากแหล่งที่คล้ายกัน

นำ PCR Product ที่ได้ จากคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R ไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 40 ng/μl จำนวน 12 ตัวอย่าง จากทุกแหล่ง ตัวอย่างละ 50 μl ต่อตัวอย่างเพื่อส่ง sequencing และเตรียมตัวอย่าง Genomic DNA ความเข้มข้น 50 ng/μl จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 μl รวม 5 μg ต่อตัวอย่างเพื่อส่ง Re-sequencing โดยวิธี Next generation sequencing สำหรับ Genomic DNA

3. การถอดรหัสพันธุกรรม DNA จากคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R

จากผลการทดลองโดยการนำ Primer 35SF และ T-NOS-R ไป Sequencing ในส่วนของตัวอย่าง Tree1 และ KD26, KD27 ซึ่งมาจากพื้นที่ แตกต่างกันได้ข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมดังนี้

ภาพที่ 1.3.3 แสดง Partial aligned sequences จาก 35S-F primer (1164 bp) ของตัวอย่าง GM 3 ตัวอย่าง

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	52
KD26_35S-F/1	(1)	GGAA	CCCCCCC	-GAGGAGCATCGTGGAAA-	GAAGACGTTCCAACCACGTCT		
KD27_35S-F/1	(1)	GGAA	CCCCCCC	C	GAGGAGCATCGTGGAAA-	GAAGACGTTCCAACCACGTCT	
Tree1_35S-F/1	(1)	GGAA	AA	CCCCCCC	C	GAGGAGCATCGTGGAAA	GAAGACGTTCCAACCACGTCT
Consensus	(1)	GGAA	CCCCCCCC	CGAGGAGCATCGTGGAAA	GAAGACGTTCCAACCACGTCT		
		Section 2					
	(53)	53	60	70	80	90	104
KD26_35S-F/1	(51)	TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC					
KD27_35S-F/1	(52)	TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC					
Tree1_35S-F/1	(53)	TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC					
Consensus	(53)	TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC					
		Section 3					
	(105)	105	110	120	130	140	156
KD26_35S-F/1	(103)	AATCCCACATATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA					
KD27_35S-F/1	(104)	AATCCCACATATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA					
Tree1_35S-F/1	(105)	AATCCCACATATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA					
Consensus	(105)	AATCCCACATATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA					
		Section 4					
	(157)	157	170	180	190	208	
KD26_35S-F/1	(155)	TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG					
KD27_35S-F/1	(156)	TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG					
Tree1_35S-F/1	(157)	TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG					
Consensus	(157)	TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG					

ภาพที่ 1.3.4 แสดง Partial aligned sequences จาก T-NOS-R primer (1274 bp)
ของตัวอย่าง GM 3 ตัวอย่าง

	(951)	951	960	970	980	990	1000
KD26_T-NOS-R/1	(936)	TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA					
KD27_T-NOS-R/1	(940)	TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA					
Tree1_T-NOS-R/1	(951)	TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA					
Consensus	(951)	TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA					
		Section 21					
	(1001)	1001	1010	1020	1030	1040	1050
KD26_T-NOS-R/1	(986)	CTAGTCGCAGAAATGTTTGGAAATGGACGGCAGTGTTCAGTAAACAAGGAAGAA					
KD27_T-NOS-R/1	(990)	CTAGTCGCAGAAATGTTTGGAAATGGACGGCAGTGTTCAGTAAACAAGGAAGAA					
Tree1_T-NOS-R/1	(1001)	CTAGTCGCAGAAATGTTTGGAAATGGACGGCAGTGTTCAGTAAACAAGGAAGAA					
Consensus	(1001)	CTAGTCGCAGAAATGTTTGGAAATGGACGGCAGTGTTCAGTAAACAAGGAAGAA					
		Section 22					
	(1051)	1051	1060	1070	1080	1090	1100
KD26_T-NOS-R/1	(1036)	AACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT					
KD27_T-NOS-R/1	(1040)	AACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT					
Tree1_T-NOS-R/1	(1051)	AACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT					
Consensus	(1051)	AACACGGAGAGACACACAGTGGAAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT					
		Section 23					
	(1101)	1101	1110	1120	1130	1140	1150
KD26_T-NOS-R/1	(1086)	CCTAGGTATGCGCAATTGAA TACTCGCACTTGTGTGTTTGTCTGGGCGGAT					
KD27_T-NOS-R/1	(1090)	CCTAGGTATGCGCAATTGAA TACTCGCACTTGTGTGTTTGTCTGGGCGGAT					
Tree1_T-NOS-R/1	(1101)	CCTAGGTATGCGCAATTGAA TACTCGCACTTGTGTGTTTGTCTGGGCGGAT					
Consensus	(1101)	CCTAGGTATGCGCAATTGAA TACTCGCACTTGTGTGTTTGTCTGGGCGGAT					
		Section 24					
	(1151)	1151	1160	1170	1180	1190	1200
KD26_T-NOS-R/1	(1136)	CCCCGGGTACCGAGCTCGAA TTTCCCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATA					
KD27_T-NOS-R/1	(1140)	CCCCGGGTACCGAGCTCGAA TTTCCCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATA					
Tree1_T-NOS-R/1	(1151)	CCCCGGGTACCGAGCTCGAA TTTCCCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATA					
Consensus	(1151)	CCCCGGGTACCGAGCTCGAA TTTCCCGGATCGTTCAAACATTTGGCAATA					

จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างมะละกอ GM ทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะสายรหัสพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการโดยมีความแตกต่างในส่วนต้นของ Promoter CaMV 35S เพียง 1 ตำแหน่งจึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์เดียวกันแม้จะรวบรวมมาจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงนำสายรหัสพันธุกรรมที่ได้มาทำการ Assembly ส่วนที่เหมือนกันได้ขนาด 1,335 bp จากนั้นนำสายรหัสพันธุกรรมที่ได้รับการ Assembly แล้วไป Blast กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ส่วน Upstream ตั้งแต่ 1-203 bp (Figure 5.) ตรงกับ Gateway vector และ Binary Vector หลายชนิด โดย 8 อันดับแรกมีความเหมือน 100% และไม่มีแตกต่างเมื่อตรวจสอบกับ Blast ทั้งนี้ลำดับที่ 1 คือ Gateway vector pUGW6 Accession number AB62666.1 (Figure 6.) พบว่า ขึ้นรหัสพันธุกรรมดังกล่าวตรงกับตำแหน่งที่ 901 – 1113 bp ของ pUGW6 Accession number AB62666.1 ซึ่งตำแหน่งที่ 258 – 1091 bp ของ pUGW6 คือตำแหน่งของ 35S promoter จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือตำแหน่งของ 35S promoter และขึ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม ของ Gateway vector และ Binary Vector หลายชนิด เช่น pUGW6, pGWB706, pGWB606, pGWB506, pGWB406, pGWB6 เป็นต้น

ภาพที่ 1.3.5 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ upstream 1-203 bp sequencing

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Gateway vector pUGW6 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB626666.1
<input type="checkbox"/> Gateway binary vector pGWB706 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB608272.1
<input type="checkbox"/> Gateway binary vector pGWB606 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB543115.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct replicase gene, complete cds	375	375	100%	2e-100	100%	FJ490192.1
<input type="checkbox"/> Gateway binary vector pGWB506 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB294473.1
<input type="checkbox"/> Gateway binary vector pGWB406 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB294430.1
<input type="checkbox"/> Gateway binary vector pGWB6 DNA, complete sequence	375	702	100%	2e-100	100%	AB289769.1
<input type="checkbox"/> Arabidopsis thaliana transgenic line B DNA	375	375	100%	2e-100	100%	AB003141.1
<input type="checkbox"/> Cloning vector p35S-GFP, complete sequence	374	374	99%	6e-100	100%	U28417.1
<input type="checkbox"/> Nicotiana benthamiana transgenic NptII (aph(3')-II (or nptII)) and modified green fluorescent prot	372	372	99%	2e-99	100%	KY464890.1

ภาพที่ 1.3.6 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามีการ match กับ pUGW6

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	2e-100	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCCCAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACG	60		
Sbjct 911	CCCCAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACG	970		
Query 61	TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC	120		
Sbjct 971	TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC	1030		
Query 121	CACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACA	180		
Sbjct 1031	CACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACA	1090		
Query 181	CGGGGGACTCTAGAGGATCCATG	203		
Sbjct 1091	CGGGGGACTCTAGAGGATCCATG	1113		

ในส่วนของตำแหน่งที่ 438 – 1,325 bp พบว่าตรงกับ Coat protein ไวรัสต่างจุดวงแหวนของมะละกอ (Papaya ringspot virus) (ภาพที่ 1.3.7) โดยมีลักษณะเหมือนกับ Coat protein ของ ไวรัสสายพันธุ์ Chiangmai 2 Accession number AY010720.1 (ภาพที่ 1.3.8) มากที่สุดที่ ID 99% โดยมี Gap เพียง 1 Gap และ Query cover เป็น 100% โดยตรงกับตำแหน่งที่ 1 – 887 bp ของยีน ซึ่งยีนมีขนาด 1,045 bp จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือตำแหน่งของ Coat protein ของ ไวรัสสายพันธุ์ Chiangmai 2 Accession number AY010720.1

ภาพที่ 1.3.7 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ upstream 438 – 1,352 bp sequencing result.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Chiangmai2 coat protein gene, partial cds	1578	1578	100%	0.0	99%	AY010720.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus isolate Chiangmai coat protein (CP) gene, partial cds	1574	1574	97%	0.0	99%	DQ085856.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Chiangmai1 coat protein gene, partial cds	1561	1561	100%	0.0	98%	AY010719.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus gene for polyprotein, partial cds, clone: T164P	1539	1539	100%	0.0	98%	AB044340.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Ratchaburi coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010721.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate KnonKhen coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010714.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Chumporn coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010713.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus isolate THP-14 coat protein (cp) gene, partial cds	1530	1530	94%	0.0	99%	AF506898.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi2 coat protein gene, partial cds	1528	1528	100%	0.0	98%	AY010716.1
<input type="checkbox"/> Papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi1 coat protein gene, partial cds	1522	1522	100%	0.0	98%	AY010715.1

ภาพที่ 1.3.8 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามี การ match กับ Papaya ringspot virus Chiangmai 2 coat protein

Papaya ringspot virus strain P isolate Chiangmai2 coat protein gene, partial cds
Sequence ID: [AY010720.1](#) Length: 1045 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 887 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1578 bits(854)	0.0	877/888(99%)	1/888(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  TCCAAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCaagataaagaaaaacag 60
          |||
Sbjct 1  TCCAAAACCTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG 60

Query 61  aaagaagaaaaagataaacaagggtaagaaaaTAATGAAGCTAGTGACGGAAACGA 120
          |||
Sbjct 61  AAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAA-GGTAAAGAAAAAATGAAGCTAGTGACGGAAACGA 119

Query 121 TGTGTCAACTAGCACAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAAGTAGTGG 180
          |||
Sbjct 120 TGTGTCAACTAGCACAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAAGTAGTGG 179

Query 181 TACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCTAGAATTAA 240
          |||
Sbjct 180 TACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACTGACAAGATGATTTTACCAAGAATTAA 239

Query 241 GGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATAGACAT 300
          |||
Sbjct 240 GGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATAGACAT 299
    
```

เมื่อนำตำแหน่ง Downstream ของชิ้นพันธุกรรม ตั้งแต่ 1326 – 1511 bp ไป Blast พบว่าตรงกับ Binary Vector หลายชนิด โดย 10 อันดับแรกมีความเหมือน 100% (ภาพที่ 1.3.9) ทั้งหมดและไม่มีความแตกต่างเมื่อตรวจสอบกับ Blast ทั้งนี้ลำดับที่ 1 คือ Binary Vector pMpGWB430 Accession number LC057583.1 (ภาพที่ 1.3.10) พบว่า ชิ้นรหัสพันธุกรรมดังกล่าวตรงกับตำแหน่งที่ 4386 - 4610 bp ของ pMpGWB430 Accession number LC057583.1 ซึ่งตำแหน่งที่ 4386 - 4610 bp ของ pMpGWB430 คือ ตำแหน่งของ NOS terminator และชิ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือ ตำแหน่งของ NOS terminator และชิ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม ของ Binary Vector หลายชนิด เช่น pMpGWB430, pMpGWB429, pMpGWB408, pMpGWB400 เป็นต้น

ภาพที่ 1.3.9 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ downstream 1,326 – 1,511 bp sequencing

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB430 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057583.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB429 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057582.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB408 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057561.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB400 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057553.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB330 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057546.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB329 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057545.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB308 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057524.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB300 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057516.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB230 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057509.1
<input type="checkbox"/> Binary vector pMpGWB229 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057508.1

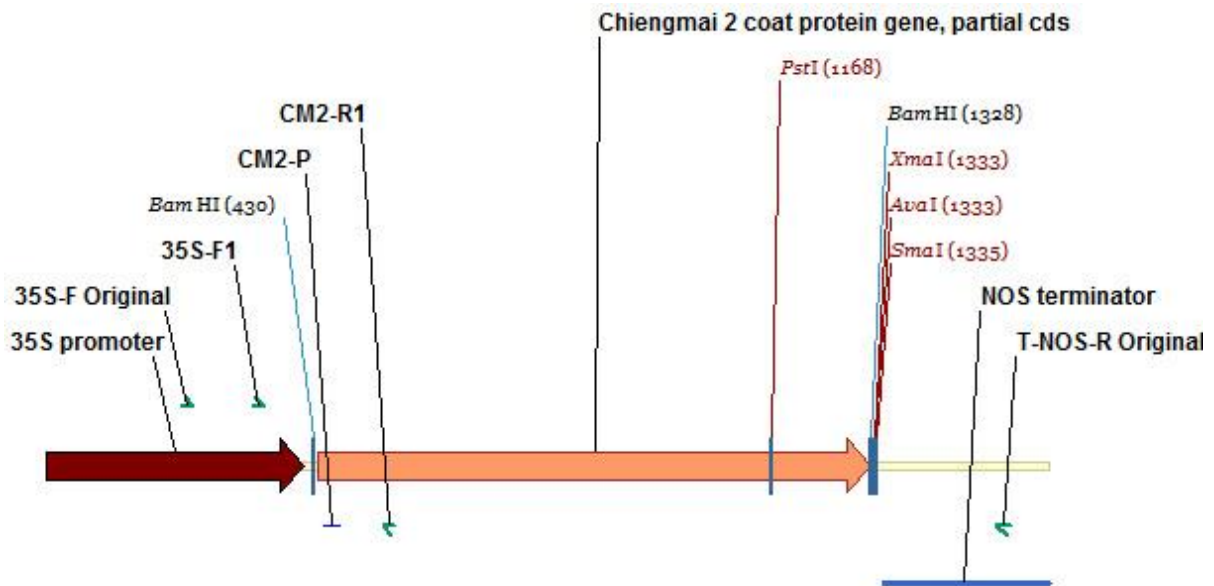
ภาพที่ 1.3.10 แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามี การ match กับ pMpGWB430

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
416 bits(225)	1e-112	225/225(100%)	0/225(0%)	Plus/Plus
<p>Binary vector pMpGWB430 DNA, complete sequence Sequence ID: LC057583.1 Length: 13342 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 4386 to 4610 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p>				
Query 2	GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTT	61		
Sbjct 4386	GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTT	4445		
Query 62	CTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTA	121		
Sbjct 4446	CTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTA	4505		
Query 122	CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT	181		
Sbjct 4506	CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT	4565		
Query 182	GATTAGAGTCCC GCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAA	226		
Sbjct 4566	GATTAGAGTCCC GCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAA	4610		

4. การร่าง Construct และการออกแบบ Construct specific detection method

จากข้อมูล Sequence และ ข้อมูลการ Blast และการตรวจสอบความถูกต้องกับฐานข้อมูลทั้งหมดสามารถร่าง Construct ของมะละกอ GM ระหว่าง Promoter 35S และ NOS-terminator ที่ถูกต้องได้ดังนี้ (ภาพที่ 1.3.11)

ภาพที่ 1.3.11 Construct ของตัวอย่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการยืนยันแล้ว



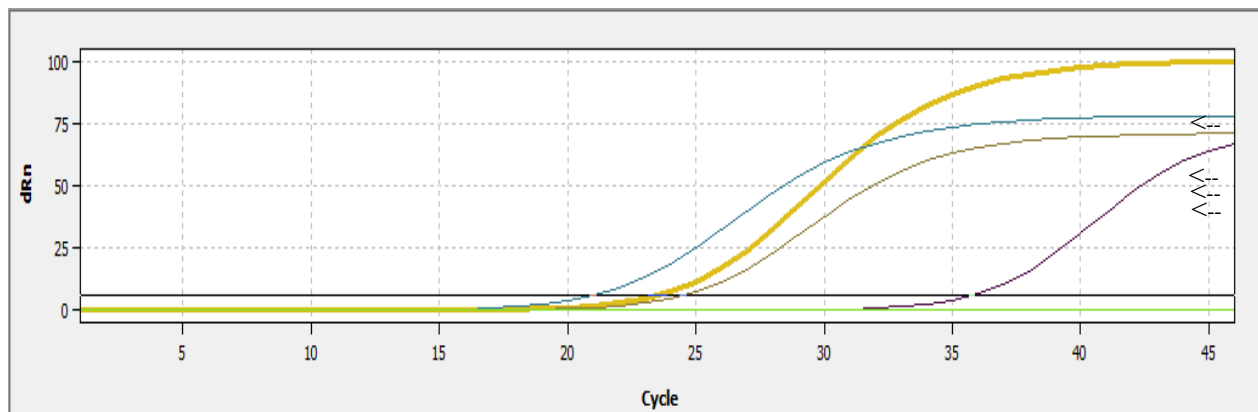
ขนาดของ Construct ทั้งชิ้นนี้คือ 1,612 bp ประกอบด้วย Promoter 35S ตำแหน่งตัดของ Restriction enzyme BamHI ขึ้นยืนบางส่วนของ Coat protein ไวรัสสายพันธุ์ Chiengmai 2 ต่อด้วย Multi-cloning site ที่บริเวณส่วนปลายของขึ้นยืน Coat protein และ NOS terminator ทั้งนี้สามารถออกแบบ Specific Probe และ Primer ได้ดังนี้

เป้าหมายการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม	ตำแหน่งที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่าง Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter (CaMV P-35S) และส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2
Primer Forward : 35S-F1	5'-GACGTAAGGGATGACGCAC-3'
Target element	CaMV P-35S
Primer Reverse : CM2-R1	5'-ACATCGTTTCCGTCCTAGC-3'
Target element	ส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2
Amplicon length	191 bp
Probe : CM2-P	5'-FAM-AAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGA-TAMRA-3'
Target element	ส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2

การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method โดยวิธี Real-time PCR

ดำเนินการทดสอบ Construct specific detection method กับดีเอ็นเอมะละกอ GM 4 ตัวอย่างที่ออกแบบเบื้องต้นด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ภาพที่ 1.3.12 แสดงผล Sigmoidal curve ของ real-time PCR ในตัวอย่างที่แตกต่างกัน



ตารางที่ 1.3.19 แสดงค่า C_t (Threshold cycle) ของตัวอย่าง GM ที่แตกต่างกัน

Sample name	Sample type	Ct
KD26	Unknown	23.45
KD27	Unknown	35.77
KD31	Unknown	21.06
Tree1	Unknown	24.46
NTC	NTC	No Ct

จากผลการทดลอง ตรวจพบ Construct specific 35S-CM2-NOS ในตัวอย่าง GM ทั้ง 4 ตัวอย่าง KD26, KD27, KD31 และ Tree1 ซึ่งได้จาก 2 แหล่งที่มา (KD, Tree1) แตกต่างกัน โดยในกลุ่ม KD26, KD27, KD31 พบว่าถึงแม้มาจากแหล่งเดียวกัน แต่ได้ค่า Ct แตกต่างกันโดย KD26, KD31 พบว่าได้ค่า Ct ใกล้เคียงกัน คือ 23.45 และ 21.06 ในขณะที่ KD27 มีค่า Ct ที่ 35.77 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวน Copies number ของ Construct 35S-CM2-NOS ในจีโนม KD26, KD31 อาจมีจำนวนใกล้เคียงกัน และมีจำนวน Copies number ในจีโนมมากกว่าในตัวอย่าง KD27 ทั้งนี้ตัวอย่าง Tree 1 มีค่า Ct 24.46 ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่าง KD26, KD31 จึงอาจกล่าวได้ในแนวทางเดียวกันว่า จำนวน Copies number ของ Construct 35S-CM2-NOS ในจีโนม ตัวอย่าง Tree 1 และ KD26, KD31 มีจำนวนใกล้เคียงกัน

5. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method และปริมาณต่ำสุดที่ วิธีการตรวจวิเคราะห์จะตรวจพบสำเนาของจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.20 แสดงผลการการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method

GM copies number	Rep	Ct				Mean	SD	RSDr (%)	Mean (Total)	SD (Total)	RSDr (%Total)
		1	2	3	4						
200	1	34.32	33.71	35.19	34.64	34.47	0.62	1.79	34.45	0.68	1.98
	2	34.49	34.87	35.05	35.06	34.87	0.27	0.76			
	3	33.09	33.08	33.97	35.14	33.82	0.97	2.88			
	4	34.49	35.04	34.27	34.82	34.66	0.34	0.99			
100	1	35.20	34.80	36.21	34.93	35.29	0.64	1.81	35.69	0.65	1.83
	2	35.01	37.07	35.73	35.75	35.89	0.86	2.39			
	3	35.96	35.25	34.71	36.01	35.48	0.62	1.75			
	4	36.07	35.87	36.19	36.33	36.12	0.19	0.54			
50	1	36.00	37.57	37.22	37.18	36.99	0.68	1.85	36.42	1.15	3.15
	2	35.98	36.98	35.63	36.59	36.30	0.60	1.67			
	3	34.37	34.24	35.14	35.98	34.93	0.80	2.30			
	4	37.42	37.50	36.90	38.06	37.47	0.47	1.27			
20	1	36.55	NA	35.81	36.83	36.40	0.53	1.45	37.78	1.28	3.40
	2	38.56	37.68	37.51	38.19	37.99	0.48	1.26			
	3	37.84	37.06	36.24	NA	37.05	0.80	2.16			
	4	39.66	40.10	39.32	37.52	39.15	1.13	2.89			
10	1	41.69	36.44	NA	36.52	38.22	3.01	7.87	38.78	1.58	4.06
	2	40.46	38.42	37.86	38.04	38.70	1.20	3.10			
	3	39.92	37.67	NA	38.21	38.60	1.17	3.04			
	4	38.75	NA	39.98	40.24	39.66	0.80	2.01			
5	1	35.07	37.83	39.50	39.17	37.89	2.02	5.32	38.88	2.23	5.74
	2	40.61	38.83	41.15	43.63	41.06	1.98	4.83			
	3	35.79	37.92	38.81	NA	37.51	1.55	4.14			
	4	NA	NA	37.48	39.59	38.54	1.49	3.87			

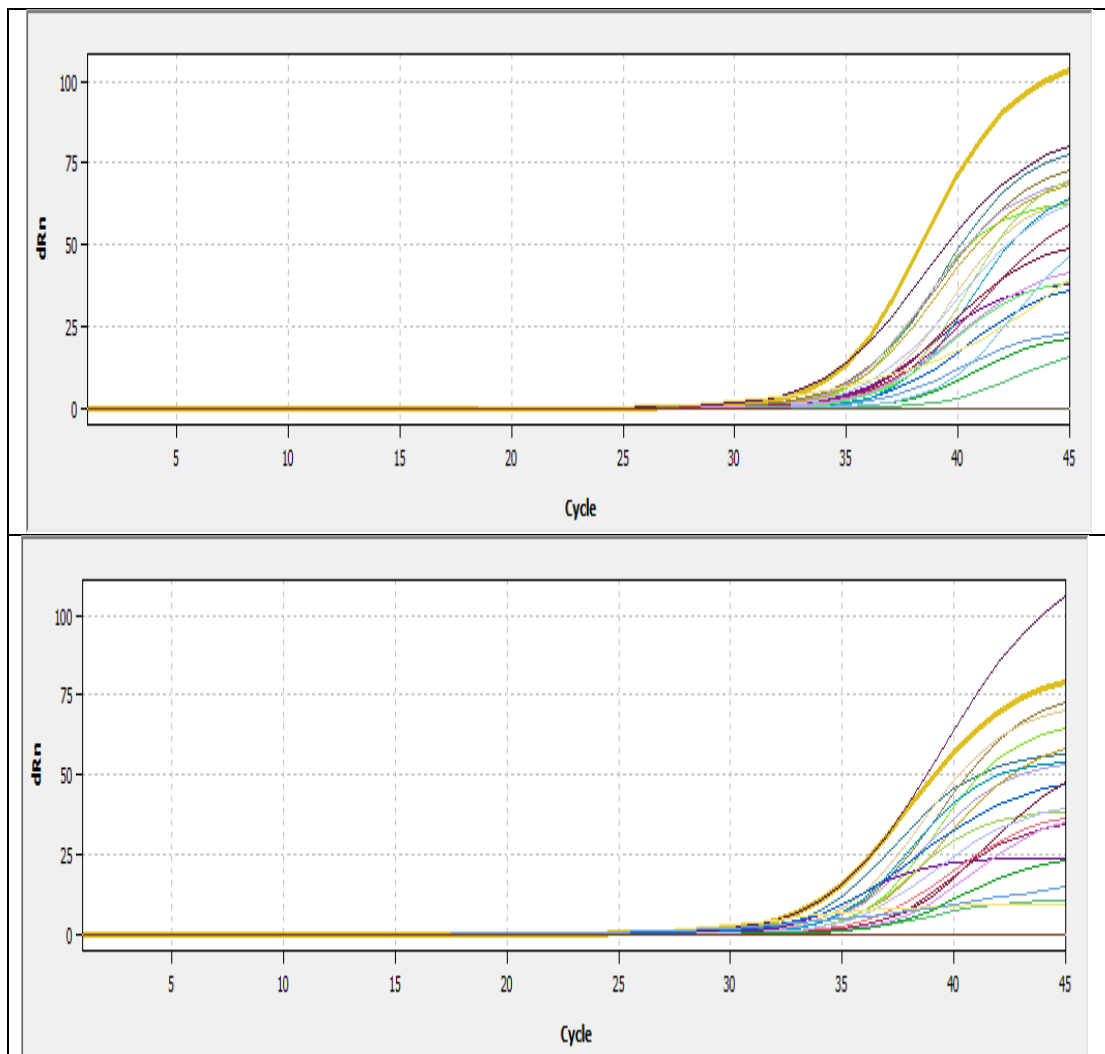
หมายเหตุ NA : Not available (ตรวจไม่พบสัญญาณ)

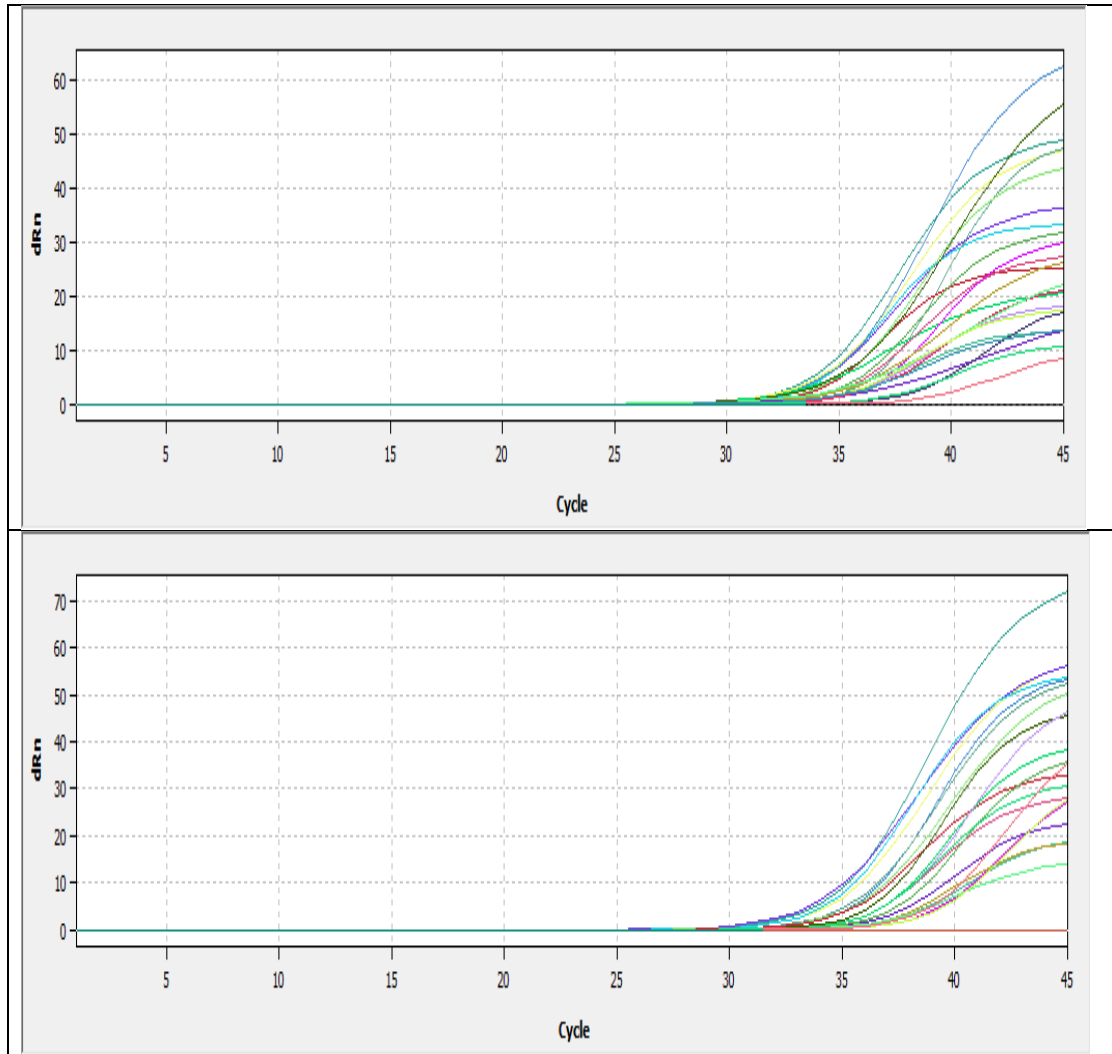
จากผลการทดลองพบว่า Construct specific 35S-CM2-NOS Detection method ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความเข้มข้น 40 copies/ μ l (200 copies) , 20 copies/ μ l (100 copies), 10 copies/ μ l (50 copies) ทุกซ้ำการทดลองและ RSDr (%Total) < 25% อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 4 copies/ μ l (20 copies) พบว่าตรวจไม่พบสัญญาณ 2 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 12.5% (> 5%), ที่ความเข้มข้น 2 copies/ μ l (10 copies) พบว่า ตรวจไม่พบสัญญาณ 3 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 18.75% (> 5%) และ ที่ความเข้มข้น 1 copies/ μ l (5 copies) พบว่า ตรวจไม่พบสัญญาณ 3 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 18.75% (> 5%) ซึ่งหาก

%False negative > 5% ไม่สามารถยอมรับได้ว่าเป็นค่าต่ำสุด (JRC Scientific and Technical Reports (EUR 24790 EN - 2011))

จึงสามารถสรุปได้ว่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2 โดยใช้ Matrix เป็น Genomic DNA ซึ่งสกัดได้จากใบมะละกอ อยู่ที่ 10 copies/ μ l (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% ที่ความเข้มข้น DNA total 40 ng/ μ l

ภาพที่ 1.3.13 แสดง Amplification curve ของการทดสอบหา LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ซ้ำ 1-4





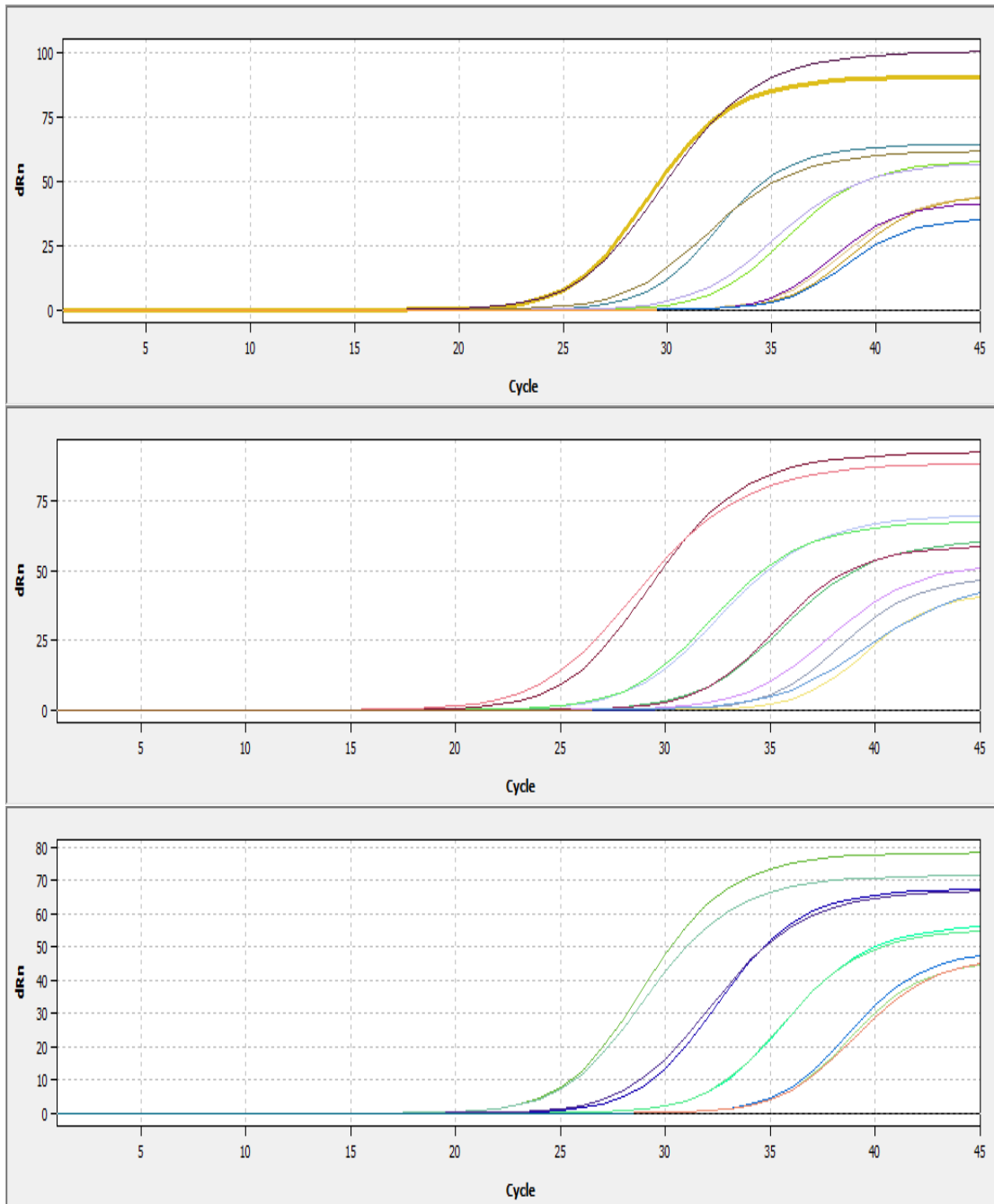
6. การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

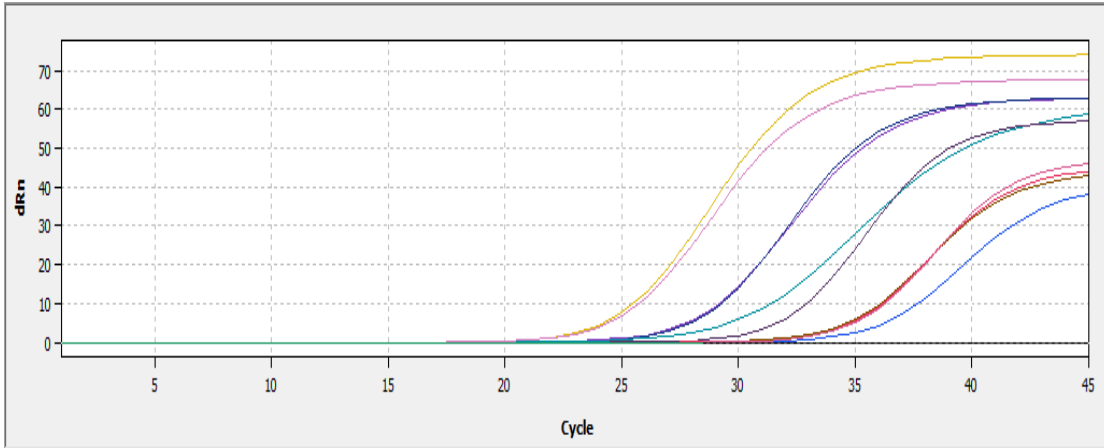
เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai 2 40 ng/ μ l และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่า เป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/ μ l เป็น Background DNA ได้ผลการทดลองดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.21 แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

GM copies number (x1000 Copies)	Rep	Ct				Mean	SDr	RSDr (%)	Mean (Total)	SD _R (Total)	RSD _R (%Total)
		1	2	3	4						
100	1	25.24	25.31	25	23.93	24.87	0.64	2.58	25.12	0.50	1.99
	2	25.28	25.4	25.29	25.48	25.36	0.10	0.38			
10	1	29.44	28.56	28.77	28.61	28.85	0.41	1.41	28.88	0.31	1.09
	2	29.12	28.56	28.98	29.03	28.92	0.25	0.86			
1	1	32.84	32.04	32.19	32.23	32.33	0.35	1.09	32.31	0.57	1.76
	2	32.71	32.67	31.1	32.68	32.29	0.79	2.46			
0.1	1	36.26	36.76	35.98	34.68	35.92	0.89	2.47	35.08	2.67	7.61
	2	36.5	28.65	35.83	35.96	34.24	3.73	10.91			
0.05	1	36.09	36.95	37.52	36.54	36.78	0.61	1.65	36.68	0.56	1.54
	2	36.29	36.52	37.43	36.09	36.58	0.59	1.62			

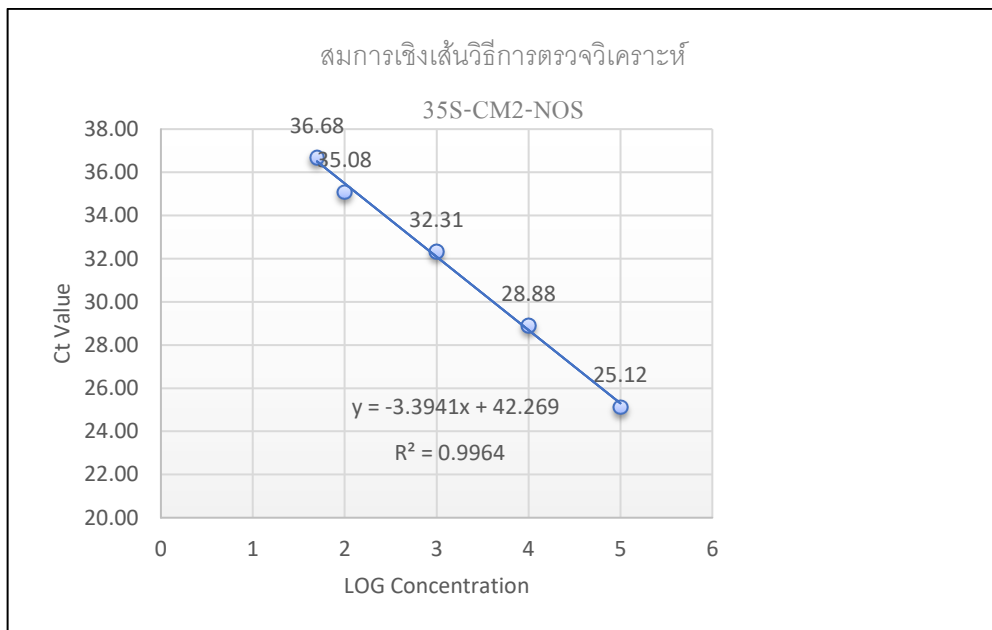
ภาพที่ 1.3.14 แสดง Amplification curve ของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ชั้น 1 - 4





จากการทดลองนำค่า GM copies number ของแต่ละ Dilution ไปใส่ค่า Log 10 และเทียบกับค่า เฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution เพื่อสร้างสมการเชิงเส้นดังกราฟต่อไปนี้

ภาพที่ 1.3.15 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR



จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Background DNA เป็น ถั่วเหลือง Non-GM สามารถสร้างสมการเชิงเส้นได้โดยมีสมการเชิงเส้นดังนี้

$y = -3.3941x + 42.269$ และได้ค่า $R^2 = 0.9964$ พบว่าค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า -3.3941 ซึ่ง ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์โดย Construct specific detection method ที่ ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR สามารถให้ผลการทดลองมีความใกล้เคียงแบบ

ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) และเป็นช่วงที่วิธีการทดสอบสามารถทดสอบได้แม่นยำ คือ ตั้งแต่ 50 – 100,000 copies หรือ 10 copies/ul ถึง 20,000 copies/ul

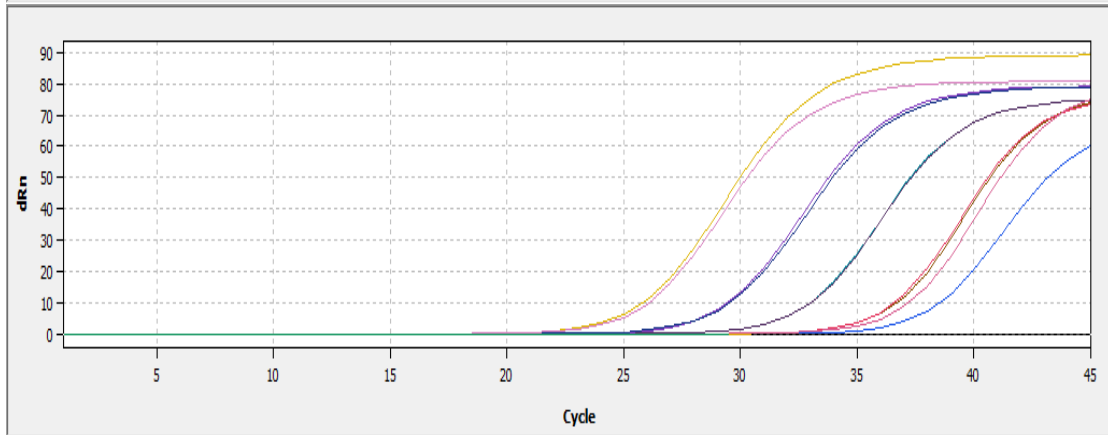
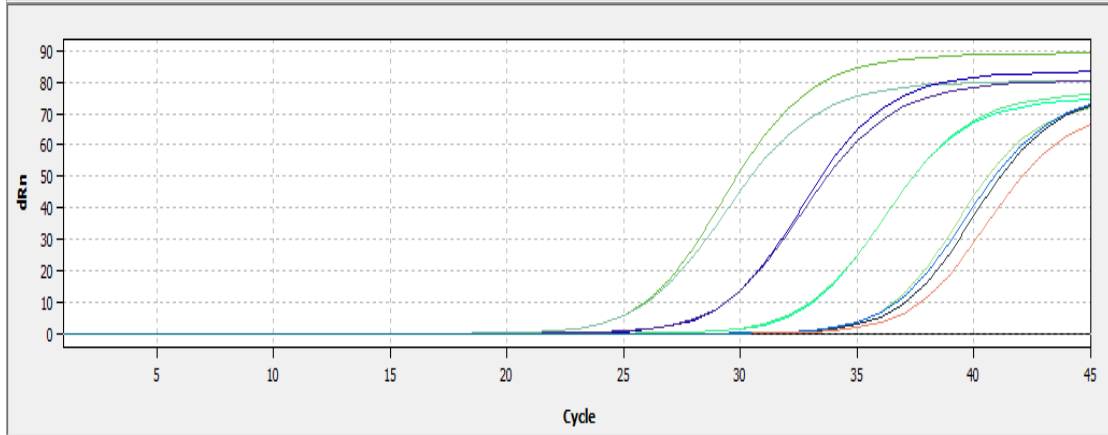
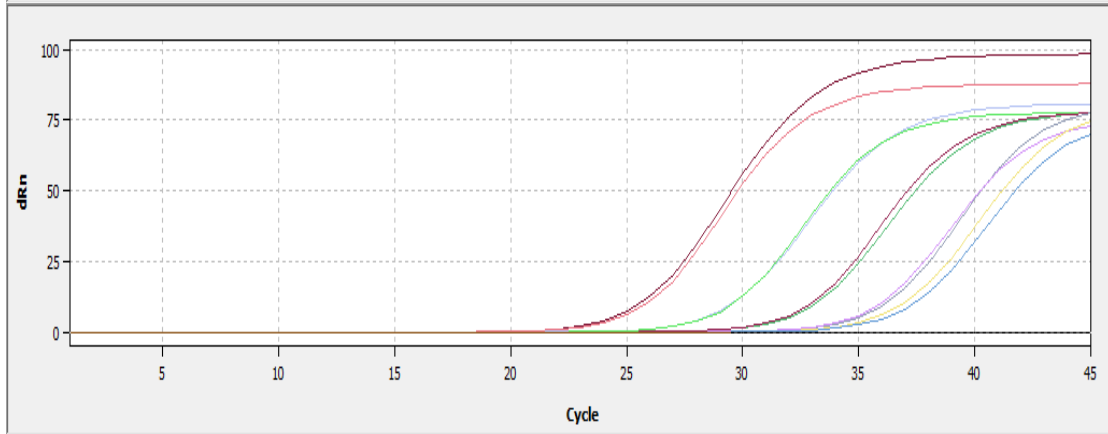
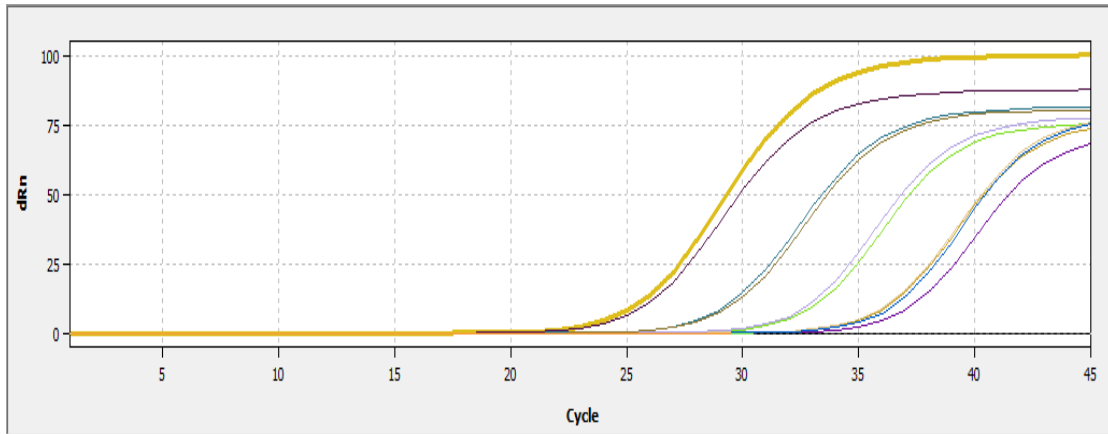
7. การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของยีน Papain

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai 2 40 ng/μl และ ตัวอย่างกล้วยที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/μl เป็น Background DNA ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหายีน Papain ของ Wei J. et al. 2016 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.

ตารางที่ 1.3.22 แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR

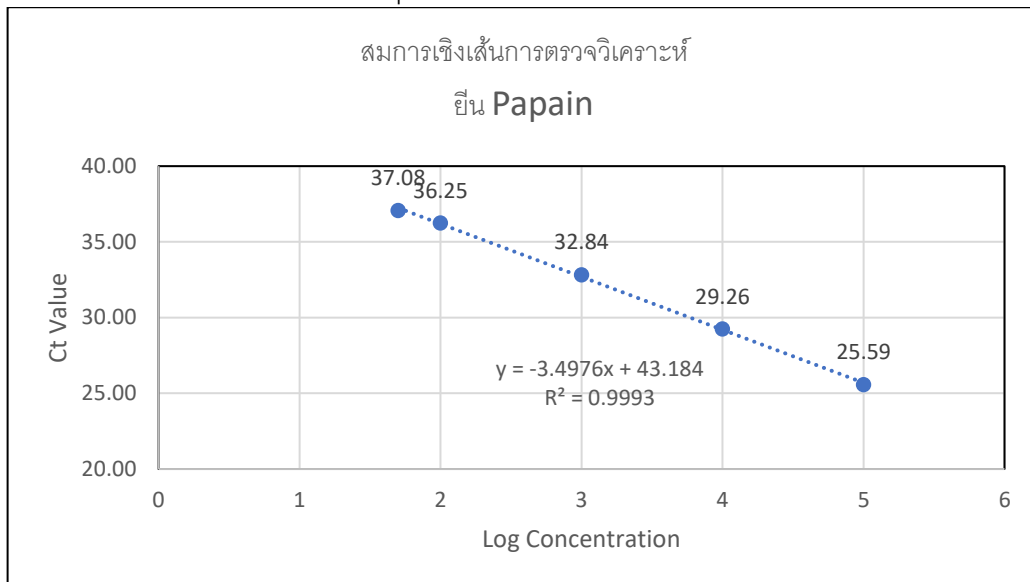
Papain copies number	Rep	Ct				Mean	SDr	RSDr (%)	Mean (Total)	SD _R (Total)	RSD _R (%Total)
		1	2	3	4						
100,000 copies	1	25.19	25.55	25.33	25.62	25.42	0.20	0.78	25.59	0.23	0.91
	2	25.73	25.82	25.59	25.87	25.75	0.12	0.48			
10,000 copies	1	29.1	29.31	29.31	29.37	29.27	0.12	0.40	29.26	0.09	0.30
	2	29.2	29.19	29.28	29.32	29.25	0.06	0.22			
1,000 copies	1	32.97	32.61	32.96	32.71	32.81	0.18	0.55	32.84	0.13	0.39
	2	32.95	32.83	32.81	32.85	32.86	0.06	0.19			
100 Copies	1	36.04	36.13	35.98	35.69	35.96	0.19	0.53	36.25	0.37	1.01
	2	36.37	36.89	36.49	36.37	36.53	0.25	0.67			
50 copies	1	37.10	36.32	36.68	37.17	36.82	0.40	1.08	37.08	0.64	1.73
	2	36.47	37.56	38.32	37.04	37.35	0.79	2.11			

ภาพที่ 1.3.16 แสดง Amplification curve ของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ซ้ำ 1 – 4



จากการทดลองนำค่า Papain copies number ของแต่ละ Dilution ไปใส่ค่า Log 10 และเทียบกับค่าเฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution เพื่อสร้างสมการเชิงเส้นดังกราฟต่อไปนี้

ภาพที่ 1.3.17 แสดงค่าเฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution และความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR



จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหายีน Papain ของ Wei J. *et al.* 2016 (ภาพที่ 2.) ใช้ Background DNA เป็น ถั่วเหลือง Non-GM สามารถสร้างสมการเชิงเส้นได้โดยมีสมการเชิงเส้นดังนี้ $y = -3.4976x + 43.184$ และได้ค่า $R^2 = 0.9993$ พบว่าค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า -3.4976 ซึ่ง ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์โดย ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR สามารถให้ผลการทดลองมีความใกล้เคียงแบบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) และเป็นช่วงที่วิธีการทดสอบสามารถทดสอบได้แม่นยำ คือ ตั้งแต่ 50 – 100,000 copies หรือ 10 copies/ μ l ถึง 20,000 copies/ μ l

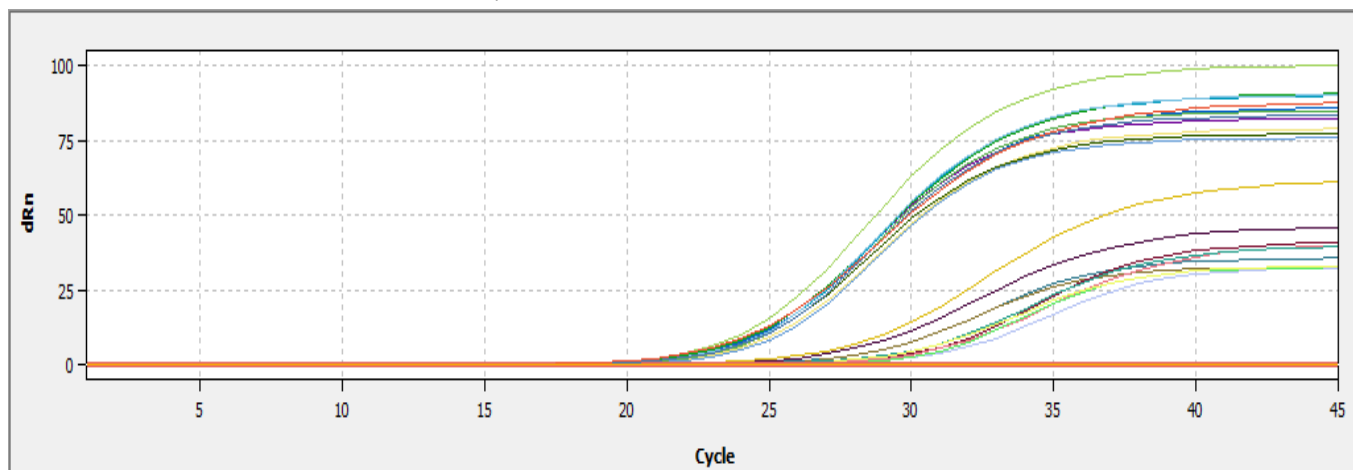
8. การทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

ตัวอย่าง CM2 (2%) ได้จากการผสมไบมะละกอ Non-GM 1g ที่มีส่วนผสมของ ไบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai2 อยู่ 20 mg คิดเป็น % ปนเปื้อน น้ำหนัก : น้ำหนักได้ 2% เช่นเดียวกับตัวอย่าง CM2 (0.5%) ได้จากการผสมไบมะละกอ Non-GM 1g ที่มีส่วนผสมของ ไบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiangmai2 อยู่ 5 mg คิดเป็น % ปนเปื้อน น้ำหนัก : น้ำหนักได้ 0.5% นำตัวอย่างทั้ง 2 มาสกัดดีเอ็นเอแล้วเจือจางด้วยน้ำเป็น 40 ng/ μ l จากนั้นนำไปทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.3.23 แสดงผลการทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้
ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

Sample	Ct				Mean	SD	RSD (%)	LogX	Experimental copies (Copies/ μ l)	Mean Experimental (%)	Bias%
	1	2	3	4							
CM2(2%)	27.55	28.15	29.36	29.36	28.61	0.91	3.17	4.03	10,612.30	2.20	9.94
Papain (CM2(2%))	23.51	23.38	23.5	22.83	23.31	0.32	1.38	5.68	482,627.01		
CM2(0.5%)	30.98	31.16	31.92	31.38	31.36	0.41	1.30	3.214	1,637.22	0.45	-2.34
Papain CM2(0.5%))	24.00	24.27	23.21	23.50	23.75	0.48	2.02	5.56	361,252.67		

ภาพที่ 1.3.18 แสดง Amplification curve ของทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ



จากการทดลอง ปริมาณ Experimental copies (Copies/ μ l) ของ Construct CM2 และ Papain ได้จากการคำนวณ ค่า LogX โดยใช้สมการเชิงเส้นจากการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ Construct CM2 และ ยีน Papain ดังต่อไปนี้ $y = -3.3941x + 42.269$ และ $y = -3.4976x + 43.184$ ตามลำดับและเมื่อนำค่า Log X ไปถอด Log ออกจะได้ค่า Experimental copies (Copies/ μ l) ซึ่งสามารถคำนวณ Mean Experimental (%) การปนเปื้อนได้โดยสมการดังต่อไปนี้ (Mean experimental copy number CM2/Mean experimental copy number papain) $\times 100$ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 3)

ทั้งนี้วิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณโดยในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในที่นี้แสดงให้เห็นว่ามี % Bias 9.94% ในการตรวจวิเคราะห์ที่การปนเปื้อน 2% และ % Bias -2.34% ในการตรวจวิเคราะห์ที่การปนเปื้อน 0.5% ซึ่งแสดงถึง Truness ที่ดีของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยในการตรวจวิเคราะห์ที่ % การปนเปื้อนทั้ง 2 ระดับ มีค่า Bias < 25% ตามเกณฑ์ของสหภาพยุโรป (Marchezi, U. et al. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. (European

Union Reference Laboratory for GM Food and Feed and European Network of GMO Laboratories, 2015))

วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถใช้ในการตรวจ Construct specific 35S-CM2-NOS detection ในมะละกอปนเปื้อน GMOs ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจนและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ตรวจพบปนเปื้อนในการส่งออกของประเทศไทยที่ดำเนินการทดสอบความใช้ได้แล้ว โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์แบบ Screening test เท่านั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาตและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus เมื่อทดสอบความใช้ได้แล้วพบว่ามีค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2 อยู่ที่ 10 copies/ μ l (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พบว่า ค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น และสามารถทดสอบเชิงปริมาณได้โดยมีค่า % Bias ที่ 9.94%

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาตและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus ที่ทดสอบความใช้ได้แล้วและมีค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiangmai 2 อยู่ที่ 10 copies/ μ l (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% วิธีการทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS จะช่วยยกระดับการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Construct specific อื่นๆได้ และช่วยป้องกันการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในการส่งออกและการปลูกภายในประเทศได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ไปจดสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรรวมถึงตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ และที่สำคัญสามารถนำไปใช้เพิ่มเติมในข้อมูลกฎหมายหรือระเบียบว่าด้วยการส่งออกมะละกอผลสดสู่ต่างประเทศว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องตรวจไม่พบทุกกรณี เป็นต้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

เอกสารอ้างอิง

- Alisa Wilantho¹, Oranud Praditsup², Wanwisa Charoenchim¹, Supasak Kulawonganunchai¹, Anunchai Assawamakin¹ and Sissades Tongshima^{1*} Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. Thai J. Genet. 2012, 5(2) : 104-129
- Directive 2001/18/EC on the deliberate release of GMOs into the environment
- Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Nat. Biotechnol.,10, 1466–1472 (1992).
- Gonsalves D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. AgBioForum, 7, 36–40 (2004).
- Jiaojun Wei, Huangying Leb, Aihu Pan, Junfeng Xu, Feiwu Li, Xiang Li, Sheng Quan, Jinchao Guo, Litao Yang. Quantitative PCR method for detection of papaya event Huanong N1. Food Chemistry Volume 194, 1 March 2016, Pages 20-25.
- Kosiyachinda P, Srivatanakul M. The transgenic Thai papaya story: a milestone towards Thailand becoming a biotech crop country. Asia-Pacific perspectives on biotechnology and bioethics. (Calderbank D, Macer DRJ ed.) UNESCO Asia and Pacific Regional Bureau for Education, Thailand, pp. 11–15 (2008).
- Kosuke NAKAMURA,^a Hiroshi AKIYAMA,^{*a} Kiyomi OHMORI,^b Yuki TAKAHASHI,^c Reona TAKABATAKE,^d Kazumi KITTA,^d Hiroyuki NAKAZAWA,^c Kazunari KONDO,^a and Reiko TESHIMA. An Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. Biol. Pharm. Bull. 34(10) 1648—1651 (2011).
- Kosuke Nakamura,^a Kazunari Kondo,^{*a} Tomoko Kobayashi,^a Akio Noguchi,^a Kiyomi Ohmori,^b Reona Takabatake,^c Kazumi Kitta,^c Hiroshi Akiyama,^a Reiko Teshima,^a and Tomoko Nishimaki-Mogamia Identification and Detection of Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus Strains in Thailand. Biol. Pharm. Bull. 37(1) 1–5 (2014).
- Reference no. 2012.BBD, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) of European Commission, 14 May, 2012.
- Sakuanrungsirikul S, Sarindu N, Prasartsee V, Chaikiatiyos S, Siriyan R, Sriwatanakul M, Lekananon P, Kitprasert C, Boonsong P, Kosiyachinda P, et al (2005) Update on the development of virus-resistant papaya: virus-resistant transgenic papaya for people in rural communities of Thailand. Food Nutr Bull 26 422–426.

Tecson Mendoza EM, Laurena AC, Botella JR. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. *Biotechnol. Annu.Rev.*, 14, 423–462 (2008).

UGMMONITOR project: Development of a molecular biology platform and a database (safety assessment) to detect unauthorized GMOs in the European food/feed chain.

การทดลองที่ 1.4 วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม Mon810 และ NK603 ด้วย
เทคนิค Multiplex Real-time PCR
Method Validation of Event Specific Mon810 and NK603 Identification using
Multiplex real-time PCR Technique

นางสาวปิยนุช ศรชัย ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
ฐิติรัตน์ อัครวมงคลศิริ ชีระ ชูแก้ว^{1/}
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันนี้พืชตัดแปรพันธุ์กรรมได้รับการยอมรับในหลายประเทศ ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมได้รับการอนุญาตให้มีการขายเชิงพาณิชย์มากที่สุด โดยข้าวโพดทนทานสารกำจัดวัชพืช (NK603 event) และต้านทานแมลง (MON810 event) มีการอนุญาตใช้มากที่สุด แต่สำหรับบางประเทศการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรมีความจำเป็นต้องทำการตรวจวิเคราะห์รายละเอียดของยีนหรือระบุสายพันธุ์ของพืชตัดแปรพันธุ์กรรมนั้นๆ ก่อน ซึ่งเป็นที่มาของการศึกษาการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยการตรวจสอบความจำเพาะและความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Event Specific Mon810 NK603 และยีน HMG แบบ Multiplex ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบมีความจำเพาะสำหรับการตรวจข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ Mon810 NK603 และ HMG ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR คือ 0.15 0.3 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบ Mon810 NK603 และ HMG ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 0.05 0.15 และ 0.025 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชพร้อมกันในปฏิกิริยาเดี่ยวด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่าวิธีดังกล่าวมีความสามารถในการจำแนกยีนโดยค่าพารามิเตอร์ของการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ดังนี้ ค่า PCR efficiency 97-112 เปอร์เซ็นต์ (ค่าที่ยอมรับของวิธี Multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์) ค่า Linearity (R^2) และ ค่า Slope เท่ากับ 0.99 และอยู่ในช่วง -3.38 ถึง -3.07 ตามลำดับ เทคนิคนี้มีขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ (LOD) ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิคการตรวจสอบ Mon810 NK603 และยีน HMG รวมกันในปฏิกิริยาเดียวกันแบบ Multiplex Real-time PCR สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีนของตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดได้

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

^{1/} สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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

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

คำนำ

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

สำหรับการตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรมที่เป็นมาตรฐานสากล (JRC-EU) ได้แบ่งระดับของการตรวจวิเคราะห์เป็น 3 ระดับคือ 1.การตรวจคัดกรอง (screening method) ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ หรือ เทอร์มิเนเตอร์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในพืชตัดแปรพันธุกรรมเกือบทุกชนิดแต่ไม่สามารถระบุชนิดหรือ สายพันธุ์ของพืชตัดแปรพันธุกรรม 2.การตรวจวิเคราะห์ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในพืชตัดแปรพันธุกรรม (target or construct gene) ซึ่งมีความจำเพาะต่อลักษณะของพืชตัดแปรพันธุกรรมเป็นกลุ่มๆ เช่น ยีน *Cry1Ab* ยีน *CP4EPSPS* เป็นต้น 3. การตรวจจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชตัดแปรพันธุกรรม (Event specific) จะตรวจสอบบริเวณเอกลักษณ์คือตำแหน่งที่ยีนถูกถ่ายเข้าไปต่อกับส่วนของจีโนมพืช จึงมีความจำเพาะต่อชนิดพืชตัดแปรพันธุกรรมสูง ซึ่งส่งผลกับค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ด้วย

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการระดับสากลตรวจคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ซึ่งเป็นการตรวจสอบยีนพร้อมกัน 3 ยีนในปฏิกิริยาเดียวกันโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจต่างกัน และโพรบที่ติดด้วย Reporter ที่แตกต่างกันทำให้สามารถแปลงแสงที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน แต่สำหรับการตรวจจำแนกชนิดพืชตัดแปรพันธุกรรมยังคงใช้เทคนิค Simplex real-time PCR (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) เป็นการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาแต่ละยีนแยกปฏิกิริยากัน ซึ่งต้องใช้เวลาสารเคมี และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์มาก จึงเป็นที่มาการศึกษาครั้งนี้คือ การนำเทคนิค Multiplex real-time PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 พร้อมกัน แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาวิธีการตรวจสอบของห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานระบบ ISO17025 ต้องมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Validation) ทุกวิธีการ โดยค่าพารามิเตอร์ของวิธีการที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้เช่น ความแม่นยำ ความถูกต้อง ประสิทธิภาพของวิธีการ และขีดจำกัดของวิธีจะต้องอยู่ในมาตรฐานที่กำหนดของวิธีการนั้นๆ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและศึกษาความใช้ได้ของวิธีตรวจจำแนกชนิดข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR

วิธีดำเนินการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุอ้างอิง

สำหรับการศึกษานี้ใช้วัสดุอ้างอิง (certificate reference material) ของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 NK603 Bt11 Bt 176 และ GA 21 ถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ RR (GTS 40-3-2) และ DP305423-1 ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของพืชตัดแปรพันธุกรรมในระดับที่แตกต่างกันดังตาราง ที่ 1 (Table1) ซึ่งได้รับมาตรฐานจาก Institute for Reference Materials and Measurements นอกจากนี้ยังใช้พลาสติกของข้าวตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt63 และ มะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 (ขนิษฐา และคณะ, 2558) เป็นตัวอย่างอ้างอิง และสำหรับตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชตัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

Table 1.4.1 GM certified reference materials information in this study

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

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

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

2. LightCycler480 Multiwell Plate 96, with sealing foil
3. Real-Time PCR equipment model LightCycler 480(Roche Technologies, Santa Clara, CA)
4. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมีในการทำสกัดดีเอ็นเอและทดสอบปฏิกิริยา
5. โพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Aldrich Biotechnolgy)

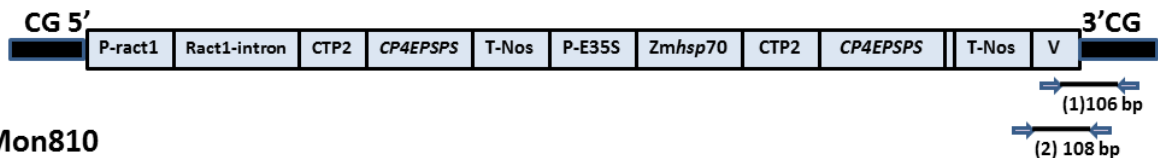
Table 1.4.2 Oligonucleotide sequences of primer and probe of Event Specific and endogenous gene

Gene	GM event	Primer/ Probe	Sequence (5'-3')	Reference
<i>Event - Specific</i>	NK603 (1)	NK603-F	GACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGC	Shrestha <i>et al.</i> (2010)
		NK603-R	CGAGAAGAGATAACAGGATCCCACTC	
		NK603-P	FAMTACCACGCGACACACTBHQ1	
	NK603 (2)	NK603-F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA	JRC-EURL- GMFF-ENGL (2011)
		NK603-R	AAGAGATAACAGGATCCCACTCAAACACT	
		NK603-P	FAMTGGTACCACGCGACACACTTCCCACTCBHQ1	
Mon810 (1)	MON810-F	CACTTCTCCTTGGACATCGATG	Shrestha <i>et al.</i> (2010)	
	MON810-R	GCAAGCAAATTCGGAAATGAA		

Gene	GM event	Primer/ Probe	Sequence (5'-3')	Reference
		MON810-P	HEXAGGACTTTTCGGTAGCCTTBHQ1	
	Mon810	MON810-F	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	JRC-EURL- GMFF-ENGL (2011)
	(2)	MON810-R	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	
		MON810-P	HEXAACATCCTTTGCCATTGCCAGCBHQ1	
<i>Endogenous gene</i>	<i>Zein</i>	Zein-F	GCTTGCCAGCTTGATGGCGT	Shrestha <i>et al.</i> (2010)
		Zein-R	GGCATCGTCTGAAGCGGTAAGG	
		Zein-P	Cy5ATGCTGCAGCAACTGBHQ3	
	<i>Adh</i>	Adh-F	CCAGCCTCATGGCCAAAG	Mazzara <i>et al.</i> (2005); JRC-EURL- GMFF- ENGL (2011)
		Adh-R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG	
		Adh-P	Cy5CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTTCCCTBHQ3	
	<i>HMG</i>	HMG-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	Charles <i>et al.</i> (2008); JRC-EURL- GMFF-ENGL (2011)
		HMG-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT	
		HMG-P	Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ3	

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

NK603



Mon810

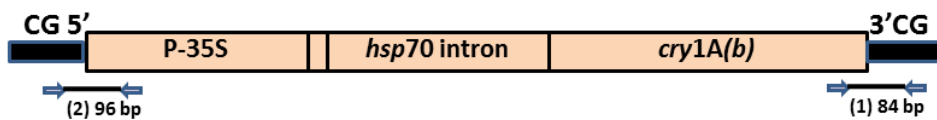


Figure 1.4.1 Construct maps of NK603 and Mon810 GM Maize events referring the region amplification of Event Specific Real-time PCR primer and probes (1: the amplification area of 1st primer and probe, 2: the amplification area of 2nd primer and probe)

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ

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

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

นำดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม (Table1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง คริมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด มาทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Simplex โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบดังตารางที่ 1.4.2 (Table 1.4.2) ซึ่งมีตำแหน่งของการเข้าจับไพรเมอร์และโพรบที่แตกต่างกันสำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ดังภาพที่ 1.4.1 (Fig.1.4.1) และยีนอ้างอิงพืชสำหรับตรวจสอบข้าวโพดที่แตกต่างกัน 3 ยีนได้แก่ ยีน *Zein* ยีน *Alcohol dehydrogenase (Adh)* และ ยีน *High Mobility Group of maize (HMG)* ใช้สภาวะปฏิกิริยาการทำ PCR ดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing และ extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้ น้ำ (PCR grade; Roche, Switzerland) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร สาร Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 2x ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (Sornchai et al, 2018) นำผลการตรวจสอบการตรวจพบยีนต่างๆ มาเปรียบเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1.4.1 (Table1.4.1) แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeders et al, 2014

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

ตรวจสอบอิทธิพลของตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์และโพรบด้วยการนำดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิง ข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปรพันธุ์กรรม (Table 1.4.1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ด ข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบดังตารางที่ 1.4.2 (Table 1.4.2) ซึ่งไพรเมอร์และโพรบแต่ละชุด มีตำแหน่งของการเข้าจับไพรเมอร์และโพรบที่แตกต่างกันสำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ดังภาพที่ 1.4.1 (Fig.1.4.1) และยีนอ้างอิงพืชสำหรับตรวจสอบข้าวโพดที่แตกต่างกัน 3 ยีนได้แก่ ยีน *Zein* ยีน *Alcohol dehydrogenase (Adh)* และยีน *High Mobility Group of maize (HMG)* ใช้สภาวะปฏิกิริยาการทำ PCR ดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing และ extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอน ที่ 2 จำนวน 40 รอบ ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละ ตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้ น้ำ (PCR grade; Roche, Switzerland) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร สาร Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 2x ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (Sornchai *et al*, 2018) ตรวจสอบผลค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้ จากเครื่อง Real time PCR รุ่น LC480 Cycler (Roche Technologies, Santa Clara, CA) เปรียบเทียบกับข้อมูลการที่ได้จากการทดลองเทียบกับตารางที่ 1.4.1 (Table 1.4.1) และเปรียบเทียบค่า Ct ของไพรเมอร์แต่ละชุด และคัดเลือกชุดไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

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

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

นำดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ Mon 810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 เปอร์เซ็นต์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 และ NK603 และ ยีน *Zein* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex (Mon810/*Zein*, NK603/*Zein*) และ Multiplex (Mon810/NK603/*Zein*) เพื่อการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอรวม 100 นาโนกรัมและสารเคมีประกอบปฏิกิริยาดังตารางที่ 1.4.3 (Table 1.4.3) และทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบและไพรเมอร์ดังตารางที่ 1.4.4 (Table 1.4.4) สำหรับความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของกรรมวิธีที่ 1 อ้างอิงจากความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของ Shrestha *et al.* (2010) ในการตรวจสอบ Event Specific Mon810 และ

NK603 แบบ Multiplex และ เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ขึ้นในกรรมวิธีที่ 2 ถึงกรรมวิธีที่ 8 (Table 1.4.4)

4.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 ชุดที่ 2 และ HMG)

ดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon 810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1 เปอร์เซ็นต์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำมาศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 และ NK603 และ ยีน HMG ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาแบบ Real-time PCR แบบ Duplex (Mon810/HMG, NK603/HMG) และ Multiplex (Mon810/NK603/HMG) เพื่อการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอรวม 100 นาโนกรัมและสารเคมีประกอบปฏิกิริยา (Table 1.4.3) และทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของโพรบและไพรเมอร์ (Table 1.4.4) โดยกรรมวิธีที่ 1 เป็นความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ตามคำแนะนำของ JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011) ในการตรวจสอบ Event Specific Mon810 และ NK603 แบบ Simplex สำหรับกรรมวิธีที่ 2 เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์เป็น 2 เท่า และสำหรับกรรมวิธีที่ 3 จะเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของ Event-Specific Mon810 และ NK603 เป็น 10 และ 3.3 เท่า ตามลำดับ และเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของการตรวจสอบยีน HMG เป็น 4 เท่า และในกรรมวิธีที่ 4 เพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของ Event-Specific Mon810 และ NK603 เป็น 10 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ของยีน HMG เป็น 5 ไมโครโมลาร์ (Table 1.4.5)

Table 1.4.3 The component of PCR reaction for Mon810, NK603 and endogenous gene detection using duplex and multiplex real-time PCR

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

Table 1.1.4 The final concentrations of probe and primer for Mon810 and NK603 GM maize detection using duplex and multiplex real-time PCR

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

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

Table 1.4.5 The final concentrations of probe and primer for Mon810 and NK603 GM maize detection using duplex and multiplex real-time PCR

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

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

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

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม events ต่างๆ ได้แก่ Bt 11, Bt176, Mon810 และ NK603 ที่มีโครงสร้างของยีน และเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ และตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการตัดแปรพันธุกรรม เช่น ข้าวโพด มาทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ ต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 4 นำมาตรวจวิเคราะห์ยีน Event-Specific Mon 810 Event-Specific NK603 และยีนอ้างอิงข้าวโพด (ยีน

HMG) ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบตรวจตัวอย่างที่ละยีน (Simplex) เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์แบบ Multiplex ที่ตรวจยีน Event-Specific Mon 810 และ NK603 ร่วมกับ ยีนอ้างอิงข้าวโพด HMG ในปฏิกิริยาเดียวกัน ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ บันทึก ค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากปฏิกิริยาของแต่ละวิธี นำค่า Ct ที่ได้มาตรวจสอบผลความเหมาะสมของไพรเมอร์โพรบจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Ct ที่ได้จากวิธี Multiplex กับ วิธี Simplex ของแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธี Pair Sample T-test และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์โพรบจากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1.4.1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate

6. การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

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

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

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

8. การทดสอบความเที่ยงตรง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน HMG ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR 4 ครั้ง ครั้งละ 12 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct โดยคำนวณหาความเที่ยงของวิธีการตรวจสอบด้วยการคำนวณหา ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของค่า Ct ของแต่ละยีน สำหรับค่าความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบคำนวณโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (Coefficient of variation:

CV) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ของการตรวจสอบแต่ละครั้งและรวมทั้ง 4 ครั้ง (Broeders *et al.*, 2014)

9. การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

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

10. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Multiplex Real-time PCR

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

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุด เดือนสิงหาคม 2562

สถานที่: ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุ์กรรม กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ตัดแปรพันธุ์กรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปรพันธุ์กรรม และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ด้วยวิธีการดัดแปลงจากวิธี GeneScan ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุ์กรรม (Roger and Bendich, 1980) (Table 1.4.5) พบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงจากข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมอยู่ในช่วงระหว่าง $1,439 \pm 179$ ถึง $1,656 \pm 244$ นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีคุณภาพของดีเอ็นเอ (A260/A280) อยู่ในช่วงระหว่าง 1.84 ± 0.12 ถึง 1.94 ± 0.04 แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าวโพดสามารถแบ่งผลของการสกัดดีเอ็นเอได้สองกลุ่มคือกลุ่มที่ได้ความเข้มข้นสูงและคุณภาพของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.8-2.0 คือ เมล็ดข้าวโพด และข้าวโพดกระป๋อง ในขณะที่ ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพดและเกร็ดข้าวโพดสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ต่ำกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และคุณภาพดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.74-1.78 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผ่านกระบวนการด้านอุตสาหกรรมมาจึงทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ทำให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต่ำกว่าเกณฑ์ (Somsomboon *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองและข้าวต่ำกว่า 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่คุณภาพดีเอ็นเอยังอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งการเติม Proteinase K และ Chloroform และ Isoamyl alcohol มีส่วนช่วยให้คุณภาพดีเอ็นเอของข้าวและถั่วเหลืองยังอยู่ในช่วงที่

เหมาะสมสำหรับผลการทดลองในภาพรวมแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้

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

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

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบกับพืชตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 (positive) และ ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นๆ เช่น Bt11 Mon863 Bt176 GA21 และข้าวโพด Non GM รวมถึงถั่วเหลืองสายพันธุ์ 305423 และ GT40-3-2 ข้าวสายพันธุ์ Bt63 และมะละกอ ด้วยการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์และโพรบที่ทำการคัดเลือกมีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 ทั้ง 2 ตำแหน่งสามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 ทุกระดับการปนเปื้อน ในขณะที่เดียวกันไพรเมอร์และโพรบของ NK603 ทั้ง 2 ตำแหน่ง สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ทุกระดับการปนเปื้อน แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณจากพืชตัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นและผลิตภัณฑ์ต่างๆ

สำหรับยีนอ้างอิงพืช (endogenous gene) พบว่า ทั้งสามไพรเมอร์ ที่ตรวจสอบยีน *Zein Adh* และ *HMG* นั้นสามารถตรวจจับสัญญาณได้ในตัวอย่างข้าวโพดทุกตัวอย่างแต่ไม่พบสัญญาณในตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ เช่น มะละกอสายพันธุ์ 55-1 ถั่วเหลือง ข้าว (Table 1.4.6) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์และโพรบยีนอ้างอิงพืชทั้งสามที่นำมาใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างข้าวโพด

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

จากการศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบทั้งหมดที่ทำการคัดเลือกในตารางที่ 1.4.2 (Table 1.4.2) มีความสามารถในการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์กล่าวคือ ไพรเมอร์และโพรบของยีนอ้างอิงข้าวโพดทั้งสามยีน *Zein Adh* และ *HMG* นั้น สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ในตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและข้าวโพดที่ไม่ตัดแปรพันธุกรรม แต่พบว่าเครื่องสามารถตรวจจับสัญญาณได้แตกต่างดังนี้ สัญญาณของยีน *HMG* และ *Adh* ตรวจพบเร็วที่สุด (ค่า Ct น้อยที่สุด) ซึ่งมีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 25.84 และ 25.65 ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจจับสัญญาณได้เร็วกว่า ยีน *Zein* ที่มีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 28.33 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามลำดับ

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

Table 1.4.6 The results of DNA concentration, DNA purity and specificity of Mon810, NK603 and endogenous probe and primer

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

Notes: + detected, - not detected

สำหรับส่วนไพรเมอร์และโพรบของยีน NK603 ให้ผลสอดคล้องกับยีน Mon810 คือสามารถตรวจจับสัญญาณได้ในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 แต่ไม่พบสัญญาณในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และข้าวโพดไม่ตัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้พบว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 สามารถตรวจพบสัญญาณได้ดีกว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ถึง 3 Cycles โดยพบว่าโพรบของชุดที่ 1 มีความยาวเพียง 16 ลำดับเบสจึงทำให้มีอุณหภูมิในการจับเกาะดีเอ็นเอต่ำเพียง 53.5 องศาเซลเซียสซึ่งไม่สอดคล้องกับอุณหภูมิของไพรเมอร์ที่สูงถึง 62 องศาเซลเซียส โดยวีระพงศ์ (2557) กล่าวว่าปัจจัยที่สำคัญที่สุดของการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR คือการออกแบบไพรเมอร์และโพรบให้ถูกต้องและมีความจำเพาะต่อยีนนั้นๆ ที่ต้องการตรวจสอบและหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์เช่นการเกิด dimer หรือ การเกิด hairpin loop หรือ การเกิด self-dimer เป็นต้น นอกจากนี้ Bustin *et al* (2004) ได้รายงานว่าการออกแบบโพรบควรให้มีความสามารถที่จะยึดเกาะดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ (Tm) อยู่ในช่วง 68 ถึง 70 องศาเซลเซียสหรือมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิ (Tm) ของไพรเมอร์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส

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

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

4. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

4.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 และ *Zein*)

จากการศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 NK603 และ ยีน *Zein* ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex และ Multiplex ในการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า การตรวจ Event Specific ของ Mon810 ควบคู่กับยีน *Zein* ในปฏิกิริยาเดียวกัน มีเพียงกรรมวิธีที่ 1 ที่ใช้ความเข้มข้นของ ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของ Mon810 5 ไมโครโมลาร์ ที่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณ Event Specific ของ Mon810 ได้ สำหรับไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของยีน *Zein* ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เป็นต้นไป สามารถตรวจจับสัญญาณของยีน *Zein* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ Mon 810 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และโพรบที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ นั้นสามารถตรวจจับสัญญาณ Event Specific ของ Mon810 ได้ แต่ตรวจพบในระยะเวลาสุดท้ายของการทำ

ปฏิกิริยา (Ct เฉลี่ย = 36.14) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำ Real-time PCR โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 ที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ต่ำกว่า 10 ไมโครโมลาร์ ส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบของยีน *Zein* ที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ต่ำกว่า 5 ไมโครโมลาร์ (Fig.2A) สำหรับการตรวจ Event Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน *Zein* พบว่าในทุกกรรมวิธีสามารถตรวจพบสัญญาณของทั้งสองยีนได้ โดยพบว่าการตรวจสอบ Event Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน *Zein* สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse และโพรบของ NK603 และยีน *Zein* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ไมโครโมลาร์ ขึ้นไป (Fig. 1.4.2B) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการตรวจจับสัญญาณของยีน *Zein* พบเจอได้แม้ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบจะอยู่ในระดับต่ำทั้งนี้เนื่องมาจากยีน *Zein* เป็นยีนอ้างอิงพืช (endogenous gene) ที่มีการแสดงออกอยู่ตลอดเวลาและทุกเนื้อเยื่อ หรือ ที่เรียกว่า constitutive gene (Sinha *et al.*, 2015) จึงสามารถตรวจจับสัญญาณได้รวดเร็ว (ค่า Ct ต่ำ) ส่วนการตรวจจับ Event Specific ของ NK603 ก็สามารถตรวจจับสัญญาณได้รวดเร็วคล้ายกับยีน *Zein* ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Shrestha *et al.* (2010) ที่ทำการตรวจสอบยีน NK603 ยีน Mon810 ร่วมกับ ยีน *Zein* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่า ระดับความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่เท่ากันแต่สามารถตรวจจับสัญญาณของ Mon810 ได้ช้ากว่ายีน NK603 และ ยีน *Zein*

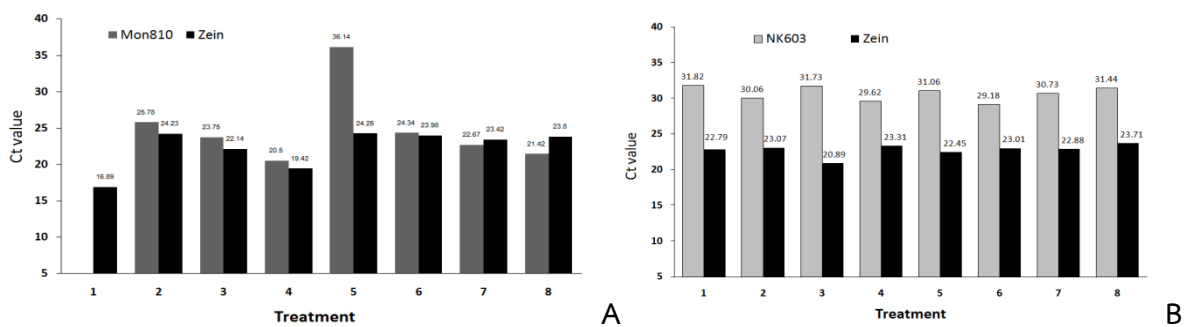


Figure 1.4.2 The Ct value of each treatment that suitable for Duplex (Mon810 area 1/Zein, A) and (NK603 area 1 /Zein, B) Real-time PCR techniques.

สำหรับการตรวจข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 NK603 ชุดที่ 1 ควบคู่กับยีน *Zein* พบว่าทุกกรรมวิธีตรวจพบสัญญาณทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ Event Specific ของ Mon810 และ NK603 และยีน *Zein* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมแบบ Duplex ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ของ NK603 และ ยีน *Zein* คือ 5 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ของ Mon810 คือ 10 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ซึ่งความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่เหมาะสมของ Mon810 NK603 และยีน *Zein* สำหรับการศึกษานี้คือ 10 5 และ 5 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ (Fig.1.4.3)

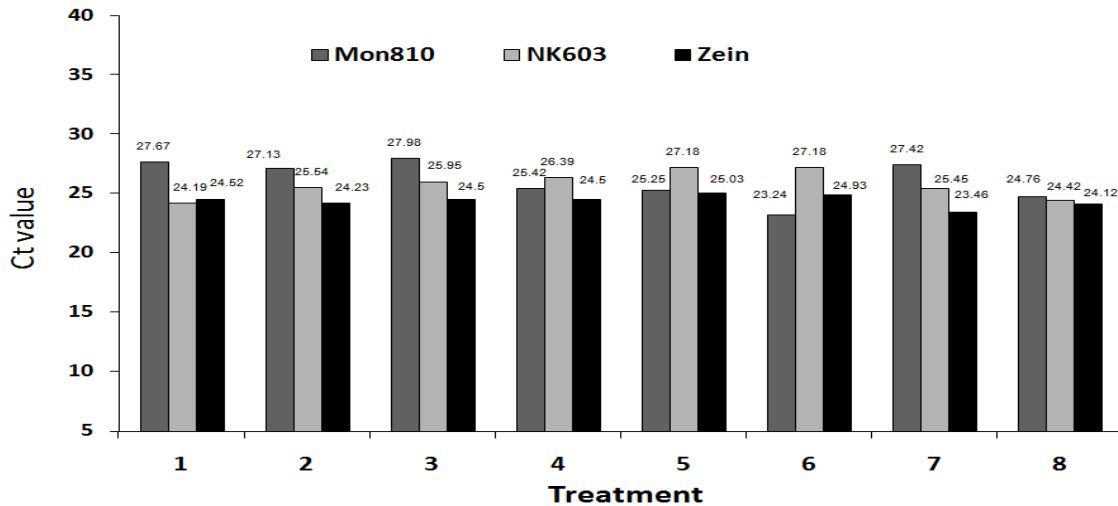


Figure 1.4.3 The Ct value of each treatment that suitable for multiplex (Mon810/NK603 area1/Zein) Real-time PCR technique.

4.2 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพรบและไพรเมอร์ (Mon810, NK603 ชุดที่ 2 และ HMG)

จากการศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบ Mon 810 NK603 และ ยีน HMG ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แบบ Duplex และ Multiplex ในการตรวจสอบข้าวโพด Mon810 และ NK603 ผลการทดลองพบว่า ในการทำปฏิกิริยาแบบ Duplex (Mon810ชุดที่2/HMG) ทุกกรรมวิธีสามารถตรวจพบสัญญาณของยีน Event-Specific Mon810 และ ยีน HMG โดยพบว่าการตรวจสอบ Event-Specific ของ Mon810 ควบคู่กับยีน HMG สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และโพรบของ Event-Specific Mon810 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนยีน HMG สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และโพรบของยีน HMG ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป (Fig.1.4.2B) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ทำให้การตรวจพบสัญญาณของแต่ละยีนรวดเร็วมากขึ้น (Ct น้อย) ดังภาพที่ 1.4.4 (Fig.1.4.4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจจับสัญญาณของยีน Event-Specific NK603 และยีน HMG ที่สามารถตรวจจับสัญญาณของยีนทั้งสองได้ทุกกรรมวิธีโดยในการตรวจสอบ Event-Specific ของ NK603 ควบคู่กับยีน HMG สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ Event-Specific NK603 ตั้งแต่ 0.3 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไปและโพรบของ Event-Specific NK603 ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป ส่วนยีน HMG สามารถใช้ไพรเมอร์ทั้งส่วน Forward และ Reverse ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และโพรบของยีน HMG ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025 ไมโครโมลาร์เป็นต้นไป และเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบก็สามารถตรวจจับสัญญาณของทั้งสองยีนได้เร็วขึ้นเช่นเดียวกัน โดยสอดคล้องกับผลการทดลองของการตรวจสอบความเข้มข้นสุดท้ายของ โพรบและไพรเมอร์ของปฏิกิริยาแบบ Duplex ที่รายงานโดย JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)

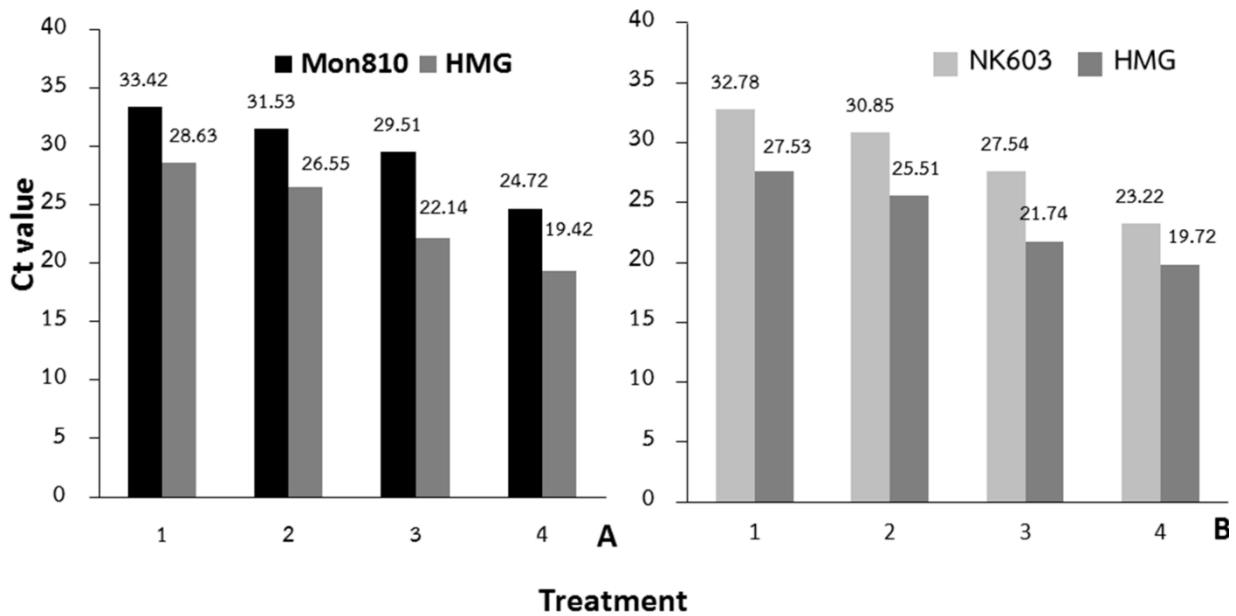


Figure 1.4.4 The Ct value of each treatment that suitable for Duplex (Mon810 area 2/HMG, A) and (NK603 area 2 /HMG, B) Real-time PCR techniques.

สำหรับการตรวจข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 NK603 ควบคู่กับยีน HMG พบว่า ทุก ๆ กรรมวิธีตรวจพบสัญญาณทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ Event-Specific ของ Mon810 และ NK603 และยีน HMG (Fig.1.4.5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมแบบ Duplex ซึ่งความเข้มข้นในระดับนี้เหมาะสมกับการวิเคราะห์แยก Event (quality Test) เพียงเท่านั้น เพราะให้คำตอบในการตรวจสอบเพียงตรวจพบหรือตรวจไม่พบ แต่อาจไม่เหมาะสมกับการหาปริมาณของแต่ละยีนนั้นๆ (quantitative Test) ที่หาระดับการมีอยู่ของยีนนั้น ว่ามีปริมาณเท่าไรหรือน้อยเพียงใด นอกจากนี้ปัจจัยเรื่องความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่ส่งผลต่อค่า Ct แล้วยังมีปัจจัยของโพรบที่ติดบริเวณตำแหน่ง 5' และบริเวณ 3' ที่ถูกติดด้วยสีที่แตกต่างกันเช่น FAM HEX Cy5 หรือติดด้วย BHQ ซึ่งสีที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการแผ่รังสีในช่วงคลื่นที่แตกต่างกัน และการแผ่รังสีของแสงทั้งสองด้านซึ่งอาจจะซ้อนทับกันทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก (Johansson, 2006) และสำหรับปัจจัยสุดท้ายซึ่งเกี่ยวข้องกับความคุ้มทุนการนำไปใช้ประโยชน์ คือเรื่องของราคาโพรบซึ่งในการทดลองนี้ความเข้มข้น โพรบที่ต่ำที่สุดสามารถตรวจเจอจึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์คัดแยก Event ในเชิงคุณภาพ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Simplex Duplex และ Multiplex พบว่าระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์แบบ Simplex และ Duplex ใช้เวลานานกว่าเนื่องจากต้องทำแต่ละยีนแยกกันทำให้ต้องใช้เวลามากขึ้น และมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ส่วนการตรวจวิเคราะห์แบบ Multiplex ใช้เวลาในการตรวจรวดเร็วกว่าและให้ผลของค่า Ct ไม่แตกต่างกันกับการตรวจสอบด้วย Simplex และ Duplex ที่ความเข้มข้นโพรบและไพรเมอร์ชุดเดียวกัน นอกจากนี้ยังประหยัดต้นทุนเรื่องสารเคมีและอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์ (Debode *et al.*, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lab Life-Real-Time PCR (2015) ที่รายงานการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Multiplex ว่าดีกว่าการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค Simplex ในหลายด้าน เช่น สามารถตรวจสอบได้หลายยีนในคราวเดียวกันและใช้สารเคมีเทียบเท่าการทำ Simplex แต่ให้ผลการตรวจสอบหลายยีนต่อครั้งต่อปฏิกิริยา ลดความเสี่ยงที่เกิดในขั้นตอนปฏิบัติงานแต่ละ

ครั้ง และช่วยประหยัดเวลาในการทำงาน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การตรวจสอบแบบ Multiplex มีความจำเป็นจะต้องทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงและความเหมาะสมความเข้มข้นของไพรเมอร์ โพรบ และองค์ประกอบหรือสถานะของสารเคมีร่วมกันก่อนที่จะปฏิบัติงานจริง ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานเช่น Alary *et al.*, 2003; Waiblinger *et al.*, 2008; Cottent *et al.*, 2013; Huber *et al.*, 2013; Broeders *et al.*, 2014; Fraiture *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016)

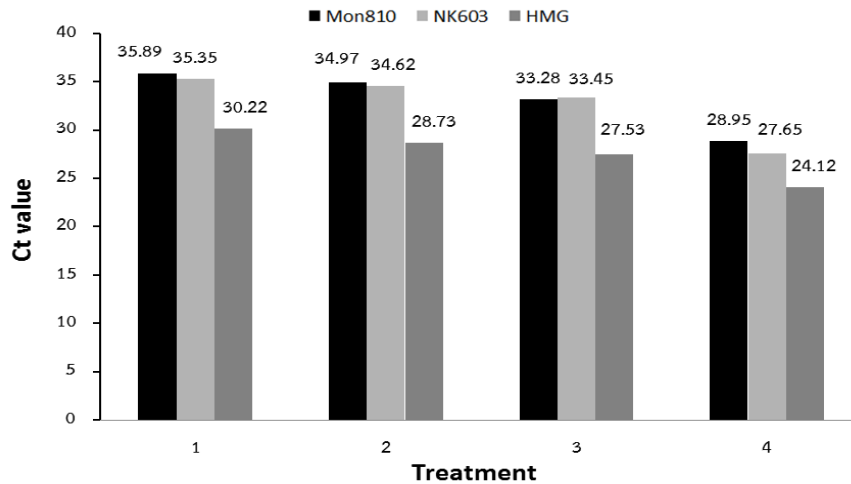


Figure 1.4.5 The Ct value of each treatment that suitable for multiplex (Mon810/NK603 area 2 /HMG) Real-time PCR technique.

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

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

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม events ต่างๆ ได้แก่ Mon810, Bt 11, Bt176, NK603 และตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการตัดแปรพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR เปรียบเทียบกับ Multiplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ทำการคัดเลือกมีความจำเพาะเฉพาะกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจสอบคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยไพรเมอร์และโพรบของ Mon810 สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ Mon810 ทุกระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่ไม่พบสัญญาณดังกล่าวในการตรวจสอบข้าวโพดไม่ตัดแปรพันธุ์กรรมและพืชชนิดอื่นๆ ในขณะที่เดียวกันไพรเมอร์และโพรบของ NK603 สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ NK603 ในทุกระดับ

ตั้งแต่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปและไม่สามารถตรวจจับสัญญาณจากพืชตัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่นเดียวกัน สำหรับยีนอ้างอิงข้าวโพด (HMG) พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในตัวอย่างข้าวโพดทุกตัวอย่างแต่ไม่พบสัญญาณในตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ (Table 1.4.6) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ไพรเมอร์และโพรบที่นำมาใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603

เมื่อเปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้จากการตรวจจับสัญญาณด้วยเทคนิค Simplex และ Multiplex Real-time PCR (Table 1.4.7) พบว่าเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีความเหมาะสมและประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์จำแนกยีนเทียบเท่ากับเทคนิค Simplex Real-time PCR ซึ่งเมื่อตรวจสอบค่า Ct เฉลี่ย ยีน Event Specific NK603 ของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมที่ทุกระดับการปนเปื้อนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับค่า Ct เฉลี่ยของการตรวจสอบยีน Event Specific NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex แต่สำหรับการตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR ในระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ 0.01 ถึง 10% โดยค่า Ct เฉลี่ยของยีน Event Specific Mon810 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex มีค่าต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์จากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังตารางที่ 1.4.1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeders *et al* (2014) พบว่า การใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 สามารถตรวจสอบได้ถูกต้องไม่พบการเกิด False negative และ False positive

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

Table 1.4.7 Comparison of Event Specific Mon810 and NK603 and endogenous gene detection using Simplex and Multiplex Real-time PCR

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

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

6. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ผลการทดลองพบว่า เทคนิค Multiplex Real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ในระดับการเจือจางดีเอ็นเอตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:16 หรือระดับการปนเปื้อนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมตั้งแต่ 0.125% ถึง 2% โดยอัตราการเจือจางที่อัตรา 1: 256 ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้ โดยค่า Ct ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณ Copy number ที่ลดลง เมื่อนำค่า Ct ที่ได้ของแต่ละระดับการเจือจางมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Del Gaudio *et al.* (2012) พบว่า ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Event-specific Mon810 และ NK603 และ *HMG* เฉลี่ยคือ -3.10 -3.07 และ -3.38 ตามลำดับ ค่าประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยา (PCR efficiency) ของปฏิกิริยายีน Event-specific Mon810 และ NK603 และ *HMG* เท่ากับ 110.17 111.71 และ 97.63 ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิ์ของการทำปฏิกิริยาของทุกยีนเท่ากับ 0.99 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR (Broeders *et al.*, 2014) ดังนี้ ค่า Slope -3.1 ถึง -3.6 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 80 ถึง 120 และค่าสัมประสิทธิ์ของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 (Table 1.4.8)

Table 1.4.8 The PCR efficiency and Slope of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

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

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

สำหรับการทดสอบหาร้อยละการปนเปื้อนที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) ของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Event-specific Mon810 และ NK603 พร้อมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณในตัวอยางดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมตั้งแต่ 369.7 ถึง 7,339 Copies ได้ครบทั้ง 12 ซ้ำ ส่วนตัวอยางดีเอ็นเอ ที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม 73.39 Copies เครื่องไม่สามารถตรวจจับสัญญาณของยีน Event-specific Mon810 และ NK603 ได้ครบทุกซ้ำ ยกเว้น ยีน *HMG* ซึ่งเป็นยีน endogenous สามารถตรวจพบสัญญาณได้ตั้งแต่ 7.34-7,339 Copies เป็นต้นไป ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าร้อยละการปนเปื้อนของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ที่ระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1.4.9 (Table 1.4.9)

Table 1.4.9 The limited of detection of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

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

Noted: nd = not detected

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

การทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของวิธีนี้นับบ่งบอกถึงความสามารถของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 โดยค่าความเที่ยงตรงและค่าความแม่นยำของวิธีสามารถตรวจสอบโดยจากค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) และค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Standard Deviation: SD) ของการหาปริมาณยีน Event-specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืช *HMG* จากการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมทั้ง 4 รอบ ผลการทดลองพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD และ SD ของการหาปริมาณ Event-specific Mon810 มีค่าเท่ากับ 1.84 และ 0.67 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ RSD และ SD ของการหาปริมาณ Event-specific NK603 มีค่า 1.63 และ 0.61 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเที่ยงตรงและความแม่นยำของทั้งสองยีนมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุ์กรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR (Broeders *et al.*, 2014) คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD ต้องไม่เกิน 25% ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Del Gaudio *et al.* (2012) ที่ได้รายงานว่าการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุ์กรรมเชิงคุณภาพต้องมีความเที่ยงในการตรวจสอบไม่ควรเกิน 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเทคนิค Multiplex Real-time PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 มีประสิทธิภาพคงที่ นอกจากนี้จากกล่าวได้ว่า อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ รวมถึงวิธีการที่เกี่ยวข้องเช่น การเตรียมตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอ มีความสม่ำเสมอสามารถทำให้ผลการตรวจจำแนกยีนที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ

Table 1.4.10 The repeatability and reproducibility of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected using Multiplex Real-time PCR

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

9. ผลการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นในปฏิกิริยา Real-time PCR ที่แตกต่างกัน 50 100 150 และ 200 นาโนกรัม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม MON 810 และ NK603 ในระดับที่ต่างๆ กันส่งผลให้การตรวจจับสัญญาณแตกต่างกัน (ค่า Ct ที่แตกต่างกัน) ในทุกๆ ยีน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 นาโนกรัม ให้ค่า Ct ที่ได้จากการตรวจสอบยีน Event-specific Mon810 เท่ากับ 33.39 ± 0.06 และยีน Event-specific NK603 เท่ากับ 35.12 ± 1.19 ซึ่งมีค่ามากที่สุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับค่า Ct ที่ได้จากการตรวจสอบยีน Event-specific Mon810 เท่ากับ 31.27 ± 1.06 และ ยีน Event-specific NK603 เท่ากับ 32.33 ± 1.27 นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นให้ค่า Ct ของ ยีน *HMG* ซึ่งเป็น endogenous gene ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR คือ 100 นาโนกรัม และจากการรายงานของ Cankar *et al* (2006) และ Turkec *et al* (2016) ที่กล่าวว่า การสกัด ดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ Real-time PCR โดยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จะแปรผกผันกับค่า Ct ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงจะมีค่า Ct ที่ต่ำและในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาต่ำจะทำค่า Ct ที่สูง แต่ในทาง

กลับกัน Ellison *et al.* (2006) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาใน Real-time PCR แต่ copy number ในดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้น ถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยแต่ถ้ามี copy number ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบระดับตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไปก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยา Real-time PCR ได้ตามทฤษฎี

10. ผลการตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Multiplex Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ Event Specific ของ Mon810 และ NK603 พร้อมตรวจยีนอ้างอิงพืช *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกันแบบ Multiplex Real-time PCR ในตัวอย่างแบบ blind sample เปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ผลการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ให้ผลการทดสอบเหมือนกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ 100 % โดยไม่พบการเกิด False positive และ False negative (Table 1.4.11)

Table 1.4.11 The event screening test results of blind samples were tested using Multiplex Real-time PCR technique (Mon810/NK603/HMG) compared with simplex Real-time PCR technique

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

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

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1) นำผลงานไปจัดทำเอกสารวิธีการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 พร้อมกับยีน endogenous gene (HMG) ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR เพื่อขยายขอบข่ายการทดสอบเข้าสู่ระบบ ISO/IEC17025:2017 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ตัดแปรพันธุกรรม
- 2) นำผลงานที่ได้ถ่ายทอดให้กับหน่วยงานเอกชนหรือภาคราชการอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจจำแนกข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 เชิงคุณภาพ
- 3) ตีพิมพ์ผลงานเผยแพร่ทางวารสารวิชาการจำนวน 2 ฉบับ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ตัดแปรพันธุกรรม ผู้มีส่วนช่วยดำเนินการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ภิยุรดา ดนัยศิริพงษ์ อรรถพล ภูมิศรี พงศกร สรรค์วิทยากุล และศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2558. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอตัดแปรพันธุกรรม. รายงานโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร. กรมวิชาการเกษตร

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

วีระพงศ์ ลุสิตานนท์. 2557. เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ Real-time PCR. บริษัท ดีทีริโอ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 157 หน้า

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ISAAA. 2018. ISAAA's GM Approval Database. <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

การทดลองที่ 1.5 ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีนCaMV35S promoter และ Nos terminator ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex real-time PCR

Validation study of CaMV 35S promoter and Nos terminator multiplex real-time PCR screening method to detect GM maize

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ นายพงศกร สรรค์วิทยากุล
นางสาวปิยนุช ศรชัย นางสาวฐิติรัตน์ อัครวมงคลศิริ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีน Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter และ Nos terminator เชิงคุณภาพในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR วิธีการดัดแปลงจาก Waiblinger et al. (2008) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบอ้างอิงจาก ISO/IEC21569:2005 and 2013 และ JRC-EURL ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมาย CaMV 35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงพืช (*high mobility group; hmg*) พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่ามีผลการตรวจวิเคราะห์เท่าเทียมหรือดีกว่าวิธีการตรวจแบบทีละยีน (single PCR, simplex) ทุกค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดได้อยู่ในเกณฑ์ค่าปกติที่ยอมรับได้ทั้งหมดได้แก่ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50-200 นาโนกรัม มีความจำเพาะในการตรวจยีนโดยไม่พบ false positive/negative ขีดจำกัดการตรวจ (LOD) ที่ 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ PCR efficiency 102-115 เปอร์เซ็นต์ (ค่าที่ยอมรับของวิธี multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์) Linearity (R^2) 0.998 ± 0.001 (ค่าที่ยอมรับ $R^2 \geq 0.98$) และค่า Slope -3.1 ถึง -3.26 (ค่าที่ยอมรับ -3.1 ถึง -3.6) ดังนั้นวิธีการตรวจคัดกรองแบบ multiplex (triplex) Real-time PCR โดยตรวจยีนคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม CaMV35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงข้าวโพด *hmg* ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดในเชิงคุณภาพได้

Abstract

The qualitative qPCR method validation for detecting on Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and Nos terminator of genetically modified maize using Multiplex real-time PCR according to modified Waiblinger et al. method (2008). Probes and Primers were referenced from ISO/IEC21569: 2005, 2013 and JRC-EURL for detecting on CaMV 35S promoter Nos terminator and endogenous gene (*high mobility group; hmg*) in one reaction. All parameter results of qualitative qPCR method validation using Multiplex real-time PCR was similar to or better than Single PCR (Simplex) method within the acceptable standard : 50-200 ng of DNA concentration, Not found false positive and negative, Limited of detection at 0.001-0.01%, PCR efficiency at 102-115%, Linearity (R^2) at 0.998 ± 0.001 and Slope at -3.1 to -3.26. In summary, Multiplex real-time PCR technique is appropriate for qualitative GMO screening in GM maize and maize products.

คำนำ

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่ใช้วิธี DNA based technique เช่น เทคนิค PCR และ Real-time PCR โดยที่เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ และเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในห้องปฏิบัติการระดับสากลซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นการตรวจยีนอ้างอิงพืช (reference gene) และตรวจวิเคราะห์คัดกรอง (screening method) เช่น ยีน CaMV 35S promoter และ NOS-terminator ที่ตัดต่อเชื่อมกับยีนจำเพาะเข้าไปในพืช ทั้งนี้การตรวจรับรองแต่ละครั้งต้องทำปฏิกิริยาทดสอบอย่างน้อย 3 ปฏิกิริยาๆ ละ 2 ซ้ำ ทำให้ต้องใช้เวลา สารเคมี และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์มาก ปัจจุบันห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรปใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ duplex real-time PCR (Waiblinger *et al.* (2008) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ติดฉลากสีของแต่ละยีนให้แตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกันและวิเคราะห์ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ละยีน ผลของปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ต้องเทียบเท่ากับวิธีการเดิมทดสอบ optimize ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบ ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ที่สามารถทำปฏิกิริยาในสภาวะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเดียวกัน ด้วยโพรบที่ติดฉลากสีต่างกัน ขั้นตอนการสังเคราะห์ของปฏิกิริยา เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative real-time PCR) ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์การค้าที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในระดับต่ำ จัดทำขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เพื่อออกใบรับรองของห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ 35s CaMV promoter และ NOS-terminator ร่วมกับการตรวจยีนอ้างอิงพืชในขั้นตอนเดียว เพื่อลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ โดยคงประสิทธิภาพ ช่วยลดเวลาและต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certified Reference Material, CRM) ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์เชิงการค้า ได้แก่ event Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162 (IRMM:ERM) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และมีค่า Certified ดังตารางที่ 1
2. LightCycler 480 Multiwell Plate 96, with sealing foil
3. Real-time PCR equipment model LightCycler 480 (Roche Technologies, Santa Clara, CA)
4. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมีในการทำสกัดดีเอ็นเอและทดสอบปฏิกิริยา
5. ไพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Aldrich Biotechnology)

ตารางที่ 1.5.1 วัสดุอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม

Source/code	Event	Certified value g/kg	%GM (\pm Uncer.)	GM construct	
				35S promoter	Nos terminator
ERM-BF413ak	Mon810 ak	<0.9	<0.09	+	-
ERM-BF413ck	Mon810 ck	4.9	0.49 \pm 0.1	+	-
ERM-BF413ek	Mon810 ek	19.8	1.98 \pm 0.15	+	-
ERM-BF413gk	Mon810 gk	99	9.9 \pm 0.5	+	-
ERM-BF411f	BT176	50	5 \pm 0.18	+	-
ERM-BF412f	BT11	48.9	4.89 \pm 0.21	+	+
ERM-BF415a	NK603 a	<0.4	<0.04	+	+
ERM-BF415b	NK603 b	1.0	0.1 \pm 0.04	+	+
ERM-BF415c	NK603 c	4.9	0.49 \pm 0.05	+	+
ERM-BF415d	NK603 d	9.8	0.98 \pm 0.07	+	+
ERM-BF415e	NK603 e	19.6	1.96 \pm 0.09	+	+
ERM-BF415f	NK603 f	49.1	4.91 \pm 0.13	+	+
ERM-BF423a	MIR604 a	<0.9	<0.09	-	+
ERM-BF423b	MIR604 b	1.0	0.1 (-0.03;+0.1)	-	+
ERM-BF423c	MIR604 c	9.8	0.98 (-0.09;+0.13)	-	+
ERM-BF423d	MIR604d	98.5	9.85 (-0.26;+0.29)	-	+
AOCS 0607-A2	MIR604	NA	100	-	+
AOCS 1208-A	MIR162	NA	100	-	+
AOCS 0906-E	Mon89034	NA	99.425	+	+
AOCS 0406-D	Mon88017	>990.5	99.05	+	+
ERM-BF414f	GA21	42.9	4.29 \pm 0.17	-	+
ERM-BF410gk	GTS 40-3-2	10	10 \pm 0.7	+	+
AOCS	0406-A	<2.0	NA		

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงการตัดแปรพันธุกรรมมียีน CaMV 35S promoterและหรือNos terminator
; - (negative) หมายถึงไม่มียีน CaMV 35S promoterและหรือNos terminator, NA=Not available

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม (ตารางที่ 1.5.1) ด้วยการดัดแปลงจากวิธี GeneScanตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรม(Roger and Bendich, 1985) โดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 มก. ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มล. เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm

เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น และนำมากำจัด RNA โดยใช้ RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Raines, 1998) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้างอิงตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับตัวอย่างสินค้าและผลิตภัณฑ์พืชจากข้าวโพดที่ทดสอบใช้วิธีการสกัดตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ได้แก่ GeneScan Cell breaking และ Guanidinium-chloroform

2. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CaMV 35S promoter NOS terminator และ endogenous gene คือ *hmg* (*High mobility group* in maize) ของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม และหาตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบจากเอกสารวิชาการต่างๆ (Waiblinger et al., 2008; Cottent et al., 2013; Huber et al., 2013; Broeders et al., 2014; Fraiture et al., 2015; Peng et al., 2016) และจากเอกสารการ Validation methods ของ JRC-EURL (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบโดยเลือกติดฉลากสีโพรบที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วย Real time PCR model LC480 Cyclor (Roche Technologies, Santa Clara, CA) และใช้ BHQ Quencer ดังนี้ โพรบ CaMV 35S promoter 5' FAM-3' BHQ, Nos terminator 5' HEX-3' BHQ, *hmg* 5' Cy5- 3' BHQ

3. ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และ Nos terminator แบบตรวจตัวอย่างที่ละยีน (Single PCR, Simplex) ซึ่งเป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้ ทดสอบ เปรียบเทียบผลกับการทดสอบปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในปฏิกิริยาเดียวกัน (Waiblinger et al., 2008) และ การตรวจวิเคราะห์แบบ triplex โดยตรวจยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และยีนอ้างอิงพืช *hmg* gene ในปฏิกิริยาเดียวกัน (Huber et al., 2013) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชุดเดียวกัน โดยใช้สารเคมีไพรเมอร์และโพรบในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 1.5.2

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม events ต่างๆ ได้แก่ Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162 ที่มีเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ (ตารางที่ 1.5.1) และ ตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรมเช่นข้าวโพดแก้วเหลือง และข้าว เป็นต้น

ตารางที่ 1.5.2 สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ตรวจยีน CaMV 35S promoter NOS

terminator และ *hmg* แบบ simplex และ multiplex (duplex และ triplex PCR)

Reagent	Final concentration/reaction		
	Simplex PCR	Duplex PCR	Triplex PCR
2X LightCycler Probe mastermix	1X	1X	1X
35S-F primer	2.5 pmol	0.1	0.1
35S-R primer	2.5 pmol	0.1	0.1
35S-Probe	2.5 pmol	0.1	0.1
Nos-F primer	(2.5 pmol)	1.0	1.0
Nos-R primer	(2.5 pmol)	1.0	1.0
Nos-Probe	(2.5 pmol)	0.2	0.2
<i>hmg</i> -F primer	-	-	0.05
<i>hmg</i> R primer	-	-	0.05
<i>hmg</i> -Probe	-	-	0.25
DNA-extract (samples or standards)	50-100 ng	50-200 ng	50-200 ng
Total reaction volume	20	20	20

หมายเหตุ: simplex; ทดสอบที่ละยีน (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'TAMRA) โดยยีนอ้างอิงที่ทดสอบด้วย conventional PCR, Duplex; ทดสอบยีน 35S promoter (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'BHQ) + Nos terminator (โพรบติดฉลาก 5'HEX-3'BHQ) ในปฏิกิริยาเดียวกัน และยีนอ้างอิงที่ทดสอบด้วย conventional PCR, Triplex; ทดสอบยีน 35S promoter (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'BHQ) + Nos terminator (โพรบติดฉลาก 5'HEX-3'BHQ) + *hmg* (โพรบติดฉลาก 5'Cy5-3'BHQ) ในปฏิกิริยาเดียวกัน

เตรียมปฏิกิริยา Real-time PCR ปริมาตรตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรต่อหลุม ดังตารางที่ 1.5.2 ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายจำเพาะที่ต้องการตรวจหา ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LigeCycler 480 โดยใช้อุณหภูมิและรอบการทำงาน ดังนี้

Simplex: CaMV 35S promoter

Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และ cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส

Simplex: Nos terminator

Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing และ extension 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และ cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส

Duplex และ Triplex: CaMV 35S promoter/Nos terminator/ *hmg*

Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และ cooling ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

เจือจางดีเอ็นเอที่สกัดจากวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event MON 89034 ที่มีอัตราเจือปนรับรอง (Certified value 99.425 g/kg) คิดเป็น 100% GM และ event Bt11 ที่มีอัตราเจือปนรับรอง Certified value 48.9 g/kg คิดเป็น 5% GM เจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีการปนเปื้อนของการตัดแปลงพันธุกรรม 5 ระดับ ได้แก่ event MON 89034 : 10% 1% 0.1% และ 0.01% ตามลำดับ และ event Bt11: 0.5% 0.05% 0.005% และ 0.0005% ตัวอย่างละ 12 ซ้ำ ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามขั้นตอนตารางที่ 1.5.2

การทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Amplification Range) โดยเตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON 89034 และ NK 603 จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีระดับการปนเปื้อน 1 และมีระดับ % ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ 50 100 150 200 ng จากนั้นทำปฏิกิริยา Real-time PCR ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

5. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Triplex Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์คัดกรองพร้อมตรวจยืนยันอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาเดียวกัน แบบ triplex real-time PCR เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดต่างๆ 17 ตัวอย่าง และมะละกออีก 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้น 100 ng จากนั้นนำมาตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene ด้วยการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 1 ปี เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

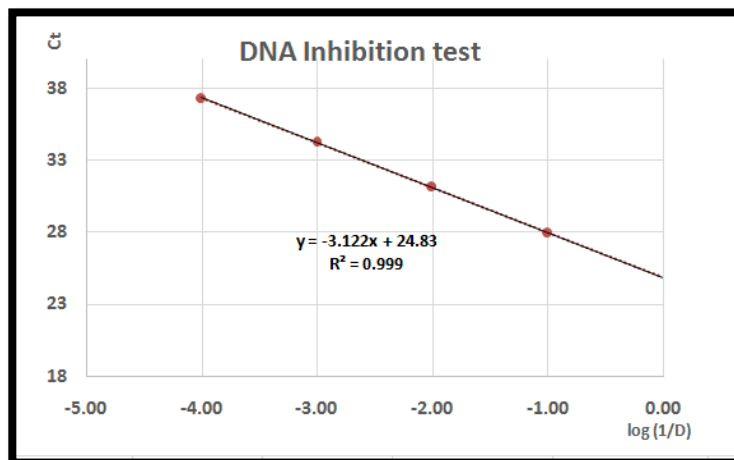
1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162 (ตารางที่ 1.5.1) ด้วยการตัดแปลงจากวิธี GeneScan (Roger and Bendich, 1985) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปลงพันธุกรรม และนำมากำจัด RNA โดยใช้ RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Raines, 1998) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (ThermoFisher Scientific, Finland)

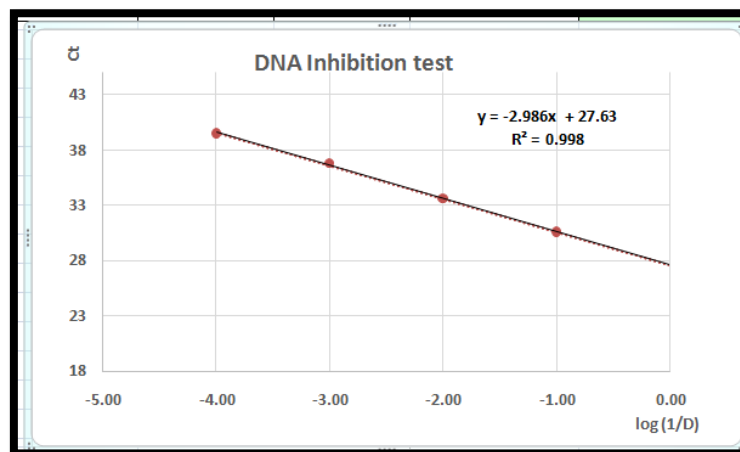
โดยผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีที่ตัดแปลงจากวิธี GeneScan ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปลงพันธุกรรมได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 1,467.17 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตรที่ได้ 50 ไมโครลิตร คุณภาพของดีเอ็นเอคำนวณค่า 260/280 เฉลี่ย 1.8-2.0 OD. ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยตรวจสอบปฏิกิริยา inhibition test ของดีเอ็นเอที่สกัด ซึ่งได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.998 ± 0.001 และมีค่า ΔCt (extrapolated) = Extrapol. Ct - Mean Ct ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือค่าต่ำกว่า 0.5 (ภาพที่ 1.5.1)

จากการรายงานของ Cankar et al (2006) ที่กล่าวว่า การสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ inhibitor ที่เกิดจากสารภายในตัวอย่าง หรือ inhibitor ที่เกิดจากขั้นตอนการสกัด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีเช่นการตรวจสอบจากการวัดคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร หรือการนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR, Real-time PCR เป็นต้น สอดคล้องกับการรายงานของ Turkec et al (2016) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นเอส่งผลต่อการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์ GMO จำเป็นต้องมีวิธีการสกัดที่สามารถให้คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ดี รวมถึงสามารถดึงเอาตัว Inhibitor ต่างๆ ออกได้มากที่สุด

สำหรับผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่มีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 1.5.3) และมีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้



ก



ข

ภาพที่ 1.5.1 การทดสอบ Inhibition test ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม MON89034(ก) และ NK603 (ข) ซึ่งมีค่า ΔCt (extrapolated) เท่ากับ 0.29 และ 0.13 และค่า R^2 เท่ากับ 0.999 และ 0.998 ตามลำดับ

ตารางที่ 1.5.3 ความเข้มข้น คุณภาพดีเอ็นเอ และผลทดสอบ Inhibition test ของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม

GM (events)	% GMO Value	ความเข้มข้น (ng/u)	Ratio of A260/280	Inhibition test	
				Δ Ct (extrapolated)	R ²
Mon810	blank <0.04	1,035±132	1.87±0.11	NA	NA
	0.5%	1,570±192	1.89±0.05	NA	NA
	2	1,640±183	1.90±0.05	0.34	0.998
	9.9%	1,642±157	1.88±0.07	NA	NA
MON89034	100%	1,353±133	2.00±0.08	0.29	0.999
NK603	blank <0.04	1,630±347	1.89±0.02	NA	NA
	0.1%	1,539±179	1.87±0.07	NA	NA
	0.5%	1,008±152	1.84±0.05	0.13	0.998
	1.0%	1,156±163	1.86±0.04	NA	NA
	2%	1,038±135	1.91±0.08	NA	NA
	10%	1,299±190	1.90±0.03	NA	NA
MIR162	100	1,197±90	1.98±0.02	0.28	0.999
Bt11	4.89	1,508±151	1.87±0.06	0.25	0.997
Bt 176	5.00	1,849±85	1.92±0.10	0.32	0.999
MIR604	<0.09	1,897±131	1.93±0.05	NA	NA
	0.98	1,795±231	1.97±0.02	NA	NA
	9.85	1,499±167	1.97±0.08	0.24	0.999
nonGM	-	1,754±142	1.85±0.03	NA	NA
AVG		1,467.17	1.91	-	-

NA: ไม่ได้ทำการทดสอบ

2. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของCaMV 35S promoter NOS terminatorและendogenous gene คือ HMG(High mobility group in maize) ของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม และหาตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบ จากเอกสารวิชาการต่างๆ (Waiblinger et al., 2008; Cottent et al., 2013; Huber et al., 2013; Broeders et al., 2014; Fraiture et al., 2015; Peng et al., 2016) และจากเอกสารการ Validation methods ของ JRC-EURL (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) โดยเลือกใช้วิธีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วย Real time PCR model LC480 Cyler (Roche Technologies, Santa Clara, CA)

หลังจากการรวบรวมข้อมูลไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสารต่างๆ แล้วสามารถสรุปข้อมูลของไพรเมอร์และโพรบได้โดยใช้วิธีการValidation methods และ ไพรเมอร์และโพรบจาก ของJRC-EUROPEAN COMMISSION (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพต่อไป (ตารางที่ 1.5.4)

ตารางที่ 1.5.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ HMG gene ของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและการติดฉลากสี

Target	Sequences	Length	อ้างอิง
Screening target			ISO 21569:2005
35S-FTM	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	18	/Amd.1:2013
35S-RTM	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	22	(2013)
35S-TMP	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1-3'	22	
NOS180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	25	
NOS180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT-3'	25	
NOS180-P	5'-Hex-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1-3'	28	
Endogenous gene			EURL-GMFF- ENGL (2010)
HMG-F	5'TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'	23	
Hgm-R	5'GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3'	22	
HMG-P	5'Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ1-3'	23	
Probe ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชตัดแปลงพันธุกรรม			
35S-P	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG- TAMRA-3'	22	
NOS-P	5'-FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA -3'	28	

3. ทดสอบความจำเพาะ(Specificity) ของปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืช และทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Simplex) เปรียบเทียบกับการทดสอบปฏิกิริยาที่ตัดแปลงตามเอกสารวิชาการในรูปแบบ Duplex PCR (CaMV 35S promoter กับ NOS terminator) และ รูปแบบ triplex (CaMV 35S promoter NOS terminator และ hmg gene) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ตัดแปลงมาจาก EU database of Reference Methods for GMOs (JRC-EURL-GMFF-ENGL,2010) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชตัดแปลงพันธุกรรมให้ผลค่า CP แตกต่างกันแต่อย่างชัดเจน โดยความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์จากการตัดแปลงมาจาก EU database of Reference Methods for GMOs (JRC-EURL-GMFF-ENGL,2010) ให้ค่า CP น้อยกว่าชุดที่ 2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชตัดแปลงพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องมาจากโพรบและไพรเมอร์ทั้งสองชุดมีความแตกต่างกันเพียงการติดโพรบตำแหน่ง 5' ด้วย FAM หรือ HEX หรือ Cy5 และติดโพรบที่ตำแหน่ง 3' ด้วย BHQ ทำให้การเรืองแสงสามารถตรวจสอบได้ดีกว่าการติดโพรบด้วย FAM ที่ปลาย 5' และ ติดโพรบ TAMRA ที่ปลาย 3' ที่มีการแผ่รังสีของแสงทั้งสองด้านซึ่งอาจจะซ้อนทับกันทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก (Johansson, 2006) นอกจากนี้ความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่ใช้ในชุดที่ 1 ยังมีปริมาณและความเข้มข้นสุดท้ายที่น้อยกว่า ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจตัวอย่างจำนวนมากต่อปี ดังนั้นจากปัจจัยที่ 1 สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบในชุดที่ 1 เหมาะสมสำหรับนำมาทำปฏิกิริยา

ค่าความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำมาทดสอบปฏิกิริยาในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ไพรเมอร์และโพรบให้ค่า CP ในการตรวจสอบแต่ละยีนแต่ละรูปแบบไม่แตกต่างกันดังตารางที่ 1.5.5 แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการตรวจสอบพบว่ารูปแบบการตรวจสอบแบบ Simplex ใช้เวลานานกว่าเนื่องจาก

ต้องทำแต่ละยีนแยกกัน และตรวจสอบยีนอ้างอิงพีซีด้วย conventional PCR ทำให้ต้องใช้เวลามากขึ้น และมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การตรวจสอบรูปแบบ Triplex ใช้เวลาในการตรวจรวดเร็วกว่าและให้ผลของค่า CP ไม่แตกต่างกันกับการตรวจสอบด้วย Simplex และ Duplex ที่ความเข้มข้นโพรบและไพรเมอร์ชุดเดียวกัน

ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lab Life-Real-Time PCR (2015) ที่กล่าวว่า การตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ Multiplex ดีกว่าการตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ Simplex ในหลายด้านดังต่อไปนี้ ช่วยประหยัดเวลาในการทำงาน สามารถตรวจสอบได้หลายยีนในคราวเดียวกันและใช้สารเคมีเทียบเท่าการทำ Simplex แต่ให้ผลการตรวจสอบหลายยีนต่อ 1 ครั้ง ลดความเสี่ยงที่เกิดจากการปฏิบัติงานหลายครั้ง แต่อย่างไรก็ตามได้กล่าวถึงข้อเสียของการตรวจสอบแบบ Multiplex คือ จำเป็นจะต้องมีการหาความเหมาะสมของไพรเมอร์ หรือโพรบ และองค์ประกอบหรือสภาวะของสารเคมีร่วมกันก่อนที่จะปฏิบัติงานจริง ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานเช่น Alary et al., (2003) ที่เปรียบเทียบการทำ Simplex และ Duplex Real-time PCR เพื่อตรวจ GMO ในข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบ promoter และ terminator ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่าง multiplex กับ Simplex ผลการทดสอบพบว่า การตรวจสอบด้วย multiplex ใช้ระยะเวลาสั้น ประหยัดและเป็นเทคนิคที่แม่นยำ (Debode et al., 2013)

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาต่อดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงต่างๆ ดังต่อไปนี้ Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034 (Positive control), NK603, MIR604 และ MIR162 ที่มีเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ และ ข้าวโพดที่ไม่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรม (Negative control) เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR (ตารางที่ 1.5.6) event ละ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะกับตัวอย่าง Positive control (Mon89034) แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับตัวอย่าง Negative control และสามารถตรวจพบยีน *hmg* ในตัวอย่างที่เป็นข้าวโพดทั้งหมด ทั้งในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นวัสดุอ้างอิงและข้าวโพดที่ไม่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรม และสามารถตรวจพบยีน *CaMV35s promoter* ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงดังต่อไปนี้ Mon810, Bt 11, Bt176, NK603 แต่สำหรับ Mon 810 และ NK603 ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMO ในระดับต่ำ (blank) ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบ NOS terminator ที่ตรวจพบในวัสดุอ้างอิงดังต่อไปนี้ Bt 11, NK603, MIR604 และ MIR162

ตารางที่ 1.5.5 ผลการทดสอบปัจจัยความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชและทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจสอบสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Simplex) เปรียบเทียบกับการทดสอบปฏิกิริยาที่ดัดแปลงตามเอกสารวิชาการในรูปแบบ Duplex PCR (CaMV 35S promoter กับ NOS terminator) และ รูปแบบ triplex (CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene)

ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR														
Plant Event	35SCaMV promoter				F test	NOS terminator				F test	HMG(endogenous)			
	Simplex ชุดที่ 1	Duplex ชุดที่ 1	Triplex ชุดที่ 1	Simplex ชุดที่ 2		Simplex ชุดที่ 1	Duplex ชุดที่ 1	Triplex ชุดที่ 1	Simplex ชุดที่ 2		Simplex ชุดที่ 1	Duplex ชุดที่ 1	Triplex ชุดที่ 1	Simplex ชุดที่ 2
Bt11 GMO5%	30±0.21 b ^{1/}	30±0.31 b ^{1/}	30±0.17 b ^{1/}	33±0.31 a ^{1/}	*	31±0.22 b ^{2/}	31±0.36 b ^{2/}	31±0.34 b ^{2/}	35±0.53 a ^{2/}	*	23±0.08 b ^{3/}	22±0.33 b ^{3/}	22±0.32 b ^{3/}	-
NK603 GMO1%	31±0.41 b ^{1/}	32±0.14 b ^{1/}	32±0.24 b ^{1/}	34±0.27 a ^{1/}	*	32±0.52 b ^{2/}	33±0.33 b ^{2/}	33±0.42 b ^{2/}	36±0.37 a ^{2/}	*	23±0.12 b ^{3/}	23±0.23 b ^{3/}	22±0.35 b ^{3/}	-
Mon-89034 GMO10%	28±0.47 b ^{1/}	28±0.18 b ^{1/}	28±0.28 b ^{1/}	31±0.32 a ^{1/}	*	29±0.26 b ^{2/}	29±0.31 b ^{2/}	30±0.41 b ^{2/}	34±0.39 a ^{2/}	*	22±0.17 b ^{3/}	22±0.13 b ^{3/}	21±0.13 b ^{3/}	-
MIR 604 GMO 1%	ND	ND	ND	ND		30±0.21 b ^{2/}	30±0.39 b ^{2/}	30±0.17 b ^{2/}	36±0.33 a ^{2/}	*	22±0.25 b ^{3/}	22±0.35 b ^{3/}	22±0.09 b ^{3/}	-

1/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนCaMV 35S promoter

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนNOS terminator

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนHMG

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≥0.05)

ND = not detected หรือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 1.5.6 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาต่อดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิง

GM (events)	% GMO Value	ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR		
		35sCaMV promoter	NOS terminator	HMG
Mon810	blank <0.04	ND	ND	27.45±0.09
	0.5%	36.50±0.24	ND	25.51±0.03
	2	33.15±0.35	ND	25.76±0.15
	9.9%	29.88±0.11	ND	25.08±0.15
MON89034	100%	28.04±0.32	27.90±0.74	27.68±0.26
NK603	blank <0.04	ND	ND	28.77±0.11
	0.1%	38.72±0.27	39.12±0.17	28.80±0.07
	0.5%	37.29±0.15	38.11±0.42	32.03±0.17
	1.0%	35.36±0.11	36.21±0.10	30.92±0.09
	2%	34.55±0.24	35.41±0.24	28.51±0.09
	10%	30.88±0.56	32.74±0.60	29.63±0.14
MIR162	100	ND	28.36±0.13	29.35±0.09
Bt11	4.89	30.36±0.17	30.21±0.17	26.06±0.07
Bt 176	5.00	35.02±0.17	ND	29.56±0.16
MIR604	<0.09	ND	30.36±0.17	27.43±0.41
	0.98	ND	30.36±0.17	27.93±0.02
	9.85	ND	30.36±0.17	29.63±0.14
RR	0.1%	30.78±0.44	30.54±0.59	ND
	10%	38.56±0.15	39.11±0.13	ND
nonGM corn	-			25.36±0.03

ND = not detected หรือ ตรวจไม่พบ

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

สกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event MON 89034 ที่มีอัตราเจือปนร้อยละ 100 และ event Bt11 ที่มีอัตราเจือปนร้อยละ 5 จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้มิให้มีการปนเปื้อนของการตัดแปรพันธุกรรม 5 ระดับได้แก่ event MON 89034 : 10% 1% 0.1% และ 0.01% ตามลำดับและ event Bt11: 0.5% 0.05% 0.005% และ 0.0005% ลำดับการเจือจางละ 12 ซ้ำ ให้มีจำนวน copies no. ของยีนที่ได้รับการตัดแปรพันธุกรรมมาตรฐานเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิงของพืชดังตารางที่ 1.5.7 โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ (Federal office of consumer protection and food safety, 2016) ดังต่อไปนี้

$$\text{Number of genome equivalents per } \mu\text{l} = \frac{\text{DNA - concentration [ng/}\mu\text{l]} \times 1000}{\text{haploid genome mass [pg]}}$$

สำหรับดีเอ็นเอของข้าวโพดมีค่า haploid genome mass เท่ากับ 2.6 พิโคกรัม (Federal office of consumer protection and food safety, 2016; Arumuganathan and Earle, 1991) และจากการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จึงสามารถสรุปได้ว่า 100 ng มีจีโนมของยีนอ้างอิงพืช 36,697 copies และหากตัวอย่างดีเอ็นเอพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเจือปนยีนตัดแปลงพันธุกรรมร้อยละ 10 จะมียีนที่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรม 3,669 copies ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างตั้งต้น 100 นาโนกรัมแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำจะได้ค่าดีเอ็นเออ้างอิงและดีเอ็นเอที่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 1.5.7 แสดงค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและจำนวน copies ของยีนตัดแปลงพันธุกรรมและยีนดั้งเดิมในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 และ Bt11

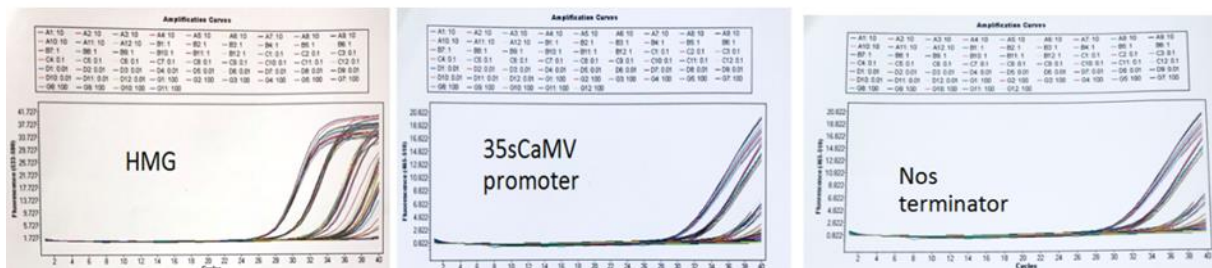
Plant Event	% GMO level	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ ต่อ 1 reaction (ng)	Reference Copies ในจีโนมข้าวโพด	Target Copies ในจีโนมข้าวโพด
MON 89034	100	100	36,697	36,697
	10	10	3,669	369.7
	1	1	369.7	36.97
	0.1	0.1	36.97	3.697
	0.01	0.01	3.69	0.369
Bt11	5	100	36,697	1,835
	0.5	10	3,669	183.5
	0.05	1	369.7	18.35
	0.005	0.1	36.9	1.835
	0.0005	0.01	3.69	0.1835

สำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน CaMV 35s promoter และ NOS terminator ที่จำเพาะต่อการตัดแปลงพันธุกรรมในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 เทียบกับยีนอ้างอิงของพืช (*hmg*) โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในการทดสอบครั้งเดียวกันนำค่า CP และ log ของ dilution factor มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำค่า CP (crossing point) กับค่า log ของ dilution factor เป็นกราฟมาตรฐาน ผลการทดสอบ ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน 35s CaMV promoter NOS terminator และ *hmg* (reference gene) เฉลี่ย -3.12 -3.104 และ -3.13 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ -3.1 ถึง -3.6 และมี PCR efficiency ของปฏิกิริยาเท่ากับ 109.04 116.17 และ 108.14 ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity R² เท่ากับ 0.99 ทั้งสามยีน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.01 ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน 35s CaMV promoter และ NOS terminator ที่จำเพาะต่อการตัดแปลงพันธุกรรมในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event Bt11 เทียบกับยีนอ้างอิงของพืช (*hmg*) ที่ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน 35s CaMV promoter NOS terminator และ *hmg* (reference gene) เฉลี่ย -3.26 -3.102 และ -3.25 ซึ่งอยู่ใน

เกณฑ์มาตรฐาน คือ -3.1 ถึง -3.6 และมี PCR efficiency ของปฏิกิริยา 102.65 115.60 และ 103.09 ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity (R^2) เท่ากับ 0.99 ทั้งสามยีน (ตารางที่ 1.5.8 และ ภาพที่ 1.5.2) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.0005

ตารางที่ 1.5.8 การตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene

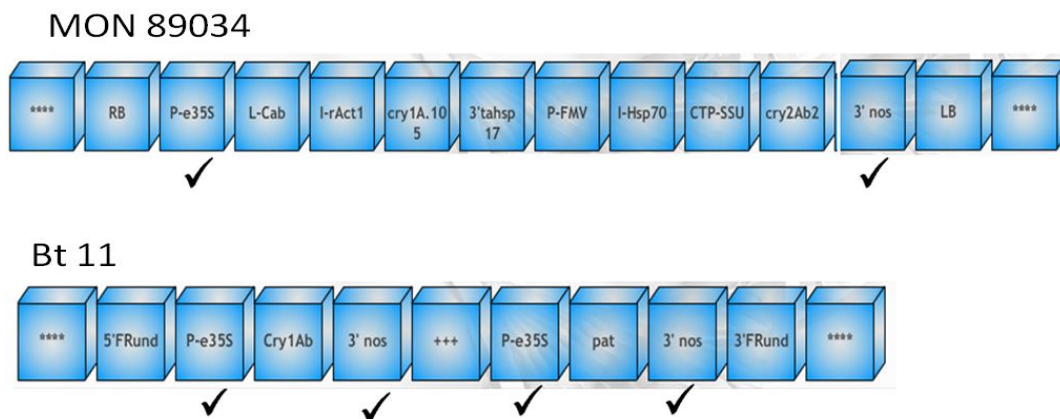
Plant Event	%	Target Copies No.	ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR		
			CaMV 35S promoter	NOS terminator	HMG
MON 89034	100%	36,697	28.94±0.30	29.11±0.29	26.10±0.14
	10%	369.7	30.60±0.46	30.90±0.49	27.96±0.33
	1%	36.97	34.19±0.51	34.54±0.62	31.28±0.43
	0.1%	3.697	36.80±0.93	36.76±0.57	34.24±0.70
	0.01%	0.369	38.92±0.97	39.12±0.97	36.28±0.26
PCR efficiency (%)			109.04	116.17	108.14
Slope			-3.12	-3.104	-3.13
Bt 11	5%	1,835	31.38±0.45	31.51±0.30	28.23±0.42
	0.5%	183.5	34.42±0.28	34.54±0.83	31.48±0.35
	0.05%	18.35	35.70±0.71	35.90±0.57	33.37±0.42
	0.005%	1.835	36.44±0.54	36.44±0.28	34.55±0.88
	0.0005%	0.1835	37.54±0.34	37.66±0.46	34.67±0.35
PCR efficiency (%)			102.65	115.60	103.09
Slope			-3.26	-3.102	-3.25



ภาพที่ 1.5.2 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON89034 ที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

ทั้งนี้ จะเห็นได้ว่า ค่า LOD ของ MON89034 สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.01 ส่วนค่า LOD ของ Bt 11 สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.0005 ซึ่งอาจเกิดจากชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON89034 มี CaMV 35s promoter และ NOS terminator เพียง 1 ชุดเท่านั้น แต่ในขณะที่

ที่ ชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt 11 มี *CaMV 35S* promoter และ NOS terminator ถึง 2 ชุด ซึ่งทำให้เราสามารถได้ค่า LOD ของ Bt11 ถึง 0.0005% ดังภาพที่ 1.2.3 นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนระหว่างยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปกับยีนที่ต้องการตรวจสอบของ MON89034 น้อยกว่า Bt11 ซึ่งผลต่อค่า LOD ของแต่ละ event ด้วย



ภาพที่ 1.5.3 แสดงชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 และ Bt11 ที่มา: ISAAA: GMapproval and CBD Biosafety Clearing House

สำหรับการทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยการเตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON 89034 และ NK 603 จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีการปนเปื้อน 1% และมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ 50 100 150 200 ng จากนั้นทำปฏิกิริยา Real-time PCR ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

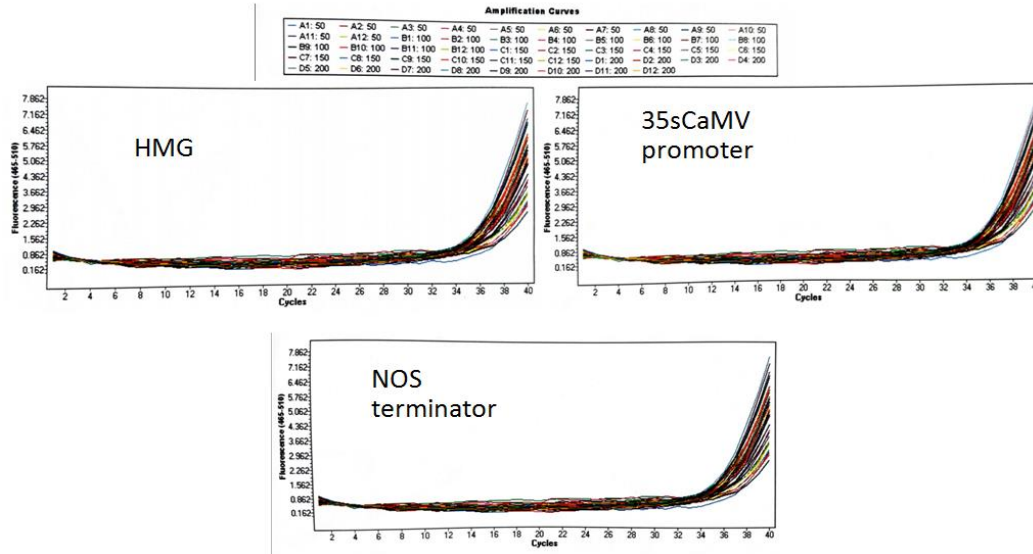
ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON 89034 ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต่างกันส่งผลให้ได้ค่า CP ที่แตกต่างกันในทุกๆ ยีน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 ng ให้ค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน *CaMV 35s* promoter เท่ากับ 36.88 ± 0.54 และยีน NOS terminator เท่ากับ 37.00 ± 0.49 ซึ่งมีความมากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน *CaMV 35s* promoter เท่ากับ 35.54 ± 0.54 และยีน NOS terminator เท่ากับ 35.32 ± 0.37 ซึ่งสอดคล้องกับดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK 603 ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 ng ให้ค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน *CaMV 35s* promoter เท่ากับ 34.81 ± 0.33 และยีน NOS terminator เท่ากับ 38.00 ± 0.32 ซึ่งมีความมากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน *CaMV 35s* promoter เท่ากับ 33.54 ± 0.25 และยีน NOS terminator เท่ากับ 36.32 ± 0.15 นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้ค่า CP ของยีน *hmg* ซึ่งเป็น endogenous gene ไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Realtime PCR คือ 100 ng (ตารางที่ 1.5.9 และ ภาพที่ 1.5.4) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cankar et al (2006) และ Turkec et al (2016) ที่กล่าวว่า การสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ Real-time PCR โดยค่า CP จะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอความเข้มข้นน้อยจะมีได้ค่า CP ที่สูงและในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาสูงจะทำให้ค่า CP ที่ต่ำ

แต่ในทางกลับกัน Ellison et al. (2006) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาใน Real-time PCR แต่ copy number ในดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้น ถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยแต่ถ้ามี copy number ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบในระดับตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไปก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยา real-time PCR ได้ตามทฤษฎี

ตารางที่ 1.5.9 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

EVENT	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ng ต่อ ปฏิกิริยา)	ค่า CP จากการตรวจสอบยีน		
		35sCaMV promoter	NOS terminator	<i>hmg</i>
MON89034 GMO 1%	50	36.88±0.54a	37.00±0.49a	36.45±0.64
	100	35.60±0.34b	35.67±0.34b	35.13±0.42
	150	35.54±0.40b	35.62±0.40b	35.23±0.38
	200	35.09±0.21b	35.14±0.24b	34.77±0.20
F-test	-	*	*	ns
NK603 GMO 1%	50	34.81±0.33	38.00±0.32a	35.85±0.51
	100	33.60±0.66	36.42±0.41b	35.43±0.36
	150	33.59±0.32	36.32±0.50b	35.13±0.23
	200	33.72±0.53	35.59±0.44b	34.65±0.20
F-test	-	*	*	ns



ภาพที่ 1.5.4 แสดงผลปฏิกิริยาที่ได้จากการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

5. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วยTriplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดต่างๆ 17 ตัวอย่าง และมะละกออีก 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้น 100 ng จากนั้นนำมาตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene ด้วยการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ ผลการทดลองพบว่า ทุกๆ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตรวจด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ให้ผลการตรวจสอบเหมือนกับที่ตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex ซึ่งเป็นการยืนยันเทคนิค Multiplex Real-time PCR ว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมและสามารถใช้ในการตรวจสอบพืชและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 1.5.10 ผลการตรวจสอบตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

พืช	รหัสตัวอย่าง ทดสอบ	ผลการตรวจ Multiplex Real-time PCR			ผลการตรวจ ของห้องปฏิบัติการ	
		35S CaMV	NOS	HMG	35S CaMV	NOS
ข้าวโพด	1895/1	+	-	+	+	-
	1895/2	+	-	+	+	-
	1895/3	+	+	+	+	+
	1895/4	+	+	+	+	+
	1895/5	+	+	+	+	+
	1895/6	+	+	+	+	+
	1895/7	+	-	+	+	-
	1895/8	+	-	+	+	-
	1895/9	+	+	+	+	+
	1895/10	+	-	+	+	-
	1895/11	+	-	+	+	-
	1895/12	+	-	+	+	-
	1895/13	+	-	+	+	-
	1895/14	+	-	+	+	-
	1895/15	+	-	+	+	-
	1895/16	+	+	+	+	+
	1895/17	+	+	+	+	+
มะละกอ	1960	+	+	-	+	+
	4910	+	+	-	+	+
	4911	+	+	-	+	+
	3771	-	-	-	-	-
	3775	-	-	-	-	-
	3820	-	-	-	-	-
	3822	-	-	-	-	-
	3830	-	-	-	-	-
	V1586	+	+	-	+	+
	V1589	+	+	-	+	+
	V1601	+	+	-	+	+
	V1594	+	+	-	+	+
	Positive papaya	+	+	-	+	+
	Positive control	NK603	+	+	+	+
Negative control	น้ำกลั่น	-	-	-	-	-

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

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดสอบค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดได้จากการทดลองการตรวจคัดกรองข้าวโพดตัดแปร พันธุกรรมด้วยวิธี multiplex real-time PCR แบบ triplex โดยตรวจยีน CaMV35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงพืช *hmg* ในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์ที่ยอมรับได้ดังนี้ ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50-200 นาโนกรัม มีความจำเพาะในการตรวจยีนโดยไม่พบ false positive/negative ขีดจำกัดการตรวจ (LOD) ที่ 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ PCR efficiency 102-115 เปอร์เซ็นต์ (ค่าที่ยอมรับของวิธี multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์ Linearity (R^2) 0.998 ± 0.001 (ค่าที่ยอมรับ $R^2 \geq 0.98$) และค่า Slope -3.1 ถึง -3.26 (ค่าที่ยอมรับ -3.1 ถึง -3.6) ดังนั้นวิธีการตรวจคัดกรองแบบ multiplex (triplex) Real-time PCR โดยตรวจยีนคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม CaMV35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงข้าวโพด *hmg* ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดในเชิงคุณภาพได้

Parameter	Simplex	Multiplex	Acceptance parameter
Applicability	+ Matrix: Tissue and product DNA amount: 50-200 ng	+ Matrix: Tissue and product DNA amount: 50-200 ng	-Difference matrix : tissue and product -Difference DNA amount 50-200 ng
Practicability	+ Equal with Multiplex Real-time PCR technique	+ Equal or better than Simplex Real-time PCR technique	Compare with other method
Specificity	+ No false positive and negative	+ No false positive and negative	No false positive and negative
Sensitivity (LOD)	+ (0.001-0.01%)	+ (0.001-0.01%)	0.001-0.01% for fresh tissue or CRM 0.01-0.1% for product :
PCR efficiency	+ 90-110%	+ 102-115%	90-110% for simplex 80-120% for multiplex
Linearity (R^2)	+ 0.99	+ 0.998 ± 0.001	$R^2 \geq 0.98$
Slope	+ -3.1 to -3.6	+ -3.1 to -3.25	-3.1 to -3.6
Robustness	+ Correct positive /negative classification	+ Correct positive /negative classification	Correct positive /negative classification
+ : parameter to be evaluated LOD: Limit of Detection			

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-จัดทำเอกสารวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม โดยการตรวจวิเคราะห์ยีน *CaMV 35S promoter* NOS terminator และ endogenous gene (*HMG*) ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

-ขยายผลการใช้ประโยชน์งานวิจัย โดยอบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้กับเจ้าหน้าที่ทดสอบ ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชตัดแปรพันธุกรรม และขยายขอบข่ายการทดสอบ เข้าสู่ระบบ ISO/IEC17025:2005

เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2543. ความพร้อมและหลักการตรวจสอบพืชที่ได้รับการตัดแต่งสารพันธุกรรมของห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร. หน้า 21-26. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Alary, R., A. Serin, D. Maury and P. Joudrier. 2003. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. *Food control*. 13:235-244.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol Rep* 9: 208-218
- Broeders, S., I, Huber, L. Grohamann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens and D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology* 37:115-126.
- Cankar, K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of GMO. *BMC Biotechnology*. 15pp.
- Cottent, G., C. Blancpain, V. Sonnard and P. F. Chuah. 2013. Development and validation of multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*. 405:6831-6844.
- Debode, F., E. Janssen and G. Berben. 2013. Development of 10 new screening PCR assays for Gmo detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminator (t35S, tE9, tOCS, tg7). *Eur Food Res Technol*. 236:659-669.
- Ellison, S.LR., C. A. English, M. J. Burns and J. T. Keer. 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*. 11 pp.

- Federal office of consumer protection and food safety. 2016. Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods.15pp.
- Fraiture, M-A., P. Herman, I. Taverniers, M. DeLoose, D. Deforce and N. H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International 22pp.
- Huber, I., A. Block, D. Sebah and et al.2013. Development and validation of duplex, triplex and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. Journal of Agricultural and food chemistry. 61:10293-1301.
- ISAAA 2016. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.
- ISO 21571. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-Nucleic acid extraction. International Organization for Standardization.44 pp.
- ISO 24276. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-General Requirement and definition. International Organization for Standardization.44 pp.
- Johansson M.K. (2006) Choosing Reporter-Quencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers. In: Didenko V.V. (eds) Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Methods in Molecular Biology™, vol 335. Humana Press
- JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011. JRC- Compendium of reference methods for GMO analysis. Luxembourg: Publication office of the European Union. 259 p. (http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/22754/1/gmo-jrc_reference%20report_2011_publ.pdf)
- Lab Life-Real-Time PCR. 2015. Compare and contrast: multiplex vs. singleplex PCR. Roche Life Science. Posted on September 19,2015.https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html

- Madic, J., C. Peytavin de Garam, N. Vingadassalon, E. Oswald, P. Fach, E. Jamet and F. Auvray. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic EHEC serotype O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:JH28 and O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 109(5):1696-1705.
- Mayer M. 1999. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food. *Food Control*. 10 :391-399.
- Mazzara M., Savini C., Munaro B., Foti N. and Van Den E.G. 2007. Event-specific method for the quantification of maize line MIR604 using Real-time PCR-Validation report and protocol-maize seeds sampling and DNA extraction. EUR 22913 EN. Luxembourg: OPOCE. *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.
- Peng, C., P. Wang, X. Xu, X. Wang, W. Wei, X. Chen and J. Xu. 2016. Development of qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *Springer Plus*. 5:889.
- Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chemical Review* 98:1045-1056.
- Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 5:69-76.
- Savini C., Bogni A., Grazioli E., Munaro B., Mazzara M. and Van Den E.G. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 89034 using Real-time PCR. EUR23700 EN. Luxembourg: OPOCE, *In* Compendium of reference methods for GMO analysis 2010
- Waiblinger, H. U., B. Ernst, A. Anderson and K. Pietsch. 2008. Validation and collaborative study of a P35S and T nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organism in food product. *Eur Food Res Technol*. 226:1221-1228.
- Turkec, A., H. Kazan, B. Karacanli and S. J. Lucas. 2015. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modified organism (GMOs) in maize food and feed products. *J Food Sci Technol*. 52(8): 5164-5171.

กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรัมวิทยา

ประกอบด้วย 1 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

หัวหน้าการทดลองที่ 2.1 นายธีระ ชูแก้ว

สังกัด สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

ผู้ร่วมงาน นางชนิษฐา วงศ์วัฒนรัตน์

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายพงศกร สรรค์วิทยากุล

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัด
แปรพันธุกรรม

Development of ELISA Test Kit on the Commercial Scale for the Detection of CP4EPSPS
Protein in Genetically Modified Soybean

นายธีระ ชูแก้ว^{1/}

นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์

นายพงศกร สรรค์วิทยากุล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองสายพันธุ์ GTS 40-3-2 ได้รับการตัดต่อยีน CP4EPSPS ทำให้สามารถต้านทานไกลโฟเสทซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช 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 ผลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ได้ในระดับต่ำสุด 1 ไมโครกรัม เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่เกิดขึ้น IgG-CP4EPSPS-HRP มีความเข้มของสีที่สังเกตได้ด้วยสายตามากกว่า IgG-CP4EPSPS-ALP การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน CP4EPSPS พบว่า ใช้อัตราส่วนเมล็ดถั่วเหลืองต่อ 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 มีความถูกต้อง ร้อยละ 70 ผลการทดลองดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ โดยสามารถตรวจได้ 48 ตัวอย่างต่อ 1 ไมโครเพลท (จำนวน 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับวิธี Real-time PCR โดยใช้ตัวอย่างใบและเมล็ดถั่วเหลืองที่สุ่มจากห้องปฏิบัติการและจากแปลงปลูกของเกษตรกรจำนวน 143 ตัวอย่างพบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ มีความถูกต้องร้อยละ 90

^{1/} สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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.

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่ประเทศไทยประสบปัญหาการผลิตเพื่อใช้ภายในประเทศไม่เพียงพอ รัฐบาลจึงอนุญาตให้นำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศ (ขนิษฐาและคณะ, 2553) ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร ปี 2550 มีปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง 1.54 ล้านตัน มูลค่า 19 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2559 พบว่า ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง 2.95 ล้านตัน มูลค่า 43 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งมีแนวโน้มการนำเข้าเพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) การนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศประมาณร้อยละ 80 มาจากสหรัฐอเมริกาและประเทศในแถบอเมริกาใต้ ซึ่งถั่วเหลืองจากประเทศดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม (ขนิษฐาและคณะ, 2548) โดยเป็นถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ GST 40-3-2 เพื่อให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทหรือเรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ มีการตัดต่อยีน *CP4EPSPS* เข้าไปทำให้ถั่วเหลืองสามารถสร้างเอนไซม์ EPSPS ได้ในปริมาณมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ EPSPS ที่สร้างมาจากยีน *CP4EPSPS* นี้เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ทำให้ถั่วเหลือง ตัดแปรพันธุกรรมสามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทได้ (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 ต้องหาแนวทางป้องกันเพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อส่งออกโดยรวมในอนาคต

การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมนิยมตรวจหาอินที่ตัดต่อเข้าไปโดยใช้วิธี PCR หรือ Real-time PCR ห้องปฏิบัติการหลายแห่งใช้วิธีนี้เป็นมาตรฐานในการให้บริการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าดัดแปรพันธุกรรม (Broeders *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามวิธี PCR ไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์กรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากใช้เวลานาน 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 บาท ต่อกล่อง (1 กล่องมี 4 ชุด) ซึ่งการพัฒนาชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมใช้ภายในประเทศ เป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบ ลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างนำเข้าโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการเกษตรใช้ตรวจติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายในแปลง นอกจากนี้เกษตรกรสามารถใช้ตรวจคัดกรองเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกแปลงได้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้านทานสารกำจัดวัชพืช ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์จึงต้องดำเนินการศึกษา เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมหรือการพัฒนาเป็นนวัตกรรมเทคโนโลยีการตรวจพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ และเพื่อให้การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมมีประสิทธิภาพสำหรับการกำกับดูแลสินค้าเกษตรของไทย

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. เครื่องเจลอเล็กโทรโฟรีซิส
5. เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation) (Bio-Rad)
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ
7. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีน
8. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR
9. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจวิเคราะห์ด้วย ELISA
10. ตัวอย่างไบและเมล็ดถั่วเหลือง
11. ไพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Prologo, Singapore)

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณ การทำบริสุทธิ์ การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน CP4EPSPS

การทดลองนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยเรื่อง การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ (ชนิษฐาและคณะ, 2558) โดยโปรตีน CP4EPSPS ได้จากการโคลนยีน CP4EPSPS จากถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม 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 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ในหลอด เรียกว่า Wash I และชะ

คอลัมน์ (Elute) ด้วย Elution buffer D (pH 5.9) ที่เติม Triton X 100 ให้มีความเข้มข้น 1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรแล้วทำการชะ (Elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ ออกด้วย 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 ตรวจสอบปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธีการ Dialysis ในสารละลาย 1XPBS pH 7.4 ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ผ่านการทำบริสุทธ์อีกครั้งโดยชุดตรวจสอบปริมาณโปรตีน 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 นาโนเมตรที่ ระยะเวลา 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 นั้น นำ 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. การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

การศึกษาชนิดสารละลายบัฟเฟอร์และอัตราส่วนตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลือง ใช้เมล็ดถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก โดยนำเมล็ด ถั่วเหลืองดังกล่าวมาบดให้เป็นผงละเอียดและชั่งน้ำหนัก 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 โดยใช้ระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 15, 30, 45, 60, 120 นาที ทดสอบผลโดยการนำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นตกตะกอน 5,000 รอบต่อ นาที 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) = $\frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง} + \text{ผลลบปลอม}} \times 100$

- ค่าความจำเพาะ (Specificity) = $\frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง} + \text{ผลบวกปลอม}} \times 100$

- ค่าความถูกต้องของชุดทดสอบ (Accuracy) = $\frac{\text{จำนวนตัวอย่างชุดทดสอบที่ให้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด}}$

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 จากนั้นนำไปปั่นใน 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% Isopropanol ที่แช่เย็นไว้ ปริมาตร 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่า Ethanol ระเหยไปจนหมด เติมน้ำกลั่นหนึ่งขวด ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 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 ออกจน

หมด นำ Minicolumn ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น (อุ่น) นิ่งฆ่าเชื้อ ลง ใน Minicolumn จำนวน 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn

5.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดและผ่านการทำ บริสุทธิ์ดีเอ็นเอ มาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง UV Spectrophotometer คำนวณค่าความ เข้มข้นของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี PCR และวิธี Real-time PCR

5.4 การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี PCR

การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ใช้คู่มือ EPSPS1 และ EPSPS2 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2.1.1 (Bonfini *et al.*, 2007) ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนผสม 1 หลอดดังแสดงในตารางที่ 2.1.2 นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง (Positive control) ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ ดีเอ็น เอของมะละกอ (Negative control) และใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแทนสารละลายดีเอ็นเอ (Non template control) หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีรอบการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1.3 แล้วตรวจสอบ คุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิลีกโทรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและ วิเคราะห์ภาพเจล

ตารางที่ 2.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่มือและโพรบสำหรับตรวจสอบยีน CP4EPSPS

ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (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 2.1.2 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการทำ PCR ของคู่มือ 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 2.1.3 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ EPSPS1 และ EPSPS2

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

5.5 การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ไพรเมอร์และโพรบดังตารางที่ 2.1.1 (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 เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโพรบด้วยเครื่อง qTower 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมคือ เริ่มด้วยการกระตุ้นปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 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 ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาขึ้นเป็นการพัฒนาจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ ชนิดแอนติบอดีต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS เปรียบเทียบกับ IgG-CP4EPSPS ทางการค้า อัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS และข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ ELISA ซึ่งข้อมูลดังกล่าวก็นำมาจัดทำเป็นคู่มือการใช้งาน (Protocol) เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่มีความง่ายต่อการใช้งานและรวดเร็ว

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจากตลาดและห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างใบถั่วเหลืองสุ่มจากแปลงปลูกของเกษตรกร จากนั้นตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาได้เปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR และวิธี Real-time PCR โดยหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (มาศวลัย และคณะ, 2556)

8. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

นำชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ไปถ่ายทอดองค์ความรู้กับนักวิชาการของกรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก และประเมินผลการถ่ายทอดเทคโนโลยี

เวลาและสถานที่

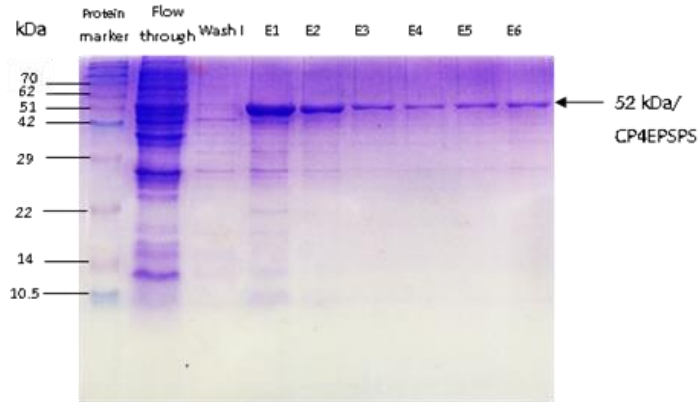
ระยะเวลา: เดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2560

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

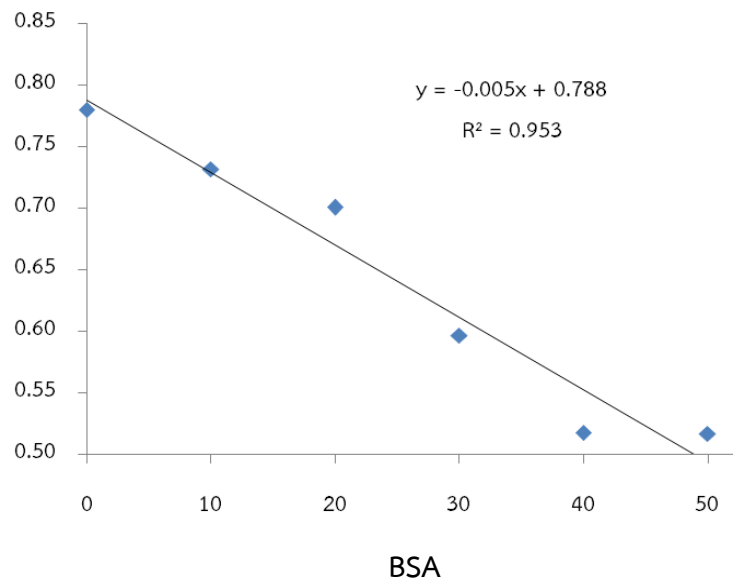
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเพิ่มปริมาณ การทำบริสุทธิ์ การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน CP4EPSPS

การทำบริสุทธิ์โปรตีน CP4EPSPS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในระบบเซลล์แบคทีเรีย แล้วตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีน CP4EPSPS มีขนาด 52 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 2.1.1) เมื่อตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน โดยเตรียมสารละลาย BSA มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครกรัม แล้วอ่านผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เมื่อนำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรมาสร้างกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรงพบว่า ได้สมการเส้นตรง $y = -0.0059x + 0.788$ (ภาพที่ 2.1.2) โดยโปรตีน CP4EPSPS มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7428 เมื่อนำมาคำนวณปริมาณความเข้มข้นโดยการแทนค่าในสมการจะได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 10.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 2.1.1 แสดงแถบโปรตีนขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลือง ดัดแปรพันธุกรรมซึ่งพบในส่วน Flow through, Wash I และ E1-E6 ตามลำดับ โดยทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

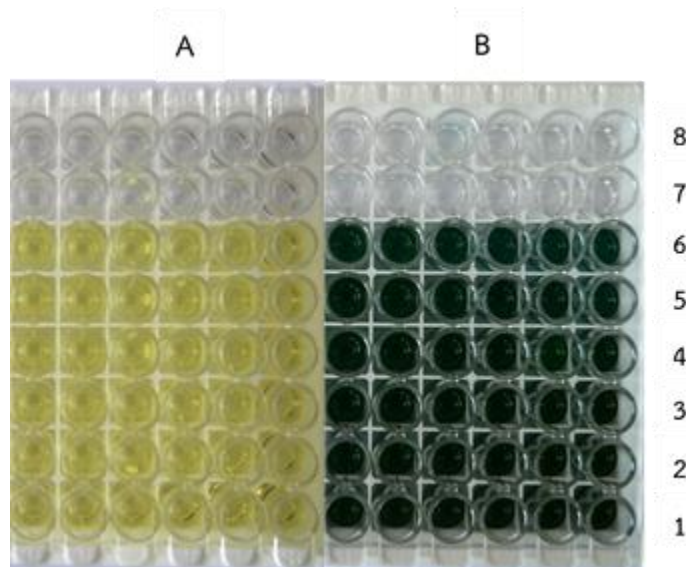


ภาพที่ 2.1.2 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS โดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐาน (BSA) 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครกรัม

2. การศึกษาชนิดแอนติบอดีต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ

การศึกษาชนิดแอนติบอดีต่อการตรวจหาโปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับต่างๆ ใช้แอนติบอดี 2 ชนิดคือ ALP และ HRP และใช้โปรตีน CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5 ไมโครกรัม ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร พบว่า แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นและสามารถตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ได้ในระดับต่ำสุดคือ 1 ไมโครกรัม นอกจากนี้การตรวจสอบที่ได้ไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลบวก (Fault Positive) กับตัวอย่าง Extraction buffer, Negative control และไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลลบปลอม (Fault Negative) กับตัวอย่าง Positive control (ภาพที่ 2.1.3) สำหรับการคัดเลือกชนิดของแอนติบอดีที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปนั้นนอกจากจะให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแล้ว ยังต้องให้ผลการตรวจสอบที่

ชัดเจนสามารถอ่านผลการตรวจสอบด้วยสายตาได้ เพื่อที่จะประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ HRP ให้สีจากการทำปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ ALP ซึ่งสะดวกแก่ผู้นำชุดตรวจสอบ ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบหาโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากสามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ด้วยสายตาภายในระยะเวลา 30 นาที ซึ่งสะดวกแก่ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง

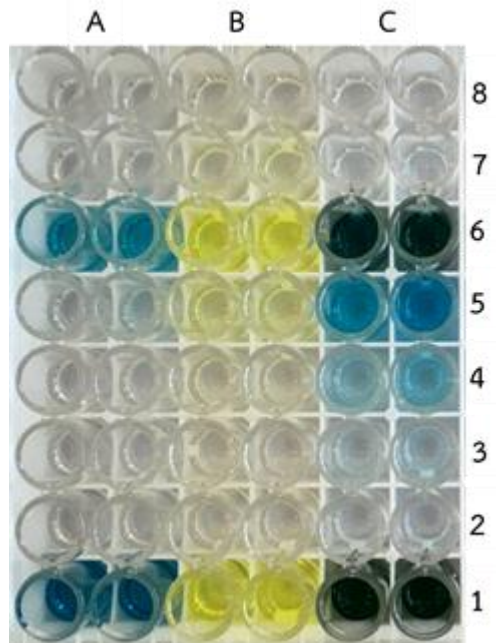


ภาพที่ 2.1.3 แสดงประสิทธิภาพการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ต่อเอนไซม์ Alkaline phosphatase (A) และ Horseradish peroxidase (B) ที่ความเข้มข้นโปรตีนระดับต่างๆ โดยแถวที่ 1 Positive control, แถวที่ 2 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 1 ไมโครกรัม, แถวที่ 3 ความเข้มข้นโปรตีน CP4EPSPS 2 ไมโครกรัม, แถวที่ 4 ความเข้มข้นโปรตีน 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 ในตัวอย่างถั่วเหลืองและสามารถตรวจพบตัวอย่างถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมจำนวน 3 ตัวอย่างจากถั่วเหลืองทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ในขณะที่ IgG-CP4EPSPS ทางการค้าตรวจพบถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม 1 ตัวอย่างจากถั่วเหลืองทั้งหมด 5 ตัวอย่าง และผลการตรวจสอบที่ได้ไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลบวกปลอม (Fault Positive) กับตัวอย่าง Extraction buffer, Negative control และไม่พบผลการทดสอบลวงชนิดผลลบปลอม (Fault Negative) กับตัวอย่าง Positive control (ภาพที่ 2.1.4) เมื่อศึกษาความถูกต้องในการทดสอบประสิทธิภาพและความใช้ได้ของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ต่อการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

โดยเปรียบเทียบผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่า การตรวจสอบด้วยวิธี PCR ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไปในทิศทางเดียวกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยวิธี PCR สามารถตรวจพบแก้วเหลืองตัดแปรรูปจำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งประสิทธิภาพในการตรวจสอบคิดเป็นความถูกต้องร้อยละ 87.5 ซึ่งผลการพัฒนาการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ด้วยเทคนิค ELISA แสดงให้เห็นว่า IgG-CP4EPSPS-ALP และ IgG-CP4EPSPS-HRP ที่ใช้ในการศึกษามีประสิทธิภาพในการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในตัวอย่างแก้วเหลืองตัดแปรรูป ดังนั้นจึงคัดเลือก IgG-CP4EPSPS-HRP ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์เนื่องจากการทดสอบด้วยสายตาในผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่า IgG-CP4EPSPS-ALP



ภาพที่ 2.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของการติดฉลาก IgG-CP4EPSPS ระหว่าง IgG-CP4EPSPS ทางการค้า (A), IgG-CP4EPSPS-ALP (B) และ IgG-CP4EPSPS-HRP (C) ต่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในตัวอย่างแก้วเหลือง 5 ตัวอย่าง (แถวที่ 1-5), แถวที่ 6 Positive control, แถวที่ 7 Negative control และแถวที่ 8 Extraction buffer

4. การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS

การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในแก้วเหลือง โดยนำเมล็ดแก้วเหลืองมาบดให้เป็นผงและชั่งน้ำหนัก 1 และ 0.1 กรัม ทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิดคือ 1XPBS และ Extraction buffer พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิดและอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อการตรวจสอบหาโปรตีน CP4EPSPS ของแก้วเหลืองตัดแปรรูป โดยการใช้เมล็ดแก้วเหลืองที่บดละเอียดจำนวน 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 2.1.4) สำหรับการอ่านผลการตรวจสอบด้วยสายตาพบว่า หลังจากเติมสับสเตรท TMB แล้วสามารถอ่านและวิเคราะห์ผลได้ด้วยสายตาที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาภายในระยะเวลา 30 นาที

ตารางที่ 2.1.4 การศึกษาอัตราส่วนตัวอย่างต่อชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ

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 ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี 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 2.1.5) นอกจากนี้พบว่าถั่วเหลือง 14 ตัวอย่างให้ผลการตรวจที่เหมือนกันระหว่างการตรวจสอบด้วย ELISA (วิเคราะห์ด้วยสายตา) และวิธี Real-time PCR โดยคิดเป็นค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 83 ค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 50 และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (Accuracy) ร้อยละ 70

ตารางที่ 2.1.5 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA เปรียบเทียบกับวิธี PCR และ Real-time PCR สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

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 ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม ตัด

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-CP4EPS-SPS-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

สารละลายที่ต้องเตรียมเบื้องต้น

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-CP4EPS-SPS-HRP)

เจือจาง Antibody ในสารละลาย Blocking solution โดยใช้อัตราส่วน 1:200

ขั้นตอนการตรวจสอบ (ภาพที่ 2.1.6)

1. เตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยบดตัวอย่างแก้วเหลือง (ใบหรือเมล็ด) ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลาย Extraction buffer 1 และ สารละลาย Extraction buffer 2 คือ 1:9:1 โดยบดตัวอย่างกับสารละลาย Extraction buffer 1 จากนั้นเติมสารละลาย Extraction buffer 2 สำหรับตัวอย่างเมล็ดแก้วเหลืองให้เขย่าสารละลายที่ได้เพิ่มอีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
2. เติมตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในไมโครเพลทปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้ตัวอย่าง Positive control และ Negative control ปริมาณ 200 ไมโครลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่างทดสอบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 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 และหยุดปฏิกิริยา โดยเติมสารละลาย Stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

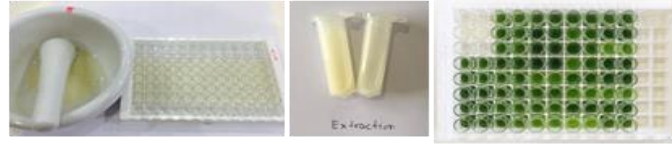
การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบ

วิเคราะห์ผลการตรวจสอบโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (กำหนดค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของ Negative control ให้ผลการทดสอบเป็นบวก) หรือสามารถวิเคราะห์ผลการ

ตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นระหว่าง Negative control, Positive control, และตัวอย่างทดสอบ ถ้าตัวอย่างที่ตรวจสอบให้ผลเป็นสีฟ้าเช่นเดียวกับ Positive control ผลการทดสอบคือบวก (เป็นตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม) และถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้ผลไม่มีสีเช่นเดียวกับ Negative control ผลการทดสอบคือลบ (ไม่มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม) โดยการตรวจสอบตามวิธีการดังกล่าวใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.1.5 ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม



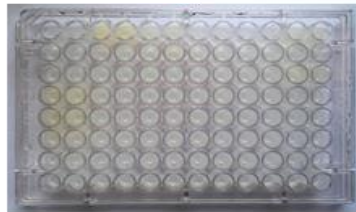
การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง (ใบและเมล็ดพันธุ์)

ล้างด้วย Washing solution 3 ครั้ง



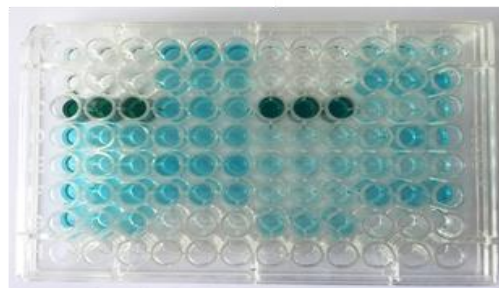
เติม Blocking solution

ล้างด้วย Washing solution 3 ครั้ง



เติม IgG-CP4EPS-SPS-HRP

ล้างด้วย Washing solution 3 ครั้ง



เติมสารละลาย Substrate และหยุดปฏิกิริยา อ่านผลการตรวจสอบเปรียบเทียบกับ Negative และ Positive

ภาพที่ 2.1.6 แสดงขั้นตอนการตรวจสอบถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPS-SPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPS-SPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมกับวิธี PCR และ วิธี Real-time PCR ใช้ตัวอย่าง 143 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรม 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 2.1.6) นอกจากนี้พบว่าถั่วเหลือง 130 ตัวอย่างให้ผลการตรวจที่เหมือนกันระหว่างการตรวจสอบด้วย ELISA (วิเคราะห์ด้วยสายตา) และวิธี Real-time PCR โดยคิดเป็นค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 74 ค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 94 และค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบ (Accuracy) ร้อยละ 90

ตารางที่ 2.1.6 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA เปรียบเทียบกับวิธี PCR และ วิธี 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	-
22	6026	√		-	-	0.250	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง (O.D. ₆₅₀)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
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	-
53	V3141		√	-	-	0.128	-
54	V3142		√	-	-	0.116	-
55	V3143		√	-	-	0.106	-
56	V3144		√	-	-	0.094	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง (O.D. ₆₅₀)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
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	-
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	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง (O.D. ₆₅₀)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
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		√	-	-	0.121	-
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	-
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	-

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง		PCR	Real-time PCR	ชุดตรวจสอบ ELISA	
		เมล็ดพันธุ์	ใบสด			ค่าการดูดกลืนแสง (O.D. ₆₅₀)	วิเคราะห์ด้วยสายตา
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

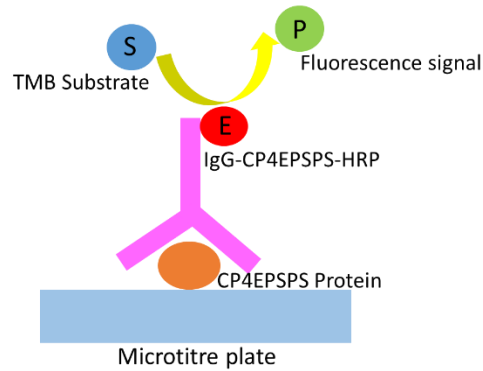
8. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม

จากการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับนักวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก (ภาพที่ 2.1.7) พบว่า นักวิชาการเกษตรให้ความสนใจในการนำชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมไปใช้ เนื่องจากศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกรับผิดชอบงานด้านการตรวจเมล็ดพันธุ์พืชโดยตรง และมีบริษัทเอกชนติดต่อเข้ามาให้ตรวจสอบการปนเปื้อนพืชตัดแปรพันธุกรรมเนื่องจากมีความสะดวกมากกว่าที่จะส่งมาตรวจที่กรุงเทพฯ แต่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกก็ไม่มีอุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้ ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ยังมีราคาถูกกว่าชุดตรวจสอบทางการค้า และการใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่น้อยกว่า



ภาพที่ 2.1.7 การถ่ายทอดองค์ความรู้กับนักวิชาการเกษตรของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก

การใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ที่พัฒนาได้ เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการตรวจสอบกับการตรวจสอบพีชตัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ ด้วยวิธี ELISA ที่มีรายงานการศึกษา (Kamle *et al.*, 2011) พบว่า ใช้ระยะเวลาการตรวจสอบที่รวดเร็วกว่า เนื่องจาก ELISA ที่พัฒนาขึ้นเป็นแบบ Plate-trapped antigen direct ELISA (PTA-direct ELISA) โดยแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบจะถูกเคลือบหลุมไมโครเพลท ภายหลังจากเติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนซึ่งถูกติดฉลากไว้ด้วยเอนไซม์แล้ว สามารถตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรท (ภาพที่ 2.1.8) ในขณะที่การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพีชตัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ ใช้ Triple-antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจน 2 ชนิดในการทำปฏิกิริยา โดยใช้แอนติบอดีตัวแรกในการเคลือบหลุมไมโครเพลท เพื่อทำหน้าที่จับกับแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่มีจำเพาะกับแอนติเจนและแอนติบอดีตัวที่สามซึ่งถูกติดฉลากไว้ด้วยเอนไซม์และมีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวที่สอง แล้วตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรท ซึ่ง TAS-ELISA ดังกล่าวมีขั้นตอนที่มากกว่าและใช้เวลานานกว่า อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมที่ได้ยังต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติมเช่น ศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของโปรตีนที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD) และทดสอบการตรวจสอบเชิงปริมาณต่อไป



ภาพที่ 2.1.8 แสดงการตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้วยชุดตรวจสอบ ELISA ที่พัฒนาได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลือง ตัดแปรพันธุกรรมที่พัฒนาได้ใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทุกขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับวิธี Real-time PCR พบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์มีความถูกต้องของชุดตรวจสอบร้อยละ 90

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมที่ได้จากการทดลองนี้ ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ระยะเวลาที่เร็วขึ้น สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างซึ่งเหมาะสมกับการวิเคราะห์ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้การใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์ผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องใช้ความรู้ความชำนาญทางด้านเทคนิคชีวโมเลกุล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างนำเข้าโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการเกษตรใช้ตรวจติดตามเฝ้าระวังการแพร่กระจายในแปลง นอกจากนี้เกษตรกรสามารถใช้ตรวจคัดกรองเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกแปลงได้

เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนนัตถร ดนัยสิริชัยชล พงศกร สรรควิทยากุล อรรคพล ภูมิศรี. 2558. การผลิต โปรีตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์. หน้า 20-30. ใน รายงานโครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้า เกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ พยุงศักดิ์ รวยอารี ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข อัญชลี ศรีสุวรรณ และ กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. 2549. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป. หน้า 228-298. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2548. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สุรภี กิริติยะอังกูร กิ่งกาญจน์ พิษญกุล และ อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2553. การโคลนยีน EPSPS และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรียเพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). หน้า 1 - 20. ใน ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2553. กรมวิชาการเกษตร.
- มาศวลัย ลิขิตธนเศรษฐ์ วลัยลักษณ์ เมธาภัทร และสุชศรี อึ้งบริบูรณ์ไพศาล. 2556. การพัฒนาชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิดทราบผลเร็ว สำหรับคลอแรมเฟนิคอล ในเกสรชเคมีภัณฑ์. 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/34616.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.

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

สารละลายที่ต้องเตรียมเบื้องต้น

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

ขั้นตอนการตรวจสอบ

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. เติมตัวอย่างที่อยู่ในไมโครเพลททิ้ง 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

การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบ

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

กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์

ประกอบด้วย 1 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal Antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance

หัวหน้าการทดลองที่ 3.1	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สังกัด	ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal Antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance

Development of NPTII Protein Detection from Polyclonal Antibody using Surface Plasmon Resonance Technique

นายพงศกร สรรค์วิทยากุล นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
นางปิยรัตน์ ดนัยสิริชัยชล นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล^{1/}
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลร่วมกับระบบอิเล็กทรอนิกส์วงจรไฟฟ้า (ไบโอเซนเซอร์ for Detection, Lab-on-Chip) ได้รับความนิยมและพัฒนาขึ้นอย่างมากในทางการแพทย์ในช่วงเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคือ เทคนิค Surface Plasmon Resonance หรือ ปฏิกริยาการสั่นของอนุภาคควอนตัมแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์หาโมเลกุลหรือโปรตีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงและมีปริมาณน้อยมากได้ ในงานวิจัยนี้เป็นการนำโปรตีนโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์มาจากยีน *nptII* ซึ่งได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการใช้เป็นตัวคัดแยกทางชีวภาพ สำหรับการดัดแปลงพันธุกรรมพืช ในงานวิจัยนี้สามารถผลิต Recombinant โปรตีน NPTII และทำให้บริสุทธิ์ในปริมาณมากได้ในคุณภาพที่อยู่ในระดับดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถนำไปใช้กระตุ้นในการผลิต Polyclonal antibody และเมื่อนำ Recombinant โปรตีน NPTII มาทดสอบการเชื่อมกับชิป NTA พบว่า His-Tag ที่อยู่บน Recombinant โปรตีน สามารถจับกับ Ni^{2+} ได้เป็น Ligand ที่ใช้ทดสอบการจับกันของโปรตีน NPTII และความสามารถในการจับของ Antibody ซึ่งเมื่อนำ Polyclonal Antibody ที่ทำให้บริสุทธิ์มาใช้เชื่อมกับโปรตีน A พบว่าโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ที่ผลิตได้ทุกชนิดและเปลี่ยนเป็น Ligand ซึ่งสามารถจับกับ Analyte ซึ่งเป็นโปรตีน NPTIII ได้ และจากการนำ Antibody มาทำปฏิกิริยา Amine coupling เพื่อเชื่อม Antibody แบบถาวรกับชิป CM5 และทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน NPTII พบว่าที่ pH 4.5 มีการสะสมของ Antibody บนชิปมากที่สุด และเมื่อทดสอบการตรวจจับกับโปรตีน NPTII สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่มีขนาดต่ำได้เป็นอย่างดี งานวิจัยชิ้นสามารถเป็นต้นแบบในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์โปรตีนปนเปื้อน GM ด้วยเทคนิคที่ง่ายและมีราคาถูกลงได้

^{1/} ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี กรมการข้าว

คำนำ

นีโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์มาจากยีน *nptII* ยีนดังกล่าวได้ถูกค้นพบและโคลนมาจาก ทรานสโฟซอน Tn5 ในจีโนมแบคทีเรีย อีโคไลน์ สายพันธุ์ K12 (Beck et al. 1982) เอนไซม์ชนิดดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของสารปฏิชีวนะจำพวก กานาไมซิน นีโอไมซิน เจเนทิซิน (G418) และ พาราโมไมซิน ได้ โดยการเติมกลุ่ม เอทีพี เทอโมออลฟอสเฟต เข้าไปที่โมเลกุลของสารปฏิชีวนะและทำให้สารปฏิชีวนะเสียคุณสมบัติไป (Richard L. et al. 1990)

ยีน *nptII* เป็นยีนที่แพร่หลายและรู้จักมานานแล้วเพราะเป็นยีนสำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มตระกูล ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะจำพวก นีโอไมซิน (*neo*) ที่สามารถนำไปใช้เป็นมากเกอร์ชีวภาพสำหรับคัดเลือกในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น ยีสต์ (Jimenez A. et al. 1980) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Florence C. G. et al. 1981) และพืช (Bevan, M. W. et al. 1983)

ในปัจจุบัน *nptII* ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการใช้เป็นตัวคัดแยกทางชีวภาพ สำหรับการดัดแปลงพันธุกรรมพืชเนื่องจากไม่มีหลักฐานว่า *nptII* เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (EFSA 2009) และจากการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ พบว่า *nptII* ไม่มี ลักษณะคล้ายคลึงหรือความเหมือนทางพันธุกรรมร่วมกับสารพิษใดๆ หรือสารกระตุ้นอาการแพ้ใดๆ (Lu et al. 2007) ทั้งนี้การจัดกลุ่มของ ตัวคัดแยกทางชีวภาพ ชีวภาพที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะ มีอยู่ 3 ระดับด้วยกันคือ 1) “ใช้ได้ไม่จำกัด” เป็นกลุ่มที่สามารถใช้ได้โดยไม่มีข้อจำกัดเพราะว่าเป็นยีนที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นยีนที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะชนิดที่หายากหรือไม่มีการใช้ในทางการแพทย์ คือ กานาไมซิน ริซิสแทนส์ ซึ่ง *nptII* จัดอยู่ในหมวดนี้ 2) “ห้ามใช้ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ค้าขายเชิงพาณิชย์” เป็นกลุ่มยีนที่สามารถใช้ในการทดลองภาคสนามเท่านั้น (Field trail) เนื่องจากยีนกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดกระบวนการต่อต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้ในมนุษย์ได้ เช่นกลุ่มยีน แอมพิซิลิน ริซิสแทนส์ และ 3) ไม่อนุญาตให้ใช้ เนื่องจากยีนกลุ่มนี้ทำให้เกิดการต่อต้านสารปฏิชีวนะระดับสูง ชนิดจำเพาะเจาะจงที่ใช้ในทางการแพทย์ในมนุษย์เช่น *nptIII* สามารถต่อต้านสารปฏิชีวนะชนิด เอมิกาซิน ได้ (EFSA 2009)

nptII จึงเป็นยีนที่ถูกใช้ทั่วไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมและสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นตัวแทนในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ GMOs ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนยีน *nptII* และโปรตีน นีโอไมซิน ฟอสโฟทรานสเฟอเรส II หลายวิธีการเช่น PCR หรือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Suratman A. et al. 2013) Real-time PCR หรือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-time (Mohamed F. et al. 2010) Elisa หรือ การตรวจวิเคราะห์จากการตกตะกอนของโปรตีน (Roland J. et al. 1992) Immunostrip หรือ การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Jennifer R. N. et al. Cotton con. 2008) อย่างไรก็ตามการทำ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) หรือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Real-time (Real-time PCR) ถึงแม้จะมีความแน่นอนและความแม่นยำสูงแต่ยังเป็นเทคนิคที่ต้องใช้เวลาและใช้สารเคมีที่มีราคาแพงในการดำเนินงานในการทดสอบ นอกจากนี้ การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ที่ผลิตขายในท้องตลาดสามารถใช้ตรวจสอบได้เพียงตรวจคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้นและไม่สามารถระบุความเข้มข้นและลักษณะของการปนเปื้อนของโปรตีนในตัวอย่างไม่ได้

ช่วงสิบปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิจัยระบบการตรวจโดยเทคโนโลยี ไบโอสเซนเซอร์ (Biosensor) หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางอิเล็กทรอนิกส์และทางชีววิทยาเข้าด้วยกัน โดยใช้หลักการตรวจวิเคราะห์จากรหัสเบสโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่จับกับสารทางชีวโมเลกุลต่างๆหรือโมเลกุลทางเคมี (Tombelli S. et al. 2005; Gyeong S. B. et al.

2005; Yi X. D. et al. 2005) และการตรวจวิเคราะห์การจับตัวกันของ แอนติเจน-แอนติบอดี และการตรวจจับกันของ โปรตีน-ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคการตรวจจับ Surface Plasmon Resonance (SPR) หรือปฏิกิริยาการสั่นของอนุภาคควอนตัมแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว โดยใช้ไบโอเซนเซอร์ ในการตรวจวิเคราะห์ (Eyal G. et al. 2009; Dongmei H. et al. 2013; Shingo N. et al. 2013)

SPR สามารถตรวจสอบสารต่างๆได้ด้วยความจำเพาะเจาะจงสูงและรวดเร็ว โดยสามารถระบุความเข้มข้นของ สารที่ตรวจวิเคราะห์ได้ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบของสารละลายหรือสารเนื้อผสม นอกจากนี้เทคนิค SPR ยังเป็นเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ต้องติดฉลากและเป็นการวิเคราะห์แบบทันที ณ ขณะนั้น (real-time) อีกด้วย (Chinowsky T.M. et al. 2007)

อนึ่งการพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนมีปัจจัยที่สำคัญ ๒ ประการ คือ การพัฒนาให้ระบบมีความจำเพาะเจาะจงสูงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม้ในตัวอย่างที่มีส่วนผสมหลากหลาย และมีความไวในการตรวจจับที่เหมาะสมตามที่ต้องการในการวิเคราะห์ผล เพราะตัวอย่างต่างๆเช่น สายละลายจากเซลล์พืชสด ซีรัม ผงแป้ง สารละลาย น้ำมัน ฯลฯ อาจมีสารหรือโมเลกุลที่สามารถเข้าไปขัดขวางการทำงาน หรือจับแบบไม่จำเพาะเจาะจง กับ พื้นผิว SPR จนอาจไปรบกวนสัญญาณจากการตรวจวิเคราะห์ได้ (Scott D. S. et al. 2009)

เพื่อให้ปัจจัยทั้ง ๒ ประการครบถ้วน มีวิธีการหลากหลายที่ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มความไวต่อการตอบสนอง และลดค่าความไม่แน่นอนเพื่อให้การตรวจตัวอย่างในสารเนื้อผสมได้ดีขึ้น เช่น การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ในแบบที่เรีย หรือในสภาพทดลอง (in-vitro) ก่อนที่จะนำมาตรวจโดย การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) หรือ การเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรม (real-time) (reviewed, Benoit et al. 2003) การใช้เทคนิค การตกตะกอนโปรตีนโดยแม่เหล็ก (Immunomagnetic) ในการแยกตัวอย่างและเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ (Straub T.M. et al. 2005) การใช้วิธีการกรองผ่านเมมเบรนเพื่อที่จะแยกส่วนประกอบหรือสารชนิดอื่นออกไป เช่น สารหรือโมเลกุลที่ใหญ่กว่าสารที่จะวิเคราะห์จากตัวอย่างที่นำมาตรวจ (Stevens R.C. et al. 2003) อย่างไรก็ตามเทคนิคที่กล่าวถึงทั้งหมดเป็นการทดลอง ที่ต้องใช้เวลาในการเตรียมและมีความซับซ้อนก่อนที่ตัวอย่างจะพร้อมเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลร่วมกับระบบอิเล็กทรอนิกส์วงจรไฟฟ้า (ไบโอเซนเซอร์ for Detection, Lab-on-chip) ได้รับความนิยมและพัฒนาขึ้นอย่างมากในทางการแพทย์ในช่วงเวลา 5 ปีที่ผ่านมาคือเทคนิค Surface Plasmon Resonance หรือ ปฏิกิริยาการสั่นของอนุภาคควอนตัมแบบรีโซแนนซ์บนพื้นผิว ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์หาโมเลกุลหรือ โปรตีนชนิดที่จำเพาะเจาะจงและมีปริมาณน้อยมากได้ นอกจากนี้มีความไวต่อการตรวจจับที่สูงแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยความเร็วมากอีกด้วยโดยใช้เวลาเพียง 15 - 30 นาทีต่อตัวอย่าง และในปัจจุบันราคาของเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถูกลงมากกว่าในอดีต ทำให้เหมาะสมในการ วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้การกับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน GMOs ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สินค้าเกษตร

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาในกระบวนการส่งออกคือระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้เวลา 5 - 10 วัน ซึ่งผู้ประกอบการจะไม่ดำเนินการตาม กระบวนการขั้นตอนปกติตามหลักที่ควรจะเป็นคือดำเนินการสุ่มจากโรงคัดบรรจุก่อนส่งออก เพื่อให้ตัวอย่างที่ได้ สุ่มมานั้นเป็นตัวแทนของสินค้าที่จะส่งออกอย่างแท้จริงโดยผู้ประกอบการจะสุ่มจากแปลงส่งออกแล้วจึงส่ง ผลิตภัณฑ์หรือสินค้าที่จะส่งออกไปโรงคัดบรรจุ (เช่นมะละกอผลสด) เพื่อส่งออกในวันรุ่งขึ้นทันที อนึ่งหากสามารถ ลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ให้ต่ำกว่า 5 วันได้ผู้ประกอบการสามารถนำผลผลิตเข้าโรงคัดบรรจุ เก็บตัวอย่างส่ง

ตรวจวิเคราะห์และสามารถอธิบายรับรองเพื่อเตรียมส่งออกได้ทันทีจะทำให้ตัวอย่างที่สุ่มมาตรวจนั้นเป็นตัวแทนของสินค้าที่จะส่งออกอย่างแท้จริง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (GeneAmp PCR System 9700)
2. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Gel-electrophoresis
3. Vortex mixer
4. Dry bath
5. เครื่องปั่นตกตะกอน Centrifuge
6. เครื่องวัดปริมาณ DNA GeneQuant II RNA/DNA
7. UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ
8. เครื่องทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ Aktapure
9. เครื่องแยกขนาดโปรตีนโดย Acrylamide

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอทะเลจากด้วยวิธี Cell breaking

ดำเนินการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอทะเลจากด้วยวิธี Cell breaking หรือสกัดโดยชุดสกัด DNeasy mericon Food Kit โดยชั่งตัวอย่างหนัก 0.2-0.25 กรัม ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลูกป็นสแตนเลส ซึ่งหนึ่งฝา เชื้อมาแล้วลงไปหลอด จำนวน 3 เม็ด เติม Homogenization buffer (Solution I buffer) (ที่เติม β -mercaptoethanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้บัฟเฟอร์เข้ากับตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการใส่ทิวบ์เข้ากับช่องใส่ทิวบ์ของเครื่องตีตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเปิดให้เครื่องทำงาน จำนวน 5 รอบ (ใช้เวลา 1 นาที ต่อรอบ) เติม Lysis buffer (Solution II buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลาย ผสมกันนำไปบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Precipitation buffer (Solution III buffer) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งไป เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไปแล้วเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง GeneQuant IIRNA/DNA

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM ที่ตรวจพบ 35S CaMV และ NOS Terminator โดยบดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วตักใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 200 mg สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan (Rogers *et al.* 1985) โดยเติม Lysis buffer และ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่บรรจุตัวอย่างไว้แล้ว 200 mg (2 ซ้ำ) โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อ Lysis buffer และ Proteinase K ดังนี้

ตารางที่ 3.1.1. แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างต่อการใช้ Buffer

Test portion	Lysis buffer (มิลลิลิตร)	Proteinase K (ไมโครลิตร)
0.1-0.3 กรัม	0.80 - 1.30	20

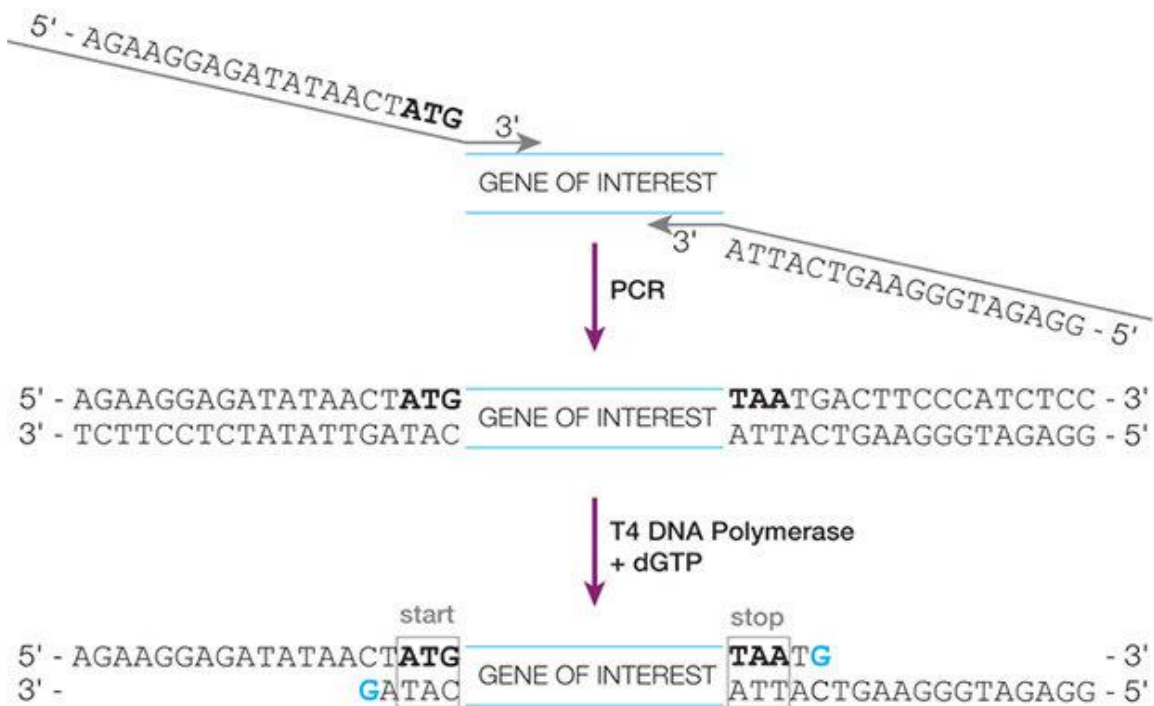
จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบดปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 ชั่วโมง วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ปิดฝาหลอด ใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ปิดได้ เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ปิดฝาหลอดที่อยู่ที่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่

เติม 100% Isopropanol ที่แช่เย็นไว้จำนวน 2 ใน 3 ของปริมาตรของหลอดที่ปิดได้เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปแช่ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของหลอดทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เท Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมน้ำกลั่นหนึ่งขวดแช่เย็น จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

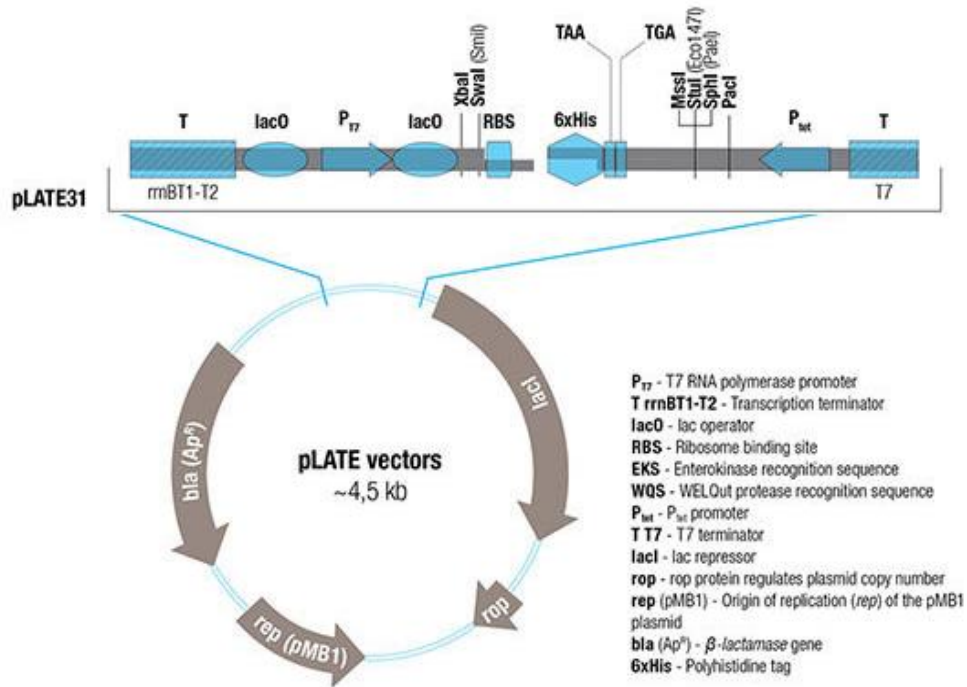
ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard™ minicolumn โดยเติม Miniprep DNA Purification Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) ติดกับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ปิดฝาสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA Purification Resin จากข้อ 4.4.1 ลงใน syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.2 หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยดันสารละลายลงจนหมด ดีเอ็นเอจะเกาะติดกับ Silica ใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของหลอดนั้นไปเติม 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อล้างดีเอ็นเอ 1 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม 80% Isopropanol ให้ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติด Syringe กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (อุ่น) หนึ่งขวดลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

3. การสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม *nptII* เพื่อเตรียมสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์

ดำเนินการออกแบบ Primer เพื่อโคลนยีน *nptII* จากเวกเตอร์ pRI909 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับถ่ายเข้าสู่พืชเพื่อตัดแปรรหัสพันธุกรรมพืช แล้วตัดต่อเข้าสู่เวกเตอร์ pLATE31 โดยระบบ aLICator LIC Cloning ซึ่งจะทำให้เกิด 5' และ 3' overhangs ใน PCR template โดยเตรียมส่วนผสมดังต่อไปนี้ที่อุณหภูมิห้อง : 5X LIC Buffer 2 μ L, Purified PCR product 0.1 pmol, T4 DNA Polymerase (1u/ μ L) 1 μ L เติมน้ำจนได้ 10 μ L Vortex และปั่นตกตะกอน 3-5 วินาที นำมาบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5M EDTA 0.6 μ L จากนั้นเติม pLATE 31 1 μ L (LIC-ready vector (60 ng, 0.02 pmol DNA)) Vortex เล็กน้อยและปั่นตกตะกอน 3-5 วินาที บ่มส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดไป Transform เข้าสู่แบคทีเรีย DH5 α แล้วคัด Transformant ด้วย Kanamycin 50 mg/ml



ภาพที่ 3.1.1. แสดงวิธีการโคลนยีนตามระบบ aLICator LIC Cloning



ภาพที่ 3.1.2. แสดงภาพ pLATE Vector และ pLATE 31

ตารางที่ 3.1.2. แสดง Primer สำหรับใช้ Clone ยีน *nptII* จาก Vector pRI909

Name	Sequence 5'-3'
With Start_F	AGAAGGAGATATAACTATGATTGAACAAGATGGA
Plate 31_R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGAAGAACTCGTCAAGAAG

4. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII

ถ่าย Vector ที่สกัดได้เข้าสู่ E.coli BL21 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรีย BL21 ที่ได้รับ Recombinant vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB medium ที่ 37°C ข้ามคืน 100 µg/mL ampicillin เขย่าที่ 220-250 rpm/นาที นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนไปใส่ในอาหาร LB/Amp medium ใหม่ในอัตราส่วน 1:50 สังเคราะห์โปรตีน NPTII ต่อเนื่องในปริมาณมากแล้วนำไปเลี้ยงที่ 37°C เขย่าที่ 220-250 rpm/นาที จนเชื้อได้ความเข้มข้น OD600 ประมาณ 0.5-0.6 (ประมาณ 2 ชั่วโมง) จากนั้นเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM และบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง นำเชื้อทั้งหมดมาปั่นตกตะกอนแล้วนำไปสกัดเอา รีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII ออกมา จากนั้นนำเซลล์ที่ปั่นตกตะกอนทั้งหมดไปดำเนินการทำ Freeze toll โดยแช่ที่ -80 °C 1 ชม. จากนั้นนำออกมาละลายและเติม Lysozyme ประมาณ 2 กรัม เขย่า 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 ชม.และ นำไปแช่ที่ -80°C อีก 1 ชม. จากนั้นนำมา ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที 4 °C แล้วนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Colum Ni-NTA โดยดำเนินการเลี้ยง

เซลล์ *E.coli* BL21 transformant vector pLATE31 ที่ได้รับยีน *nptII* ทำการเลี้ยงในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อเก็บเซลล์แบคทีเรียไปทำการแยกและทำให้โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยเลี้ยง starter ที่ได้จากโคลนนี้เดี่ยวใน flask ที่มีอาหาร LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/mL เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แบ่ง starter เดิมลงในอาหาร LB ซึ่งมีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 µg/mL ปริมาตร 1 ลิตร (เติม starter ปริมาตร 10% ของอาหารใหม่) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง (non induce) นำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM แล้วเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการเซนตริฟิวส์เชื้อในหลอดเซนทริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร บันเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C รวมตะกอนใสในหลอด falcon ขนาด 50 มิลลิลิตร ในขั้นตอนการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน (Induce) เลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์โปรตีน 3 – 4 ชม. จากนั้นนำมาสกัดเอาโปรตีน NPTII

ทำเซลล์ให้แตกและทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ B (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ตะกอนเซลล์ที่เก็บจากอาหาร 500 ml ละลายด้วยบัฟเฟอร์ B (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme ประมาณเท่าหัวไม้ขีด กวนให้เข้ากันจนเหนียว บ่มในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วเอามาเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วบ่มในน้ำแข็ง 15 นาที เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C นานข้ามคืน เพื่อให้เซลล์แตกบางส่วน ทำให้เซลล์แตกมากยิ่งขึ้น โดยนำเซลล์มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไป break cell ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD รุ่น 2200 ตั้งค่าที่ 5 min, power 40% ทำการ sonicate ประมาณ 4-5 ครั้ง จนสารละลายเซลล์หายเหนียวและใส (crude) นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm. นาน 10 นาที ที่ 4°C แยกเก็บส่วนใส (supernatant) กับตะกอน (pellet) นำส่วน supernatant มาทำให้มีความบริสุทธิ์โดย Nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin โดยบรรจุ column ด้วย Ni-NTA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รอให้ Ni-NTA จัดเรียงตัว ประมาณ 20 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย buffer B ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin (25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดมาผสมกับ Supernate เขย่าไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง โหลดส่วนผสมทั้งหมดลงใน column เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ (flow through) ล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) ที่เติม tween 20 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 % ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin (Wash I) ล้าง column ด้วย buffer D (pH 5.9) ที่เติม tween 20 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 % ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (Wash II) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ในหลอด ตามลำดับ ทำการชะ (elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย buffer E (pH 4.5) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ Desalting เพื่อให้โปรตีนอยู่ในสารละลาย Running buffer ของเครื่อง Biercore แล้วเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอพร้อมใช้

5. การผลิตแอนติซีรั่มจากกระต่าย

ในการทดลองขั้นต่อไปเป็นการเตรียมนำโปรตีนฉีดเข้าสู่กระต่ายโดยผู้เชี่ยวชาญซึ่งมีใบรับรองการปฏิบัติงานกับสัตว์ทดลองจากสถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์เป็นผู้ดำเนินการ

เจาะเลือดกระต่ายเก็บเป็น Normal Serum เพื่อใช้เป็น Negative control การฉีดครั้งแรกนำโปรตีน NPTII ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนมา Dilute กับ PBS ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.1 g/l โดยมี Volume final 1.5 ml จากนั้นนำไปผสมกับ adjuvant ชนิด Complete อัตราส่วน 1:1 จนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันสีขุ่นขาว และฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังกระต่ายประมาณสามครั้งจนหมด ดำเนินการทดลองฉีดติดต่อกันทั้งหมด 3 สัปดาห์ และเปลี่ยน adjuvant เป็นชนิด incomplete เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ที่ระยะเวลาไว้ 1 สัปดาห์แล้วจึงเริ่มเจาะเพื่อเก็บแอนตี้ซีรัม เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ที่ระยะเวลาไว้ 1 จึงดำเนินการเก็บ antiserum แบบ Whole body เลือดที่ได้นำไปปั่นด้วย ultra centrifuge ที่ 14,000 rpm 4°C แล้วจึงดูดเก็บ antiserum ใส่ที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือดไว้ที่ -20°C



ภาพที่ 3.1.3. แสดงการผลิต Antibody โดยการกระตุ้นด้วยการฉีด โปรตีน NPTII (29 kDa) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วกับกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ขาวอายุ 2-3 เดือน.

6. การสกัด IgG จากแอนตี้ซีรัมโดยผ่านคอลัม HiTrap Protein A HP

ดำเนินการสกัด IgG จาก Antiserum เพื่อให้มีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์โดยดำเนินการสกัดผ่านเครื่อง AKTA pure โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 6.1 เตรียม binding buffer 20 mM Sodium phosphate pH 7.0
- 6.2 เตรียม Elution buffer 0.1 M citric acid pH 3
- 6.3 เตรียม Neutralizing buffer 1 M Tris-HCL pH 9.0
- 6.4 ผสมแอนตี้ซีรัมกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1:10
- 6.5 ต่อคอลัม HiTrap Protein A HP เข้ากับเครื่องแล้วดำเนินการสกัด IgG แบบ peak fraction
- 6.6 ดำเนินการ Desalting เพื่อนำเกลือออกจากตัวอย่างและเพื่อเปลี่ยน buffer

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การสืบค้นข้อมูลทาง Bioinformatic เพื่อให้ได้สายรหัสพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับยีน *nptII*

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลยีน *nptII* โดยนำยีน *nptII* จากแหล่งต่างๆมาเปรียบเทียบพบว่ามี ความแตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบในส่วนของสายรหัสเปปไทด์พบว่าสายรหัสเปปไทด์มีความเหมือนกันถึง 99% เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI สายรหัสเปปไทด์มีความเหมือนกัน 98-100% ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆคือ *Riemerella anatipestifer*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* รวมถึงเวกเตอร์ชนิดต่างๆกันอีกด้วย

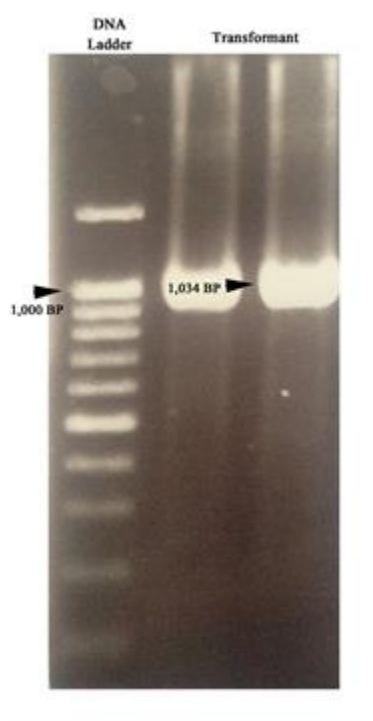
		Section 1				
		(1)	10	20	34	
Translation of Kan resistance_pET200	(1)	---	IEODGLHAGS	PAAWVERLFGYDWA	OLTIGC	
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(1)	---	IEODGLHAGS	PAAWVERLFGYDWA	OLTIGC	
Translation of NPTII_KU	(1)	ASMG	IEODGLHAGS	PAAWVERLFGYDWA	OLTIGC	
Consensus	(1)	M	IEODGLHAGS	PAAWVERLFGYDWA	OOTIGC	
		Section 2				
		(35)	35	40	50	68
Translation of Kan resistance_pET200	(32)	S	DAAVFRLSAOGR	PVLFVKTDL	SGALNELODEAA	
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(32)	S	DAAVFRLSAOGR	PVLFVKTDL	SGALNELODEAA	
Translation of NPTII_KU	(35)	S	DAAVFRLSAOGR	PVLFVKTDL	SGALNELODEAA	
Consensus	(35)	S	DAAVFRLSAOGR	PVLFVKTDL	SGALNELODEAA	
		Section 3				
		(69)	69	80	90	102
Translation of Kan resistance_pET200	(66)	R	LSWLATTGVP	CAAVLDVVTE	EAGRDWLL	LGEVPG
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(66)	R	LSWLATTGVP	CAAVLDVVTE	EAGRDWLL	LGEVPG
Translation of NPTII_KU	(69)	R	LSWLATTGVP	CAAVLDVVTE	EAGRDWLL	LGEVPG
Consensus	(69)	R	LSWLATTGVP	CAAVLDVVTE	EAGRDWLL	LGEVPG
		Section 4				
		(103)	103	110	120	136
Translation of Kan resistance_pET200	(100)	O	DLSSH LAPAEK	VSIMADAM	RRLHTLDP	ATCPF
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(100)	O	DLSSH LAPAEK	VSIMADAM	RRLHTLDP	ATCPF
Translation of NPTII_KU	(103)	O	DLSSH LAPAEK	VSIMADAM	RRLHTLDP	ATCPF
Consensus	(103)	O	DLSSH LAPAEK	VSIMADAM	RRLHTLDP	ATCPF
		Section 5				
		(137)	137	150	160	170
Translation of Kan resistance_pET200	(134)	D	HOAKHRIER	ARTRMEAG	LVDODDL	DEEHOG
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(134)	D	HOAKHRIER	ARTRMEAG	LVDODDL	DEEHOG
Translation of NPTII_KU	(137)	D	HOAKHRIER	ARTRMEAG	LVDODDL	DEEHOG
Consensus	(137)	D	HOAKHRIER	ARTRMEAG	LVDODDL	DEEHOG
		Section 6				
		(171)	171	180	190	204
Translation of Kan resistance_pET200	(168)	A	ELFARLKAR	MPDGED	LVVTHG	DACLPN
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(168)	A	ELFARLKAR	MPDGED	LVVTHG	DACLPN
Translation of NPTII_KU	(171)	A	ELFARLKAR	MPDGED	LVVTHG	DACLPN
Consensus	(171)	A	ELFARLKAR	MPDGED	LVVTHG	DACLPN
		Section 7				
		(205)	205	210	220	238
Translation of Kan resistance_pET200	(202)	R	FSGFIDCG	RGLGVAD	RYODIAL	ATRDIAE
Translation of Neo/Kan resistance_pR1909	(202)	R	FSGFIDCG	RGLGVAD	RYODIAL	ATRDIAE
Translation of NPTII_KU	(205)	R	FSGFIDCG	RGLGVAD	RYODIAL	ATRDIAE
Consensus	(205)	R	FSGFIDCG	RGLGVAD	RYODIAL	ATRDIAE

ภาพที่ 3.1.4. แสดงภาพ Alignment สายรหัสเปปไทด์ของโปรตีน NPTII จากที่มาที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบโปรตีนซึ่งใช้เป็น Genetic marker ในพืช GM ที่ใช้โปรตีน NPTII สามารถดำเนินการได้ในเชิง Universal target เพราะมีการรักษาสายรหัสเปปไทด์ Sequence ไว้ อย่างเข้มงวดในสิ่งมีชีวิตต่างๆกัน

เมื่อนำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมยีน *nptII* จากเวกเตอร์ pRI909 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่า สายรหัสเปปไทด์มีความแตกต่างเพียง 3 ตำแหน่ง และไม่มี ความแตกต่างในตำแหน่งอื่นๆซึ่งไม่มีผลต่อลักษณะ โครงสร้างของโปรตีนและสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้เป็น Universal target ได้

2. การสังเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม *nptII* เพื่อเตรียมสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์

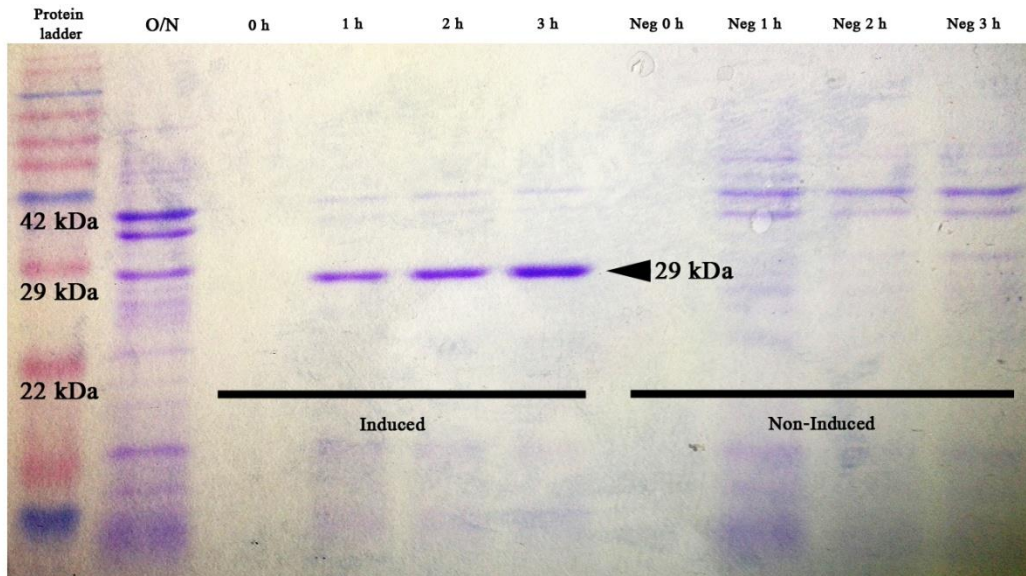
หลังจากโคลนยีน *nptII* และเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pLATE31 แล้วถ่ายเวกเตอร์เข้าสู่ E-coli ชนิด DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณเวกเตอร์ที่ได้รับการตัดแปลงแล้วจึงตรวจสอบความถูกต้องพบว่าถูกต้องตามที่คาดการณ์คือ ขนาดของยีนที่โคลน และขนาด Adapter เวกเตอร์ได้ขนาดคือประมาณ 1,034 bp



ภาพที่ 3.1.5 แสดง ผล colony PCR จาก Transformant pLATE31

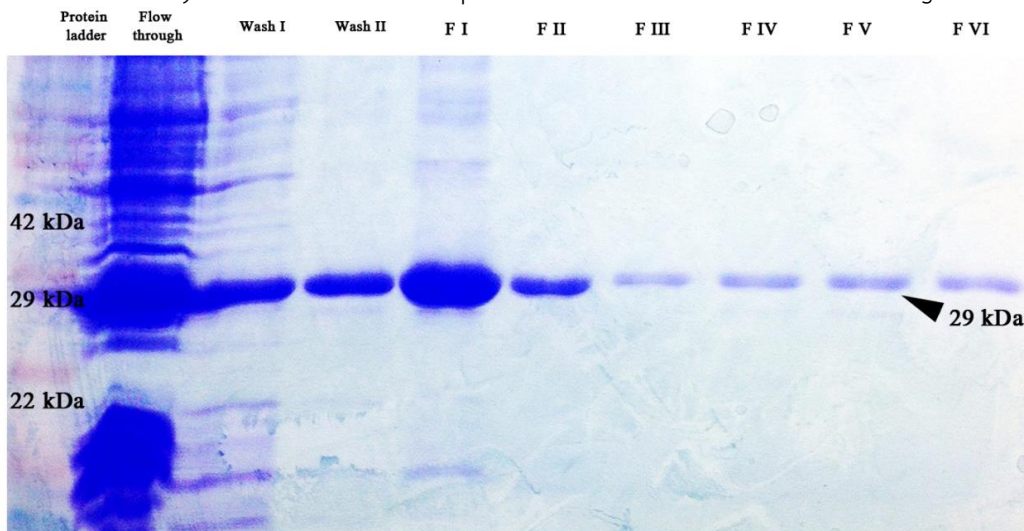
3. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน NPTII

ในขั้นตอนการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน (Induce) พบว่าการเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเคราะห์โปรตีนเพียง 3 – 4 ชม. เพียงพอต่อการนำมาสกัดเอาโปรตีน NPTII โดยไม่มีผลต่อความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่าการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ในแบคทีเรีย Transformant ที่ได้รับ vector pLATE31 มีประสิทธิภาพสูง ได้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการสังเคราะห์เพียงพอ



ภาพที่ 3.1.6. แสดงการวิเคราะห์ Protein Gels (SDS-PAGE) โดยเป็นการเทียบกันระหว่าง E.Coli BL21 transformant ที่ได้รับการกระตุ้นเพื่อให้ผลิตโปรตีนและที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในเวลา 3 ชั่วโมง

เมื่อเก็บ Fraction ทั้งหมดไปตรวจสอบโดย SDS-PAGE พบว่าสามารถชะโปรตีน NPTII ออกจากคอลัม Ni-NTA ได้เกือบทั้งหมดที่ Fraction 12 โดยใน Fraction อื่นหลังจากนั้นแถบไม่ปรากฏแถบโปรตีนให้เห็น จึงดำเนินการเก็บ Fraction 1-12 ไปผ่านการ Desalting โดยเครื่อง Purify protein ให้อยู่ในสารละลาย PBS แล้วนำไปเอาน้ำออกด้วย Dialysis tube และ Microsep Advance 10K จนได้ความเข้มข้น 1 mg/ml

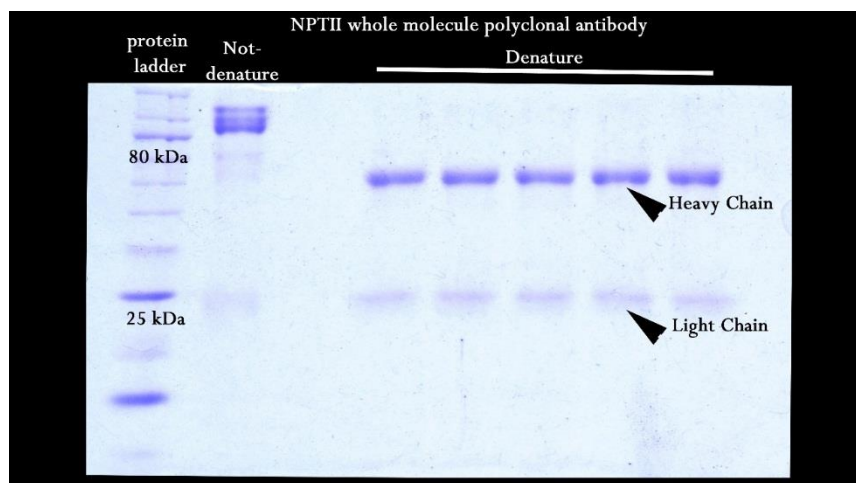


ภาพที่ 3.1.7 แสดงการวิเคราะห์ Protein Gels (SDS-PAGE) แสดงให้เห็นการทำ NPTII protein (29 kDa) ให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA resin จาก supernatant ของ BL21 E.Coli transformant ที่ได้รับการกระตุ้นให้ผลิตโปรตีน ในรูป Fraction 1-6, fraction 7-24 (ไม่ได้แสดง)

4. การสกัด IgG จากแอนตี้ซีรัมโดยผ่านคอลัมน์ HiTrap Protein A HP

ผลจากการสกัด IgG และหลัง Concentrate พบว่าได้ค่า Absorbance 1:6 ที่ 0.26 – 0.5 คิดเป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายได้ 1 - 1.6 mg/ml และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย Gel SDS-PAGE พบว่า Antibody ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถนำไปทดสอบกับโปรตีนชิปต่อไป

ภาพที่ 3.1.8 แสดงการวิเคราะห์ Polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการฉีดกระต่าย

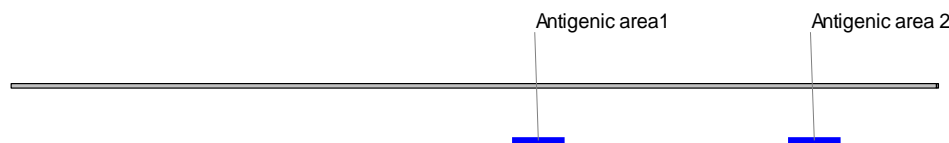


5. การสังเคราะห์โปรตีนแบบ Short peptide เพื่อใช้เป็น Antigen กระตุ้นการผลิตแอนติบอดี

ดำเนินการสังเคราะห์สายโปรตีนขนาดสั้นสองเส้นและนำไปใช้เป็น Antigen เพื่อผลิต Polyclonal antibody เทียบกับแบบทั้งโมเลกุลโปรตีน

Antigenic area 1 : ARTRMEAGLVDQDDL (Peptide #1)

Antigenic area 2 : LATRDIAEELGGEWA (Peptide #2)

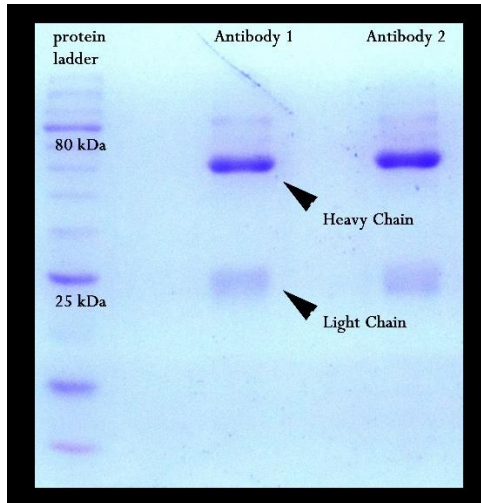


Translation of Neo/Kan resistance pRI909

265 aa

ภาพที่ 3.1.9 แสดง Translation feature ของยีน *nptII* และ antigenic area

ซึ่งจะนำไปทำ protein synthesis



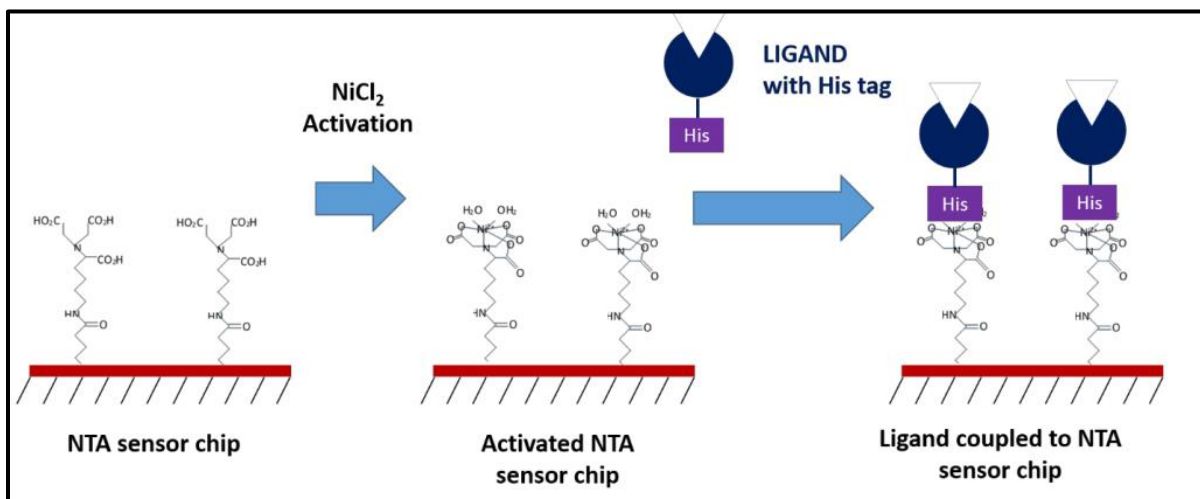
ภาพที่ 3.1.10.แสดง Polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากการสังเคราะห์โดยใช้ Peptide #1&2 เป็น antigen

เมื่อนำ Antibody ที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วย Gel SDS-PAGE พบว่า Antibody ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถนำไปทดสอบกับโปรตีนชิปต่อไป และความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 1 - 1.5 mg/ml การดำเนินการในขั้นต่อไปเป็นการนำ Antibody แบบทั้งสายโปรตีนเปรียบเทียบกับ Antibody ที่ได้จากการใช้ Peptide #1&2 เป็น antigen โดยการสร้าง Protein ชิป

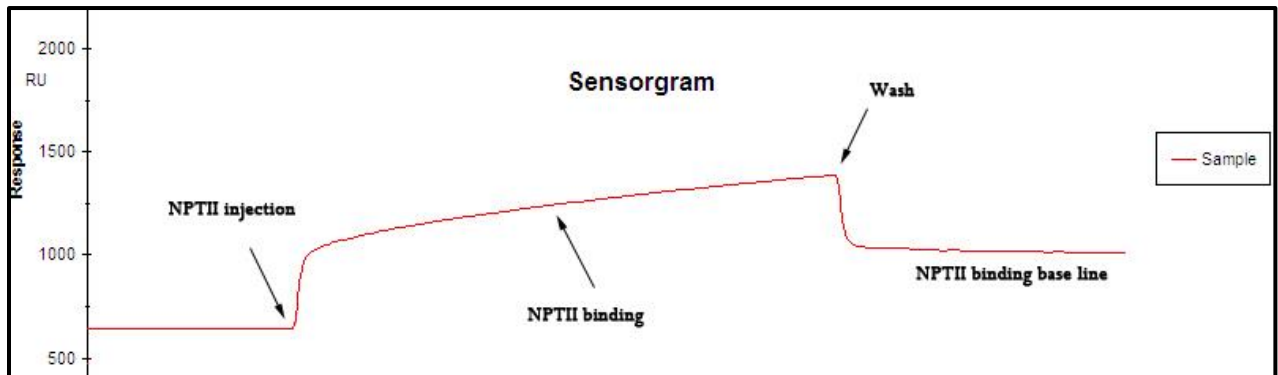
6. การทดสอบการจับกันของ Antibody และโปรตีน NPTII บน NTA ชิป

ดำเนินการ Activate NTA ชิป ด้วยสารละลาย NiCl_2 เพื่อให้ประจุของ Ni^{2+} จับกับสายโมเลกุลคาร์บอนบนชิป จากนั้นจึงฉีดโปรตีน NPTII ที่มีสายเปปไทด์ His tag ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เข้าสู่ชิปเพื่อใช้เป็น ligand ในการทดสอบ

ภาพที่ 11 แสดง NTA ชิป activation โดย NiCl_2 และ capturing ของ NPTII ligand กับ Ni^{2+}

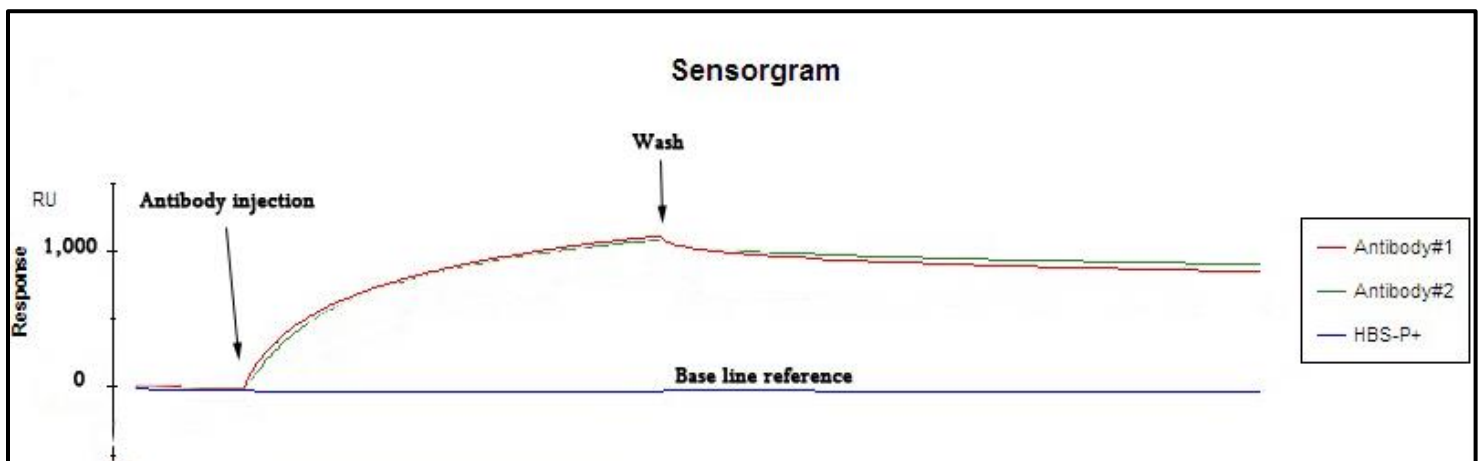


ภาพที่ 3.1.12 แสดง NPTII binding baseline ในการ Capturing ของ NPTII ligand กับ Ni²⁺



จากการทดลองพบว่าการจับตัวกันของโปรตีน NPTII ที่ฉีดเข้าบนชิปมีความเสถียร ได้ค่า Response 450 RU แล้วจึงดำเนินการฉีด Antibody 1 และ 2 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับกันของ Antibody 1 และ 2 ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml จากการทดลองพบว่า Antibody ทั้ง 2 ชนิดสามารถจับกับ โปรตีน NPTII ได้ดีพอๆกัน โดยมีค่า Response ประมาณ 1,000 RU อย่างไรก็ตามในส่วนของ Antibody 1 พบว่าสามารถจับกับ โปรตีน NPTII ได้เร็วกว่า Antibody 2 เล็กน้อย แต่ Antibody 1 มีความเสถียรในการจับกับโปรตีน NPTII น้อยกว่า Antibody 2 เมื่อสังเกตจากความเร็วในการ Wash โปรตีน NPT II หลุดออกจาก Antibody 1 เร็วกว่า เล็กน้อยเช่นกัน

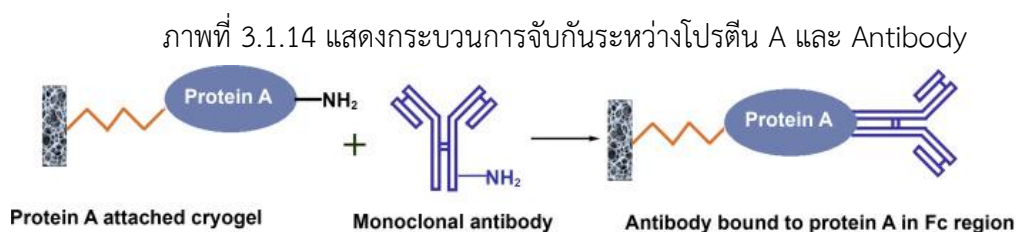
ภาพที่ 3.1.13 แสดงการเปรียบเทียบการจับกันของ Antibody 1 และ 2 กับ NPTII ligand.



จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้ Antibody ทั้งสองในการตรวจจับ โปรตีน NPTII ได้ดีพอๆกัน แต่ Antibody 1 จับได้เร็วกว่าจึงอาจเหมาะสมกว่าในการนำไปพัฒนาชิป เพื่อตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้ต้องดำเนินการทดสอบ kinetic อีกครั้ง และต้องเปรียบเทียบกับ NPTII Antibody แบบ Whole molecule ด้วย

7. ปฏิกริยาและการทำงานของโปรตีน A ชิป

โปรตีน A ชิป เป็นชิปที่เคลือบพื้นผิวทองคำด้วย Carboxymethylated dextran และยึดกับ recombinant Protein A (MabSelect™ SuRe ligand) โดยโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ชนิด IgG ได้ด้วยพันธะ Covalent บริเวณ Fc ของ Antibody

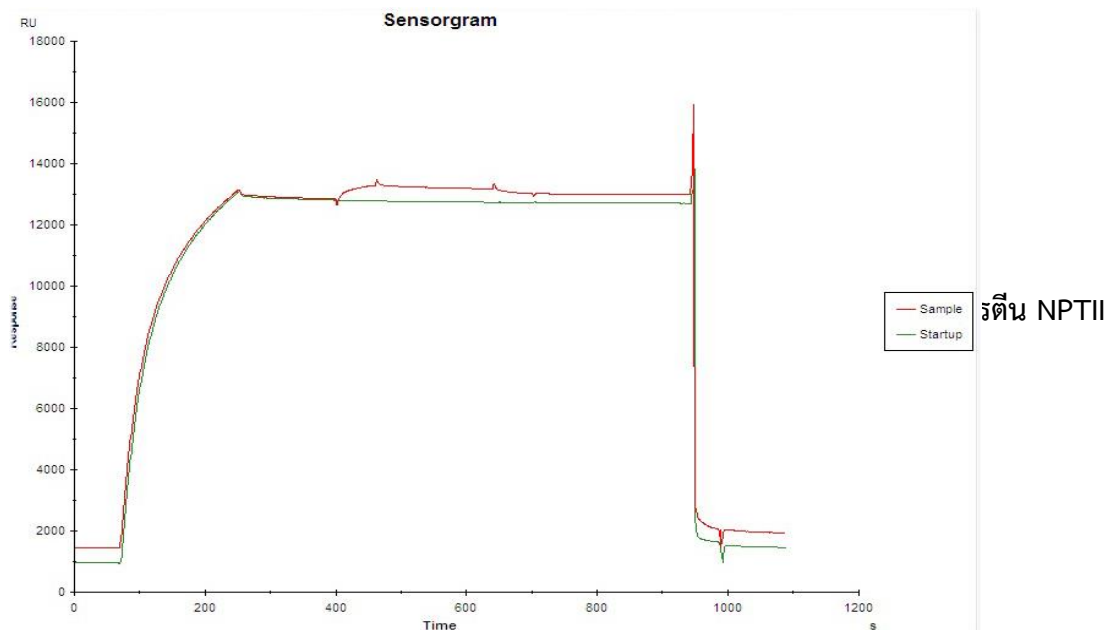


จากนั้นเตรียมดำเนินการทดลองเพื่อหา Full Binding Kinetic Analysis ของ Antibodies เพื่อหาค่า binding kinetic parameters ต่างๆดังนี้ 1. Ka : Association rate 2. Kd: Dissociation rate และ 3. KD : Affinity constant โดยการนำ Antibody 1, 2 และ Polyclonal จากการฉีดกระต่ายแต่ละชนิดมาจับกับโปรตีน A บน Protein A ชิป แล้ว Run Antigen Recombinant Protein NPTII เทียบที่อย่าง 6 ค่าความเข้มข้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแม่นยำของข้อมูล โดยแอนติบอดีที่ดีจะต้องมีค่า Affinity สูง และยึดติดแน่นหรือหลุดยาก (Low off-rate)

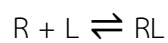
8. การทดสอบการจับของโปรตีน NPTII และ Polyclonal 1# โดยชิปโปรตีน A

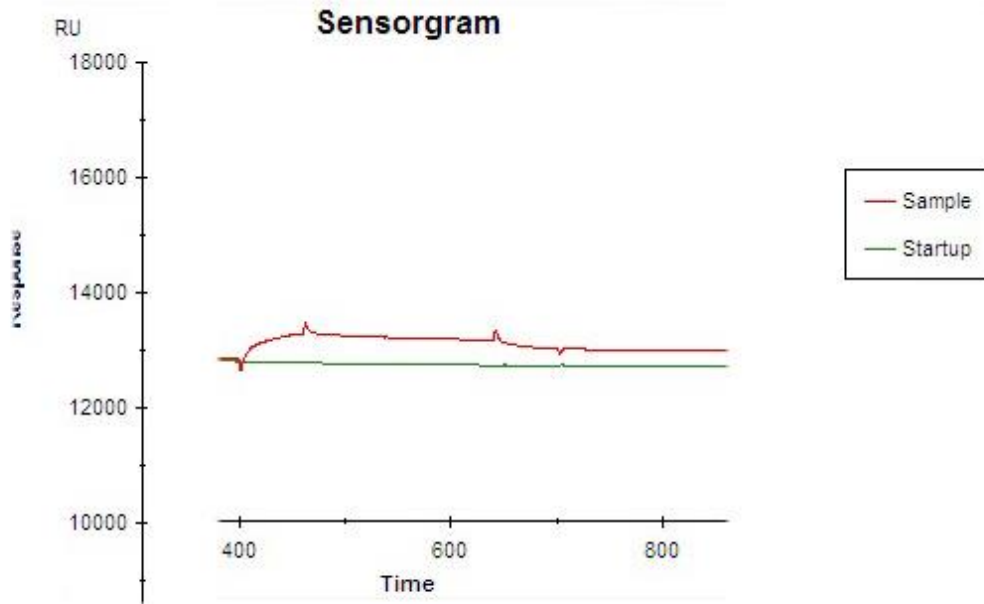
นำ Polyclonal 1# ที่ได้รับการ desalting แล้วใน NaH₂PO₄ มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/ml และ โปรตีน NPTII 10 µg/ml ทดสอบร่วมกับชิปโปรตีน A Run ระบบด้วย Buffer HBS-EP⁺ และ Elute โดย Buffer Glycine-HCl, pH 1.5 ตั้งโปรแกรมเครื่องให้เป็นการ Detect โดย Ligand with analyt จากการทดลองได้ผลดังนี้

ภาพที่ 3.1.15 แสดง Sensogram ที่ได้จากการนำ Polyclonal 1# ไปทดสอบกับโปรตีน NPTII



จากการทดลองสามารถนำมาคำนวณหาค่า Binding constant หรือค่า Association/Disassociation constant ได้ หรือที่เรียกว่าค่า constant K ซึ่งเป็นค่าคงที่ที่บ่งบอกถึงการจับกันหรือการหลุดออกจากกันของ โมเลกุล เช่น Receptor (R) และ ligand (L) โดยมีสมการดังต่อไปนี้





ภาพที่ 3.1.16 แสดง Sensogram ขยายที่ได้จากการนำ Polyclonal 1# ไปทดสอบกับโปรตีน NPTII

โดยเมื่อ Inject แอนติบอดี 1# เข้าสู่ระบบพบว่าชิปโปรตีน A จับกับแอนติบอดี 1# ถึงระดับ 11,500 RU ภายในเวลา 180 s (ตำแหน่ง A.) ได้ค่า $K_a = 63 \text{ RU/s}$ จากนั้นระบบจึงฉีดโปรตีน NPTII (ตำแหน่ง B.) พบว่า แอนติบอดี 1 สามารถจับกับโปรตีน NPTII และค่า RU เพิ่มขึ้น 400 RU ภายในเวลา 60 วินาที ได้ค่า $K_a = 6.66 \text{ RU/s}$ และเมื่อทำการ Washing (ตำแหน่ง C.) พบว่าค่า RU ลดลงจาก 400 มาเท่ากับเส้น Reference ใช้เวลา 720 s ค่า K_d ของโปรตีน NPTII และ แอนติบอดี 1# มีค่าเท่ากับ 0.5 RU/s แสดงให้เห็นว่าการจับกันของ โปรตีน NPTII และ แอนติบอดี 1# สามารถตรวจจับ โปรตีน NPTII ซึ่งเป็น Recombinant protein ได้ดี และมีความเสถียรมากโดยใช้เวลาในการหลุดออกจากกันนานโดยมีค่า K_d ต่ำ (0.5 RU/s)

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า แอนติบอดี 1# สามารถนำมาใช้ในการตรวจจับ โปรตีน NPTII บนชิปได้และมีค่า $K_a = 6.66 \text{ RU/s}$ และ $K_d = 0.5 \text{ RU/s}$ ซึ่งในขั้นต่อไปจะเป็นการทดสอบกับโปรตีนในธรรมชาติที่ไม่บริสุทธิ์ และหาค่า LOD จนถึงทดสอบความใช้ได้ต่อไป และทดสอบค่า kinetic แบบ Different concentration series

9. การตรึงแอนติบอดีบน ชิป CM5 แบบโควาเลนต์เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์โปรตีน NPTII

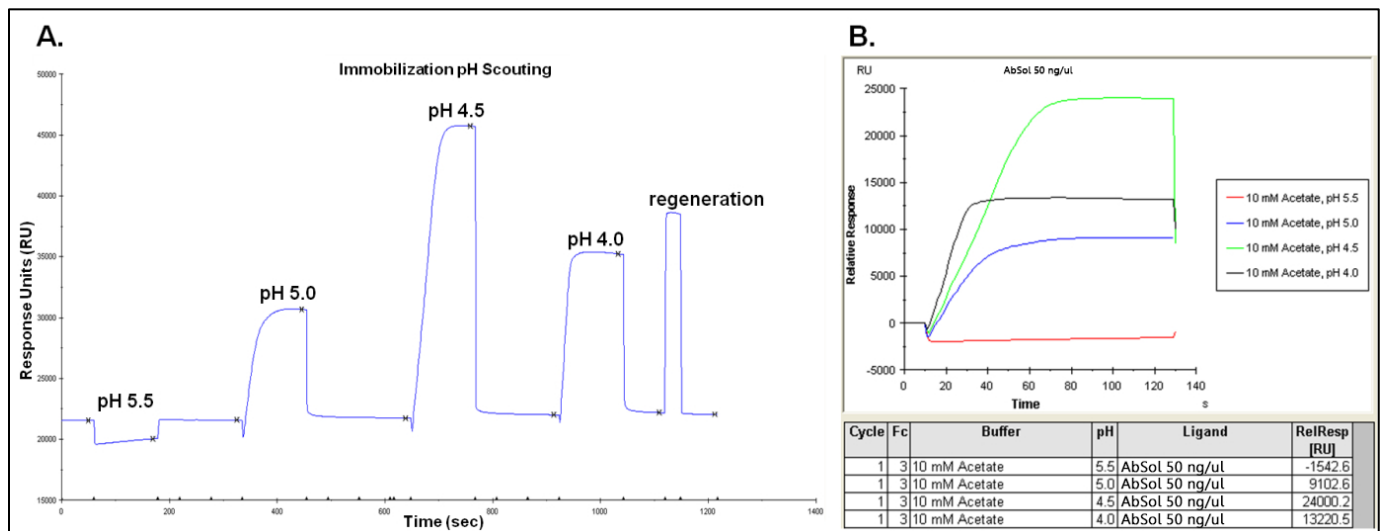
นำ ชิป CM5 ซึ่งประกอบด้วยหมู่ carboxyl สำหรับการทำปฏิกิริยา amine coupling มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมสารละลายสำหรับ amine coupling โดยผสม EDC และ NHS ในน้ำกลั่นกรองด้วย filter 0.2 micron ปริมาตร 10 ml เพื่อให้ได้สารละลาย EDC 400 mM และ สารละลาย NHS 100 mM ตามลำดับ

นำสารละลาย 1.0 M ethanolamine-HCl, HBS-EP buffer, acetate buffers และ regeneration scouting kit มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อการทดลองในขั้นต่อไป

10. การทดสอบค่า pH เพื่อการตรึง Antibody บน ชิป CM5

การทดสอบค่า pH ในการตรึงแอนติบอดีบนชิป CM5 ช่วยให้สามารถระบุค่า pH (optimal pH) ที่เหมาะสมที่จะใช้และค่าความแรงของประจุไฟฟ้า หรือ ionic strength ได้ การทดสอบค่า pH ในขั้นตอนนี้จึงจำเป็นในกรณีที่ต้องการทดลองกับ ชิป ซึ่งเคลือบด้วย carboxymethylated dextran matrix (CM) โดยดำเนินการดังนี้

- นำ ชิป CM5 ซึ่งประกอบด้วยหมู่ carboxyl สำหรับการทำปฏิกิริยา amine coupling ใส่เข้าเครื่อง Biacore
- เตรียมสารละลาย HBS-EP buffer เป็น running buffer
- เตรียมสารละลายแอนติบอดี 100 μ l ความเข้มข้น 50 ng/ μ l ใน 10 mM acetate buffers ที่ pH ที่แตกต่างกัน (4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5)
- ฉีดสารละลายแอนติบอดี ที่ pH ต่างกันเข้าสู่ระบบ 80 μ l และตรวจสอบค่า pH ที่ให้ค่า RU สูงที่สุดแล้วล้าง ชิป ด้วย running buffer
- ฉีดสารละลาย ethanolamine-HCl ความเข้มข้น 1 M 220 μ l เข้าระบบเพื่อล้างชิป

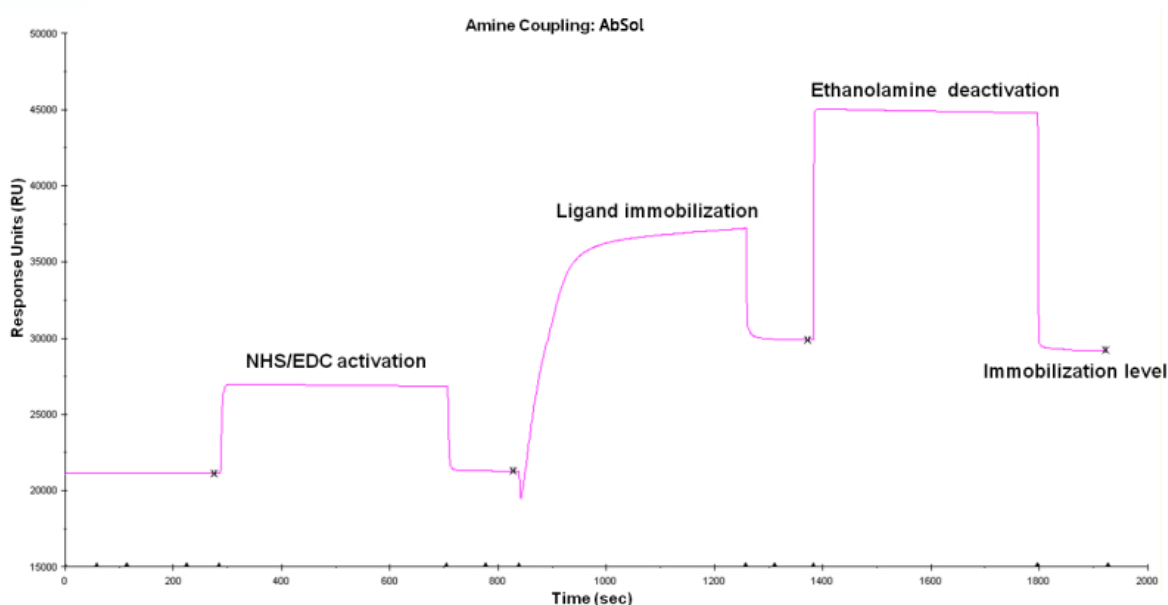


ภาพที่ 3.1.17 A. แสดง RU sensogram ของแต่ละ antibody solution ที่ pH ต่างกัน B. แสดง RU accumulation ของแต่ละ antibody solution ใน 10 mM Acetate ที่ pH ต่างกัน เมื่อเวลาผ่านไป

จากการทดลองพบว่าที่ pH ต่างกัน แอนติบอดีมีความสามารถในการเข้าไปจับกับ ชิป CM5 ต่างกันโดยที่ pH 5.5 พบว่าแทบไม่มีการสะสมของแอนติบอดีบน ชิป เลย ในขณะที่ pH 5 และ 4.5 มีการสะสมของ Antibody บน ชิป เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 9,102.6 RU และ 24,000.2 RU และลดลงที่ pH 4 13,220 RU จึงสามารถสรุปได้ว่าที่ pH 4.5 เป็นค่า pH ที่ดีที่สุดที่สามารถใช้ สำหรับสารละลาย Antibody ในการตรึงบน ชิป CM5

11 การตรึง Antibody บน ชิป CM5

1. เตรียมสารละลาย Antibody ใน 10 mM Acetate ที่ pH 4.5
2. เตรียมหลอดสารละลาย EDC, NHS และ ethanolamine-HCL
3. เมื่อเริ่มเดินเครื่อง ระบบจะฉีด สารละลาย EDC, NHS ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 เพื่อ Activate ผิวของ ชิป เพื่อการตรึง Antibody จากนั้นสารละลาย Antibody จะถูกฉีดเข้าไป และ ethanolamine-HCL จะเป็นตัวชะล้าง Antibody ส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับ ชิป

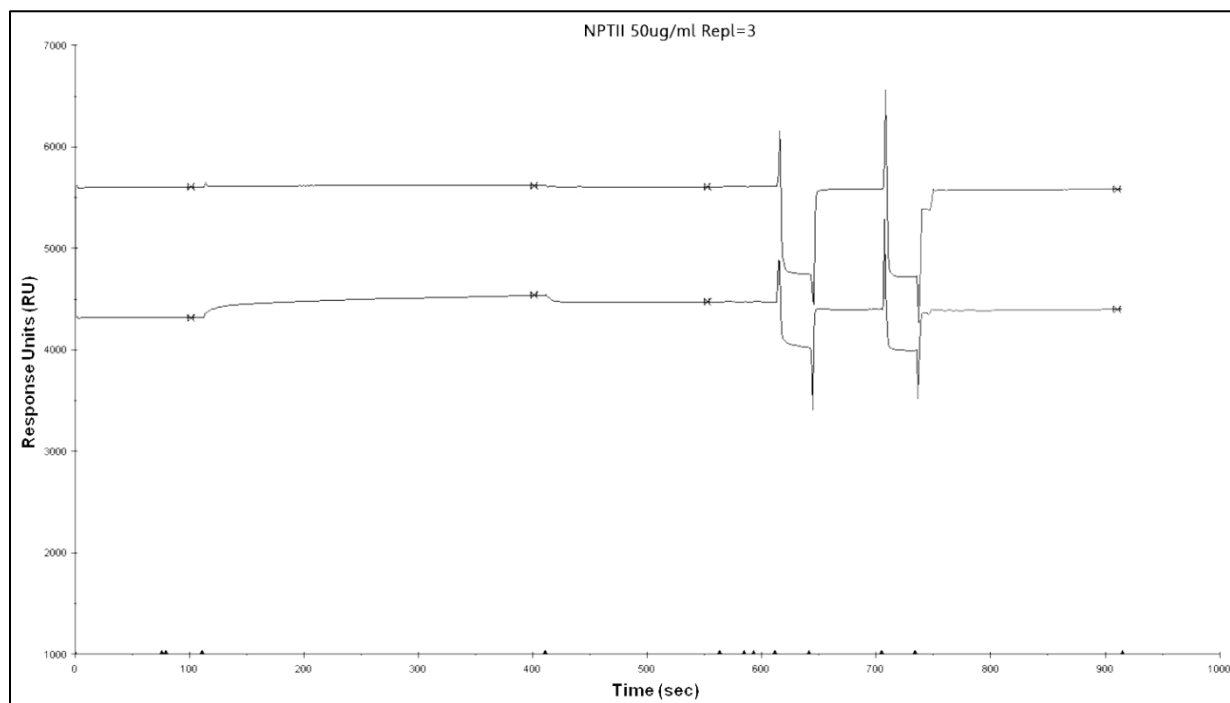


ภาพที่ 3.1.18. แสดง Sensorgram ของ ligand immobilization การตอบสนองการตรึงของ Antibody (Ligand) บน ชิป แสดงถึง ปริมาณของ Antibody (ligand) ที่ตรึงกับ ผิวของ ชิป หลังจากการทำปฏิกิริยา

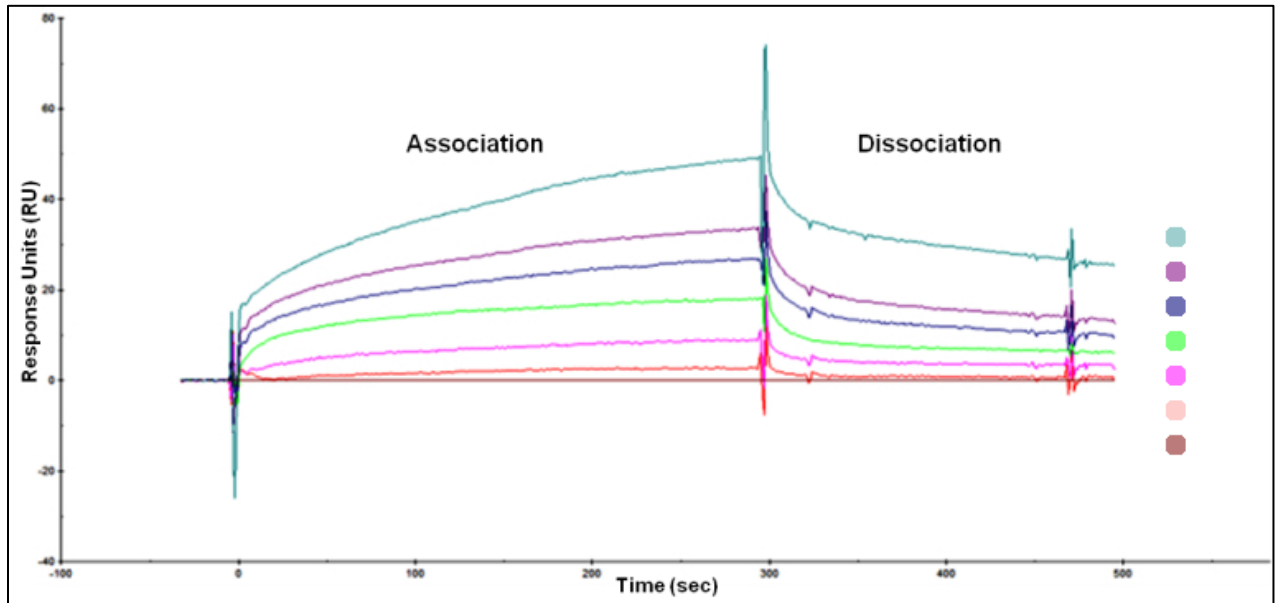
จากการทดลองพบว่า Antibody สามารถตรึงกับ ชิป CM5 แบบ Covalent หรือแบบถาวร โดยมีค่า RU ที่สะสมบน ชิป CM5 Response bound 8,607 RU และหลังจากล้างด้วย Running buffer ได้ Response final 8,083.5 RU

12. การทดสอบความสามารถในการจับโปรตีน NPTII โดย Antibody ชิป CM5

ดำเนินการทดสอบ Regeneration conditions (ผลไม่ได้แสดง) พบว่าใช้ 150 mM NaOH เป็นเวลา 5 นาที ให้ผลการชะล้าง Analyst ที่ดีที่สุด จากนั้นเตรียม โปรตีน NPTII ที่สังเคราะห์ต่อเนื่องในปริมาณมากและทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Colum NTA แล้ว นำมา Dilute เป็น 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อทดสอบความสามารถในการจับโปรตีน NPTII โดย Antibody ชิป CM5 โดยใช้ Blank control เป็นช่อง ชิป ที่ไม่มีการตรึง Antibody และ Negative control เป็น Protein BSA 50 $\mu\text{g/ml}$ โดยระบบจะฉีดตัวอย่างเป็นรอบ ตามด้วย Running buffer และ Regeneration buffer เพื่อขึ้นรอบใหม่ Flow rate 30 $\mu\text{l/min}$, Injection time 5 min โดยแต่ละความเข้มข้นดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 3.1.19 แสดงข้อมูลดิบ Raw sensorgram ของ binding assay หรือการจับกันระหว่าง Antibody และ protein NPTII 50 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 3.1.20 แสดง Final sensorgram ของการจับกันระหว่าง Antibody และ protein NPTII ที่ความเข้มข้นต่างๆ generated โดย BIAevaluation software

จากการทดลอง เมื่อนำ Sensorgram ซึ่งเป็น Binding assay แบบ Raw data ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BIAevaluation สามารถสร้างกราฟ Binding assay ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่า Antibody มีความจำเพาะเจาะจง และไม่พบ signal ใดๆ ในส่วนของ Negative control BSA นอกจากนี้ Antibody CM5 ชิป สามารถตรวจจับโปรตีน NPTII ได้ถึง รกล่าวสามารถนำไปใช้ระดับความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ หรือ 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง สามารถผลิต Recombinant โปรตีน NPTII และทำให้บริสุทธิ์ในปริมาณมากได้ในคุณภาพที่อยู่ในระดับดี ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถนำไปใช้กระตุ้นในการผลิต Polyclonal antibody และเมื่อนำ Recombinant โปรตีน NPTII มาทดสอบการเชื่อมกับชิป NTA พบว่า His-Tag ที่อยู่บน Recombinant โปรตีนสามารถจับกับ Ni^{2+} ได้เป็น Ligand ที่ใช้ทดสอบการจับกันของโปรตีน NPTII และความสามารถในการจับของ Antibody ซึ่งเมื่อนำ Polyclonal Antibody ที่ทำให้บริสุทธิ์มาใช้เชื่อมกับโปรตีน A พบว่าโปรตีน A สามารถจับกับ Antibody ที่ผลิตได้ทุกชนิดและเปลี่ยนเป็น Ligand ซึ่งสามารถจับกับ Analyte ซึ่งเป็นโปรตีน NPTIII ได้ และจากการนำ Antibody มาทำปฏิกิริยา Amine coupling เพื่อเชื่อม Antibody แบบถาวรกับ ชิป CM5 และทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน NPTII พบว่าที่ pH 4.5 มีการสะสมของ Antibody บนชิปมากที่สุด

และเมื่อทดสอบการตรวจจับกับโปรตีน NPTII สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 µg/ml หรือ 5 ng/µl แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

โปรตีนชิปในการตรวจจับหาโปรตีนหรือโมเลกุลเป้าหมาย โดยใช้ Antibody หรือ Ligand ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากและสามารถตรวจหาสารหรือโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้โดยวิธีการที่ไม่ซับซ้อน (เมื่อผลิตชิปและทดสอบความใช้ได้ของชิปเสร็จแล้ว) และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจมีราคาถูก เครื่องมือใช้ได้ง่าย ผู้ปฏิบัติงานสามารถเรียนรู้ได้ภายใน 1 วัน และใช้สารปริมาณน้อยสามารถนำชิปไปพัฒนาและสร้างเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ที่ได้นอกจากการตรวจวิเคราะห์ด้าน GMOs สามารถนำไปพัฒนาใช้กับการตรวจวิเคราะห์ด้านอื่นๆ ได้อีกเช่นกันเช่น การตรวจหาโรคพืชที่ปนเปื้อนในตัวอย่างสินค้าทางการเกษตร การตรวจหาสารเคมีปนเปื้อนหรือสารสำคัญทางการเกษตร เป็นต้น

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

เอกสารอ้างอิง

- Beck E., Ludwig G., Auerswald E. A., Reiss B., Schaller H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Volume 19, Issue 3, Pages 327–336.
- Benoit P. W., Donahue D. W. 2003. Review Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment. J Food Prot.; 66(10):1935-48.
- Bevan M. W., Flavell R. B. & Chilton M.-D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature (London) 304, 184–187.
- Chinowsky T. M., Soelberg S. D., Baker P., Swanson N. R., Kauffman P., Mactutis A., Grow M. S., Atmar R., Yee S. S., Furlong C. E. 2007. Portable 24-analyte surface Plasmon resonance instruments for rapid, versatile biodetection. Biosens Bioelectron. Apr 15; 22(9-10):2268-75.
- EFSA. 2009. Scientific opinion of the GMO and BIOHAZ Panels on the "Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants" European Food Safety Authority 1034: 1-82.

- Dongmei H., Scott R. F., Johnny X. H., Xixia D., Liwen Q., Yuxian P., Yue C., Jing J., Catriona M. , Joe B., Xiaoyan C. and Matthew A. C. 2013. Comparison of surface Plasmon resonance, Resonant Waveguide Grating Biosensing and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Evaluation of a Dengue Virus Immunoassay. *Biosensor*, 3, 297-311
- Florence C. –G., Florian H., Philippe K., Axel-Claude G. 25 July 1981. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *Journal of Molecular Biology* Volume 150, Issue 1, Pages 1–14.
- Gyeong S. B., Suhyeong Cho., Byung-Gee K. 15 December 2005. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. Volume 21, Issue 6, Pages 863–870.
- Jennifer R. N. and Kyu S. C. 2008. NPTII ImmunoStrip® for the Rapid Detection of the Selectable Marker Neomycin Phosphotransferase II in Transgenic Cotton. Beltwide Cotton Conferences January 8-11, Gaylord Opryland Resort and Convention Center Nashville, Tennessee
- Jimenez A., and Davies J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature (London)* 287:869-871.
- Lu Y., Xu W., Kang A., Luo Y., Guo F., Yang R., Zhang J., Huang K. 2007. Prokaryotic expression and allergenicity assessment of hygromycin B phosphotransferase protein derived from genetically modified plants. *J Food Sci. Sep*;72(7):M228-32.
- Mohamed F., Lydia F. and Lorenzo B. 2010. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. . *BMC Biotechnology*, 10:53 doi:10.1186/1472-6750-10-53
- Roland J. N., John M. M., Robert G. B. 1992. Evaluation of an ELISA assay for rapid detection and quantification of neomycin phosphotransferase II in transgenic plants. *Molecular Biology Reporter* August, Volume 10, Issue 3, pp 263-272
- Scott D., Soelberg R. C., Stevens A. P., Limaye and Clement E. F. 2009. Surface Plasmon resonance (SPR) Detection Using antibody-Linked Magnetic Nanoparticles for Analyte Capture, Purification, Concentration and Signal Amplification. *Anal Chem*. Mar 15; 81(6): 2357–2363.
- Shingo N., Rui Y., Takeshi O. and Kiyoshi T. 2013. Sensitive Detection of Capsaicinoids Using a surface Plasmon resonance Sensor with Anti-Homovanillic Acid Polyclonal Antibodies. *Biosensor*, 3, 374-384

- Stevens R. C., Soelberg S. D., Near S., Furlong C. E. 2008 Sep 1. Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface Plasmon resonance Biosensor system. *Anal Chem.*; 80(17):6747-51.
- Straub T. M., Dockendorff B.P., Quiñonez-Díaz M.D., Valdez C.O., Shutthanandan J. I., Tarasevich B. J., Grate J. W., Bruckner-Lea C. J. 2005 Sep. Automated methods for multiplexed pathogen detection. *J Microbiol Methods.* 62(3):303-16.
- Suratman A., Ughude J. O. and Sismindari. 2013. Detection of nptII Gene and 35SCaMV Promoter in Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *J.Food Pharm.Sci.* 1 ,10-13
- Yi X., Arica A. L., Alan J. H. and Kevin W. P. August 26, 2005. Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor† Volume 44, Issue 34, pages 5456–5459.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

ประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาในเรื่องการตรวจพบการปนเปื้อนพืช GMOs ในสินค้าเกษตรของไทย และต่างประเทศได้ใช้ประเด็นเรื่อง GMOs เป็นมาตรการกีดกันทางการค้าในการส่งออกสินค้าเกษตร ดังนั้นประเทศไทยจำเป็นต้องมีระบบตรวจสอบย้อนกลับที่มีประสิทธิภาพ และได้มาตรฐาน เพื่อควบคุมสินค้าเกษตรทั้งการนำเข้าส่งออก และการผลิตสินค้าเกษตรให้ปลอดภัยการปนเปื้อนพืช GMOs จึงจำเป็นต้องวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม

วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจรับรองสินค้าพืชตัดแปรพันธุกรรมให้ได้ตามมาตรฐานสากล และรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นมาตรฐานของ ISO/IEC17025 และเพิ่มศักยภาพในการตรวจสอบรับรองสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร
- 2) เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน เพื่อใช้คัดกรองคุณภาพพืช GMOs ในภาคสนาม หรือสามารถติดตามการแพร่กระจายพืชตัดแปรพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็วตลอดจนภาคเอกชนสามารถคัดกรองวัตถุดิบ
- 3) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลแบบไบโอเซนเซอร์ เพื่อพัฒนาเป็น Protein chip ใช้ในการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ

ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล

ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สินค้าเกษตรรูปแบบต่างๆ เพื่อให้ได้คุณภาพดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ตรวจจำแนกทางชีวโมเลกุล การศึกษาดีเอ็นเอตัวตรวจ (primers และ probes) รวมถึงการออกแบบเพื่อใช้จำแนกยีนที่มีความจำเพาะเจาะจง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ Real-time PCR และการพัฒนาการตรวจแบบ Multiplex Real-time PCR รวมไปถึงการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification

กิจกรรมที่ 2 วิจัยพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีซีรัมวิทยา

พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA เชิงพาณิชย์ เพื่อตรวจโปรตีน CP4EPSPS ของถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมโดยการสังเคราะห์ยีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม แล้วโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด expression vector จากนั้นถ่ายโอน พลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์โปรตีนตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน ทำโปรตีนบริสุทธิ์ให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายในลักษณะผงแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจง (specificity) และค่าความเจือจาง (dilution) ของโปรตีนที่ยังคงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี CP4EPSPS เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีนถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม (ELISA kit) ในเชิงพาณิชย์โดยนำ recombinant protein CP4EPSPS ที่บริสุทธิ์มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดี CP4EPSPS มาใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการแสดงผลการวิเคราะห์ถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการนำเข้าชุด ELISA kit จากต่างประเทศ พร้อม

ทั้งผลก้นองค์ความรู้การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA สู่ภาคเอกชนและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

กิจกรรมที่ 3 วิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีไบโอเซนเซอร์

ศึกษาวิธีการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance โดยผลิตรีคอมบิแนนท์ โปรตีนจาก ยีน *nptII* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตโพลีโคลนอล แอนติบอดีโดยกระตุ้นด้วยแอนติเจนสังเคราะห์จากยีน *nptII* ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิด Interaction ระหว่าง โพลีโคลนอล แอนติบอดีและ โปรตีนNPTII โดยเทคนิค Surface Plasmon Resonance นำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการผลิตชุดตรวจสำเร็จรูป และโปรตีนชิปเพื่อตรวจจับโปรตีน NPTII

ผลการวิจัย

1. ได้เทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล เพื่อการตรวจสอบรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรในการขอรับรอง ISO/IEC17025 และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจให้รวดเร็ว

1.1. การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของตัวอย่างมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 และ PRSV-SC

1.2. วิจัยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรม Mon 810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

1.3. ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ CaMV 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี Multiplex real-time PCR

2. ได้เทคนิค LAMP สามารถนำไปใช้ตรวจคัดกรองเผ่าระวังการปนเปื้อนข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในหน่วยงานส่วนภูมิภาคได้

3. ได้เทคนิคเพื่อจำแนกสายพันธุ์มะละกอ GMOs แบบ Construct specific และดีเอ็นเอตัวตรวจ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนมะละกอ GM ซึ่งสามารถจดสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรได้

4. ได้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์สำหรับตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรม ชุดตรวจได้ใช้เวลาในการตรวจสอบรวมทั้งขั้นตอนไม่เกิน 5 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์กับวิธี Real-time PCR พบว่า ชุด ELISA ต้นแบบเชิงพาณิชย์มีค่าความถูกต้องของชุดตรวจสอบร้อยละ 90

5. ได้เทคนิคการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance สามารถตรวจจับกับโปรตีนได้ถึงความเข้มข้นที่ 5 µg/ml หรือ 5 ng/µl แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของโปรตีนชิปที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายที่ปริมาณต่ำได้เป็นอย่างดี เทคนิคนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

คุณสมบัติ/จุดเด่นของผลิตภัณฑ์หรือเทคโนโลยีที่ได้รับ

1. ข้อมูลใหม่ที่ค้นพบจากงานวิจัย: ได้วิธีการตรวจและโครงสร้างของ Construct specific ของ มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตรวจพบในประเทศไทย
2. ได้ชุดตรวจสอบ ELISA kit นำไปใช้ตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม สำหรับภาครัฐและภาคเอกชน เพื่อคัดกรองถั่วเหลืองที่เป็นวัตถุอันตรายและในแปลงเกษตรกร และกระบวนการผลิตโปรตีน CP4EPS5 แห่งแบบเยือกแข็งที่สามารถนำไปใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน
3. ได้โพลีโคลนอล แอนติบอดี (IgG) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน NPTII ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม และเทคนิคการตรวจจับโปรตีน NPTII โดย Polyclonal antibody ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance ในการตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัย

1. เพิ่มศักยภาพในการส่งออกสินค้าเกษตรของไทย โดยการตรวจตามมาตรฐานสากล เพื่อให้ประเทศคู่ค้าเกิดความมั่นใจในการออกรับรอง
2. กรมวิชาการเกษตร. ได้ชุดตรวจสอบ ELISA kit เชิงพาณิชย์ และสามารถขยายผลโดยถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับภาคเอกชน
3. ประเทศไทยส่งออกสินค้าเกษตรได้มากขึ้น เพิ่มรายได้ให้กับประเทศ โดยการควบคุมมาตรฐานสินค้าเกษตรไม่ให้เกิดการปนเปื้อนพืช GMOs ทำให้
4. รองรับ พรบ.กักพืช และ พรบ.ความปลอดภัยทางชีวภาพ ในการควบคุมพืช GMOs ตลอดจนการพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์

กลุ่มเป้าหมายที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร และภาคเอกชนที่มีห้องปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม
2. เจ้าหน้าที่และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

ควรมีการวิจัยต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจสอบไบโอเซนเซอร์ ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว สามารถตรวจได้หลายๆ ยีน ในครั้งเดียว