การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

Standard Plasmids Construction for Genetically Modified Soybean and Maize Detection

ประสาน สืบสุข [1] กิ่งกาญจน์ พิชญกุล [1] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ [1]
กุหลาบ คงทอง [1] อลงกรณ์ กรณ์ทอง [1]

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการทุกครั้ง ต้องใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของพลาสมิดจัดเป็นวัสดุอ้างอิงชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุม และเปรียบเทียบการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการสร้างสิ่งประดิษฐ์ ที่เป็นวัสดุอ้างอิงในรูปแบบของพลาสมิดสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ขึ้นใช้เอง เพื่อทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่าผลิตเอง 15 เท่า ส่งผลให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างลดลง

การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน CP4EPSPS จากดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และยีน Lectin จากถั่วเหลืองที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม นำชิ้นส่วนของยีนทั้งสองเชื่อมต่อกันอยู่ในพลาสมิด ให้ชื่อดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ว่า pStdDOA/GMO1 เมื่อนำไปทดสอบความถูกต้อง พบว่าดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นถือเป็นวัสดุอ้างอิงที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างถูกต้อง และจากการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ MON810 จากดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 ชิ้นดีเอ็นเอของ Bt176 จากดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 และชิ้นดีเอ็นเอของยีน Zein จากดีเอ็นเอข้าวโพดไม่ดัดแปลงพันธุกรรม โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ MON810 และ Zein ที่ได้มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันอยู่ในพลาสมิด ให้ชื่อว่าดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO2 ส่วนชิ้นของดีเอ็นเอ Bt176 และ Zein ได้นำมาต่อเข้าด้วยกันอยู่ในพลาสมิด ให้ชื่อว่าดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO3 เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งสองไปทดสอบความถูกต้อง พบว่าดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งสองจัดเป็นวัสดุอ้างอิงที่สามารถนำไปใช้การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างถูกต้อง

ดังนั้นดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1, pStdDOA/GMO2 และ pStdDOA/GMO3 ที่สร้างขึ้นจัดเป็นนวัตกรรมของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประหยัดต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้มาก

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาการเกษตรอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ที่ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืช ต้านทานต่อโรคและแมลง และมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น ในประเทศไทยการผลิตถั่วเหลือง และข้าวโพด เพื่อใช้ภายในประเทศยังไม่เพียงพอ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งอาจจะมีการปะปนของถั่วเหลือง หรือข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทมีการตัดต่อยีน CP4EPSPS เพิ่มเข้าไปจึงทำให้ถั่วเหลืองที่ถูกตัดต่อสารพันธุกรรมสามารถสร้างเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ได้ในปริมาณมาก มีคุณสมบัติในการต้านสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Takabataka *et al*, 2011) ส่วนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 มีการตัดต่อยีน *cry1Ab* มีผลทำให้ข้าวโพดที่ถูกตัดต่อสารพันธุกรรมนี้สามารถผลิตโปรตีนที่เปรียบเสมือนกับเป็นสารฆ่าแมลง เมื่อหนอนกินพืชที่มียีน *cry1Ab* เข้าไปจะทำลายระบบย่อยอาหาร และตายในที่สุด (Van *et al.,*1989) สำหรับข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt176 ประกอบด้วยยีน *cry1Ab* จำนวน 2 ชุด ที่มีการผลิตโปรตีนในการทำลายระบบย่อยอาหารของแมลงเช่นเดียวกัน แต่อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือพืชเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเป็นอาหารและวัตถุดิบในการผลิตอาหารยังเป็นที่ถกเถียงกันระหว่างข้อดี คือการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนอาหารของโลก แต่มีข้อวิตกกังวลเกี่ยวกับผลกระทบที่มีต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม หลายประเทศจึงได้ออกกฎหมายเพื่อควบคุมการนำเข้าและการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม อีกทั้งผู้บริโภคมีการเรียกร้องให้มีการติดฉลากสินค้าหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ห้างสรรพสินค้าบางแห่งได้ออกมาตรการให้สินค้าที่จะนำมาวางขายต้องมีหนังสือรับรองว่าเป็นสินค้าที่ไม่ใช่พืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือไม่ได้ใช้วัตถุดิบที่ผลิตจากพืชดัดแปลงพันธุกรรม (ขนิษฐา และคณะ, 2553) ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมต้องเป็นวิธีมาตรฐาน และผลการตรวจวิเคราะห์ต้องถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่ยอมรับของสากล ห้องปฏิบัติการตรวจพืชดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่ยอมรับการตรวจหาการปนเปื้อนของพืชอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะตำแหน่งที่ต้องการในหลอดทดลอง นอกจากนี้ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องทราบถึงปริมาณการปนเปื้อน โดยกำหนดให้อาหารที่มีการปนเปื้อนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมมากกว่า 0.9% ขึ้นไป ต้องแสดงฉลาก เป็นต้น (มณี, 2547)

วิธีการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใดนั้น การตรวจในห้องปฏิบัติการทุกครั้ง ต้องใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของ พลาสมิดจัดเป็นวัสดุอ้างอิงชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์การปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งต้องมีส่วนของยีนแปลกปลอมที่ใส่เข้าไปในพืช และยีนปกติที่มีอยู่แล้วในพืชนั้นเชื่อมต่ออยู่

ด้วยกัน ซึ่งยีน Lectin ที่อยู่ในถั่วเหลือง และยีน Zein ที่อยู่ในข้าวโพด จัดเป็นยีนปกติที่สามารถนำมาใช้ได้ ที่ผ่านมาได้มีการใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด โดย Allnutt *et al.,* (2005) ได้สร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน pMON810 ที่มีส่วนยีน MON810 และ pSSIIB มียีน Maize starch synthase II B เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Takeshi (2001) ได้ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีส่วนของ CaMV35S promoter และ NOS terminator เป็นดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิงถึงปริมาณการปนเปื้อนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR

จึงทำการทดลองสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบของพลาสมิดเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม เป็นการสร้างวัสดุอ้างอิงขึ้นใช้เองของกรมวิชาการเกษตร เพื่อทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่าการผลิตได้เองถึง 15 เท่า ส่งผลให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างลดลงมากด้วย ซึ่งในแต่ละปีห้องปฏิบัติการที่รับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม ต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก นับว่าการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานขึ้นใช้เอง เป็นประโยชน์อย่างมากต่อห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมของกรมวิชาการเกษตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนชิ้นส่วนของยีน CP4EPSPS, Lectin จากถั่วเหลือง และ MON810, Bt176, Zein จากข้าวโพด ที่มีและไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม

2. สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดที่ประกอบด้วย CP4EPSPS และ Lectin เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

3. สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดที่ประกอบด้วย MON810 และ Zein เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810

4. สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิดที่ประกอบด้วย Bt176 และ Zein เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt176

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (ตัวอย่างส่งตรวจหมายเลข Gm11533) และถั่วเหลืองไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (พันธุ์เชียงใหม่ 60) ตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดบดละเอียด ที่มีการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ERM-BF413f) และที่มีการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ERM-BF411f) และข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (พันธุ์ NSX042029)

2. ชุดน้ำยา สารเคมี และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยชีวโมเลกุล

วิธีการ

การดำเนินการประกอบด้วย 2 กิจกรรมดังนี้

กิจกรรมที่ 1. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

1.1 การโคลนยีน CP4EPSPS และ Lectin

สืบค้นข้อมูลของยีน CP4EPSPS และ Lectin ของถั่วเหลือง จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI วิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีนเข้าด้วยกัน และออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยนำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมไปเพิ่มปริมาณยีน CP4EPSPS สำหรับยีน Lectin ใช้ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมในการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน นำชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณได้นำไปเชื่อมต่อ (cloning) เข้ากับพลาสมิด pGEM-T easy และส่งผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสในแต่ละชิ้นส่วนยีน

1.2 การสร้างชุดยีน CP4EPSPS และ Lectin

นำพลาสมิดที่ได้รับยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่มีการตรวจสอบความถูกต้องแล้วจากข้อ 1.1 มาสร้างเป็นชุดยีนประกอบด้วย CP4EPSPS + Lectin โดยนำพลาสมิดทั้งสองมาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ Nde*I* จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกันโดยเติมเอ็นไซม์ T4 DNA Ligase และนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเลือกเฉพาะชิ้นที่มีการเชื่อมต่อกันของยีน CP4EPSPS + Lectin ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นำตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันไปใส่ไว้ในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย ตรวจสอบความถูกต้องของโคลนโดยวิธีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิคพีซีอาร์

1.3 การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีนเป้าหมาย CP4EPSPS และ Lectin เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และมีดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และน้ำเป็นตัวควบคุมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

กิจกรรมที่ 2. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

2.1 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ MON810, Bt176 และ Zein

สืบค้นข้อมูลของยีน MON810, Bt176 และ Zein ของข้าวโพด จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI วิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีนเข้าด้วยกัน และออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยนำดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 ไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ MON810 ส่วนดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ Bt176 สำหรับดีเอ็นเอของข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอยีน Zein นำตัวอย่างชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณได้นำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCR8/GW/TOPO และส่งผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสในแต่ละชิ้นส่วนยีน

2.2 การสร้างชุดยีน MON810 + Zein และ Bt176 + Zein

นำพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ MON810, Bt176 และ Zein ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้วจากข้อ 2.1 มาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ Asc*I* แล้วนำไปสร้างเป็นชุดยีน 2 ชุด คือชุดยีนที่ 1 ประกอบด้วย MON810 + Zein และชุดยีนที่ 2 ประกอบด้วย Bt176 + Zein จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกันตามชุดของยีนโดยใช้เอ็นไซม์ T4 DNA Ligase และนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเลือกเฉพาะชิ้นที่มีการเชื่อมต่อกันของยีน MON810+Zein และ Bt176+Zein ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับยีนแต่ละชุด นำตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันไปใส่ไว้ในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย ตรวจสอบความถูกต้องของโคลนโดยวิธีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและเทคนิคพีซีอาร์

2.3 การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีนเป้าหมาย MON810+Zein และ Bt176+Zein เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานโดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 และ Bt176 โดยมีดีเอ็นเอของข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวเปรียบเทียบผลการตรวจสอบ และมีน้ำเป็นตัวควบคุมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2550 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

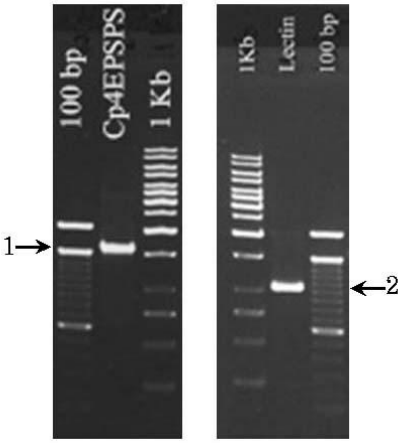
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

กิจกรรมที่ 1. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

1.1 การโคลนยีน CP4EPSPS และ Lectin

ผลการค้นหาลำดับเบสของยีน CP4EPSPS และ Lectin ในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI พบข้อมูลยีน CP4EPSPS ใน Accession no. AB209952 มีขนาด 2,457 คู่เบส สำหรับยีน Lectin ของถั่วเหลืองพบใน Accession no. K00821 มีขนาด 2,152 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของยีนทั้งสอง พบว่าไม่มีตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Sal*I,* Nde*I* และ Sac*I* จึงได้นำลำดับเบสของเอ็นไซม์ดังกล่าวไปเติมที่ตำแหน่งปลายด้านปลาย 5’ และ 3’ ของแต่ละยีน ทั้งนี้เพื่อใช้ในการตัดต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกัน ได้ออกแบบการจัดวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยยีน CP4EPSPS ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ไว้ที่ปลายด้านปลาย 5’ ด้วยเอ็นไซม์ Nde*I* ส่วนปลายด้านปลาย 3’ ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดด้วยเอ็นไซม์ Sac*I* ส่วนยีน Lectin ได้ออกแบบการวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ไว้ที่ปลายด้านปลาย 5’ ด้วยเอ็นไซม์ Sal*I*

ส่วนปลายด้านปลาย 3' ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดด้วยเอ็นไซม์ Nde*I* จะเห็นได้ว่า**การออกแบบการวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ได้ออกแบบให้มีจุดตัดของเอ็นไซม์ Nde*I* ปรากฏอยู่บนสายดีเอ็นเอของทั้งสองยีน ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการต่อยีนทั้งสองเข้าด้วยกัน** จากการนำข้อมูลลำดับเบสที่มีการดัดแปลงดังกล่าว ไปออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CP4EPSPS ส่วนไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน Lectin คือ Gmlectin-F และ Gmlectin-R เมื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณยีน CP4EPSPS จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,595 คู่เบส ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน Lectin จากถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,025 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแต่ละยีนมีเพียงแถบเดียวเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณนั้น มีความจำเพาะกับยีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และมีความจำเพาะกับยีน Lectin ของถั่วเหลืองปกติ โดยชิ้นดีเอ็นเอของยีน CP4EPSPS และ Lectin สามารถนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T easy และถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 ได้สำเร็จ สามารถตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งมีสีขาวเป็นจำนวนมาก จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิค Single Colony PCR พบว่าทุกโคโลนีที่มีสีขาวมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ทุกโคโลนี แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความถูกต้องในระดับการเรียงลำดับของสารพันธุกรรม จึงได้ทำการแยกสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียที่มีโคโลนีเป็นสีขาว นำไปหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่แทรกตัวอยู่ในเวคเตอร์ pGEM-T easy ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R พบว่าลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนทั้งสองที่โคลนได้ มีการเรียงตัวของลำดับเบสเหมือนกับยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่มีรายงานไว้แล้ว จึงสรุปได้ว่ายีนทั้งสองที่โคลนได้มีความถูกต้อง



ภาพที่ 1 ขนาดของชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS ที่เพิ่มปริมาณได้จากถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (ลูกศร 1) และขนาดของชิ้นส่วนยีน Lectin ที่เพิ่มปริมาณได้จากถั่วเหลืองปกติ (ลูกศร 2)

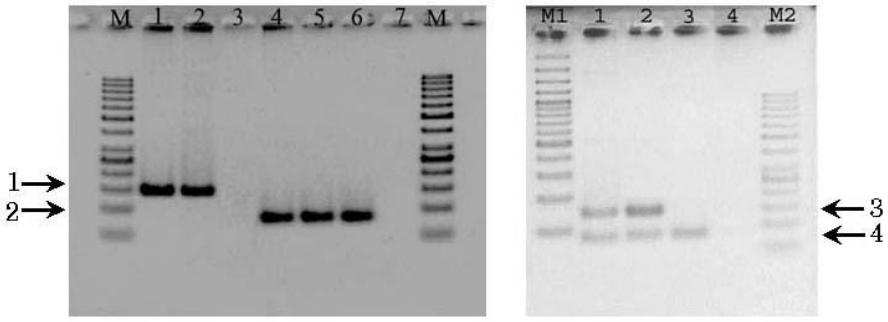
1.2 การสร้างชุดยีน CP4EPSPS และ Lectin

พบว่าสามารถนำพลาสมิดที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS และ Lectin มาตัดและต่อเข้าด้วยกันได้สำเร็จ โดยการตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Nde*I* แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ CP4EPSPS กับ Lectin เข้าด้วยกันด้วยเอ็นไซม์ T4 DNA Ligase โอกาสการเชื่อมต่อกันของชิ้นดีเอ็นเอนั้น มีลักษณะเป็นแบบสุ่ม มี 3 แบบ คือ (1). CP4EPSPS ต่อกับ CP4EPSPS (2). Lectin ต่อกับ Lectin และ (3). CP4EPSPS ต่อกับ Lectin แต่ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันของ CP4EPSPS ต่อกับ Lectin เท่านั้น ผลจากการคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาด 2,620 คู่เบส จึงเป็นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องตามที่คาดหวังไว้ ซึ่งเกิดจากการต่อเชื่อมรวมกันระหว่างยีน CP4EPSPS และ Lectin โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันนี้ สามารถนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียได้ เมื่อตรวจคัดเลือกโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอ CP4EPSPS และ Lection เชื่อมอยู่ด้วยกันโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ พบว่าได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอดังนี้ (1). Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,620 คู่เบส (2). Gmlectin-F และ Gmlectin-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,025 คู่เบส และ (3). CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,595 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเป็นขนาดที่ตรงกับค่าที่คาดหมายไว้ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบโคลนเป้าหมายเพื่อยืนยันผลให้ชัดเจนโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ Sac*I,* Nde*I* และ Sal*I* พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมี 3 ขนาด คือ 1,025 1,595 และ 2,817 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีน Lectin, CP4EPSPS และเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO ตามลำดับ

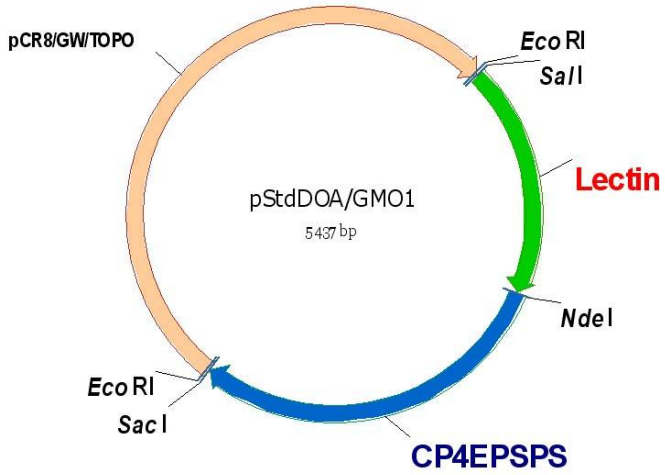
1.3 การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

ผลจากการนำพลาสมิดของโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นยีน CP4EPSPS และ Lectin เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกันไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และมีดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่มี และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ Sttmr3a และ Sttmr2a สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 146 คู่เบส ในดีเอ็นเอมาตรฐาน และในถั่วเหลืองที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และเมื่อตรวจสอบยีน Lectin ซึ่งเป็นยีนพื้นฐานที่อยู่ในถั่วเหลือง ด้วยไพรเมอร์ Sltm1 และ Sltm2 ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 99 คู่เบส ซึ่งพบได้ทั้งในดีเอ็นเอมาตรฐาน ถั่วเหลืองที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และถั่วเหลืองไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ได้ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสอง 2 คู่ ผสมกันในปฏิกิริยาพีซีอาร์หลอดเดียวกัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งขนาด 146 และ 99 คู่เบส ที่เกิดจากการตรวจสอบเพียงครั้งเดียว จึงเป็นการลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างลงอีกวิธีหนึ่ง (ภาพที่ 2) ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นได้ให้ชื่อว่า pStdDOA/GMO1 ซึ่งประกอบด้วยชุดยีนของ CP4EPSPS และLectin ที่อยู่ในพลาสมิด pCR8/GW/TOPO (ภาพที่ 3) จัดเป็นวัสดุอ้างอิงที่เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบของพลาสมิด ที่ผลิตขึ้นเองที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพตามมาตรฐานสากล เพื่อทดแทนการนำเข้า

วัสดุอ้างอิงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่าการผลิตเองถึง 15 เท่า ส่งผลให้ช่วยประหยัดต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้มาก



ภาพที่ 2 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานโดยใช้ไพรเมอร์ Sttmr3a + Sttmr2a ลูกศร 1 และ Sltm1 + Sltm2 ลูกศร 2 ที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ชนิด คือ pStdDOA/GMO1 (ช่องที่ 1,4) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 2,5) และ ถั่วเหลืองที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 3,6) สำหรับช่องที่ 7 เป็นน้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยมี 50 bp. DNA Ladder (M) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอ (ภาพด้านซ้าย) และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ดังกล่าวผสมกัน (ลูกศร 3 = Sttmr3a + Sttmr2a, ลูกศร 4 = Sltm1 + Sltm2) ที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ชนิด คือ pStdDOA/GMO1 (ช่องที่ 1) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 2) และ ถั่วเหลืองที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 3) สำหรับช่องที่ 4 เป็นน้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยมี 100 bp. DNA Ladder (M1) และ 50 bp. DNA Ladder (M2) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอ (ภาพด้านขวา)

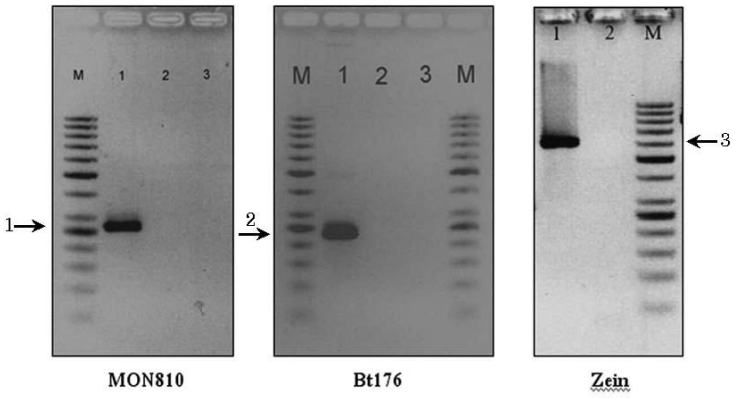


ภาพที่ 3 แผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1 ที่มีส่วนประกอบของชิ้นส่วนของยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่อยู่ภายในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO

กิจกรรมที่ 2 การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

2.1 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ MON810, Bt176 และ Zein

ผลการค้นหาลำดับดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810, Bt176 และ Zein ในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI พบว่าข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 Accession no. AF434709 มีขนาด 927 คู่เบส และ AY326434 มีขนาด 4,180 คู่เบส สำหรับ Bt176 Accession no. AJ878607 มีขนาด 821 คู่เบส ส่วนยีน Zein พบในข้าวโพด Accession no. M23537 มีขนาด 2,562 คู่เบส และได้คัดเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมกับการออกแบบไพรเมอร์ MON810, Bt176 และ Zein อีกทั้งเป็นตำแหน่งที่สามารถเติมลำดับเบสของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของ AscI, SalI, BamHI และ NdeI ได้ที่ปลายทางด้าน 5' และ 3' โดย MON810 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ MON810.BamHI.SalI และ MON810.AscI.NdeI ส่วน Bt176 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ Bt176.BamHI.SalI และ Bt176.AscI.NdeI สำหรับยีน Zein ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ Zein.NdeI.AscI และ Zein.SalI.BamHI เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณยีน MON810, Bt176 และ Zein จากดีเอ็นเอของข้าวโพดที่มี และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า MON810 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ขนาด 268 คู่เบส ส่วน Bt176 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ได้ขนาด 234 คู่เบส สำหรับชิ้นส่วนของยีน Zein สามารถเพิ่มปริมาณได้ขนาด 621 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแต่ละยีนมีเพียงแถบเดียวเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณนั้น มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอที่อยู่ภายในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 และ Bt176 และมีความจำเพาะกับยีน Zein ที่มีในข้าวโพดทั่วไป และสามารถนำชิ้นดีเอ็นเอของยีน MON810, Bt176 และ Zein ไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot Mach1-T1R ได้สำเร็จ เมื่อตรวจสอบความถูกต้องในระดับการเรียงลำดับของสารพันธุกรรมของชิ้นยีน MON810, Bt176 และ Zein ที่แทรกตัวอยู่ในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO ด้วยไพรเมอร์ GW1 และ GW2 พบว่าชิ้นยีน MON810 ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนตรงกับ 2 Accession คือ Accession no. AF434709 ตรงกับเบสด้านด้านปลาย 3' และ Accession no. AY326434 ตรงกับเบสด้านปลาย 5' ซึ่งเป็นลำดับเบสในตำแหน่งบริเวณรอยต่อระหว่างลำดับเบสของยีนแปลกปลอมที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของจีโนมของข้าวโพด และเป็นบริเวณที่มีเพียงตำแหน่งเดียว สำหรับลำดับเบสของชิ้นยีน Bt176 ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนกับ Accession no. AJ878607 ส่วนลำดับเบสของชิ้นยีน Zein เมื่อเปรียบเทียบแล้วตรงกับ Accession no. M23537 แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ MON810, Bt176 และ Zein ที่โคลนได้มีความถูกต้อง จึงสรุปได้ว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ MON810, Bt176 และ Zein สามารถนำไปใช้สร้างชุดของยีนตามที่ต้องการได้



ภาพที่ 4 ขนาดของชิ้นส่วนยีน MON810 (ลูกศร 1) และ Bt176 (ลูกศร 2) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 1), ดีเอ็นเอข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 2), น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ช่องที่ 3) และขนาดของชิ้นส่วนยีน Zein (ลูกศร 3) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดปกติ (ช่องที่ 1) และ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ช่องที่ 2) โดยมี 50 bp. DNA Ladder (M) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

2.2 การสร้างชุดยีน MON810 + Zein และ Bt176 + Zein

ผลการสร้างชุดยีน MON810 + Zein และ Bt176 + Zein พบว่าสามารถนำพลาสมิดที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนยีนเป้าหมายมาตัดและต่อเข้าด้วยกันได้ โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ AscI และต่อแต่ละชิ้นดีเอ็นเอเข้าด้วยกันโดยใช้เอ็นไซม์ T4 DNA Ligase ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างยีน MON810 + Zein ได้ขนาด 889 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ที่เกิดจากการรวมกันของชิ้นยีน MON810 และ Zein อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างยีน Bt176 + Zein ได้ขนาด 829 คู่เบส และเป็นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างยีน Bt176 และ Zein โดยชุดยีนที่มีการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอทั้งสองชุด สามารถนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียได้ ผลการใช้เทคนิคพีซีอาร์ยืนยันความถูกต้องของการคัดเลือกโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอ MON810 และ Zein เชื่อมอยู่ด้วยกัน โดยตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ พบว่าได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอดังนี้ (1). MON810.BamHI.SalI และ Zein.SalI.BamHI ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 889 คู่เบส (2). MON810.BamHI.SalI และ MON810.AscI.NdeI ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 268 คู่เบส และ (3). Zein. NdeI.AscI และ Zein.SalI.BamHI ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 621 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเป็นขนาดที่ตรงกับค่าที่คาดหมายไว้ทุกขนาด นอกจากนี้ได้ตรวจสอบโคลนเป้าหมายโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมี 2 ขนาด คือ 899 และ 2,799 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีน MON810+Zein และเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO ตามลำดับ สำหรับผลการใช้เทคนิคพีซีอาร์ยืนยันความถูกต้องของการคัดเลือกโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอ Bt176 และ Zein เชื่อมอยู่ด้วยกัน จากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ พบว่าได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอดังนี้ (1). Bt176.BamHI.SalI และ Zein.SalI.BamHI ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 829 คู่เบส (2). Bt176.BamHI.SalI และ Bt176.AscI.NdeI ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 208 คู่

เบส และ (3). Zein. NdeI.AscI และ Zein.SalI.BamHI ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 621 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเป็นขนาดที่ตรงกับค่าที่คาดหมายไว้ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบโคลนเป้าหมายโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมี 2 ขนาด คือ 839 และ 2,799 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีน Bt176+Zein และเวคเตอร์ pCR8/GW/ TOPO ตามลำดับ

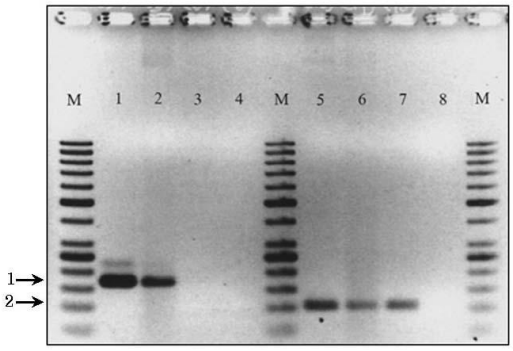
2.3 การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

ผลการทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นยีน MON810+Zein เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกันด้วยเทคเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 และมีดีเอ็นเอของข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าพลาสมิดที่มีชิ้นยีน MON810+Zein เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ 81-80-L และ 81-80-R สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 170 คู่เบส ในดีเอ็นเอมาตรฐาน และในข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และเมื่อตรวจสอบยีน Zein ซึ่งเป็นยีนพื้นฐานที่อยู่ในข้าวโพด ด้วยไพรเมอร์ Zein-1-L และ Zein-1-R สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 104 คู่เบส ซึ่งพบได้ทั้งในดีเอ็นเอมาตรฐาน ข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม(ภาพที่ 5) ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นได้ให้ชื่อว่า pStdDOA/GMO2 ซึ่งประกอบด้วยชุดยีนของ MON810 และ Zein ที่อยู่ในพลาสมิด pCR8/GW/TOPO (ภาพที่ 7) สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810

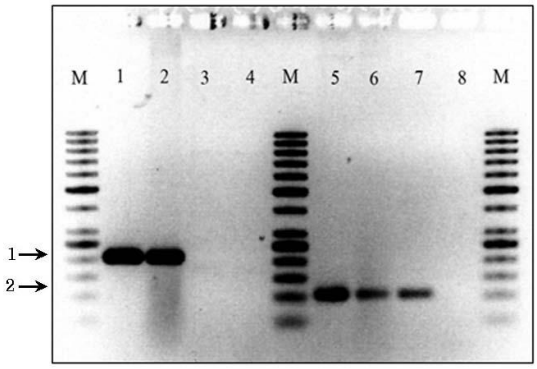
ผลจากการนำพลาสมิดของโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นยีน Bt176+Zein เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกันไปตรวจสอบด้วยเทคเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 และมีดีเอ็นเอของข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ 54-97-L และ 54-97-R สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 209 คู่เบส ในดีเอ็นเอมาตรฐาน และในข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และเมื่อตรวจสอบยีน Zein ซึ่งเป็นยีนพื้นฐานที่อยู่ในข้าวโพด ด้วยไพรเมอร์ Zein-1-L และ Zein-1-R สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 104 คู่เบส ซึ่งพบได้ทั้งในดีเอ็นเอมาตรฐาน ข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (ภาพที่ 6) ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นได้ให้ชื่อว่า pStdDOA/GMO3 ซึ่งประกอบด้วยชุดยีนของ Bt176 และ Zein ที่อยู่ในพลาสมิด pCR8/GW/TOPO (ภาพที่ 8) สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176

ดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1, pStdDOA/GMO2 และ pStdDOA/GMO3 (โดย p หมายถึง พลาสมิด, Std หมายถึง มาตรฐาน, DOA หมายถึง กรมวิชาการเกษตร, GMO หมายถึงสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม และ 1, 2 และ 3 หมายถึง ลำดับที่ของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้สร้างขึ้น) เป็พลาสมิดที่ได้เก็บไว้ในแบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ One Shot Mach 1 T1R สามารถนำไปเพิ่มปริมาณได้ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะ Spectinomycin และสกัดพลาสมิดนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพ

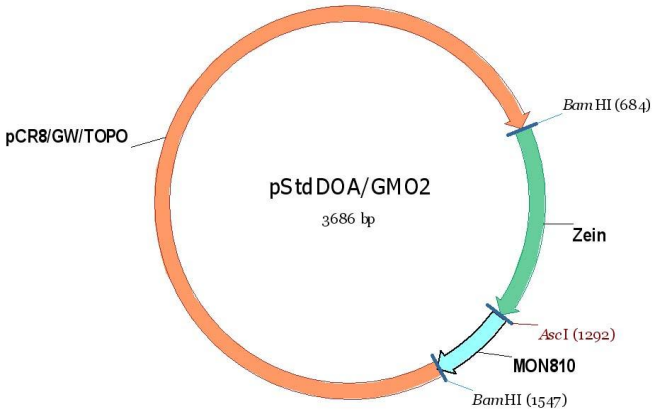
ได้ทันที แต่ในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ไปใช้เปรียบเทียบในเชิงปริมาณ จำเป็นต้องทำพลาสมิดให้อยู่รูปของสายตรง (linearised plasmid) โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีจุดตัดเพียงครั้งเดียว และมีตำแหน่งตัดที่ต้องอยู่ภายนอกชิ้นส่วนของยีน เช่น pStdDOA/GMO1 ใช้เอ็นไซม์ Sac*I* หรือ Sal*I* ส่วน pStdDOA/GMO2 และ pStdDOA/GMO3 สามารถใช้เอ็นไซม์ Apa*I* และ EcoRV จากนั้นแยกดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกต้องและแน่นอน เพื่อนำปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไปคำนานหาจำนวน copy number สำหรับใช้เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค Quantitative Real-time PCR ต่อไป



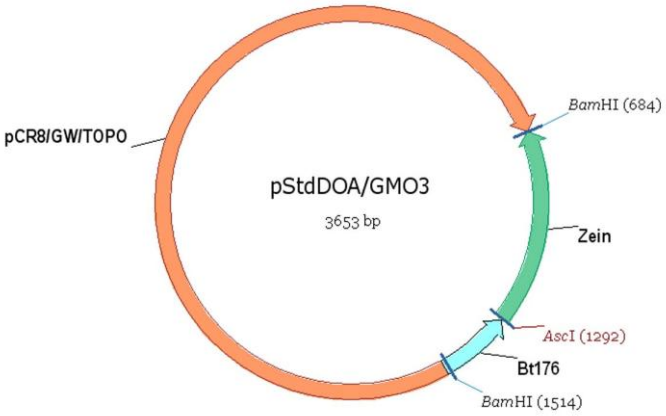
ภาพที่ 5 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO2 โดยใช้ไพรเมอร์ 81-80-L + 81-80-R (ลูกศร 1) และ Zein-1-L + Zein-1-R (ลูกศร 2) ที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ชนิด คือ pStdDOA/GMO2 (ช่องที่ 1,5) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 (ช่องที่ 2,6) และข้าวโพดที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 3,7) สำหรับช่องที่ 4 และ 8 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยมี 50 bp. DNA Ladder เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ (ช่อง M)



ภาพที่ 6 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO3 โดยใช้ไพรเมอร์ 54-97-L + 54-97-R R (ลูกศร 1) และ Zein-1-L + Zein-1-R R (ลูกศร 2) ที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ชนิด คือ pStdDOA/GMO3 (ช่องที่ 1,5) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 (ช่องที่ 2,6) และ ข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (ช่องที่ 3,7) สำหรับช่องที่ 4 และ 8 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยมี 50 bp. DNA Ladder เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ (ช่อง M)



ภาพที่ 7 แผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO2 ที่มีส่วนประกอบของชิ้นส่วนของยีน MON810 และ Zein ที่อยู่ภายในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO



ภาพที่ 8 แผนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO3 ที่มีส่วนประกอบของชิ้นส่วนของยีน Bt176 และ Zein ที่อยู่ภายในเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถโคลนชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS, Lectin, MON810, Bt176 และ Zein จากถั่วเหลืองและข้าวโพดที่มี และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ประสบผลสำเร็จ ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และได้ผ่านการตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมแล้วพบว่ายีนมีความถูกต้องและตรงกับลำดับของยีนที่ได้รายงานไว้แล้ว นอกจากนี้ได้นำยีนที่โคลนได้ไปผ่านกระบวนการตัดและต่อเข้าด้วยกัน เพื่อสร้างเป็นชุดของยีนที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ทำให้ได้ดีเอ็นเอมาตรฐาน จำนวน 3 ชุด คือ (1) pStdDOA/GMO1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ที่ประกอบด้วย

ส่วนของยีน CP4EPSPS และ Lectin (2) pStdDOA/GMO2 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON810 ที่ต้านทานต่อหนอนเจาะฝักข้าวโพด ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีน MON810 และ Zein และ (3) pStdDOA/GMO3 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Bt176 ที่ต้านทานต่อหนอนเจาะฝักข้าวโพด ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีน Bt176 และ Zein

ดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งสามชุดเชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pCR8/GW/TOPO เก็บไว้ในแบคทีเรีย ซึ่งสามารถผลิตออกมาใช้งานได้ง่ายมาก โดยการนำแบคทีเรียไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพได้ทันที แต่ถ้าต้องการนำดีเอ็นเอมาตรฐานเหล่านี้ไปใช้เปรียบเทียบในเชิงปริมาณ แนะนำให้ทำพลาสมิดให้อยู่สภาพของสายตรงโดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีจุดตัดเพียงครั้งเดียว และมีตำแหน่งตัดที่ต้องอยู่ภายนอกชิ้นส่วนของยีน แล้วจึงแยกดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกต้องและแน่นอน ก็จะได้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถนำไปหาปริมาณดีเอ็นเอในระดับที่เป็นจำนวน copy number ได้ทันที ผลจากการทดลองนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานนำไปใช้ในการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานของยีนต่าง ๆ ที่มีการใส่เข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างได้นี้มีประสิทธิภาพสูง ได้มาตรฐานสากล จึงนับเป็นวัสดุอ้างอิงของกรมวิชาการเกษตรที่นำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1 ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ และใช้เปรียบเทียบปริมาณการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อสารจำกัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready) ส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO2 และ pStdDOA/GMO3 นำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ และใช้เปรียบเทียบปริมาณการปะปนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ MON810 และ Bt176 ที่ต้านทานต่อหนอนเจาะฝักข้าวโพด ซึ่งทำให้ห้องปฏิบัติการตรวจสอบวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรม ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชสำหรับการออกใบรับรองปลอดพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อการนำเข้าส่งออกตาม พรบ. กักพืช จำนวนมากสามารถลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ พร้อมให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่แม่นยำ รวดเร็ว ทำให้การให้บริการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพสูง

2. ผลงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานของยีนต่าง ๆ ที่มีการใส่เข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด เช่น ข้าว Bt63, ข้าวโพด StarLink และพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่น ๆ ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก ต้องตรวจวิเคราะห์จำนวนมากขึ้นทุกปี และมีพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น ทั้งในรูปยีนเดียว และหลายยีน ซึ่งกรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานรับผิดชอบ ในการตรวจรับรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมและสินค้าเกษตรส่งออก ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างได้เองนี้ ตรวจวิเคราะห์ได้ผลมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับของต่างประเทศ เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐาน ISO 17025 ทำให้สินค้าเกษตรส่งออก สามารถ

ส่งออกได้ตามเวลา และตามมาตรฐานสากล และยังสามารถผลิตดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อแบ่งปันให้ห้องปฏิบัติการอื่นที่ต้องตรวจสอบพืช หรืออาหารดัดแปลงพันธุกรรม ในอนาคตดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นนี้สามารถถ่ายทอดไปยังภาคเอกชน โดยความร่วมมือระหว่างกรมวิชาการเกษตรและภาคเอกชน จะทำให้สามารถผลิตเป็นการค้าต่อไปได้

3. เป็นประโยชน์ในทางเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นใช้เองนี้สามารถทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่าผลิตเอง 15 เท่า โดยไม่ต้องสูญเสียเงินตราออกไปต่างประเทศ อีกทั้งยังส่งผลให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างลดลง นับเป็นการสร้างวัสดุอ้างอิงที่เป็นนวัตกรรมใหม่ของกรมวิชาการเกษตร ที่ก้าวหน้า และเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

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

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

มณี ตันติรุ่งกิจ. 2547. การตรวจสอบจีเอ็มโอในอาหาร. *วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง*. 18(1) : 5-8.

Allnutt, T.R., Hird, H. Chisholm., Oehlschlager, O. and Henry C. M. 2005. Plasmid Standards for Real Time PCR and GM Enforcement Testing. www.gm-inspectorate.gov.uk/documents /PLASMID.pdf.

Takeshi Matsuoka. 2001. GMO Labeling and Detection Methods in Japan. http//apec.biotec.or.th/pdf/ MrTakeshiMatsuoka.

Takabatake, R., Akiyama, H., Sakata, K., Onishi, M., Koiwa,T., Futo Satoshi., Minegishi, Y., Teshima, R., Mano, j., Jurui, S., and Kitta K. 2011. Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean A2704-12. *Food Hyg. Saf. Sci.* 52 : 100-107.

Van, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. and Van H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringienesis* Delta-endotoxins. Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-gut of Target insects. *Eur J Biochem* 186 : 239-247.

Oguchi, T., Onishi, M., Minegishi, Y., Kurosawa, Y., Kasahara, M., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, Sl, Furui, S., Hino, A. and Kitta K. 2009. Development of Quantitative Duplex Real-Time PCR Methodfor Screening Analysis of Genetically Modified Maize. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 50 : 117-125.