การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

Developing of Real-time PCR Technique for Detection of Genetically Modified Soybean and Processed Food

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ พยุงศักดิ์ รวยอารี ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์0[1]

ประสาน สืบสุข อัญชลี ศรีสุวรรณ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร1[2]

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Quantitative analysis of GM soybean and processed food derived from GM materials by real-time PCR was compared on four DNA extraction methods; a) guanidium-chloroform method, b) GeneScan extraction method, c) silica based DNA extraction method and d) PVP based DNA extraction method. Genomic DNA from 2 samples of seed 4 samples of soybean meal and 14 different types of processed food were extracted by 4 different DNA extraction methods. Genomic DNA of each samples was then divided into 2 sets. The first set of genomic DNA was not purified, while the second set was purified by using Wizard® Miniprep DNA Purification Kit before performing PCR. Quality of genomic DNA of each samples was also determined by amplifying lectin gene. It was showed that the guanidium-chloroform method included purification step was as good as the GeneScan extraction method as determined by efficiently producing the DNA expected band. This indicated that the guanidium-chloroform and GeneScan extraction method was the most suitable for the sample type as seed and soybean meal, while the suitable DNA extraction method for processed food samples depended on the content and processing method of each processed food.

รหัสกิจกรรม 05-01-47-07

รหัสการทดลอง 05-01-47-0701 , 0703

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

[2] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

Improvement of quantitative analysis of GM soybean by Real-time PCR was tested with 2 sets of primers and probes. It was found that the 145 bp and 81 bp DNA fragment of CP4EPSPS and lectin gene, were successfully amplified using primer pair (sttmf3a/sttm2a and sltm1/sltm2) and probe (Sttmpa and Sltmp) respectively. The quantity of amplified DNA fragments was directly proportional to the log concentration of DNA template and the minimum level of GM soybean DNA was detected at 0.1%.

GM soybean and food were widely distributed through the world. To survey an amount of GMOs contamination in Thailand, 316 samples of soybean meal and seed and 140 samples of processed product derived from soybean seed were collected for GMO detection. Initially, genomic DNA of all samples were extracted and detected for CaMV 35S promoter and Nos terminator. All positive samples were then quantitatively analysed for GMO contamination by Real-time PCR. It was found that 47 out of 316 samples of soybean meal and seed were contaminated with GM material. The most contaminated GM soybean seeds was imported from Agentina which comprised of 19 out of 47 contaminated samples. The amount of GMO contamination was 23 - 100%. The GM soybean seeds from Brazil, USA and India which comprised of 10, 6 and 3 out of 47 contaminated samples were rank the 2^{nd}, 3^{rd} and 4^{th} respectively and the amount of GMO contamination was 2.3-100%, 86.5-100% and 2-100% respectively. The GM soybean from Urukwai, Canana and Republic of Arabemilet was found only one sample which was 100%, 88.9% and 100%. 6 out of 47 contaminated GM soybean sample were from unidentified country which comprised of 0.5-100% GMO contamination.

For processed product samples, there were 13 out of 140 samples only contaminated with GMO. These processed samples were all derived from soybean seed. 5, 5 and 3 contaminated processed product were animal feed, soy protein and soy flour which comprice of 0.4-27.8%, 0.1-0.2% and 0.7-3.6% GMO contamination respectively.

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมกับเมล็ด และกากถั่วเหลือง โดยใช้จำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่างได้แก่ เมล็ด 2 ตัวอย่าง และ กากถั่วเหลือง 4 ตัวอย่าง สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูป ใช้จำนวนตัวอย่าง 14 ตัวอย่างได้แก่ ซอสมะเขือเทศ, ซอสดิบ, ซีอิ๊วดิบ, เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง, เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง, ข้าวโพดครีมกระป๋อง, สาหร่ายอบกรอบ, เต้าหู้ถั่วเหลือง, มะเขือเทศกระป๋อง, ผงปรุงรส 5 ชนิด มีวิธีการสกัด DNA 4 วิธีคือ guanidinium-chloroform method, GeneScan extraction method, Silica based DNA extraction method และ PVP based DNA extraction method หลังจากได้ DNA แล้วแบ่ง DNA ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องทำ DNA ให้บริสุทธิ์ กลุ่มที่ 2 ทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit วัดผลโดยการตรวจประสิทธิภาพ และคุณภาพที่ปราศจากสารยับยั้งของ DNA ในการทำ PCR โดยการตรวจคุณภาพของยีน lectin ซึ่งมีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองและยีนพืชด้วยวิธี PCR ผลการทดลองพบว่าวิธีสกัด DNA ที่เหมาะสมกับเมล็ดและกากถั่วเหลืองคือ วิธี guanidinium-chloroform และผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit เป็นวิธีที่ดีที่สุด เทียบเท่ากับวิธี GeneScan extraction และ ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกัน สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูปผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์แปรรูปและขบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเริ่มจากการออกแบบและคัดเลือกคู่ primers และ probe จำนวน 2 ชุด นำมาศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready และ lectin ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าคู่ primers sttmf3a/sttm2a และ probe Sttmpa สามารถเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ส่วน CP4 EPSPS ขนาด 145 bp และคู่ primers sltm1/sltm2 และ probe Sltmp เพิ่มปริมาณยีน lectin ขนาด 81 bp ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ของความเข้มข้นของ DNA และสามารถตรวจปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ได้ในปริมาณต่ำสุดถึง 0.1%

การสำรวจข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองจำนวน 316 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจำนวน 140 ตัวอย่าง นำมาสกัด DNA เพื่อตรวจหาถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ปนเปื้อน GM ด้วยวิธี PCR โดยตรวจหายีน 35S CaMV promoter และ Nos terminator เพื่อเป็นการตรวจหาพืช GM เบื้องต้น หลังจากนั้นนำ DNA

ที่ตรวจพบยีนทั้งสองมาตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนพืช GM ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าจากการสำรวจถั่วเหลืองจำนวน 316 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยจำนวนถั่วเหลืองนำเข้าที่ปนเปื้อน GM มากที่สุดได้แก่ประเทศอาร์เจนตินามีจำนวน 19 ตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 23-100% รองลงมาคือบราซิลพบจำนวน 10 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 2.3-100%, สหรัฐอเมริกาพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 86.5-100%, อินเดียพบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 2-100%, อุรุกวัยพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 100%, แคนาดาพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรต พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้าพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ปนเปื้อน 0.5-100%

สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูปพบว่า ปนเปื้อน GMOs มาจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองทั้งหมด พบว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปนเปื้อนได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.4 - 27.8%, โปรตีนถั่วเหลืองพบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.1 - 0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.7-3.6%

คำนำ

จากสถานการณ์การปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงการค้าทั่วโลก พบว่าในปี 2546 มีประเทศปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก 18 ประเทศ คิดเป็นพื้นที่ปลูก 67.7 ล้านเฮกแตร์ ซึ่งเพิ่มขึ้น 9 ล้านเฮกแตร์ หรือ 15% จากปี 2545 โดยสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศที่มีพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมากที่สุดคือ 42.80 ล้านเฮกแตร์ รองลงมาได้แก่ อาร์เจนตินามีพื้นที่เพาะปลูก 13.9 ล้านเฮกแตร์ แคนาดา 4.40 ล้านเฮกแตร์ บราซิล 3.0 ล้านเฮกแตร์ และจีน 2.8 ล้านเฮกแตร์ (James, 2003) พืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุดคือ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือที่เรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready ซึ่งเป็นของบริษัทมอนซานโต้ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) และในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกเป็นจำนวนมาก ด้วยการปรับปรุงยีนใหม่ๆ เพื่อตัดต่อในพืช จึงทำให้ประเทศหลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป เมื่อเดือนกรกฎาคม 2546 ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับ (Traceability and Labelling of GMOs and Food and Feed Products Produced from GMOs (EC) No.1830/2003) ที่เข้มงวดกว่าเดิมและมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 เมษายน 2547 กฎระเบียบดังกล่าวนี้กำหนดให้ต้องมีการตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการ

ทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะต้องติดฉลากด้วย โดยในกฎระเบียบเดิมสินค้าดังกล่าวไม่จำเป็นต้องติดฉลาก มีการระบุข้อความว่า “ This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547)

จากกฎระเบียบดังกล่าวส่งผลให้ประเทศไทยต้องประสบปัญหาและอุปสรรคมากเป็นพิเศษในการส่งสินค้าเกษตรออก เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า และอาจแอบแฝงการกีดกันทางการค้าไว้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองหรือมีส่วนผสมของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (GM) เนื่องจากประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองภายในประเทศไม่เพียงพอ จึงต้องมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองสำหรับเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์แปรรูป ด้วยการนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมัน ผลิตอาหารเพื่อบริโภค เช่น เต้าหู้ น้ำเต้าหู้ ซีอิ๊ว ฯลฯ หรือกากถั่วเหลืองที่นำมาแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น การนำเข้าถั่วเหลืองของไทย ส่วนใหญ่สั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศที่เป็นแหล่งปลูกถั่วเหลือง GM ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะปนเปื้อนด้วยถั่วเหลือง GM และการส่งออกของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองก็มีโอกาสที่จะผลิตจากถั่วเหลือง GM เช่นเดียวกัน

ในขณะเดียวกันภายในประเทศเองประชาชนและผู้บริโภคก็มีความวิตกกังวลเกี่ยวกับการบริโภคอาหาร GM และมีการเรียกร้องให้มีการติดฉลากสินค้า หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของ GM ห้างสรรพสินค้าบางแห่งได้ออกมาตรการให้สินค้าที่จะนำมาวางขาย ต้องมีหนังสือรับรองว่าเป็นสินค้าที่ไม่ใช่ GM หรือไม่ได้ใช้วัตถุดิบที่ผลิตจาก GM นอกจากนี้ในหลายประเทศที่ซื้อสินค้าเกษตรของไทยได้กำหนดข้อจำกัดของส่วนผสมอาหาร GM โดยระบุเป็นจำนวนเปอร์เซ็นต์ของพืช GM ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในเชิงปริมาณ (quantitative) สามารถระบุการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM เป็นเปอร์เซ็นต์ได้ งานตรวจสอบการปนเปื้อน GM ในสินค้าเกษตรเป็นเทคโนโลยีค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย จึงจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GM ให้มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และเชื่อถือได้ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตร GM และสร้างมาตรการควบคุม ตรวจสอบ และออกหนังสือรับรองสินค้าพืช Non-GM

การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืช GM ให้มีประสิทธิภาพจำเป็นอย่างยิ่งต้องพัฒนาวิธีการสกัด DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานที่สุด และสำคัญ คุณภาพและปริมาณของ DNA นับว่ามีความสำคัญมากต่อการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมในตัวอย่างพืชหรือผลิตภัณฑ์อาหารGM เนื่องจากว่ามีสารมากมายหลายชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแปลกปลอมในขั้นตอนการตรวจที่เกิดขึ้นระหว่างการสกัดDNA สารเหล่านี้รวมถึงโปรตีน น้ำมัน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารพวก Phenolic compound ที่มีอยู่ในพืชเอง หรืออาจเป็นสารเคมีต่างๆ ซึ่งใช้ในการสกัด DNA เช่น Phenol, SDS และ EDTA ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ DNA Taq polymerase ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) หรือ Real-time PCR ได้ และอาจนำไปสู่การแปลผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาด ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง นับได้ว่ามีส่วนช่วยทำให้ DNA ที่สกัดได้มีทั้งปริมาณและคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณของสารพันธุกรรมแปลกปลอมได้ นอกจากนี้ในอาหารที่ผ่านกรรมวิธีขั้นสูง เช่นผ่านกระบวนการกลั่น อบภายใต้ความดัน ความเป็นกรด/ด่างสูง หรือผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์บางชนิด DNA อาจถูกทำให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการตรวจสอบ ส่วนอาหารบางชนิดที่มีส่วนประกอบของสารเคมี เช่น ไนเตรทในผลิตภัณฑ์อาหารจะมีผลต่อการทำงานของ polymerase ในปฏิกิริยา PCR หรืออาหารบางชนิดที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง มักพบการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรตใน DNA ที่สกัดได้ จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR ดังนั้นการใช้วิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสม และการปรับวิธีการให้มีความจำเพาะ เช่น พัฒนาวิธีการสกัด DNA เฉพาะต่อชนิดของอาหาร เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนสารยับยั้งดังกล่าว อาจช่วยแก้ปัญหาได้ ความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง DNA ความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอนั้นๆ ความบริสุทธิ์ในที่นี้จะรวมถึงการปราศจากซึ่งสารที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน ซึ่งส่วนใหญ่มักปนมาในขณะที่สกัด DNA นอกจากคุณภาพของ DNA เป็นปัจจัยสำคัญ แล้วขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR ซึ่งปัญหาดังกล่าวจะพบในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ความดัน หรืออุณหภูมิสูง หรือที่ผ่านคลื่นเสียง ผ่านการปั่น homoginize เป็นเวลานาน ผ่านกระบวนการที่เป็นกรดด่างสูง ผ่านเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องทดสอบการปนเปื้อนด้วยสารยับยั้ง และคุณภาพ DNA ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย PCR ทุกครั้ง (ปิยะศักดิ์, 2543 ; ขนิษฐา, 2545 ; Wurz *et al.,* 1999)

โดยทั่วไปการตรวจสอบพืช GM นิยมตรวจหายีนที่ตัดต่อเข้าไปในพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งห้องปฏิบัติการหลายแห่งได้ใช้เทคนิคนี้เป็นมาตรฐานในการให้บริการตรวจวิเคราะห์สินค้า GM เนื่องจากเป็นวิธีการที่แม่นยำและมีความไวในการตรวจสอบ ทำได้ภายในเวลารวดเร็ว และสามารถตรวจสอบสินค้าเกษตรที่ถูกแปรรูปเป็นอาหารได้ แต่วิธีการนี้ก็มีข้อจำกัดคือ

ไม่สามารถระบุปริมาณการปนเปื้อนของพืช GM ได้ จึงนิยมใช้เทคนิค PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาพืช GM เบื้องต้นก่อนว่ามีพืช GM ปนเปื้อนหรือไม่ แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

การตรวจวิเคราะห์พืช GM หรือผลิตภัณฑ์พืช GM ในเชิงปริมาณ วิธีที่นิยมและเป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คือ Real-time PCR (Berdal and Holst-Jensen, 2001) ซึ่งเป็นการนำเอาเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลอง โดยตรวจผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR นี้สามารถตรวจวิเคราะห์พืช GM ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ในเชิงคุณภาพด้วยสี SYBR Green I เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของผลผลิต PCR ด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากสี SYBR Green I ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า Ethidium Bromine โดยสี SYBR Green I จะเรืองแสงก็ต่อเมื่อไปจับกับ DNA เกลียวคู่ ตรงบริเวณที่เป็น Minor groove เท่านั้น โดยความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของผลผลิต PCR ที่เพิ่มขึ้น และปริมาณของ DNA Template เริ่มต้นที่แตกต่างกันจะทำให้จำนวนรอบที่เริ่มต้นตรวจจับสัญญาณมีความแตกต่างกันด้วย สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ในเชิงปริมาณ โดยนำ Hybridization probe ซึ่งอาจเป็น 1 หรือ 2 probe ก็ได้ มาใช้สำหรับการตรวจสอบและหาปริมาณ DNA ที่ให้ความจำเพาะสูงในการจำแนกผลผลิต PCR โดยการเติม Hybridization probe ที่ถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนส์ และวิเคราะห์ปริมาณของผลผลิต PCR ด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ ที่ถูกปลดปล่อยออกมา (สุรเทพ และ ปธานพร, 2543 ; Berdal and Holst-Jensen, 2001)

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ในวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป โดยตรวจหาตัวยีน (transgene) ที่ตัดต่อในถั่วเหลือง ด้วยวิธี Real-time PCR ตลอดจนหาวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิด เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง และกากถั่วเหลือง
2. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Thermal Cycler PERKIN ELMER 9700)
3. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA แบบ Real-time PCR (LightCycler)
4. เครื่องวัดสารละลาย DNA (GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech)
5 UV transilluminator
6. เครื่อง electrophoresis
7. เครื่อง centrifuge
8. vortex mixer
9. water bath
10. เครื่องบดเมล็ด
11. ตู้เย็น 4°C
12. ตู้เย็น -20°C
13. ถั่วเหลือง GM ชนิด Roundup Ready (certified reference materials (CRM IRMM-410))
14. ถั่วเหลือง Non GM (certified reference materials (CRM IRMM-410))
15. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัด DNA
16. คู่ primers เพื่อใช้เพิ่มปริมาณยีน ในปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคู่ primers ลำดับเบส และ ยีนที่เพิ่มปริมาณ ในปฏิกิริยา PCR

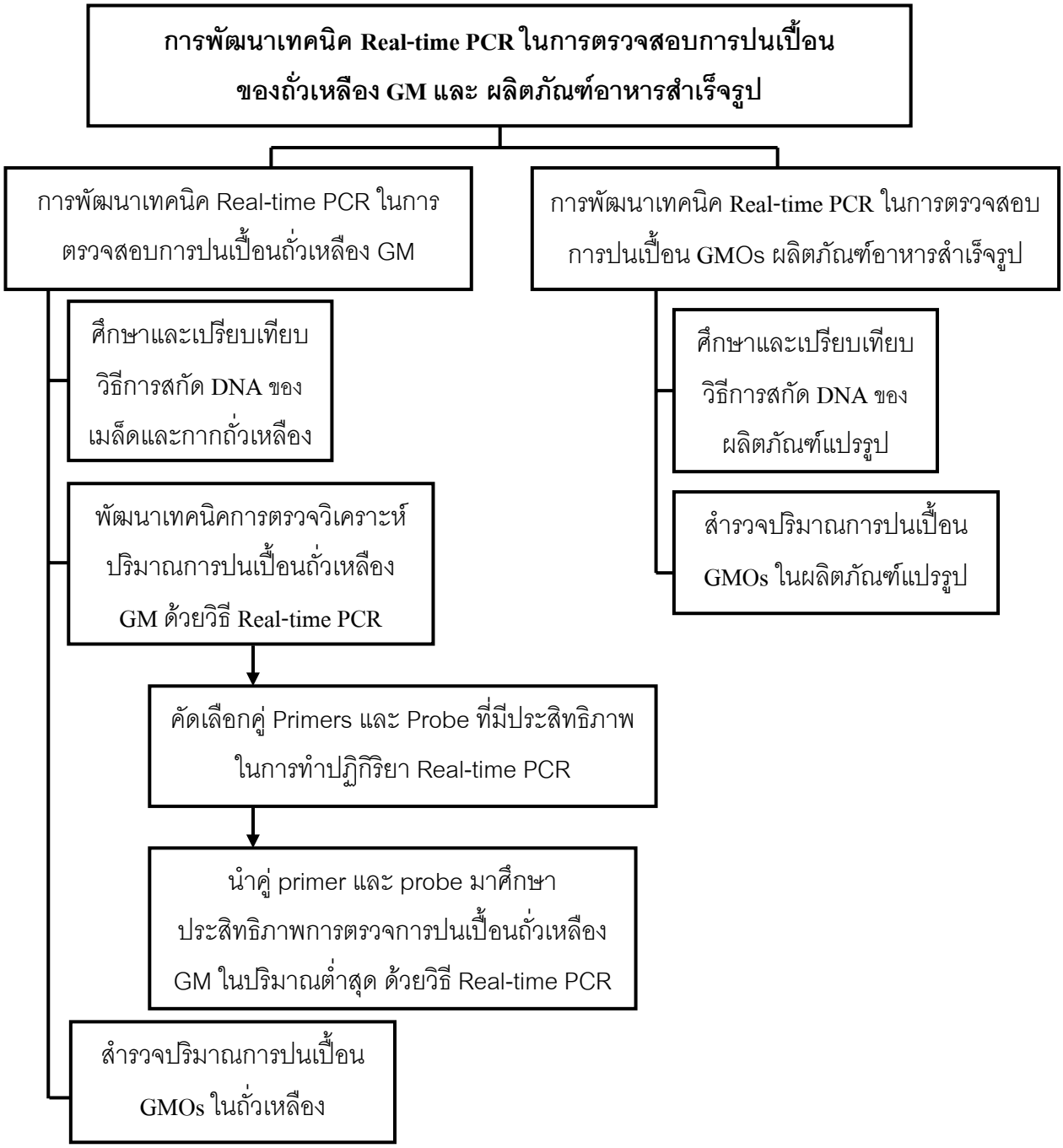
ชื่อ primer	ลำดับเบส	ยีน
Lec1 primer	5'-GACGCTATTGTGAGCTCCTC-3'	Lectin
Lec2 primer	5'-TGTCAGGGCCATAGAAGGTG-3'	
35SF	5'-CCACGTGTTCAAACCAAGTGG-3'	CaMV 35S Promoter
35SR	5'-TCCTCTGCAAATGAAATGAACTTCC-3'	
Nos1	5'-GAATCGTGTTGCCGCTCTTG-3'	Nos terminator
Nos2	5'-TTATCGTAGTTTGCGCGCTA-3'	
Zein-F	5'-CCTATAGCTTCGCTTCTTCC-3'	Zein
Zein-R	5'-TGCTCTAATAGCGCTGATGA	
ITS5	5'-GGAACCAGAAGTCGTAACAAGG-3'	ITS
26S-25R	5'-TATGCTTAAACTCAGCGCGT-3'	

วิธีการ

แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ

1. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM

2. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อน GMOs ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดลองของงานวิจัยการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และ ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

<u>การทดลองที่ 1</u> การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

นำตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองจำนวน 6 ตัวอย่างได้แก่ เมล็ด 2 ตัวอย่าง และ กากถั่วเหลือง 4 ตัวอย่าง มาบดให้เป็นผงละเอียด โดยสุ่มตัวอย่างละ 0.5 กรัม นำมาสกัด DNA โดยใช้วิธีการสกัด DNA 4 วิธีคือ guanidinium-chloroform (Studer *et al*. 1997, ISO 21571, 2002), GeneScan extraction, Silica based DNA extraction (Boyle and Lew, 1995, ISO 21571, 2002) และ polyvinyl-pyrrolidone (PVP) based DNA extraction (Kim *et al*., 1997 and ISO 21571, 2002) (รายละเอียดดูในภาคผนวก) หลังจากได้ DNA แล้วแบ่ง DNA เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ กลุ่มที่ 2 ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit ทำกรรมวิธีละ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง GeneQuant II RNA/DNA Calculator ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำมาตรวจคุณภาพ DNA ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ กัน โดยการเพิ่มปริมาณยีน lectin ซึ่งใช้คู่ primer Lec1/Lec2 ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอด ดังนี้

1. 10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
2. 25 mM $MgCl_2$	3	ไมโครลิตร
3. 10 mM dNTP (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP และ10 mM dTTP)	1	ไมโครลิตร
4. Lec1 Primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
5. Lec2 Primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
6. Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (deionized water)	28.75	ไมโครลิตร
8. สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	10	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ DNA ของถั่วเหลือง (positive control) และตัวควบคุมที่เป็นลบ คือใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน สารละลาย DNA (negative control) หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้คือ

94°C	5 นาที	1 รอบ
94°C	20 วินาที	40 รอบ
57°C	20 วินาที	
72°C	1 นาที	
72°C	10 นาที	1 รอบ
4°C	hold	(Spoth and Strauss,1999)

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างมาตรวจหาชิ้น DNA ขนาด 181 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน

1.2 การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

1.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของคู่ Primers และ probe ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

1.2.1.1 การเตรียม Reference ของตัวอย่างถั่วเหลือง GM เพื่อใช้ทำ standard curve

นำถั่วเหลือง GM ชนิด Roundup Ready (Dried Soya Bean Powder containing Genetically Modified Roundup Ready Soya , Certified Reference Material IRMM) ที่ปนเปื้อนระดับ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5% (CRM IRMM-410) นำมาสกัด DNA ด้วย วิธี guanidinium-chloroform แล้วนำมาทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard®Miniprep DNA Purification Kit หลังจากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง GeneQuant II RNA/DNA Calculator ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (อัตราส่วน 260/280 ควรอยู่ระหว่าง 1.8-2.0) นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 50 และ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เก็บ DNA ไว้ที่ -20C เพื่อนำมาทดลองต่อไป หลังจากนั้นนำ DNA ของ Reference ถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 5% ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาทำให้เจือจางระดับ 1:4, 1:16 และ 1:64 ตามลำดับ

1.2.1.2 การออกแบบและสังเคราะห์คู่ primer และ probe

ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบคู่ primer และ probe ที่ใช้ตรวจยีน Roundup Ready และยีน Lectin 2 ชุด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบของชุดคู่ primer และ probe ที่ใช้ทำปฏิกิริยา Real-time PCR

ชุดการทดลอง	ชื่อ primer/probe	ลำดับเบส	ยีน
1 (Pietsch and Waiblinger, 2000)	RR-F primer	5'-TGATCTGATATCTGCACTGACG-3'	35S promoter และ EPSPS CTP
	RR-R primer	5'- TGTATCCGTTGACCCATGTTGT-3'	
	RR-P probe	5'FAM-CCCACTATGCTTGGCAAGACCCT-TAMRA-3'	
	Lec1 primer	5'-GACGCTATTGTGAGCTCCTC-3'	Lectin
	Lec2 primer	5'-TGTCAGGGCCATAGAAGGTG-3'	
	Lecp Probe	5'FAM-CAACTCAATAGCTTGACGACGGC-TAMRA-3'	
2 (ISO/CD2427, 2002, Terry and Harris, 2001)	Sttmf3a primer	5'-GCAAATCCTGTAGCCTTTCC-3'	CP4 EPSPS
	Sttmr2a primer	5'-CTTGCCCGTGTTGATAACGTC-3'	
	Sttmpa probe	5' FAM-TTCATGTTCGCGGTCTCGCG-TAMRA-3'	
	Sltm1 primer	5'-AACCGGTAGCGTTGCGAG-3'	Lectin
	Sltm2 primer	5'-AGCCCATCTGCAAGGCTTT-3'	
	Sltmp probe	5'FAM-TTCGCCGCTTCTTCAACTTCACCT-TAMRA-3'	

1.2.1.3 การเตรียม Standard Curve

นำ DNA ของ Reference ถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 5% ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และที่เจือจางระดับ 1:4, 1:16 และ 1:64 โดยมี copy number ของยีน Lectin เป็น 100,000, 25,000, 6,250 และ 1,562.5 ตามลำดับ และ มี copy number ของยีน Roundup Ready เป็น 5,000, 1,250, 312.5 และ 78.1 ตามลำดับ และนำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 1% ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างเทียบ นำมาเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready และยีน Lectin โดยเปรียบเทียบการทดลองด้วยคู่ primer และ probe 2 ชุด ซึ่งทั้ง 2 ชุดนี้ มีการทำปฏิกิริยา Real-time PCR เหมือนกัน ซึ่งในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอด ดังนี้

1. 2X Quantitect Probe PCR	10	ไมโครลิตร
2. Primer F (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.4	ไมโครลิตร
3. Primer R (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.4	ไมโครลิตร
4. TaqMan Probe (1.5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.4	ไมโครลิตร
5. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (deionized water)	3.8	ไมโครลิตร
6. สารละลาย DNA (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	5	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด capillaries tube นำไป centrifuged ประมาณ 10-20 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมตกอยู่ก้นหลอด แล้วนำไปวางใน LightCycler rotor หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) โดยมีรอบการทำ Real-time PCR ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้เครื่อง LightCycler

Program:	Denature			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (^{o}C)	Hold Time (sec)	Slope (C^{o}/sec)	2^{o} Target Temp (^{o}C)	Step Size (C^{o})	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	900	20	0	0	0	None

Program:	Amplification			Type:	Quantification	Cycles:	40
Segment Number	Temperature Target (^{o}C)	Hold Time (sec)	Slope (C^{o}/sec)	2^{o} Target Temp (^{o}C)	Step Size (C^{o})	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	5	20	0	0	0	None
2	60	60	20	0	0	0	Single

Program:	Cooling			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (^{o}C)	Hold Time (sec)	Slope (C^{o}/sec)	2^{o} Target Temp (^{o}C)	Step Size (C^{o})	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในปริมาณต่ำสุดด้วยวิธี Real-time PCR

นำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1% มาเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/ Sttmf2a และ probe Sttmpa และ ยีน Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1/ Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งเตรียมปฏิกิริยาเหมือนการทดลองข้อ 1.2.1.3

1.3 สำรวจปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

ได้ดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1.3.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างถั่วเหลือง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 - 2548 ซึ่งได้จากการตรวจสินค้านำเข้าจากด่านต่างๆ การสุ่มจากร้านค้าขายเมล็ดและกากถั่วเหลือง เมล็ดพันธุ์จากสถาบันพืชไร่ และจากผู้ประกอบการส่งมาตรวจวิเคราะห์ จำนวน 316 ตัวอย่าง (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) สุ่มตัวอย่างละ 1 กิโลกรัมพร้อมทั้งให้รหัสตัวอย่าง นำมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด นำตัวอย่างที่ทำให้ละเอียดแล้วมาผสมให้เข้ากัน เพื่อจะได้เป็นตัวแทนที่ดีในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

1.3.2 สกัด DNA ถั่วเหลือง

นำตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองที่บดให้เป็นผงละเอียดมาสกัด DNA โดยสุ่มตัวอย่างละ 0.5 กรัม จำนวน 2 หลอด นำมาสกัด DNA โดยใช้ วิธี guanidinium-chloroform หลังจากนั้นนำ DNA มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit ตามวิธีของ Spoth และ Strauss,1999 แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณ DNA พร้อมทั้งปรับความเข้มข้นของ DNA ให้เท่ากันคือ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจหายีน lectin โดยวิธี PCR เหมือนในข้อที่ 1.1

1.3.3 ตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองด้วยวิธี PCR

นำ DNA ที่ตรวจหายีน lectin ของถั่วเหลืองได้ มาตรวจจำแนกยีน CaMV 35S Promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี PCR โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของ CaMV 35S Promoter ด้วยคู่ primer CaMV 35S Promoter Forward Primer และ CaMV 35S Promoter Reverse Primer และ การเพิ่มปริมาณยีน Nos terminator ด้วยคู่ primer Nos1/Nos2 โดยใช้อัตราส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อที่ 1.1 โดยเปรียบเทียบกับ ตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ

DNA ของถั่วเหลืองที่เป็น GMOs (positive control) และตัวควบคุมที่เป็นลบคือ DNA ของถั่วเหลืองที่เป็น Non-GMOs (negative control) และตัวควบคุมที่เป็นลบ ที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารละลาย DNA (negative control) เพื่อเป็นตัวควบคุมการปนเปื้อนในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

นำทุกหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำตาม PCR ดังนี้คือ

94°C	5 นาที	1 รอบ
94°C	20 วินาที	40 รอบ
60°C	20 วินาที	
72°C	1 นาที	
72°C	10 นาที	1 รอบ
4°C	hold	

สำหรับเพิ่มปริมาณยีน CaMV 35S Promoter และ Nos terminator หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างมาตรวจหาชิ้น DNA ของ CaMV 35S Promoter ขนาด 123 bp และ Nos terminator ขนาด 180 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis

1.3.4 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

นำ DNA ที่ตรวจพบยีน 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นถั่วเหลือง GM มาทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน โดยการตรวจหาจำนวน copy gene ของ Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/Sttmf2a และ probe Sttmpa และจำนวน copy gene ของ Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1/Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งเตรียมปฏิกิริยาเหมือนการทดลองข้อ 1.2.1.3 ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมี Reference standard เป็นถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อนระดับ 5% (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และถูกทำให้เจือจางเป็น 1:4, 1:16 และ 1:64 มาทำเป็น Standard curve ของยีน Lectin และ Roundup Ready แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMOs} = \frac{\text{จำนวน copy gene ของ Roundup Ready}}{\text{จำนวน copy gene ของ Lectin}} \times 100$$

โดยจำนวน copy gene ของ Roundup Ready และ Lectin คำนวณได้จาก Standard curve ของทั้งสองยีน

<u>การทดลองที่ 2</u> **การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อน GMOs ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป**

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของผลิตภัณฑ์แปรรูป

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปจำนวน 14 ตัวอย่างได้แก่ ซอสมะเขือเทศ, ซอสดิบ, ซีอิ๊วดิบ, เมล็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง, เมล็ดพริกไทยแก่กระป๋อง, ข้าวโพดครีมกระป๋อง, สาหร่ายอบกรอบ, เต้าหู้ถั่วเหลือง มะเขือเทศกระป๋อง, ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust, ผงปรุงรสชนิด Zinger Batter, ผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Marinade, ผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Breading และ ผงปรุงรสชนิด KFCH & Inject Marinade มาสกัด DNA โดยเตรียมตัวอย่างดังนี้ ในกรณีตัวอย่างเป็นเม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง, เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง ข้าวโพดครีมกระป๋อง, สาหร่ายอบกรอบ, เต้าหู้ถั่วเหลือง, มะเขือเทศกระป๋อง, มาปั่นหรือบดให้เป็นละเอียด แล้วสุ่มตัวอย่างมาตัวอย่างละ 2 กรัม ในกรณีตัวอย่างเป็น ซอสมะเขือเทศ นำตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ก่อน แล้วปิเปตเอาเฉพาะตะกอนตัวอย่างละ 2 กรัม และในกรณีตัวอย่างเป็น ซอสดิบ และซีอิ๊วดิบปิเปตตัวอย่างละ 2 มิลลิลิตร สำหรับผงปรุงรส 5 ชนิด ซึ่งเป็นผงละเอียดอยู่แล้ว สุ่มมาอย่างละ 2 กรัม หลังจากนั้นนำมาสกัด DNA โดยใช้วิธีการสกัด DNA 4 วิธีคือ guanidinium-chloroform method, GeneScan extraction method, Silica based DNA extraction method และ PVP based DNA extraction method หลังจากได้ DNA มาแล้วแบ่ง DNA เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ กลุ่มที่ 2 ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit ทำกรรมวิธีละ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง GeneQuant II RNA/DNA Calculator ที่ความยาวที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจคุณภาพ DNA ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ กัน ดังนี้

- ตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลือง หรือมีส่วนประกอบของถั่วเหลือง ได้แก่ ซอสดิบ, ซีอิ๊วดิบ, เต้าหู้ถั่วเหลือง, ซอสดิบ และ ซีอิ๊วดิบ ตรวจคุณภาพโดยการเพิ่มปริมาณยีน lectin ซึ่งใช้คู่ primer Lec1/Lec2 ด้วยวิธี PCR ซึ่งทำเหมือนข้อ 1.1

- ตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวโพด ได้แก่ ข้าวโพดครีมกระป๋อง ตรวจคุณภาพโดยการเพิ่มปริมาณยีน Zein ซึ่งใช้คู่ primer Zein-F/Zein-R ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอด เหมือนข้อ 1.1 เปลี่ยนเฉพาะคู่ primer หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้คือ

94°C	5 นาที	1 รอบ
94°C	20 วินาที	40 รอบ
54°C	20 วินาที	
72°C	1 นาที	
72°C	10 นาที	1 รอบ
4°C	hold	

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างมาตรวจหาชิ้น DNA ขนาด 190 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน

- ตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชอื่น ได้แก่ ซอสมะเขือเทศ เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง, เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง, สาหร่ายอบกรอบ, มะเขือเทศกระป๋อง, ผงปรุงรส 5 ชนิด ตรวจคุณภาพโดยการเพิ่มปริมาณยีน Internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งใช้คู่ primer ITS-5/26S-25R ด้วยวิธี PCR ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนผสมต่อ 1 หลอด เหมือนข้อ 1.1 เปลี่ยนเฉพาะคู่ primer หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้คือ

94°C	5 นาที	1 รอบ
94°C	20 วินาที	40 รอบ
60°C	20 วินาที	
72°C	1 นาที	
72°C	10 นาที	1 รอบ
4°C	hold	

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างมาตรวจหาชิ้น DNA ขนาด 128 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาด DNA มาตรฐาน

2.2 สำรวจปริมาณการปนเปื้อน GMOs ในผลิตภัณฑ์แปรรูป

ได้ดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

2.2.1 เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูป

สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูป จากห้างสรรพสินค้าต่างๆ, ผู้ประกอบการส่งออก และนำเข้า และผู้ประกอบการที่ผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศ จำนวน 140 ตัวอย่าง ได้แก่ ผงปรุงรสชนิดต่างๆ 51, อาหารสัตว์ 20, นมถั่วเหลือง 12, แป้งถั่วเหลือง 9, แป้งข้าวโพดผสมเลซิติน 1, โปรตีนถั่วเหลือง 5, เลซิติน 5, ไขมันถั่วเหลือง 2, เครื่องดื่มธัญญาหาร 3, ซุปเต้าเจี้ยวผง 2, เต้าเจี้ยว

4, เต้าหู้ 2, ถั่วเหลืองหมักนัตโตะ 3, ผงเต้าหู้สำเร็จรูป 1, ฟองเต้าหู้ 2, ซอสดิบ 3, ซอสถั่วเหลืองผง 4, ซอสปรุงรส 1, ซอสหอยนางรม 2, ซี้อิ๊วดิบ 1, Rice Cracker 3 , ซอสมะเขือเทศ 1, เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง 1, เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง 1, ข้าวโพดครีมกระป๋อง 1, สาหร่ายอบกรอบ 1 และมะเขือเทศกระป๋อง 1 สตรอเบอรี่อบแห้ง 1 ตัวอย่าง (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) โดยทำการสุ่มพร้อมทั้งให้รหัสตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม นำมาบดหรือปั่นให้เป็นละเอียดด้วยเครื่องบด ส่วนนมถั่วเหลือง สุ่ม 1,000 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีและเก็บตะกอนมารวมกัน นำตัวอย่างที่ทำให้ละเอียดแล้ว หรือตะกอนของนมถั่วเหลืองมาผสมให้เข้ากันของแต่ละตัวอย่าง เพื่อจะได้เป็นตัวแทนที่ดีในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2 สกัด DNA ของผลิตภัณฑ์แปรรูป

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ปั่นหรือบดให้ละเอียด แล้วสุ่มตัวอย่างมาตัวอย่างละ 2 กรัม ในกรณีตัวอย่างเป็น ซอสดิบ และซีอิ๊วดิบ ปิเปตตัวอย่างละ 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาสกัด DNA โดยใช้วิธีการสกัด DNA แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์แปรรูปนั้น ได้แก่ ซอส, ซีอิ๊ว และผงปรุงรสชนิดต่างๆ ใช้วิธี GeneScan extraction ส่วนเม็ดพริกไทยกระป๋องใช้วิธี Silica based DNA extraction ผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่นใช้ วิธี guanidinium-chloroform หลังจากนั้นนำ DNA มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard®Miniprep DNA Purification แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่างมาวัดปริมาณ DNA พร้อมทั้งปรับความเข้มข้นของ DNA ให้เท่ากันคือ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจคุณภาพของ DNA เหมือนในขั้นตอนที่1.2

2.2.3 ตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์แปรรูปด้วยวิธี PCR

นำ DNA ที่ตรวจคุณภาพได้ มาตรวจจำแนกยีน CaMV 35S Promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี PCR โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของ CaMV 35S Promoter ด้วยคู่ primer CaMV 35S Promoter Forward Primer และ CaMV 35S Promoter Reverse Primer และ การเพิ่มปริมาณยีน Nos terminator ด้วยคู่ primer Nos1/Nos2 โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3.3

2.2.4 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

นำ DNA ที่ตรวจพบยีน 35S promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นถั่วเหลือง GM มาทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน โดยการตรวจหาจำนวน copy gene ของ Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/Sttmf2a และ probe Sttmpa และจำนวน copy gene ของ Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1 Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา

Real-time PCR ซึ่งเตรียมปฏิกิริยาเหมือนการทดลองข้อ 1.2.1.3 ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมี Reference standard เป็นถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อนระดับ 5% (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และถูกทำให้เจือจางเป็น 1:4, 1:16 และ 1:64 มาทำเป็น Standard curve ของยีน Lectin และ Roundup Ready แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนดังข้อ 1.3.4

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาการทดลอง ตุลาคม 2546- กันยายน 2548

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืช GMOs
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM

1.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

ขั้นตอนการสกัด DNA เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง และใช้เวลามากที่สุด สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมแปลกปลอมในพืช และประสิทธิภาพของวิธีการสกัด DNA นับว่ามีความสำคัญมากต่อการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมในตัวอย่างพืช หรือผลิตภัณฑ์อาหาร GM เนื่องจากว่ามีสารมากมายหลายชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแปลกปลอมในขั้นตอนการตรวจ ที่เกิดขึ้นระหว่างการสกัด DNA สารเหล่านี้รวมถึงโปรตีน น้ำมัน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และสารพวก Phenolic compound ที่มีอยู่ในพืชเอง หรืออาจเป็นสารเคมีต่างๆ ซึ่งใช้ในการสกัด DNA เช่น Phenol, SDS และ EDTA ก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR หรือ Real-time PCR ได้ และอาจนำไปสู่การแปลผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาด ดังนั้นการเลือกวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง นับว่ามีส่วนช่วยทำให้ DNA ที่สกัดได้มีทั้งปริมาณและคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณของสารพันธุกรรมแปลกปลอมได้

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาหาวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับเมล็ด และกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูป และเป็นพืชที่มีโปรตีนและไขมันสูง โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 4 วิธี คือ guanidinium-chloroform method, GeneScan extraction method, Silica

based DNA extraction method และ PVP based DNA extraction method ซึ่งวิธี guanidinium-chloroform , Silica based DNA extraction และ PVP based DNA extraction แต่ละวิธีก็ได้รับการยอมรับจาก International Standard (ISO/DIS 21570, 2002) ว่าด้วย Method of analysis for the detection of genetically modified organism and derived products- nucleic acid extraction สำหรับวิธี GeneScan extraction เป็นน้ำยาชุด Kit สกัด DNA ของบริษัท GeneScan ซึ่งก็นิยมใช้กันตามห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานเช่นกัน หลังจากได้ DNA แล้วแบ่ง DNA เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ กลุ่มที่ 2 ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ DNA-binding silica resin และ ผ่าน Wizard minicolumn (Wizard™ Promega) ซึ่งเป็นวิธีการของ Swiss Food Manual, 1998 ตัวอย่างที่ใช้ทดลองเป็นเมล็ดถั่วเหลือง 2 ตัวอย่าง และกากถั่วเหลือง 4 ตัวอย่าง และวัดผลโดยการดูประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณยีน lectin ซึ่งเป็นยีนที่มีอยู่ในถั่วเหลือง ด้วยวิธี PCR เพื่อดูประสิทธิภาพของ DNA ที่ได้ว่ามีคุณภาพเพียงพอในการเพิ่มปริมาณได้หรือไม่ และมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือไม่ (Mayer, 1999; Wurz, *et al.,* 1999) โดยจะต้องปรับความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ในแต่ละวิธีให้เท่ากันหมดคือ 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จึงนำไปทำ PCR ผลการทดลองพบว่าทุกวิธีการที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะได้แถบ DNA ที่เข้มชัดเจน และเพิ่มปริมาณได้มากกว่า DNA ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบในวิธีการเดียวกัน (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 2) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยการนำสารละลาย DNA ผ่าน minicolumn เป็นการเพิ่มขั้นตอนการทำ DNA ให้สะอาดขึ้น โดย DNA จะติดอยู่กับ resin ใน minicolumn และถูกล้างด้วย Isopropanol ถึง 2 ครั้ง ทำให้ลดสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ลงได้ ซึ่งตรงกับการทดลองของห้องปฏิบัติการ Joint Research Centre - European Commission Biotechnology & GMOs Unit ปี 2005 ได้ทดลองสกัด DNA ของเมล็ดข้าวโพด TC1507 โดยใช้ lysis buffer สกัด และทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit ซึ่งทำให้ได้ DNA ที่ได้มีคุณภาพดีมาก เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของทุกวิธีพบว่าวิธีสกัด guanidinium-chloroform และ GeneScan extraction ที่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ เป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ทุกตัวอย่างเนื่องจากให้แถบ DNA ที่เข้ม ชัดเจน และขึ้นสม่ำเสมอทุกซ้ำ (ภาพที่1 B และ D) รองลงมาคือวิธี GeneScan extraction ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ วิธี PVP ที่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ และ guanidinium-chloroform ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ คือ ทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด แต่แถบ DNA ที่ได้บางตัวอย่างจาง และบางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ สำหรับวิธี PVP ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ไม่ขึ้น 1 ตัวอย่าง และแถบ DNA ที่ได้บางตัวอย่างจาง และบางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ วิธี Silica ที่

ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ขึ้น 3 ตัวอย่าง บางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ ส่วนวิธี Silica ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ขึ้นเพียง 1 ตัวอย่าง และซ้ำเดียว

จากทดลองนี้จะเห็นได้ว่าวิธีสกัด guanidinium-chloroform และ GeneScan extraction จะสกัดวัตถุดิบที่เป็นเมล็ด และกากได้ดีมาก เนื่องจากทั้งสองวิธีมีขั้นตอนและหลักการที่คล้ายคลึงกัน คือ ใน buffer สกัด DNA ของวิธี guanidinium-chloroform ประกอบด้วย SDS และ guanidinium buffer และ มีการเติมเอ็นไซม์ amylase ย่อยสลายแป้ง proteinase K ช่วยย่อยโปรตีน ส่วนวิธี GeneScan extraction ไม่สามารถรู้ส่วนผสมของ buffer เนื่องจากเป็นชุด Kit ของบริษัท แต่ในขั้นตอนการสกัดก็มีการเติม proteinase K เช่นเดียวกัน และใช้ chloroform แยกสกัดเอาโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ ออร์กาเนลต่างๆ ออก แล้วจึงตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol เช่นเดียวกัน แต่เมื่อเทียบต้นทุนของทั้งสองวิธีพบว่าวิธี GeneScan extraction จะมีราคาแพงกว่า เนื่องจากเป็นชุด Kit ของบริษัท จึงควรเลือกใช้วิธี guanidinium-chloroform มากกว่า

สำหรับวิธี Silica เป็นวิธีที่ไม่ใช้สารพวก toxic reagent เช่น phenol, chloroform เป็นต้น โดยมีหลักการสกัดคือ lysis buffer ที่ประกอบด้วย SDS เพื่อย่อยสลายเซล หรือทำให้เซลแตก หลังจากนั้นจึงใช้ silica resin เพื่อไปจับกับ DNA แล้วล้างส่วนที่เหลือออกด้วย isopropanol และละลาย DNA ที่จับกับ silica resin ด้วยน้ำอุ่น แต่วิธีนี้ไม่เหมาะกับการสกัดถั่วเหลือง ซึ่งมีไขมันสูง หรืออาหารประเภทที่มีส่วนประกอบของไขมัน (ISO/DIS 21571, 2002) ซึ่งตรงกับการทดลองที่เพิ่มปริมาณ DNA ได้น้อยมาก

วิธี PVP ใน lysis buffer ที่ประกอบด้วย SDS และ EDTA ที่เข้มข้นสูง เพื่อย่อยสลายเซล หรือทำให้เซลแตก และกำจัดส่วนที่เป็น โปรตีน ออร์กาเนลต่างๆ ตลอดจนส่วนประกอบของ polyphenolic และ polysaccharides ด้วย PVP และ ammonium acetate หลังจากนั้นตกตะกอนด้วย ethanol alcohol วิธีนี้เหมาะกับวัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของ polyphenolic สูงๆ เช่นการทดลองของ Kim และคณะ ปี 1997 ได้ใช้วิธีนี้สกัดพวกไม้ผล และสน

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดของ DNA 4 วิธี นำ DNA ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน minicolumn และไม่ผ่าน minicolumn โดยการตรวจคุณภาพของ DNA ด้วยการตรวจยีน lectin (endogenous gene) ถั่วเหลือง

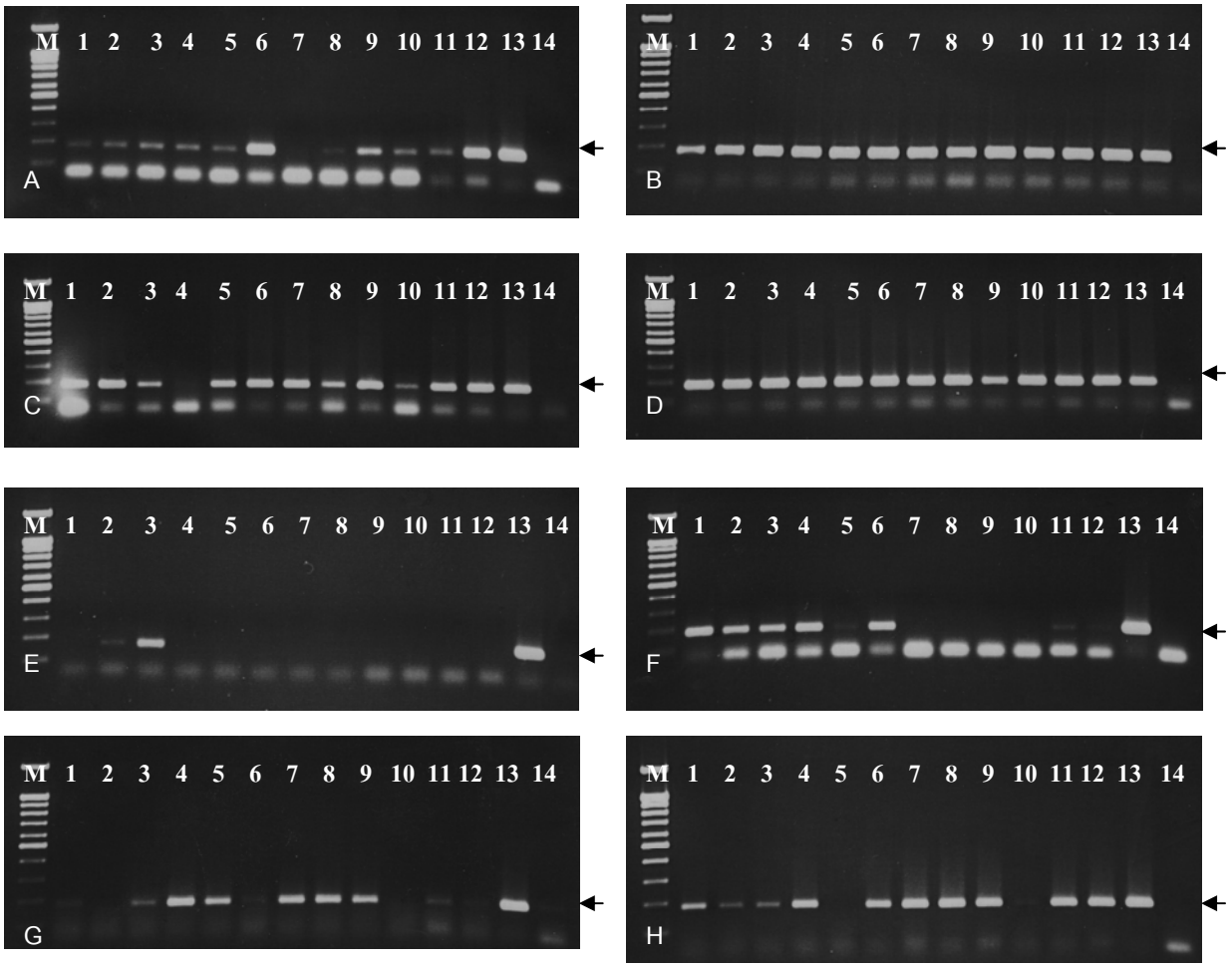
ตัวอย่าง	guanidinium-chloroform		GeneScan		Silica		PVP	
	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA
1. เมล็ดถั่วเหลือง	++	+++	+++	+++	+	+++	-	+
2. เมล็ดถั่วเหลือง	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++
3. กากถั่วเหลือง	++	+++	+++	+++	-	++	+++	+++
4. กากถั่วเหลือง	+	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
5. กากถั่วเหลือง	++	+++	++	+++	-	-	++	+++
6. กากถั่วเหลือง	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิดแถบ DNA เป้าหมาย

\+ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายจางมาก

++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้ม

+++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้มมาก



ภาพที่ 2 การตรวจคุณภาพ DNA ของตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลือง ด้วยการเพิ่มปริมาณยีน Lectin ของถั่วเหลืองด้วยวิธี PCR:

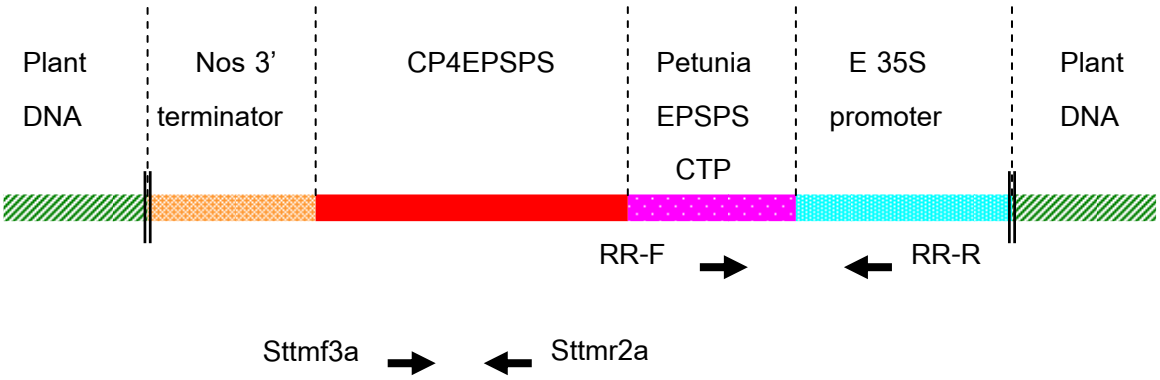
A, C, E, G	=	DNA ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn
B, D, F, H	=	DNA ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn
A, B	=	ใช้วิธี guanidinium-chloroform
C, D	=	ใช้วิธี GeneScan
E, F	=	ใช้วิธี Silica
H, G	=	ใช้วิธี PVP
แถบที่ 1-4	=	เมล็ดถั่วเหลือง (2 ตัวอย่างๆ ละ 2 ซ้ำ)
แถบที่ 5-12	=	กากถั่วเหลือง (2 ตัวอย่างๆ ละ 2 ซ้ำ)
แถบที่ 13	=	Positve control (DNA ถั่วเหลือง)
แถบที่ 14	=	Negative control (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)
แถบที่ M	=	100 bp DNA ladder

1.2 การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

1.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของคู่ Primers และ probe ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

ในการทดลองนี้ได้ทดสอบคู่ primer และ probe 2 ชุด ที่ได้จากการทดลองของ Pietsch and Waiblinger, 2000 คือ คู่ primer จำเพาะ RR-F/RR-R และ TaqMan probe RR-P ซึ่ง DNA สายสั้นๆ ที่ติดฉลากด้าน 5' เป็น FAM (6-carboxy-fluorescein) ซึ่งทำหน้าที่เป็น reporter dye และ ด้าน 3' เป็น TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) ซึ่งทำหน้าที่เป็น quencher dye และ TaqMan probe นี้จะไป hybridization กับผลผลิต PCR สำหรับคู่ primer จำเพาะ RR-F/RR-R ได้ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ในส่วนของ Petunia EPSPS CTP และ E 35S promoter ซึ่งมีขนาด 172 bp (ภาพที่ 3) และ คู่ primer จำเพาะ Lec1/Lec2 และ TaqMan probe Lecp ที่ติดฉลากด้าน 5' เป็น FAM และ ด้าน 3' เป็น TAMRA สำหรับคู่ primer จำเพาะ Lec1/Lec2 ได้ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน lectin ขนาด 181 bp

ส่วนคู่ primer และ probe อีกชุด ได้จากการทดลองของ Terry and Harris, 2001 คือ คู่ primer จำเพาะ Sttmf3a/ Sttmr2a และ TaqMan probe Sttmpa ที่ติดฉลากด้าน 5' เป็น FAM และ ด้าน 3' เป็น TAMRA สำหรับคู่ primer จำเพาะ Sttmf3a/Sttmr2a ได้ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ในส่วนของ CP4 EPSPS ซึ่งมีขนาด 145 bp (ภาพที่ 3) และ คู่ primer จำเพาะ Sltm1/Sltm2 และ TaqMan probe Sltmp ที่ติดฉลากด้าน 5' เป็น FAM และ ด้าน 3' เป็น TAMRA สำหรับคู่ primer จำเพาะ Sltm1/Sltm2 ได้ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน lectin ขนาด 81 bp



ภาพที่ 3 โครงสร้างของยีนถั่วเหลือง Roundup Ready และการออกแบบคู่ primer จำเพาะ 2 คู่ คือ RR-F/RR-R เพิ่มปริมาณยีน Petunia EPSPS CTP และ E 35S promoter ขนาด 172 bp และ Sttmf3a/Sttmr2a เพิ่มปริมาณยีน CP4EPSPS ขนาด 145 bp (Mayer, 1999)

จากการทดลองได้นำ DNA ของ Reference ถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 5% ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และที่เจือจางระดับ 1:4, 1:16 และ 1:64 โดยมี copy number ของยีน lectin เป็น 100,000, 25,000, 6,250 และ 1,562.5 ตามลำดับ และ มี copy number ของยีน Roundup Ready เป็น 5,000, 1,250, 312.5 และ 78.1 ตามลำดับ ซึ่งคำนวณได้จาก 1 copy gene ของ lectin จะมี DNA ของถั่วเหลืองประมาณ 2.31 pg เท่ากับหนึ่งจีโนมของถั่วเหลือง (Graham *et al*., 1994) ในการทดลองได้ใช้ DNA ของ Reference ถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 5% ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตร ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR เพราะฉะนั้นจึงมี DNA จำนวน 250 ng ซึ่งเทียบโดยประมาณเท่ากับ 100,000 copy gene ของ lectin และมี copy gene ของ Roundup Ready เท่ากับ 5,000 copy gene ของ Roundup Ready (5% ของ 100,000) และได้นำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่ปนเปื้อนระดับ 1% ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างเทียบ นำมาเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready และยีน lectin โดยเปรียบเทียบการทดลองด้วยคู่ primer และ probe 2 ชุด โดยวิธี Real-time PCR

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR ตามมาตรฐานของ International Standard (ISO/CD 2547, 2004) ระบุให้ใช้ TaqMan probe ในการทำ Hybridization ซึ่งสามารถใช้ได้กับเครื่อง ABI Prism 7700 (Applied Biosystem) และ LightCycler (Roche Diagnostic) กลไกการทำงานของปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ TaqMan probe คือ TaqMan probe ซึ่งเป็น DNA สายสั้นๆ ที่ปลาย 5’ ติดฉลากเป็น reporter dye ซึ่งจะทำหน้าที่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ ส่วนปลาย 3’ ติดฉลากเป็น quencher dye ซึ่งจะควบคุมไม่ให้ reporter dye เปล่งแสง ดังนั้นเมื่อ probe ซึ่งเกาะติดกับผลผลิต PCR สายคู่อยู่นั้น reporter dye จะยังไม่สามารถเปล่งแสงได้ เนื่องจากมี quencher dye ควบคุมอยู่ (ภาพที่ 12 ในภาคผนวก) จนกระทั่งผลผลิต PCR สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว และคู่ primer จับกับผลผลิต PCR และทำการ annealing สาย DNA ขณะเดียวกันเอ็นไซม์ Taq polymerase จะไปตัดสายของ probe ขาด ทำให้ reporter dye หลุดออกจาก quencher dye และสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ ซึ่งเครื่องจะวัดสัญญาณนี้ไว้

ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ด้วยคู่ primer จำเพาะ RR-F/RR-R และ TaqMan probe RR-P กับจำนวนรอบ ในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA คือ การเพิ่มปริมาณ DNA ของถั่วเหลือง Roundup Ready (RRS) ที่ปนเปื้อนระดับ 5% จะเพิ่มในอัตราสูงสุดรองลงมาเป็น DNA ของถั่วเหลือง Roundup Ready 5% ที่เจือจาง 1:16 (มีระดับการปนเปื้อนประมาณ 0.83%) แทนที่จะเป็นถั่วเหลือง Roundup Ready 5% ที่เจือจาง 1:4 (มีระดับการ

ปนเปื้อนประมาณ 1.25%) และสุดท้ายคือการเพิ่มปริมาณ DNA ของถั่วเหลือง Roundup Ready 5% ที่เจือจาง 1:64 (มีระดับการปนเปื้อนประมาณ 0.08%) จากการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนของความเข้มข้นของ DNA จึงทำให้ไม่สามารถทำ Standard curve ได้ และเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM 1% พบว่าการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready อยู่ต่ำกว่า Reference ถั่วเหลืองที่เจือจางระดับ 1:64 เทียบการปนเปื้อนเท่ากับ 0.08% ซึ่งจะทำให้การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนผิดพลาดได้

ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน lectin ด้วยคู่ primer จำเพาะ Lec1/Lec2 และ TaqMan probe Lecp กับจำนวนรอบในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าการเพิ่มไม่เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า logความเข้มข้นของ DNA เช่นเดียวกัน คือ การเพิ่มปริมาณ DNA ของถั่วเหลือง Roundup Ready ที่ปนเปื้อนระดับ 5% ที่เจือจาง 1:4 เพิ่มในอัตราสูงสุด รองลงมาเป็น DNA ของถั่วเหลือง Roundup Ready 5% และที่เจือจาง 1:16 ซึ่งเพิ่มในอัตราใกล้เคียงกัน และสุดท้ายที่เจือจาง 1:64 จึงทำให้ไม่สามารถทำ Standard curve ได้

จากการใช้คู่ primer ชุดนี้ได้ทดลองเพิ่มเติมอีกโดยการทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ DNA, primer และ probe ตลอดจนอุณหภูมิในการ Hybridization แต่ก็พบว่าไม่สามารถทำ Standard curve ได้ และได้นำเอาคู่ primer RR-F/RR-R และ Lec1/Lec2 มาทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจผลด้วย gel electrophoresis พบว่าได้แถบ DNA เป้าหมายที่คมชัดดีมาก จึงสันนิษฐานว่าสาเหตุที่ทำให้ primer และ probe ชุดนี้เพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนของความเข้มข้นของ DNA อาจเนื่องมาจาก probe ออกแบบไม่ดี หรืออาจเนื่องมาจาก probe ซึ่งแทนที่จะไป Hybridization กับ ผลผลิต PCR แต่กลับไป Hybridization กับ primer จึงทำให้การเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่คงที่ (จากคู่มือการใช้เครื่อง ABI Prism 7000 Sequence Detection System)

สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ด้วยคู่ primer จำเพาะ Sttmf3a/Sttmr2a และ TaqMan probe Sttmpa พบว่าการเพิ่มปริมาณของผลผลิต PCR เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ (ภาพที่ 4 และตารางที่ 5) และการเพิ่มปริมาณยีน lectin ด้วยคู่ primer จำเพาะ Sltm1/Sltm2 และ TaqMan probe Sltmp การเพิ่มปริมาณของผลผลิต PCR เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 5 การคำนวณปริมาณยีน Roundup Ready ด้วยคู่ primer จำเพาะ Sttmf3a/Sttmr2a และ TaqMan probe Sttmpa การคำนวณปริมาณยีน lectin ด้วยคู่ primer จำเพาะ Sltm1/Sltm2 และ TaqMan probe Sltmp และการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนยีน Roundup Ready

Sample	Lectin-PCR			Roundup Ready-PCR			Roundup Ready content (%) (d)
	Copy number (a)	Copy number (b)	Crossing point (c)	Copy number (a)	Copy number (b)	Crossing point (c)	
5%RRS	100,000	100,000	28.20	5,000	5,265	27.72	Standard
5%RRS, 1:4	25,000	57,770	28.74	1,250	1,296	29.33	Standard
5%RRS, 1:16	6,250	8,950	30.59	312.5	249.1	31.23	Standard
5%RRS, 1:64	1,562.5	1563	32.55	78.1	89.8	32.40	Standard
1% GM sample	unknown	73,680	28.50	unknown	739	29.97	1.00

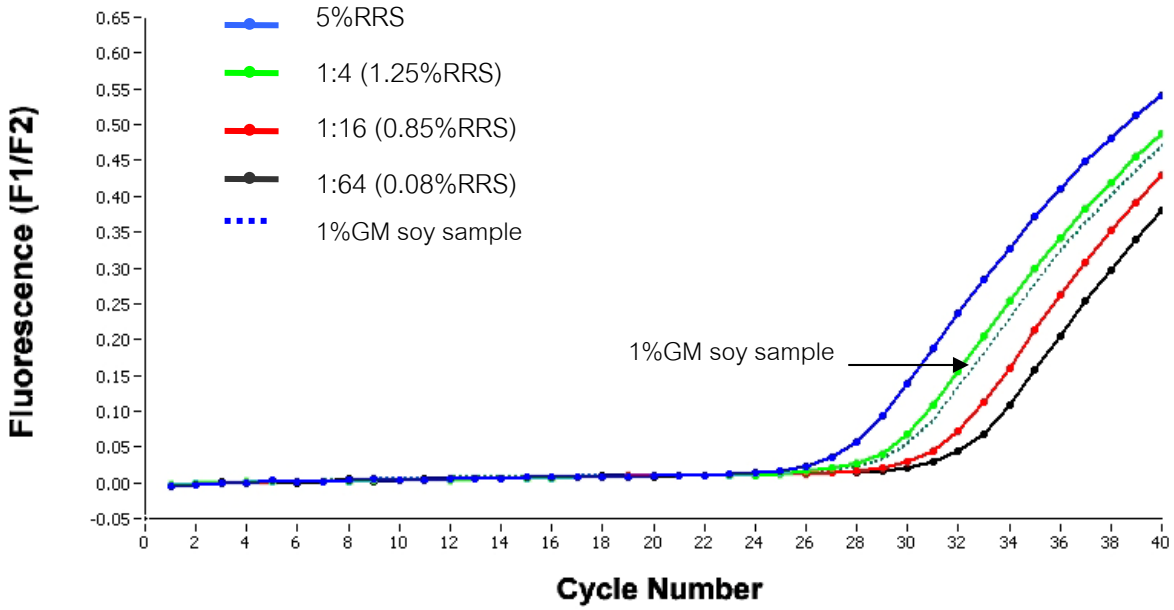
(a) หมายถึง ค่า Copy number ของยีนที่ใส่เข้าโปรแกรมของเครื่องครั้งแรก

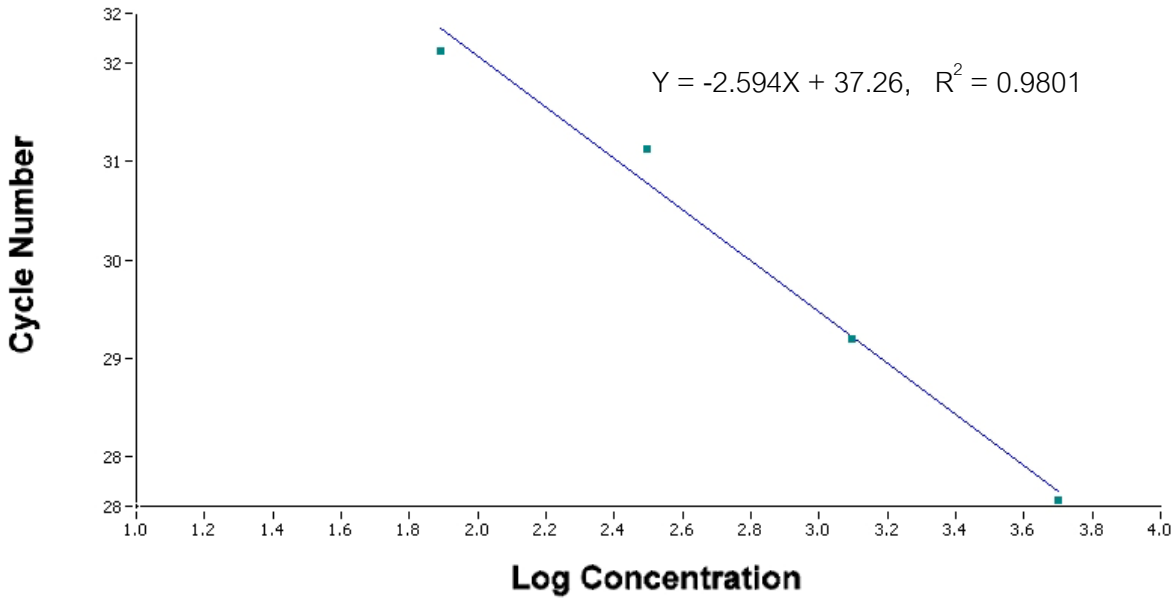
(b) หมายถึง ค่า Copy number ของยีนที่เครื่องคำนวณให้หลังจากทำปฏิกิริยา Real-time PCR

(c) หมายถึง จำนวนรอบที่ยีนถูกเพิ่มปริมาณครั้งแรก

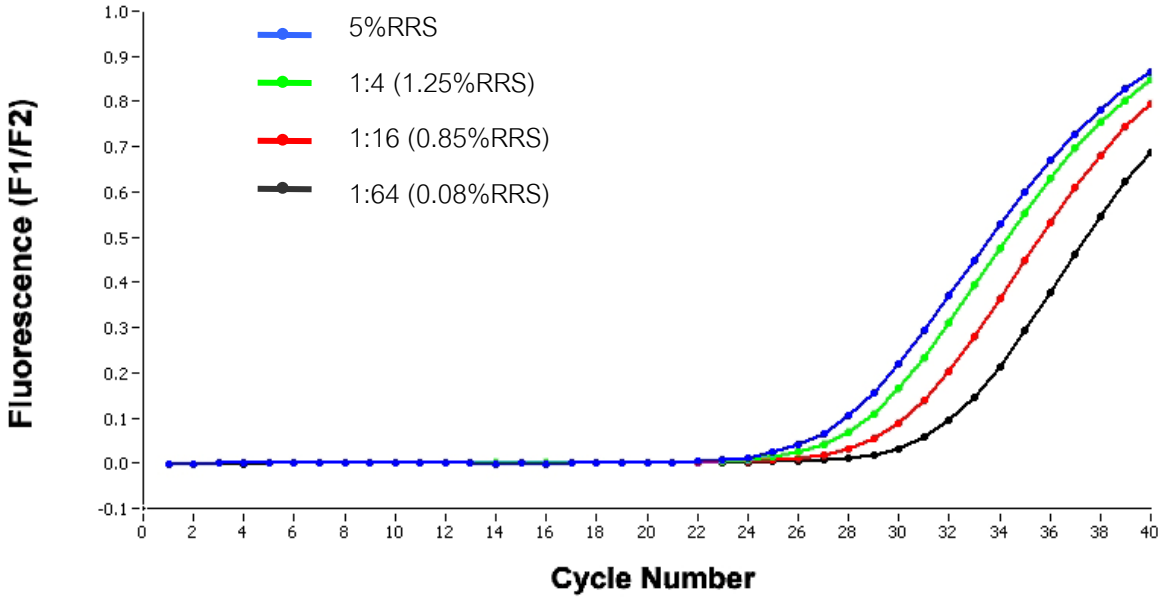
(d)หมายถึง เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนถั่วเหลือง Roundup Ready

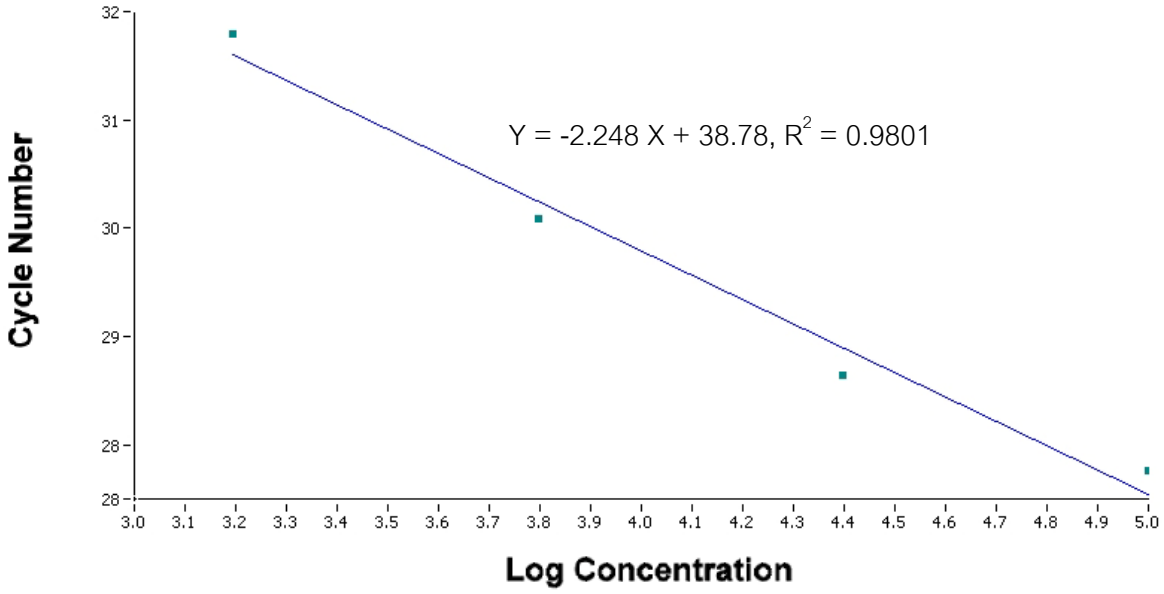
$$= \frac{\text{จำนวน copy gene ของ Roundup Ready}}{\text{จำนวน copy gene ของ Lectin}} \times 100$$





ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready (ช่วง CP4EPSPS) โดยใช้ชุดคู่ primer Sttmf3a/ Sttmr2a และ Sttma probe ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ภาพบน) และ แสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA (X) กับ copy number ของยีน Roundup Ready (Y) (ภาพล่าง)

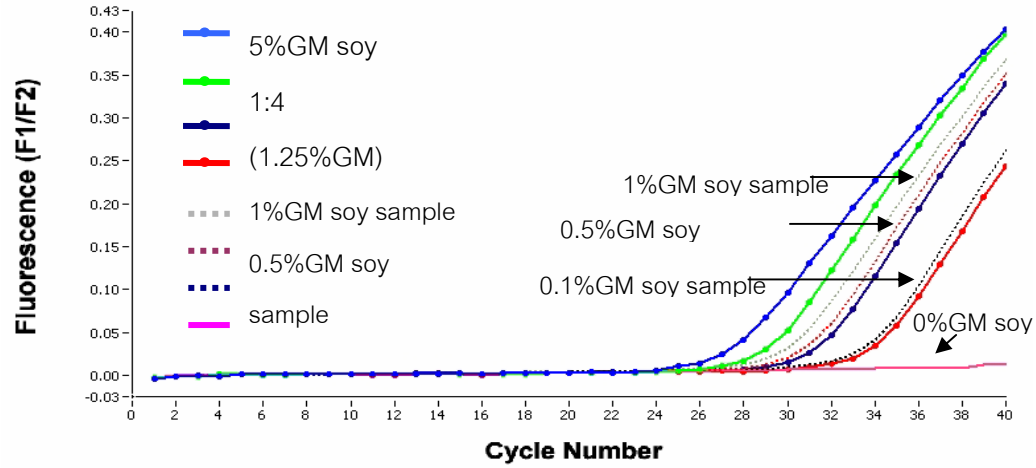




ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน lectin กับจำนวนรอบ ในปฏิกิริยา Real-time PCRโดยใช้ชุดคู่ primer Sltm1/ Sltm2 และ Sltmp probe (ภาพบน) และ แสดง Standard curve ที่ได้จากค่า log ของปริมาณความเข้มข้นของ DNA (X) กับ copy number ของยีน lectin (Y)(ภาพล่าง)

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในปริมาณต่ำสุด ด้วยวิธี Real-time PCR

จากการนำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1% มาตรวจสอบปริมาณยีน Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS เทียบกับ Standard ถั่วเหลือง 5% โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/ Sttmf2a และ probe Sttmpa และ ยีน Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1/ Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่า DNA ของตัวอย่างถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0.1, 0.5 และ 1% สามารถเพิ่มปริมาณได้ เป็นสัดส่วนกัน (ภาพที่ 6) การเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ช่วง CP4EPSPS ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน 0.1% จะเพิ่มในอัตราที่สูงกว่าเส้น Standard ของ ถั่วเหลือง GM 5% ที่เจือจาง 1:64 เล็กน้อย ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.08% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนจากการเทียบ copy number ของยีน Roundup Ready กับยีน lectin ได้เท่ากับ 0.12% สำหรับการเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ของถั่วเหลือง GM 0.5% เพิ่มในอัตราที่สูงกว่าเส้น Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:16 เล็กน้อย ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.31% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเท่ากับ 0.54% สำหรับการเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ของถั่วเหลือง GM 1% เพิ่มในอัตราที่อยู่ระหว่างเส้น Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:16 ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.31% กับ Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:4 ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 1.25% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเท่ากับ 0.97% สำหรับถั่วเหลือง GM ระดับ 0% พบว่าไม่เพิ่มปริมาณยีนเลย

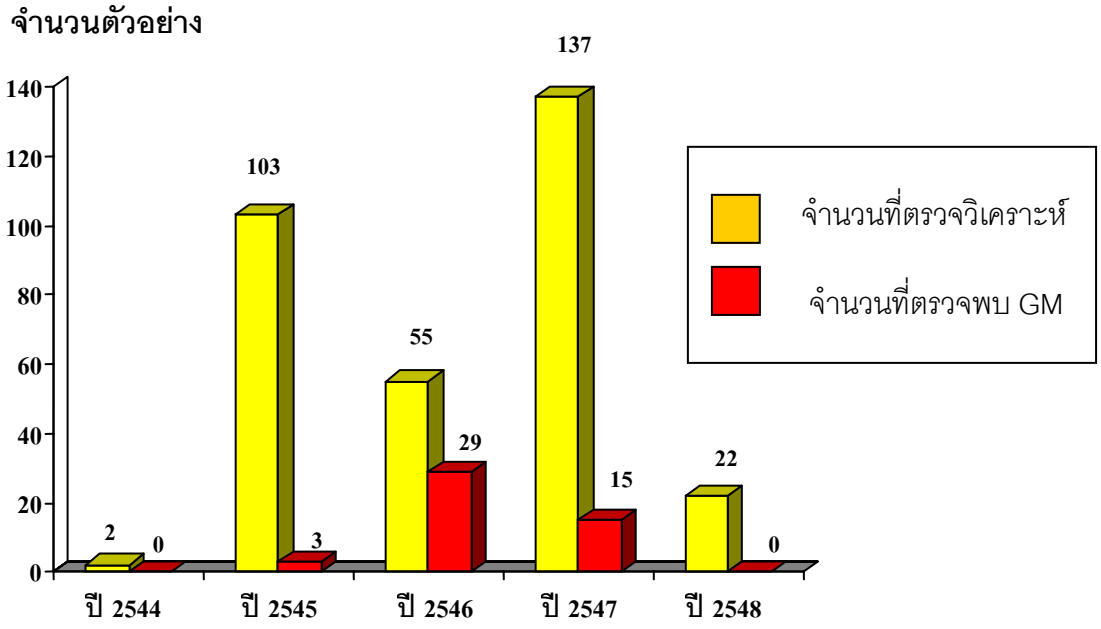


ภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน 0, 0.1, 0.5 และ 1%

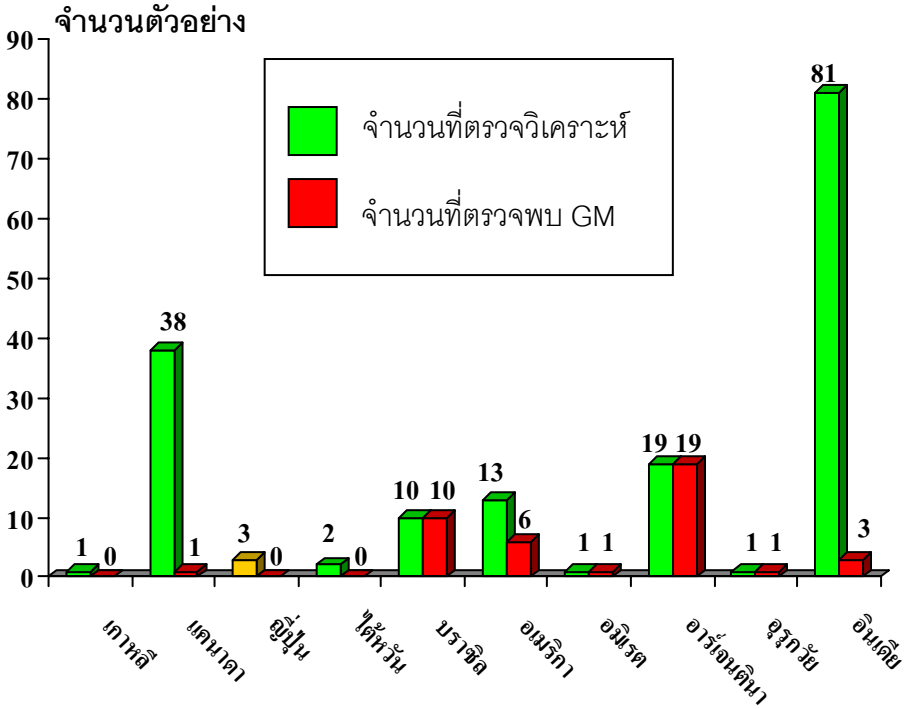
จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าคู่ primer Sttmf3a/ Sttmf2a และ probe Sttmpa สามารถตรวจการปนเปื้อนของยีน Roundup Ready ในตัวอย่างถั่วเหลือง GM ได้ในระดับถึง 0.1% หรืออาจจะต่ำกว่านี้แต่ไม่ได้ทดลอง เพราะที่ระดับ 0.1% ถือว่าเป็นมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์พืช GM ซึ่งเป็นค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (ISO 24276, 2002)

1.3 สำรวจปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

จากการสำรวจจำนวนตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลือง กับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบถั่วเหลือง GM ตั้งแต่ปี 2544-2548 (ภาพที่ 7) พบว่าในปี 2544 ตรวจ 2 ตัวอย่าง ไม่พบถั่วเหลือง GM ปี 2545 ตรวจ 103 ตัวอย่าง พบถั่วเหลือง GM จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.9 ปี 2546 ตรวจ 55 ตัวอย่าง พบถั่วเหลือง GM จำนวน 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52.3 ปี 2547 ตรวจ 137 ตัวอย่าง พบถั่วเหลือง GM จำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.9 ปี 2548 ตรวจ 22 ตัวอย่าง ไม่พบถั่วเหลือง GM จากการสำรวจนี้แสดงให้เห็นว่าในปี 2544 ไมพบตัวอย่างถั่วเหลือง GM เลย เป็นเพราะว่าได้สุ่มตรวจน้อยเกินไปเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้น แต่จะเห็นว่าปี 2545-2547 จำนวนถั่วเหลือง GM มีเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในปี 2546 ตรวจพบถั่วเหลือง GM ถึงร้อยละ 52.3 ซึ่งสูงกว่าทุกปีและปี 2548 (ถึงเดือนกันยายน) ไม่พบถั่วเหลือง GM เลย ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าได้มีมาตรการเข้มงวดกับการติดฉลากสินค้าพืช GM ทำให้ผู้ประกอบการต้องตัดสินใจเลือกซื้อสินค้าจากแหล่งที่ไม่ใช่ถั่วเหลือง GM มากขึ้นมาก และหากวิเคราะห์ถึงการนำเข้าเมล็ดและกากถั่วเหลืองจากประเทศต่างๆ กับโอกาสการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ที่ตรวจพบ (ภาพที่ 8) จะเห็นว่าการนำถั่วเหลืองจากประเทศแคนาดาจำนวน 38 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 2.6 ประเทศบราซิลจำนวน 10 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 100 ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 13 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 6 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 46.2



ภาพที่ 7 แสดงการสำรวจจำนวนตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลือง กับจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบถั่วเหลือง GM ตั้งแต่ปี 2544-2548



ภาพที่ 8 แสดงจำนวนตัวอย่างสุ่มตรวจที่ประเทศไทยสั่งนำเข้าเมล็ดและกากถั่วเหลืองจากต่างประเทศ และจำนวนที่ตรวจพบถั่วเหลือง GM ของแต่ละประเทศ

ประเทศสาธารณรัฐอาหรับอิมิเรตจำนวน 1 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 100 ประเทศอาร์เจนตินาจำนวน 19 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 19 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 100 ประเทศอุรุกวัย จำนวน 1 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 100 ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 81 ตัวอย่าง พบเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 3 ตัวอย่าง ดังนั้นโอกาสพบถั่วเหลือง GM คิดเป็นร้อยละ 3.7 ส่วนเกาหลี ญี่ปุ่น และไต้หวันนำเข้ามา 1, 3 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตรวจไม่พบถั่วเหลือง GM เลย เนื่องจากว่าไม่ใช่แหล่งปลูกถั่วเหลือง GM ส่วนประเทศที่พบถั่วเหลือง GM ก็คือประเทศที่เป็นแหล่งปลูกถั่วเหลือง GM จากข้อมูลนี้ทำให้สามารถช่วยในการเลือกซื้อถั่วเหลืองนำเข้าว่าจะซื้อจากประเทศไหนจึงจะมีโอกาสเสี่ยงน้อยที่สุด เช่นที่อินเดียเป็นต้น

จากการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในเมล็ดและกากถั่วเหลืองที่ตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นว่าเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 47 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6) พบว่าจำนวนถั่วเหลืองนำเข้าที่ปนเปื้อน GM มากที่สุดได้แก่ประเทศอาร์เจนตินามีจำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกาก 17 ตัวอย่าง และเมล็ด 2 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 23-100% รองลงมาคือบราซิลพบจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด โดยปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2.3-100%, สหรัฐอเมริกาพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ดทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 86.5-100%, อินเดียพบจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2-100%, อุรุกวัยพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100%, แคนาดาพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรตพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้าพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง 5 ตัวอย่าง และเมล็ด 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 0.5 - 100%

ตารางที่ 6 ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
1	2346	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	0.5	ไม่ระบุ
2	2347	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	89.5	ไม่ระบุ
3	2348	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	2.2	ไม่ระบุ
4	3136	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อุรุกวัย
5	3137	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
6	3138	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
7	3139	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	26	บราซิล
8	3140	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
9	3141	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	บราซิล
10	3175	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	55.5	อาร์เจนตินา
11	3176	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
12	3177	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	13.2	บราซิล
13	3178	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	94.7	อาร์เจนตินา
14	3179	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	90.6	อาร์เจนตินา
15	3180	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
16	3181	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
17	3182	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	23	อาร์เจนตินา
18	3183	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	91.6	อาร์เจนตินา
19	3184	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
20	3185	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
21	3186	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	36.6	อาร์เจนตินา
22	3187	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
23	3188	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
24	3189	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
25	3190	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อินเดีย
26	3191	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
27	3192	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
28	3193	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
29	3196	กากถั่วเหลือง	9/12/2546	GMOs	88.8	แคนาดา
30	3207	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	95.5	บราซิล
31	3208	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	28.1	บราซิล
32	3209	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
33	3246	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
34	3247	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
35	3248	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	86.5	สหรัฐอเมริกา
36	3249	กากถั่วเหลือง	5/1/2547	GMOs	2.5	บราซิล

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
37	3288	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	77.7	อาร์เจนตินา
38	3289	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	2.3	บราซิล
39	3292	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	21.1	บราซิล
40	3293	เมล็ดถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
41	3299	เมล็ดถั่วเหลือง	29/1/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ
42	3318	เมล็ดถั่วเหลือง	4/2/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
43	3332	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	GMOs	2	อินเดีย
44	3382	กากถั่วเหลือง	19/3/2547	GMOs	1	ไม่ระบุ
45	3511	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	GMOs	75.7	อินเดีย
46	3559	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	GMOs	0.1	สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรต
47	6586	กากถั่วเหลือง	9/12/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ

<u>การทดลองที่ 2</u> การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อน GMOs ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

2.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของผลิตภัณฑ์แปรรูป

จากการทดลองได้สุ่มตัวอย่างมาสกัด DNA จำนวน 2 กรัม เนื่องจากตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูป DNA ได้สลายตัวไปบางส่วน จึงต้องใช้ตัวอย่างมาสกัดค่อนข้างมาก เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA เพียงพอกับการตรวจวิเคราะห์ และจากการทดลองพบว่า ทุกวิธีการที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะได้แถบ DNA ที่เข้ม ชัดเจน และเพิ่มปริมาณได้มากกว่า DNA ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบในวิธีการเดียวกัน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดกับผลิตภัณฑ์แปรรูปแต่ละชนิด ได้แก่ ซอสมะเขือเทศ พบว่าทุกวิธีสามารถสกัดได้เกือบหมด ยกเว้นวิธี Silica ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ (ตารางที่ 7) แต่วิธี Silica ถึงแม้จะผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ การเพิ่มปริมาณ DNA ยังได้แถบ DNA ที่จางอยู่ (ภาพที่ 9)

สำหรับซอสดิบและซี้อิ๊วดิบ ซึ่งมีส่วนประกอบและขั้นตอนการผลิตคล้ายคลึงกัน จากการทดลองพบว่าวิธีที่สกัด DNA ได้ดีคือ PVP และ GeneScan extraction ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับซอสดิบถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้เลย ต่าง

จากซี้อิ๊วดิบคือถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก็ยังสามารถเพิ่มปริมาณได้ในวิธี PVP และ GeneScan extraction และวิธี Silica ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้เช่นเดียวกัน แต่แถบ DNA ค่อนข้างจาง (ตารางที่ 7 และภาพที่ 9)

เม็ดพริกไทยอ่อนและแก่ที่บรรจุกระป๋อง พบว่าถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้เลยเกือบทุกวิธี ยกเว้นวิธี Silica ที่สกัดเม็ดพริกอ่อนแต่แถบ DNA จางมาก วิธีที่ดีที่สุดสำหรับสกัดเม็ดพริกอ่อนและแก่ คือ วิธี Silica ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แถบ DNA ที่ได้ชัดเจนดี นอกจากนี้ก็มีวิธี GeneScan extraction ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แต่แถบ DNA ที่ได้ค่อนข้างจาง และขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ สำหรับวิธี PVP ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สกัดได้เฉพาะเม็ดพริกไทยอ่อนแถบ DNA ที่ได้จาง (ภาพที่ 9) และวิธี guanidinium-chloroform ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สกัดได้เฉพาะเม็ดพริกแก่ ได้แถบ DNA จาง และขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ (ภาพที่ 10) ถึงแม้เม็ดพริกอ่อนและแก่จะผ่านกระบวนการแปรรูปน้อย แต่ในตัวเม็ดพริกไทยก็มีองค์ประกอบของพวกสารต่างๆ ที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR เช่น Phenolic compound, Tanin, Polysaccharide เป็นต้น จึงทำให้สกัด DNA ค่อนข้างยาก และองค์ประกอบของสารในเม็ดพริกอ่อนและแก่ก็แตกต่างกันด้วย จึงทำให้บางวิธีสกัดได้เฉพาะพริกไทยอ่อน และบางวิธีสกัดได้เฉพาะพริกไทยแก่

ข้าวโพดครีมกระป๋อง สาหร่ายอบกรอบ เต้าหู้ถั่วเหลือง และมะเขือเทศกระป๋อง พบว่าทุกวิธีทั้งที่นำ DNA ผ่านและไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด แต่ถ้านำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แถบ DNA ที่ได้ชัดเจนดีกว่าไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้เป็นเพราะข้าวโพดครีมกระป๋อง สาหร่ายอบกรอบ เต้าหู้ถั่วเหลือง และมะเขือเทศกระป๋อง ผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยโดยเฉพาะสาหร่ายอบกรอบ จึงสกัด DNA ได้ง่าย (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

ผงปรุงรสชนิดต่างๆ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 11) พบว่าผงปรุงรสชนิด Zinger Predust (มีส่วนประกอบคือ แป้งสาลี, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันสกัดจากขมิ้น, น้ำมันสกัดจากพริก, โซเดียมไบคาร์บอเนต, กลูเต้นจากแป้งสาลี, ไข่ขาวผง, โซเดียมแอซิดไพโรฟอสเฟต) ผงปรุงรสชนิด Zinger Batter (มีส่วนประกอบคือ แป้งสาลี, เกลือ, โซเดียมไบคาร์บอเนต, แป้งถั่วเหลือง, โซเดียมแอซิดไพโรฟอสเฟต) และผงปรุงรสชนิด KFCH & Inject Marinade (เป็นเครื่องปรุงสำหรับไก่ KFC มีส่วนประกอบคือ น้ำมันสกัดจากพริก, เกลือ, ผงชูรส, กระเทียม, ฟอสเฟต) ทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด โดยให้แถบ DNA ที่เข้ม และชัดเจน แต่ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าวิธี guanidinium-chloroform, GeneScan extraction และ PVP ทำให้ได้แถบ DNA ของตัวอย่าง Zinger Predust และ Zinger Batter ชัดเจนเช่นเดียวกับนำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 11) แต่ตัวอย่าง KFCH & Inject Marinade ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้

บริสุทธิ์พบว่าแถบ DNA ของแต่ละวิธีการสกัด จะจางและขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ หรือไม่ขึ้นเลย สำหรับผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Breading (มีส่วนประกอบคือ โซเดียมแอซิดไพโรฟอสเฟต, โซเดียมไบคาร์บอเนต, แป้งข้าวโพด, เด็กซ์โตรส, น้ำมันถั่วเหลือง ค่อนข้างสกัดยาก ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเกือบทุกวิธีไม่ให้แถบ DNA เลย ยกเว้นวิธี guanidinium-chloroform ซึ่งให้แถบ DNA มากและขึ้นไม่สม่ำเสมอ แต่ถ้านำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าวิธี guanidinium-chloroform ให้แถบ DNA ชัดที่สุด แต่ขึ้นเพียงซ้ำเดียว รองลงมาคือ GeneScan extraction แต่ก็ขึ้นเพียงซ้ำเดียวเช่นกัน ส่วนตัวอย่าง Hot & Spicy Marinade Predust (มีส่วนประกอบคือ โซเดียมแอซิดไพโรฟอสเฟต, โซเดียมไบคาร์บอเนต, แป้งข้าวโพด, เด็กซ์โตรส, น้ำมันถั่วเหลือง) DNA ของทุกวิธีสกัดไม่ได้แถบ DNA เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างมีส่วนประกอบของพริกป่น ซึ่งพริกจะมีพวก pigment ที่ทำให้เกิดสี และ pigment เหล่านี้ถ้ามีปริมาณมากจะไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ อาจแก้ปัญหาโดยการเจือจางตัวอย่าง DNA ลง เพื่อลดปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของผลิตภัณฑ์แปรรูป 4 วิธี นำ DNA ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน minicolumn และไม่ผ่าน minicolumn โดยการตรวจคุณภาพของ DNA ด้วยวิธี PCR

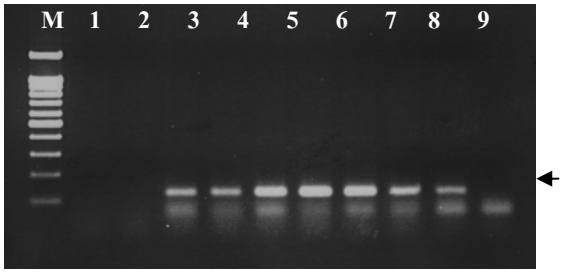
ตัวอย่าง	guanidinium-chloroform		GeneScan		Silica		PVP	
	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA
1. ซอสมะเขือเทศ	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++
2. ซอสดิบ	-	-	-	++	-	-	-	++
3. ซีอิ๊วดิบ	-	-	++	+++	-	+	+++	+++
4. เม็ดพริกไทยอ่อนในน้ำเกลือ	-	-	-	+	+	+++	-	+
5. เม็ดพริกไทยแก่ในน้ำเกลือ	-	-	-	+	-	+++	-	-
6. ข้าวโพดครีม	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++
7. สาหร่ายอบกรอบ	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
8. เต้าหู้ถั่วเหลือง	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
9. มะเขือเทศกระป๋อง	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++

ตารางที่ 7 (ต่อ)

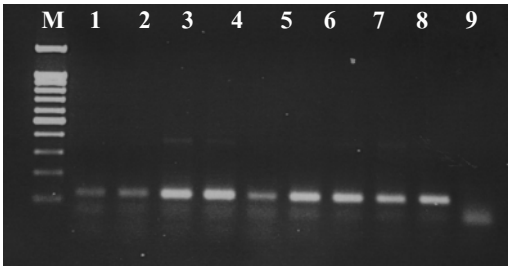
ตัวอย่าง	guanidinium-chloroform		GeneScan		Silica		PVP	
	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA
10. ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
11.ผงปรุงรสชนิด Zinger Batter	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
12. ผงปรุงรสชนิด Hot&Spicy Marinade	-	-	-	-	-	-	-	-
13. ผงปรุงรสชนิด Hot &Spicy Breading	+	+++	-	++	-	-	-	-
14. ผงปรุงรสชนิด KFCH & Inject Marinade	+++	+++	-	++	++	+++	+	++

หมายเหตุ

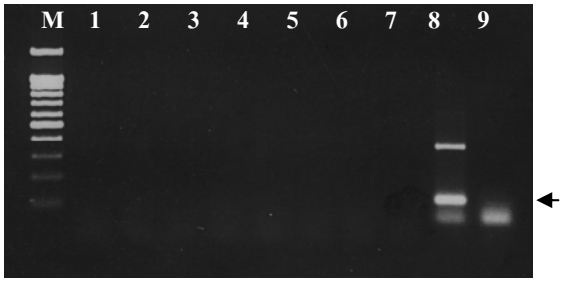
- หมายถึง ไม่เกิดแถบ DNA เป้าหมาย
+ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายจางมาก
++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้ม
+++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้มมาก



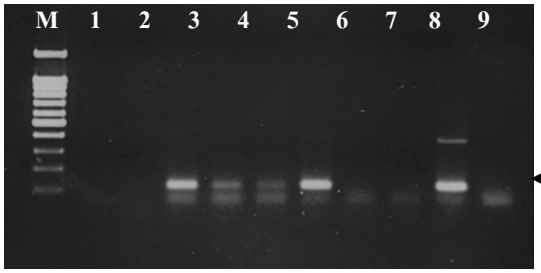
ซอสมะเขือเทศ ไม่ผ่าน minicolumn



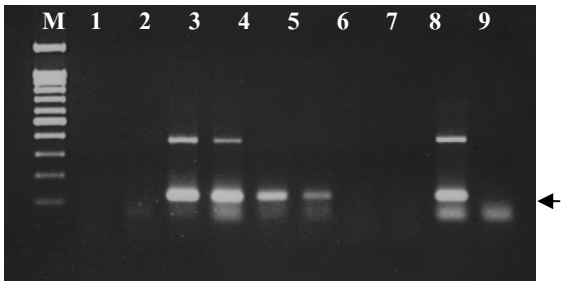
ซอสมะเขือเทศ ผ่าน minicolumn



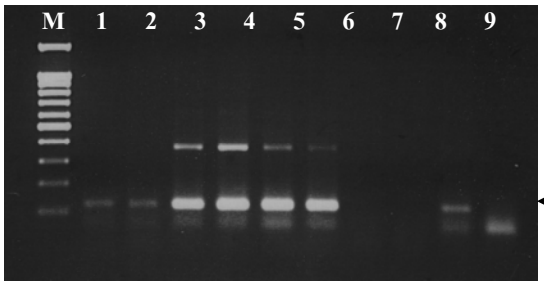
ซอสดิบ ไม่ผ่าน minicolumn



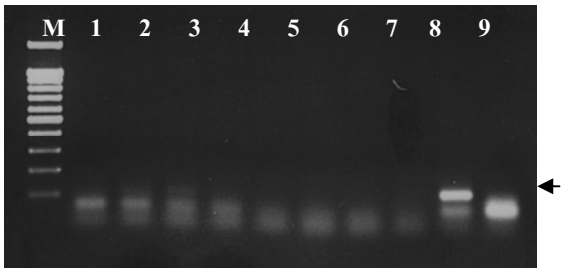
ซอสดิบ ผ่าน minicolumn



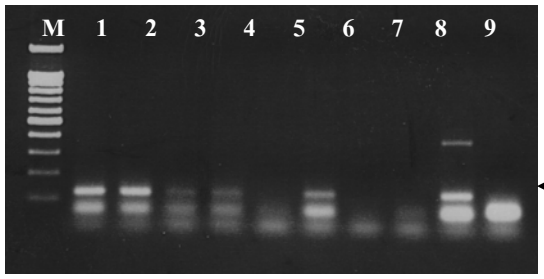
ซีอิ๊วดิบ ไม่ผ่าน minicolumn



ซีอิ๊วดิบ ผ่าน minicolumn

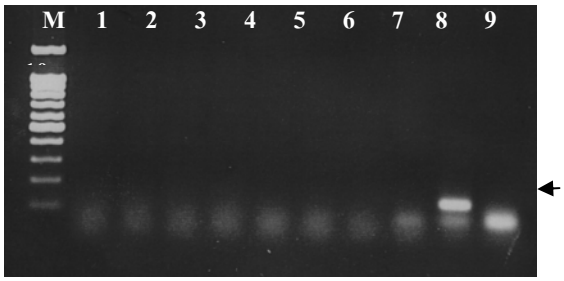


เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง ไม่ผ่าน minicolumn

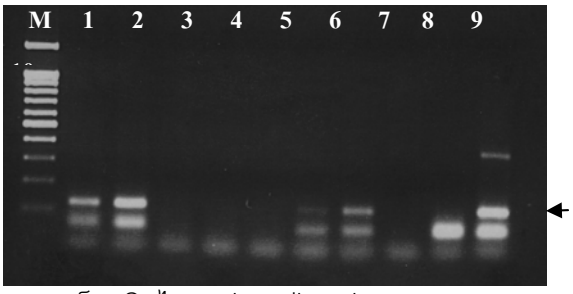


เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง ผ่าน minicolumn

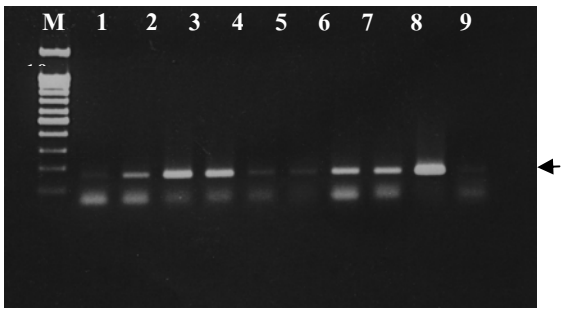
ภาพที่ 9 การตรวจคุณภาพ DNA ของซอสมะเขือเทศ ซอสดิบ ซีอิ๊วดิบ และเม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ แถบที่ 1-2 = Silica based DNA extraction method แถบที่ 3-4 = PVP method แถบที่ 5-6 = GeneScan extraction method แถบที่ 7-8 = guanidinium-chloroform method แถบที่ 9 = Positive control (ถั่วเหลือง) แถบที่ 10 = Negative control (น้ำกลั่น) แถบที่ M = 100 bp DNA Ladder คอลัมภ์ซ้าย DNA ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn คอลัมภ์ขวา DNA ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn



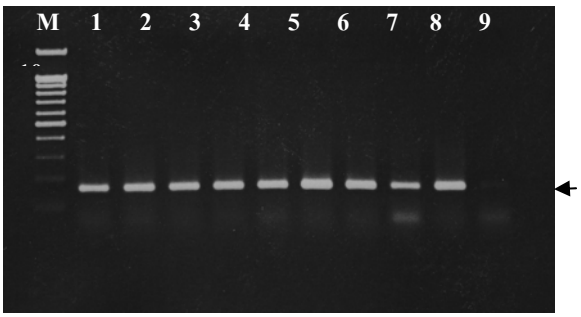
เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง ไม่ผ่าน minicolumn



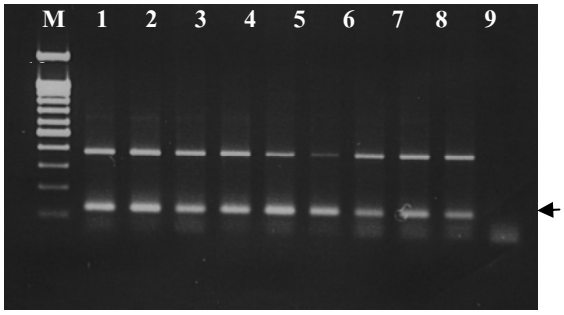
เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง ผ่าน minicolumn



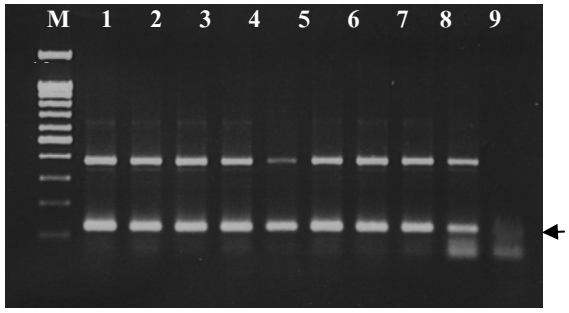
ข้าวโพดครีมกระป๋อง ไม่ผ่าน minicolumn



ข้าวโพดครีมกระป๋อง ผ่าน minicolumn



สาหร่ายอบกรอบ ไม่ผ่าน minicolumn



สาหร่ายอบกรอบ ผ่าน minicolumn

ภาพที่ 10 การตรวจคุณภาพ DNA ของเม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง ข้าวโพดครีมกระป๋อง และสาหร่ายอบกรอบ ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ

แถบที่ 1-2 Silica based DNA extraction method แถบที่ 3-4 PVP method

แถบที่ 5-6 GeneScan extraction method

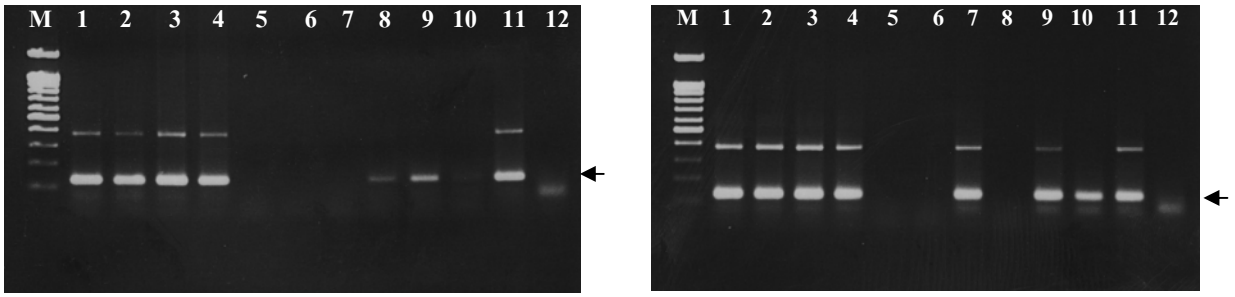
แถบที่ 7-8 guanidinium-chloroform method

แถบที่ 9 Positive control (ถั่วเหลือง)

แถบที่ 10 Negative control (น้ำกลั่น)

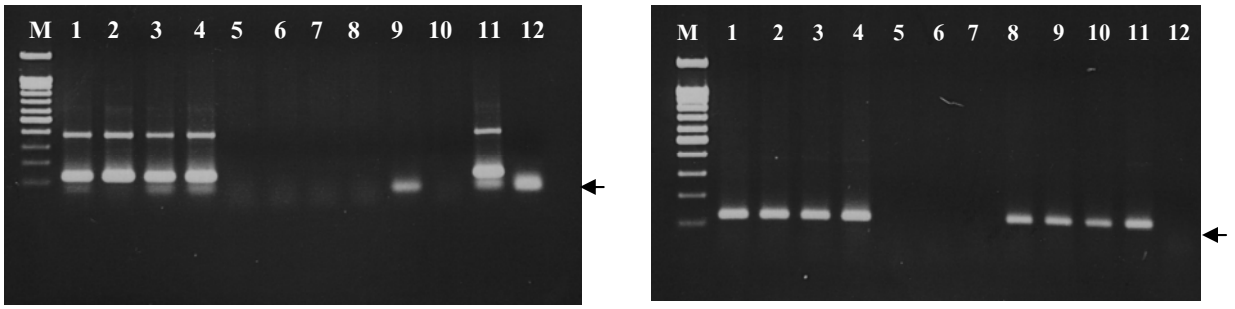
แถบที่ M 100 bp DNA Ladder

คอลัมน์ซ้าย DNA ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn คอลัมน์ขวา DNA ทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน minicolumn



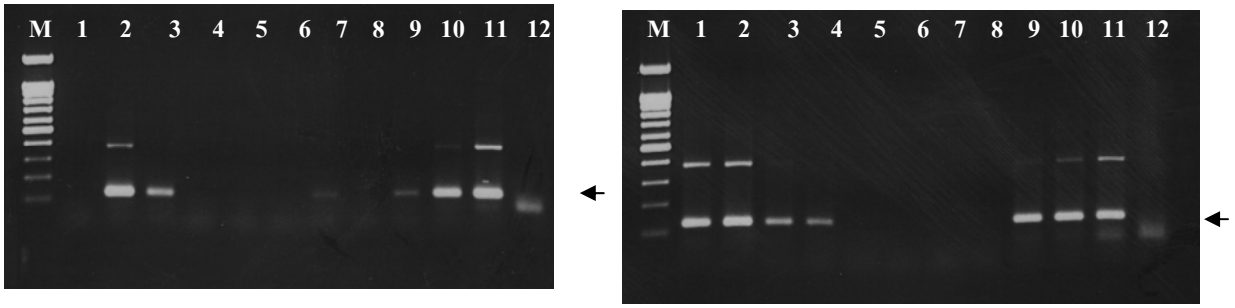
guanidinium-chloroform ไม่ผ่าน minicolumn

guanidinium-chloroform ผ่าน minicolumn



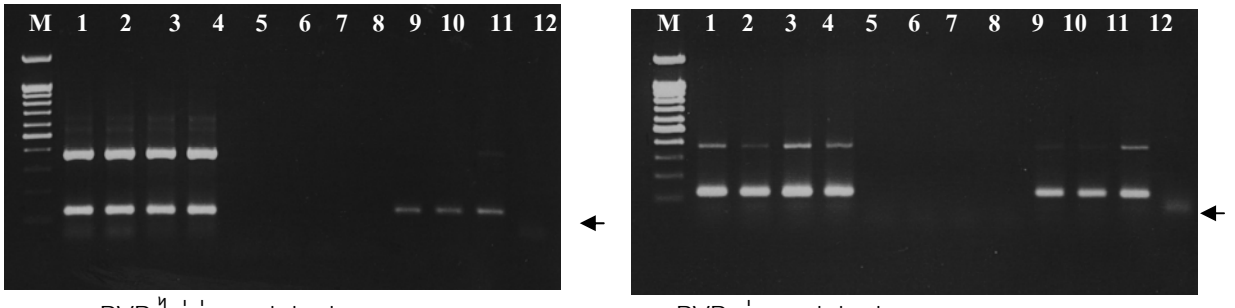
GeneScan ไม่ผ่าน minicolumn

GeneScan ผ่าน minicolumn



Silica ไม่ผ่าน minicolumn

Silica ผ่าน minicolumn



PVP ไม่ผ่าน minicolumn

PVP ผ่าน minicolumn

ภาพที่ 11 การตรวจคุณภาพ DNA ของผงปรุงรส 5 ชนิด ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ

แถบที่ 1-2	Zinger Predust	แถบที่ 3-4	Zinger Batter
แถบที่ 5-6	Hot & Spicy Marinade	แถบที่ 7-8	Hot & Spicy Breading
แถบที่ 9-10	KFCH & Inject Marinade	แถบที่ 11	Positive control (ถั่วเหลือง)
แถบที่ 12	Negative control (น้ำกลั่น)	แถบที่ M	100 bp DNA Ladder

2.2 สำรวจปริมาณการปนเปื้อน GMOs ในผลิตภัณฑ์แปรรูป

จากการสำรวจผลิตภัณฑ์แปรรูปจำนวน 140 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นโดยตรวจยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator พบว่ามีผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ปนเปื้อนพืช GM จำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองทั้งหมด หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เป็น GM มาวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนด้วยวิธี Real-time PCR โดยวิเคราะห์หายีน CP4EPSPS ซึ่งเป็นยีนของถั่วเหลือง GM ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปนเปื้อนได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.4-27.8%, โปรตีนถั่วเหลืองพบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.1-0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.7-3.6% (ตารางที่ 8)

จากการสำรวจปริมาณการปนเปื้อนวัตถุดิบที่เป็นเมล็ดและกากถั่วเหลือง พบว่าการปนเปื้อนของเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองสูงกว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปมาก และพบว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เป็นอาหารสัตว์การปนเปื้อนก็จะสูงกว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปที่นำมาใช้บริโภค สาเหตุอาจเนื่องมาจากกฎระเบียบได้เข้มงวดการติดฉลากและนำเข้าพืช GM โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป เมื่อเดือนกรกฎาคม 2546 ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับ (Traceability and Labelling of GMOs and Food and Feed Products Produced from GMOs (EC) No.1830/2003) ที่เข้มงวดกว่าเดิมและมีผลบังคับใช้ภายตั้งแต่ 15 เมษายน 2547 กฎระเบียบดังกล่าวกำหนดให้ต้องมีการตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะต้องติดฉลากด้วย :ซึ่งในกฎระเบียบเดิมสินค้าดังกล่าวไม่จำเป็นต้องติดฉลาก โดยมีข้อความว่า “ This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547)

และอีกสาเหตุหนึ่งที่การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์แปรรูปต่ำกว่าวัตถุดิบเช่นเมล็ดและกากก็คือ ในขบวนแปรรูปอาหารนั้น จะทำให้ DNA ของพืช GM นั้นเกิดการสลายตัวไปด้วยเช่นการทดลองของ Bauer และคณะ ปี 2005 ได้ทดลองนำพืช GM คือ นำมันฝรั่งไปแปรรูปเป็นอาหาร คือ มันฝรั่งอบกรอบชนิดแท่ง (potato sticks) มันฝรั่งอบกรอบชนิดแผ่นบางๆ (potato crisp) และมันฝรั่งอบกรอบชนิดเกล็ด (potato flakes) และได้เก็บตัวอย่างของทุกขั้นตอนของการแปรรูป พบว่าตัวอย่าง DNA จะค่อยๆ สลายไป เพราะฉะนั้นการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนพืช GM ที่เป็นผลิตภัณฑ์จึงค่อนข้างยาก ขึ้นอยู่กับขบวนการแปรรูปนั้นๆ ด้วย ถึงแม้ว่าอาจใช้วัตถุดิบที่เป็นพืช GM ค่อนข้างสูงก็ตาม

ตารางที่ 8 ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในผลิตภัณฑ์แปรรูป

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์	
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)
1	2274	อาหารสัตว์	18/6/2545	GMOs	27.8
2	2275	อาหารสัตว์	18/6/2545	GMOs	0.4
3	2345	อาหารสัตว์	5/7/2545	GMOs	1.2
4	2372	แป้งถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	3.6
5	2505	อาหารสัตว์	3/9/2545	GMOs	3.3
6	2506	อาหารสัตว์	3/9/2545	GMOs	2.7
7	2526	แป้งถั่วเหลือง	25/9/2545	GMOs	0.7
8	2641	แป้งถั่วเหลือง	24/1/2546	GMOs	0.2
9	3103	โปรตีนถั่วเหลือง	20/10/2546	GMOs	0.2
10	4682	โปรตีนถั่วเหลือง	23/9/2547	GMOs	0.1
11	6852	โปรตีนถั่วเหลือง	31/5/2548	GMOs	0.1
12	6853	โปรตีนถั่วเหลือง	31/5/2548	GMOs	0.1
13	6854	โปรตีนถั่วเหลือง	31/5/2548	GMOs	0.1

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมกับเมล็ดและกากถั่วเหลือง พบว่าวิธีที่ดีที่สุดคือ วิธี guanidinium-chloroform ที่นำ DNA มาทำให้บริสุทธ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification เป็นวิธีการที่ดีที่สุด เทียบเท่ากับวิธี GeneScan extraction

2. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเริ่มจากการออกแบบและคัดเลือกคู่ primers และ probe จำนวน 2 ชุด นำมาศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready และ lectin ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าคู่ primers sttmf3a/sttm2a และ probe Sttmpa สามารถเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ส่วน CP4 EPSPS ขนาด 145 bp และคู่ primers sltm1/sltm2 และ probe Sltmp เพิ่มปริมาณยีน lectin ขนาด 81 bp ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA และสามารถตรวจปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ได้ในปริมาณต่ำสุดถึง 0.1%

3. การสำรวจเมล็ดและกากถั่วเหลืองจำนวน 316 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยจำนวนถั่วเหลืองนำเข้าที่ปนเปื้อน GM มากที่สุดได้แก่ประเทศอาร์เจนตินา มีจำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกาก 17 ตัวอย่าง และเมล็ด 2 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 23-100% รองลงมาคือบราซิลพบจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด โดยปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2.3-100%, สหรัฐอเมริกาพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ดทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 86.5-100%, อินเดียพบจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2-100%, อุรุกวัยพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100%, แคนาดาพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรตพบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้าพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง 5 ตัวอย่าง และเมล็ด 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 0.5-100%

4. การศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูปพบว่าวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์แปรรูปและขบวนการแปรรูปแตกต่างกันดังนี้

- ซอสมะเขือเทศ พบว่าทุกวิธีสามารถสกัดได้ ยกเว้นวิธี Silica
- ซอสดิบ และซี้อิ๊วดิบ วิธีที่สกัด DNA ได้ดีคือ PVP และ GeneScan extraction ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
- เม็ดพริกไทยอ่อนและแก่ที่บรรจุกระป๋อง วิธีที่ดีที่สุดคือวิธี Silica ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
- ข้าวโพดครีมกระป๋อง สาหร่ายอบกรอบ เต้าหู้ถั่วเหลือง และมะเขือเทศกระป๋อง พบว่าทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
- ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust และ KFCH & Inject Marinade พบว่าทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด
- สำหรับผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Breading พบว่าวิธี guanidinium-chloroform ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดีที่สุด
- ส่วนตัวอย่าง Hot & Spicy Marinade Predust ไม่มีวิธีไหนสกัดได้

5. การสำรวจผลิตภัณฑ์แปรรูป140 ตัวอย่าง พบว่ามีพืช GM ปนเปื้อนมาจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองทั้งหมด และเมื่อนำมาหาปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ที่มียีน Roundyup Ready พบว่าผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปนเปื้อนได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.4-27.8%, โปรตีนถั่วเหลืองพบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.1-0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.7-3.6%

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2543. ความพร้อมและหลักการตรวจสอบพืชที่ได้รับการตัดแต่งสารพันธุกรรมของห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร. หน้า 21-26. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2545. การพัฒนาเทคนิค PCR-ELISA เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองที่มีการตัดต่อสารพันธุกรรม. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. 115-134.

นิรนาม. 2547. รายงานเรื่อง “ข้อเสนอทางเลือกนโยบายพันธุวิศวกรรมและความปลอดภัยทางชีวภาพของประเทศไทย”. 31 หน้า.

ปิยะศักดิ์ ชะอุ่มพฤกษ์. 2543. เทคนิคการวิเคราะห์ GMOs. ใน จีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์ การประชุมเชิงปฏิบัติการ วันที่ 10 - 12 พฤษภาคม 2543 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. น. 9-20.

สุรเทพ ภู่ทอง และ ปธานพร ประกอบวณิชกุล. 2543. LightCycler System-The Smartest Innovation in PCR. หน้า 1-6. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Bauer, T., Hammes, W.P., Haase, N.U., and Hertel,C. 2005. Effect of Food Components and Processing parameters on DNA degradation in Food. Environment Biosafety Research. 33 : 215-223.

Berdal, K.G. and Holst-Jensen, A. 2001. Roundup Ready Soybean Event-specific Real-time Qualitative PCR Assay and Estimation of the Practical Detection and Quantification limit in GMO Analysis. European Food Research and Technology. 213 : 432-438.

Boyle, J.S. and Lew, AM. 1995. Trend Genet. 1. p. 8.

Graham, M.J., Nickell, C.D. and Rayburn, A.L. 1994. Relationship between genome size and maturity group in soybean. Theor. Appl. Genet. 88 : 427-432.

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 2427. 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.

ISO/CD 2547. 2004. Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products Detection of Event GTS 40-3-2 in Soybean Seeds by Real-time Quantitative PCR. 28 pp.

James, C. 2003. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003. ISAAA Briefs No. 27, 2003.

Kim, C.S., Lee, C.H., Shin, J.S., Chung, Y.S. and Hyung, N.I. 1997. A Simple and Rapid Method for Isolation of High Quanlity Genomic DNA from Fruit Trees and Conifers using PVP. Nucleic Acids Research. 25 : 1085-1086.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. 1999. IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powders. Journal of AOAC International. 82 : 923-929.

Mayer, M. 1999. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food. Food Control. 10 : 391-399.

Pietsch, K. and H.U. Waiblinger. 2000. Quantification of Genetically Modified Soybeans in Food with the LightCycler System. . หน้า 50-57. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชตัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Spoth, B. and Strauss, E..1999. Screening for Genetically Modified Organisms in Food Using Promega's WizardR Resin. Promega Notes Magazine. 73 ; 23-25.

Studer, E. 1997. Nachweis des gentechnisch veranderten "Maximizer"-Mais mittels der Polymerase-Ketten reaction (PCR). Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88 : 515-524.

Swiss, Food Manual. 1998. Molecular Biological Methods, Chapter 52B, Eidgenossische Drucksachen und Materialzentrale Bern. 250 pp.

Terry,C.F. and Harris, N. 2001. Event-specific Detection of Roundup Ready Soya Using Two Differenct Real Time PCR Detection Chemistries. European Food Research and Technology. 213 : 425-431.

Wurz, A., Bluth, Zeltz, P., Pfeifer, C. and Willmund, R. 1999. Quantitative Analysis of Genetically Modified Organisms (GMO) in Processed Food by PCR-based Methods. Food Control. 10 : 385-389.

ภาคผนวก

หมวด ก. วิธีการสกัด DNA สำหรับเมล็ด และกากถั่วเหลือง

1. Guanidinium-Chloroform methods (Studer *et al.*, 1997)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 0.2 - 0.5 กรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) จำนวน 1.6 มิลลิลิตร, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร RNase-A จำนวน 10 ไมโครลิตร, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร α-amylase จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 50 นาที

3. เติม 5M Guanidine-HCl จำนวน 160 ไมโครลิตร และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่จำนวน 900 ไมโครลิตร แล้วเติม Chloroform จำนวน 900 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่จำนวน 700 ไมโครลิตร เติม isopropanol จำนวน 420 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน DNA

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เท Ethanol ทิ้ง วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษซับ เพื่อซับของเหลวออก ปล่อย DNA ให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

2. GeneScan extraction methods (ชุด Kit ของบริษัท GeneScan)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 0.2-0.5 กรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม lysis buffer จำนวน 1.6 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง

3. เติม 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่จำนวน 900 ไมโครลิตร แล้วเติม Chloroform จำนวน 900 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่จำนวน 700 ไมโครลิตร เติม isopropanol จำนวน 420 ไมโครลิตร และ glycogen 2 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน DNA

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เท Ethanol ทิ้ง วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษซับ เพื่อซับของเหลวออก ปล่อย DNA ให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

3. Silica-based DNA extraction methods (Boyle and Lew, 1995)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 0.2-0.5 กรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (2 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) จำนวน 1.6 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่จำนวน 550 ไมโครลิตร แล้วเติม 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร RNase-A จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลาย บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที

4. เติม 5M Guanidine-HCl จำนวน 55 ไมโครลิตร และสารละลาย silica (10% silica, PBS buffer) จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 2 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้งเติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 2 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 5 นาที ดูดเอาของเหลวซึ่งเป็นสารละลาย DNA ใส่หลอดใหม่

4. Polyvinyl-pyrrolidone (PVP)-based DNA extraction methods (Kim *et al.*, 1997)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 0.2 - 0.5 กรัม ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (2 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 5% SDS) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง

3. เติมสารละลาย PVP (12%PVP, 7.5M ammonium acetate) จำนวน 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 30 นาที

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอน DNA เติม 70% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เติม 70% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง ปล่อยให้ DNA แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

หมวด ข. วิธีการสกัด DNA สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูป

1. Guanidinium-Chloroform methods (Studer *et al.*, 1997)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) จำนวน 10 มิลลิลิตร, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร RNase-A จำนวน 100 ไมโครลิตร, 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร α-amylase จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 50 นาที

3. เติม 5M Guanidine-HCl จำนวน 1.6 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่จำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วเติม Chloroform จำนวน 8 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่จำนวน 6 มิลลิลิตร เติม isopropanol จำนวน 3.6 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน DNA

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เท Ethanol ทิ้ง วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษซับ เพื่อซับของเหลวออก ปล่อย DNA ให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

2. GeneScan extraction methods (ชุด Kit ของบริษัท GeneScan)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม lysis buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง

3. เติม 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่จำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วเติม Chloroform จำนวน 8 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่จำนวน 6 มิลลิลิตร เติม isopropanol จำนวน 3.6 มิลลิลิตร และ glycogen 20 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน DNA

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที เท Ethanol ทิ้ง วางหลอดคว่ำลงบนกระดาษซับ เพื่อซับของเหลวออก ปล่อย DNA ให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

3. Silica-based DNA extraction methods (Boyle and Lew, 1995)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (2 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS) จำนวน 1.6 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Proteinase K จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จำนวน 5.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร RNase-A จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลาย บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที

4. เติม 5M Guanidine-HCl จำนวน 550 ไมโครลิตร และสารละลาย silica (10% silica, PBS buffer) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 2 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เติม isopropanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 2 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 5 นาที ดูดเอาของเหลวซึ่งเป็นสารละลาย DNA ใส่หลอดใหม่

4. Polyvinyl-pyrrolidone (PVP)-based DNA extraction methods (Kim *et al.*, 1997)

1. สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดและผสมให้เข้ากันตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลอด

2. เติม Extraction buffer (2 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 5% SDS) จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ Vortex Mixer บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง

3. เติมสารละลาย PVP (12%PVP, 7.5M ammonium acetate) จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วเติม isopropanol จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 30 นาที

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอน DNA เติม 70% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง เติม 70% ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวทิ้ง ปล่อยให้ DNA แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA นำไปบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที

หมวด ค. วิธีการ Purified DNA ด้วย Wizard™ minicolumn

1. เติม Miniprep DNA Purification Resin ในสารละลาย DNA ที่สกัดได้ ผสมให้เข้าโดยกลับหลอดไปมา

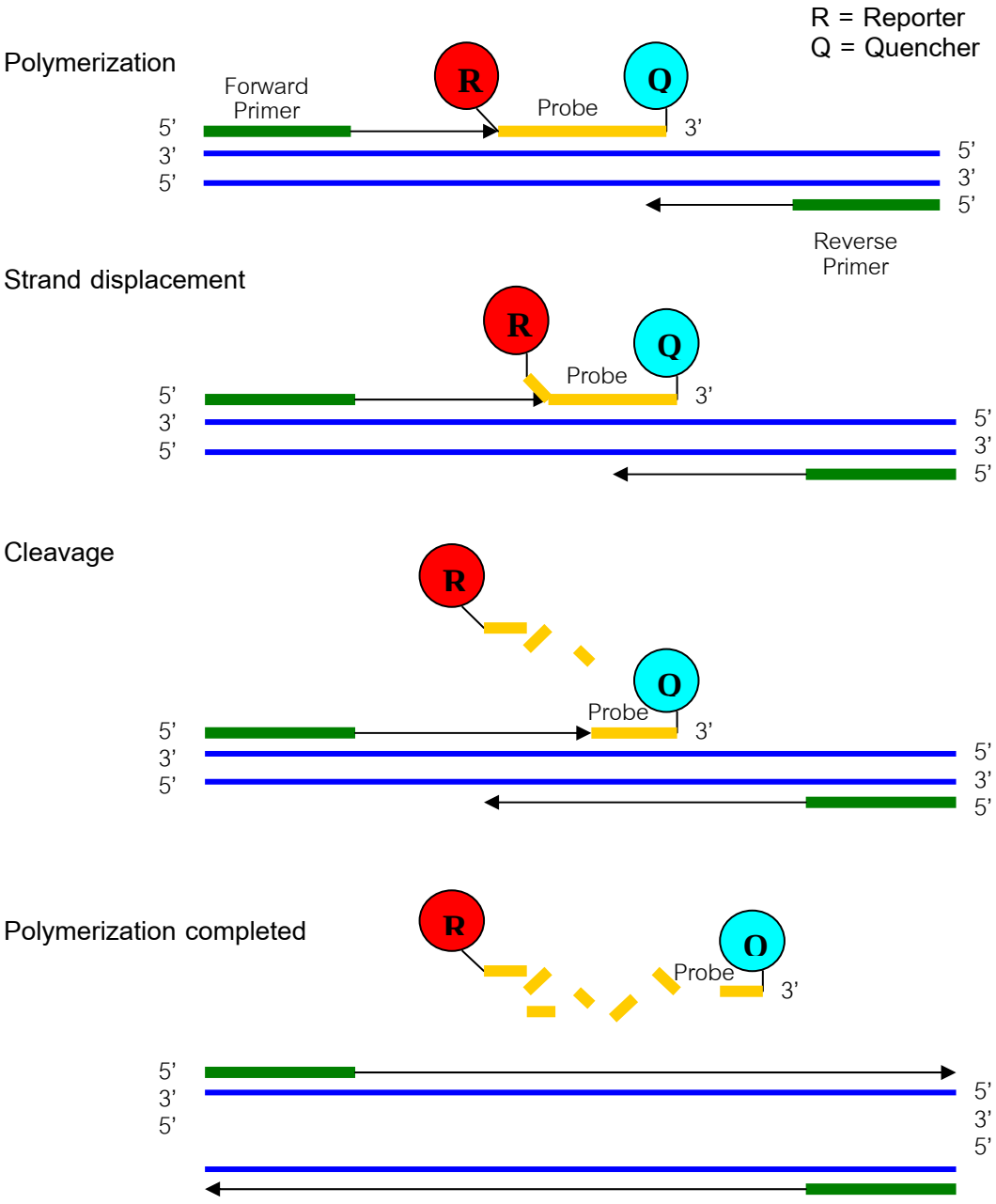
2. ติด syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ซึ่งดึง plunger ออกจากตัว syringe ก่อน) กับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้

3. ดูดสารละลาย DNA ที่ผสมกับ Miniprep DNA Purification Resin จากข้อ 1 ลงใน syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากข้อ 2 หลังจากนั้นใช้ plunge ค่อยดันสายละลายลง DNA จะเกาะติดกับ silica ใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของเหลวนั้นไป

4. เติม 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อล้าง DNA 2 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม Isopropanol ให้ถอด syringe ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง plunger ออก หลังจากนั้นจึงติด syringe กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ)

5. ถอด syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 20 วินาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด

6. นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำอุ่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 70°C ลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที DNA ที่ติดกับ silica จะละลายในน้ำอุ่น หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 2 นาที เพื่อสารละลาย DNA ไหลออกจาก Minicolumn นำ DNA เก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป



ภาพที่ 12 กลไกการทำงานของปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ TaqMan probe คือ TaqMan probe ซึ่งเป็น DNA สายสั้นๆ ที่ปลาย 5’ ติดฉลากเป็น reporter dye ซึ่งจะทำหน้าที่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ ส่วนปลาย 3’ ติดฉลากเป็น quencher dye ซึ่งจะควบคุมไม่ให้ reporter dye เปล่งแสง ดังนั้นเมื่อ probe ซึ่งเกาะติดกับผลผลิต PCR สายคู่อยู่นั้น reporter dye จะยังไม่สามารถเปล่งแสงได้ เนื่องจากมี quencher dye ควบคุมอยู่ จนกระทั่งผลผลิต PCR สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว และคู่ primer จับกับผลผลิต PCR และทำการ annealing สาย DNA ขณะเดียวกันเอ็นไซม์ Taq polymerase จะไปตัดสายของ probe ขาด ทำให้ reporter dye หลุดออกจาก quencher dye และสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ ซึ่งเครื่องจะวัดสัญญาณนี้ไว้

หมวด ง.

ตารางที่ 9 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลือง ผลการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี PCR การตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนด้วยวิธี Real-time PCR

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
1	1686	เมล็ดถั่วเหลือง	18/10/2544	Non-GMOs		ไม่ระบุ
2	1809	ถั่วเหลือง	28/12/2544	Non-GMOs		ไม่ระบุ
3	1980	ถั่วเหลือง	17/1/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
4	2000	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/1)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
5	2001	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/2)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
6	2002	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/3)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
7	2003	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/4)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
8	2004	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/5)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
9	2005	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/6)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
10	2006	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/7)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
11	2007	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/8)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
12	2008	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/9)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
13	2009	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/10)	18/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
14	2010	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/11)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
15	2011	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/12)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
16	2012	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/13)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
17	2013	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/14)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
18	2014	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/15)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
19	2015	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/16)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
20	2016	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/17)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
21	2017	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/18)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
22	2018	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/19)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
23	2019	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/20)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
24	2020	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/21)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
25	2021	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/22)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
26	2022	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/23)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
27	2023	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/24)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
28	2024	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/25)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
29	2025	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/26)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
30	2026	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/27)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
31	2027	ถั่วเหลืองเมล็ดพันธุ์ (MLR 44/28)	4/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
32	2056	เมล็ดถั่วเหลือง	21/2/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
33	2165	เมล็ดถั่วเหลือง	29/3/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
34	2166	เมล็ดถั่วเหลือง	5/4/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
35	2278	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
36	2279	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
37	2280	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
38	2281	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
39	2282	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
40	2283	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
41	2284	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
42	2285	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
43	2286	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
44	2287	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
45	2288	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
46	2289	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
47	2290	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
48	2291	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
49	2292	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
50	2293	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
51	2294	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
52	2295	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
53	2296	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
54	2297	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
55	2298	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
56	2299	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
57	2300	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
58	2301	เมล็ดถั่วเหลือง	15/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
59	2302	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
60	2303	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
61	2304	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
62	2305	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
63	2306	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
64	2307	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
65	2308	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
66	2309	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
67	2310	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
68	2311	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
69	2312	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
70	2313	เมล็ดถั่วเหลือง	17/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
71	2314	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
72	2315	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
73	2316	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
74	2317	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
75	2318	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
76	2319	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
77	2320	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
78	2321	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
79	2322	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
80	2323	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
81	2324	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
82	2325	เมล็ดถั่วเหลือง	19/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
83	2326	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
84	2327	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
85	2328	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
86	2329	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
87	2330	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
88	2331	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
89	2332	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
90	2333	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
91	2334	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
92	2335	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
93	2336	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
94	2337	เมล็ดถั่วเหลือง	22/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
95	2338	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
96	2339	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
97	2340	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
98	2341	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
99	2342	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
100	2343	เมล็ดถั่วเหลือง	19/6/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
101	2346	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	0.545	ไม่ระบุ
102	2347	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	89.51	ไม่ระบุ
103	2348	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	2.215	ไม่ระบุ
104	2393	เมล็ดถั่วเหลือง	23/7/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
105	2615	กากถั่วเหลือง	20/12/2545	Non-GMOs		ไม่ระบุ
106	2728	เมล็ดถั่วเหลือง	21/3/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
107	2729	เมล็ดถั่วเหลือง	21/3/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
108	2843	เมล็ดถั่วเหลือง	20/5/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
109	2936	กากถั่วเหลือง	26/6/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
110	3124	กากถั่วเหลือง	20/10/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
111	3131	เมล็ดถั่วเหลือง	22/10/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
112	3136	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อุรุกวัย
113	3137	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
114	3138	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
115	3139	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	26.05	บราซิล
116	3140	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
117	3141	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	บราซิล
118	3161	เมล็ดถั่วเหลือง	5/11/2546	Non-GMOs		ไต้หวัน
119	3167	เมล็ดถั่วเหลือง	19/11/2546	Non-GMOs		แคนาดา
120	3168	เมล็ดถั่วเหลือง	19/11/2546	Non-GMOs		ญี่ปุ่น
121	3174	เมล็ดถั่วเหลือง	27/11/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
122	3175	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	55.5	อาร์เจนตินา
123	3176	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
124	3177	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	13.165	บราซิล
125	3178	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	94.7	อาร์เจนตินา
126	3179	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	90.65	อาร์เจนตินา
127	3180	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
128	3181	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
129	3182	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	22.945	อาร์เจนตินา
130	3183	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	91.57	อาร์เจนตินา
131	3184	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
132	3185	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
133	3186	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	36.605	อาร์เจนตินา
134	3187	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
135	3188	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
136	3189	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
137	3190	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อินเดีย
138	3191	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
139	3192	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
140	3193	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
141	3195	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2546	Non-GMOs		แคนาดา
142	3196	กากถั่วเหลือง	9/12/2546	GMOs	88.85	แคนาดา
143	3197	กากถั่วเหลือง	9/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
144	3198	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2546	Non-GMOs		แคนาดา
145	3200	เมล็ดถั่วเหลือง	15/12/2546	Non-GMOs		แคนาดา

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
146	3201	กากถั่วเหลือง	15/12/46	Non-GMOs		อินเดีย
147	3202	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
148	3203	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
149	3204	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
150	3206	เมล็ดถั่วเหลือง	15/12/2546	Non-GMOs		ไม่ระบุ
151	3207	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	95.5	บราซิล
152	3208	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	28.15	บราซิล
153	3209	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
154	3211	กากถั่วเหลือง	18/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
155	3212	กากถั่วเหลือง	18/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
156	3213	กากถั่วเหลือง	18/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
157	3233	เมล็ดถั่วเหลือง	29/12/2546	Non-GMOs		แคนาดา
158	3235	กากถั่วเหลือง	29/12/2546	Non-GMOs		อินเดีย
159	3246	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/4257	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
160	3247	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
161	3248	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	86.52	สหรัฐอเมริกา
162	3249	กากถั่วเหลือง	5/1/2547	GMOs	2.51	บราซิล
163	3250	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	Non-GMOs		แคนาดา
164	3251	เมล็ดถั่วเหลือง	9/1/2547	Non-GMOs		แคนาดา
165	3252	กากถั่วเหลือง	8/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
166	3253	กากถั่วเหลือง	8/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
167	3254	กากถั่วเหลือง	8/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
168	3255	กากถั่วเหลือง	8/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
169	3256	เมล็ดถั่วเหลือง	9/1/2547	Non-GMOs		แคนาดา
170	3257	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
171	3258	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
172	3259	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
173	3260	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
174	3261	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
175	3262	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
176	3263	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
177	3264	กากถั่วเหลือง	15/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
178	3267	เมล็ดถั่วเหลือง	20/1/2547	Non-GMOs		แคนาดา
179	3268	กากถั่วเหลือง	20/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
180	3269	กากถั่วเหลือง	20/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
181	3270	กากถั่วเหลือง	20/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
182	3271	กากถั่วเหลือง	20/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
183	3274	กากถั่วเหลือง	26/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
184	3275	กากถั่วเหลือง	26/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
185	3276	กากถั่วเหลือง	26/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
186	3288	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	77.72	อาร์เจนตินา
187	3289	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	2.255	บราซิล
188	3290	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
189	3291	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
190	3292	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	21.055	บราซิล
191	3293	เมล็ดถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
192	3298	กากถั่วเหลือง	29/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
193	3299	เมล็ดถั่วเหลือง	29/1/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ
194	3300	กากถั่วเหลือง	29/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
195	3301	กากถั่วเหลือง	29/1/2547	Non-GMOs		อินเดีย
196	3314	กากถั่วเหลือง	4/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
197	3315	กากถั่วเหลือง	4/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
198	3316	กากถั่วเหลือง	4/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
199	3317	กากถั่วเหลือง	4/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
200	3318	เมล็ดถั่วเหลือง	4/2/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
201	3319	เมล็ดถั่วเหลือง	4/2/2547	Non-GMOs		แคนาดา
202	3326	เมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียด	11/2/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
203	3327	เมล็ดถั่วเหลืองบดละเอียด	11/2/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
204	3329	กากถั่วเหลือง	11/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
205	3330	กากถั่วเหลือง	11/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
206	3331	เมล็ดถั่วเหลือง	11/2/2547	Non-GMOs		แคนาดา
207	3332	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	GMOs	1.97	อินเดีย
208	3333	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
209	3334	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
210	3335	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
211	3336	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
212	3337	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	Non-GMOs		อินเดีย
213	3353	กากถั่วเหลือง	5/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
214	3354	เมล็ดถั่วเหลือง	5/3/2547	Non-GMOs		แคนาดา
215	3363	กากถั่วเหลือง	4/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
216	3364	กากถั่วเหลือง	4/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
217	3365	กากถั่วเหลือง	4/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
218	3366	กากถั่วเหลือง	4/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
219	3367	เมล็ดถั่วเหลือง	4/3/2547	Non-GMOs		แคนาดา
220	3370	กากถั่วเหลือง	17/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
221	3371	กากถั่วเหลือง	17/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
222	3382	กากถั่วเหลือง	19/3/2547	GMOs	1.045	ไม่ระบุ
223	3386	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
224	3387	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
225	3388	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
226	3389	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
227	3390	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
228	3391	กากถั่วเหลือง	29/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
229	3396	กากถั่วเหลือง	22/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
230	3397	กากถั่วเหลือง	22/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
231	3399	กากถั่วเหลือง	22/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
232	3400	กากถั่วเหลือง	22/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
233	3403	กากถั่วเหลือง	19/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
234	3404	กากถั่วเหลือง	19/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
235	3405	กากถั่วเหลือง	19/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
236	3406	กากถั่วเหลือง	19/4/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
237	3421	กากถั่วเหลือง	19/4/2547	Non-GMOs		อินเดีย
238	3427	เมล็ดถั่วเหลือง	20/5/2547	Non-GMOs		แคนาดา
239	3428	เมล็ดถั่วเหลือง	20/5/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
240	3429	เมล็ดถั่วเหลือง	20/5/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
241	3430	เมล็ดถั่วเหลือง	20/5/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
242	3433	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
243	3434	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
244	3435	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
245	3436	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
246	3437	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
247	3438	กากถั่วเหลือง	14/5/2547	Non-GMOs		อินเดีย
248	3439	กากถั่วเหลือง	20/5/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
249	3467	เมล็ดถั่วเหลือง	8/6/2547	Non-GMOs		แคนาดา
250	3468	กากถั่วเหลือง	8/3/2547	Non-GMOs		อินเดีย
251	3502	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
252	3503	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
253	3504	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
254	3505	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
255	3506	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
256	3508	เมล็ดถั่วเหลือง	14/7/2547	Non-GMOs		แคนาดา
257	3509	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	Non-GMOs		อินเดีย
258	3510	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	Non-GMOs		อินเดีย
259	3511	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	GMOs	75.66	อินเดีย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
260	3512	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	Non-GMOs		อินเดีย
261	3518	กากถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		อินเดีย
262	3521	เมล็ดถั่วเหลือง	21/7/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
263	3522	เมล็ดถั่วเหลือง	21/7/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
264	3523	เมล็ดถั่วเหลือง	21/7/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
265	3529	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
266	3533	กากถั่วเหลือง	2/8/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
267	3535	เมล็ดถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		แคนาดา
268	3537	กากถั่วเหลือง	9/8/2547	Non-GMOs		อินเดีย
269	3556	เมล็ดถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		แคนาดา
270	3557	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		อินเดีย
271	3558	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		อินเดีย
272	3559	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	GMOs	0.13	สหรัฐอาหรับอิมิเรต
273	3564	เมล็ดถั่วเหลือง	9/9/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
274	3565	เมล็ดถั่วเหลือง	9/9/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
275	3623	เมล็ดถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		แคนาดา
276	3624	เมล็ดถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		แคนาดา
277	3635	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
278	4130	เมล็ดถั่วเหลือง	8/10/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
279	6503	เมล็ดถั่วเหลือง	15/10/2547	Non-GMOs		ญี่ปุ่น
280	6504	เมล็ดถั่วเหลือง	15/10/2547	Non-GMOs		แคนาดา
281	6505	เมล็ดถั่วเหลือง	15/10/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
282	6506	เมล็ดถั่วเหลือง	15/10/2547	Non-GMOs		ไต้หวัน
94	6548	เมล็ดถั่วเหลือง	10/11/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
283	6559	เมล็ดถั่วเหลือง	12/11/2547	Non-GMOs		แคนาดา
284	6586	กากถั่วเหลือง	9/12/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ
285	6589	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
286	6590	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
287	6591	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
288	6592	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
289	6593	เมล็ดถั่วเหลือง	9/12/2547	Non-GMOs		ไม่ระบุ
290	6632	เมล็ดถั่วเหลือง	27/12/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
291	6633	เมล็ดถั่วเหลือง	27/12/2547	Non-GMOs		แคนาดา
292	6634	เมล็ดถั่วเหลือง	27/12/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
293	6635	เมล็ดถั่วเหลือง	27/12/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
294	6636	เมล็ดถั่วเหลือง	27/12/2547	Non-GMOs		สหรัฐอเมริกา
295	6656	เมล็ดถั่วเหลือง	10/1/2548	Non-GMOs		แคนาดา
296	6737	เมล็ดถั่วเหลือง	18/3/2548	Non-GMOs		เกาหลี
297	6738	เมล็ดถั่วเหลือง	18/3/2548	Non-GMOs		แคนาดา
298	6739	เมล็ดถั่วเหลือง	18/3/2548	Non-GMOs		แคนาดา
299	6740	เมล็ดถั่วเหลือง	18/3/2548	Non-GMOs		แคนาดา
300	6741	เมล็ดถั่วเหลือง	18/3/2548	Non-GMOs		ญี่ปุ่น oss
301	6806	เมล็ดถั่วเหลือง	26/4/2548	Non-GMOs		แคนาดา
302	6807	เมล็ดถั่วเหลือง	26/4/2548	Non-GMOs		แคนาดา
303	6808	เมล็ดถั่วเหลือง	26/4/2548	Non-GMOs		แคนาดา
304	6809	เมล็ดถั่วเหลือง	26/4/2548	Non-GMOs		แคนาดา
305	6865	เมล็ดถั่วเหลือง	3/6/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ
306	6866	เมล็ดถั่วเหลือง	3/6/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ
307	6958	เมล็ดถั่วเหลือง	29/6/2548	Non-GMOs		แคนาดา
308	6959	เมล็ดถั่วเหลือง	29/6/2548	Non-GMOs		แคนาดา
309	6980	เมล็ดถั่วเหลือง	7/7/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ
310	6981	เมล็ดถั่วเหลือง	7/7/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ
311	7026	กากถั่วเหลือง	26/7/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ
312	7032	เมล็ดถั่วเหลือง	2/8/2548	Non-GMOs		แคนาดา
313	7033	เมล็ดถั่วเหลือง	2/8/2548	Non-GMOs		แคนาดา
314	7039	เมล็ดถั่วเหลือง	22/8/2548	Non-GMOs		แคนาดา
315	7040	เมล็ดถั่วเหลือง	22/8/2548	Non-GMOs		แคนาดา
316	7572	เมล็ดถั่วเหลือง	15/9/2548	Non-GMOs		ไม่ระบุ

ตารางที่ 10 การสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์แปรรูป ผลการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี PCR การตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนด้วยวิธี Real-time PCR

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
1	1672	แป้งข้าวโพด + เลซิติน	5/10/2544	Non-GMOs	
2	1673	เลซิติน	5/10/2544	Non-GMOs	
3	1804	ผงปรุงรส Zinger prebust/breader	11/1/2545	Non-GMOs	
4	1806	ผงปรุงรส Cripsy Strips	11/1/2545	Non-GMOs	
5	2050	ผงปรุงรส GRISPY SIRIPS BREADER	21/2/2545	Non-GMOs	
6	2051	ผงปรุงรส ZINGER BTTER	22/2/2545	Non-GMOs	
7	2052	ผงปรุงรส ZINGER PRODUST/BREADER	22/2/2545	Non-GMOs	
8	2053	ผงปรุงรส COLONEL FILLET PREDUST	22/2/2545	Non-GMOs	
9	2055	ผงปรุงรส COLONEL FILLET BREADER	21/2/2545	Non-GMOs	
10	2239	แป้งโปรตีนถั่วเหลือง	29/5/2545	Non-GMOs	
11	2269	ผงปรุงรส Crispy Strips Breader	5/7/2545	Non-GMOs	
12	2274	อาหารสัตว์	18/6/2545	GMOs	27.8
13	2275	อาหารสัตว์	18/6/2545	GMOs	0.4
14	2345	อาหารสัตว์ 592 k	5/7/2545	GMOs	1.2
15	2372	แป้งถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	3.6
16	2473	อาหารสัตว์	14/8/2545	Non-GMOs	
17	2505	อาหารสัตว์	3/9/2545	GMOs	3.3
18	2506	อาหารสัตว์	3/9/2545	GMOs	2.7
19	2526	แป้งถั่วเหลือง	25/9/2545	GMOs	0.7
20	2527	ผงปรุงรส Colonel fillet Produst	25/9/2545	Non-GMOs	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
21	2529	ผงปรุงรส F Colonel fillet Breader	8/10/2545	Non-GMOs	
22	2530	ผงปรุงรส Zinger Predust Breader # BM 401-10	8/10/2545	Non-GMOs	
23	2531	ผงปรุงรส Zinger Batter # BM 400-2	8/10/2545	Non-GMOs	
24	2549	Rice Cracker with Flavour	24/10/2545	Non-GMOs	
25	2550	Rice Cracker with Sea Laver	24/10/2545	Non-GMOs	
26	2551	Rice Cracker with Flavour	24/10/2545	Non-GMOs	
27	2578	ผงปรุงรส Crispy Strips Breader # BM 399-15	30/10/2545	Non-GMOs	
28	2641	แป้งถั่วเหลือง	24/1/2546	GMOs	0.2
29	2695	เครื่องดื่มธัญญาหาร	4/3/2546	Non-GMOs	
30	2696	เครื่องดื่มธัญญาหาร	4/3/2546	Non-GMOs	
31	2697	เครื่องดื่มธัญญาหาร	17/3/2546	Non-GMOs	
32	2698	เต้าเจี้ยว	4/2/2546	Non-GMOs	
33	2699	เต้าเจี้ยว	10/3/2546	Non-GMOs	
34	2700	ฟองเต้าหู้	24/2/2546	Non-GMOs	
35	2701	เต้าหู้หลอด	24/2/2546	Non-GMOs	
36	2737	ผงปรุงรส Colonel Fillet Marinade # PF391	24/3/2546	Non-GMOs	
37	2738	ผงปรุงรส Colonel Fillet Predust # BM402	24/3/2546	Non-GMOs	
38	2740	ผงปรุงรส Colonel Fillet Predust # BM 404	24/3/2546	Non-GMOs	
39	2776	สตรอเบอรี่อบแห้ง	9/4/2546	Non-GMOs	
40	2800	ผงปรุงรส Crispy Strips Breader	14/5/2546	Non-GMOs	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
41	2801	ผงปรุงรส Crispy Strips Breader	14/5/2546	Non-GMOs	
42	2802	ผงปรุงรส Zinger Marinade	14/5/2546	Non-GMOs	
43	2844	นมถั่วเหลือง	20/5/2546	Non-GMOs	
44	2845	นมถั่วเหลือง	20/5/2546	Non-GMOs	
45	2846	ผงปรุงรส Zinger Predust Breader	29/5/2546	Non-GMOs	
46	2847	ผงปรุงรส Zinger Batter	29/5/2546	Non-GMOs	
47	2848	ผงปรุงรส Hot Spicy Marinade	29/5/2546	Non-GMOs	
48	2849	ผงปรุงรส Hot Spicy Breading	29/5/2546	Non-GMOs	
49	2886	ซอสปรุงรส	17/11/2546	Non-GMOs	
50	2887	ผงเต้าหู้สำเร็จรูป	5/6/2546	Non-GMOs	
51	2889	ซุปกึ่งสำเร็จรูป(มิโกะซาน)	9/6/2546	Non-GMOs	
52	2890	ซุปเต้าเจี้ยวบด	5/6/2546	Non-GMOs	
53	2895	ถั่วเหลืองหมักนัตโตะ	6/6/2546	Non-GMOs	
54	2896	ถั่วเหลืองหมักนัตโตะ	6/6/2546	Non-GMOs	
55	2897	ถั่วเหลืองหมักนัตโตะ	6/6/2546	Non-GMOs	
56	2937	อาหารสัตว์	26/6/2546	Non-GMOs	
57	2980	แป้งถั่วเหลือง	30/7/2546	Non-GMOs	
58	3081	ผงปรุงรส Colonel Fillet Marinade	11/11/2546	Non-GMOs	
59	3082	ผงปรุงรส Colonel Fillet Predust	25/9/2546	Non-GMOs	
60	3084	ผงปรุงรส Colonel Fillet Breader	25/9/2546	Non-GMOs	
61	3086	เต้าหู้ถั่วเหลือง	20/10/2546	Non-GMOs	
62	3089	เต้าเจี้ยว	20/10/2546	Non-GMOs	
63	3090	เต้าเจี้ยว	28/10/2546	Non-GMOs	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
64	3091	ฟองเต้าหู้	14/10/2546	Non-GMOs	
65	3095	ซอสถั่วเหลืองผง	27/10/2546	Non-GMOs	
66	3096	ซอสถั่วเหลืองผง	27/10/2546	Non-GMOs	
67	3100	เลซิติน	24/10/2546	Non-GMOs	
68	3101	เลซิติน	14/10/2546	Non-GMOs	
69	3102	ไขมันถั่วเหลืองผง	24/10/2546	Non-GMOs	
70	3103	โปรตีนถั่วเหลืองผง	20/10/2546	GMOs	0.2
71	3129	ผงปรุงรส Crispy Bredder	17/10/2546	Non-GMOs	
72	3130	ผงปรุงรส Zinger Marinade	17/10/2546	Non-GMOs	
73	3142	แป้งประกอบอาหาร	10/11/2546	Non-GMOs	
74	3169	ผงปรุงรส Zinger Predust Breader	26/11/2546	Non-GMOs	
75	3170	ผงปรุงรส Zinger Batter	26/11/2546	Non-GMOs	
76	3171	ผงปรุงรส Hot & Spicy Marinade	26/11/2546	Non-GMOs	
77	3172	ผงปรุงรส Hot & Spicy Breading	26/11/2546	Non-GMOs	
78	3210	สาหร่ายอบกรอบ	8/11/2546	Non-GMOs	
79	3231	ข้าวโพดครีมกระป๋อง	9/12/2546	Non-GMOs	
80	3234	นมถั่วเหลือง	29/12/2546	Non-GMOs	
81	3342	แป้งถั่วเหลือง	25/2/2547	Non-GMOs	
82	3360	ซอสมะเขือเทศ	23/2/2547	Non-GMOs	
83	3361	ซอสดิบ	11/3/2547	Non-GMOs	
84	3362	ซีอิ๊วดิบ	11/3/2547	Non-GMOs	
85	3368	เม็ดพริกไทยอ่อนกระป๋อง	26/2/2547	Non-GMOs	
86	3369	เม็ดพริกไทยแก่กระป๋อง	26/2/2547	Non-GMOs	
87	3407	อาหารสัตว์	19/4/2547	Non-GMOs	
88	3432	ซอสหอยนางรม	12/5/2547	Non-GMOs	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
89	3440	อาหารสัตว์	20/5/2547	Non-GMOs	
90	3462	แป้งถั่วเหลือง	15/6/2547	Non-GMOs	
91	3534	อาหารสัตว์	2/8/2547	Non-GMOs	
92	3567	ผงปรุงรส Criscy Strips	10/9/2547	Non-GMOs	
93	4141	ซอสถั่วเหลืองผง	23/12/2547	Non-GMOs	
94	4142	ซอสถั่วเหลืองผง	23/12/2547	Non-GMOs	
95	4679	เลซิติน EM-10 Lecithin	9/11/2547	Non-GMOs	
96	4680	เลซิติน EM-15 Lecithin	9/11/2547	Non-GMOs	
97	4681	ไขมันถั่วเหลืองผง	23/9/2547	Non-GMOs	
98	4682	โปรตีนถั่วเหลืองผง	23/9/2547	GMOs	0.1
99	6549	ผงปรุงรส Zinger predust	10/11/2547	Non-GMOs	
100	6550	ผงปรุงรส Zinger Batter	10/11/2547	Non-GMOs	
101	6551	ผงปรุงรส Hot & Spicy Marinade	10/11/2547	Non-GMOs	
102	6552	ผงปรุงรส Hot & Spicy Breading	10/11/2547	Non-GMOs	
103	6555	ผงปรุงรส Chicken HPV	10/11/2547	Non-GMOs	
104	6556	ผงปรุงรส Chicken HPV	10/11/2547	Non-GMOs	
105	6587	อาหารสัตว์	18/11/2547	Non-GMOs	
106	6661	ซอสดิบ	19/1/2548	Non-GMOs	
107	6669	ผงปรุงรส Black Peper Seasoning	20/1/2548	Non-GMOs	
108	6670	ผงปรุงรส Black Peper Seasoning	20/1/2548	Non-GMOs	
109	6671	ผงปรุงรส Pizza Seasoning	20/1/2548	Non-GMOs	
110	6672	ผงปรุงรส Pizza Seasoning	20/1/2548	Non-GMOs	
111	6673	ผงปรุงรส Seaweed Seasoning	20/1/2548	Non-GMOs	
112	6692	อาหารสัตว์	24/1/2548	Non-GMOs	
113	6693	อาหารสัตว์	24/1/2548	Non-GMOs	
114	6700	ผงปรุงรส Japanese Seaweed Seasoning	14/2/2548	Non-GMOs	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์ PCR	ผลการตรวจวิเคราะห์ Real-time PCR Aver.
115	6701	ผงปรุงรส Supreme Salmon Seasoning	14/2/2548	Non-GMOs	
116	6703	ซอสดิบ	16/2/2548	Non-GMOs	
117	6727	ผงปรุงรส mace powder	7/3/2548	Non-GMOs	
118	6728	ผงปรุงรส Onion powder	7/3/2548	Non-GMOs	
119	6729	ผงปรุงรส Paprika powder	7/3/2548	Non-GMOs	
120	6785	อาหารสัตว์	8/4/2548	Non-GMOs	
121	6789	ซอสหอยนางรม	19/4/2548	Non-GMOs	
122	6844	แป้งถั่วเหลือง	25/5/2548	Non-GMOs	
123	6852	โปรตีนเกษตร	31/5/2548	GMOs	0.1
124	6853	โปรตีนเกษตร	31/5/2548	GMOs	0.1
125	6854	โปรตีนเกษตร	31/5/2548	GMOs	0.1
126	6858	อาหารสัตว์	2/6/2548	Non-GMOs	
127	6935	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
128	6936	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
129	6937	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
130	6938	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
131	6939	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
132	6940	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
133	6941	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
134	6942	นมถั่วเหลือง	28/6/2548	Non-GMOs	
135	6978	นมถั่วเหลือง	5/7/2548	Non-GMOs	
136	7014	อาหารสัตว์	8/7/2548	Non-GMOs	
137	7015	อาหารสัตว์	8/7/2548	Non-GMOs	
138	7041	อาหารสัตว์	23/8/2548	Non-GMOs	
139	7042	อาหารสัตว์	23/8/2548	Non-GMOs	
140	7578	ผงปรุงรส Crispy Breader	21/9/2548	Non-GMOs	