ระดับโครงการ

รายงานโครงการวิจัย

ชื่อเรื่องภาษาไทย: การพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time PCR สำหรับตรวจคัดกรองและจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพในพืชนำเข้า (ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และ ข้าวโพด)

ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ: The development of Multiplex Real-time PCR techniques for qualitative and identification screening of GM crops in imported crops (Rice, Wheat, Soybeans and, Maize)

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์

Ms. Piyarat Thammakijjawat

ปี 2564

กรมวิชาการเกษตร

คำปรารภ

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานที่มีภาระกิจหลักด้านการศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนา ระบบการตรวจสอบจำแนกพิสูจน์พืช และจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อควบคุมการระบาดและเฝ้าระวังพืชและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม ตามพระราชบัญญัติกักพืช ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีการพัฒนาเทคนิค Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และข้าวโพด ให้สามารถตรวจจำแยกยีนดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความรวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลา และงบประมาณ

โดยจะมีการขยายผลเพื่อขอการรับรองวิธีการทดสอบ ขั้นตอนการปฏิบัติงานตามระบบคุณภาพ และนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อแก้ปัญหาและรองรับการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการนำเข้า และเพื่อควบคุมกำกับดูแลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม

คณะผู้วิจัย
ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ปิยนุช ศรชัย
ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ
วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร
มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time PCR สำหรับตรวจคัดกรองและจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพในพืชนำเข้า (ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และ ข้าวโพด) ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 2 ปี เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2563 สิ้นสุด 31 ธันวาคม 2564 คณะผู้วิจัยได้ดำเนินงานวิจัยตามระบบคุณภาพ และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างทดสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ซึ่งห้องปฏิบัติการฯ ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ตุลาคม 2563 – 31 ธันวาคม 2564 การดำเนินงานวิจัยในโครงการฯ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทีมผู้ช่วยวิจัยในโครงการฯ คณะกรรมการวิจัยและพัฒนา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะกรรมการที่ปรึกษางานวิจัย กรมวิชาการเกษตร ตลอดจนบุคลากรในสังกัดกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน

มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย
(คณะผู้วิจัย)

หัวหน้าโครงการ : นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ (Piyarat Thammakijjawat)
ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
โทรศัพท์: 0-2579-1535, 08-1847-9789 โทรสาร: 0-2579-1533
e-mail: pthammakijjawat@gmail.com

นักวิจัย 1) นางสาวปิยนุช ศรชัย (Piyanuch Sornchai)
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
โทรศัพท์: 0-2579-1533-5, 061-641-9591 โทรสาร: 0-2579-1533
e-mail: butakurogo@hotmail.com

นักวิจัย 2) นางสาวฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ (Thitirut Assawamongkholsiri)
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
โทรศัพท์: 0-2579-1533-5, 086-260-4449 โทรสาร: 0-2579-1533
e-mail: thitirut.assawamongkholsiri@gmail.com

นักวิจัย 3) นายวีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร (Weerasak Pitaksaringkarn)
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
โทรศัพท์: 0-2579-1535, โทรสาร: 0-2579-1533
e-mail: weraouddy@hotmail.com

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม ภายใต้การดำเนินงานของกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้รับการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 โดยในปัจจุบันมีการตรวจคัดกรองยีน *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator และ ยีนอ้างอิงพืช ซึ่งเป็นการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพ เพื่อบ่งชี้ถึงการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมในตัวอย่างทดสอบ การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์พืชหรือสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมในข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และข้าวโพด พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Genescan Lysis ได้ค่าปริมาณและบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจคัดกรองและจำแนกแยกข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Bt63, LL601 และ LL62 โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator และ *PLD* 2) *P35S::Bar*, *CryIAb/Ac*, *LL62* และ *LL601* ในข้าวสาลีสามารถจำแนกได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ MON71800 และ MON71200 และจำแนกการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่น ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด และ คาโนลา โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Acc-1* และ *MON71800* 2) *Lectin, HMG, CruA* และ *MON71200* ในถั่วเหลืองสามารถจำแนกได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ events A2704-12, MON87701, MON87705, MON87769, MON89788 และ GTS 40-3-2 โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* 2) *rbcS-E9*, *Mon 87705*, *Mon 89788* และ *Lectin* สำหรับข้าวโพดสามารถจำแนกได้ 14 สายพันธุ์ ได้แก่ Bt11, GA21, TC1507, DAS59122-7, T25, MIR604, Mon810, Mon88017, Mon89034, NK603, MIR162, Mon87460, Mon87427, และ DAS40278-9 โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพียง 1 ชุด ได้แก่ *P35S, Nos*, *Pat, FMV และ Ubiquitin* พบว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบและติดฉลากสีมีความจำเพาะกับยีนที่ใช้ตรวจคัดกรองในแต่ละชนิดพืช โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจคัดกรองแบบยีนเดี่ยว พบว่าสามารถลดเวลาการตรวจคัดกรอง โดยใช้ต้นทุนสารเคมีลดลง และจากการทดสอบความใช้ได้เปรียบเทียบระหว่างการตรวจคัดกรองแบบยีนเดี่ยวกับเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่า เทคนิคที่พัฒนาขึ้น ค่าความถูกต้องของผลการทดสอบ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าขีดจำกัดของตรวจพบ (LOD) ไม่แตกต่างกันกับการตรวจแบบยีนเดี่ยว นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาวัสดุอ้างอิงพลาสมิดของข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ MON71800ขึ้น เพื่อใช้ทดแทนการนำเข้าของวัสดุอ้างอิงทดสอบจากต่างประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Genetically modified plant and plant's product detection laboratory under Genetically modified plant and microbe research and development group, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture has been accredited for ISO/IEC 17025 laboratory. In present, CaMV35S Promoter, NOS terminator and plant's endogenous gene have been used for screening in qualitative detection for determination of GM plant in summitted sample. Development of detection of GM plant and its product in rice, wheat, soybean and corn found that Genescan Lysis method is appropriate method for DNA extraction by performing high quantity and quality of extracted DNA for using in Multiplex Real-time PCR which is be able to classify 3 events of GM rice, Bt63, LL601 and LL62 by employing 2 set of primers and probes 1) CaMV35S Promoter, Nos terminator and PLD 2) P35S::Bar, CryIAb/Ac, LL62 and LL601. In wheat is be able to classify 2 events, MON71800 and MON71200 and also separate from another GM species, soybean, corn and canola by employing 2 set of primers and probes 1) CaMV35S Promoter, Nos terminator, Acc-1 and MON71800 2) Lectin, HMG, CruA and MON71200. In soybean is be able to classify 6 events of soybean GM, A2704-12, MON87701, MON87705, MON87769, MON89788 and GTS 40-3-2 by employing 2 set of primers and probes 1) CaMV35S Promoter, Nos terminator, Cy1Ac and Lectin 2) rbcS-E9, Mon 87705, Mon 89788 and Lectin. In corn is be able to classify 14 events of GM corn, Bt11, GA21, TC1507, DAS59122-7, T25, MIR604, Mon810, Mon88017, Mon89034, NK603, MIR162, Mon87460, Mon87427 and DAS40278-9 by employing 1 set of primers and probes P35S, Nos, Pat, FMV and Ubiquitin. The designed primers and probe are specific and efficiency for detection target genes in each plant. Comparing to Simplex Real-time PCR, Multiplex Real-time PCR perform faster working time and lower chemical cost. The method validation of Multiplex Real-time PCR compares to Simplex Real-time PCR showed 100% accuracy and same LOD. Moreover, MON71800 in-house reference plasmid was developed for using as positive control instead of importation from foreign country.

สำนักวิทยบริการฯ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำปรารภ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
ผู้วิจัย (คณะผู้วิจัย)	ง
บทคัดย่อ	จ
Abstract	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	28
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	68

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

เรื่อง **หน้า**

บทที่ 2 ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

Figure 2.1-1 Condition of Multiplex Real-time PCR 7

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

Figure 2.2-1 The schematic diagrams of the designed in-house pUC57-MON71800 which consist of *CaMV35S* promoter, *ACC-1*, *MON71800* event specific element, NOS terminator, ampicillin resistant gene and restriction recognize region between each gene. 11

Figure 2.2-2 The fragment sequence of designed insertion genes. The red letter indicates position of forward primer, reverse primer and probe of each gene. The green letter indicates position of restriction enzyme sites. 12

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

เรื่อง **หน้า**

บทที่ 2 ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

Table 2.1-1 Primers and probes sequence 5

Table 2.1-2 The structure of designed 2 sets of screening and detection of GM wheat and other GM contamination 6

Table 2.1-3 The mixture chemical use in Triplex and Tetraplex Real-time PCR 8

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

Table 2.2-1 The sequences of oligonucleotide of primers and probes for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* genes for first set and *HMG*, *Lectin*, *MON71200* event specific and *CruA* for second set 13

Table 2.2-2 The structure of designed 2 sets of screening and detection of GM wheat and other GM contamination 14

Table 2.2-3 Reagents for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* for first set of primers and probes and *HMG*, *Lectin*, *MON71200* event specific and *CruA* for second set of primers and probes by Real-Time PCR (Simplex and Tetraplex) 15

การทดลองที่ 3 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม events A2704-12 Mon87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2

Table 2.3-1 Oligonucleotide sequences of primer and probe for detection 7 genes of genetically modified soybean 19

Table 2.3-2 The detection of soybean gene structure by Tetraplex Real-time for experiment A and experiment B 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

Table 2.3-3 Reagents used for detection of soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time for experiment A 21

Table 2.3-4 Reagents used for detection of soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time for experiment B 22

การทดลองที่ 4 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 events

Table 2.4-1 The GM certified reference materials information in this study 25

บทที่ 3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

Table 3.1-1 Rice and its product DNA extraction and inhibition test 28

Table 3.1-2 Specific test of primers and probes of *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *PLD*, *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* and *Bar* 29

Table 3.1-3 Amplification factor, PCR efficiency, slope, linearity and intercept of CaMV35S promoter, NOS terminator, PLD CryIAb/Ac, event specific LL62, event specific LL601 and Bar genes detection using Triplex and Tetraplex Real-time PCR 30

Table 3.1-4 Precision accuracy and repeatability of Multiplex real-time PCR 31

Table 3.1-5 Limit of detection of CaMV35S Promoter, NOS terminator, PLD, CryIAb/Ac, event specifc LL62, event specific LL601 and Bar in Multiplex Real-time PCR reaction 32

Table 3.1-6 Testing of 50 rice and its product samples from ISO/IEC17025 laboratory in 2 sets of primers and probe 33

Table 3.1-7 Testing of spike samples into non-GM rice in 2 sets of primers and probes 34

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

Table 3.2-1 Concentration, ratio of A260/280 and inhibition test of extracted DNA from wheat and wheat's products 34

Table 3.2-2 Specific test of primers and probes of *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1 MON71800*, *Lectin*, *HMG*, *CruA* and *MON71200* in Simplex Real-time PCR 35

Table 3.2-3 Crossing point (CP) of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* by using of PUC57-MON71800 plasmid (1 pg) as a template in Simplex and Tetraplex Real-Time PCR reaction *$P < 0.05$ (t-test) (n=3). 36

Table 3.2-4 Crossing point (CP) of *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* event specific element by using wheat spiked corn, soybean, canola DNA at 0.05% and MON71200 (Wako) plasmid DNA at 0.1% as a template in Simplex and Tetraplex Real-Time PCR reaction *$P < 0.05$ (t-test) (n=3). 36

Table 3.2-5 Amplification factor, PCR efficiency, slope, linearity and intercept of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800*, *ACC-1*, *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* genes detection using Tatraplex Real-time PCR 37

Table 3.2-6 Precision accuracy and repeatability of Tetraplex real-time PCR 38

Table 3.2-7 Limit of detection (LOD) of PUC57-MON71800 plasmid for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* in Tetraplex Real-Time PCR reaction. (n=10) 39

Table 3.2-8 Limit of detection (LOD) of *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* event specific element in Tetraplex Real-Time PCR reaction. (n=10) 39

Table 3.2-9 Testing of 30 wheat samples from ISO/IEC17025 laboratory in 2 sets of primers and probe (n=2) 40

Table 3.2-10 Blind test of spiked different kinds of GM samples in non-GM wheat DNA for testing on designed 2 sets of primers and probes (n=3) 42

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

การทดลองที่ 3 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม events A2704-12 Mon87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2

Table 3.3-1 the DNA concentration and DNA Ratio of DNA extraction 43

Table 3.3-2 The C_t of specific test on soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time 45

Table 3.3-3 The C_t results of various primer-probe concentrations for detection genetically modified soybean by Tetraplex Real-time 47

Table 3.3-4 The results of C_t, PCR efficiency, and slope on LOD testing for genetically modified soybean by Tetraplex Real-time 49

Table 3.3-5 The results of C_t on various DNA template concentrations for genetically modified soybean detection by Tetraplex Real-time 50

Table 3.3-6 Soybean food and seed, PT samples, and plant samples screened by Tetraplex Real-time compared with Triplex Real-time PCR assay which analyzing by Research and Development of GM Plant & Microbe Detection Lab 53

การทดลองที่ 4 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 events

Table 3.4-1 Quality, concentration, and Inhibition test results of 14 genetically modified after DNA extraction 55

Table 3.4-2 The construct gene information of 14 genetically modified maize 57

Table 3.4-3 Oligonucleotide sequences of primer and probe of construct gene for event gene detection in 14 genetically modified maize 58

Table 3.4-4 The Ct Mean results of primers and probes specificity for 35SCaMV promoter, NOS terminator, FMV promoter, *PAT* and *Ubi*-1 gene using Simplex and Multiplex Real-time PCR techniques. 60

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

Table 3.4-5 PCR efficiency, slope, linearity and intercept of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV and *Pat* gene detection using Multiplex Real-time PCR 61

Table 3.4-6 The repeatability and reproducibility of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV and *Pat* gene that were detected by using multiplex real-time PCR in 0.1% contaminated GM Maize 62

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วและมีศักยภาพสูงในการสร้างประโยชน์อย่างกว้างขวางในด้านต่างๆ เช่น ด้านการแพทย์ ด้านอุตสาหกรรม และด้านการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยหลักของพันธุวิศวกรรม ซึ่งวัตถุประสงค์ของการพัฒนาอาจแตกต่างกัน เช่น การสร้างพืชให้มีคุณลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม พืชทนแล้ง พืชทนเค็ม การปรับปรุงพันธุ์พืชทนทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคที่เกิดจากไวรัส แบคทีเรีย และแมลงศัตรูพืช การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ การปรับปรุงให้พืชมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น รวมถึงสร้างพืชที่ให้สีสันแปลกใหม่ตามความต้องการของตลาด เป็นต้น โดยพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีการปลูกและใช้ประโยชน์เชิงการค้าตั้งแต่ปี 2539 จนถึงปัจจุบันปี 2560 มีรายงานปลูกใน 26 ประเทศทั่วโลกพื้นที่ 1,186.25 ล้านไร่ ประเทศหลักคือสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา คุณลักษณะการดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการอนุญาตใช้มีมากกว่า 404 สายพันธุ์ (events) เป็นพืชไร่เศรษฐกิจ 356 สายพันธุ์ ไม้ผล 22 สายพันธุ์ ไม้ยืนต้น 23 สายพันธุ์ และไม้ดอกไม้ประดับ 3 สายพันธุ์ ชนิดพืชที่ผ่านการอนุมัติใช้ประโยชน์อาทิ ข้าวโพด (231 สายพันธุ์) ฝ้าย (60 สายพันธุ์) มันฝรั่ง (48 สายพันธุ์) คาโนลา (41 สายพันธุ์) และถั่วเหลือง (40 สายพันธุ์) โดยประเทศในเอเชียที่ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ อินเดีย (ฝ้าย) จีน (ฝ้าย มะละกอ poplar มะเขือเทศ sweet pepper) ปากีสถาน (ฝ้าย) ฟิลิปปินส์ (ข้าวโพด) เมียนมาร์ (ฝ้าย) อินโดนีเซีย (อ้อย) และเวียดนาม (ข้าวโพด) (ISAAA, 2560)

จากข้อมูลการพัฒนาและอนุญาตปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้น ยังมีกลุ่มประเทศที่ไม่อนุญาตปลูกแต่ให้นำเข้าเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอีกกว่า 31 ประเทศ รวมถึงประเทศไทยที่ไม่อนุญาตให้ปลูก แต่อนุญาตให้นำเข้าถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเพื่ออุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ จากประเด็นความปลอดภัยทางชีวภาพ ทำให้หลายประเทศใช้การตรวจการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นมาตรการกีดกันทางการค้า ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตร อุตสาหกรรม และการส่งออก ตัวอย่างเช่นประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศจีน ไม่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม สหภาพยุโรปมีระบบแจ้งเตือนเรื่องตรวจพบการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าส่งออก ซึ่งรายงานในปี พ.ศ. 2557-2560 ตรวจพบการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรม (ที่ไม่ได้รับอนุญาต) จากประเทศไทย รวม 21 ครั้ง (RASFF Food and Feed safety alerts; EU commission) ทำให้ผู้ประกอบการส่งออกสินค้าทางการเกษตร ต้องสุ่มตัวอย่างสินค้าส่งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์ปลอดการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงสามารถส่งออกได้

ประเทศไทยมีการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารของสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม รับผิดชอบโดยคณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (ศช.) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ประเมินแล้วเสร็จจำนวน 29 โครงการ เป็นข้าวโพด 19 โครงการ ถั่วเหลือง 6 โครงการ อาหารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม 4 โครงการ โดยมีโครงการที่อยู่ระหว่างการประเมินอีก 12 โครงการ ทั้งนี้มีพืชดัดแปลงพันธุกรรมอีกหลายชนิดและหลายสายพันธุ์ ที่ยังไม่ผ่านการประเมิน อาทิ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวไรน์ ข้าวบาร์เลย์ คาโนล่า ชูการ์บีท และพืชตระกูลถั่วอื่นๆ เป็นต้น ทำให้อาจมีโอกาสหลุดรอดปะปนเข้ามาในภาคอุตสาหกรรมของไทย ซึ่งนำเข้าวัตถุดิบมาใช้ในอุตสาหกรรม (นคร สอนสมบูรณ์ และคณะ, 2559) นับแต่ปี 2559 กรมวิชาการเกษตรรับภารกิจถ่ายโอนการตรวจสอบการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าวัตถุดิบนำเข้าจากกระทรวงสาธารณสุข ในพิกัด ถั่วเหลือง ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวไรน์ ข้าวบาร์เลย์ โดยตรวจคัดกรองยีน

กรมวิชาการเกษตร

35S Promoter และ Nos terminator ด้วย Real-time PCR ผลการตรวจตัวอย่าง พบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวสาลี ปะปนยีนคาโนล่าดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งคาดว่าเกิดจากกระบวนการขนส่ง ทั้งนี้พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่อนุญาตใช้ในเชิงพาณิชย์มีมากกว่า 350 สายพันธุ์ โดยแต่ละประเทศจะมีระบบการประเมินความปลอดภัยอนุญาตใช้เฉพาะกรณี ทำให้วิธีการตรวจคัดกรองยีน 35S Promoter และ Nos terminator ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่เพียงพอในการกำกับดูแลอีกต่อไป (Park et al, 2015)

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม ภายใต้การดำเนินงานของกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้รับการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นการรับรองในขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ และมะละกอ โดยการตรวจคัดกรองยีน CaMV35S Promoter และ Nos terminator ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ในพืชที่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม เชิงคุณภาพโดยวิธี Real-time PCR ทำปฏิกิริยาทีละคู่ไพเมอร์-โพรบ (single plex) 1 ตัวอย่างจะต้องตรวจ 3 ยีน คือ 1) การตรวจคัดกรองยีน CaMV35S Promoter 2) การตรวจคัดกรองยีน Nos terminator และ 3) การตรวจยีนอ้างอิงพืช (Endogenous gene) นอกจากนี้กรณีที่ต้องตรวจจำแนกชนิดยีนที่มีการตัดต่อพันธุกรรมครั้งละยีน ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายของสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนสิ้นเปลืองทรัพยากรในการตรวจวิเคราะห์ และใช้ระยะเวลาในตรวจวิเคราะห์นาน เจ้าหน้าที่ทดสอบต้องทำงานนอกเวลาราชการ เพื่อให้สามารถออกรายงานผลการทดสอบได้ทันกำหนดเวลา ตามพระราชบัญญัติอำนวยความสะดวกประชาชน ซึ่งสายพันธุ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการอนุญาตให้จำหน่ายเชิงการค้ามีจำนวนมาก หากไม่มีผลการตรวจวิเคราะห์อาจส่งผลกระทบต่อการนำเข้า-ส่งออก การพัฒนาเทคนิคตรวจวิเคราะห์ที่ไม่คลอบคลุม จะทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกับประเทศปลายทาง ทำให้เกิดความไม่น่าเชื่อถือทางการค้า ประกอบกับการควบคุมกำกับดูแลของประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลประกอบเรื่องสายพันธุ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีการนำเข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต เพื่อป้องกันปัญหาการปฏิเสธการนำเข้า-ส่งออกสินค้า ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ และจัดทำฐานข้อมูลการปะปนในวัตถุดิบนำเข้า เพื่อการรับมือทางด้านการค้ากับสถานการณ์ที่จะเปลี่ยนแปลงในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหน่วยราชการซึ่งมีภารกิจ บทบาทหน้าที่ในการควบคุมกำกับดูแลโดยตรง จะต้องมีการวิจัยพัฒนาให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ครอบคลุม ถูกต้อง น่าเชื่อถือ เพื่อรักษาผลประโยชน์ของประเทศในกรณีกรณีข้อพิพาท เป็นการสร้างบุคลากรที่มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนกำกับดูแลห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ตามระบบคุณภาพสากล ISO/IEC17025 และอำนวยความสะดวกให้แก่ประชาชนที่มาใช้บริการ

โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพทั้งการตรวจคัดกรองและจำแนกยีน หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน (Multiplex Real-time PCR) มุ่งเน้นการตรวจวิเคราะห์ในพืชนำเข้าที่ยังไม่มีกฎหมายกำกับดูแล ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี การตรวจวิเคราะห์พืชนำเข้าที่มีความเสี่ยงที่จะหลุดลอดปะปนเข้ามาในประเทศไทย เนื่องจากมีการปลูกเชิงการค้าและมีจำนวนสายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรมมาก ได้แก่ ข้าวโพด และถั่วเหลือง การวิจัยจะทำการตรวจวิเคราะห์อย่างเป็นระบบของแต่ละพืช ตรวจยีนจำเพาะและยีนคัดกรองเพิ่มเติมจากยีน 35S Promoter และ Nos terminator ทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ครอบคลุมชนิดของยีนดัดแปลงพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำ ลดระยะเวลาการตรวจ ประหยัดต้นทุน เตรียมพร้อมรองรับการตรวจวิเคราะห์และควบคุมกำกับดูแลในประเทศตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งอยู่ระหว่างดำเนินการปรับปรุงสำหรับการควบคุมการนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมทุกชนิด โดยจะอนุญาตนำเข้าและใช้เฉพาะที่ผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในประเทศแล้วเท่านั้น ได้ข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

ประกอบการจัดทำมาตรการหรือกฎหมายในการกำกับดูแลสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม และรวบรวมข้อมูลสำหรับการเปิดตลาดการค้ากับต่างประเทศในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex real-time PCR ที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลาและงบประมาณในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และข้าวโพด และจัดทำเอกสารวิธีทดสอบขั้นตอนการปฏิบัติงานสำหรับห้องปฏิบัติการ ขอรับรองมาตรฐาน ISO/IEC17025 โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยสำหรับแต่ละการทดลอง ดังนี้

1. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt63, LL62, LL601
2. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon71800 และตรวจสอบการปนเปื้อนพืชดัดแปลงพันธุกรรมจากการขนส่ง ตามแนวปฏิบัติในการตรวจวิเคราะห์ของสหภาพยุโรป
3. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ A2704-12 MON87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2
4. เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9.

1.3 ขอบเขตการศึกษา

พัฒนาวิธีทดสอบเพื่อใช้เป็นระบบการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างสินค้าและผลิตภัณฑ์ 4 พืช ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และข้าวโพด โดยพัฒนาจากวิธีการตรวจวิเคราะห์มาตรฐานสากลในการตรวจคัดกรองและตรวจจำแนกยีนที่ดัดแปลงพันธุกรรมของพืช สืบค้นข้อมูลวิธีมาตรฐาน ชนิดไพรเมอร์และโพรบ ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR วิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมของแต่ละกรณี วางแผนการทดสอบของปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LightCycler 480 (Roche) ของห้องปฏิบัติการที่สามารถรองรับสีฟลูออเรสเซนต์ในการทดสอบได้ 3-4 สีในปฏิกิริยาเดียวกัน จัดซื้อวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certified reference material; CRM) หรือวัสดุอ้างอิงของสิ่งทดลองใน Matrix ต่างๆ ได้แก่ ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ทดสอบปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและตรวจยีนจำเพาะพืช ทดสอบวิธีตรวจจำแนกยีนจำเพาะที่ได้รับการตัดต่อเข้าไปในพืชโดยวิธี Single plex และ Multiplex Real-time PCR ทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ ความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ ความแม่น ความเที่ยง ความทวนซ้ำได้ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ จากนั้นทำการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างสินค้าพืชในห้องปฏิบัติการ รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล และข้อมูลผลการทดสอบ เพื่อเป็นวิธีสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เป็นข้อมูลเพื่อรองรับการออกกฎหมายควบคุมกำกับดูแล และการขอรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ของห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

2.1.1 วัสดุอ้างอิง

วัสดุอ้างอิงสำหรับการทดลองนี้ คือ พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ LL601 (pGSE220, Eurofins) และ Bt63 (pGSE28, Eurofins) และจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ LL62 (Eurofins)

Table 2.1-1 Primers and probes sequence

Target	Name	Sequence (5'-3')	Length	Reference
CaMV35S Promoter	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	18	ISO21569:2005/ FDAM1:2012 (E), Waiblinger et al. (2008)
	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	22	
	35S-P	FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1	22	
NOS terminator	NOS-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	25	
	NOS-R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT	25	
	NOS-P	HEX-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1	28	
PLD	KVM159	TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT	20	Bayer CropScience (2006)
	KVM160	CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC	22	
	TM013	Cy5-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-BHQ3	23	
Bar	MDB498	TATCCTTCGCAAGACCCTTCC	21	
	DPA143	ATGTCGGCCGGGCGTCGTTCTG	22	
	TM099	TXRed-TCTATATAAGGAAGTTCATTTCATT-BHQ2	25	
CryIAb/Ac (Bt63 rice)	T51F (Cry1A(b/c)-93F	GACTGCTGGAGTGATTATCGACAGA	25	Made et al. 2006, 2008/289/EC
	T51R (Cry1A(b/c)-93R	AGCTCGGTACCTCGACTTATTCAG	24	
	T51P (Cry1A(b/c)-93P	FAM-TCGAGTTCATTCCAGTTACTGCAACACTCGAG-BHQ1	32	
LL62	MDB616-f	AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG	22	EU-JRC
	MDB694-r	TGCTAACGGGTGCATCGTCTA	21	
	TM019-P	HEX-CGCACCGATTATTTATACTTTTAGTCCACCT-BHQ1	31	
LL601	SHA040	TCTAGGATCCGAAGCAGATCGT	22	USDA GRAIN INSPECTION
	SHA041	GGAGGGCGCGGAGTGT	16	
	TM098	Cy5-CCACCTCCCAACAATAAAAGCGCCTG-BHQ3	26	

2.1.2 ไพรเมอร์และโพรบ

ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้อ้างอิงตามวิธีทดสอบมาตรฐาน งานวิจัยที่มีการเผยแพร่ และรายงานจากวิธีการทดสอบ (ISO21569:2005/FDAM1:2012 (E), Waiblinger et al. (2008), Bayer CropScience (2006), Made et al. 2006, 2008/289/EC, USDA GRAIN INSPECTION) โดยแบ่งชุดไพรเมอร์โพรบออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ประกอบด้วยยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และ *PLD* ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence dry) ที่โพรบเป็น FAM/BHQ1, Hex/BHQ1 และ Cy5/BHQ3 ตามลำดับเพื่อใช้สำหรับตรวจคัดกรองข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ชุดที่ 2 ประกอบด้วยยีน *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence dry) ที่โพรบเป็น FAM/BHQ1,

กรมวิชาการเกษตร

Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ตามลำดับ เพื่อสำหรับใช้ตรวจจำแนกสายพันธุ์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ดังแสดงใน **Table 2.1-1**

2.1.3 ออกแบบการตรวจคัดกรองและจำแนกข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

เนื่องจากข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการสืบค้นบนฐานข้อมูล GM approval database ของ ISAAA พบ 7 สายพันธุ์ แต่ที่สามารถจัดหาวัสดุอ้างอิงทดสอบได้ มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ LL601 LL62 และ Bt63 โดยแต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบของยีนแตกต่างกัน จึงทำการออกแบบชุดยีนที่ทำการตรวจคัดกรองในชุดที่ 1 ได้แก่ยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และ *PLD* ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างข้าวที่ทดสอบเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ และพอที่จะระบุความเป็นไปได้ของสายพันธุ์ สำหรับชุดยีนที่ 2 ประกอบด้วย *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ซึ่งจะสามารถระบุสายพันธุ์ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้ว่าคือสายพันธุ์ใด ดังแสดงใน **Table 2.1-2**

Table 2.1-2 The structure of designed 2 sets of screening and detection of GM wheat and other GM contamination

GM-event	Genetic elements			Pattern of Detection
	P-35S	*T-nos*	*PLD*	
Bt 63 Rice	-	+	+	1
LL 601 Rice	+	+	+	2
LL 62 Rice	+	-	+	3
Non-GM Rice	-	-	+	4
Negative	-	-	-	5

GM-event	Specific gene				Pattern of Detection
	Cry1Ab/Ac	*Bar*	*LL601*	*LL62*	
Bt Shanyou 63	+	+	-	-	1
LL Rice 601	-	+	+	-	2
LL Rice 62	-	+	-	+	3
Non-GM	-	-	-	-	4
Negative	-	-	-	-	4

+ means detected and – means not-detected

2.1.4 การสกัดดีเอ็นเอ และทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยา

ข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าวสาลีที่ผ่านการบดอย่างละเอียดแล้วจะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Lysis buffer (Rogers and Bendich, 1985) ที่มีการประยุกต์ใช้ filter column เพื่อจับกับ resin ที่เกาะกับโมเลกุลดีเอ็นเอ นำตัวอย่างน้ำหนัก 0.2 กรัม เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

กรมวิชาการเกษตร

ชั่วโมงกลับหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนและแยกสารโมเลกุลใหญ่อื่นออกไป โดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 2 รอบ นำส่วนใสมาเติม resin (Promega) และ ผ่านฟิลเตอร์ Wizard™ minicolumn (Promega) และล้างฟิลเตอร์ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำฟิลเตอร์คอลัมน์ประกอบเข้ากับหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ 12000 รอบต่อนาที เติมน้ำอุ่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำการเจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR เพื่อตรวจยีน ACC-1 จำนวน 3 ซ้ำ นำค่า Cp (Crossing point) ที่ได้มาวิเคราะห์หาสมการเชิงเส้น บันทึกค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) ค่า slope ของสมการ และค่า ΔCt (extrapolated) = Extrapol Ct - Mean Ct (Charles et al., 2008)

2.1.5 สภาวะของปฏิกิริยา

ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบในระดับต่างๆ ให้เหมาะสมในปฏิกิริยาแบบ Triplex และ Tetraplex Real-time PCR ทั้ง 2 ชุดของไพรเมอร์และโพรบ โดยทดสอบเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR เพื่อให้ได้ค่า Cp ที่ไม่มีความแตกต่างกัน โดยปฏิกิริยารวมมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ เริ่มต้นด้วย อุณหภูมิ Initial Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และลดอุณหภูมิลงที่ 4 องศาเซลเซียส (Waiblinger et al., 2008) ดังแสดงใน **Figure 2.1-1** และ **Table 2.1-3**

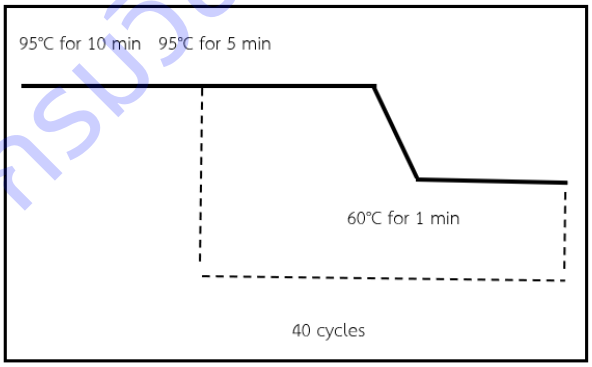

Figure 2.1-1 Condition of Multiplex Real-time PCR

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.1-3 The mixture chemical use in Triplex and Tetraplex Real-time PCR

Reagent (First set)	Final concentration/reaction (µM)	Reagent (second set)	Final concentration/reaction (µM)
2xLightCycer Probe master mix	1x	2xLightCycer Probe master mix	1x
35S-F	0.1	T51F (Cry1A(b/c)-93F	0.1
35S-R	0.1	T51R (Cry1A(b/c)-93R	0.1
35S-P	0.1	T51P (Cry1A(b/c)-93P	0.1
NOS-F	1.0	MDB616-f	1.0
NOS-R	1.0	MDB694-r	1.0
NOS-P	0.2	TM019-P	0.2
KMV159	0.05	MDB498	0.1
KMV160	0.05	DPA143	0.1
TM099	0.025	TM099	0.1
DNA template (ng)	50-200	SHA040	0.05
Total reaction volume	20	SHA041	0.05
		TM098	0.025
		DNA template (ng)	50-200
		Total reaction volume	20

กรมวิชาการเกษตร

2.1.6 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

นำไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบทั้ง 2 ชุด มาทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างพลาสมิด ดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) และ ข้าวไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติม (spike) pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) และจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 ในปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบผลที่ได้กับโครงสร้างองค์ประกอบยีนของตัวอย่างพืชนั้นๆ เพื่อหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder et al. (2014)

2.1.7 การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR

นำตัวอย่างจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) มาเจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Triplex Real-time PCR ของชุดยีนที่ 1 โดยใช้ตัวอย่างจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* และ เพิ่มเติมใช้ตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220

(LL601) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Tetraplex Real-time PCR ของชุดยีนที่ 2 สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* นำผลของค่า Cp ที่ได้ในแต่ละยีนมาสร้างสมการเส้นตรงความเข้มข้นมาตรฐานและคำนวนหาค่า Linearity (R^2) และค่า Slope และคำไปใช้คำนวณหา ค่า PCR efficiency จากสูตร $e = 10^{-1/slope}$ ตามวิธีของ Broeder et al. (2014)

2.1.8 การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL601 LL62 และ Bt63 ด้วย 2 ชุดไพรเมอร์และโพรบ

ทำการทดสอบความเที่ยงและความแม่นของการตรวจวิเคราะห์ยีนชุดที่ 1 *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* และชุดยีนที่ 2 *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ด้วยจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) ในปฏิกิริยาTriplex และ Tetraplex real-time PCR ตามลำดับ ตัวอย่างยีนเป้าหมายละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 รอบการทดสอบเพื่อหาความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำซ้ำแต่ละรอบ นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละยีน (%RSD) โดยคำนวนจากสูตร %RSD=(ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน/ค่าเฉลี่ย)x100 โดยค่าที่ยอมรับได้ควรมีค่า %RSD ที่น้อยกว่า 25% (Broeders et al. 2014)

2.1.9 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยนำตัวอย่าง จีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) มาเจือจางในระดับต่างๆ 10, 5 และ 1 copies ทำการตรวจวิเคราะห์ยีน ชุดที่ 1 *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* และชุดยีนที่ 2 *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Detect : Not-detect โดยค่าที่ยอมรับได้ต้องมากกว่า 90% ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีการตรวจสอบได้มากกว่า 90% ถือเป็นค่า LOD (Limit of detection) ของชุดยีนนั้นๆ (Broeders et al. 2014)

2.1.10 การขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

ขยายผลทดสอบชุดไพรเมอร์โพรบทั้ง 2 ชุดกับตัวอย่างข้าวที่มีการส่งตรวจกับห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ซึ่งผ่านการรับรองจากมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 จำนวน 50 ตัวอย่าง นอกจากนั้นยังทดสอบ Blind test กับตัวอย่างข้าวที่มีการ spike พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความถูกต้องของผลการทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

2.1.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของกลุ่มตัวอย่างทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 23.0

2.1.12 เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ตุลาคม 2563 – 31 ธันวาคม 2564 ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

2.2.1 วัสดุอ้างอิง

วัสดุอ้างอิงสำหรับการทดลองนี้ คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pUC57-MON71800 ซึ่งภายในประกอบด้วยชิ้นยีนที่ได้จากการสังเคราะห์ยีน *CaMV35S* promoter, *MON71800* event specific element, *ACC-1* และNOS terminator ตามลำดับ ดังแสดงใน **Figure 2.2-1** โดยมีความยาว 3650 bp มีการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 3700 DNA analyzer (PerkinElmer, Boston, MA, USA)

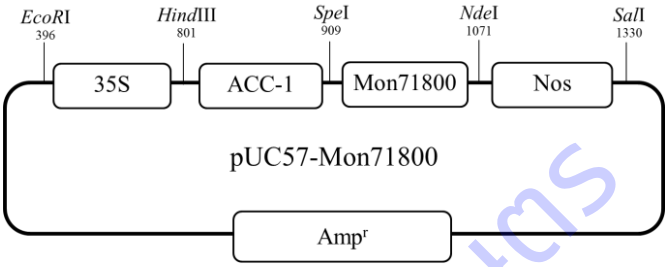

Figure 2.2-1 The schematic diagrams of the designed in-house pUC57-MON71800 which consist of *CaMV35S* promoter, *ACC-1*, *MON71800* event specific element, NOS terminator, ampicillin resistant gene and restriction recognize region between each gene.

โดยภายพลาสมิดระหว่างชิ้นยีนแต่ละชิ้นจะมีการใส่จุดตัดเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme site) เพื่อใช้สำหรับกรณีต้องการตัดให้พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอสายตรง นอกจากนั้นมีการระบุตำแหน่งที่ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้เข้าจับในปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย ดังแสดงใน **Figure 2.2-2**

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.2-2 The fragment sequence of designed insertion genes. The red letter indicates position of forward primer, reverse primer and probe of each gene. The green letter indicates position of restriction enzyme sites.

2.2.2 ไพรเมอร์และโพรบ

ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้อ้างอิงตามวิธีทดสอบมาตรฐาน งานวิจัยที่มีการเผยแพร่ และรายงานจากวิธีการทดสอบ Kim et al., 2015, Pauli et al., 2001 และ JRC-EURL-GMFF- ENGL (2011, 2016 and 2018) โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์และโพรบของยีนเป้าหมาย *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* และ *ACC-1* ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence dry) ที่โพรบเป็น FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ตามลำดับ เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองและจำแนกข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม MON71800 และ ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์และโพรบของยีนเป้าหมาย *HMG*, *Lectin*, *MON71200* และ *CruA* ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ที่โพรบเป็น FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ตามลำดับเช่นกัน เพื่อใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์การบ่งชี้การปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่นและจำแนกข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม MON71200 ดังที่แสดงใน **Table 2.2-1**

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.2-1 The sequences of oligonucleotide of primers and probes for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* genes for first set and *HMG*, *Lectin*, *MON71200* event specific and *CruA* for second set

Target	Name	Sequence (5'-3')	Reference
CaMV35S promoter	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011 QT-ELE-00-004
	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	
	35S-P	FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1	
NOS terminator	NOS-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011 QL-ELE-00-011
	NOS-R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT	
	NOS-P	HEX-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1	
MON71800	MON71800-F	CTTCTCTCTCTTTGAATCTCAATAC	Kim et al., 2015
	MON71800-R	CCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	
	MON71800-P	TxRd-CCCTCTCTAATTCGGAAATC-BHQ2	
ACC-1	ACC1-F	GCTTCGCTGTCTAAGGTTGT	Kim et al., 2015
	ACC1-R	CTGCTGCCATTCCATTGTTC	
	ACC1-P	Cy5-CGGCAAAACACCAATTCACA-BHQ3	
HMG	HMG-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
	HMG-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
	HMG-P	FAM- CAATCCACACAAACGCACGCGTA -BHQ1	
Lectin	Lectin-F	TCCACCCCCATCCACATTT	Pauli et al., 2001
	Lectin-R	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA	
	Lectin-P	HEX- AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG -BHQ1	
MON71200	MON71200-F	CACGACGGTCATCGAGC	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2018)
	MON71200-R	CCGTTCGTCATTGACTGTT	
	MON71200-P	TxRd-CATACGGAAAAGATGCTGCAGGGAATATATTGAAC-BHQ2	
CruA	CruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2016)
	CruA-R	CCGTCGTTGTAGAACCATTGG	
	CruA-P	Cy5-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ3	

2.2.3 ออกแบบการตรวจคัดกรองและจำแนกข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

เนื่องจากข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการสืบค้นบนฐานข้อมูล GM approval database ของ ISAAA พบเพียง 1 event คือ MON71800 โดยมีองค์ประกอบยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และ event specific *MON71800* แต่จากการสืบค้นรายงานของ EU-JRC พบรายงานการตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีMON71200 อีกสายพันธุ์หนึ่ง นอกจากนั้นยังพบว่ามีการปะปนของพืชโภคภัณฑ์ชนิดอื่นระหว่างการขนส่ง ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง และคาโนลา ดังนั้นจึงมีการออกแบบการทดลองออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 เพื่อใช้ตรวจคัดกรองข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์MON71800 และชุดที่ 2 เพื่อใช้สำหรับบ่งชี้การปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่นและจำแนกสายพันธุ์MON71200 ดังที่แสดงใน **Table 2.2-2**

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.2-2 The structure of designed 2 sets of screening and detection of GM wheat and other GM contamination

GM-event	Genetic elements first set				Result	Process
	35S	*NOS*	*MON71800*	*ACC-1*		
MON71800	+	+	+	+	+,+,+,+	GM wheat
Other GM	+	+	-	+	+,+,-,+	Second set test
Other GM	+	-	-	+	+,-, -,+	Second set test
Other GM	-	+	-	+	-,+,-,+	Second set test
Negative	-	-	-	+	-,-,-,+	Non-GM wheat

GM-event	Genetic elements second set				Result	Process
	HMG	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*		
Contamination	+	-	-	-	+,-,-,-	GM corn
Contamination	-	+	-	-	-,+,-,-	GM soybean
Contamination	-	-	+	-	-,-, +,-	GM canola
MON71200	-	-	-	+	-,-,-,+	GM wheat
Negative	-	-	-	-	-,-,-,-	Other GM

+ means detected and – means not-detected

2.2.4 การสกัดดีเอ็นเอ และทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยา

ข้าวสาลีและผลิตภัณฑ์ข้าวสาลีที่ผ่านการบดอย่างละเอียดแล้วจะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Lysis buffer (Rogers and Bendich, 1985) ที่มีการประยุกต์ใช้ filter column เพื่อจับกับ resin ที่เกาะกับโมเลกุลดีเอ็นเอ นำตัวอย่างน้ำหนัก 0.2 กรัม เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงกลับหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนและแยกสารโมเลกุลใหญ่อื่นออกไป โดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 2 รอบ นำส่วนใสมาเติม resin (Promega) และ ผ่านฟิลเตอร์ Wizard™ minicolumn (Promega) และล้างฟิลเตอร์ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำฟิลเตอร์คอลัมน์ประกอบเข้ากับหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่ 12000 รอบต่อนาที เติมน้ำอุ่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำตัวอยางดีเอ็นเอที่สกัดได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำการเจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR เพื่อตรวจยีน *ACC-1* จำนวน 3 ซ้ำ นำค่า Cp (Crossing point) ที่ได้มาวิเคราะห์หาสมการเชิงเส้น บันทึกค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2) ค่า slope ของสมการ และค่า ΔCt (extrapolated) = Extrapol Ct - Mean Ct (Charles et al., 2008)

2.2.5 สภาวะของปฏิกิริยา

ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบในระดับต่างๆ ให้เหมาะสมในปฏิกิริยาแบบ Tetraplex Real-time PCR ทั้ง 2 ชุดของไพรเมอร์และโพรบ โดยทดสอบเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR

กรมวิชาการเกษตร

เพื่อให้ได้ค่า Cp ที่ไม่มีความแตกต่างกัน โดยปฏิกิริยารวมมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ เริ่มต้นด้วย อุณหภูมิ Initial Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และลดอุณหภูมิลงที่ 4 องศาเซลเซียส (Waiblinger et al., 2008)

Table 2.2-3 Reagents for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* for first set of primers and probes and *HMG*, *Lectin*, *MON71200* event specific and *CruA* for second set of primers and probes by Real-Time PCR (Simplex and Tetraplex)

Reagent	Final concentration/reaction (µM)				
	Simplex				Tetraplex
	CaMV35S	*NOS* terminator	*MON71800*	*ACC-1*	
2xLightCycer Probe master	1x	1x	1x	1x	1x
35S-F / HMG-F	0.5	-	-	-	0.1
35S-R / HMG-R	0.5	-	-	-	0.1
35S-P / HMG-P	0.5	-	-	-	0.1
NOS-F / Lectin-F	-	0.5	-	-	1.0
NOS-R / Lectin-R	-	0.5	-	-	1.0
NOS-P / Lectin-P	-	0.5	-	-	0.2
MON71800-F / MON71200-F	-	-	0.5	-	0.1
MON71800-R / MON71200-R	-	-	0.5	-	0.1
MON71800-P / MON71200-P	-	-	0.5	-	0.1
ACC1-F / CruA-F	-	-	-	0.5	0.05
ACC1-R / CruA-R	-	-	-	0.5	0.05
ACC1-P / CruA-P	-	-	-	0.5	0.025
DNA template (ng)	50-100	50-100	50-100	50-100	50-200
Total reaction volume	20	20	20	20	20

กรมวิชาการเกษตร

2.2.6 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

นำไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบทั้ง 2 ชุด มาทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างพืชไม่ดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด คาโนลา และพืชดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ข้าวโพด NK603 MON810 MIR604 ถั่วเหลือง GTS4032 A2704-12 คาโนลา Rf3 พลาสมิดข้าวสาลี pUC57-MON71800 และพลาสมิด MON71200 (Wako) ในปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบผลที่ได้กับโครงสร้างองค์ประกอบยีนของตัวอย่างพืชนั้นๆ เพื่อหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder et al. (2014) นอกจากนั้นยังเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า Cp ของการตรวจพบยีน ในชุดที่ 1 ได้แก่ *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1* และ *MON71800* ชุดที่ 2 ได้แก่ *Lectin*, *HMG*, *CruA* และ *MON71200* ในปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR และ Tetraplex Real-time PCR ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่า Cp ที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Pair Sample T-test

2.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Tetraplex real-time PCR

นำตัวอย่างพลาสมิด PUC57-MON71800 พืชไม้ดัดแปลงพันธุกรรมของ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และพลาสมิดMON71200 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วย Tetraplex Real-time PCR ของชุดยีนที่ 1 โดยใช้ตัวอย่างพลาสมิด pUC57-MON71800 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1* และ *MON71800* และใช้ตัวอย่างพืชไม้ดัดแปลงพันธุกรรมของ ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนลา และพลาสมิดMON71200 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *Lectin*, *HMG*, *CruA* และ *MON71200* นำผลของค่า Cp ที่ได้ในแต่ละยีนมาสร้างสมการเส้นตรงความเข้มข้นมาตรฐานและคำนวนหาค่า Linearity (R^2) และค่า Slope และคำไปใช้คำนวณหา ค่า PCR efficiency จากสูตร $e = 10^{-1/slope}$ ตามวิธีของ Broeder et al. (2014)

2.2.8 การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ปฏิกิริยา Tetraplex real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ พลาสมิด pUC57-MON71800 ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนลา และพลาสมิด MON71200 ด้วย 2 ชุดไพรเมอร์และโพรบ

ทำการทดสอบความเที่ยงและความแม่นของการตรวจวิเคราะห์ยีนชุดที่ 1 *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1* และ *MON71800* ด้วยตัวอย่าง พลาสมิด pUC57-MON71800 และชุดยีนที่ 2 *Lectin*, *HMG*, *CruA* และ *MON71200* ด้วยข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนลา และพลาสมิดMON71200 ในปฏิกิริยา Tetraplex real-time PCR ที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 รอบการทดสอบเพื่อหาความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำซ้ำแต่ละรอบ นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละยีน (%RSD) โดยคำนวนจากสูตร %RSD=(ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน/ค่าเฉลี่ย)x100 โดยค่าที่ยอมรับได้ควรมีค่า %RSD ที่น้อยกว่า 25% (Broeders et al. 2014)

2.2.9 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยนำตัวอย่าง พลาสมิด pUC57-MON71800 มาเจือจางในระดับต่างๆ 100, 10, 1 และ 0.1 pg ทำการตรวจวิเคราะห์ยีน ชุดที่ 1 *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1* และ *MON71800* และตัวอย่าง ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนลา และพลาสมิดMON71200 ที่ %ปะปน 1, 0.1, 0.05 และ 0.01% ทำการตรวจวิเคราะห์ยีน ชุดยีนที่ 2 *Lectin*, *HMG*, *CruA* และ *MON71200* ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ เปรียนอัตราส่วนระหว่าง Detect : Not-detect โดยค่าที่ยอมรับได้ต้องมากกว่า 90% ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีการตรวจสอบได้มากกว่า 90% ถือเป็นค่า LOD (Limit of detection) ของชุดยีนนั้นๆ (Broeders et al. 2014)

2.2.10 การขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

ขยายผลทดสอบชุดไพรเมอร์โพรบทั้ง 2 ชุดกับตัวอย่างข้าวสาลีที่มีการส่งตรวจกับห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งผ่านการรับรองจากมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 จำนวน 30 ตัวอย่าง นอกจากนั้นยังทดสอบ Blind test กับตัวอย่างข้าวสาลีที่มีการ spike พืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดต่างๆ ได้แก่ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK603 MON810 MIR604

กรมวิทยาศาสตร์

ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม GTS4032 A2704-12 และคาโนลาดัดแปลงพันธุกรรม Rf3 เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความถูกต้องของผลการทดสอบ

2.2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบความจำเพาะเปรียบเทียบระหว่าง Simplex และ Tetraplex Real-time PCR ใช้ Pair Sample T-test ($P < 0.05$)

2.2.12 เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ตุลาคม 2563 – 31 ธันวาคม 2564 ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม events A2704-12 Mon87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2

2.3.1 วัสดุอ้างอิงรับรอง

วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material) ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ ประกอบด้วย วัสดุอ้างอิงรับรองของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมชนิดผงสายพันธุ์ Mon87769, Mon87705, Mon89788 และ Mon87701 ที่ระดับการปะปน 100% และสายพันธุ์ GTS 40-3-2 ที่ระดับการปะปน 10, 1, 0.1 และ < 0.009% (blank) วัสดุอ้างอิงรับรองของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอที่สกัดสายพันธุ์ A2704-12 ที่ระดับการปะปน 100% และวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมชนิดผงสายพันธุ์ NK-603 ที่ระดับการปะปน 5%

2.3.2 ไพรเมอร์และโพรบ

ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้อ้างอิงตามวิธีทดสอบมาตรฐานของ JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis และ EU database of reference methods ดังแสดงใน **Table 2.3-1** โดยเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อการตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 7 ยีน คือ ยีนคัดกรอง (Element-specific gene) *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac*, *rbcS E9* terminator และ *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง และยีนจำเพาะ (Event-specific gene) event Mon87705 และ event Mon89788 ทั้งนี้ได้มีการปรับปรุงฉลากสี (Fluorescence dry) ที่ติดโพรบให้มีความจำเพาะที่แตกต่างกันจำนวน 4 สี (FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3.3 ออกแบบการตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

พัฒนาวิธีการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR จำนวน 2 ชุดการทดลอง และการออกแบบผลวิเคราะห์ของถั่วเหลืองพันธุกรรมดังแสดงใน **Table 2.3-2** โดยชุดการทดลอง A เป็นการตรวจยีนคัดกรองเพื่อจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87701, A2704-12 และ GTS 40-3-2 หากผลการทดสอบไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมพบเพียงยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง ให้ทำการทดสอบชุด B ต่อ ซึ่งเป็นการตรวจยีนคัดกรองร่วมกับยีนจำเพาะเพื่อจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87769, Mon87705 และ Mon89788 หากผลการทดสอบไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรม พบเพียงยีน *Lectin* ทั้งชุดการทดสอบ A และ B แสดงว่าตัวอย่างที่ทดสอบเป็นถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (Non-GM)

Table 2.3-1 Oligonucleotide sequences of primer and probe for detection 7 genes of genetically modified soybean

Target gene	Primer/ Probe	Sequences (5'-3')	Reference
CaMV35S	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	Waiblinger et
promoter	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	al., 2008

กรมวิชาการเกษตร

	35S-P	FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1	
Nos terminator	Nos -F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	Waiblinger et al., 2008
	Nos -R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT	
	Nos -P	HEX- ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA -BHQ1	
Cy1Ac	Cy1Ac-F	GAGGAAATGCGTATTCAATTCAAC	Grohmann et al., 2015
	Cy1Ac-R	TTCTGGACTGCGAACAATGG	
	Cy1Ac-P	TxRd-ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC-BHQ2	
rbcS E9 terminator	T E9-F	TTTTTATTCGGTTTTCGCTATCG	Debode et al., 2016
	T E9-R	TGAGAATGAACAAAAGGACCATATCA	
	T E9-P	HEX-TCATTAACTCTTCTCCATCCATTTCCATTTCACAGT-BHQ1	
Specific event Mon87705	87705-F	TTCCCGGACATGAAGCCATTTAC	Savini et al., 2012
	87705-R	ACAACGGTGCCTTGGCCCAAAG	
	87705-P	TxRd-AAGAGACTCAGGGTGTTGTTATCACTGCGG-BHQ2	
Specific event Mon89788	89788-F	TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT	Charles Delobel et al., 2013
	89788-R	TCGAGCAGGACCTGCAGAA	
	89788-P	FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA	
Lectin	Le1-F	TCCACCCCCATCCACATTT	Pauli et al., 2001
	Le1-R	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA	
	Le1-P	Cy5- AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-BHQ3	

2.3.4 การสกัดดีเอ็นเอ และสภาวะปฏิกิริยา

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม วัสดุอ้างอิงถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม วัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม และตัวอย่างทดสอบต่าง ๆ โดยวิธี Lysis buffer (Modified from Rogers and Bendich, 1985) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 µl จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260/280 nm

ทำปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LC480 cycler (Roche Diagnostics, Germany) โดยต่อหนึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl เริ่มจากขั้นตอน Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วยขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นไปที่ขั้นตอน Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 45 รอบ และสุดท้าย คือ ขั้นตอนทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 1 รอบ (Waiblinger et al., 2008) โดยสารปฏิกิริยา ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ความเข้มข้น 1 เท่า (1X) ของปฏิกิริยา Simplex และ tetraplex Real-time PCR ดังแสดงใน **Table 2.3-3** และ **Table 2.3-4**

Table 2.3-2 The detection of soybean gene structure by Tetraplex Real-time for experiment A and experiment B

GM Event	Condition of experiment A				Condition of experiment B			
	Element-specific gene				Element-specific and Event-specific gene			
	CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*

Mon87701	-	-	+	+	-	-	-	+
A2704-12	+	-	-	+	-	-	-	+
GTS 40-3-2	+	+	-	+	-	-	-	+
Mon87769	-	-	-	+	+	-	-	+
Mon87705	-	-	-	+	+	+	-	+
Mon89788	-	-	-	+	+	-	+	+
Non-GM	-	-	-	+	-	-	-	+

Remark: + = detected target gene, - = not detected non-target gene

2.3.5 การทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา

ทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาโดยเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรอง GTS 40-3-2 ที่ระดับการปนเปื้อน 10% ให้มีความเข้มข้น 20 ng/µl เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:0, 1:4, 1:16, 1:64, และ 1:256 และทดสอบการตรวจยีน *Lectin* ด้วยปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR บันทึกค่าสัญญาณเรืองแสงเริ่มต้น (threshold cycle: C_t) วิเคราะห์ผลค่าความต่างของค่า C_t (ΔC_t extrapolated) ค่าความชันของกราฟ ค่า PCR efficiency และค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (coefficient; R^2) โดยร้อยละของค่า PCR efficiency สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1 (Hougs et al., 2017)

$$\text{PCR efficiency (\%)} = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100 \qquad \text{(สมการที่ 1)}$$

Where: Slope = the slope of the standard curve, plotted with the y axis as C_t and the x axis as log (quantity)

2.3.6 การทดสอบความจำเพาะด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบจำนวน 7 ชุดยีน ด้วยวัสดุอ้างอิงรับรองของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ระดับการปะปน 10% และวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ NK-603 ที่ระดับการปะปน 5% ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ซึ่งทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาด้วยวิธี Simplex Real-time PCR โดยทดสอบทีละชุดยีน เปรียบเทียบผลกับวิธี Tetraplex Real-time PCR ที่ทำการทดสอบครั้งละ 4 ชุดยีน โดยใช้สภาวะทดสอบเดียวกันที่ระดับ 1X **(Table 2.3-3 และ 2.3-4)** ตัวอย่างดีเอ็นเอมีความเข้มข้น 20 ng/µl ปริมาตร 5 µl (100 ng/reaction) ซึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้าย 20 µl/reaction ทำการทดสอบจำนวน 12 ซ้ำ บันทึกค่า C_t วิเคราะห์ผลการตรวจยีนคัดกรอง และยีนจำเพาะเปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบกับโครงสร้างของพืชดัดแปลงพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์

Table 2.3-3 Reagents used for detection of soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time for experiment A

Reagent	Stock (µM)	Simplex Real-time PCR for each target gene (µl)				Tetraplex Real-time PCR (µl)
		CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	

กรมวิชาการเกษตร

2XProbe master mix	2x	1x	1x	1x	1x	1x
35S-F	10	0.080	-	-	-	0.080
35S-R	10	0.080	-	-	-	0.080
35S-P	10	0.080	-	-	-	0.080
Nos-F	100	-	0.800	-	-	0.800
Nos-R	100	-	0.800	-	-	0.800
Nos -P	10	-	0.800	-	-	0.800
Cy1Ac-F	100	-	-	0.320	-	0.320
Cy1Ac-R	100	-	-	0.320	-	0.320
Cy1Ac-P	10	-	-	0.080	-	0.080
Lectin-F	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-R	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-P	10	-	-	-	0.025	0.025
Template DNA (ng)	20	100	100	100	100	100
Total reaction (µl)	-	20	20	20	20	20

Table 2.3-4 Reagents used for detection of soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time for experiment B

Reagent	**Stock (µM)**	**Simplex Real-time PCR for each target gene (µl)**				**Tetraplex Real-time PCR (µl)**
		rbcS E9	**Mon87705**	**Mon89788**	***Lectin***	
2XProbe master mix	2x	1x	1x	1x	1x	1x
T E9-F	10	0.272	-	-	-	0.272
T E9-R	10	0.272	-	-	-	0.272
T E9-P	10	0.240	-	-	-	0.240
87705-F	10	-	0.180	-	-	0.180
87705-R	10	-	0.180	-	-	0.180
87705-P	10	-	0.100	-	-	0.100
89788-F	10	-	-	0.060	-	0.060
89788-R	10	-	-	0.060	-	0.060
89788-P	10	-	-	0.020	-	0.020
Lectin-F	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-R	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-P	10	-	-	-	0.025	0.025
Template DNA (ng)	20	100	100	100	100	100
Total reaction (µl)	-	20	20	20	20	20

กรมวิชาการเกษตร

2.3.7 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบของปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR โดยแปรผันความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบออกเป็น 3 ระดับ คือ 1) ความเข้มข้นอ้างอิงที่ระดับ 1X ดังแสดงใน **Table 2.3-3** และ **Table 2.3-4** 2) ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่ลดลง -30% (0.7X) และ 3) ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่เพิ่มขึ้น +30% (1.3X) ทดสอบด้วยวัสดุอ้างอิงรับรองของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ ที่ระดับการปะปน 10% ทำการทดสอบจำนวน 12 ซ้ำ ทำการบันทึกค่า C_t เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR

2.3.8 การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรองที่ระดับการปะปน 100% ไปเจือจางแบบลำดับขั้นออกเป็น 4 ระดับของการปะปน คือ 10, 1, 0.1, และ 0.01% ซึ่งจีโนมของถั่วเหลือง (Haploid soybean genomic DNA) มีน้ำหนัก 1.13 พิโคกรัมต่อสำเนายีน (pg/copy) (Royal Botanic Garden, 2012; Savini et al., 2012) และมีการใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นต้นแบบเท่ากับ 100 ng/reaction ดังนั้น ที่ร้อยละการปนเปื้อนข้างต้นจะสามารถคำนวณค่าจีโนมดัดแปลงพันธุกรรมของถั่วเหลืองได้เป็น 8,849.5, 885, 88.5 และ 8.85 copies/5 µl ตามลำดับ โดยสำหรับการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac, rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 ทำการเจือจางด้วยดีเอ็นเอของถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และสำหรับยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลืองทำการเจือจางด้วยดีเอ็นเอของข้าวโพดไม่ดัดแปลงพันธุกรรม ทำการทดสอบในแต่ระดับการปะปน จำนวน 12 ซ้ำ บันทึกค่า C_t เพื่อหาปริมาณปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดซึ่งสามารถตรวจพบได้ในแต่ละยีนเป้าหมาย วิเคราะห์ค่า PCR efficiency ค่าความชันกราฟ และร้อยละความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อหาความไวของปฏิกิริยาในการตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

2.3.9 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ

ทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นต้นแบบ (DNA template) ที่เหมาะสม ทดสอบโดยนำตัวอย่างที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรองที่ระดับการปะปน 0.1% โดยเจือจางด้วยดีเอ็นเอของถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 100 และ 150 ng/reaction ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบในแต่ละปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็น จำนวน 12 ซ้ำ ทำการบันทึกค่า C_t เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในการหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นต้นแบบที่มีความเหมาะสม

2.3.10 การขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

ขยายผลการตรวจคัดแยกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งผ่านการรับรองจากมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ในการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการบริโภคจำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างถั่วเหลืองสำหรับทดสอบความชำนาญ (Proficiency test) จำนวน 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ได้แก่ ซอสถั่วเหลือง เมล่อน เมล็ดมะละกอ ข้าวโพดฝักอ่อน แป้งมันสำปะหลัง และข้าวโพดกระป๋อง จำนวนอย่างละ 1 ตัวอย่าง

2.3.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

ศูนย์วิชาการเกษตร

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของกลุ่มตัวอย่างทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 23.0

2.3.12 เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ตุลาคม 2563 – 31 ธันวาคม 2564 ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 events (Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9)

2.4.1 วัสดุอ้างอิง

สำหรับการศึกษานี้ใช้วัสดุอ้างอิง (certificate reference material) ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ เช่น Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับที่แตกต่างกันดัง **Table 2.4-1** ซึ่งได้รับมาตรฐานจาก Institute for Reference Materials and Measurements และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ครีมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกร็ดข้าวโพด ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (Table1) และตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985) โดยชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติม Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่อจนครบ 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :Isoamyl alcohol (24:1) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น และนำมาทำให้บริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard™ minicolumn (Promega) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทดสอบการมีอยู่ของสารยับยั้งปฏิกิริยาในดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอมาเป็นต้นแบบปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการตรวจสอบยีนอ้างอิงพืชของข้าวโพด ทำการบันทึกข้อมูลผลของปฏิกิริยาโดยนำค่า CP (Crossing point) ที่วิเคราะห์ได้ไปหาสมการเชิงเส้น บันทึกค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (R2) ค่า slope ของสมการ และค่า ΔCt (extrapolated) = Extrapol Ct - Mean Ct (Charles *et al*., 2008)

Table 2.4-1 The GM certified reference materials information in this study

No.	GM (Events)	%GMO Value	No.	GM (Events)	%GMO Value
1	Mon810	blank <0.04	10	DAS40278-9	blank <0.03
		0.5%			0.5

กรมวิชาการเกษตร

No.	GM (Events)	%GMO Value	No.	GM (Events)	%GMO Value
		2			1
		9.9%			10
2	Mon87427	100	11	TC1507	blank <0.05
3	T25	100			0.1
4	GA21	blank <0.08			1
		0.1			10
		0.5	12	DAS59122-7	blank<0.1
		1			0.1
		2			1
		5			10
5	NK603	blank <0.04	13	Bt11	blank <0.01
		0.1			0.1
		0.5			1
		1			10
		2			100
		10	14	MIR604	Blank <0.09
6	MIR162	100			0.1
7	MON89034	100			1
8	Mon87460	100			10
9	Mon88017	100	15	Non GM	0

กรมวิชาการเกษตร

2.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลองค์ประกอบของยีนที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการจำแนกยีนในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์

ตรวจสอบข้อมูลของมียีนคัดเลือก ยีนรายงานผล โปรโมเตอร์ เทอร์มิเนเตอร์ และยีนเป้าหมาย ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ได้แก่ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 จากแหล่งข้อมูล 2 แห่ง ได้แก่ International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) และ Joint Research Center European Commission แล้วจัดกลุ่มยีนออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. ยีนคัดเลือกหรือยีนรายงานผล 2.โปรโมเตอร์หรือเทอร์มิเนเตอร์ และ 3. ยีนเป้าหมาย (Waiblinger *et al*., 2008; Cottent *et al*., 2013; Huber *et al*., 2013; Broeders *et al*., 2014; Fraiture *et al*., 2015 and Peng *et al*., 2016) ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อมาทำตารางความสัมพันธุ์ของการจำแนกสายพันธุ์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (Matrix)

2.4.4 ศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex และ Multiplex

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ได้แก่ ได้แก่ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ที่มีโครงสร้างของยีน และเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ มาทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบต่อปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ตรวจสอบยีนในข้อที่ 3 (35SCaMV promoter, Nos terminator, Pat, FMV และ Ubiquitin) นำมาตรวจวิเคราะห์จำแนกยีน ด้วยเทคนิค real-time PCR แบบตรวจตัวอย่างทีละยีน (Simplex) เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์แบบ Multiplex ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (Johansson *et al*., 2006) บันทึก ค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากปฏิกิริยาของแต่ละวิธี นำค่า Ct ที่ได้มาตรวจสอบผลความเหมาะสมของไพรเมอร์โพรบจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Ct ที่ได้จากวิธี Multiplex กับ วิธี Simplex ของแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธี Pair Sample T-test และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์โพรบจากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนตามตารางที่ 2 (Table 2) แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder *et al*. (2014)

2.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ผสมกันระหว่างสายพันธุ์ Bt11 GA21 และ DAS559122-7 (เนื่องจากทั้งสามสายพันธุ์เป็นตัวแทนในการตรวจจำแนกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด) ที่ระดับการปะปน 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เจือจางดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยน้ำบริสุทธิ์ (deionized water) ที่สัดส่วน 1:2, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดยแต่ละลำดับทำ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 4 รอบ นำมาทดสอบปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR หลังจากนั้นนำผลของค่า Ct ของแต่ละยีนที่ทำการตรวจสอบมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Broeder *et al*. (2014) และจากสมการของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานนำมาคำนวณหา ค่า PCR efficiency, ค่า Linearity (R2) และค่า Slope และนำค่าดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์มาตรฐานของ JRC-EURL

2.4.6 การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ผสมกันระหว่างสายพันธุ์ Bt11 GA21 และ DAS559122-7 ที่ระดับการปะปน 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบยีน Event Specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน HMG ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR 4 ครั้ง ครั้งละ 12 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct โดยคำนวณหาค่าความเที่ยงของวิธีการตรวจสอบด้วยการคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของค่า Ct ของแต่ละยีน สำหรับค่าความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบคำนวณโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธ์ความแปรผัน (Coefficient of variation: CV) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ของการตรวจสอบแต่ละครั้งและรวมทั้ง 4 ครั้ง ดัดแปลงจากวิธีของ Broeders *et al*. (2014)

7.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของกลุ่มตัวอย่างทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 23.0

2.4.8 เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ตุลาคม 2562 – 31 ธันวาคม 2564 ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอและทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยา

ผลการสกัดดีเอ็นเอของข้าว แป้งข้าว เส้นก๋วยเตี๋ยว และขนมข้าวอบกรอบ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เมื่อทำการวัดค่าความเข้มข้นและค่าความบริสุทธิ์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (ThermoFisher Scientific, Finland) พบค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอทุกตัวอย่างมีค่าสูง 5227 ถึง 568 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการขั้นต่ำ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ A260/A280 พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1.97 ถึง 2.10 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์จากเกณฑ์ที่ยอมรับ 1.8 ถึง 2.0 เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยาโดยการตรวจยีน *PLD* ด้วย Simplex Real-time PCR พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอมีค่า R^2 ระหว่าง 0.98-0.99 ค่า ΔCt (extrapolated) ระหว่าง 0.17 ถึง 0.52 (ค่ามาตรฐาน ΔCt ≤ 2) ค่า Slope ระหว่าง -3.18 ถึง -3.97 (ค่ามาตรฐาน -3.1 ≥ Slope ≥ -3.6) ค่า efficiency ระหว่าง 106.21 ถึง 78.59 (ค่ามาตรฐาน Simplex Real-time PCR ที่ 90 – 110%) (Wu et al., 2014) แสดงถึงวิธีการสกัดดีเอ็นเอของข้าวที่อาจจะมีโมเลกุลอื่นปะปนในตัวอย่างดีเอ็นเอข้าว แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์แล้วพบว่าเหมาะสม จึงต้องนำดีเอ็นเอข้าวไปทดสอบในปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR ต่อไป เพื่อประเมินถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยา ทั้งนี้การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดพืชต่างๆนั้น นิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดในการสกัดเนื่องจากมีเนื้อเยื่อและเปลือกหลายชั้น เช่น การใช้วิธี Guanidinium-HCL นอกจากนั้นยังมีการเติม Amylase เพื่อย่อยโมเลกุลน้ำตาลก่อนทำการทำให้บริสุทธิ์ (Sajib et al., 2017)

Table 3.1-1 Rice and its product DNA extraction and inhibition test

Sample	DNA concentration (ng/ul)	A260/A280	ΔC extrapolated	Intercept	Slope	Efficiency (%)	R^2
Rice	5227.815 ± 162.40	2.08 ± 0.01	0.52	23.76	-3.97	78.59	0.98
Rice flour	4529.72 ± 190.60	2.10 ± 0.01	0.17	24.99	-3.18	106.21	0.99
Rice noodle	4905.39 ± 344.01	2.10 ± 0.00	0.03	25.03	-3.54	91.51	0.99
Rice cracker	568.06 ± 100.04	1.97 ± 0.00	0.17	27.36	-3.22	104	0.99

3.1.2 ความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวดัดแปลงพันธุกรรม pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) และ ข้าวไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติม (spike) pGSE28 (Bt63 Rice) และ pGSE220 (LL601) และจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม LL62 ในปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละยีนเป้าหมาย พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้กับ True positive/negative ไม่พบ False negative และ False positive แสดงถึงความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบมีความจำเพาะร้อยละ 100 ต่อชุดยีนเป้าหมายทั้ง 2 ชุด ดังแสดงใน **Table 3.1-2** ในส่วนของ plasmid DNA pGSE220 (LL601) ไม่พบยีน CaMV35S Promoter และ NOS terminator และ *Bar* และ plasmid DNA pGSE28 (Bt63 Rice) ไม่พบยีน

Bar เนื่องจากเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีการใส่เฉพาะบางยีนทำให้ตรวจไม่พบครบตามองค์ประกอบของสายพันธุ์ตามฐายข้อมูลของ ISAAA (ISAAA, 2564)

Table 3.1-2 Specific test of primers and probes of *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *PLD*, *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* and *Bar*

Samples	Target genes (real-time PCR) (n=3)						
	35S	*NOS*	*PLD*	*Bar*	*LL601*	*LL62*	*Cry1Ab/Ac*
plasmid DNA pGSE220 (LL601)	-	-	-	-	+	-	-
Genomic DNA LL62	+	-	+	+	-	-	-
plasmid DNA pGSE28 (Bt63 Rice)	-	+	-	-	-	-	+
Non-GM rice+ pGSE220 (LL601)	-	-	+	-	+	-	-
Non-GM rice+ pGSE28 (Bt63 Rice)	-	+	+	-	-	-	+
10% RR	+	+	-	-	-	-	-
0.1%RR	+	+	-	-	-	-	-
Non-GM rice	-	-	+	-	-	-	-
Water	-	-	-	-	-	-	-
Specificity	100%						

+ means detected and - means not detected

3.1.3 ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายในปฏิริยา Triplex Real-time PCR ของชุดยีนที่ 1 ของยีน *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* และประสิทธิภาพของ Tetraplex Real-time PCR ของยีน *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ทำการทดสอบที่ DNA template ใช้ plasmid DNA pGSE220 (LL601), plasmid DNA pGSE28 (Bt63 Rice) และจีโนมิกส์ LL62 เริ่มต้น 100 copies เจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Triplex Real-time PCR ของยีนชุดที่ 1 และ Tetraplex Real-time PCR ของยีนชุดที่ 2 โดยประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย สามารถคำนวณได้จากสูตรคำนวณ PCR efficiency = $[10^{(-1/slope)}-1]$ ซึ่งค่า Ideal slope ที่ -3.322 ซึ่งคิดเป็น 100% efficiency โดยค่า Amplification factor ที่คำนวณได้ที่ 2 หมายถึงการเพิ่มจำนวนเป็น 2 copy ในทุกรอบของปฏิกิริยาจากค่าที่แสดงใน **Table 3.1-3** พบว่าได้ค่า Amplification factor ในทุกยีนเป้าหมายมีค่าอยู่ระหว่าง 1.84 ถึง 2.09 คิดเป็น efficiency อยู่ระหว่าง 84.07 ถึง 109.04% อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ที่ 80 ถึง 120% สำหรับ Multiplex Real-time PCR (Broeders et al. 2014) ทั้งนี้ที่ระดับความเจือจางที่ 1:256 ไม่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายส่วนใหญ่ได้เนื่องจากมี DNA template จำนวนน้อยเกินไปทำให้สัญญาณเกิดช้ากว่า 40 cycles ตามการตั้งค่าปฏิกิริยาเริ่มต้น

Table 3.1-3 Amplification factor, PCR efficiency, slope, linearity and intercept of CaMV35S promoter, NOS terminator, PLD CryIAb/Ac, event specific LL62, event specific LL601 and Bar genes detection using Triplex and Tetraplex Real-time PCR

	Ct of target gene detection

กรมวิชาการเกษตร

Dilutio	Start	*35S*	*NOS*	*PLD*	*Cry1Ab/Ac*	*Bar*	*LL601*	*LL62*
1:0	100	32.02±0.8	28.22±0.4	21.67±0.4	28.74±0.3	31.33±0.2	28.17±0.5	31.30±0.4
1:4	25	34.07±0.5	30.48±0.3	24.65±0.7	30.56±0.7	33.54±0.3	30.23±0.2	33.57±0.1
1:16	6.25	36.02±0.1	32.32±0.6	26.62±0.3	33.03±0.4	35.76±0.6	32.03±0.7	36.16±0.5
1:64	1.56	37.83±0.3	34.35±0.1	28.59±0.1	35.10±0.1	37.76±0.2	34.01±0.3	37.82±0.2
1:256	0.39	-	-	30.68±0.9	-	-	-	-
Amplification		2.09	2.04	1.99	1.84	1.92	2.08	1.92
PCR efficiency		109.04	104.70	99.58	84.17	92.89	108.22	92.00
Slope		-3.12	-3.21	-3.33	-3.77	-3.50	-3.13	-3.52
R^2		0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98
Intercept		32.21	28.51	22.62	28.35	31.46	28.31	31.60

3.1.4 ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของปฏิกิริยา Tetraplex real-time PCR

ทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของปฏิกิริยาโดยในแต่ละรอบของการทดสอบมีจำนวนซ้ำ 10 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 รอบการทดสอบ เพื่อทดสอบหาความสามารถในการทวนซ้ำของยีนเป้าหมายในปฏิริยา Triplex Real-time PCR ของชุดยีนที่ 1 ของยีน *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* โดยใช้จีโนมิกส์ LL62 เป็นDNA template และประสิทธิภาพของ Tetraplex Real-time PCR ของยีน *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ใช้ plasmid DNA pGSE220 (LL601), plasmid DNA pGSE28 (Bt63 Rice) และจีโนมิกส์ LL62 เป็นDNA template เมื่อเปรียบเทียบค่า Cp ที่ได้จากการทำในแต่ละรอบพบว่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 1.19 ซึ่งถือว่าผลการทดสอบมีความเที่ยงและความแม่นยำสูง ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการมดสอบ 3 รอบนำค่าเฉลี่ย Cp ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยระหว่างรอบ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละยีนพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16 ถึง 0.4 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ที่ค่า %RSD ต้องน้อยกว่าร้อยละ 25 (Broeders et al., 2014 และ Del Gaudio et al., 2012) แสดงถึงวิธีการทดสอบ สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ ไพรเมอร์โพรบที่ใช้ในการทดสอบ มีความเที่ยง ความแม่นยำ และสามารถทวนซ้ำได้ของการตรวจคัดกรองและจำแนกข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ LL601 LL62 และ Bt63

Table 3.1-4 Precision accuracy and repeatability of Multiplex real-time PCR

Replication	Average Cp						
	35S	*NOS*	*PLD*	*Cry1Ab/Ac*	*LL601*	*LL62*	*Bar*
1	33.97	34.74	33.71	35.23	34.88	35.21	35.25
2	34.19	34.66	33.72	35.04	34.44	35.08	34.65
3	34.29	35.14	34.42	34.72	34.93	34.84	35.08
Average	34.15	34.85	33.95	35.00	34.75	35.04	34.99
SD	0.16	0.25	0.40	0.25	0.26	0.18	0.31
RSD (%)	0.47	0.73	1.19	0.73	0.77	0.52	0.88

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.1.5 ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบเพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ของชุดยีนที่ 1 ได้แก่ *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* โดยใช้วัสดุทดสอบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ LL62 ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 1 copies ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยที่ 5 copies ค่าการทดสอบที่สามารถตรวจพบยีนมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 90 หรือน้อยกว่า 9 ตัวอย่างใน 10 ตัวอย่าง ซึ่งค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์จะต้องมีค่ามากกว่าร้อยละ 90 จึงสามารถยอมรับได้ (Anonymous, 2011 และ Broeders et al., 2014) ในขณะที่ 10 copies พบว่าทั้ง 3 ยีนเป้าหมายมีค่าการตรวจพบร้อยละ 100 จึงทำให้ทราบว่า ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ของยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminatorและ *PLD* โดยจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ LL62 เป็นวัสดุในการทดสอบอยู่ที่ 10 copies ดังที่แสดงใน Table 8 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ของชุดยีนที่ 2 ได้แก่ *CrylAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* ใช้วัสดุทดสอบเป็นข้าวไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติม plasmid DNA pGSE220 (LL601) และ plasmid DNA pGSE28 (Bt63 Rice) ที่ 10, 5 และ 1 copies พบว่า ยีนเป้ามหมาย *CrylAb/Ac* และ event specific *LL601* ระดับการปะปนต่ำสุดที่ตรวจพบอยู่ที่ 5 copies ในขณะที่ ยีน event specific *LL62* และ *Bar* มีระดับการปะปนต่ำสุดที่ตรวจพบอยู่ที่ 10 copies จึงทำการสรุปได้ว่า ชุดยีนทั้ง 2 ชุด มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ที่ 10 copies ดังที่แสดงใน **Table 3.1-5**

Table 3.1-5 Limit of detection of CaMV35S Promoter, NOS terminator, PLD, CrylAb/Ac, event specifc LL62, event specific LL601 and Bar in Multiplex Real-time PCR reaction

Sample + spike plasmid	Target gene	Replication	Ratio (Detection: Not-detection)			Limit of detection
			10 cp	5 cp	1 cp	
Rice + plasmid DNA pGSE28	*NOS*	10	10:0	10:0	0:10	5 cp
	Cry1Ab/Ac		10:0	10:0	0:10	
	PLD		10:0	10:0	0:10	
Rice + plasmid DNA pGSE220	*LL601*	10	10:0	10:0	0:10	5 cp
	PLD		10:0	10:0	0:10	
Genomic DNA LL62	*CaMV 35S*	10	10:0	0:10	0:10	10 cp
	Bar		10:0	0:10	0:10	
	LL62		10:0	0:10	0:10	
	PLD		10:0	0:10	0:10	

3.1.6 ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

ขยายผลการทดสอบ ชุดไพรเมอร์โพรบด้วยวิธีการ Multiplex Real-time PCR ของชุดที่ 1 และ 2 เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของนำมาใช้ทดสอบจริง โดยทดสอบกับตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าวที่มีการนำมาส่งตรวจจริงที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ภายใต้มาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

ISO/IEC17025:2017 จำนวน 50 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างข้าว 27 ตัวอย่าง เส้นก๋วยเตี๋ยว 20 ตัวอย่าง แล้วแป้งข้าว 3 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างมีการตรวจพบยีน *PLD* แต่สำหรับยีนเป้าหมายอื่นตรวจไม่พบ แสดงถึงการไม่มี

Sample	Number	First set of primers and probe			Second set of primers and probe			
		35S	*NOS*	*PLD*	*Cry1Ab/Ac*	*Bar*	*LL601*	*LL62*
Rice	27	Not detected	Not detected	Detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Noodle	20	Not detected	Not detected	Detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Flour	3	Not detected	Not detected	Detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected

การปะปนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมในตัวอย่างที่ของห้องปฏิบัติการที่ตรวจ ดังแสดงผลการทดสอบใน **Table 3.1-6** นอกจากนั้นมีการทดสอบตัวอย่างข้าวที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติมวัสดุอ้างอิงทดสอบ (spike) แบบเดี่ยวและแบบรวม 2 ชนิด และ 3 ชนิดเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้ชุดไพรเมอร์โพรบทั้ง 2 ชุดในการปฏิบัติงานจริง โดยพบว่าชุดทดสอบมีประสิทธิภาพในการตรวจพบยีนเป้าหมายตามตัวอย่างทดสอบชนิดต่างๆ อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงใน **Table 3.1-7** ทั้งนี้ค่า Cp ของยีนเป้าหมายเดียวกันอาจให้ค่าต่างกันได้ เนื่องจาก DNA template ต่างกันทำให้สัญญาณการตรวจพบขึ้นได้ไม่พร้อมกันจึงส่งผลให้ได้ค่า Cp ที่แตกต่างกันเนื่องจากการตรวจวิเคราะห์เป็นเชิงคุณภาพจึงถือว่ายอมรับได้ในการอ่านผลการทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.1-6 Testing of 50 rice and its product samples from ISO/IEC17025 laboratory in 2 sets of primers and probe

Table 3.1-7 Testing of spike samples into non-GM rice in 2 sets of primers and probes

Matrix		Cp ± SD (n=3)						
		First set of primers and probe			Second set of primers and probe			
DNA	Spike	35S	NOS	PLD	Cry1Ab/Ac	Bar	LL601	LL62
Rice	-	-	-	22.20 ± 0.02a	-	-	-	-
	LL601	-	-	29.88 ± 0.16c	-	-	34.12 ± 1.01c	-
	LL62	36.24 ± 0.64b	-	29.64 ± 0.24c	-	35.41 ± 0.64b	-	36.15 ± 0.35b
	Bt63	-	34.82 ± 1.11b	29.69 ± 0.09c	36.11 ± 0.25c	-	-	-
	LL601 + LL62	35.83 ± 1.30a	-	23.35 ± 0.08b	-	34.59 ± 0.29a	31.62 ± 0.90a	34.91 ± 0.43a
	LL601 + Bt63	-	33.45 ± 0.53a	23.29 ± 0.22b	33.41 ± 0.39a	-	31.78 ± 0.19a	-
	LL62+ Bt63	35.82 ± 0.21a	33.20 ± 0.49a	23.21 ± 0.09b	33.56 ± 0.24a	34.35 ± 0.04a	-	34.52 ± 0.07a
	LL601+LL62+Bt63	36.79 ± 0.22b	36.79 ± 0.22c	23.43 ± 0.06b	34.25 ± 0.27b	35.58 ± 0.06b	32.38 ±	35.31 ±
Noodle	-	-	-	25.75 ± 1.77a	-	-	-	-
	LL601	-	-	33.63 ± 0.14b	-	-	33.93 ± 0.39b	-
	LL62	36.7 ± 0.29b	-	33.36 ± 1.03b	-	36.63 ± 0.54c	-	37.40 ± 0.35c
	Bt63	-	35.06 ± 0.62b	34.22 ± 0.63c	35.48 ± 1.06c	-	-	-
	LL601 + LL62	35.61 ± 1.68a	-	25.98 ± 0.27a	-	35.26 ± 0.32b	31.69 ± 0.30a	35.63 ± 0.42b

	LL601 + Bt63	-	33.89 ± 0.66a	25.75 ± 0.17a	32.65 ± 0.39a	-	31.15 ± 1.12a	-
	LL62+ Bt63	35.97 ± 0.42a	33.23 ± 0.16a	25.59 ± 0.08a	33.32 ± 0.78a	34.45 ± 0.41a	-	34.63 ± 0.32a
	LL601+LL62+Bt63	37.02 ± 1.28b	33.38 ± 0.20a	25.67 ± 0.18a	34.31 ± 0.64b	36.03 ± 0.63c	31.41 ± 0.85a	35.96 ± 0.42b
Rice flour	-	-	-	25.10 ± 0.11a	-	-	-	-
	LL601	-	-	30.61 ± 0.24b	-	-	34.07 ± 0.59b	-
	LL62	37.79 ± 0.23c	-	31.31 ± 0.41b	-	35.75 ± 0.95b	-	36.12 ± 0.95b
	Bt63	-	34.35 ± 0.97b	31.02 ± 0.44b	34.72 ± 0.13b	-	-	-
	LL601 + LL62	35.58 ± 0.37a	-	26.35 ± 0.15a	-	34.89 ± 0.80a	31.76 ± 0.14a	35.06 ± 0.61ab
	LL601 + Bt63	-	32.93 ± 0.70a	26.38 ± 0.19a	33.40 ± 0.21a	-	31.47 ± 0.13a	-
	LL62+ Bt63	36.58 ± 0.31b	33.19 ± 0.21a	25.87 ± 0.66a	33.21 ± 0.42a	34.20 ± 0.37a	-	34.27 ± 0.32a
	LL601+LL62+Bt63	36.29 ± 0.68b	33.71 ± 0.89ab	26.34 ± 0.05a	34.03 ± 0.32b	35.12 ± 0.32b	31.89 ± 0.08a	34.99 ± 0.30a

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอและทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยา

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมีผลสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นควรมีการตรวจสอบปริมาณ ความบริสุทธิ์ และสารยับยั้งปฏิกิริยาเพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มยีนเป้าหมายอย่างสมบูรณ์โดยไม่มีสารที่ขัดขวางปฏิกิริยา โดยเฉพาะปฏิกิริยาที่มีการเพิ่มจำนวนยีนหลายยีนพร้อมกันหากพบว่ามีสารยับยั้งในปฏิกิริยาในดีเอ็นเอที่สกัดได้จะต้องมีการกำจัดสารยับยั้งปฏิกิริยานั้นก่อนเพื่อความถูกต้องของผลการทดสอบ (Mazzara et al., 2005, Cankar et al., 2006 และ Turkec et al., 2015) ผลการสกัดดีเอ็นเอของข้าวสาลี แป้งข้าวสาลี บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป และขนมอบกรอบ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เมื่อทำการวัดค่าความเข้มข้นและค่าความบริสุทธิ์ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (ThermoFisher Scientific, Finland) พบค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอทุกตัวอย่างมีค่าสูง 5080 ถึง 1168 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการขั้นต่ำ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ A260/A280 พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1.95 ถึง 2.04 ซึ่งถือว่ามีความบริสุทธิ์จากเกณฑ์ที่ยอมรับ 1.8 ถึง 2.0 เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยาโดยการตรวจยีน *ACC-1* ด้วย Simplex Real-time PCR พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอมีค่า R^2 ระหว่าง 0.98-0.99 ค่า ΔCt (extrapolated) ระหว่าง -0.4 ถึง 0.3 (ค่ามาตรฐาน $\Delta Ct \leq 2$) ค่า Slope ระหว่าง -3.24 ถึง -3.47 (ค่ามาตรฐาน $-3.1 \geq Slope \geq -3.6$) ค่า efficiency ระหว่าง 103.54 ถึง 94.17 (ค่ามาตรฐาน Simplex Real-time PCR ที่ 90 – 110%) (Wu et al., 2014) จากผลการทดสอบสารยังยั้งปฏิกิริยาพบว่าการเพิ่มขึ้นของยีนเป้าหมายในแต่ละรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ตามเกณฑ์ที่ยอมรับในแต่ละรอบ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ที่สมบูรณ์นั้นจะมีค่า Slope ที่ -3.322 คิดเป็นค่า ค่า efficiency ที่ 100% (Fraga et al., 2014) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นที่ใช้การทดลองนี้มีประสิทธิภาพสูง ได้ปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์สูง โดยดีเอ็นเอที่ได้ปราศจากสารยับยั้งปฏิกิริยาเหมาะสำหรับใช้ในการทดสอบ ดังที่แสดงใน **Table 3.2-1**

Table 3.2-1 Concentration, ratio of A260/280 and inhibition test of extracted DNA from wheat and wheat's products

Sample	Concentration (ng/µl)	Ratio A260/280	Inhibition test				
			ΔC	R^2	Slope	Intercept	Efficiency
Wheat	5080.37±242.24	2.04±0.00	-0.23	0.99	-3.24	23.75	103.54
Wheat flour	2155.22±264.58	1.95±0.00	-0.40	0.99	-3.30	22.65	100.92
Instant noodle	1488.20±71.17	2.02±0.00	0.30	0.98	-3.47	20.98	94.17
Cracker	1168.80±178.14	1.95±0.01	0.08	0.99	-3.44	25.07	95.30

3.2.2 ความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบทั้ง 2 ชุด กับตัวอย่างพืชไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดต่างๆ พลาสมิด pUC57-MON71800 และ พลาสมิด MON71200 รวม 13 ชนิดทดสอบชนิดละ 3 ซ้ำในแต่ละยีนในปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR โดยแต่ละยีนเป้าหมาย พบว่าเมื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เปรียบเทียบค่าที่ได้กับ True positive/negative ไม่พบ False negative และ False positive แสดงถึงความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบมีความจำเพาะร้อยละ 100 ต่อชุดยีนเป้าหมายทั้ง 2 ชุด ดังแสดงใน **Table 3.2-2** นอกจากนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า Cp ของปฏิริยาแบบ Simplex Real-time PCR กับ Tetraplex Real-time PCR พบว่าค่า Cp จากปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR มีค่าสูงกว่าเพียงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน **Table 3.2-3** และ **Table 3.2-4** แสดงถึงความเหมาะสมของชุดไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบ และสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อการเพิ่มจำนวนบีนเป้าหมาย สอดคล้องกับ Broeders et al., 2014 ที่แสดงความจำเพาะของไพรเมอร์โพรบกับยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาแบบ Simplex Real-time PCR

Table 3.2-2 Specific test of primers and probes of *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator, *ACC-1* *MON71800*, *Lectin*, *HMG*, *CruA* and *MON71200* in Simplex Real-time PCR

Samples	Target genes (Simplex real-time PCR) (n=3)							
	35S	NOS	MON17800	ACC-1	HMG	Lectin	CruA	MON71200
PUC57-MON71800	+	+	+	+	-	-	-	-
MON71200 (Wako)	-	-	-	+	-	-	-	+
Non-GM corn	-	-	-	-	+	-	-	-
Non-GM soybean	-	-	-	-	-	+	-	-
Non-GM canola	-	-	-	-	-	-	+	-
10% RR	+	+	-	-	-	+	-	-
0.1% RR	+	+	-	-	-	+	-	-
NK603	+	+	-	-	+	-	-	-
MON810	+	-	-	-	+	-	-	-
MIR604	-	+	-	-	+	-	-	-
GTS4032	+	+	-	-	-	+	-	-
A2704-12	+	-	-	-	-	+	-	-
Rf3	-	+	-	-	-	-	+	-
Water	-	-	-	-	-	-	-	-
Specificity	100%							

+ means detected and - means not detected

Table 3.2-3 Crossing point (CP) of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* by using of PUC57-MON71800 plasmid (1 pg) as a template in Simplex and Tetraplex Real-Time PCR reaction *$P < 0.05$ (t-test) (n=3).

Target	Crossing point (CP) ± SD		
	Simplex	Tetraplex	t-test
CaMV35S promoter	34.15 ± 0.37	34.92 ± 0.02	nd
NOS terminator	33.78 ± 0.01	34.26 ± 0.15	nd
MON71800	34.64 ± 0.35	35.19 ± 0.01	nd

กรมวิชาการเกษตร

ACC-1	33.43 ± 0.06	34.10 ± 0.04	nd

nd means not statically different between two columns

Table 3.2-4 Crossing point (CP) of *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* event specific element by using wheat spiked corn, soybean, canola DNA at 0.05% and MON71200 (Wako) plasmid DNA at 0.1% as a template in Simplex and Tetraplex Real-Time PCR reaction *$P < 0.05$ (t-test) (n=3).

Target	Crossing point (CP) ± SD		
	Simplex	Tetraplex	t-test
HMG	35.16 ± 0.19	35.56 ± 0.75	nd
Lectin	34.19 ± 1.20	34.68 ± 0.64	nd
CruA	34.20 ± 0.11	34.86 ± 0.48	nd
MON71200	35.10 ± 0.15	35.84 ± 0.49	nd

nd means not statically different between two columns

3.2.3 ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR

ทดสอบประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายในปฏิริยา Tetraplex Real-time PCR ของชุดยีนทั้ง 2 ทำการทดสอบที่ DNA template เริ่มต้น 200 นาโนกรัมเจือจางเป็นลำดับขั้นที่ 1:4 1:16 1:64 และ 1:256 ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR ของยีนชุดที่ 1 ได้แก่ *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element และ *ACC-1* และยีนชุดที่ 2 ได้แก่ *HMG*, *Lectin*, *CruA* และ *MON71200* โดยประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย สามารถคำนวณได้จากสูตรคำนวณ PCR efficiency = $[10^{(-1/slope)}-1]$ ซึ่งค่า Ideal slope ที่ -3.322 ซึ่งคิดเป็น 100% efficiency โดยค่า Amplification factor ที่คำนวณได้ที่ 2 หมายถึงการเพิ่มจำนวณเป็น 2 copy ในทุกรอบของปฏิกิริยาจากค่าที่แสดงใน **Table 3.2-5** พบว่าได้ค่า Amplification factor ในทุกยีนเป้าหมายมีค่าอยู่ระหว่าง 1.81 ถึง 2.13 คิดเป็น efficiency อยู่ระหว่าง 80.88 ถึง 113.21% อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ที่ 80 ถึง 120% สำหรับ Multiplex Real-time PCR (Broeders et al. 2014) แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์โพรบทั้ง 2 ชุดในปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR มีความเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย สามารถใช้ตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม MON71800 และ MON71200 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังที่แสดงใน Table 8 ทั้งนี้ปัจจัยที่จะมีผลต่อปะสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่มีหลายอย่าง เช่น ความยาวของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา รูปแบบทุติยภูมิของผลิตภัณฑ์ และการออกแบบไพรเมอร์โพรบที่เหมาะสม

Table 3.2-5 Amplification factor, PCR efficiency, slope, linearity and intercept of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800*, *ACC-1*, *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* genes detection using Tatraplex Real-time PCR

Dilution GM:	DNA conc.	Ct of target gene detection							
		CaMV35S	*NOS*	*MON71800*	*ACC-1*	*HMG*	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*
1:0	200	23.52±0.28	26.61±0.81	26.60±0.35	25.30±0.27	25.15±0.52	22.35±0.14	28.42±0.53	27.61±0.85

1:4	50	26.38±0.61	28.46±0.34	28.60±0.42	27.14±0.64	27.21±0.37	24.55±0.64	30.41±0.39	29.58±0.41
1:16	12.5	28.70±0.29	30.72±0.43	30.30±0.35	29.24±0.95	29.71±0.49	26.22±0.31	32.71±0.82	31.76±0.53
1:64	3.125	31.05±0.48	32.88±0.16	32.08±0.79	31.67±0.79	31.80±0.78	28.33±0.85	34.86±0.17	33.60±0.18
1:256	0.781	33.35±0.59	35.01±0.42	34.76±0.58	33.69±0.23	34.31±0.43	29.95±0.433	36.89±0.74	35.64±0.15
Amplification		1.81	1.89	1.98	1.87	1.81	2.13	1.90	2
PCR efficiency		81.48	88.82	98.23	87.36	80.88	113.21	90.04	99.86
Slope		-3.86	-3.62	-3.36	-3.66	-3.88	-3.04	-3.58	-3.32
R^2		1	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Intercept		24.05	26.31	26.37	24.91	24.91	22.68	28.32	27.64

3.2.4 ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability) ของปฏิกิริยา Tetraplex real-time PCR

ทดสอบความเที่ยงและความแม่นยำของปฏิกิริยาโดยในแต่ละรอบของการทดสอบมีจำนวนซ้ำ 10 ซ้ำ ทำการทดสอบ 3 รอบการทดสอบ เพื่อทดสอบหาความสามารถในการทวนซ้ำของยีนเป้าหมาย *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800*, *ACC-1*, *HMG*, *Lectin*, *CruA* และ *MON71200* เมื่อเปรียบเทียบค่า Cp ที่ได้จากการทำในแต่ละรอบพบว่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.25 ถึง 2.59 ซึ่งถือว่าผลการทดสอบมีความเที่ยงและความแม่นยำสูง ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดสอบ 3 รอบนำค่าเฉลี่ย Cp ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยระหว่างรอบ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละยีนพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.04 ถึง 1.8 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ที่ค่า %RSD ต้องน้อยกว่าร้อยละ 25 (Broeders et al., 2014 และ Del Gaudio et al., 2012) แสดงถึงวิธีการทดสอบ สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ ไพรเมอร์โพรบที่ใช้ในการทดสอบ มีความเที่ยง ความแม่นยำ และสามารถทวนซ้ำได้ของการตรวจคัดกรองและจำแนกข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

Table 3.2-6 Precision accuracy and repeatability of Tetraplex real-time PCR

Replication	Average Cp							
	35S	*NOS*	*MON17800*	*ACC-1*	*HMG*	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*
1	33.97	34.03	34.62	33.84	35.75	34.86	34.40	35.06
2	34.19	34.00	34.97	34.16	34.69	34.51	34.50	35.24
3	34.29	33.99	35.02	34.33	34.62	34.36	34.26	35.70
Average	34.15	34.01	34.87	34.11	35.02	34.58	34.39	35.33
SD	0.16	0.01	0.21	0.25	0.63	0.25	0.12	0.32
RSD (%)	0.47	0.04	0.62	0.73	1.80	0.72	0.35	0.93

3.2.5 ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบเพื่อหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ของชุดยีนที่ 1 ได้แก่ *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* และ *ACC-1* เนื่องจากวัสดุที่ใช้ทำการทดสอบเป็น พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ pUC57-MON71800 ซึ่งมียีนเป้าหมายเป็นองค์ประกอบครบทั้ง 4 ยีน (**Figure 2.2-1**) จึงทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10, 1 และ 0.1พิโครกรัม ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยที่ 0.1 พิโครกรัม ค่าการทดสอบที่สามารถตรวจพบยีนมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 90 หรือน้อยกว่า 9 ตัวอย่างใน 10 ตัวอย่าง ซึ่งค่าขีดจำกัดของการ

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจวิเคราะห์จะต้องมีค่ามากกว่าร้อยละ 90 จึงสามารถยอมรับได้ (Anonymous, 2011 และ Broeders et al., 2014) ในขณะที่ 1 พิโครกรัมพบว่าทั้ง 4 ยีนเป้าหมายมีค่าการตรวจพบร้อยละ 100 จึงทำให้ทราบว่า ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ของยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* และ *ACC-1* โดยใช้พลาสมิด pUC57-MON71800 เป็นวัสดุในการทดสอบอยู่ที่ 1 พิโครกรัมพลาสมิด ดังที่แสดงใน **Table 3.2-7** สำหรับการตรวจวิเคราะห์ของชุดยีนที่ 2 ได้แก่ *HMG*, *Lectin*, *CruA* และ MON71200 ใช้วัสดุทดสอบเป็นข้าวสาลีไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติม ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนลา และพลาสมิด MON71200 (Wako) ที่ร้อยละ 10, 1, 0.1, 0.05 และ 0.01 พบว่า ยีนเป้ามหมาย *HMG*, *Lectin* และ *CruA* ระดับการปะปนต่ำสุดที่ตรวจพบอยู่ที่ร้อยละ 0.05 ในขณะที่ ยีน *MON71200* มีระดับการปะปนต่ำสุดที่ตรวจพบอยู่ที่ร้อยละ 0.1 ทั้งนี้ในปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR เป็นการตรวจ 4 ยีนเป้าหมายในปฏิกิริยาเดียวกัน จึงสรุได้ว่าชุดยีนที่ 2 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ที่ร้อยละ 0.1 ของการปะปน ดังที่แสดงใน **Table 3.2-8**

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.2-7 Limit of detection (LOD) of PUC57-MON71800 plasmid for detection of *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* event specific element and *ACC-1* in Tetraplex Real-Time PCR reaction. (n=10)

Target	Replication	Ratio (Detect : Non-detect)		Limit of detection (LOD)
		1 pg	0.1 pg	
CaMV35S promoter	10	10:0	5:5	1 pg
NOS terminator	10	10:0	4:6	1 pg
MON71800	10	10:0	3:7	1 pg
ACC-1	10	10:0	7:3	1 pg

Table 3.2-8 Limit of detection (LOD) of *HMG*, *Lectin*, *CruA* and *MON71200* event specific element in Tetraplex Real-Time PCR reaction. (n=10)

Target	Replication	Ratio (Detect : Non-detect)			Limit of detection (LOD)
		0.1%	0.05%	0.01%	
HMG	10	10:0	10:0	1:9	0.05%
Lectin	10	10:0	10:0	0:10	0.05%
CruA	10	10:0	10:0	2:8	0.05%
MON71200	10	10:0	0:10	0:10	0.1%

3.2.6 ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

ขยายผลการทดสอบ ชุดไพรเมอร์โพรบด้วยวิธีการ Tetraplex Real-time PCR ของชุดที่ 1 และ 2 เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของนำมาใช้ทดสอบจริง โดยทดสอบกับตัวอย่างข้าวสาลีที่มีการนำมาส่งตรวจจริงที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ภายใต้มาตรฐาน ISO/IEC17025:2017 จำนวน 30 ตัวอย่างพบว่า มี 7 ตัวอย่างที่มีการตรวจพบยีน *NOS* terminator ในการตรวจชุดยีนที่ 1 จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 7 ตัวอย่างนั้นมาดำเนินการตรวจต่อในชุดยีนที่ 2 พบว่ามีการตรวจพบยีน *CruA* ของคาโนลา จึงสรุปได้ว่ามีการปะปนของคาโนลาดัดแปลงพันธุกรรมในตัวอย่างที่ส่งตรวจจำนวน 7 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง ดังแสดงใน **Table 3.2-9** ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากฝุ่นผงที่ปะปนในระหว่างการขนส่ง นอกจากนั้นทำการทดสอบด้วย Blind sample ข้าวสาลีไม่ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเติม (Spike) พืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดต่างๆ พบว่าวิธีการทดสอบสามารถตรวจพบยีนเป้าหมายได้ตรงตามชนิดตัวอย่างนั้นๆ แสดงถึงประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบในการตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการปะปนมากับข้าวสาลี และสามารถจำแนกสายพันธุ์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมMON71800 และ MON71200 ได้ดังแสดงใน **Table 3.2-10** สอดคล้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ของ Kim et al., 2015 และ รายงานของ EURL GMFF, 2018, https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/unauthorised-gmos

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.2-9 Testing of 30 wheat samples from ISO/IEC17025 laboratory in 2 sets of primers and probe (n=2)

Sample no.	First set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result	Second set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result
	35S	*NOS*	*ACC-1*	*MON71800*		*HMG*	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*	
6766	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1715	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1069	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1071	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1070	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0988	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0989	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0990	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0789	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0602	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0448	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0391	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0392	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0870	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0072	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
1112	Not-detect	Detected	Detected	Not-detect	GM	Not-detect	Not-detect	Detecte	Not-detect	Canola GM
0451	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1107	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1031	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1438	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1504	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

กรมวิทยาศาสตร์

Sample no.	First set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result	Second set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result
	35S	*NOS*	*ACC-1*	*MON71800*		*HMG*	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*	
1686	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1937	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1957	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2020	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2073	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2079	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0042	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0043	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0157	Not-detect	Not-detect	Detected	Not-detect	Non-GM	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.2-10 Blind test of spiked different kinds of GM samples in non-GM wheat DNA for testing on designed 2 sets of primers and probes (n=3)

Spiked GM to non-GM wheat	First set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result	Second set of primers and probes (Mean Cp ± SD)				Result
	35S	*NOS*	*ACC-1*	*MON71800*		*HMG*	*Lectin*	*CruA*	*MON71200*	
Corn NK603	Detected 31.22	Detected 29.00±0.14	Detected 23.01±0.67	Not-detect	GM contamination	Detected 25.51±0.39	Not-detect	Not-detect	Not-detect	GM corn contamination
Corn MON810	Detected 33.05±0.25	Not-detect	Detected 24.25±0.46	Not-detect	GM contamination	Detected 26.51±0.16	Not-detect	Not-detect	Not-detect	GM corn contamination
Corn MIR604	Not-detect	Detected 28.88±0.20	Detected 24.73±0.07	Not-detect	GM contamination	Detected 25.95±0.47	Not-detect	Not-detect	Not-detect	GM corn contamination
Soybean GTS403-2	Detected 27.88±0.42	Detected 26.07±0.35	Detected 23.58±0.26	Not-detect	GM contamination	Not-detect	Detected 25.64±0.18	Not-detect	Not-detect	GM soybean contamination
Soybean A2704-12	Detected 24.31±0.1	Not-detect	Detected 23.32±0.56	Not-detect	GM contamination	Not-detect	Detected 23.25±0.12	Not-detect	Not-detect	GM soybean contamination
Canola Rf3	Not-detect	Detected 33.17±0.40	Detected 24.17±0.19	Not-detect	GM contamination	Not-detect	Not-detect	Detected 33.66±0.18	Not-detect	GM canola contamination
pUC57-MON71800	Detected 11.85±0.06	Detected 11.54±0.07	Detected 9.92±0.16	Detected 15.90±0.39	MON71800 GM wheat	Not-detect	Not-detect	Not-detect	Not-detect	N/A
MON71200 Plasmid	Not-detect	Not-detect	Detected 23.08±0.56	Not-detect	Test in second set primers	Not-detect	Not-detect	Not-detect	Detected 32.82±0.17	MON71200 GM wheat

กรมวิทยาศาสตร์

การทดลองที่ 3 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม events A2704-12 Mon87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมดังแสดงใน **Table 3.3-1** ผลการทดลองพบว่ามีความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ในช่วง 364 ถึง 2,318 ng/µl โดยความเข้มดีเอ็นเอที่นำไปใช้ทดสอบเพียง 20 ng/µl ดังนั้นจึงมีปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอสำหรับการนำไปตรวจยีนด้วยวิธี Real-time PCR และดีเอ็นเอมีคุณภาพ โดยมีค่าเฉลี่ย A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.80 - 2.14 ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้และยังส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์สุดท้ายของการทำปฏิกิริยา Real-time PCR (Houge et al., 2017) โดยปกติอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ควรอยู่ระหว่าง 1.8 – 2.0 โดยหากมีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของโปรตีน หรือสารประกอบฟีนอลบางส่วนจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 280 nm และถ้า A_{260}/A_{280} มีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของอาร์เอ็นเอ (Fraga et al., 2014; Lucena-Aguilar et al., 2016)

Table 3.3-1 the DNA concentration and DNA Ratio of DNA extraction

Plants	CRM events	CRM code	Certified value (%)	DNA concentration (ng/ul)	DNA Ratio A_{260}/A_{280}
Soybean	MON87701	AOCS 0809-A	100	1,142 ± 67	2.08 ± 0.02
	MON87705	AOCS 0210-A	100	2,138 ± 456	2.13 ± 0.01
	MON87769	AOCS 0809-B	100	1,945 ± 58	2.14 ± 0.00
	MON89788	AOCS 0906-B	100	1,510 ± 315	2.05 ± 0.02
	GTS 40-3-2	ERM®BF410ap	< 0.009 (blank)	611 ± 272	1.85 ± 0.13
	GTS 40-3-2	ERM®BF410cp	0.1	527 ± 94	1.85 ± 0.05
	GTS 40-3-2	ERM®BF410dp	1	364 ± 341	1.80 ± 0.12
	GTS 40-3-2	ERM®BF410dp	10	1,499 ± 298	1.97 ± 0.05
Corn	NK 603	ERM®BF415c	0.49	1,261 ± 159	2.11 ± 0.02

3.3.2 การปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา

จากการทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม GTS 40-3-2 ที่ระดับการปะปน 10% โดยการตรวจยีน *Lectin* ด้วยวิธี Simplex real-time PCR ผลการทดลองในการทดสอบอัตราการเจือจางดีเอ็นเอพบว่ามีค่า ΔC_t เท่ากับ 0.02 (ค่ามาตรฐาน $\Delta C_t \leq 2$) ค่าความชันของกราฟเท่ากับ -3.35 (ค่ามาตรฐาน -3.1 ≥ Slope ≥ -3.6) ค่า PCR efficiency เท่ากับ 98.83% และค่า R^2 มากกว่า 0.99 ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน โดยค่า C_t ซึ่งเป็นสัญญาณเรืองแสงเริ่มต้นนั้นสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยตามทฤษฎีการที่ค่า C_t เพิ่มขึ้นเป็น 2 Copies ทุกรอบส่งผลให้ค่าความชันของกราฟเท่ากับ -3.322 ซึ่งทำให้มีค่า PCR efficiency เป็น 100% กล่าวคือ ปริมาณของ

กรมวิชาการเกษตร

ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าอย่างสมบูรณ์ในแต่ละรอบของช่วง Exponential phase (อโนทัย, 2549; Life technologies, 2012) โดยการทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในการทดลองนี้พบว่ามีค่า PCR efficiency เท่ากับ 98.83% ซึ่งมีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 1.99 เท่าในแต่ละรอบปฏิกิริยา แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่มีสาเหตุมาจากดีเอ็นเอไม่มีคุณภาพ หรือสารตกค้างที่เกิดจากปฏิกิริยาการสกัดหรือทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งโดยปกติค่า PCR efficiency สำหรับวิธี Simplex Real-time PCR ควรอยู่ในช่วง 90 – 110% (Life technologies, 2012; Fraga et al., 2014)

3.3.3 ความจำเพาะด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ ในการตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Simplex Real-Time พบว่าโพรบและไพรเมอร์มีความจำเพาะสูงสำหรับตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac, rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* โดยมีการแสดงสัญญาณค่า C_t ดังแสดงใน Table 3.3-2 ซึ่งมีความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ 100% นอกจากนี้ชุดไพรเมอร์และโพรบดังกล่าวยังมีความจำเพาะสูงในการตรวจ 4 ยีนในปฏิกิริยาเดียวกันทั้งชุดการทดลอง A และ B ที่ได้ออกแบบไว้ โดยชุดการทดลอง A สามารถตรวจพบยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* และในชุดการทดลอง B สามารถตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* โดยตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นที่ไม่อยู่ในโครงสร้างยีน (Non-target GM DNA)

จากผลการทดสอบพบว่าค่า C_t ในการตรวจด้วยวิธี Tetraplex Real-Time มีค่าสูงกว่าวิธี Simplex Real-Time เมื่อตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Cy1Ac,* event Mon87705 และ event Mon89788 อย่างไรก็ตามค่า C_t ในการตรวจทั้งสองวิธีไม่ต่างกันเมื่อตรวจยีน *Nos* terminator, *rbcS E9* terminator (Mon87769, Mon89788) และ *Lectin* (Table 3.3-2) นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK 603 พบว่ามีการตรวจพบยีน *CaMV*35S promoter และ *Nos* terminator และตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นรวมถึงยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบถูกต้องสอดคล้องกับโครงสร้างการดัดแปลงพันธุกรรมของพืชชนิดและถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

โดยไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากหากมีการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (Random primers) หรือไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ำจะทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายที่สนใจ หรืออาจเกิดการลดปริมาณของดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาได้ (Life technologies, 2012) นอกจากนี้การตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time ทำให้สามารถจำแนกได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวเป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมใน 6 สายพันธุ์หรือไม่ ด้วยการตรวจยีนด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 2 ชุด (A และ B) ในขณะที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปนิยมตรวจเพียงยีน *CaMV*35S promoter ที่ได้จากไวรัสพืช *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) และยีน *Nos* terminator ที่ได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* (Bak and Emerson, 2019) ซึ่งเป็นยีนที่นิยมตัดต่อในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Simplex Real-Time แต่งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมถึง 4 สายพันธุ์ คือ Mon87701, Mon87769, Mon 89788 และ Mon87705 ซึ่งไม่มียีน *CaMV*35S promoter และ *Nos* terminator ในโครงสร้างยีน แสดงว่าการตรวจไม่พบทั้งสองยีนดังกล่าวไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นพืชที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ได้มีการรายงานว่าการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน (มีจำนวนตัวอย่างต่อเพลทมากขึ้น) ลดปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ลดปริมาณสารเคมีและ

กรมวิชาการเกษตร

วัสดุวิทยาศาสตร์ได้ถึง 2 เท่า ลดความคาดเคลื่อนจากการใช้ปิเปต (Pipet precision errors) อีกทั้งยังประหยัดเวลาทำงาน เนื่องจากสามารถตรวจหลายยีนได้ภายในปฏิกิริยาเดียว (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561a; Bak and Emerson, 2019)

Table 3.3-2 The C_t of specific test on soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time

RT-PCR	Condition of experiment A (C_t)				Condition of experiment B (C_t)			
	CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*
GM-Event	**GTS 40-3-2**				**Mon87769**			
Simplex	27.72 ± 0.86	28.38 ± 0.15	NA	23.49 ± 0.11	32.37 ± 0.19	NA	NA	NA
Tetraplex	30.13 ± 0.40	28.34 ± 0.34	ND	21.13 ± 1.45	32.02 ± 0.36	ND	ND	29.22 ± 0.29
GM-Event	**A2704-12**				**Mon 89788**			
Simplex	24.54 ± 0.40	NA	NA	NA	29.78 ± 0.21	NA	28.28 ± 0.36	NA
Tetraplex	26.54 ± 0.27	ND	ND	23.28 ± 0.38	30.97 ± 0.58	ND	29.44 ± 0.69	28.18 ± 0.83
GM-Event	**Mon87701**				**Mon87705**			
Simplex	NA	NA	25.71 ± 0.11	NA	29.55 ± 0.36	26.01 ± 1.16	NA	NA
Tetraplex	ND	ND	29.77 ± 0.19	23.51 ± 0.72	31.70 ± 0.21	30.15 ± 0.33	ND	28.06 ± 0.63
GM-Event	**5% NK603**				**5% NK603**			
Simplex	28.04 ± 1.90	34.11 ± 2.10	NA	ND	NA	NA	NA	ND
Tetraplex	32.42 ± 1.68	28.82 ± 1.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Remark: NA = Not analyzed gene, ND = not detected non-target gene

3.3.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ

จากการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR ซึ่งได้มีการออกแบบฉลากสีโพรบที่แตกต่างกันเพื่อลดการซ้อนทับของช่วงคลื่นการดูดกลืนแสง ทำให้สามารถแยกการตรวจจับยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีฉลากสีโพรบ/ Quencher จำนวน 4 ช่วงแสงที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดสอบ ได้แก่ FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ซึ่งมีการปลอดปล่อยสเปกตรัมสูงสุดเท่ากับ 515, 555, 603 และ 674 nm ตามลำดับ นอกจากนี้การเลือกใช้ Black Hole Quencher (BHQ) ยังช่วยลดการเรืองแสงของพื้นหลังเนื่องจากมีปลดปล่อยความร้อนแทนแสงปกติ และยังเพิ่มอัตราส่วนสัญญาณการตรวจจับยีนเป้าหมายต่อสัญญาณรบกวน ส่งผลให้ความไวในการตรวจจับสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Quencher ชนิด DABCYL หรือ TAMRA (Sigma-Aldrich, 2014) จากการทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 3 ระดับ คือ ที่สภาวะอ้างอิง (1X) ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่ลดลง -30% (0.7X) และความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่เพิ่มขึ้น +30% (1.3X) ผลการทดสอบพบว่าทุกสภาวะสามารถตรวจจำแนกยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* ในชุดการทดลอง A พร้อมทั้งตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* ในชุดการทดลอง B ซึ่งมีความถูกต้องโดยตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นที่ไม่อยู่ในโครงสร้างยีนและตรวจพบทุกซ้ำ (100%) ที่ทำการทดสอบดังแสดงใน **Table 3.3-3**

ผลการทดลองพบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบอยู่ที่ระดับ 0.7X ทำให้ค่า C_t ของทั้ง 7 ยีนที่ทดสอบมีค่าเฉลี่ยสูงขึ้นซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แสดงถึงความไวและประสิทธิภาพของปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR ที่ลดลง **(Table 3.3-3)** แต่เมื่อทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

โพรบที่ระดับ 1X ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย C_t ของการตรวจจำแยกยีน *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ event Mon87705 มีค่าน้อยที่สุดเป็น 28.34, 29.77 และ 30.15 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ระดับ 1.3X ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย C_t ของการตรวจจำแยกยีน *CaMV35S* promoter และ event Mon89788 มีค่าต่ำที่สุด (ไม่รวมยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง) นอกจากนี้การตรวจจำแยกยีน *rbcS E9* terminator มีค่าเฉลี่ย C_t ไม่แตกต่างกันที่ระดับ 1X และ 1.3X เมื่อทดสอบในวัสดุอ้างอิงรับรอง Mon89788 และ Mon87705 ดังแสดงใน **Table 7** ดังนั้น ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่ระดับ 1X มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR เนื่องจากให้ค่าความไวของการตรวจจำแนกยีนที่มีประสิทธิภาพ และใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าส่งผลให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญของการเพิ่มประสิทธิภาพปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มีจำกัดส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายลดลง (Life technologies, 2012) ซึ่งเป็นสาเหตุให้สภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบต่ำ (0.7X) มีค่า C_t ที่สูงและความไวของปฏิกิริยาลดลง ในทางตรงข้ามความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงเกินไปทำให้เกิดสภาวะ Multiplex Real-time PCR อิ่มตัว เนื่องจากเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มากจนเกิดภาวะอิ่มตัวส่งผลให้ DNA polymerase ยับยั้งการสังเคราะห์จากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีปริมาณน้อย (Life technologies, 2012) ซึ่งอาจเป็นผลให้ที่สภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบสูง (1.3X) มีค่า C_t และความไวของปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากสภาวะอ้างอิง (1X) สำหรับการตรวจยีน *rbcS E9* terminator อย่างไรก็ตามยีนเป้าหมายแต่ละชนิดมีปริมาณและจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาไม่เท่ากัน ยกตัวอย่างเช่น ยีน *Lectin* เป็นยีนอ้างอิงจำเพาะของถั่วเหลืองซึ่งโดยปกติมีจำนวนสำเนายีนที่สูง การใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ต่ำเพียง 0.050 และ 0.025 µM ตามลำดับ ก็เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา อีกทั้งยังมีความไวในการตรวจจับที่สูงโดยมีค่า C_t อยู่ในช่วง 21.13 ถึง 29.22 ดังแสดงใน **Table 3.3-3** นั่นคือความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมนั้นต้องมีเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในขณะที่ต้องมีปริมาณต่ำพอเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หมดก่อนที่จะเกิดสภาวะดีเอ็นเอสะสมอิ่มตัว

Table 3.3-3 The C_t results of various primer-probe concentrations for detection genetically modified soybean by Tetraplex Real-time

Concentrations	Condition of experiment A (C_t)				Condition of experiment B (C_t)			
Target gene	*CaMV35S*	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*
GM-Event	GTS 40-3-2				Mon87769			
0.7X	32.66 c	31.17 c	ND	24.51 b	33.60 c	ND	ND	30.57 c
1.0X	30.13 b	28.34 a	ND	21.13 a	32.02 b	ND	ND	29.22 b
1.3X	29.64 a	30.14 b	ND	21.78 a	31.78 a	ND	ND	27.95 a
CV (%)	4.45	4.06	-	7.64	2.65	-	-	3.86
GM-Event	A2704-12				Mon 89788			
0.7X	28.51 c	ND	ND	25.40 c	32.77 b	ND	31.47 c	29.76 c
1.0X	26.54 b	ND	ND	23.28 b	30.97 a	ND	29.44 b	28.18 b
1.3X	25.10 a	ND	ND	21.15 a	30.59 a	ND	28.29 a	26.94 a
CV (%)	5.55	-	-	7.37	3.35	-	4.80	4.63
GM-Event	Mon 87701				Mon87705			

0.7X	ND	ND	31.00 c	26.37 c	33.38 b	30.96 c	ND	29.04 c
1.0X	ND	ND	29.77 a	23.51 b	31.70 a	30.15 a	ND	28.06 b
1.3X	ND	ND	30.25 b	22.30 a	31.14 a	30.65 b	ND	26.56 a
CV (%)	-	-	1.80	8.29	3.12	1.38	-	4.05

Remark: ND = not detected non-target GM gene, Means followed by difference letters indicate the difference among primer-probe concentrations in each sub-column by Duncan test ($P \leq 0.05$)

3.3.5 ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

จากการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์โดยเจือจางดีเอ็นเอออกเป็น 4 ระดับของการปะปน คือ 10, 1, 0.1 และ 0.01% ซึ่งมีค่าจีโนมดัดแปลงพันธุกรรมของถั่วเหลืองเป็น 8,849.5, 885, 88.5 และ 8.85 copies/reaction ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่าเมื่อยีนเป้าหมายที่ทดสอบทั้ง 7 ยีน มีร้อยละการเจือจางลดลงจาก 10 เป็น 0.01% ส่งผลให้ปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR มีความไวในการการตรวจจำแนกยีนลดลงโดยมีค่า C_t ที่สูงขึ้นซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงใน **Table 3.3-4** โดยการตรวจจำแนกยีน *Cy1Ac, rbcS E9* terminator, event Mon87705 และ event Mon89788 มีค่า LOD ต่ำสุดที่น่าเชื่อถือเท่ากับ 0.1% ซึ่งตรวจพบทุกซ้ำและมีความถูกต้อง 100% นอกจากนี้การตรวจยีน *CaMV35S* promoter มีความไวที่แตกต่างกัน โดยในวัสดุอ้างอิงรับรอง GTS 40-3-2 และ A2704-12 มีค่า LOD เท่ากับ 0.1 และ 0.01% ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจจำแนกยีน *Nos* terminator และ *Lectin* สามารถตรวจยีนได้ที่ระดับการปะปน 0.01% แต่ผลของความถูกต้องลดลงเหลือ 83 และ 58% ตามลำดับ **(Table 3.3-4)** ดังนั้น เพื่อให้สามารถตรวจพบและจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้ทั้งหมดในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบ และมีความถูกต้อง 100% ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR มีค่า LOD ต่ำสุดคือ 0.1% (88.5 copies/reaction)

โดยผลการทดลองในชุดการทดลอง A พบว่ามีค่า PCR efficiency สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator และ *Cy1Ac* อยู่ในช่วง 93.34 – 100.07% ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าชุดการทดลอง B ซึ่งมีค่า PCR efficiency สำหรับการตรวจยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705 และ event Mon89788 อยู่ในช่วง 80.47 – 94.45% และค่า PCR efficiency สำหรับการตรวจยีน *Lectin* มีค่าสูงที่สุดในช่วง 113.15 – 118.19% **(Table 3.3-4)** โดยทั่วไปค่า PCR efficiency สำหรับวิธี Multiplex Real-time PCR ควรอยู่ในช่วง 80 – 120% (Bak and Emerson, 2019; Bustin et al., 2009) โดยหากมีค่าเกินกว่า 120% เป็นการบ่งชี้ว่ามีสารยับยั้งเกิดขึ้นในปฏิกิริยา เช่น คุณภาพดีเอ็นเอไม่ดี หรือปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบสูงเกินไป ซึ่งสามารถแก้ไขด้วยการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นให้เหมาะสม ในทางตรงข้ามหากค่า PCR efficiency ต่ำกว่า 80% อาจมีสาเหตุจากความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของไพรเมอร์ โพรบ แมกนีเซียม หรือ DNA polymerase เป็นต้น อีกทั้งการเข้าแข่งขันในการทำปฏิกิริยาหลายยีนในหลอดทดลองเดียวกันอาจทำให้ประสิทธิภาพของ Multiplex Real-time PCR ลดลงได้ (Life technologies, 2012) ซึ่งในการทดลองนี้ผลการตรวจจำแนก 7 ยีนเป้าหมายอยู่ในเกณฑ์ดังกล่าว โดยค่า PCR efficiency ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงทฤษฎีมีค่าเท่ากับ 100.07% สำหรับการตรวจยีน *CaMV35S* promoter โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง A2704-12 ในการทดสอบ อย่างไรก็ตามค่า PCR efficiency ที่ได้ต่ำสุดเท่ากับ 80.47% แต่ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นเป็น 1.8 เท่าต่อรอบในช่วง Exponential phase นอกจากนี้ผลการทดลองใน **Table 8** ยังสอดคล้องกับค่าความชันของกราฟซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ -2.92 ≥ Slope ≥ -3.91

Table 3.3-4 The results of C_t, PCR efficiency, and slope on LOD testing for genetically modified soybean by Tetraplex Real-time

GM level	Target copies No.	Condition of experiment A (C_t)				Condition of experiment B (C_t)			
		CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin* [1/]	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin* [1/]
GM-Event		GTS 40-3-2			blank	Mon87769			blank
10%	8,849.5	27.78 a	26.58 a	ND	24.91	29.47 a	ND	ND	26.96
1%	885	31.48 b	30.20 b	ND	28.75	33.32 b	ND	ND	30.15
0.1%	88.5	34.75 c	33.28 c	ND	31.28	36.90 c	ND	ND	33.05
0.01%	8.85	ND	36.94 d [2/]	ND	33.91	ND	ND	ND	36.43 [3/]
Efficiency (%)	-	93.50	96.15	-	118.19	85.91	-	-	113.15
Slope	-	-3.49	-3.42	-	-2.95	-3.71	-	-	-3.04
GM-Event		A2704-12				Mon 89788			
10%	8,849.5	26.54 a	ND	ND		28.55 a	ND	29.44 a	
1%	885	27.70 b	ND	ND		33.01 b	ND	32.62 b	
0.1%	88.5	31.53 c	ND	ND		36.05 c	ND	36.37 c	
0.01%	8.85	36.33 d	ND	ND		ND	ND	ND	
Efficiency (%)	-	100.07	-	-		84.81	-	94.45	
Slope	-	-3.32	-	-		-3.75	-	-3.46	
GM-Event		Mon 87701				Mon87705			
10%	8,849.5	ND	ND	27.37 a		28.38 a	29.02 a	ND	
1%	885	ND	ND	30.94 b		32.51 b	32.67 b	ND	
0.1%	88.5	ND	ND	34.36 c		36.18 c	36.49 b	ND	
0.01%	8.85	ND	ND	37.58 [3/]		ND	ND	ND	
Efficiency (%)	-	-	-	93.34		80.47	85.29	-	
Slope	-	-	-	-3.49		-3.90	-3.73	-	

Remark: Means followed by difference letters indicate the difference among LOD levels in each sub-column by Duncan test ($P \leq 0.05$), ND = not detected non-target GM gene, [1/] *Lentin* genes were analyzed by using GTS 40-3-2 blank diluted with corn DNA, [2/] The accuracy of gene detection is decreased to 83%, [3/] The accuracy of gene detection is decreased to 58%.

3.3.6 ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ

Table 3.3-5 แสดงผลการแปรผันปริมาณดีเอ็นต้นแบบที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 ng/reaction ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นดีเอ็นเอลดลงจาก 150 เป็น 25 ng/reaction ส่งผลให้ค่า C_t มีแนวโน้มสูงขึ้น ทำให้มีความไวในการตรวจจำแนกยีนลดลง โดยในชุดการทดลอง A พบว่าดีเอ็นเอต้นแบบความ

กรมวิชาการเกษตร

เข้มข้น 150 ng/reaction ให้ค่า C_t ดีที่สุดสำหรับการตรวจยีน *Cry1Ac* และ *CaMV35S* promoter เมื่อใช้ Mon87701 และ A2704-12 เป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง โดยมีค่า C_t 31.36 และ 29.10 ตามลำดับ ซึ่งผลสอดคล้องในการทดลอง B โดยที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 150 ng/reaction มีค่า C_t ต่ำที่สุดสำหรับการตรวจยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705 และ event Mon89788 เป็น 32.28 – 33.20, 32.09 และ 32.38 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator และ *Lectin* ให้ค่า C_t ไม่ต่างกันในวัสดุอ้างอิงรับรอง GTS 40-3-2 เมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ng/reaction **(Table 3.3-5)**

Table 3.3-5 The results of C_t on various DNA template concentrations for genetically modified soybean detection by Tetraplex Real-time

RT-PCR	Condition of experiment A (C_t)				Condition of experiment B (C_t)			
Target DNA (ng/re.)	*CaMV35S*	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*
GM-Event	GTS 40-3-2				Mon87769			
150	35.14 a	33.79 a	ND	23.50 a	33.07 a	ND	ND	21.71 a
100	34.58 a	33.89 a	ND	23.64 a	33.75 b	ND	ND	22.34 b
50	36.42 b [1/]	35.01 ab	ND	23.46 a	33.86 b	ND	ND	22.52 b
25	36.27 b [2/]	35.42 b [1/]	ND	24.02 b	34.71 c	ND	ND	23.14 c
GM-Event	A2704-12				Mon 89788			
150	29.10 a	ND	ND	24.18 a	32.28 a	ND	32.09 a	23.81 a
100	30.09 b	ND	ND	24.48 b	32.84 b	ND	33.30 b	23.87 a
50	31.49 c	ND	ND	25.60 c	33.71 c	ND	33.87 c	24.81 b
25	31.96 d	ND	ND	26.26 d	34.68 d	ND	34.71 d	25.45 c
GM-Event	Mon 87701				Mon87705			
150	ND	ND	31.36 a	23.07 a	33.20 a	32.38 a	ND	23.06 a
100	ND	ND	34.60 b	23.19 b	33.63 b	32.77 b	ND	23.61 b
50	ND	ND	34.86 bc [2/]	24.37 c	34.55 c	33.82 c	ND	24.43 c
25	ND	ND	36.07 c [2/]	25.05 c	35.44 d	34.55 d	ND	25.28 d

Remark: Means followed by difference letters indicate the difference among DNA template concentrations in each sub-column by Duncan test ($P \leq 0.05$), ND = not detected non-target GM gene, [1/] The accuracy of gene detection is decreased to 75 - 83%, [2/] The accuracy of gene detection is decreased to 50 - 58%.

โดยการตรวจยีน *Lectin* โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง Mon89788 ก็ให้ค่า C_t ไม่แตกต่างเช่นเดียวกัน แสดงว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับตรวจคัดแยกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR อยู่ในช่วง 100 - 150 ng/reaction อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นต้นแบบที่มีความเข้มข้นต่ำ 25 - 50 ng/reaction มีความถูกต้องในการตรวจพบยีนลดลง โดยเฉพาะเมื่อใช้ GTS 40-3-2 และ Mon 87701 เป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง

ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อสิทธิภาพของการทำ Real-time PCR โดย Life technologies (2012) ได้รายงานว่าการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แต่ละครั้งควรใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในช่วง 10 – 1000 copies หรือเทียบเท่ากับ 100 pg ถึง 1 µg สำหรับ genomic DNA ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

กรมวิชาการเกษตร

ความจำเพาะของไพรเมอร์โพรบ เนื่องจากการใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการปนเปื้อน ซึ่งไปลดประสิทธิภาพของกระบวนการ Real-time PCR แต่หากใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่น้อยเกินไปส่งผลให้ความไวและความถูกต้องของปฏิกิริยาลดลง

3.3.7 ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

จากการขยายผลวิเคราะห์ในตัวอย่างถั่วเหลือง ตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญ และตัวอย่างพืชชนิดอื่น ๆ รวมจำนวน 30 ตัวอย่าง ดังแสดงใน **Table 3.3-6** พบว่า ผลการตรวจคัดกรองยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ที่ได้จากการพัฒนาในงานวิจัยนี้ตรวจพบยีน *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator และ *Lectin* มีความถูกต้อง 100% ในทุกตัวอย่างทดสอบสอดคล้องกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งผ่านการรับรองจากมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025

จากการตรวจคัดกรองยีนด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการบริโภคจำนวน 10 ตัวอย่าง (1031 – 1572) ผลทดสอบไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรม แต่เมื่อขยายผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่าตรวจพบยีนดัดแปลงพันธุกรรม *rbcS E9* terminator และ event Mon89788 จาก 4 ใน 10 ตัวอย่าง (1031, 1033, 1168 และ 1169) โดยจากโครงสร้างยีนที่ตรวจพบแสดงว่าทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวมีการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 ซึ่งไม่มียีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator อยู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างถั่วเหลือง 0354 – 0872 ที่ตรวจพบเพียงยีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator ด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ยังตรวจพบยีนดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นเพิ่มเมื่อขยายผลการตรวจสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR โดยจากผลการทดสอบ พบว่า 9 ใน 10 ตัวอย่างตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator ร่วมกับยีน event Mon89788 และอีก 2 ตัวอย่าง (0693 และ 0872) ตรวจพบยีน *Cy1Ac* ดังแสดงใน **Table 3.3-6** ซึ่งแสดงถึงการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 และ Mon87701 ตามลำดับ ซึ่งจาก 10 ตัวอย่างในกลุ่มตัวอย่างนี้มีเพียงตัวอย่าง 0445 เท่านั้นที่มีการปะปนเฉพาะถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ GTS 40-3-2 หรืออาจมีสายพันธุ์ A2704-12 ปะปนร่วมด้วย เนื่องจากตรวจพบทั้งยีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator โดยตัวอย่างที่ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดนี้ไม่พบการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87705

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบในตัวอย่างถั่วเหลืองสำหรับทดสอบความชำนาญโดยที่ตัวอย่าง MyKIMIA PT soya V0667 และ USDA PT soya V0151 มีองค์ประกอบของยีนดัดแปลงพันธุกรรม *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator และ event Mon89788 อยู่ในตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator เพิ่มเติม ซึ่งเป็นยีนคัดกรองที่มีอยู่ในโครงสร้างของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 นอกจากนี้ยังพบยีน *Cy1Ac* ที่อยู่ในโครงสร้างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87701 ปะปนอยู่ในตัวอย่าง V0667 อีกด้วย ในขณะที่ตัวอย่าง USDA PT soya V0278 และ USDA PT soya V0150 มีองค์ประกอบของยีน *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator, event GTS 40-3-2, event A2704-12 และ event DP305423 ในตัวอย่างทดสอบ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับทดสอบความชำนาญทั้ง 4 ตัวอย่าง มีการตรวจพบยีนคัดกรอง *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจ โดยพบว่าเป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ event GTS 40-3-2 เนื่องจากมียีนทั้งสองอยู่ใน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

โครงสร้างของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการตรวจพบยีนคัดกรอง *CaMV35S* promoter ร่วมกับยีน *Nos* terminator อาจพบ event A2704-12 ปะปนร่วมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ได้เนื่องจากมียีน *CaMV35S* promoter อยู่ในโครงสร้าง ยกตัวอย่างเช่น V0278 และ V0150 มียีน event A2704-12 แต่ในตัวอย่าง V0667 และ V0151 ไม่พบยีน event A2704-12 ซึ่ง Huber et al (2013) ได้รายงานผลการตรวจตัวอย่างถั่วเหลืองและตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ และการตรวจพบเพียงยีน *CaMV35S* promoter แสดงถึงการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ A2704-12

นอกจากนี้ในตัวอย่างทดสอบอื่นๆ ได้แก่ เมล่อน แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดกระป๋องและเมล็ดมะละกอ ตรวจไม่พบยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง แสดงว่าการไม่มีการปะปนของถั่วเหลืองในการทดสอบ และวิธี Tetraplex Real-time PCR นั้นมีความจำเพาะในการตรวจตัวอย่างที่มีองค์ประกอบจากถั่วเหลืองอย่างมีประสิทธิภาพ **(Table 3.3-6)** อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่างซอสถั่วเหลืองนั้นตรวจไม่พบยีน *Lectin* ทั้งในวิธี Triplex และ Tetraplex Real-time PCR เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลายขั้นตอนส่งผลให้ดีเอ็นเอถูกทำลายและไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงตรวจไม่พบยีนดังกล่าว (เกศสุนี และคณะ, 2553; Cardarelli et al., 2005) โดยงานวิจัยนี้ได้ออกแบบให้มีการตรวจยีนคัดกรองซึ่งมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ขั้นต้นว่าถั่วเหลืองหรือพืชชนิดต่างๆ มีการดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างได้อย่างกว้างขวาง แต่หากต้องการตรวจเพื่อแยกว่าเป็นสายพันธุ์ใดโดยละเอียดควรมีการตรวจแบบยีนจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้สามารถตรวจหายีนคัดกรองด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ในชุดการทดลอง A และยังสามารถตรวจยีนจำเพาะของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมในชุดการทดลอง B ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถใช้ทดสอบในตัวอย่างที่มีความหลากหลายทั้งพืชสด และผลิตภัณฑ์แปรรูป

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.3-6 Soybean food and seed, PT samples, and plant samples screened by Tetraplex Real-time compared with Triplex Real-time PCR assay which analyzing by Research and Development of GM Plant & Microbe Detection Lab

Samples and code names	Tetraplex Real-time: experiment A				Tetraplex Real-time: experiment B				Triplex Real-time PCR		
	CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*	*CaMV35S*	*Nos*	Endogenous*
soybean (food) 1031, soybean (food) 1032	- , -	- , -	- , -	+ , +	+ , -	- , -	+ , -	+ , +	- , -	- , -	+ , +
soybean (food) 1033, soybean (seed) 1168	- , -	- , -	- , -	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	- , -	- , -	+ , +
soybean (seed) 1169, soybean (seed) 1170	- , -	- , -	- , -	+ , +	+ , -	- , -	+ , -	+ , +	- , -	- , -	+ , +
soybean (food) 1569, soybean (food) 1570	- , -	- , -	- , -	+ , +	- , -	- , -	- , -	+ , +	- , -	- , -	+ , +
soybean (food) 1571, soybean (food) 1572	- , -	- , -	- , -	+ , +	- , -	- , -	- , -	+ , +	- , -	- , -	+ , +
soybean (food) 0354, soybean (food) 0355	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
soybean (food) 0390, soybean (food) 0445	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , -	- , -	+ , -	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
soybean (food) 0517, soybean (seed) 0603	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
soybean (seed) 0671, soybean (food) 0690	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
soybean (food) 0693, soybean (food) 0872	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
USDA PT soya V0278, MyKIMIA PT soya V0667	+ , +	+ , +	- , +	+ , +	- , +	- , -	- , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
USDA PT soya V0150, USDA PT soya V0151	+ , +	+ , +	- , -	+ , +	- , +	- , -	- , +	+ , +	+ , +	+ , +	+ , +
melon 0829, tapioca starch 0918	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	+ , +
baby corn 0899, canned corn 0922	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	- , -	+ , +
soybean sauce 0897	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
papaya seed 0898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Remark: (-) = not detected non-target gene, (+) = detected target gene, USDA PT: USDA proficiency test, MyKIMIA PT: Kimia proficiency test,
*Endogenous gene of soybean is *Lectin*; Endogenous gene of maize is *Hmg;* Endogenous gene of papaya is *papain*, Endogenous gene of melon and tapioca starch is *tRNA*

กรมวิทยาศาสตร์

การทดลองที่ 4 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 events (Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9)

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ที่มีระดับการปนเปื้อนที่แตกต่างกัน และข้าวโพดไม่ดัดแปลงพันธุกรรมตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (ThermoFisher Scientific, Finland) ผลการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอพบว่าวิธีการสกัด ดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีที่ดัดแปลงตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 1,380.81±221 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาตรที่ได้ 50 ไมโครลิตร คุณภาพของดีเอ็นเอคำนวณค่า 260/280 เฉลี่ย 1.88±0.04 ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยตรวจสอบปฏิกิริยา inhibition test ของยีน *HMG* ในดีเอ็นเอที่สกัด ซึ่งได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.998±0.005 และมีค่า ΔCt (extrapolated)=Extrapol Ct - Mean Ct ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือค่าต่ำกว่า 0.5

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ส่งผลต่อการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cankar *et al*. (2006) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากซึ่งอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ สารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) ที่เกิดจากสารภายในตัวอย่าง หรือ ที่เกิดจากขั้นตอนการสกัด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่นการตรวจสอบจากการวัดคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร หรือการนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR, real-time PCR เป็นต้น และจากการรายงานของ Turkec *et al.* (2015) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นส่งผลต่อการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมจำเป็นต้องมีวิธีการสกัดที่สามารถให้คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ดี รวมถึงสามารถดึงเอาสาร Inhibitor ต่างๆ ออกได้มากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับวิธีของ Mazzara *et al*. (2005)

Table 3.4-1 Quality, concentration, and Inhibition test results of 14 genetically modified after DNA extraction

GM (events)	% GMO Value	Concentration (ng/ul)	Ratio of A260/280	Inhibition test	
				ΔCt (extrapolated)	R^2
Mon810	blank <0.04	1,035±132	1.87±0.11	NA	NA
	0.5%	1,570±192	1.89±0.05	NA	NA
	2	1,640±183	1.90±0.05	NA	NA
	9.9%	1,642±157	1.88±0.07	0.42	0.997
Mon87427	100	1,408±151	1.87±0.02	0.46	0.998

GM (events)	% GMO Value	Concentration (ng/ul)	Ratio of A260/280	Inhibition test	
				ΔCt (extrapolated)	R^2
DAS40278-9	blank <0.03	1,214±151	1.81±0.03	NA	NA
	0.5	1,338±151	1.95±0.12	0.25	0.997
	1	1,428±151	1.83±0.02	NA	NA
	10	1,318±151	1.85±0.04	0.38	0.997
T25	100	1,238±151	1.90±0.04	0.43	0.997
Mon88017	100	1,423±151	1.87±0.02	0.38	0.998
Mon87460	100	1,508±151	1.85±0.03	0.26	0.997
GA21	blank <0.08	1,548±281	1.92±0.04	NA	NA
	0.1	1,712±101	1.87±0.03	NA	NA
	0.5	1,512±211	1.85±0.03	0.25	0.993
	1	1,228±131	1.87±0.11	NA	NA
	2	1,198±107	1.85±0.05	NA	NA
	5	1,541±98	1.87±0.03	0.45	0.998
TC1507	blank <0.05	1,508±213	1.84±0.02	NA	NA
	0.1	1,114±172	1.87±0.05	0.25	0.994
	1	1,218±150	1.87±0.06	NA	NA
	10	1,398±201	1.83±0.02	0.43	0.997
DAS59122-7	blank<0.1	1,214±71	1.89±0.06	NA	NA
	0.1	1,428±301	1.91±0.06	0.25	0.997
	1	1,113±171	1.93±0.04	NA	NA
	10	1,128±51	1.87±0.05	0.45	0.998
MON89034	100	1,353±133	2.00±0.08	0.29	0.999
NK603	blank <0.04	1,630±347	1.89±0.02	NA	NA
	0.1	1,539±179	1.87±0.07	NA	NA
	0.5	1,008±152	1.84±0.05	0.13	0.998
	1	1,156±163	1.86±0.04	NA	NA
	2	1,038±135	1.91±0.08	NA	NA
	10	1,299±190	1.90±0.03	0.23	0.997
MIR162	100	1,197±90	1.98±0.02	0.28	0.999
Bt11	blank <0.01	1,128±137	1.85±0.02	NA	NA
	0.1	1,508±151	1.84±0.02	0.25	0.997
	1	1,328±241	1.83±0.03	NA	NA
	10	1,127±123	1.87±0.06	NA	NA
	100	1,315±201	1.84±0.01	0.32	0.998
MIR604	Blank <0.09	1,897±131	1.93±0.05	NA	NA
	0.1	1,795±231	1.97±0.02	NA	NA
	1	1,563±231	1.94±0.05	NA	NA
	10	1,499±167	1.97±0.08	0.24	0.999
nonGM	-	1,754±142	1.85±0.03	0.34	0.998
AVG		1,380±221	1.88±0.04		

NA: Not Available for test

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลองค์ประกอบของยีนที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการจำแนกยีนในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์

ผลจากการสืบค้นหาลำดับเบสของยีนแต่ละตัวโดยเลือกตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve region) คัดเลือกไพรเมอร์และโพรบซึ่งสามารถจัดกลุ่มและมีความจำเพาะเจาะจงกับกลุ่มยีนทั้งสามกลุ่มของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ได้โดยแบ่งเป็น 1 ส่วนของโปรโมเตอร์ และ เทอร์มิเนเตอร์ คือ 35SCaMV promoter, Nos terminator, *maize ubiquitin* (*Ubi*-1) และ Figwort Mosaic Virus35S promoter (P-FMV) และในส่วนของยีนองค์ประกอบ (Construct gene) ได้แก่ *phosphinothricin acetyltransferase* (*PAT*) ซึ่งสามารถจัด Matrix ในการตรวจจำแนกยีนดัง **Table 3.4-1** แล้วนำมาสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบดัง **Table 3.4-3** เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม โดยจากการจำลอง Matrix ซึ่งสามารถใช้โพรบและไพรเมอร์เพียงจำนวน 5 ตัวทำให้สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมออกเป็น 10 กลุ่ม โดยจะมีกลุ่มที่ 1 4 5 และ 9 ที่มีในแต่ละกลุ่มมีข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 2 สายพันธุ์ ซึ่งอาจจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์จำแนกยีนอีก 1 ครั้งต่อไป

Table 3.4-2 The construct gene information of 14 genetically modified maize

GM-event	Genetic elements						Format
	P35S	Nos	Pat	FMV	Ubiquitin-1	Code	
TC1507	1	0	1	0	0	10100	1
59122-7	1	0	1	0	0	10100	1
MIR604	0	1	0	0	0	01000	2
Mon810	1	0	0	0	1	10001	3
MON87460	1	1	0	0	0	11000	4
MON88017	1	1	0	0	0	11000	4
NK603	1	1	0	0	1	11001	5
MON87427	1	1	0	0	1	11001	5
T25	1	0	1	0	1	10101	6
Mon89034	1	1	0	1	0	11010	7
Bt11	1	1	1	0	0	11100	8
GA21	0	1	0	0	1	01001	9
MIR162	0	1	0	0	1	01001	9
40278-9	0	0	0	0	1	00001	10
Negative	0	0	0	0	0	00000	11

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.4-3 Oligonucleotide sequences of primer and probe of construct gene for event gene detection in 14 genetically modified maize

No.	Gene	Name	Sequence 5'-3'	Reference
1	CaMV 35S promoter	35S-FTM	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	JRC-EURL GMFF-
		35S-RTM	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	ENGL. 2011
		35S-TMP	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1-3'	QT-ELE-00-004
2	NOS terminator	Nos 180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	JRC-EURL GMFF-
		Nos 180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT-3'	ENGL. 2011
		Nos 180-P	5'-HEXATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1-3'	QL-ELE-00-011
3	Phosphinothricin N-	Pat F	5'-CGCGGTTTGTGATATCGTTAAC-3'	Debode *et al.,* 2016
	acetyltransferase	Pat R	5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA-3'	QL-ELE-00-025
	(pat)	patProbe	5'Cy5AGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTGBHQ3-3'	
4	Figwort Mosaic Virus	PFMV F	5'-CAAAATAACGTGGAAAAGAGCT -3'	JRC-EURL GMFF-
	35S promoter	PFMV R	5'-TCTTTTGTGGTCGTCACTGC -3'	ENGL. 2011
	(P-FMV)	PFMV Probe	5'TexasredCTGACAGCCCACTCACTAATGC -3'	QL-ELE-00-015
5	Ubiquitin promoter	PUbi F	5'- GAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAAC-3'	Dedobe *et al*., 2013
	(Ubi-1)	PUbi R	5'- ACGCGACGCTGCTTGGT-3'	
		PUbi Probe	5'- Cy5 CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACBHQ3-3'	

3.4.3 ศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบต่อข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex และ Multiplex

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบ 5 ยีน กับตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (CRM) ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ในระดับต่างๆ และตัวอย่างพืชที่ไม่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยวิธี Simplex และ Multiplex Real-time PCR

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ 35SCaMV promoter, Nos terminator, *maize ubiquitin* (*Ubi*-1) และ Figwort Mosaic Virus35S promoter (P-FMV) ยีน *Ubiquitin* และ ยีน *pat* ด้วยเทคนิค Simplex Real-time PCR พบว่า ไพรเมอร์โพรบของแต่ละยีนมีความจำเพาะต่อการตรวจสอบยีนโดยสามารถตรวจพบยีน 35SCaMV promoter ได้ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 Mon810 Mon88017 Mon89034 MIR162 Mon87427 และ DAS40278-9 ตรวจพบยีน Nos terminator ได้ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Bt11 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 NK603 และ MIR162 ตรวจพบยีน *maize ubiquitin* (*Ubi*-1) ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ GA21 T25 Mon810 NK603 MIR162 Mon87427 และ DAS40278-9 ตรวจพบยีน FMV ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ TC1507 DAS59122-7 T25 และ Bt11 และตรวจพบยีน *pat* ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon89034 นอกจากนี้ทุกยีนไม่สามารถตรวจพบได้ในข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมดัง **Table 3.4-4** ทั้งนี้เมื่อตรวจวิเคราะห์ยีนทั้ง 5 ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ให้ผลการตรวจพบเหมือนกับเทคนิค Simplex Real-time PCR และเมื่อเปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้จากการตรวจจับสัญญาณยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, *maize ubiquitin* (*Ubi*-1) และ Figwort Mosaic Virus35S promoter (P-FMV) ยีน *Ubiquitin* และ ยีน *pat* ระหว่างเทคนิค simplex และ multiplex real-

กรมวิชาการเกษตร

time ดัง **Table 3.4-4** พบว่าค่า Ct ที่ได้จากเทคนิค Multiplex Real-time PCR มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับ ค่า Ct เฉลี่ยที่ตรวจวัดได้จากเทคนิค Simplex Real-time PCR และนอกจากนี้พบว่า เทคนิค Multiplex Real-time PCR ให้ค่า Ct เฉลี่ย สูงกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีภายในปฏิกิริยาเดียวกัน เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์จากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนดังดัง **Table 3.4-2** แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder *et al*., (2014) พบว่า การใช้เทคนิค multiplex real time PCR ตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ไม่พบ False negative และ False positive (Lab Life-Real-Time PCR, 2015)

3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา Multiplex real-time PCR

การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ผสมกันระหว่าง Bt11 GA21 และ DAS559122-7 ที่ระดับการปะปน 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ผลการทดลองพบว่า 35SCaMV promoter, NOS terminator, FMV promoter, *PAT* และ *Ubi*-1 สามารถตรวจวัดได้ในระดับการเจือจางดีเอ็นเอตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:16 หรือระดับการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตั้งแต่ 0.625% ถึง 5% ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยอัตราการเจือจางที่อัตรา 1: 256 ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้ โดยค่า Ct ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณสำเนาดีเอ็นเอต้นแบบ (copy number) ที่ลดลง เมื่อนำค่า Ct ที่ได้ของแต่ละระดับการเจือจางมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Del Gaudio *et al*. (2012) พบว่า 35SCaMV promoter, NOS terminator, FMV promoter และยีน*Ubi*-1 มีค่าSlope -2.93 -2.91 และ -3.1 ตามลำดับ ค่า PCR efficiency เท่ากับ119 120 และ 111.19 ตามลำดับ และค่าสัมประสิทธิของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99 แต่สำหรับการสังเคราะห์ยีน FMV และยีน *Pat* ไม่อยู่ในค่าที่เหมาะสมตามทฤษฎีกล่าวคือ ให้ค่า PCR efficiency เท่ากับ 135 และ166 ตามลำดับ แต่ให้ค่าค่าสัมประสิทธิของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99 ทั้งนี้เกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR (Broeders *et al*., 2014) ดังนี้ ค่าSlope -3.1 ถึง -2.9 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 80 ถึง 120 และค่าสัมประสิทธิของการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99-1 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR มีประสิทธิภาพสามารถ จำแนกยีนได้ (Shrestha *et al*., 2010 and Sinha *et al*., 2015)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Table 3.4-4 The Ct Mean results of primers and probes specificity for 35SCaMV promoter, NOS terminator, FMV promoter, *PAT* and *Ubi*-1 gene using Simplex and Multiplex Real-time PCR techniques.

Event	GM Conta-minated (%)	Ct Mean of (gene)														
		35SCaMV promoter			Nos terminator			FMV			*PAT*			*Ubi*-1		
		Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test	Sim-plex	Multi-plex	T-test
TC1507	1	31.27	33.51	*	30.12	32.80	*	34.12	33.87	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
59122-7	1	30.26	34.42	*	30.08	33.12	*	31.54	31.72	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
MIR604	1	ND	ND	ns	31.72	31.08	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
Mon810	1	32.11	34.08	*	30.26	33.42	*	ND	ND	ns	ND	ND	ns	36.17	36.51	ns
MON87460	1	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
MON88017	1	33.46	35.78	*	32.76	34.58	*	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
NK603	1	ND	ND	ns	30.28	31.22	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	36.54	36.92	ns
MON87427	1	30.25	31.42	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	37.36	36.43	ns
T25	1	ND	ND	ns	30.46	30.68	ns	34.41	33.74	ns	ND	ND	ns	35.11	36.84	ns
Mon 89034	1	32.46	33.12	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	32.62	31.94	ns	ND	ND	ns
Bt11	1	30.86	33.02	*	33.11	32.98	ns	34.52	33.97	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns
GA21	1	30.25	30.22	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	35.71	36.12	ns
MIR162	1	33.42	32.74	ns	34.08	34.52	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	35.74	34.53	ns
40278-9	1	32.24	31.89	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	36.25	35.78	ns
Negative	0	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns	ND	ND	ns

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.4-5 PCR efficiency, slope, linearity and intercept of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV and *Pat* gene detection using Multiplex Real-time PCR

Dilution GM: total volume	% GMO level	DNA conc.	Target Copies No.	Ct of target gene detection				
				35SCaMV promoter	Nos terminator	*FMV*	*Pat*	*Ubi-1*
1:0	5	100	366.97	26.74±0.26	27.08±0.45	2816±0.23	30.12±0.25	26.16±0.13
1:2	2.5	50	183.49	29.52±0.14	30.28±0.32	31.14±0.21	31.76±0.22	29.74±0.28
1:4	1.25	25	91.743	32.64±0.22	33.17±0.26	34.24±0.34	32.12±0.32	32.58±0.12
1:16	0.625	6.25	22.936	38.42±0.36	38.80±0.27	38.85±0.51	37.87±0.41	38.64±0.11
1:256	0.004	0.39	1.433	-	-	-	-	-
PCR efficiency (%)				119.43	120.62	134.62	166.40	111.19
Slope				-2.93	-2.91	-2.70	-2.35	-3.10
R^2				0.99	0.99	0.99	0.99	0.9984
Intercept				26.69	27.23	28.47	29.61	26.38

3.4.5 การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

การทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของวิธีนั้นบ่งบอกถึงความสามารถของวิธีการตรวจจำแนก ยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV และ *Pat* ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม โดยค่าความเที่ยงตรงและค่าความแม่นยำของวิธีสามารถตรวจสอบโดยจากค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) และค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Standard Deviation: SD) ของการหาปริมาณยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV และ *Pat* จากการทำตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ผสมกัน 14 สายพันธุ์ ทั้ง 4 รอบ ผลการทดลองพบว่า การหายีนทั้ง 5 มีค่า RSD อยู่ระหว่าง 0.72 ถึง 0.87 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า SD ของการหา ยีนอยู่ระหว่าง 0.24 ถึง 0.29 (**Table 7**) โดยค่าความเที่ยงตรงและความแม่นยำของทั้งห้ายีนมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR (Broeders *et al*., 2014) คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD ต้องไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Del Gaudio *et al*. (2012) ที่ได้รายงานว่าการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพต้องมีความเที่ยงในการตรวจสอบไม่ควรเกิน 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการตรวจจำแนกยีน35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV และ *Pat* ด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพคงที่ นอกจากนี้อาจกล่าวได้ว่า อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ รวมถึงวิธีการที่เกี่ยวข้องเช่น การเตรียมตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอมีความสม่ำเสมอสามารถทำให้ผลการตรวจจำแนกยีนที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ (Debode *et al*., 2013)

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.4-6 The repeatability and reproducibility of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi-1*, FMV and *Pat* gene that were detected by using multiplex real-time PCR in 0.1% contaminated GM Maize

Sample	Replicate	Ct average				
		35SCaMV promoter	Nos terminator	*FMV*	*Pat*	*Ubi-1*
14 GM Maize 0.1% GM contaminated	1	32.64	33.17	34.24	33.12	32.58
	2	32.31	33.54	34.48	32.81	33.17
	3	32.43	32.97	33.98	32.76	32.76
	4	31.97	33.57	34.63	32.32	32.43
	Mean	32.33	33.31	34.33	32.75	32.73
	Min	31.97	32.97	33.98	32.32	32.43
	Max	32.64	33.57	34.63	33.12	33.17
	SD	0.24	0.25	0.25	0.29	0.277
	RSDr (%)	0.75	0.76	0.72	0.87	0.85

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมตามข้อมูลของ ISAAA database พบว่ามี 7 สายพันธุ์ แต่เนื่องจากวัสดุอ้างอิงทดสอบที่สามารถจัดหาได้ มีเพียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พลาสมิดดีเอ็นเอ pGSE220 (LL601) (Eurofins) พลาสมิดดีเอ็นเอ pGSE28 (Bt63 Rice) (Eurofins) และ จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ LL62 (Eurofins) โดยทั้ง 3 สายพันธุ์มียีน *Bar* เป็นองค์ประกอบ แต่เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอเป็นการตัดยีนบางส่วนมาโคลนในพลาสมิด ทำให้ไม่พบยีน *Bar* ในพลาสมิดดีเอ็นเอ pGSE220 (LL601) (Eurofins) พลาสมิดดีเอ็นเอ pGSE28 (Bt63 Rice) (Eurofins) แต่พบในจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ LL62 การทดลองนี้แบ่งชุดยีนทดสอบออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ประกอบด้วยยีน *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator และ *PLD* สำหรับใช้ตรวจคัดกรองข้าวดัดแปลงพันธุกรรม และชุดที่ 2 ประกอบด้วยยีน *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* สามารถใช้คัดแยกสายพันธุ์ข้าวได้ 3 สายพันธุ์ จากผลการทดสอบพบว่า ชุดไพรเมอร์โพรบของทั้ง 2 ชุดยีนมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย ร้อยละ 100 ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่มีความสมบูรณ์อยู่ในเกณฑ์ที่รับได้ที่ร้อยละ 80 ถึง 120 วิธีการทดสอบมีความเที่ยง ความแม่น และความสามารถในการทวนซ้ำ มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของแต่ละยีนน้อยกว่า 25 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ สำหรับยีนชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ที่ 10 copies คิดเป็นร้อยละการปะปนที่ร้อยละ 0.1 เมื่อนำวิธีการทดสอบมาขยายผลกับตัวอย่างข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าวในห้องปฏิบัติการจำนวน 50 ตัวอย่างไม่พบว่ามีการปะปนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 50 ตัวอย่าง วิธีการ Multiplex Real-time PCR เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจคัดกรองข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมโดยชุดยีนที่ 1 ของยีน *CaMV35S* Promoter, *NOS* terminator และ *PLD* มีประสิทธิภาพในการตรวจคัดกรองข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยหากตรวจพบยีน *CaMV35S* Promoter หรือ *NOS* terminator หรือ ตรวจพบทั้ง 2 ยีนจะเป็นการคัดกรองเบื้องต้นถึงการมีข้าวดัดแปลงพันธุกรรมปะปนในตัวอย่างนั้น ทั้งนี้หากต้องการจำแนกการปะปนนั้นว่าเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ใดชุดยีนที่ 2 ที่ประกอบด้วย *CryIAb/Ac*, event specific *LL62*, event specific *LL601* และ *Bar* จะสามารถจำแนกข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ LL601 LL62 และ Bt63 ซึ่งการใช้วิธีการ Multiplex Real-time PCR จะช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์เมื่อเทียบกับ Simplex Real-time PCR ที่ตรวจครั้งละ 1 ยีน และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากการดูดจ่ายสารละลายหลายครั้ง โดยในแต่ละชุดยีนมี ยีนที่ใช้ควบคุมความถูกต้องของผลการทดสอบ ในชุดที่ 1 เป็น จำเพาะข้าว *PLD* (Phospholipase D) และชุดที่ 2 เป็น *Bar* (Bialaphos resistance) ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นการยืนยันผลการทดสอบและคบบคุมภายในปฏิกิริยา

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 พัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม

ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมตามข้อมูลของ ISAAA database พบว่ามีเพียง MONM71800 เพียงสายพันธุ์เดียว แต่เมื่อสืบค้นข้อมูลแล้วพบว่า EU-JRC ได้ออกรายงานการวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม MON71200 ในปี 2018 นอกจากนั้นยังพบการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นในตัวอย่างข้าวสาลีที่เกิดขึ้นจากการขนส่ง ทำให้การตรวจคัดกรองและจำแนก ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมมียีนเป้าหมายที่ต้องตรวจหลายยีน วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย Tetraplex Real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจได้ 4 ยีนใน 1 ปฏิกิริยา จึงช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ลง โดยแบ่งชุดยีนออกเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดที่ 1 ประกอบด้วย *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* และ *ACC-1* และชุดที่ 2 ประกอบด้วย *HMG*, *Lectin*, *CruA* และ *MON71200* ทั้งนี้วัสดุอ้างอิงทดสอบของข้าวสาลี MON71800 ไม่มีการจำหน่ายทางการค้าทำให้ต้องสังเคราะห์พลาสมิด pUC57-MON71800 ใช้ทดแทน จากผลการทดสอบพบว่า ชุดไพรเมอร์โพรบของทั้ง 2 ชุดยีนมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายร้อยละ 100 ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่มีความสมบูรณ์อยู่ในเกณฑ์ที่รับได้ที่ร้อยละ 80 ถึง 120 วิธีการทดสอบมีความเที่ยง ความแม่น และความสามารถในการทวนซ้ำ มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของแต่ละยีนน้อยกว่า 25 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ สำหรับยีนชุดที่ 1 ที่ 1 พิโครกรัม pUC57-MON71800 และชุดที่ 2 ที่ร้อยละ 0.1 เมื่อนำวิธีการทดสอบมาขยายผลกับตัวอย่างข้าวสาลีในห้องปฏิบัติการจำนวน 30 ตัวอย่าง ตรวจพบการปะปนของคาโนลาดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 7 ตัวอย่าง วิธีการ Tetraplex Real-time PCR เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจคัดกรองข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมโดยในชุดยีนที่ 1 สามารถคัดกรองได้ว่าเป็นข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ หากใช่เป็นข้าวสาลีสายพันธุ์MON71800 หรือไม่ โดยหากตรวจพบยีน ครบทั้ง 4 ยีนเป้าหมาย *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *MON71800* และ *ACC-1* จะสามารถบ่งชี้ได้ โดยหากตรวจพบเพียง *CaMV35S* promoter หรือ *NOS* terminator หรือทั้ง 2 ยีนนี้แต่ไม่พบยีน *MON71800* จะต้องทำการทดสอบในชุดที่ 2 ที่จะสามารถบ่งชี้ถึงการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่นได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง และคาโนลา นอกจากนั้นยังสามารถจำแนกข้าวสาลีสายพันธุ์MON71200 ได้อีกด้วย

การทดลองที่ 3 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม events A2704-12 Mon87701 Mon87705 Mon87769 Mon89788 และ GTS 40-3-2

การตรวจยีนคัดกรองและยีนจำเพาะด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR สามารถจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่อนุญาตให้นำเข้า 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Mon87701, A2704-12, GTS 40-3-2, Mon87705, Mon87769 และ Mon89788 โดยใช้ไพรเมอร์-โพรบ 2 ชุด คือ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* 2) *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* ซึ่งชุดไพรเมอร์และโพรบมีความเข้มข้นเหมาะสมที่ระดับ 1X ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ต่ำสุดของวิธีเท่ากับ 0.1% และมีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในช่วง 100 – 150 ng/reaction จากการขยายผลตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการบริโภคจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบการปะปนของยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้เพิ่มจากเดิมถึง 65% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจเพียงยีน *CaMV35S* promoter และ *Nos* terminator ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปไม่เพียงพอสำหรับตรวจสอบการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้อย่าง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

มีประสิทธิภาพ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และสามารถตรวจสอบได้ครอบคลุมเพื่อรองรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่จะอนุญาตให้มีการนำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้เทคนิคตรวจจำแนกยีนสี่ชนิดในปฏิกิริยาเดียวยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์

การทดลองที่ 4 พัฒนาวิธี Multiplex real-time PCR ในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 events (Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9)

การตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ Bt11 GA21 TC1507 DAS59122-7 T25 MIR604 Mon810 Mon88017 Mon 89034 NK603 MIR162 Mon87460 Mon87427 และ DAS40278-9 ด้วยวิธี Matrix Approach Multiplex Real-time PCR โดยการตรวจจำแนกยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, *Ubi*-1, FMV และ *Pat* ในปฏิกิริยาเดียวกัน มีประสิทธิภาพสามารถใช้ในตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ออก โดยโพรบและไพรเมอร์มีความจำเพาะ และเหมาะสมต่อการจำแนกยีน อีกทั้งค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดสอบวิธี Multiplex Real-time PCR อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ และเมื่อทดสอบใช้ในการจำแนกยีนพบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถจำแนกยีนได้ถูกต้องโดยไม่มี False positive/negative (Alary *et al*., 2003)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และสามารถตรวจสอบได้ครอบคลุมเพื่อรองรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่จะอนุญาตให้มีการนำเข้าข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้เทคนิคตรวจจำแนกยีนรวมในปฏิกิริยาเดียวจะประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าการตรวจแยกปฏิกิริยากันถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร

4.2 ผลการวิจัยของโครงการ (Output)

สามารถพัฒนาเทคนิค Multiplex real-time PCR ที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลาและงบประมาณในการตรวจคัดกรองและจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และข้าวโพด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ ดังนี้

4.2.1 การตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ, สุธานันทน์ นาคประนม, พงศกร สรรค์วิทยากุล, ศิริพร เสนดำ, ปิยนุช ศรชัย, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. (2565). การตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วย Tetraplex Real-time PCR เพื่อรับรองการนำเข้าสินค้าเกษตร. วารสารแก่นเกษตร (บทความเลขที่ 160-64)

4.2.2 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Pitaksaringkarn, W., Assawamongkholsiri, T., Sornchai, P., & Thammakijjawat, P. (2021). Development of the In-House Genetically Modified Wheat MON71800 Reference Plasmid for Qualitative Detection by Tetraplex Real-Time PCR. Proceeding in RSU International Research Conference, April 30, 2021. Pathum Thani, Thailand.

4.2.3 การประชุมวิชาการระดับชาติ

ปิยนุช ศรชัย, ณัฐชานันท์ ควรประเสริฐ, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. (2564). การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการตรวจจำแนกยีนในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 18 ธันวาคม 2564.

4.3 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcome and Impact)

ด้านนโยบาย นำไปขยายผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และควบคุมกำกับดูแลการนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตร

ด้านสังคม สร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค

ด้านเศรษฐกิจ ส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร โดยมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ที่สร้างความเชื่อมั่นในการนำเข้า – ส่งออกสินค้า

ด้านวิชาการ มีเอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ห้องปฏิบัติการได้วิธีทดสอบ ขั้นตอนการดำเนินงานทดสอบที่ได้มาตรฐาน สามารถขยายผลให้ห้องปฏิบัติการภาครัฐ และเอกชน นำวิธีทดสอบไปประยุกต์ใช้เพื่อรองรับการตรวจวิเคราะห์ควบคุมกำกับดูแลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

เกศสุนี ชมชื่น, ดวงจันทร์ บุตราศรี, และมลิวรรณ นาคขุนทด. 2553. การตรวจสอบจีเอ็มโอในผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลืองและข้าวโพดในจังหวัดพิษณุโลก. NU Science Journal. 7: 38 – 49.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ภิยุรดา ดนัยศิริพงษ์ อรรคพล ภูมีศรี พงศกร สรรค์วิทยากุล และศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2558. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม. รายงานโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร. กรมวิชาการเกษตร

คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ. 2560. สถานภาพการพิจารณาผลการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอาหารที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่. ใน: รายงานการประชุมคณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ครั้งที่ 1/2560. 9 มีนาคม 2560. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.

ปิยนุช ศรชัย, ณัฐวดี บุญทองดี, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ, ปริญดา สองเมืองสุข, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2563. การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรอง *CaMV35S* promoter *Nos* terminator ยีน *Npt*II ร่วมกับยีนอ้างอิงมะละกอในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR. น. 85 – 96. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 17 เรื่องเกษตรกำแพงแสน ตามรอยพ่อ สานต่อศาสตร์แผ่นดิน 2-3 ธันวาคม 2563. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ปิยนุช ศรชัย, ธีระ ชูแก้ว, ณัฐวดี บุญทองดี, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2562. การตรวจสอบความใช้ได้ของการตรวจจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR. วารสารวิชาการเกษตร. 3: 224 – 237.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ปิยนุช ศรชัย, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และพงศกร สรรค์วิทยากุล. 2561a. การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-Time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025. วารสารวิชาการเกษตร. 36: 316-331.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ปิยนุช ศรชัย, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร, พงศกร สรรค์วิทยากุล, บาญเย็น ชาระวงศ์, สุธานันทน์ นาคประนม, และคณะ. 2561b. การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพื่อการบริการอย่างมีประสิทธิภาพ. น. 196 – 210. ใน: ผลงานดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2561, 27 พฤษภาคม 2562. รามาการ์เด้นท์, กรุงเทพมหานคร.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). 2559. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง ทิศทางพืชเศรษฐกิจไทยในอาเซียน. พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ.

อโณทัย โภคาธิกรณ์. 2549. Basic Real-time PCR. ใน: การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications. 16-17 พฤศจิกายน 2549. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Abouseadaa, H. H., Osman, G. H., Ramadan, A. M., Hassanein, S. E., Abdelsattar, M. T., Morsy, Y. B., Alameldin, H. F., El-Ghareeb, D. K., Nour-Eldin, H. A., Salem, R., Gad, A. A., Elkhodary,

S. E., Shehata, M. M., Mahfouz, H. M., Eissa, H. F. & Bahieldin, A. (2015). Development of transgenic wheat (Triticum aestivum L.) expressing avidin gene conferring resistance to stored product insects. BMC plant biology, 15(1), 1-8.

Alary, R., Serin, A., Maury, D. Jouira, H. B., Sirven J. P., Gautier, M. F., and Joudrier, P. 2003. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. *Food control* 13: 235-244.

Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., Bockus, W. W. & Muthukrishnan, S. (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against Fusarium graminearum. Journal of Experimental Botany, 54(384),1101-1111.

Anonymous (2011). ISO 16140 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Protocol for the Validation of Alternative Methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Anonymous. 2011. ISO 16140 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Protocol for the Validation of Alternative Methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Babekova, R., Funk, T., Pecoraro, S., Engel, K-H., Busch, U. 2008. Development of an event-specific Real-time PCR detection method for the transgenic Bt rice line KMD1. Eur Food Res Technol DOI 10.107/s00217-008-0981-0

Bahrdt, C., A.B. Krech, A. Wurz, and D. Wulff. 2010. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. Anal Bioanal Chem. 396: 2103 – 2112.

Bak, A., and J.B. Emerson. 2019. Multiplex quantitative PCR for single-reaction genetically modified (GM) plant detection and identification of false-positive GM plants linked to *Cauliflower mosaic virus* (*CaMV*) infection. BMC Biotechnology. 73: 1-12.

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

Bulcke M V D, Lievens A, Barbaupiednoir E, Mbongolombella G, Roosens N, Sneyers M, Casi A L. 2010. A theoretical introduction to “combinatory SYBR®Green qPCR screening”,a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 396, 2113–2123. doi: 10.1007/ s00216-009-3286-7

Bustin, SA., V. Benes, JA. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, MW. Pfaffl, GL. Shipley, J. Vandesompele, and CT. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum

information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry. 55: 611–622.

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel J., and Gruden. K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quntification of GMO. *BMC Biotechnol* 14: 6-37.

Cardarelli, P., M.R. Branquinho, T.B.F. Renata, P.C. Fernanda, and L.G. Andre. 2005. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. Food Control. 16: 859-866.

Charles Delobel, C., A. Bogni, G. Pinski, M. Mazzara, and G. Van den Eede. 2013. Event-specific method for the quantification of soybean line MON89788 using Real-time PCR v 1.01 - Validation report and validated method. EUR 26153 EN. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

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

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

Debode, F., I. Huber, R. Macarthur, PE. Rischitor, M. Mazzara, V. Herau, D. Sebah, D. Dobnik, S. Broeders, NH. Roosens, U. Busch, G. Berben, D. Morisset, and J. Zel. 2016. Inter-laboratory studies for the validation of two singleplex (*tE9* and pea *lectin*) and one duplex (*pat/bar*) real-time PCR methods for GMO detection. Food Control. 73: 452-461.

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

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

Eugster, A., P. Murmann, A. Kaenzig, and A. Breitenmoser. 2014. Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV Tetraplex Real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. Food Analysis. 68: 701 – 704.

EU-RL GMFF: MON71800 event-specific method verification report 2 JRC Publication JRC 84421

European Network of GMO Laboratories (ENGL). 2015. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. European Commission Joint Research Centre, Ispra (VA), Italy.

European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed; Report on the Verification of the Performance of a Simplex Endpoint Event-specific Method for the Detection of Event MON71800 in Wheat Using Real-time PCR; JRC103356

Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. 2014. Real-Time PCR. Current protocols essential laboratory techniques. Available: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470089941.et1003s08. Accessed Sep. 2, 2021.

Fraiture, M.A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., and Roosens, N.H. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. *BioMed Research International* https://doi.org/10.1155/2015/392872.

Grohmann, L., R. Reiting, D. Maede, S. Uhlig, K. Simon, K. Frost, G. Jit Randhawa, and K. Zur. 2015. Collaborative trial validation of *cry1Ab/Ac* and *Pubi-cry* TagMan-based real-time PCR assays for detection of DNA derived from genetically modified Bt plant products. Accreditation and Quality Assurance. 20: 85-96.

Grohmann, Lutz., A. Belter, B. Speck, O. Goerlich, P. Guertler, A. Angers-Loustau, and A. Patak. 2017. Screening for six genetically modified soybean lines by an event-specific multiplex PCR method: Collaborative trial validation of a novel approach for GMO detection. J Consum Prot Food Saf. Available: https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-016-1056-y. Accessed Aug. 6, 2021.

Hougs, L., F. Gatto, O. Goerlich, L. Grohmann, K. Lieske, M. Mazzara, F. Narendja, J. Ovesná, N. Papazova, I. Scholtens, and J. Žel. 2017. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods (Version 2). EUR 29015 EN. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F. & Fry, J. (2003). Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (Triticum aestivum L.) using glyphosate selection. Plant Cell Reports, 21(10), 1010-1019.

Huang, H.Y., and T.M. Pan. 2004. Detection of genetically modified Maize Mon810 and NK603 by Multiplex and Real-Time polymerase chain reaction methods. **J. Agric. Food Chem.** 52: 3264 – 3268.

Huber, I., Block, A., Sebah, D., Debode, F., Morisset, D., Grohmann, L., Berben, G., Štebih, D., Milavec, M., Žel, J., and Busch, U. 2013. Development and validation of duplex, triplex and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 10293-1301.

In-house verification of a qualitative, event-specific, qPCR-based method for detection and identification of GM wheat MON71200", 2018. **http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/emerg-unauth.html**

ISAAA. 2022. *ISAAA's GM Approval Database*. http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/.

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

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

Kim, J. H., Park, S. B., Roh, H. J., Park, S., Shin, M. K., Im Moon, G., ... & Kim, H. Y. (2015). A simplified and accurate detection of the genetically modified wheat MON71800 with one calibrator plasmid. Food chemistry, 176, 1-6.

Koppel, R., F. Velsen, N. Felderer, and T. Bucher. 2012. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from four transgenic soy Mon89788, A5547-127, Roundup Ready, A2704-12 and lectin. Eur Food Res Technol. Available: https://www.researchgate.net/publication/257372901. Accessed Aug. 6, 2021.

Kramkowska, M., Grzelak, T., and Czyzewska, K. 2013. Benefits and risks associated with genetically modified food products. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 20(3): 413-419.

Lab Life-Real-Time PCR. 2015. *Compare and contrast: multiplex vs. singleplex PCR.* Roche Life Science.Posted onSeptember19,2015.https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html

Leckband, G., & Lörz, H. (1998). Transformation and expression of a stilbene synthase gene of Vitis vinifera L. in barley and wheat for increased fungal resistance. Theoretical and Applied Genetics, 96(8), 1004-1012.

Life technologies. 2012. Real-time PCR handbook. Available: https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf. Accessed Sep. 2, 2021.

Lu, J., G.Z. Ji, G. Li, Y.F. Wu, J. Yang, S.L. Lin, D.L. Yang, J.N. Zhao, and W.M. Xiu. 2016. Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice. Cereal Res. Commun. 44: 47 – 56.

Lucena-Aguilar, G., M.S-L. Ana, B-A. Cristina, A.C. Jose´, A.L-G. Jose´and A-Q. Rocio. 2016. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. Biopreservation and Biobanking. 14: 264-270.

Made D., Degner C. and Grohmann L. 2006. Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice. Eur Food Res Technol 224: 271-278

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

Pauli, U., M. Liniger, and M. Schrott. 2001. Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: method evaluation in a swiss ring trial. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. 92: 145-158.

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

Pitaksaringkarn, W., T. Assawamongkholsiri, P. Sornchai, and P. Thammakijjawat. 2021. Development of the In-House genetically modified wheat Mon71800 reference plasmid for qualitative detection by Tetraplex Real-Time PCR. pp. 512 - 519. In Proceedings of RSU International Research Conference 30 April 2021. Pathum Thani, Thailand.

Randhawa, G., Singh, M., & Sood, P. (2016). DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain. Current science, 1000-1009.

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

Royal Botanic Garden. 2012. Kew. Plant DNA c-values database. Available: http://data.kew.org/cvalues/. Accessed Aug. 11, 2020.

Sajib A. A., Bhuiya M. A. I. and Huque R. 2017. A Simple, Efficient and Rapid Method for Good Quality DNA Extraction from Rice Grains. Rice science 24: 119-122

Savini, C., M. Mazzara, C. Charles Delobel, G. Pinski, and G. Van den Eede. 2012. Event-specific method for the quantification of soybean MON87705 using Real-time PCR. Validation report and validated method. EUR 25499 EN. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Shin, S., Mackintosh, C. A., Lewis, J., Heinen, S. J., Radmer, L., Dill-Macky, R., ... & Muehlbauer, G. J. (2008). Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against Fusarium graminearum. Journal of experimental botany, 59(9), 2371-2378.

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

Sigma-Aldrich. 2014. Primers and fluorescent probes for quantitative Real-time PCR and other applications. World Headquarters St. Louis, Missouri, US. Waiblinger, H.U., B. Ernst, A. Anderson, and K. Pietsch. 2008. Validation and collaborative study of a *P35S* and *T nos*

duplex Real-time PCR screening method to detect genetically modified organism in food product. European Food Research and Technology. 226: 1221-1228.

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

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

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

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

Wu, G., Wu, Y., Nie, S., Zhang, L. Xiao, L., Cao, Y. and Lu, C. 2010. Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1. Food Chemistry 199: 417-422.

Xia, L., Ma, Y., He, Y., & Jones, H. D. (2012). GM wheat development in China: current status and challenges to commercialization. Journal of experimental botany, 63(5), 1785-1790.

กรมวิชาการเกษตร