รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

Development of GMO Detection Technique for Approvement of Agricultural Product

นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
Khanitha Wongwathanarat

2558

รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

Development of GMO Detection Technique for Approvement of Agricultural Product

นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
Khanitha Wongwathanarat

2558

สารบัญ หน้า

กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
บทนำ	5
บทคัดย่อ	7
1. การทดลองที่ 1 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ การตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม	8
2. การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63	20
3. การทดลองที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready	31
4. การทดลองที่ 4 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม	39
5. การทดลองที่ 5 การผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีน Cry9C (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม	46
6. การทดลองที่ 6 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ การตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423	54
7. การทดลองที่ 7 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162	64
8. การทดลองที่ 8 การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ มะละกอดัดแปรพันธุกรรม	74
9. การทดลองที่ 9 การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์	96
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	111
บรรณานุกรม	114

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของผู้มีพระคุณที่ได้ให้ความช่วยเหลืออย่างมากมาย ขอกราบขอบพระคุณคณะผู้บริหารของกรมวิชาการเกษตรที่ให้งบประมาณสนับสนุนโครงการและคณะผู้เชี่ยวชาญของกรมวิชาการเกษตรที่คอยให้คำแนะนำชี้แนะ ติดตามและประเมินผลตลอดเวลา ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้ผลงานวิจัยดำเนินได้อย่างมีคุณภาพ

ขอขอบพระคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและทำงานวิจัยอย่างมุ่งมั่น และดำเนินงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ สนับสนุนให้งานวิจัยสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้ และนำไปใช้ประโยชน์ได้

สุดท้ายขอขอบพระคุณกองแผนงานและวิชาการ ที่คอยประสานงานด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้วิจัย

การทดลองที่ 1 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปร พันธุกรรม

หัวหน้าการทดลองที่ 1	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63

หัวหน้าการทดลองที่ 2	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready

หัวหน้าการทดลองที่ 3	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 4 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

หัวหน้าการทดลองที่ 4	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 5 การผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีน Cry9C (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม)

หัวหน้าการทดลองที่ 5	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 6 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423

หัวหน้าการทดลองที่ 6	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 7 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162

หัวหน้าการทดลองที่ 7	นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายอรรคพล ภูมีศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทดลองที่ 8 การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

หัวหน้าการทดลองที่ 8	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 9 การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์

หัวหน้าการทดลองที่ 9	นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

พืชดัดแปรพันธุกรรมเริ่มปลูกเชิงการค้าตั้งตั้งปี 2539 ในประเทศสหรัฐอเมริกา และในปี 2553 สถานการณ์การปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงการค้าทั่วโลก พบว่ามี 29 ประเทศที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม ประเทศ คิดเป็นพื้นที่ปลูก 1 พันล้านเฮกแตร์ โดยประเทศสหรัฐอเมริกามีพื้นที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมากที่สุด 62.5 ล้านเฮกแตร์ ซึ่งพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกเป็นการค้าได้แก่ ถั่วเหลือง, ข้าวโพด, ฝ้าย, เรปซีด, squash, มะละกอ, alfalfa และ sugar beet พื้นที่ปลูกรองลงมาคือประเทศอาร์เจนตินา 21 ล้านเฮกแตร์ พืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด และ ฝ้าย ประเทศบราซิล 15.8 ล้านเฮกแตร์ ได้แก่ ถั่วเหลือง, ข้าวโพด และ ฝ้าย ประเทศแคนาดา 7.6 ล้านเฮกแตร์ ได้แก่ ถั่วเหลือง, ข้าวโพด, เรปซีด และ sugar beet ประเทศอินเดีย 7.6 ล้านเฮกแตร์ ได้แก่ ฝ้าย และประเทศจีน 3.8 ล้านเฮกแตร์ ได้แก่ ฝ้าย, มะละกอ, มะเขือเทศ, พริกหวาน, พิทูเนีย และ poplar เป็นต้น พืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุดคือ ถั่วเหลือง โดยมีพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม 65.8 ล้านเฮกแตร์ คิดเป็นร้อยละ 72 ของพื้นที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกมากที่สุดคือ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชสายพันธุ์ GST 40-3-2 หรือที่เรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready ซึ่งเป็นของบริษัทมอนซานโต้ และพัฒนามาเพื่อต้านทานสารกำจัดวัชพืช glyphosate โดยตัดต่อยีน CP4EPSPS และ CTP มี promoter คือ 35S CaMV และ terminator

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับการรับรองให้ปลูกเป็นการค้าและปลอดภัยในการนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ได้ในบางประเทศ ในช่วง ปี 2539 – 2547 ที่ผ่านมา พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเพิ่มขึ้นมากกว่า 47 เท่า โดยเฉพาะปี 2547 ทั่วโลกมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดถึง 140 ล้านเฮกแตร์ ในจำนวนพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดทั้งหมดนี้คิดเป็นพื้นที่เพาะปลูกเฉพาะข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมถึงร้อยละ 14

และเนื่องจากมีการระบาดของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก ทำให้มะละกอให้ผลผลิตลดลงจนกระทั่งไม่ให้ผลผลิตเลย โรคดังกล่าวแพร่ระบาดในทุกระยะของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งระยะให้ผลผลิต และการแพร่กระจายของโรคโดยแมลงพาหะ คือ เพลี้ยอ่อน ใช้ระยะเวลารวดเร็วมากเพียง 10-30 วินาที ทำให้การใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค (วิชัย และคณะ, 2542) จึงได้มีการพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วยการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยการตัดต่อยีนของไวรัสเข้าไปในพืช เพื่อให้พืชมีความต้านทานต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ หรือไวรัสสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ เรียกความต้านทานลักษณะนี้ว่า pathogen-derived resistance (PDR) หากมีการใช้ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (CP) จะเรียกความต้านทานที่เกิดขึ้นว่า coat protein-mediated resistance (CP-MR) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการชะลอหรือยับยั้งการพัฒนาของโรคได้ (Beachy, 1990) โดยมีหลายประเทศได้พัฒนามะละกอดัดแปรพันธุกรรมขึ้น

ปัจจุบันประเทศไทยต้องเปิดการค้าเสรี ทำให้สินค้าเกษตรจากประเทศอื่นๆ เข้ามาในประเทศได้ง่าย สินค้าเกษตรของไทยอาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมเหล่านั้น ที่จะส่งผลต่อการส่งออกสินค้าทางการเกษตรของไทย และความวิตกกังวลต่อความปลอดภัยของพืชดัดแปรพันธุกรรมในสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ในหลายประเทศจึงมีกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสินค้าและผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และได้มาตรฐานสากล ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางด้าน molecular biomarkers analysis ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจทางด้านดีเอ็นเอและโปรตีน จะทำให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศไทยในด้านการค้า ซึ่งมีผลต่อการนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์ของประเทศ หากไม่พัฒนาอาจทำให้ประเทศเกิดความเสียหายหรือถูกกีดกันทางการค้าโลกได้ เพราะ molecular biomarker analysis นับวันยิ่งมีบทบาทความสำคัญเพิ่มมากในภาคอุตสาหกรรมอาหารและเกษตร ถูกนำไปเพื่อใช้ในการพิสูจน์ผลิตภัณฑ์ และการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม วิธีที่นิยมและเป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คือ Real-time PCR ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทาง molecular biomarker analysis โดยนำเอาเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลอง โดยตรวจผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR นอกจากนี้การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนอย่างรวดเร็ว แบบง่ายๆ ที่อาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยา และการไหลของสารในการทำปฏิกิริยา (lateral flow technique) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนหรือเรียกอีกอย่างว่า Lateral Flow Test (LFT) เพื่อเป็นการตรวจติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปรพันธุกรรม และสำหรับให้เจ้าหน้าที่ซึ่งไม่มีความชำนาญการสามารถตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมได้เอง และรวดเร็วเพื่อป้องกันการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมแพร่กระจายในประเทศไทย หรือการพัฒนาชุดตรวจสอบ (ELISA kit) ในเชิงพาณิชย์ จะสามารถทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่ระบาดของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

จากปัญหาและความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่กรมวิชาการเกษตร ต้องมีงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจสอบพืชที่อาจมีการนำเข้า ส่งออก และตรวจติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อควบคุมพันธุ์พืชที่มีการตัดต่อยีนให้ได้อย่างทันท่วงทีและมีประสิทธิภาพ และเพื่อให้เข้ากับภาวะการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของโลกในปัจจุบัน โดยมีโครงการวิจัยดังต่อไปนี้ 1. พัฒนาวิธีการตรวจรับรองสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม และทดสอบความใช้ได้ของวิธีให้ได้ตามมาตรฐานสากล และรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นมาตรฐานของ ISO/IEC17025 เพื่อให้ประเทศคู่ค้าเกิดความมั่นใจในการออกใบรับรอง 2. พัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนของข้าว Bt63, ข้าวโพด Roundup Ready, ข้าวโพดต้านทานแมลง และข้าวโพด StarLink ซึ่งเป็นการตรวจอย่างรวดเร็วเพื่อให้เจ้าหน้าที่ด่านกักพืชสามารถตรวจสอบเบื้องต้น และสามารถใช้ชุดตรวจสอบ เพื่อเฝ้าระวัง หรือติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปลงพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็ว 3. สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบพลาสมิด ใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR ที่ได้มาตรฐาน และถูกต้องแม่นยำ 4. พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPEPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช ในภาคสนามอย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ สามารถตรวจ

วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง ลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อเฝ้าระวัง หรือติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปรพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็ว เป็นต้น

บทคัดย่อ

ปัจจุบันประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับต่างประเทศและหลายประเทศมีกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อลดความเสี่ยงการปนเปื้อนพืช GMOs ในสินค้าเกษตรเพื่อการนำเข้าและส่งออก จึงเกิดโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตรขึ้น โดยได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยถั่วเหลือง GTS 40-3-2 1 สายพันธุ์ ข้าวโพด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ Mon 810, Bt176, Bt11, Mon863, NK603, GA21, TC1507, CBH351 และ T25 (LOD, LOQ : 0.05%-0.5%) การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788, 356043 และ 305423 (LOQ : 0.1%, 0.5%, 0.5% และ LOD *: 0.05%, 0.5%, 0.1%)* และการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 (LOD : 0.1%) ด้วยวิธี Real-time PCR เชิงคุณภาพและปริมาณ พบว่าทุกวิธีมีค่าความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ทั้งมีการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีนข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63, โปรตีน CP4EPSPS ในข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready, โปรตีน CryIAb ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม, และโปรตีน Cry9C ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม โดยสังเคราะห์ยีน *EPSPS*, *NK603*, *Cry1Ab* และ *CRY9C* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองที่จำเพาะกับโปรตีนในข้าวและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม เตรียม Gold-conjugated IgG พ่นที่ conjugated release pad ใช้ goat anti-rabbit (GAR) ทำ control line และใช้ IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผลิตขึ้นเองทำ test line พบว่าชุดตรวจสอบทั้ง 4 มีความไวที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุด ที่ 0.0625 µg/ml, 0.3 µg/ml, 0.03 µg/ml และ 0.01 µg/ml ตามลำดับ และตรวจสอบได้ภายในเวลา 5-20 นาที ทั้งยังได้ผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ โดยผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน EPSPS ในเซลล์ *E. coli* ทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS ด้วย Ni-NTA เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง และทดสอบทำแห้งโปรตีนแบบเยือกแข็ง แล้วทดสอบความใช้ได้ของแอนติบอดีต่อโปรตีนด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองสด โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน EPSPS ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สอดคล้องกับชุดตรวจสอบทางการค้า (Agdia ELISA kit) รวมทั้งมีการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยสร้างชุดยีนสามชุดที่ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos* และยีน *papain* ที่เหมือนกัน แต่ต่างกันในส่วนของยีน *cp* ที่คัดแยกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้ คือ สายพันธุ์กรมวิชาการเกษตร (*cp*-DOA) สายพันธุ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (*cp*_SC) และสายพันธุ์ฮาวาย หรือ line 55-1 (*cp*_Hawaii) พันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR โดยค่า LOD ของดีเอ็นเอมาตรฐานทั้ง 3 ชุด อยู่ระหว่าง 25-250 ชุด (copies) จะเห็นได้ว่าทุกเทคนิคที่พัฒนาขึ้นได้มาตรฐานในการตรวจสอบพืช GMOs ทั้งสำหรับห้องปฏิบัติการและภาคสนาม

การทดลองที่ 1 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ อรรคพล ภูมีศรี ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Chananton Danaisilichaichon Khanitha Wongwathanarat   Arkkapon Phoomeesri
Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยถั่วเหลือง GTS 40-3-2 1 สายพันธุ์ ข้าวโพด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ Mon 810, Bt176, Bt11, Mon863, NK603, GA21, TC1507, CBH351 และ T25 โดยทำการทดสอบกับชุดไพร์เมอร์ และโพรบที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับ Gene-specific และ Event-specific ด้วยการติดฉลากที่ปลาย 5’ ด้วย FAM ซึ่งและ ปลาย 3’ ด้วย TAMRA โดยทดสอบกับเครื่อง LightCycler480 และพิจารณาความใช้ได้ของวิธีการจากการหาค่า R^2, Slop, และ PCR efficiency ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของการตรวจวิเคราะห์ระหว่างรอบของการทำ Real-time PCR ที่สามารถตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ กับค่าของจำนวน copy number ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากการทดสอบ จากผลการทดสอบพบว่าการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในตัวอย่างพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 ชนิดมีค่าของR^2 อยู่ที่ 1 ซึ่งตามเกณฑ์การยอมรับได้จะต้องมีค่าอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 0.98 รวมถึงมีค่า slop อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ เมื่อพิจารณาความถูกต้องแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์พบว่า การตรวจวิเคราะห์จะมีความถูกต้องแม่นยำที่สูง เมื่อทำการทดสอบที่ระดับการปนเปื้อนมากกว่า 1% แต่เมื่อทำการทดสอบที่ระดับต่ำกว่า 1% ค่าความถูกต้องแม่นยำจะน้อยลงแต่ยังคงสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาที่ค่าเบี่ยงเบนของการวัด พบว่าการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือน้อยกว่า 25 % และมีค่า LOD และ LOQ ของการตรวจวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 0.05-0.5 % จากผลการทดสอบนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ gene-specific และ event specific ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณได้

คำสำคัญ : Real-time PCR, gene-specific, event specific, LOD, LOQ

บทนำ

ปัจจุบันมีพืชดัดแปรพันธุกรรมจำนวนมากที่ได้รับการอนุมัติให้มีการค้าขายในตลาดทั่วโลก จากปี 1996 ถึง 2005 พบว่าการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ถึง 53 เท่า เมื่อพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ปลูกในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งมีรายงานในปี 1996-2011 ว่าพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1.7 เป็น 160 ล้านแฮกแตร์ โดยพืชที่ทำการเพาะปลูกได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง คาโนล่า มันฝรั่ง และ มะละกอ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมที่นิยมปลูกกันมากที่สุดในโลก โดยเฉพาะ ข้าวโพด รองลงมาคือ ถั่วเหลือง (Meris, 2014) ทั้งนี้ในปี 2005 มีการปลูกข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมคิดเป็น 24% ของการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมด ได้แก่ ข้าวโพดทนทานสารกำจัดวัชพืช (Herbicide tolerance) เช่น B16, T25, NK603 และ GA21 ข้าวโพดต้านทานแมลง เช่น Mon863, Mon802 และ Mon810 เป็นต้น รวมถึงข้าวโพดที่มีการรวมลักษณะมากกว่าหนึ่งลักษณะเข้าด้วยกันเช่น ข้าวโพด Bt176, Bt11, CBH351 และ TC1507 เป็นต้น ซึ่งเป็นข้าวโพดที่มีลักษะทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชและยังต้านทานต่อแมลงอีกด้วย ในปี 2004 และ 2005 มีพืชดัดแปรพันธุกรรมอีก 18 สายพันธุ์ที่ได้รับการอนุมัติให้ค้าขายในเมืองจีน ซึ่งในจำนวนนี้ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม 1 สายพันธุ์ได้แก่ GTS 40-3-2 และ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม อีก 8 สายพันธุ์ได้แก่ Bt11, Bt176, GA21, T25, NK603, Mon810, Mon863 และ TC1507 (Yang L. et al., 2007)ในปี 2014 The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) ได้รายงานว่าปัจจุบันมีพืชดัดแปรพันธุกรรมอยู่ 336 สายพันธุ์จากพืชทั้งหมด 27 ชนิด ที่ได้รับอนุญาตให้วางขาย ปลูก เพื่อเป็นอาหารและอาหารสัตว์ (http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/ (02/2014); (James, 2013)) จากการที่มีกฎระเบียบการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมในแต่ละประเทศ เช่น ยุโรป ให้มีการติดฉลากที่ 0.9% เกาหลี 3% ญี่ปุ่น 5% (Yang L. et al., 2007) ผลจากการค้าระหว่างประเทศ ทำให้การติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่ประเทศคู่ค้าต้องให้ความสนใจทำให้มีความพยายามในการค้นคว้าวิจัย วิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อตอบสนองต่อมาตรการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมซึ่งกำหนดขึ้นเพื่อการกีดกันทางการค้าในทางอ้อม (Milavec M. et al., 2014) ในปี 2004 EU ได้ออกแนวทางสำหรับการสุ่มตรวจและการตรวจวิเคราะห์ GMOs ฉบับ EU Recommendation 2004/787/EC ซึ่งระบุให้การรายงานการปนเปื้อนสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมจะต้องรายงานในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนโดยจะต้องเป็นเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน copy number ของ Event-specific กับ Taxon-specific โดยคำนวณจาก Haploid genomes (European Commission, 2004)

การตรวจทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR ถือว่ามีความน่าเชื่อถือ จากรายงานของ Milavec *et al*., 2014 สรุปไว้ว่าการตรวจวิเคราะห์แบบ Screening method แม้จะบ่งชี้พืชดัดแปรพันธุกรรมได้ แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดผลบวกปลอม (False-positive) หากมี gene หรือ construct เดียวกันกระจายในพืชดัดแปรพันธุกรรมเดียวกัน หรืออาจเกิดกรณีที่พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปรพันธุกรรมนั้นๆ ไม่ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาจากการใช้ Promoter หรือ Terminator เดียวกันกับที่ทำการทดสอบ

เพื่อลดปัญหาการเกิดผลบวกปลอม จึงมีความพยายามออกแบบการทดสอบให้มีลักษณะของไพรเมอร์และโพรบที่มีช่วงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง จีโนมของพืชที่ต้องการตรวจวิเคราะห์กับ promoter หรือ terminator อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งสามารถออกแบบการตรวจวิเคราะห์ได้ 4 รูปแบบ คือ การตรวจวิเคราะห์แบบ Screening –specific, gene-specific, construct-specific และ event-specific แต่อย่างไรก็ตามยังขาดแนวทางในการทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ มักจะเป็น วิธีการและพารามิเตอร์ที่กำหนดหรือสร้างขึ้นมาในห้องปฏิบัติการเอง (In-house) หรือ กำหนดระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter- laboratory) (Broeders S. *et al*., 2014) การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์มากที่สุดและมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ (Yang L. *et al*., 2007) เพื่อให้เกิดความยืดหยุ่นทางการค้า และสามารถให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภคในการตัดสินใจ และเพื่อตอบสนองต่อมาตรการติดฉลากสินค้าพืชและผลิตภัณฑ์ การทดสอบเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR จึงเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ ที่สามารถใช้ในการบ่งชี้และบอกปริมาณของพืชและผลิตภัณฑ์ดัดแปรพันธุกรรมที่ถูกเลือกใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (Milavec M. et al., 2014) การตรวจวิเคราะห์อาหารและอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Real-time PCR หรือ qPCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและยังสามารถให้ข้อมูลเชิงปริมาณของสิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ ในปี 2009 European Network of GMO Laboratories (ENGL) ได้จัดทำวิธีการและขั้นตอนในการทดสอบความใช้ได้ เช่น จำนวนตัวอย่างของการทำ Standard curves เพื่อวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น linearity, ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม, ความเที่ยงตรง, ความถูกต้อง, ความแม่นยำ รวมไปถึงค่า LOD (limit of detection) และค่า LOQ (Limit of Quantification) ของการวิเคราะห์ซึ่งทั้งหมดได้มีการตั้งค่าเกณฑ์การยอมรับเพื่อใช้สำหรับพิจารณาค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ เพื่อที่แต่ละห้องปฏิบัติการจะสามารถออกแบบการทดสอบวิธีทวนสอบความใช้ได้ของการตรวจวิเคราะห์ได้เอง(Papazova, 2013)

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ในปี 2554-2558 ระยะเวลา 4 ปี มีวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

จัดซื้อตัวอย่างอ้างอิงมาตรฐาน CRM ข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจากบริษัท Eurofin ได้แก่ CRM ผงถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Event GTS 40-3-2, CRM ผงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

Event MON810, Bt176, Bt11, NK603, GA21, TC1507, Mon863, CRM จีโมมิกส์ดีเอ็นเอข้าวโพดสายพันธุ์ CBH351 และ T25, CRM ผงถั่วเหลืองและข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม สกัดดีเอ็นเอจาก CRM แบบผงด้วยวิธี GeneScan extraction methods ทำบริสุทธิ์ DNA ด้วย Wizard® Miniprep DNA Purification Kit แล้ววัดปริมาณและคุณภาพของ DNA ด้วยเครื่อง GeneQuant100 และเจือจาง DNA ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

2. การออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์และโพรบ

คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างพืชดัดแปรพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์ จากฐานข้อมูลของ European CommissionJoint Research Centre (JCR) (Laura, 2007)และโพรบที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ ที่นำมาใช้ในการทำ Real-time PCR แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene ของพืชดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ

		Primer for Target gene	Specificity	Amplificon
GTS40-3-2	F	๕'-gCA AAT CCT CTg gCC TTT CC-๓'	CP๔ epsps gene	๑๔๖ bp
	R	๕'-CTT gCC CgT ATT gAT gAC gTC-๓'		
	Probe	๕'-FAM-TTC ATg TTC ggC ggT CTC gCg-TAMRA-๓'		
MON810	F	๕'-TCg AAg gACg AAg gAC TCT AAC gT-๓'	Maize	๙๒ bp
	R	๕'-gCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-๓'	genome/	
	Probe	๕'-FAM- AAC ATC CTT TgC CAT TGC CCA gC-TAMRA-๓'	CaMV ๓๕S pro	
Bt 176	F	๕'-CCC ATC gAC ATC AgC CTg AgC-๓'	cryIA (b) gene	๑๒๙ bp
	R	๕'-CAg gAA ggC gTC CCA CTg gC-๓'		
	Probe	๕'-FAM-Atg TCC ACC Agg CCC AgC ACg-TAMRA-๓'		
Bt 11	F	๕'-gCg gAA CCC CTA TTT gTT TA-๓'	๓'pUC๑๘/pUC๑	๗๐ bp
	R	๕'-TCC Aag AAT CCC TCC ATg Ag-๓'	๘-maize	
	Probe	๕'-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TgT ATC CgC TCA-TAMRA-๓'	genome	
NK603	F	๕'-ATg AAT gAC CTC gAg TAA gCT TgT TAA-๓'	๓' insert/maize	๑๐๘ bp
	R	๕'-Aag AgA TAA Cag gAT CCA CTC AAA CAC-๓'	genome	
	Probe	๕'-FAM-Tgg TAC CAC gCg ACA CAC TTC CAC TC-TAMRA-๓'		
GA21	F	๕'-CTT ATC gTT Atg CTA TTT gCA ACT TTA gA-๓'	๕ maize	๑๑๒ bp
	R	๕'-Tgg CTC gCg ATC CTC CT-๓'	genome/insert	
	Probe	๕'-FAM-CAT ATA CTA ACT CAT ATC TCT TTC TCA ACA gCA ggT ggg T-TAMRA-๓'		
MON863	F	๕'-gTA ggA TCg gAA AgC TTg gTA C-๓'	๕'maize	๘๔ bp
	R	๕'-TgT TAC ggC CTA AAT gCT gAA CT-๓'	genome/CaMV	
	Probe	๕'-FAM-TgA ACA CCC ATC CgA ACA AgT Agg gTC A-TAMRA-๓'	๓๕S pro	
TC1507	F	๕'-TAg TCT TCg gCC AgA ATg g-๓'	TC๑๕๐๗ event	๕๘ bp
	R	๕'-CTT TgC CAA gAT CAA gCg-๓'	specific	
	Probe	๕'-FAM-TAA CTC Aag gCC CTC ACT CCg-TAMRA-๓'		
CBH351	F	๕'-TAC TAC ATC gAC CgC ATC gA-๓'	cry๙C/T๓๕S	๑๗๑ bp
	R	๕'-CCT AAT TCC CTT ATC Tgg gA-๓'		
	Probe	๕'-FAM-CgT gCC CgT gAA CCC AgC TC-TAMRA-๓'		
T25	F	๕'-ACA AgC gTg TCg TgC TCC AC-๓'		๑๐๒ bp
	R	๕'-gAC ATg ATA CTC CTT CCA CCg-๓'	๕'maize genome/insert	
	Probe	๕'-FAM-TCA TTg AgT CgT TCC gCC ATT gTC g-TAMRA-๓'		

		Primer for Endogenous gene	Specificity	Amplificon
GTS 40-3-2	F	5'-gACgCT ATT gTg ACC TCC TC-3'	Lectin	81 bp
	R	5'-TgT CAg ggg CAT AgA Agg Tg-3'		
	Probe	5'-FAM-CAA CTC AAT AAg gTT gACgAA AACggC-TAMRA-3'		
MON810	F	5'-CACTCCATCGTGGAGAGCTT-3'	invertase (ivr1) gene	111 bp
	R	5'-GGCGTTGTTGAAGAGGAAGA-3'		
	Probe	5'-FAM-TACCCCACACCGAGCCATCTACGACT-TAMRA-3'		
Bt 176	F	5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3'	alcohol	70 bp
	R	5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AAg-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-TAMRA-3'	(adh1) gene	
Bt 11	F	5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3'	alcohol	70 bp
	R	5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AAg-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-TAMRA-3'	(adh1) gene	
NK603	F	5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3'	alcohol	70 bp
	R	5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AAg-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-TAMRA-3'	(adh1) gene	
GA21	F	5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3'	alcohol	70 bp
	R	5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AAg-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-TAMRA-3'	(adh1) gene	
MON863	F	5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3'	alcohol	70 bp
	R	5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AAg-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-TAMRA-3'	(adh1) gene	
TC1507	F	5'-TTg gAC Tag AAA TCT CgT gCT gA-3'	high-mobility	79 bp
	R	5'-gCT ACA Tag gAg CCT TgT CCT-3'	group (hmg)	
	Probe	5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3'	gene	
CBH351	F	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'	alcohol	135 bp
	R	5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-TAMRA-3'	(adh1) gene	
T25	F	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'	alcohol	135 bp
	R	5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	dehydrogenase	
	Probe	5'-FAM-AAT CAg GgC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-TAMRA-3'	(adh1) gene	

3. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ

ทดสอบปฏิกิริยา PCR ด้วยการตรวจสอบ Endogenousgene ของพืชด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจยีน *Lectin*, *Adh*และ*Zein*ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการเตรียมชุดน้ำยาจาก 5xbuffer GoTaq 5 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, 10mM dNTPปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10uMol Forward และ Reverse Primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Taqpolymereseปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร และน้ำ nucleic free water ปริมาตร 10.37 มิลลิลิตร แล้วทำปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 95

องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีเพื่อเป็นการกระตุ้นปฏิกิริยา แล้วจึงทำปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 40 รอบ แล้วตรวจสอบผลของปฏิกิริยาบนอะกาโรสเจล2% ด้วยเครื่อง อิเล็กโตโฟลิซีส จากนั้นทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบและการทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค PCR และ Real-time PCR โดยใช้ปริมาณสารเพื่อการทดสอบดังตารางที่ 4 เมื่อทำการผสม master mix เสร็จแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Light Cycler480 ด้วยโปรแกรม ดังตารางที่ 4, 5 และ 6

4. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

เจือจางดีเอ็นเอจาก CRM ทุกตัวในอัตราส่วน 1:4, 1:16, 1:64 และ 1:256 แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ ยกเว้นตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม CBH351 และ T25 ความเข้มข้น 100 copyต่อไมโครลิตร ต้องเจือจางในอัตราส่วน 1:3, 1:9, 1:27 จำนวน 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น และสร้าง Stand curve ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการสร้าง Standard curve ด้วยการเจือจางตัวอย่างให้มีจำนวนการปนเปื้อนที่ระดับต่างกัน

	Target gene				Endogenous gene			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
GTS 40-3-2	5000	1250	312	78	100000	25000	6250	1560
MON810	5000	1250	312	78	100000	25000	6250	1560
Bt 176	4590	1150	287	72	91700	22900	5730	1430
Bt 11	4590	1150	287	72	91700	22900	5730	1430
NK603	5000	1250	312	78	100000	25000	6250	1560
GA21	4300	1080	269	67	100000	25000	6250	1560
MON863	1834	459	115	29	18349	4587	1147	287
TC1507	1834	459	115	29	18349	4587	1147	287
CBH351	300	100	30		300	100	30	
T25	300	100	30		300	100	30	

5. การทดสอบ Quantitative Real-time PCR

ตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Reference gene โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ตามอัตราส่วนผสมดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอัตราส่วนผสมเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Real-time PCR

Component	Final concentration	ul/reaction
2X Quantitect Prove PCR	2x	10 ul
Forward primer	5uM	0.5 ul
Reverse primer	5uM	0.5 ul
Probe	5um	0.5 ul
nucleic free water	-	3.5 ul
รวม (master mix)	-	15 ul
DNA template 10 ng/ul	50 ng	5 ul
Total reaction volume	-	20 ul

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงใน Real-time PCR plate 96 well แล้วนำเข้าเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals) โดยมีรอบการทำ Real-time PCR ดังตารางที่ 4, 5 และ 6 จากนั้นจึงนำ amplification curve ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) มาเป็นสิ่งที่ใช้กำหนดค่า Ct value และ copy number เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่า ความเที่ยงตรง (Precision), ความถูกต้อง (Trueness), ความแม่นยำ(Accuracy), ค่าเฉลี่ยมาตรฐาน (SD), ค่าเบี่ยงเบนสัมพันธ์ (RSD), ค่าความชันของกราฟ (slope), ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น linearity (R2), ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR efficiency) และ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนและเปอร์เซ็นต์ Bias, LOD และ LOQ, เพื่อศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยทำการทดสอบอย่างน้อย 4รอบการทดลอง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย เพื่อวิเคราะห์ค่าดังกล่าวต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิและจำนวนรอบการทำงานของระบบ Real-time PCR เมื่อทำการทดสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Bt176

step	stage	T ^{0}C	Time(sec)	Acquisition	Cycles	Use for
1	UNG pre-PCR decontamination	50	120"	No	1x	
2	Activation of DNA polymerase and denaturation	95	600	No	1x	
3	Denaturation	95	15	No	40x	Bt176
4	Annealing & Extension	60	60	Measure		
5	cooling	40	30	no	1x	

ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและจำนวนรอบการทำงานของระบบ Real-time PCR เมื่อทำการทดสอบถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมRR, NK603, GA21, Mon810, TC1507, Mon863, T25 และ CBH351

step	stage	T ^{0}C	Time(sec)	Acquisition	Cycles	Use for
1	UNG pre-PCR decontamination	50	120"	No	1x	RR NK603
2	Activation of DNA polymerase and denaturation	95	600	No	1x	GA21 Mon810 TC1507
3	Denaturation	95	15	No	45x	Mon863
4	Annealing & Extension	60	60	Measure		T25
5	cooling	40	30	no	1x	CBH351

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและจำนวนรอบการทำงานของระบบ Real-time PCR เมื่อทำการทดสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมBt11

step	stage	T ^{0}C	Time(sec)	Acquisition	Cycles	Use for
1	UNG pre-PCR decontamination	50	120"	No	1x	
2	Activation of DNA polymerase and denaturation	95	600	No	1x	
3	Denaturation	95	15	No	50x	Bt11
4	Annealing & Extension	60	60	Measure		
5	cooling	40	30	no	1x	

ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ

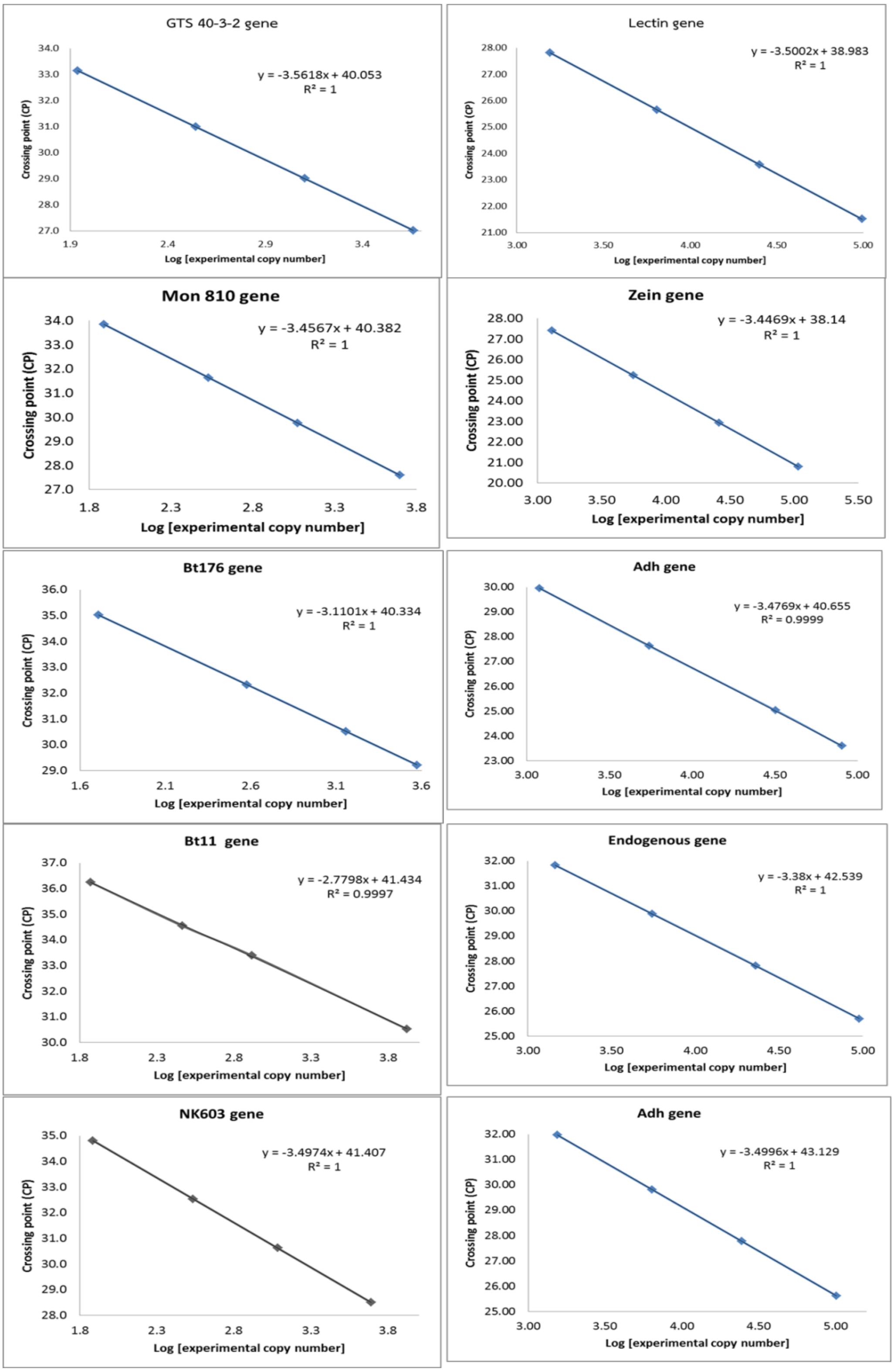
ไพรเมอร์และโพรบจากฐานข้อมูลของ Join Research Center (Laura, 2007) ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS 40-3-2, ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Bt 176 และ TC1507 เป็นการตรวจสอบแบบ gene-specific ส่วนชุดไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Bt11, Mon810, Mon863, NK603, GA21, T25 และ CBH351 เป็นการตรวจสอบแบบ event-specific ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการตรวจวิเคราะห์โดยหลักการ Screening method (Milavec M. et al., 2014) เช่นการทดสอบของ Yang et al., 2007 พบว่า การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงปริมาณจะมีค่าความเบี่ยงเบน (bias) น้อยหากใช้คู่ไพรเมอร์และโพรบที่ทำการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene แบบ event-specific

การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อการตรวจทดสอบเชิงปริมาณ

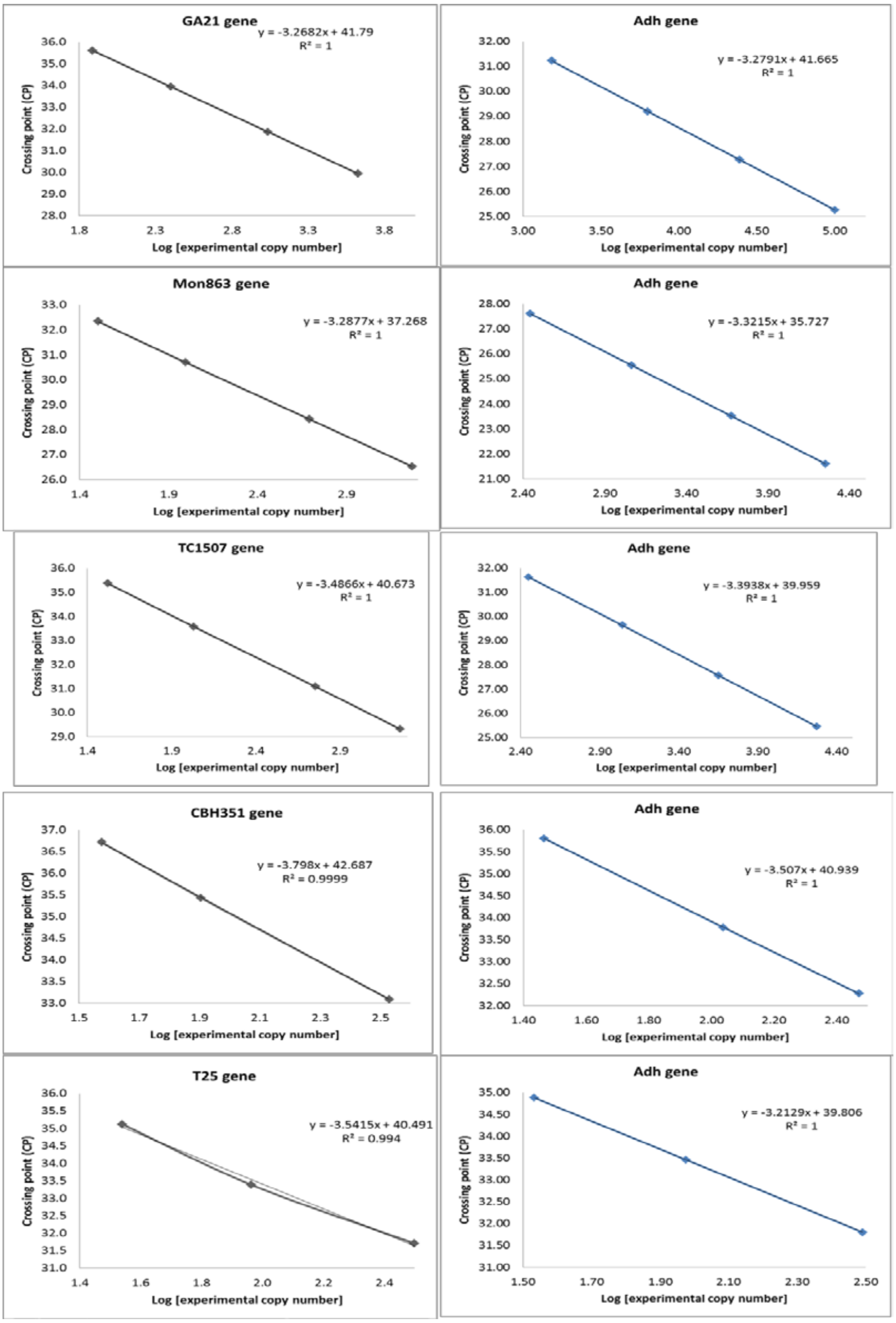
การหาความสัมพันธ์ของการปนเปื้อนยีนที่ทำการตัดต่อเข้าไปในถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม (Target gene) โดยทำการทดสอบควบคู่ไปกับการหาปริมาณของendogenous gene ที่มีอยู่ในพืชเป็นการหาความสัมพันธ์ร้อยละระหว่างตัวแปรทั้งสองด้วยการใช้ค่า crossing point (CP) และค่า [log ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ] จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยทำการทดสอบเพื่อตรวจวิเคราะห์ Target gene และ endogenous gene ทั้ง 2 ระบบควบคู่กัน นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาสมการเชิงเส้น ของการทดสอบว่าปริมาณของตัวอย่างและช่วงของการตรวจพบสัญญาณมีการสอดคล้องกันหรือไม่ ดังภาพที่ 1 และ 2

การคำนวณหาค่าความชันของกราฟค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

การคำนวณหาค่าความชันของกราฟ ค่าความสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จะได้จากการทำ Starndard curve แสดงดังตารางที่ 7 จากรายงานของ (Papazova, 2013) ซึ่งระบุจากข้อกำหนดในการทำทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ โดยกลุ่มงาน EU-RL GMFF ด้วยการทดสอบภายใต้กฎระเบียบของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 17025 ซึ่งได้ระบุไว้ ค่าความสัมพันธ์ของสมการเชิงเส้นของกราฟ R^2 จะมีค่าของเกณฑ์การยอมรับอยู่ที่ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ค่าความชันของกราฟ (Slop) มีค่าเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง -3.1 ถึง -3.6 และ มีเกณฑ์การยอมรับของค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR efficiency) อยู่ระหว่าง 90-110 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ Target gene ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์Endogenous gene ในการทดสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม GTS 40-3-2, ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon810, Bt176, Bt11, และ NK603 ด้วยการเจือจางตัวอย่างที่ระดับต่างๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจากค่า crossing point และ Log (Experimental copy number)



ภาพที่ 2 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ Target gene ควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ Endogenous gene ในการทดสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม GA21, Mon863, TC1507, T25 และ NK603 ด้วยการเจือจางตัวอย่างที่ระดับต่างๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานจากค่า crossing point และ Log (Experimental copy number)

ตารางที่ 7 แสดงค่าความชันของกราฟ ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene ในพืชดัดแปรพันธุกรรม ทั้ง 10 สายพันธุ์

	Target gene			Endogenous gene		
	R^2	Slope	PCR efficiency	R2	Slope	PCR efficiency
ค่าการยอมรับ	≥0.98	-3.1 ถึง -3.6	90% - 110%	≥0.98	-3.1 ถึง -3.6	90% - 110%
GTS40-3-2	๑.๐	-๓.๖	๙๐.๙๒	๑	-๓.๕	๙๓.๐๑
MON810	๑.๐	-๓.๕	๙๕.๓๘	๑	-๓.๔	๙๕.๑๒
Bt 176	๑.๐	-๓.๑	๑๐๕.๐๘	๑	-๓.๕	๙๖.๗๓
Bt 11	๑.๐	-๒.๘	๑๑๒.๗๐	๑	-๓.๔	๙๙.๐๒
NK603	๑.๐	-๓.๕	๙๓.๓๔	๑	-๓.๕	๙๓.๑๓
GA21	๑.๐	-๓.๓	๑๐๒.๕๔	๑	-๓.๓	๑๐๑.๘๘
MON863	๑.๐	-๓.๓	๙๐.๐๐	๑	-๓.๓	๘๗.๐๐
TC1507	๑.๐	-๓.๕	๙๔.๗๐	๑	-๓.๔	๙๘.๕๕
CBH-351	๑.๐	-๓.๗	๘๓.๙๐	๑	-๓.๕	๙๓.๐๐
T25	๑.๐	-๓.๕	๙๒.๐๐	๑	-๓.๒	๑๐๐.๐๐

เมื่อพิจารณาค่าความชันของกราฟ ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการทดสอบ Endogenous gene ทดสอบควบคู่กับ Target gene นั้น พบว่าพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์มีความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าความชันของกราฟอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.98 และมีค่าอยู่ระหว่างช่วง -3.1 ถึง -3.6 ตามลำดับ และมีค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ Mon863 เพียง 1 สายพันธุ์ที่มีค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับคือมีค่าอยู่ที่ 87 เปอร์เซ็นต์ซึ่งอาจเกิดจากความไม่เหมาะสมของสารละลายหรือรอบการทดสอบที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา

การหาความถูกต้องแม่นยำความเที่ยง และความเบี่ยงเบน ของการตรวจวิเคราะห์

การทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์ ด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบสำหรับทำการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene มีความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้คือมีค่าของเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ที่ ±25% และมีความเบี่ยงเบนของการวัดน้อยกว่า 25% ซึ่งหมายความการเมื่อทำการทดสอบผลของการทดสอบมีความแม่นยำต่อการทดสอบโดยสามารถทำการทดสอบได้ใกล้เคียงกับค่าจริงที่ได้ทำการกำหนดไว้ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่าความถูกต้องและความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง ค่าสัมประสิทธ์ของความสัมพันธ์ (RSD) และ ค่าความเบี่ยงเบน ในการทดสอบ Target gene และ Endogenous geneจากการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์

	Trueness		Precision			
	Target gene	Endogenous gene	Target gene		Endogenous gene	
			RSD(%)	Bias(%)	RSD(%)	Bias(%)
ค่าการยอมรับ	90% - 110%		±25%	<25%	±25%	<25%
GTS40-3-2	101.07	100.67	3.20	1.07	8.19	0.67
MON810	100.27	107.67	0.30	0.27	1.07	7.67
Bt 176	87.60	81.84	16.95	-18.16	20.69	-12.40
Bt 11	101.86	97.09	23.44	1.86	18.48	-2.91
NK603	98.13	100.67	2.25	-1.87	1.15	0.67
GA21	98.91	101.23	6.12	-1.09	5.20	1.23
MON863	101.23	98.05	6.42	1.23	8.81	-1.95
TC1507	98.87	102.82	8.00	-1.13	15.94	2.82
CBH351	112.86	98.99	12.69	12.86	8.42	-1.01
T25	105.23	103.30	9.36	5.23	6.27	3.30

ตารางที่ 9 แสดงค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และค่าเบี่ยงเบนของการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม 10สายพันธุ์ด้วยการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene ที่ระดับการปนเปื้อนต่างกัน

	RSD(%)						Bias(%)		
	Target gene			Endogenous gene					
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3
ค่าการยอมรับ	±25%						<25%		
GTS40-3-2	4.49	15.82	27.23	7.20	17.49	5.85	-7.21	39.90	35.20
MON810	0.30	21.67	27.38	1.07	14.36	13.32	-6.90	2.43	24.04
Bt 176	16.95	24.90	34.62	20.69	13.05	12.92	-6.47	470.39	5693.21
Bt 11	11.13	26.46	51.30	22.86	50.88	6.60	4.18	-31.11	-55.57
NK603	2.25	13.81	46.24	1.15	10.42	7.16	-2.52	-0.36	2.30
GA21	6.12	36.89	124.19	5.20	8.84	10.02	-15.97	-6.30	27.86
MON863	6.42	32.52	28.76	8.81	12.94	1.54	3.19	-12.80	14.72
TC1507	8.00	47.14	33.18	15.94	24.78	38.53	-3.89	2.32	41.17
CBH351	12.69	24.54		8.42	15.93		14.01	33.87	
T25	9.36	21.82		6.27	8.54		1.87	-4.04	

หมายเหตุ : U1 คือ GTS 40-3-2, MON810, Bt 176, Bt 11 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 5%, GA21 ที่ระดับการปนเปื้อน 4.3%, MON863 และ TC1507 ที่ระดับการปนเปื้อน 10% และ CBH351 และ T25 ที่ระดับการปนเปื้อน 100%, U2 คือ ตัวอย่างพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ระดับการปนเปื้อน 1% และ U2 คือระดับการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่ระดับ 0.1% ยกเว้น ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม CBH351 และ T25 ซึ่งมีปริมาณการปนเปื้อนอยู่ในปริมาณ copy number ที่ต่ำมากอยู่แล้วจึงไม่สามารถเจือจางให้มีการปนเปื้อนที่ระดับ 0.1% ได้

จากตารางที่ 9 พบว่าค่าความเที่ยงตรงของการตรวจวิเคราะห์ จะสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อน โดยเมื่อมีการปนเปื้อนในระดับต่ำ ความเที่ยงตรงของการตรวจวิเคราะห์ก็จะมีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำไปด้วย เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงตรงของการตรวจวิเคราะห์ระหว่าง Target gene และ Endogenous gene พบว่าการตรวจวิเคราะห์ Endogenous gene จะมีความเที่ยงตรงของการตรวจวิเคราะห์มากกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วย Target gene จากการทดสอบพบว่าไพร์เมอร์และโพรบ ที่ใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ได้และเหมาะสมต่อห้องปฏิบัติการ

ค่าความทดสอบซ้ำได้ ค่า Limit of Detection และค่า Limit of Quantification ของการตรวจวิเคราะห์

หาค่า LOD และ LOQ ได้ โดยค่า LOD คือค่าต่ำสุดของตัวอย่างที่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ และค่า LOQ คือค่าต่ำสุดของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ได้และมีค่ามาตรฐานการเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับน้อยกว่า 25 สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่ามาตรฐานเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ของการตรวจวิเคราะห์ Target gene และ Endogenous gene ในพืชดัดแปรพันธุกรรม 10 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการพิจารณาค่าความทดสอบซ้ำได้

	LOD	LOQ
GTS40-3-2	0.1%	0.10%
MON810	0.50%	0.50%
Bt 176	0.1%	0.10%
Bt 11	0.1%	0.1%
NK603	0.1%	0.1%
GA21	0.1%	0.1%
MON863	0.05%	0.05%
TC1507	0.05%	0.07%
CBH351	10 copy	
T25	10copy	

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธีการ ไพรเมอร์และโพรบ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากค่าความสัมพันธ์ของการตรวจวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของมาตรฐานสากล คือมีค่าของ R^2 อยู่ในช่วงสูงกว่า 0.98 ซึ่งค่าที่ได้จากทุกการทดสอบด้วยพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 10 สายพันธุ์มีช่วงค่าการทดสอบที่ดีซึ่งแสดงให้เห็นว่าในทุกรอบการทดสอบการเตรียมตัวอย่างและการทำค่า กราฟมาตรฐานมีความสัมพันธ์กัน และเมื่อพิจารณาที่ค่าความถูกต้องแม่นยำ และเที่ยงตรง พบว่า การตรวจวิเคราะห์ให้ผลของความถูกต้องแม่นยำ และเที่ยงตรงที่ดีเนื่องจากอยู่ในช่วงค่าของเกณฑ์การยอมรับ แต่ในการตรวจวิเคราะห์บางสายพันธุ์ยังมีความเบี่ยงเบนและมี

บางพารามิเตอร์ที่อยู่นอกเหนือเกณฑ์การยอมรับอยู่โดยเฉพาะเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ในปริมาณการปนเปื้อนที่ต่ำกว่า 0.1 % ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณของการปนเปื้อนที่มีอยู่น้อย หรือเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างซึ่งอาจทำให้ค่าการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มีความคลาดเคลื่อนไปบ้างเพราะเมื่อตัวอย่างมีปริมาณของยีนที่ทำการตรวจวิเคราะห์เจือปนอยู่ในปริมาณน้อย การตรวจวิเคราะห์ก็จะแปรผกผันทำให้การตรวจวิเคราะห์อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์และโพรบ ที่ออกแบบมาการตรวจวิเคราะห์ Event-specific จะมีความเหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพืชเนื่องจากจะสามารถยืนยันชนิดพืชที่ทำการตรวจวิเคราะห์ได้ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการของ gene-specific แม้จะมีความจำเพาะเจาะจงกับตัวยีนที่ทำการตัดต่อเข้าไปในยีนพืชแต่ก็ไม่สามารถใช้เพื่อยืนยันได้ว่ายีนที่ทำการตรวจพบเป็นของพืชชนิดนั้นๆจริงหรือ ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ gene-specific นี้อาจมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์อยู่บ้างในกรณีที่ตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์เป็นตัวอย่างสำเร็จรูป หรือแปรรูปที่มีการเจือปนของส่วนผสมจากพืชหลายชนิด ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่ผ่านทดสอบความใช้ได้ของวิธีการจากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพืช ผลิตภัณฑ์แปรรูปและอาหารสัตว์ที่ต้องการการตรวจรับรองสำหรับการนำเข้า-ส่งออกสินค้าระหว่างประเทศของห้องปฏิบัติการได้ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณ เพื่อตอบสนองต่อระเบียบมาตรการในการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมกับประเทศคู่ค้าที่มีการกำหนดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนขั้นต่ำไว้ อีกทั้งข้อมูลจากการวิจัยยังเป็นฐานข้อมูลในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม และสามารถใช้เป็นข้อมูลมาตรฐานของการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานสากลได้

การทดลองที่ 2 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล พงศกร สรรค์วิทยากุล
อรรคพล ภูมีศรี ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Khanitha Wongwathanarat Chananton Danaisilichaichon Pongsakorn Sunvittayakul
Arkkapon Phoomeesri Srimek Chowpongpang Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

สังเคราะห์ยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp โคลนเข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดโปรตีนขนาด 52 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 4.5 นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง แยกสกัด IgG จากแอนติบอดีปรับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 1:200 ทดสอบความใช้ได้ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองสด โปรตีน

EPSPS บริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน EPSPS ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการกับชุดตรวจสอบทางการค้า (Agdia ELISA kit) ผลการทดสอบทั้งสองให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน

คำสำคัญ : ยีน *Cry1Ab*, แอนติเจน, แอนติซีรัม, ชุดตรวจสอบ

บทนำ

ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่เหมาะสมกับการปลูกถั่วเหลือง แต่ปริมาณการปลูกถั่วเหลืองไม่เพียงพอสำหรับการบริโภคภายในประเทศ รัฐบาลจึงแก้ไขปัญหาโดยการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศในรูปเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง สำหรับการแปรรูปในอุตสาหกรรมเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองที่นำเข้ามาจากประเทศบราซิล ร้อยละ 49 อาร์เจนตินา ร้อยละ 15 และอินเดีย ร้อยละ 15 จากสถานการณ์ในยุคปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกมีการวิจัยพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรม เพื่อการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตและลดความเสียหายจากการทำลายของแมลงศัตรูพืช พบว่าในปี 2546 มีประเทศปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก 18 ประเทศ พืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด คือ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือที่เรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready ซึ่งเป็นของบริษัทมอนซานโต้ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) โดยมีประเทศผู้ผลิตสำคัญ 3 อันดับแรกของโลก ได้แก่ ประเทศจีน ร้อยละ 28.58 รองลงมา ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ร้อยละ 19.17 บราซิล ร้อยละ 15.72 อาร์เจนติน่า ร้อยละ 15.43 และในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกเป็นจำนวนมาก ด้วยการปรับปรุงยีนใหม่ๆ เพื่อตัดต่อในพืช จึงทำให้ประเทศหลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป เมื่อเดือนกรกฎาคม 2546 ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับที่เข้มงวดกว่าเดิมและมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 เมษายน 2547 กฎระเบียบดังกล่าวนี้กำหนดให้ต้องมีการตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะต้องติดฉลากด้วย โดยในกฎระเบียบเดิมสินค้าดังกล่าวไม่จำเป็นต้องติดฉลาก มีการระบุข้อความว่า “This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547)

จากกฎระเบียบดังกล่าว ส่งผลให้ประเทศไทยต้องประสบปัญหาและอุปสรรคมากเป็นพิเศษในการส่งสินค้าเกษตรออก เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า และอาจแอบแฝงการกีดกันทางการค้าไว้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองหรือมีส่วนผสมของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากผลผลิตถั่วเหลืองที่มีในประเทศไทยไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงต้องมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์แปรรูป การนำเข้าถั่วเหลืองของไทย ร้อยละ 80 สั่งจากประเทศที่เป็นแหล่ง

ปลูกถั่วเหลือง GMOs ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะปนเปื้อนด้วยถั่วเหลือง GMOs ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการส่งออกของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองก็มีโอกาสที่จะผลิตจากถั่วเหลือง GMOs เช่นเดียวกัน

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

ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้โคลนยีน *EPSPS* และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อใช้ตรวจโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช

Honghong Wu *et al.,* (2012) สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณโปรตีน CP4EPEPS ในเซลล์แบคทีเรีย ตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค western blot นำโปรตีนที่ได้มาเป็นแอนติเจนเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบโปรตีน CP4EPEPS ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA

ข้อมูลจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในการตรวจสอบโปรตีนชนิดนี้ นิยมใช้เทคนิค ELISA เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น โดยทางสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องซื้อชุดตรวจสอบ ELISA จากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาประมาณชุดละ 30,000 บาท ชุดตรวจสอบ 1 ชุด สามารถตรวจสอบได้ 2-10 ตัวอย่าง ประเทศไทยต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการซื้อชุดตรวจสอบนี้ Wei Wang (2000) นำ recombinant protein มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ยังคงคุณสมบัติของโปรตีนไว้ได้อย่างดี สามารถยืดเวลาเก็บรักษาโปรตีนไว้ได้ยาวนาน เพราะฉะนั้นการพัฒนา recombinant protein CP4EPEPS โดยการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อนำมาใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ (ELISA kit) ในเชิงพาณิชย์ จะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่ระบาดของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ระเบียบวิธีการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 ดำเนินการที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร ในปี 2557-2558 ระยะเวลา 1 ปี มีวิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณโปรตีน EPSPS ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

โคลนยีน *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เชื่อมต่อยีนเข้ากับ expression vector pET200 TOPO แล้วถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* BL21 คัดเลือกโคลน นำไปเลี้ยงและชักนำให้สร้างโปรตีนในอาหาร 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ ทำให้เซลล์แตกโดยการ sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD รุ่น 2200 ปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใส (supernatant) ไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย column NI-NTA super flow (QiAGEN)

2. การทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS

ทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS ที่อยู่ในส่วนใสด้วยคอลัมน์ Ni-NTA supser flow ตามวิธีการของบริษัท ตรวจสอบปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธีการ dialysis ในสารละลาย 1xPBS pH 7.4 ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ผ่านการทำบริสุทธิ์อีกครั้งโดย Bradford’s method

3. การตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดย Bradford’s method

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน EPSPS ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ เปรียบเทียบปริมาณจากการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีการของชุดวิเคราะห์โปรตีน Bio-Rad Assay (บริษัท BIO-RAD) ซึ่งอาศัยหลักการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของ (Bradford, 1976แต่ละความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน) ทำ 4 ซ้ำ แล้วนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อสร้างสมการเส้นตรงที่เหมาะสมด้วย Least square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นำค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595} ของโปรตีน EPSPS แทนค่าในสมการเส้นตรงเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีน

4. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

ใช้กระต่ายเพศเมียพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 3 เดือนและมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัมโดยเจาะเลือดกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum, Ns) แอนติเจนคือโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์เข้มข้น 1 mg/ml ผสมกับ complete Freund’s adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) จำนวน 5 จุด แล้วกระตุ้นภูมิในสัตว์ทดลองอีก 3 ครั้งโดยผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund’s adjuvant (IFA) เจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหูครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 6 และเจาะเลือดทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงแยกแอนติบอดีจากเม็ดเลือดแดงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนซีรัมและเติม 2% NaN_3 ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.02% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS ด้วยเทคนิค indirect ELISA

5. การตรวจสอบค่าไตเตอร์ (Titer) ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค indirectELISA

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อโปรตีน EPSPS ซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของ A_{405}ของซีรัมปกติ, Normal serum) ด้วยวิธีการ indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977)

6. การแยกสกัดและทดสอบประสิทธิภาพอิมมูโนโกลบูลิน

แยกสกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) แล้วปรับสภาพของ IgG ด้วย 0.05 เท่าของปริมาตร IgG ด้วย neutralizing buffer ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{280}$ โดยใช้ค่า Extinction coefficient ของ IgG เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลางคำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จากสูตร O.D.280/1.4 = X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977) จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วเจือจางเพิ่มด้วยสารละลาย 1XPBS pH 7.4 ที่ค่าการเจือจางเริ่มต้นที่ 1:200 ถึง 1:12,800 ทดสอบหาค่าความเจือจางของ IgG แต่ละระดับความเข้มข้นต่อการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 ng/µl ด้วยเทคนิค indirect ELISA จำนวน 5 ซ้ำ อ่านผลการตรวจสอบที่ 30 นาที หลังเติมสับสเตรท

7. การหาค่าความเจือจางของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ปรับความเข้มข้นโปรตีนEPSPS บริสุทธิ์เริ่มต้นที่ 1 mg/ml เจือจางโปรตีน EPSPS ในสารละลาย Coating buffer pH 9.6 ที่ระดับความเข้มข้น 1:2-1:2,048 (แบบ 2 fold –dilution) ค่าความเจือจางละ 5 ซ้ำ ใช้ IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เจือจาง 1:200 และใช้ goat anti rabbit IgG ที่เจือจาง 1:10,000 เพื่อตรวจดูระดับความเจือจางต่ำสุดของโปรตีน EPSPS ที่สามารถตรวจสอบได้ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่เวลา 30 นาทีหลังเติมสารละลายสับสเตรท กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของสารละลาย buffer ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

8. การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชสำหรับทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจพบยีน EPSPS โดยเทคนิค real time PCR แช่ในสารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.12% เป็นเวลา 30 นาที ใช้ต้นที่เจริญเป็นต้นได้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก และเพาะถั่วเหลืองที่ตรวจไม่พบยีน EPSPS ควบคู่กันไปเพื่อใช้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบ แล้วใช้ตัวอย่างดังกล่าวทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA กับผลการทดสอบด้วยเทคนิค real time PCR เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำ และประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

9. การทำแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีนและแอนติบอดี

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งตัวอย่างโปรตีน

เจือจางโปรตีน EPSPS ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในสารละลาย coating buffer pH 9.6 ที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 10, 100, 200 และ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โหลดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงใน

หลุมไมโครเพลทชนิด 96 หลุม แช่ตัวอย่างในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วเอาเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส ความดัน 132 mPa

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดี

แยกสกัด IgG ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน EPEPS ด้วยด้วยชุดสกัด Protein A Chromatography จากนั้นทำ desalting ให้ IgG อยู่ในสารละลาย 100 mM sodium phosphate buffer ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ $OD._{280}$ เจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 mg/ml เจือจาง IgG ในอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 โหลด IgG แต่ละความเข้มข้นในปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไมโครเพลทแช่ที่ อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สภาวะสุญญากาศ จนกว่า IgG จะแห้งสนิทติดบนผิวไมโครเพลท

10. การตรวจสอบตัวอย่างที่ทำแห้งแบบเยือกแห้งด้วยเทคนิค indirect ELISA

- ตรวจสอบตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีน EPSPS และ IgG ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตรวจสอบความใช้ได้ของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเทคนิค indirect ELISA ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977) ตรวจสอบผลโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่เวลา 15 นาที หลังเติมสารละลายสับสเตรท กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของสารละลาย buffer หรือ BSA ซึ่งเป็น negative control ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

11. การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่เพิ่มปริมาณและสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำโปรตีนความเข้มข้น 1 mg/ml เจือจางโปรตีนบริสุทธิ์ในผงถั่วเหลืองที่ระดับความเจือจาง 1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 เปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ใช้แอนติบอดีเข้มข้น 1 mg/ml เจือจาง 1:200 โดยใช้สับสเตรท 2 ชนิด คือ Alkaline Phosphatase (AP) และ Horseradish Peroxidase (HRP) เพื่อคัดเลือกชนิดสับสเตรทที่เหมาะสมไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ในเชิงพาณิชย์ และเปรียบเทียบผลตัวอย่างเดียวกันกับชุดตรวจสอบทางการค้า Agdia (Roundup Ready CP4EPSPS, USA)

ผลการทดลองและอภิปราย

ผลการเพิ่มปริมาณและทำบริสุทธิ์โปรตีนEPSPS

ได้ recombinant protein EPSPS ที่มีขนาดโปรตีนเท่ากับ 52 กิโลดาลตัน ที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้เป็น positive control ซึ่งแถบโปรตีนเป้าหมายเป็นโปรตีนเดียว ไม่มีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อน

ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดย Bradford's method

ตรวจวัดปริมาณ โดย Bradford's method เปรียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ระยะเวล 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{595}ได้ค่าสมการ Y=0.005x+0.178 ค่าระดับความเชื่อมั่น R^2 0.975 หรือที่ 97.5% นำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน EPSPS แทนค่า Y ในสมการข้างต้น คำนวณค่า X จากสมการได้ความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ได้ปริมาณความเข้มข้นโปรตีน EPSPS เท่ากับ 70.6, 30.4, 24.0, 44.07 mg/ml

ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เจาะเลือดจากกระต่ายมาทั้งหมด 10 ครั้ง พบว่าแอนติซีรัมที่ 5 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด (ภาพที่ 1) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1:3,876,800 เหมาะที่จะนำไปแยกสกัด IgG ให้ได้ IgG ที่มีความบริสุทธิ์และมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ผลการแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน

IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีน EPSPS ซึ่งแยกสกัดโดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ผ่านเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) วัดค่า OD_{280} เท่ากับ 4.432 คิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 3.165 mg/ml ดังภาพที่ 2

ผลการทดสอบประสิทธิภาพอิมมูโนโกลบูลิน

- การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินด้วยเทคนิค indirect ELISA

IgG ที่เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1:200-1:12,800 เพื่อหาค่าความเจือจางต่ำสุดของ IgG ต่อโปรตีน EPSPS พบว่าให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ Carbonate coating buffer ที่ใช้เป็น Negative control และระดับความเจือจางต่ำสุดของ IgG ที่สามารถตรวจสอบโปรตีน EPSPS ได้อย่างจำเพาะเจาะจงคือค่าความเจือจางต่ำสุดที่ 1:1,600 มีค่าเท่ากับ 0.322 และระดับความเจือจางที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนสามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ในระดับสายตาอย่างชัดเจนคือระดับความเจือจางที่ 1:200-1:400 ค่า OD_{405} เท่ากับ 1.545 และ 0.884 เพราะฉะนั้นที่ระดับความเจือจางของ IgG ที่ระดับนี้เหมาะสมในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถวิเคราะห์ผลได้ในการอ่านผลในระดับสายตาโดยไม่จำเป็นต้องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเหมาะกับการนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบ

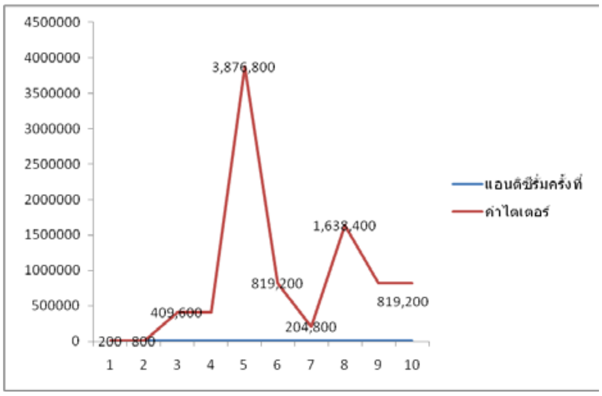
- การหาค่าความเจือจางของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ระดับความเจือจางสูงสุดของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ที่ IgG สามารถตรวจสอบได้แสดงให้ถึงคุณภาพของแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ จากการเจือจางแอนติเจนที่ระดับ 1:2-1:2,048 ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่า OD_{405} มีค่าอยู่ในช่วง 1.309 -0.286 ถือเป็นระดับที่ต่ำมากกว่า 1 นาโนกรัม และระดับความเจือจางของโปรตีน EPSPS ที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่สุด คือ ค่าความเจือจางที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการ

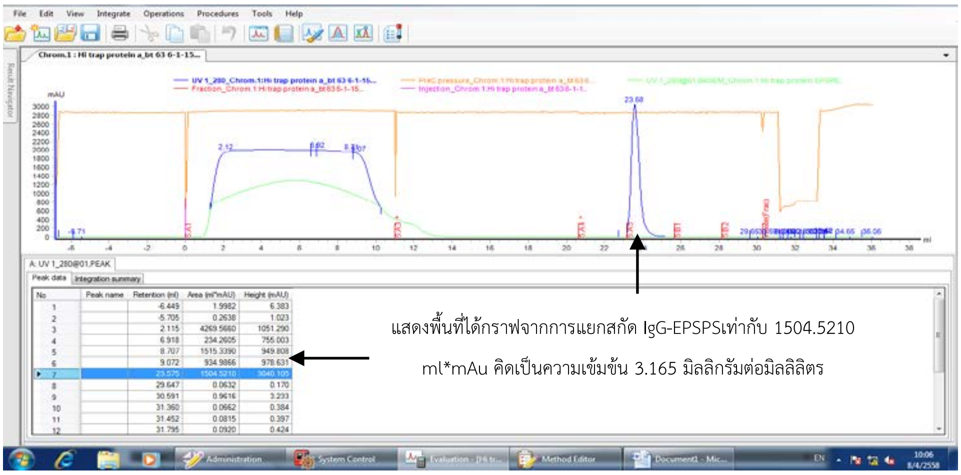
จับกับพื้นที่ผิวของ microplate ELISA แสดงว่าปริมาณโปรตีนที่มากกว่าระดับนี้ อาจมีโปรตีนมากเกินไปจนเกิดเป็นส่วนเกินในการจับกับพื้นผิวของ microplate ELISA

- การทดสอบตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

เปรียบเทียบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้น กับเทคนิคการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 3 ตัวอย่าง ตรวจพบโปรตีน EPSPS ซึ่งให้ค่าการตรวจสอบที่ OD_{405} อยู่ในช่วง 0.5530-0.7866 แต่ให้ผลการตรวจสอบที่ไม่ชัดเจนมากนัก เมื่อเทียบกับโปรตีน EPSPS จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างต้นถั่วเหลืองต่อสารละลายที่ใช้บดตัวอย่าง เพื่อให้ได้อัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้บดตัวอย่างโดยไม่มีผลกระทบกับการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA



ภาพที่ 1 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมครั้งที่ 1-10 เมื่อใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA อ่านผลการตรวจสอบที่เวลา 30 นาที หลังเติมสับสเตรท



ภาพที่ 2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟจากการแยกสกัด IgG-EPSPS แต่ละ fraction ตรวจวัดที่ค่า OD_{280} แสดงผล ณ เวลาจริงที่แยกสกัด IgG

ผลการทำแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีนและแอนติบอดี

จากการเคลือบผิวไมโครเพลทด้วยโปรตีน EPSPS พบว่าต้องใช้เวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตัวอย่างจะแห้งสนิทติดบนผิวไมโครเพลท สามารถเก็บรักษาตัวอย่างสำหรับใช้เป็น positive control เพื่อโปรตีน EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้ ส่วน IgG ใช้เวลาในการทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้อุณหภูมิ -80 องศา เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน เบื้องต้นพบว่า IgG แห้งเคลือบติดพื้นผิวไมโครเพลทเป็นอย่างดี

ผลการตรวจสอบตัวอย่างที่ทำแห้งแบบเยือกแห้งด้วยเทคนิค indirect ELISA

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของโปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจางที่แตกจ่างกัน เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าโปรตีนยังคงสภาพได้เป็นอย่างดี ทุกระดับความเจือจางที่นำมาทดสอบยังคงสภาพและโครงสร้างของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนได้เป็นอย่างดี แม้ว่าในระดับความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทดสอบคือ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ให้การดูดกลืนแสงที่ A_{405} เท่ากับ 2.565 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุดขึ้นไปในการทดสอบคือ 100, 200, 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.575, 3.033, 3.611 ตามลำดับ เพราะฉะนั้นแสดงให้เห็นว่าระดับความเจือจางของโปรตีนที่สามารถนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งสามารถใช้โปรตีนที่ระดับต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้

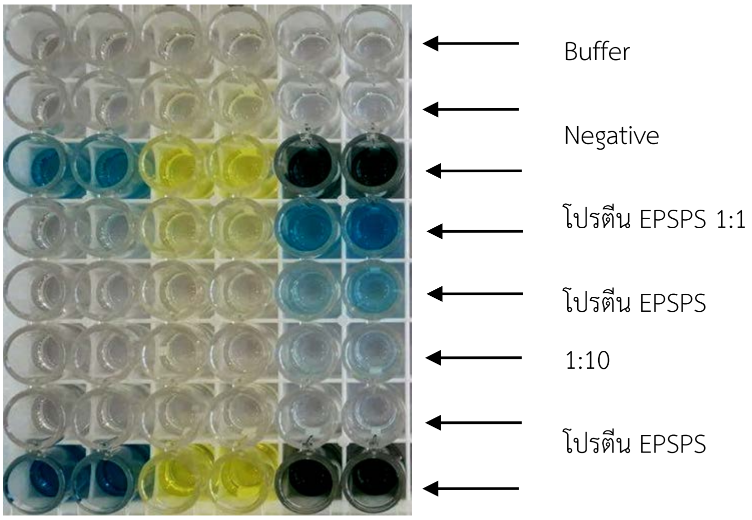
ผลการตรวจสอบตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA

จากการเคลือบไมโครเพลทด้วย IgG ที่ระดับความเจือจางที่แตกต่างกันนั้น พบว่าเมื่อเจือจาง IgG ที่ระดับต่ำที่ 1:800 พบว่า IgG ในสภาพตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งที่ระดับความเจือจางดังกล่าวยังคงคุณสมบัติในการตรวจจับกับโปรตีนเป้าหมายได้เป็นอย่างดี ซึ่งในการทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของ IgG ยังสามารถเจือจาง IgG ได้ในระดับต่ำกว่า 1:800 ได้อีก จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำปฏิกิริยาระหว่าง IgG แต่ละระดับความเจือจางกับโปรตีน EPSPS ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวทุกระดับความเจือจางของ IgG ยังคงตรวจสอบโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการรักษาโครงสร้างของ IgG ให้คงคุณสมบัติของอิพิโทปที่ดีในการตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย เพราะฉะนั้นการเคลือบไมโครเพลทด้วย IgG ที่มีความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปตรวจสอบโปรตีนพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำกว่า 10 ng/µl

ผลการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

จากการเจือจางโปรตีน EPSPS ในผงถั่วเหลืองที่ 4 ระดับความเจือจาง พบว่าเมื่อเลือกใช้ AP และ HRP เป็นสับสเตรทสามารถตรวจสอบ โปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจางที่ 1:1, 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{405} เท่ากับ 3.784 และ 2.490 เมื่อใช้สับสเตรทชนิด AP สำหรับสับสเตรทชนิด HRP ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{405} เท่ากับ 2.490 และ 0.633 เมื่อใช้แอนติบอดีที่ระดับความเจือจาง 1:200 อ่านผลการตรวจสอบที่ระยะเวลา 30 นาที หลังจากเติมสับสเตรท แต่เมื่อทิ้งระยะเวลาการตรวจสอบไว้ที่ 60 นาที ตัวอย่างที่ใช้สับสเตรทชนิด AP มีแนวโน้มให้ผลการทดสอบลวง (false positive) กับ negative control

เพราะฉะนั้นชนิดของสับสเตรทที่ควรเลือกใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit คือ ชนิด HRP อีกทั้งสับสเตรทดังกล่าวให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่า AP สับสเตรท พบว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจสอบโปรตีน EPSPS สอดคล้องกับ (Agdia ELISA kit) และสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ในระดับความเจือจางที่ 1:100 ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ดีกว่า Agdia ELISA kit ถึง 100 เท่า เมื่อใช้ HRP เป็นสับสเตรทและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ negative control และ Extraction buffer (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบโปรตีน EPSPS ด้วยเทคนิค indirect ELISA เมื่อทดสอบด้วย แอนติบอดี Agdia เจือจาง 1:200 แอนติบอดี IgG-EPSPS-AP[/2] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด AP IgG-EPSPS-HRP[/3] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด HRP อ่านผลการตรวจสอบที่ 30 นาทีหลังเติมสับสเตรท

ส่วนวิธีการในการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ เพื่อใช้ในการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมและการขยายผลในเชิงพาณิชย์ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ชนิด 96 หลุม ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างได้ 48 ตัวอย่าง ชุดตรวจสอบ 1 ชุดประกอบด้วย

รายการ	ปริมาณ
- ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม	1 เพลท
- IgG-EPSPS 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	1 หลอด
- secondary antibody-HRP	1 หลอด
- TMB substrate	25 มิลลิลิตร
- Extraction buffer	25 มิลลิลิตร
- skim milk	6 กรัม
- PBST buffer	400 มิลลิลิตร
- PBS	200 มิลลิลิตร
- Positive control	1 หลอด

ซึ่งมีวิธีใช้ดังนี้

1. บดตัวอย่างถั่วเหลืองที่จะตรวจสอบหาใน Extraction buffer อัตราส่วน 1:10 ดูดส่วนใสปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างในไมโครเพลทที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

2. เติม blocking solution (2% skim milk ที่ละลายใน PBST) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

3. เติม IgG-EPSPS 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 1: 200 ใน blocking solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

4. เติม secondary antibody-HRP เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

5. เติม TMB substrate หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องปิดแสงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที อ่านผลการตรวจสอบที่วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของ Negative control ผลการตรวจสอบว่าเป็นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สังเคราะห์ยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp โคลนเข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® แล้วถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย แล้วทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 52 กิโลดาลตันถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 4.5 ใช้โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีและได้เจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมจำนวน 10 ครั้ง มาแยกสกัด IgG ด้วยชุดสกัด protein A นำโปรตีน EPSPS และ IgG มาพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit โดยพัฒนาโปรตีนและแอนติบอดีในรูปแบบแห้งแบบเหยือกแข็ง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นกับแอนติบอดีทางการค้า พบว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ผลการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ได้ดีกว่าแอนติบอดีทางการค้าเมื่อให้อัตราส่วนความเข้มข้นเดียวกัน แสดงว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้เป็นอย่างดีเหมาะสำหรับใช้พัฒนา ELISA kit ในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นยังมีประสิทธิภาพดีเฉพาะการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในต้นสดได้ดีกว่าในส่วนของผลิตภัณฑ์แปรรูป จึงควรมีการวิจัยพัฒนาการสกัดโปรตีนจากผลิตภัณฑ์แปรรูป เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อไป อีกทั้งแอนติบอดีทั้งชนิดโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลและโปรตีน

EPSPS บริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้น สามารถจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ และงานวิจัยชิ้นนี้ยังเป็นต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม โดยสามารถลดปริมาณและการใช้สารเคมี ลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลาและค่าใช้จ่ายได้อีกด้วย

การทดลองที่ 3 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready

ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Chananton Danaisilichaichon Khanitha Wongwathanarat Piyarat Thammakijjawat
Srimek Chowpongpang Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีสังเคราะห์ โปรตีน EPSPS ที่มีความบริสุทธิ์ ในข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ด้วยการสังเคราะห์ยีน CP4EPSPS แล้วโคลนยีน เข้าเวคเตอร์ pET200/D-TOPO (ให้ชื่อพลาสมิดว่า pET200-NK603) แล้วสังเคราะห์โปรตีน EPSPS ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม ด้วยการเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ และชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยเติมสาร IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อผลิตโปรตีน EPSPS ที่ 22 ชั่วโมง ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาด 48 kDa จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนไปทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยเทคนิค DIBA และเตรียม gold-conjugated IgG linked ด้วยเทคนิค Hetero-funtional linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมในการเชื่อมต่ออนุภาคทองคำ คือ IgG linked เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ต่ออนุภาคทอง 1 มิลลิลิตร เมื่อทดสอบความเข้มข้นของ Gold-conjugated IgG ที่มีต่อ conjugated release pad อยู่ที่อัตรา 10-15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร โดยใช้ goat anti-rabbit (GAR) ทำ control line และทำ test line ด้วย IgG ของ NK603 ซึ่งจะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดกับสารละลาย Na_2HPO4 โดยสามารถตรวจสอบได้ภายในระยะเวลา 5-10 นาที ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ คือ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่าง negative sample

คำสำคัญ : โปรตีน EPSPS, DIBA, Gold-conjugated IgG, Hetero-funtional linker

บทนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับการรับรองให้ปลูกเป็นการค้าและรับรองความปลอดภัยในการนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ในบางประเทศ โดยในช่วงปี 2539 - 2547 พื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 47 เท่า โดยเฉพาะปี 2547 มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดถึง 140 ล้านเฮกแตร์ทั่วโลก ซึ่งในจำนวนพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดทั้งหมดนี้คิดเป็นพื้นที่

เพาะปลูกเฉพาะข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมถึงร้อยละ 14 จากรายงานในปี 2552 ของ Seong Hun Lee และคณะกล่าวว่าพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมได้เพิ่มขึ้นจากเดิม 1.7 ล้านแฮกแตร์ ในปี 2539 เป็น 125 ล้านแฮกแตร์ ในปี 2551 จากพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดพบว่าพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปลูกกันเป็นจำนวนมาก 3 อันดับแรก คือถั่วเหลือง คิดเป็น 70% ของพื้นที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก รองลงมาคือฝ้าย คิดเป็น 46% และอันดับที่ 3 คือ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม คิดเป็น 24 % ของพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม ตามที่ The International Service for the Acquistion of Agri biotech Application หรือ ISAAA ได้มีรายงานว่าปัจจุบัน มีข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมมากกว่า 121 ชนิดที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นอาหารหรืออาหารสัตว์ และยังมีการปลูกเพื่อการค้าในประเทศต่างๆ มากกว่า 23 ประเทศ (James, 2013; Jae et al, 2014).

ข้าวโพด NK603 หรือชื่อทางการค้า คือ ข้าวโพด Roundup Ready เป็นพืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ประกอบไปด้วยยีน cp4epsps (CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ได้มีการวิจัยพัฒนาการตรวจสอบด้วยพืชดัดแปรพันธุกรรมต่างๆมากมายไม่ว่าจะเป็น ทางด้านดีเอ็นเอเช่น เทคนิค PCR หรือ Real-time PCR หรือ การตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีน ทั้งนี้การเปิดการค้าเสรี ทำให้สินค้าเกษตรมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรม การพัฒนาชุดตรวจสอบ ด้วยการใช้เทคนิค immunochromatographic strip test ซึ่งปัจจุบันได้พัฒนากลายเป็นเทคนิค gold labeled IgG flow test (GLIFT) (สุรภี และคณะ, 2547 และ กิตติศักดิ์ และคณะ, 2549) ในการทดลองนี้เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อการตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการทางอิมูโนวิทยา และการไหลของสารในการทำปฏิกิริยา (lateral flow technique) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนหรือเรียกอีกอย่างว่า Lateral Flow Test (LFT) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้อ่านผลได้อย่างรวดเร็ว ง่าย และตรวจสอบภาคสนามได้ (Kobra *et al*, 2011; Liu *et al*., 2014)

ระเบียบวิธีการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready ดำเนินที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร ในปี 2553-2558 ระยะเวลา 5 ปี มีวิธีการ

1. การเตรียมและทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

สังเคราะห์ยีน CP4EPSPS เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET200/D-TOPO เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม pET200-NK603 ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 คัดเลือกแบคทีเรีย NK603-BL21 จำนวน 2 โคลน ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เมื่อถูกชักนำด้วยสาร IPTG เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมได้ จึงทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยหลักการ Affinity Chromatography (Jiang *et al*, 2014) โดยใช้ specific (affinity) elution หรือ non-specific elution ด้วยการใช้ค่า pH หรือ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ระดับpH 4.9-8 เพื่อให้ได้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด โดยเปรียบเทียบปริมาณและขนาด

ของโปรตีนที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี SDS-PAGE ใช้โปรตีน CP4EPSPS ที่บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน โดยผสมโปรตีนเข้มข้น 1 mg/ml ผสมกับ complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 นำไปฉีดกระต่าย สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 3 สัปดาห์ เข้าชั้นใต้ผิงหนังกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white ในสัปดาห์ที่ 4 ใช้แอนติเจนเข้มข้น 3 mg/ml ผสมกับ incomplete adjuvant ฉีดใต้ผิวหนังของกระต่ายตัวเดิม จากนั้นจึงเจาะเลือดเพื่อเก็บแอนตีซีรัม จำนวน 10 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมไว้ทำบริสุทธิ์ IgG

2. การแยกสกัด IgG

นำแอนติซีรัมที่มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดมาทำการแยกสกัด IgG โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate saturated แล้วนำ IgG ที่ได้มาทำ dialysis ในบัฟเฟอร์ 0.5x PBS นานข้ามคืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) ตรวจสอบคุณภาพ IgG ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณปรับความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร O.D.280/1.4 = X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977) และได้สกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) ตรวจสอบ IgG ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG โดยใช้ค่า Extinction coefficient ของ IgG เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลาง และคำนวณความเข้มด้วยสูตรข้างต้น

3. การทดสอบคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจนด้วยวิธี immunochromatographic assay

- ทดสอบแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

ทดสอบ indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยมีตัวอย่างทดสอบ คือ CP4EPSPS ความเข้มข้น 100 ng/µl และตัวอย่างพืชได้แก่ใบข้าวโพด ทดสอบด้วย IgG ที่เจือจางด้วย blocking solution และGAR-conjugated เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับกันของโปรตีนและ IgG โดยเติมสารละลายสับเสตรท p-nitrophenyl phosphate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 30 นาทีหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของซีรัมปกติ ที่ให้ค่าเป็นบวก

- ทดสอบแอนติซีรัมด้วยเทคนิค DIBA

เจือจาง Recombinant protein NK603 บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000-1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน นำแผ่น NCM ไปทดสอบกับแอนติซีรัม เจือจางใน Blocking buffer ในอัตรา 1:200 ล้างด้วย TBST จากนั้นแช่ในสารละลาย GAR-conjugated ที่เจือจางใน Blocking buffer อัตราส่วน 1:10,000 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST แล้วเติมสารละลาย Napthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt บ่มในที่มืดจนกว่าจะเกิดสีชมพูของปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น

4. การติด linker ที่ antibodies

เพิ่มความเสถียรในการจับกันของ Gold และ IgG ด้วยการติด linker ซึ่งเป็นการเชื่อม IgG และอนุภาคทองด้วยโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายโพลิเมอร์ หรือ HeterofuntionalLinker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดี้บริเวณหมู่คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide) ด้วยการผสม IgG ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml กับ 100 mM$NaIO_4$ เขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1x PBS และเติม 46.5 mM linker solution แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 40 mM HEPES แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g นาน 10 นาที ที่ 4 °C ด้วย 10k MWCO จากนั้นเติมด้วย 40 mM HEPES ให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ml

5. ตรวจสอบ การ Oxidation ของ IgG linker ด้วย Purpald test

ขั้นตอนสำคัญของการเชื่อมต่อแอนติบอดี้กับอนุภาคทองคือการ ปลดปล่อย aldehyde group ด้วยการออกซิเดชั่นของน้ำตาล ซึ่งขั้นตอนนี้ทำได้ด้วย 1xPBS และ $NaIO_4$ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของ Aldehydes ในตัวอย่าง IgG ที่ได้รับการ Oxidation นั้นสามารถทำได้โดยการเติม 60 ไมโครลิตร purpled solution ลงใน 20 ไมโครลิตร IgG ซึ่งวิธีการนี้จะต้องทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากตัวอย่างจะกลายเป็นสีม่วง ซึ่งหมายถึงการปลดปล่อย Oxygen ออกมา

6. การทดสอบการ conjugated ของ IgG กับ Gold เพื่อหาอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบการเชื่อมต่อของแอนติซีรั่ม กับ colloid gold ที่มีอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ด้วยการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของ IgG linked 1 mg/ml โดยผสม colloid gold 1 ml กับ IgG linked ปริมาตร 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ul จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที แล้วสังเกตสีและการตกตะกอนของอนุภาคทอง ด้วยกล้อง transmission electron microscopy (TEM) ที่ได้ดังรูปภาพที่ 2 จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm

7. ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

ผลิตชุดตรวจสอบ Strip test ด้วยการทดลองพ่น Gold conjugated ลงบนแผ่น Gold conjugate release pad โดยทำการ เตรียม gold pad ด้วยการแช่สารละลาย Pretreatment ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทองที่อัตราส่วนระหว่าง Gold:IgG linked 1 มิลลิลิตร :1 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร : 15 ไมโครลิตร แล้วนำมาพ่นบน Gold conjugate release pad ที่ได้รับการ Pretreatment แล้ว ทดสอบความหนาแน่นของการพ่นด้วย ระยะ ตั้งแต่ 10 - 30 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบ ให้แห้ง แล้วเตรียมเมมเบรนสำหรับทดสอบด้วยการขีดเส้น Test line ด้วย IgG NK603 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ เส้น Control line ด้วย Goat anti-rabitIgGอบให้แห้งที่ 37 °C ทำการประกอบชุดทดสอบด้วยการติด Gold Conjugate release pad ลงไปแล้วตามด้วยแผ่น Sample pad เพื่อใช้สำหรับดูดซับตัวโปรตีน NK603 บนแผ่น Backing card จากนั้นวางแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เมมเบรนที่มีเส้น Control line และ Test line ซึ่งแผ่น Nitrocellulose membrane (NM) ที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ AE99 แล้วติดลงบน Backing card แล้วจึงวางแผ่นซับ Wick pad ไว้ด้านบนสุด

ผลการทดลองและอภิปราย

ผลของการเตรียมและทำบริสุทธิ์แอนติบอดี

ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ Nk603 BL-21 ผลิตรีคอมบิแนนท์ EPSPS โปรตีนออกมามากที่สุดที่การชักนำด้วย IPTG นาน 22 ชั่วโมง และโปรตีนมีขนาดประมาณ 48 kDa

ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งที่ 1 (As-1 หรือ สัปดาห์ที่ 4) จนถึงครั้งที่ 10 (As-10 หรือสัปดาห์ที่ 13) แสดงให้เห็นในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมตั้งแต่การเจาะเลือดครั้งที่ 1 (As-1) จนถึงครั้งที่ 10 (As-10)

แอนติซีรัม(As)	As-๑	As-๒	As-๓	**As-4**	As-๕	**As-6**	As-๗	As-๘	As-๙	As-๑๐
ค่าไตเตอร์	:๕๑,๒๐๐	๑:๑๐๒,๔๐๐	๑:๔๐๙,๖๐๐	**1:819,200**	๑:๔๐๙,๖๐๐	**1:819,200**	๑:๒๐๔,๘๐๐	๑: ๔๐๙,๖๐๐	๑:๒๐๔,๘๐๐	๑:๒๐๔,๘๐๐

จากตารางจะเห็นได้ว่าแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่ายในครั้งที่ 4 และครั้งที่ 6 ให้ค่าไตเตอร์ที่สูงที่สุด คือ 819,000 ซึ่งเป็นปริมาณแอนติซีรัมที่เจือจางที่สุดหรือเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยังคงสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน CP4EPSPS และให้ผลเป็นบวกหรือ positive ในเทคนิค indirect ELISA ได้พบว่าหากทำการสกัด IgG ด้วยวิธี ตกตะกอนด้วย ammonium sulphate saturated ปริมาณของ IgG ที่ได้ มีค่าน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ Hitrap Protein A ซึ่งทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของ IgG สูงกว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอน ammonium sulphate saturated

การทดสอบคุณภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจนด้วยวิธี immunochromatographic assay

- ผลการทดสอบแอนติซีรัมและIgGที่ผลิตจากกระต่ายกับตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีน และ IgG ที่สกัดได้จากการใช้วิธี Hitrap Protein A มาทำการทดสอบกับตัวอย่างพืชที่คาดว่าจะเป็นข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม CP4EPSPS พบว่าตัวอย่างที่ได้จากพืช มีค่าความเข้มข้นสูงกว่า 2x ของความเข้มข้นของ Negative control แต่มีค่าน้อยกว่า Positive control ซึ่งเป็น protein บริสุทธิ์ ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบเป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมแต่มีการปนเปื้อนของยีนดัดแปรพันธุกรรมอยู่ในปริมาณที่ต่ำ

- ทดสอบแอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายด้วยเทคนิค DIBA

ผลการตรวจสอบ recombinant protein CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1,000-1 นาโนกรัม/ไมโครลิตรด้วยเทคนิค DIBA ผลการตรวจสอบที่ระยะเวลา 10 นาทีหลังจากเติมสับสเตรทแสดงให้เห็นว่า

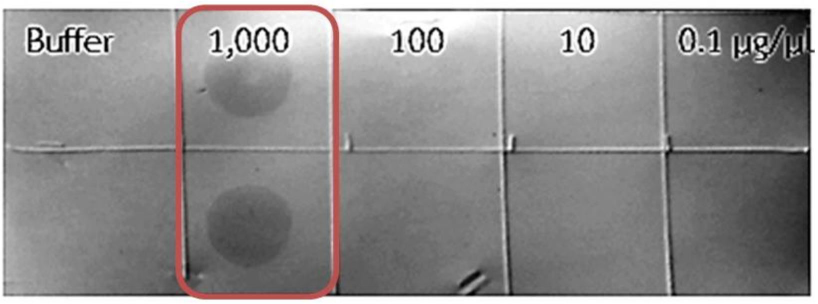
แอนติบอดีต่อ recombinant protein CP4EPSPS ที่ผลิตจากจากกระต่ายมีความจำเพาะเจาะจง และมีความไวในการตรวจจับโปรตีนที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทดสอบคือ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และระดับความความเข้มของสีที่แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาจะแปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน

ทดสอบการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG)

- หลัก Physical interaction (electrostatic coupling)

สร้าง AuNPIgG conjugates ด้วยหลักการ Physical interaction (electrostatic coupling) ซึ่งเป็นวิธีการเชื่อมต่อผ่านปฏิกิริยาสัมพันธ์ของประจุ คือเชื่อมต่อประจุลบจาก Colloidal gold และประจุบวกจากแอนติบอดี้ PAb-CP4EPSPS ใช้ IgG ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 16 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตกตะกอน Colloidal gold conjugated IgG ด้วยสารละลาย passive gold diluents pH 7.4 กัน ตรวจวัดค่า O.D. 530 ให้มีค่าเท่ากับ 3.065 เป็นค่าที่มีปริมาณและความเหมาะสมของการเชื่อมต่อของอนุภาคทองกับ IgG

AuNPIgG conjugated ที่เชื่อมต่อกันด้วยหลักการ electrostatic coupling มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ Colloidal gold conjugated IgG ของ PAb-CP4EPSPS ต่อ recombinant protein CP4EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาสีม่วงแดงของ Colloidal gold conjugated IgG ที่ทำปฏิกิริยาของโปรตีนที่ความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงซึ่งแสดงให้เห็นว่า Colloidal gold conjugated IgG สามารถตรวจจับกับโปรตีนเป้าหมาย CP4EPSPS ได้อย่างจำเพาะเจาะจงไม่เกิดปฏิกิริยาข้ากับสารละลายบัพเฟอร์ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผลการทดสอบ Colloidal gold conjugated IgG ที่ระดับความเจือจาง 1: 50 ทำปฏิกิยากับ recombinant protein CP4EPSPS

- ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อโปรตีน EPSPS

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อโปรตีน EPSPS ด้วยวิธีทดสอบ Westhernbloting เมื่อถ่ายโปรตีนจากเจลอะคริลาไมด์ไปยังแผ่นเมมเบรน และใช้ IgG มาตรวจจับโปรตีน EPSPS และเติมสับเสตรจ ตรวจพบสัญญาณการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัด Bradford

นำโปรตีน BSA ซึ่งจะใช้ในการสร้าง Standard Control มาเจือจางให้เป็น 1-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับเพื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน CP4EPSPS ที่ผลิตได้ แล้วนำมาผสมกับ dry ด้วยอัตราส่วน

5:1 (โปรตีน : dry) จากนั้นนำค่า Standard curve ของ BSA ที่ได้มาสร้างกราฟสมการเส้นตรง คือ Y=0.0011+0.1968, R^2 = 0.9911 และเมื่อนำค่า Abs ที่วัดได้จากโปรตีน CP4EPSPS มาคำนวณ พบว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ คือ 66.09091 และ 31.36364 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตรวจสอบ การ Oxidation ของ IgG linker ด้วย Purpald test

การเชื่อมต่อแอนติบอดีกับอนุภาคทองคือการ ปลดปล่อย aldehyde group ด้วยการออกซิเดชั่นของน้ำตาล เพื่อทดสอบการมีอยู่ของ Aldehydes ในตัวอย่าง IgG ที่ได้รับการ Oxidation นั้นสามารถทำได้โดยการเติม 60 ไมโครลิตร purpled solution ลงใน 20 ไมโครลิตร IgG ซึ่งวิธีการนี้จะต้องทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากตัวอย่างจะกลายเป็นสีม่วง ซึ่งหมายถึงการปลดปล่อย Oxygen ออกมาจากการทดสอบพบว่า ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย purpled แสดงสีม่วงเข้มชัดเจน ในขณะที่ตัวอย่างที่ เป็น negative ไม่มีสีเลย

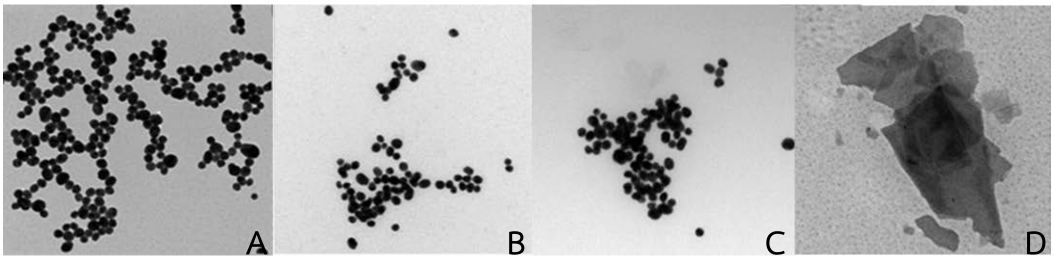
ผลการทดสอบการ conjugated ของIgGกับ Gold เพื่อหาอัตราส่วนการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ทดสอบการเชื่อมต่อของแอนติซีรั่ม กับ colloid gold ที่มีอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40nm กับ IgG linked ปริมาตร 10, 25, 50 และ 75 ul เติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl แล้วสังเกตสีที่และการตกตะกอนของอนุภาคทอง อ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นที่ 400 – 800 nm พบว่าปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ 10 µl โดยมีค่า λmax เท่ากับ 526 nm และค่า Absorbancemax เท่ากับ 0.3341

การทดสอบประสิทธิภาพการเชื่อมต่อของ อนุภาคทองคำกับ IgG-linked ด้วย Dot blot

เตรียมอนุภาคทอง ปริมาตร 10 ml กับ IgG-linked 100 และ 150 µl แล้วนำมาทดสอบกับโปรตีน NK603 ด้วยวิธี Dot blot พบว่าการ conjugated Gold กับ IgG 150 ul ให้ผลการทดสอบชัดเจนที่สุดโดยสามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาได้ที่โปรตีนต่ำสุดที่ 7.5 mg/ml

เมื่อตรวจสอบการจับกันของอนุภาคทองและแอนติบอดีโดยใช้กล้อง Transmission electron micrographs พบอนุภาคทองจับกับ IgG ดังภาพที่ 2B-C ส่วนภาพที่ 2A เป็นอนุภาคทองตั้งต้น และภาพที่ 2D เป็นตัวอย่างสารละลายที่ไม่จับกับอนุภาคทอง



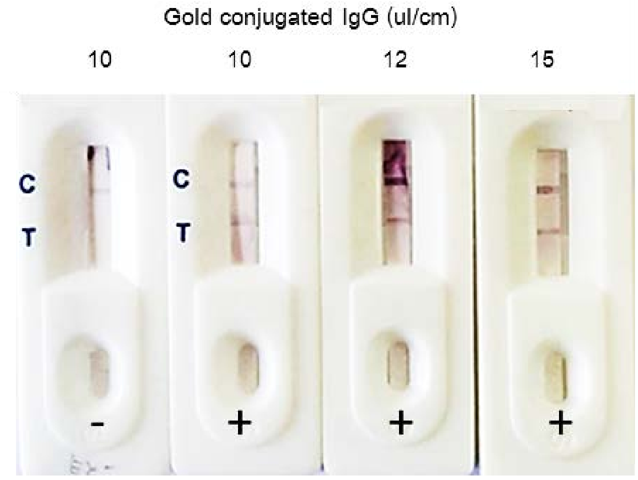
ภาพที่ 2 แสดงการจับกันของอนุภาคทองและแอนติบอดีโดยใช้กล้อง Transmission electron micrographs (TEM) ที่อนุภาคทองมีขนาด 40 nm (A) ตัวอย่างของ Colloidal gold (bio science) (B) un-conjugated gold (C) gold conjugated กับ NK603 IgG และ (D) gold conjugated กับ NK603 IgG ในสารละลาย Diluent

ทดสอบหา Extraction buffer เพื่อใช้ในการทดสอบตัวอย่าง

ทดสอบเพื่อหา Extraction buffer ที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง เพื่อใช้ในการทดสอบกับชุดทดสอบแบบรวดเร็วที่พัฒนาขึ้น ซึ่งมีสารละลาย 8 ชนิด คือ 1xPBS pH 7.4, 100mM Na2HPO4, 5M Guanidinuim, SEBA buffer, 2% CTAB, Doa extraction buffer, Buffer B pH8.0 และ Lysis buffer แต่สารละลาย 100mM Na2HPO4 ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด โดยไม่ก่อให้เกิด false positive และ false negative

ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

ทดลองผลิตชุดตรวจสอบ Strip test พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ เห็นขีดชัดเจนที่ระดับความเข้มข้นของ Gold 1 ml : IgG linked 15 ul พ่นบน Gold conjugate release pad ที่ได้รับการ Pretreatment แล้ว พ่นให้มีความหนาแน่น 12-15 ul/cm ให้ผลชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 3) คือสามารถอ่านผลเป็น negative ที่ตัวอย่าง Negative control และตัวอย่างที่ระดับโปรตีนทั้ง 3 ระดับ ปรากฏแถบสีม่วงทั้ง Control line และ test line การขีดเส้น Test line ด้วย IgG NK603 ความเข้มข้น 1 mg/ml และ เส้น Control line ด้วย Goat anti-rabitIgG ความเข้มข้น 1 mg/ml ทำการประกอบชุดทดสอบด้วยการติด Gold Conjugate release pad ลงไปแล้วตามด้วยแผ่น Sample pad บนแผ่น Backing (card Backing Pad AE 99) จากนั้นวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่มีเส้น Control line และ Test line แล้วลงบน Backing card แล้วจึงวางแผ่นซับ Wick pad ไว้ด้านบนสุด และเมื่อทำการทดสอบเจือจางตัวอย่างโปรตีนที่นำมาใช้ทดสอบชุด GLIFL พบว่าค่าต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้คือ 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 3 แสดงชุดตรวจสอบ Gold labeled IgG flow (GLIF) ด้วยการทำ serial dilutions ระหว่าง Gold conjugated IgG จาก NK603 IgG ที่ผ่านการติด linker แล้ว. ผลการทดสอบพบว่า เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าชุดตรวจสอบสามารถแสดงผลได้ภาพในระยะเวลา 5-10 นาที โดยที่ตัวอย่าง blank ให้ผลเป็น ลบ และตัวอย่างที่มีโปรตีน NK603 อยู่ให้ผลเป็นบวก

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบโปรตีน CP4EPSPS ในข้าวโพด NK603 ซึ่งเป็นข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช สามารถทำการเพิ่มปริมาณและทำบริสุทธิ์แอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้เพื่อทำชุดตรวจสอบโดยเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค DIBA พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงระหว่าง แอนติบอดีและแอนติเจนที่ผลิตได้ Gold labeled IgG flow Test ได้ ด้วยการทำเส้น Test line จาก NK603 IgG ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียม Gold conjugated release pad ด้วยปริมาณความเข้มข้นของ IgG linked 10-15 ไมโครลิตร ต่อ อนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่อทำการพ่นบน Gold conjugated release pad ในอัตรา 12-15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จะให้ผลการทดสอบชัดเจนภายในระยะเวลา 5-10 นาทีเมื่อทำปฏิกิริยาโปรตีน NK603 ด้วยสารละลาย Na_2HPO4 ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 0.3 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยไม่ก่อให้เกิด false positive เมื่อทดสอบกับ Blank sample ซึ่งจะต้องทำการพัฒนาในส่วนของระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป เพื่อให้สามารถเก็บได้นานขึ้นและองค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการผลิตชุดตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม NK603 ในเชิงพาณิชย์ได้ และได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผลิต Recombonaint Protein และการ Pure Protein ด้วยหลักการ Affinity Chromatography โดยใช้ specific (affinity) elution

การทดลองที่ 4 การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CrylAb (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ พงศกร สรรค์วิทยากุล อรรคพล ภูมีศรี
ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Piyarat Thammakijjawat Pongsakorn Sunvittayakul Arkkapon Phoomeesri
Khanitha Wongwathanarat Srimek Chowpongpang Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ลำดับเบสออกแบบไพรเมอร์และโคลนยีน *Cry1Ab* ขนาด 1377 bp เข้าสู่เวคเตอร์ pET200 ถ่ายยีนเข้าแบคทีเรีย *Eschericia coli* ตรวจสอบลำดับเบสเป็นส่วนหนึ่งของยีน *CrylAb* จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีขนาด 2,457 นิวคลีโอไทด์ เหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน Cry1Ab ด้วย IPTG ในอาหาร LB ผสมน้ำตาลกลูโคสและแลคโตส สกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วย B-Per Bacterial extraction reagent ทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Ni-NTA ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาดประมาณ 51 kdal วัดปริมาณความเข้มข้นเตรียมเป็นแอนติเจน ฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติซีรัม รวม 3 ครั้ง (1, 1.5 และ 2 มก./มล. ตามลำดับ) เจาะเก็บเลือดกระต่าย (แอนติซีรัม) ทุกสัปดาห์รวม 9 ครั้ง วัดค่าไตเตอร์ได้สูงสุด 1:204,800 นำมาสกัดแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) แล้วเชื่อมต่ออนุภาคทองคำ (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยวิธีการเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ซึ่งให้พันธะของอนุภาคทองคำและ IgG มีความเสถียร ผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส พ่น colloidal gold-IgG อัตรา

15ไมโครลิตร/เซนติเมตร control line ใช้ Goat anti-rabit IgG 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Test line ใช้ CryIAb-IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัตรา 3 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ประกอบเป็นชุดตรวจสอบทดสอบปฏิกิริยาการตรวจโปรตีน ปฏิกิริยาผลบวกจะเกิดเส้นสีม่วงของ test line และ control line หลังหยดสารละลายตัวอย่าง 5-10 นาที โดยชุดตรวจสอบมีความไวในการตรวจโปรตีนได้ต่ำสุดที่ 0.03 มิลลิกรัม สามารถเก็บรักษาชุดตรวจสอบในถุงฟรอย์ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 C และอุณหภูมิห้อง ได้เป็นเวลา 3 เดือน

คำสำคัญ : ยีน *Cry1Ab*, แอนติบอดี

บทนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง พัฒนาโดยบริษัทเมล็ดพันธุ์ของประเทศสหรัฐอเมริกา และได้รับอนุญาตให้ปลูกในเชิงการค้าตั้งแต่ปี 1995 ในสิบกว่าประเทศทั่วโลก ประเทศที่ปลูกมากอันดับต้นๆ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล แคนาดา และอาร์เจนตินา ซึ่งส่งขายทั่วโลก ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง Mon 810 เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดเดียวที่สหภาพยุโรปอนุญาตปลูกและใช้ในการเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง พัฒนาขึ้นโดยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมการตัดต่อยีน CryIAb จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* เข้าไปในพืชให้สร้าง CryIAb delta endotoxin มีผลต่อเยื่อบุกระเพาะของแมลง lepidopteran บัจจุบันมีหลายกรณี (events) ที่อนุญาตให้ผลิตและจำหน่ายเป็นการค้า เช่น Mon810, Bt11, Bt176 เป็นต้น โดยมีหลายสายพันธุ์ที่เป็นชนิดรวมยีน (stacked trait) ทั้งนี้การควบคุมการปลูกหรือใช้ประโยชน์จากพืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรมต่างๆ ขึ้นอยู่กับกฎหมายกำกับดูแลของแต่ละประเทศ ประเทศไทยโดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมวิชาการเกษตร ควบคุมตามพระราชบัญญัติกักพืช โดยกำหนดให้พืชดัดแปรพันธุกรรมเป็นสิ่งต้องห้าม รวม 89 สกุล ห้ามนำเข้า และปลูก หรือครอบครอง ยกเว้นได้รับอนุญาตเพื่อการศึกษาทดลอง และมีข้อยกเว้นการนำเข้าอาหารสำเร็จรูป ข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์หรืออาหารสำหรับมนุษย์หรือใช้เพื่อการอุตสาหกรรม และกระทรวงสาธารณสุข มีกฎหมายควบคุมการแสดงฉลากอาหารที่ได้จากเทคนิคการดัดแปลงพันธุกรรม กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ 22 ชนิดที่มีข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ปนสารพันธุกรรมหรือโปรตีนตั้งแต่ร้อยละ 5 เป็นอาหารที่ต้องมีฉลาก ทั้งนี้พืชหรือผลิตภัณฑ์พืชดัดแปรพันธุกรรมไม่สามารถจำแนกได้ด้วยตาเปล่า การตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม มีวิธีพื้นฐาน 2 แบบ คือ การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และการตรวจโปรตีน สำหรับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นการตรวจยีนที่ตัดต่อเข้าไปในพืช ด้วยเทคนิค PCR ห้องปฏิบัติการหลายแห่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจรับรองสินค้าพืช เนื่องจากเป็นวิธีการที่แม่นยำและมีความไวในการตรวจสอบ ทำได้ภายในเวลารวดเร็ว และสามารถตรวจสอบสินค้าเกษตรที่ถูกแปรรูปเป็นอาหารได้ แต่วิธีการนี้ก็มีข้อจำกัดคือไม่สามารถระบุปริมาณการปนเปื้อนของพืช GM ได้ บัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีมาตรฐานสามารถตรวจรับรองสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเชิงคุณภาพและปริมาณ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) การตรวจโปรตีนด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา บัจจุบันมีการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบแบบ ELISA (Enzyme Link Immuno sorbent assay) และ

LFD (Lateral flow device) ซึ่งรูปแบบ LFD เป็นชุดตรวจสอบแบบ strip มีการจำหน่ายเป็นการค้าสำหรับตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ และวัตถุดิบ แต่สำหรับกรณียีนหรือลักษณะการดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สร้างโปรตีน จะต้องตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเท่านั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของข้าวโพดต้านทานแมลงเป็นรูปแบบที่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ในภาคสนามได้สำหรับตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมต้านทานแมลง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อนุญาตปลูกและใช้ในเชิงการค้าเป็นระยะเวลานานและแพร่หลาย ซึ่งต้องคอยตรวจติดตามเฝ้าระวังการปนเปื้อนในแปลงปลูก รวมถึงการตรวจคัดกรองวัตถุดิบเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรม

ระเบียบวิธีการวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ดำเนินการที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร ในปี 2553-2558 ระยะเวลา 5 ปี มีวิธีการ

1. การเตรียมแอนติเจน

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *CryIAb* ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ในฐานข้อมูล GenBank ออกแบบและสังเคราะห์คู่ไพรเมอร์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โคลนยีนเข้าสู่ cloning vector วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับเบสและแปรรหัสเป็นโปรตีนโดยใช้ Program analysis โคลนยีนเข้า expression vector ถ่ายเข้าเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* ศึกษาการสร้างโปรตีนในอาหารเหลวผสมกลูโคสและแลคโตสความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน เก็บเซลล์แบคทีเรีย สกัดโปรตีน และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมในการ eluted โปรตีน ตรวจวัดความเข้มข้นและขนาดของโปรตีนที่แยกได้ด้วย SDS-PAGE

2. การผลิตแอนติซีรัม

นำรีคอมบีแนน์โปรตีน CryIAb บริสุทธิ์ มาใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย เพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีขึ้นในระบบเลือดของกระต่าย เจาะเก็บ Normal serum ก่อนฉีดแอนติเจน และวางโปรแกรมการฉีดแอนติเจน เลือกใช้วิธีการฉีดแบบ subcutaneous บริเวณต้นคอ จำนวน 3 ครั้ง ความเข้มข้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เจาะเก็บเลือดจากกระต่ายทุกสัปดาห์ ครั้งละ 10-40 มิลลิลิตร นำน้ำเลือดที่ได้ มาสกัดแยกเม็ดเลือดแดงออกเก็บส่วนที่เป็นแอนติซีรัมแบ่งใส่หลอดทดลองเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดค่าไตเตอร์ประสิทธิภาพสูงสุดของแอนติซีรัมที่สามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ใช้เป็นแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA

3. การผลิตชุดตรวจสอบ

นำแอนติบอดีที่ได้มาสกัด IgG ทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนด้วยวิธี DIBA ทดสอบความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับผลิตเป็นชุดตรวจสอบแบบ GLIFT kit นำ IgG บริสุทธิ์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับอนุภาค

ของทองคำ colloidal gold ทดสอบวิธีการต่อเชื่อมของ colloidal gold กับ IgG จากนั้นนำมาทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมในการพ่นบนแผ่น fiber glass สำหรับส่งผ่านโปรตีนในการทดสอบ ใช้ IgG บริสุทธิ์ เป็นเส้น test line และ control line ใช้ Goat Anti Rabbit IgG จากนั้นติดประกอบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb

4. ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb และทดสอบความจำเพาะโดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C, cp4EPSPS และความไวของการเกิดปฏิกิริยาโดยทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจโปรตีนได้ การจับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา วิธีการและอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ โดยทดสอบการเก็บในถุงฟรอย์ปิดสนิท ใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส และเก็บที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาทดสอบปฏิกิริยาทุก 2 สัปดาห์ รวม 6 ครั้ง)

ผลการทดลองและอภิปราย

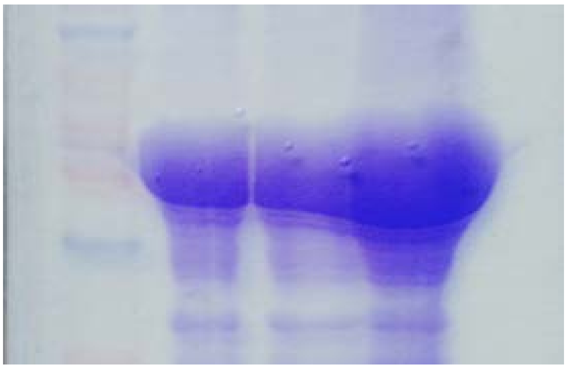
การเตรียมแอนติเจน

- การโคลนยีนและการเหนี่ยวนำสร้างโปรตีน

โคลนยีน CryIAb ขนาด 1377 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET200 ถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* BL21 คัดเลือกโคลน C2 และ C4 นำมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้สร้างโปรตีนเมื่อเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแบคทีเรียเจริญได้ในอาหารที่เติมน้ำตาลแลคโตส 1 mM แลคโตส

- การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน

สกัดโปรตีน ด้วย extraction buffer B-Per (www.piercentt.com) จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใสมาทำบริสุทธิ์ ผ่าน Ni-NTA column พบว่าสามารถ eluted ได้โปรตีนได้ทุก pH จึงเลือกใช้ pH 6 นำโปรตีนมาทำ dialysis ในสารละลาย 1X PBS buffer, pH 7.4 วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA และเจือจางโปรตีนแล้วตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่า รีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb มีขนาดประมาณ 51 kDa (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงรีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE

การผลิตแอนติซีรัม

- การทดสอบค่ำไตเตอร์

ทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บแต่ละครั้ง จำนวน 9 ครั้งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยเจือจางรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb ที่ใช้เป็นแอนติเจน ความเข้มข้น 10 ng/ul และเจือจางแอนติซีรัมที่เก็บแต่ละครั้งความเข้มข้น 1:200 ถึง 1: 1,638,400 ใช้ Normal Serum 1:200 เป็นตัวเปรียบเทียบ จากการตรวจวัด AS 1- AS9 พบ As1 ได้ค่าไตเตอร์สูงสุด คือ 1: 204,800

- การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ IgG

ปั่นตกตะกอนโปรตีนแอนติซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำไปสกัด IgG ด้วยคอลัมน์ protein A โดย เครื่อง AKTA pure ผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer sodium phosphate ความเข้มข้น 20mM pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 และนำไปผ่านคอลัมน์โปรตีน A ใช้ Elution buffer กรด citric ความเข้มข้น 0.1 M pH3 เติม Neutralizing buffer Tris-HCL ความเข้มข้น 1M pH 9.0 ปรับสภาพ pH เพื่อป้องกันการเสียสภาพของ IgG จากนั้นทำ desalting IgG ผ่านคอลัมน์ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง OD 280 คำนวณค่าความเข้มข้น

- ทดสอบปฏิกิริยา DIBA

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เจือจางความเข้มข้นของโปรตีน กับ IgG ด้วยวิธี Dot blot (DIBA) บนแผ่น nitrocellulose membrane เตรียมรีคอมบีแนนท์โปรตีน CryIAb 1 mg/ml เจือจาง 1:2 ถึง 1:256 หยดตัวอย่างจุดละ 5 ไมโครลิตร ใช้ IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml เจือจาง 1:2,000 ใช้ blank buffer และรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C 1:2 เป็น negative control ผลการทดสอบพบการเกิดปฏิกิริยาเป็นจุดสีม่วงทุกความเข้มข้นของโปรตีน ไม่เกิดปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์ที่เป็น negative control แต่พบการเกิดปฏิกิริยาจางๆ ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry9C

การผลิตชุดตรวจสอบ

- ทดสอบการเชื่อมต่อ colloidal gold, pH7.4 และ pH 9.0 กับปริมาณ IgG ที่เหมาะสมเท่ากับ 1.89 mg/ml โดยใช้ gold 100 ul ต่อ IgG 1.89 ug, 3.78 ug และ 5.67 ug ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการไม่ได้เติม IgG และ colloidal gold ปกติ เมื่อเติม 10% NaCl เปรียบเทียบสีของสารแขวนลอยที่ได้ พบว่าแต่ละความเข้มข้นมีการจับของ IgG กับ gold ที่อัตราเหมาะสมแตกต่างกนจึงให้สีของ gold ที่เปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกัน จึงทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสงตั้งแต่ 400-800 nm พบว่า colloidal gold pH 7.4 ปกติ มีค่า λmax = A520 และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ 0.3835 และเมื่อ conjugated กับ IgG วัดค่า λmax = A530 และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ 0.3249 มีค่าความต่าง 0.586 ในขณะที่ colloidal gold pH 9.0 ซึ่ง gold ปกติ วัดค่า λmax = A520 และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ 0.4284 และเมื่อ conjugated กับ IgG วัดค่า λmax = A530 และวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ 0.3668 มีค่าความต่าง 0.616 ซึ่งค่า λmax และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เป็นค่าที่ประเมินคุณภาพ

ของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำได้ ยิ่งค่าสูงก็แสดงว่าพันธะจับกันได้ดี (Michael, 2011) แสดงว่าควรเลือก colloidal gold pH 9.0 มา conjugated กับ IgG เหมาะสมกว่า colloidal gold pH 7.4

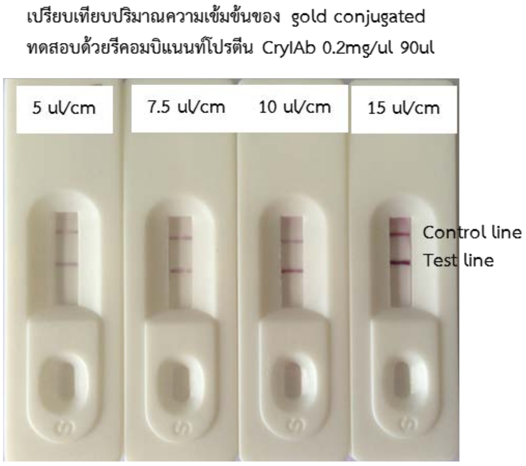
- ทดสอบปริมาณที่เหมาะสมของ Gold conjugated IgG

ปริมาณ Gold conjugated IgG ที่เหมาะสม ซึ่งอ่านค่าทั้ง control line และ test line ได้ชัดเจน คือ อัตรา 15 ul/cm แล้วประกอบชุดทดสอบโดยเริ่มจากการวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 มม. วางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) 1 มม. และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรน 1 มม. ตัดด้วยเครื่อง Biodot เป็น strip กว้าง 0.35 cm

การทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบ

- ทดสอบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้บัฟเฟอร์ PBS พบการเกิดปฏิกิริยาแต่เส้น test line และ control line ไม่คมชัด แต่เมื่อทดสอบด้วย extraction buffer (Sodium tetraborate, PVP, SDS, Triton X-100, Sodium sulfate pH 8.5-9.0) พบการเกิดปฏิกิริยาของ control line และ test line เส้นคมชัดเจนขึ้น ทั้งนี้การนำชุดตรวจสอบแบบ strip บรรจุลงตลับแนวนอน เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าการนำชุดตรวจสอบจุ่มลงในหลอดทดลองแนวตั้ง โดยชุดตรวจสอบที่ให้ผลการตรวจโปรตีน CryIAb ดีที่สุด ประกอบด้วย Gold conjugated อัตรา 15 ul/cm Test line ด้วย IgG CryIAb ความเข้มข้น 1.0 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 330 μg/ml (1:3) ทั้งนี้ gold conjugatedIgG 5-10 ul/cm เกิดปฏิกิริยาจางกว่า (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการทดสอบชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของความเข้มข้น gold conjugated อัตรา 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร/เซนติเมตร

- ทดสอบความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์ (Specificity)

นำชุดตรวจสอบมาทดสอบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่อัตราความเข้มข้น 200 ng/ul ประกอบด้วย โปรตีน CryIAb/Ac, Cry9C, NPTII และ CP4EPSPS พบปฏิกิริยาเกิดเส้น test line เป็นบวกกับทุกโปรตีน ยกเว้นโปรตีน NPTII และไม่เกิดปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์ซึ่งเป็น negative control อาจเนื่องจากปฏิกิริยา false positive อย่างไรก็ดีต้องมีการพัฒนาให้มีความจำเพาะมากขึ้นเพื่อป้องกันการอ่านผลผิดพลาด

- ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาและความไวในการตรวจวิเคราะห์ Sensitivity

ทดสอบความไวในการเกิดปฏิกิริยา โดยเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน CryIAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตรา 1:2 เริ่มจาก 200 ng/ul จนต่ำสุดคือ 0.39 ng/ul ใช้ปริมาณ 90 ไมโครลิตรต่อการทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีน ดังนี้ 18, 9, 4.5, 2.25, 1.125, 0.56, 0.28, 0.14, 0.07 และ 0.03 mg พบว่าชุดตรวจสอบที่พ่น gold ในอัตรา 7.5 µl/cm ได้ค่า sensitivity 0.56 mg ส่วนชุดตรวจสอบที่พ่น gold ในอัตรา 15 µl/cm ได้ความเข้มข้นโปรตีนต่ำสุดคือ 0.39ng/ul ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.03 มิลลิกรัม

- ทดสอบอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb

ผลการเก็บชุดทดสอบบรรจุใส่ซองอะลูมิเนียมฟรอยด์ ปิดซองให้สนิท นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คืออุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่อายุการเก็บรักษาทุก 15 วัน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการเก็บรักษาระยะแรกชุดตรวจสอบที่เก็บในอุณหภูมิห้อง และ 4 $^{\circ}$C เกิดผลบวกของปฏิกิริยากับโปรตีนเป้าหมายแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ของเส้น test line และ control line ภายใน 10-20 นาที แต่เมื่ออายุการเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานกว่า 2 สัปดาห์ ถึงนานกว่า 2 เดือน พบการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้เวลานานขึ้น ทั้งนี้จะดำเนินการทดสอบบัฟเฟอร์ และ GAR ในการประกอบชุดตรวจสอบใหม่ รวมถึงการลดความชื้นของชุดตรวจสอบก่อนเก็บเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้ได้นานขึ้น

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ชุดตรวจสอบโปรตีน CryIAb แบบ Strip พัฒนาจากการโคลนยีนที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของยีน *CryIAb* ที่ตัดต่อเข้าไปในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานแมลง เหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CryIAb ที่ถ่ายเข้าเวคเตอร์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรัม สกัดแอนติบอดีชนิด IgG เชื่อมกับอนุภาคทองคำ (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยวิธี nearly covalent ชุดตรวจสอบที่ใช้ Gold conjugated อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตร ใช้ CryIAb-IgG ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเส้นTest line และ Goatanti-rabit IgG อัตรา 1:3 (ความเข้มข้น 330ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเส้น control line อัตรา 3 ไมโครลิตร/เซนติเมตร บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนเป็นเส้นสีม่วงชัดสุดโดยผลบวกของการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดเส้นสีม่วง 2 เส้น และผลลบจะเกิดเฉพาะ contol line ความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจโปรตีน CryIAb ได้ คือ 0.03 มิลลิกรัม เวลาที่ใช้

ในการเกิดปฏิกิริยา 5-10 นาที สามารถเก็บชุดตรวจสอบในถุงฟรอยด์ปิดสนิทที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ 3 เดือน ทดสอบปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นต่อไปสำหรับการพัฒนา จะต้องศึกษาความจำเพาะและทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างใบและวัสดุอ้างอิง โดยทำการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาให้มีอายุได้นานขึ้น และระยะเวลาในการตรวจสอบไม่เกิน 5 นาที และรูปแบบในการผลิตชุดตรวจสอบโปรตีนแบบ GLIFT Kit สำหรับใช้ตรวจสอบโปรตีน CryIAb ของข้าวโพดต้านทานแมลง สายพันธุ์ MON810, Bt176, Bt11 นี้ ยังสามารถนำไปขยายผลการทดสอบในภาคสนามต่อกลุ่มเป้าหมายภาคเอกชน ผู้ประกอบการนำเข้าส่งออกสินค้าพืชและผลิตภัณฑ์ข้าวโพด และภาครัฐ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านกักกันพืช ฯลฯ

การทดลองที่ 5 การผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีน Cry9C (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

พงศกร สรรค์วิทยากุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
Pongsakorn Sunvittayakul Khanitha Wongwathanarat Piyarat Thammakijjawat
Prasert Wongwathanarat Srimek Chowpongpang

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CRY9C แบบ Strip โดยเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CRY9C จากยีน *cry9c* ผู้วิจัยสกัดโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรั่ม นำแอนติซีรั่มมาสกัดแอนติบอดี้ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) แล้วเชื่อมกับอนุภาคทองคำขนาด 40นาโนเมตร โดยใช้แผ่น ไนโตรเซลลูโลส เป็นวัสดุนำผ่านเปรียบเทียบการเชื่อมต่อ electrostatic force และ nearly covalent พบว่าการเชื่อม IgG กับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ทำให้พันธะของอนุภาคทองคำและ IgG มีความเสถียรกว่าการเชื่อมแบบ electrostatic force เมื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีน พบว่าการพ่นอนุภาคทองคำ-IgG ที่อัตรา 15 ไมโครลิตร/เซนติเมตรให้ผลดีที่สุดโดยใช้ Goatanti – rabit IgG ความเข้มข้น 330 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น control line และใช้ Anti-CRY9C IgG ความเข้มข้น 2.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น Test line ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนชัดเจนที่สุดทั้งนี้จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ โปรตีน CRY9C ได้คือ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนสามารถมองเห็นได้ชัดเจนประมาณ 20 นาที โดยสามารถเก็บชุดตรวจสอบได้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

คำสำคัญ : โปรตีน CRY9C, อนุภาคทองคำ, โปรตีนรีคอมบิแนนท์

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมในเชิงคุณภาพและปริมาณ วิธีที่นิยมและเป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์คือ PCRและReal-time PCR (Berdal and Holst-Jensen., 2001) ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้พัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON810, Bt176, Bt11, GA21 และ MON863 โดยได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ Real-time PCR นอกจากนี้กำลังดำเนินการวิจัยพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63, LL62 และ LL601 อย่างไรก็ดีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลานานและไม่สะดวก(Mettler *et al*., 2005) ต่อการนำไปใช้ในพื้นที่จริงในกรณีที่ต้องมีการเก็บตัวอย่าง ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อใช้ตรวจโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช ซึ่งช่วยให้การตรวจวิเคราะห์มีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

อนึ่งประเทศไทยมีนโยบายให้การสนับสนุนการพัฒนาศักยภาพการวิจัยและพัฒนาพันธุวิศวกรรมให้มีความเข้มแข็ง นำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังไม่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการเพาะปลูก ยกเว้นเพื่อการศึกษาทดลองเท่านั้น โดยอาศัยกลไกการควบคุมของพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551) ซึ่งกำหนดให้มีพืชดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 89 รายการเป็นสิ่งต้องห้ามนำเข้า ยกเว้นข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นอาหารหรือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะข้าวโพด StarLinkซึ่งทาง องค์การอาหารและยาไม่อนุญาตให้นำเข้าโดยเด็ดขาด โดยได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 215 พ.ศ.2544 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย โดยให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพันธุกรรมครายไนน์ซี (Cry9C DNA Sequence) หรือโปรตีนที่สร้างมาจากสารพันธุกรรมนี้ ในข้าวโพดและถั่วเหลือง เนื่องด้วยโปรตีน Cry9c มีลักษณะโมเลกุลที่คล้ายกับโปรตีนที่สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ในมนุษย์ (Investigation of Human Health Effects Associated with Potential Exposure to Genetically Modified Corn, 2001) ในการตรวจสอบโปรตีนชนิดนี้ นิยมใช้เทคนิค ELISA เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น โดยทางสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องซื้อชุดตรวจสอบ ELISA (Rica *et al*., 2012) จากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาประมาณชุดละ 30,000 บาท ชุดตรวจสอบ 1 ชุด สามารถตรวจสอบได้ 2–10 ตัวอย่าง ประเทศไทยต้องสูญเสียงบประมาณเป็นจำนวนมากในการซื้อชุดตรวจสอบนี้ การทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ใช้ได้เองภายในประเทศ ซึ่งจะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศและลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเป็น immune strip ให้มีความสะดวกและรวดเร็วในการใช้งานกับพื้นที่ในแปลงปลูกหรือด่านตรวจพืชได้อีกประการหนึ่งด้วย

ระเบียบวิธีการวิจัย

การผลิตชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วสำหรับโปรตีน Cry9C (เป็นกรณีศึกษาการใช้กับ) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ดำเนินการที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและกลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร ในปี 2553 – 2558 ระยะเวลา 5 ปี มีวิธีการ

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน CRY9C

สังเคราะห์ ยีน cry9C ของข้าวโพดจากฐานข้อมูล NCBI Protein Accession No. Q45733.1 (Lambert *et al*., 1996) ขนาด 1,100 bp โดยบริษัท GenScript, USA ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pET 200/D-TOPO® และถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* BL21 คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม มาเลี้ยงในอาหารเหลว2xYT 100 ml กับ Kanamycin 50 mg/l เพื่อใช้เป็น sterter 1 คืน เตรียมอาหารเหลว LB ที่เติม Glucose ให้ได้ความเข้มข้น 1% และ Kanamycin 50 mg/l ปริมาตร 1 – 2 ลิตร จากนั้นนำ starter ที่ได้เติมลงในอาหารที่ไว้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20% เลี้ยงโดยบ่มที่ 37°C ที่ 250 rpm นาน 1 ชม. หรือจนกว่าจะได้ OD600 ประมาณ 0.5 จากนั้นเติม IPTG 0.5 mM และเลี้ยงต่ออีก 3 ชม. เมื่อครบกำหนดนำเซลล์ทั้งหมดไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วนำเซลล์มาแช่ที่ -80 °C นาน 1 ชม. จากนั้นนำออกมาละลายและเติม Lysozyme ประมาณ 2 กรัม เขย่านาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแช่น้ำแข็งอีก 1 ชั่วโมง และนำไปแช่ที่ -80 °C อีก 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ที่ 4 °C แล้วนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Colum Ni-NTA

2. การผลิตแอนติซีรั่มจากกระต่าย

เจาะเลือดกระต่ายเก็บเป็น normal Serum เพื่อใช้เป็น negative control โปรตีน Cry9c ที่ใช้เป็นแอนติเจน นำมาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ผสมกับ adjuvant ชนิด Complete อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอของกระต่าย และฉีดกระตุ้นกระต่ายอีก 3 ครั้ง เว้นช่วงการฉีด1 สัปดาห์/ครั้ง โดยเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ฉีดแต่ละครจำนวนครั้งละ 0.5 mg/ml และเปลี่ยน adjuvant เป็นชนิด incomplete เมื่อครบกำหนดการฉีดสัปดาห์ที่ 3 ทิ้งระยะไว้ 1 สัปดาห์แล้วจึงเริ่มเจาะเพื่อเก็บแอนติซีรั่ม ทั้งหมด 8 ครั้ง ระยะห่าง 1 สัปดาห์/ครั้ง ในการเจาะแต่ละครั้ง จะใช้เข็มฉีดยาเจาะที่เส้นเลือดบริเวณใบหูของกระต่ายและเก็บเลือดประมาณ 20 ml/ครั้ง เลือดที่ได้ทิ้งไว้จน Clot แข็งแล้วจึงดูดเก็บ Serum ใสที่แยกชั้นกับเกล็ดเลือด นำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนใสซึ่งเป็น Antiserum เก็บไว้ที่ -20 °C

3. การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพIgG

นำแอนตีซีรั่มมาทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH4)_2SO_4$ แล้วสกัด IgG จากแอนติซีรัมด้วยคอลัมน์ protein A โดยใช้เครื่อง AKTA pure ทำโดยผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer sodium phosphate ความเข้มข้น 20mM ที่ pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ protein A ใช้ แล้วชะ IgG จากคอลัมน์ด้วย Elution buffer (กรด citric ความเข้มข้น 0.1 M, pH3) เติม Neutralizing buffer Tris-HCL ความเข้มข้น 1 M, pH 9.0 เพื่อปรับ pH ของ IgG แล้วนำ IgG ไปทำ Desalting วัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ 280 nm เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีน ตรวจสอบคุณภาพของ IgG ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทดสอบประสิทธิภาพของ IgG ด้วยวิธี NCM ELISA หรือ Dot blot โดยหยดโปรตีน Cry9C ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane จากนั้นทดสอบโดยนำ IgG ที่สกัดได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml และทดสอบที่อัตราส่วน 1:2,000 และใช้ BSA กับ blank buffer เป็น negative control

4. การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วย Electrastatic force

นำ IgG ที่สกัดได้มาผสมกับสารละลายอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 nm (Kestral) ที่ pH 7.4 โดยใช้ IgG ที่ปริมาตรแตกต่างกัน 500 µl จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาอนุภาคทองคำที่ไม่ได้จับกับ IgG และบ่มทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax ซึ่งเป็นตัวบอกความยาวคลื่นแสง ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ในการประเมินคุณภาพของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำ

5. การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วยพันธะ neary-covalent

ผสม IgG กับ Sodium periodate ($NaIO_4$) ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นกับหมู่ cis-diols และเปลี่ยนหมู่ aldehyde เป็น active aldehydes (–CHO) ทั้งนี้หมู่ (–CHO) จะสามารถทำปฏิกิริยา Coupling กับ Linker (Kumar *et al.*, 2008) ได้ ซึ่งในที่นี้ใช้โมเลกุล dithiol aromatic PEG6-CONHNH2 เป็นตัวเชื่อม (Linker) กับ IgG ได้ IgG-linker ไปผสมกับอนุภาคทอง เพื่อให้เกิดพันธะกึ่งโควาเลนต์ หรือ Nearly-covalent ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีและอนุภาคทองคำหลุดออกจากกันได้ยาก และ Blocking บริเวณที่ไม่มี Linker จับด้วยโปรตีน BSA 10% เพื่อป้องกัน Non-specific binding จากนั้นนำไปอ่านค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm เพื่อหาค่า λmax และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งเป็นตัวบอกความยาวคลื่นแสง ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เพื่อประเมินคุณภาพของพันธะระหว่าง IgG และอนุภาคทองคำ (Michael, 2011)

6. การเตรียมและการประกอบ Immunostrip

ดำเนินการเตรียมแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) โดยแช่ในสารละลาย Pretreatment (Conjugate pad pretreatmentbuffer, PBS (0.01 mol/L, pH 8.0), 10% sucrose, 0.05% Tween-20) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายอนุภาคทอง 10 ml แล้วนำไปผสมกับ IgG-linker500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีจากนั้นจึงเติม BSA 10% และนำไปปั่นตกตะกอน และนำตะกอนอนุภาคทองที่เตรียมไว้มาละลายในสารละลายทอง (0.01 mol/L PBS; pH 8.0, 1% concentration BSA, 0.05% PEG) ให้ได้ปริมาตร 600µl เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยขีดเส้น Test line ด้วย IgG Cry9c ความเข้มข้น 2.5 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti-rabit IgG ความเข้มข้น 330 µg/ml แล้วนำไปแช่ใน Blocking buffer (PBS (0.001 mol/L, pH 7.4), 1% concentration BSA) 30 นาที ที่ 37°C และตากให้แห้งที่ 37°C

เมื่อเตรียมอุปกรณ์ทุกอย่างแล้วจึงนำสารละลายทองคำ-แอนติบอดีพ่นบนแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ด้วยเครื่อง Biodot ปริมาณ 15 µl/cm จากนั้นนำ Conjugate release pad ไปอบที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วประกอบชุดตรวจสอบโดยประกอบ โดยเริ่มจากการวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm จากนั้นจึงวางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ประมาณ 1 mm เช่นกัน และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm เมื่อประกอบเสร็จแล้วจึงนำไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้าง 0.35 cm เพื่อให้สามารถใส่ลงตลับได้

ผลการทดลองและอภิปราย

การผลิตโปรตีน Cry9C ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

สามารถผลิตโปรตีน Cry9c ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมในระบบเซลล์แบคทีเรีย และหลังทำบริสุทธิ์พบว่าโปรตีน Cry9c มีขนาดประมาณ 48 kDa

การหาค่าตวามเข้มข้นของโปรตีน Cry9c ที่ทำให้บริสุทธิ์

สร้าง Standard curve ของ BSA ได้กราฟสมการเส้นตรงคือ y = 0.023x + 0.543 และ R^2 = 0.875 เมื่อนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก Cry9c [1-2] ที่อัตราส่วน 1:10 มาคำนวน พบว่าได้ความเข้มข้นของโปรตีน Cry9c [1-2] ประมาณ 250 mg/ml

การผลิตแอนตี้ซีรัมจากกระต่าย และวัดค่าไตเตอร์

ทดสอบค่าไตเตอร์แอนติซีรัม 1 – 6 ด้วยเทคนิค Indirect-Elisa พบว่า แอนติซีรัม 4 มีค่าไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 1: 102,400 แสดงว่าแอนติซีรัมตัวนี้ มีความเข้มข้นของ IgG มากที่สุด จึงทำให้ค่าไตเตอร์ของปฏิกิริยาสูงที่สุด

การทดสอบ NCM ELISA (Dot blot)

นำ Antiserum 6/2 มาทดสอบด้วยวิธี NCM ELISA โดยหยดโปรตีน Cry9c ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ความเข้มข้น 25 ng/µl, 50 ng/µl, 75 ng/µl, 100 ng/µl และ 1 mg/µl จากนั้นทดสอบ Dot blot ด้วย Antiserum 6/2 ที่อัตราส่วน 1: 2,000 พบว่า Antiserum 6/2 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดี สามารถจับกับโปรตีน Cry9c และตกตะกอนได้ที่ความเข้มข้นทุกค่าความเข้มข้นโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ Buffer negative control และ BSA negative control

ภาวะที่เหมาะสมต่อการ Conjugate ระหว่างอนุภาคทองคำและแอนตีบอดี

ทดสอบผสมสารละลายอนุภาคทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 nm กับ IgG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.4 µg/ml – 34 µg/ml, 51 µg/ml, 68 µg/ml และ 85 µg/ml บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติม NaCl 10% W/V 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาการจับกันของอนุภาคทองคำกับ IgG บ่มอีก 5 นาที

วัดค่า Absorbance ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 – 800 nm พบว่าปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ pH 7.4 คือ 6 µl โดยมีค่า λ_{max} เท่ากับ 530 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ $\Delta Absorbance_{max}$ = 0.0957

ส่วนของสารละลายอนุภาคทองคำที่ pH 9 ปริมาตร IgG ที่ดีที่สุดที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองคำเพื่อ Conjugate ที่ pH 9 คือ 5 µl โดยมีค่า λ_{max} เท่ากับ 530 nm และค่า $Absorbance_{max}$ เท่ากับ 0.3284 และ $\Delta Absorbance_{max}$ = 0.0879

โดยหาก IgG สามารถจับกับ Colloidal gold ได้อย่างสมบูรณ์ ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่าที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold อย่างเดียว สำหรับในการทดลองนี้พบว่าค่า $\Delta Absorbance_{max}$ ที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG pH9 มีค่าน้อยกว่าค่า $\Delta Absorbance_{max}$ ที่ได้จากสารละลาย Colloidal gold-IgG pH 7.4 ดังนั้นมีแนวโน้มว่าที่ pH สูง IgG Cry9c น่าจะเชื่อมกับ gold particle ได้มากกว่าที่ pH ต่ำ และการที่ค่า Abs ของ Colloidal gold-IgG ขึ้นไม่ถึงค่า Abs ของ สารละลาย Colloidal gold อาจเป็นไปได้ว่า IgG ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอและเกิดปฏิกิริยาแบบ Competitive ระหว่าง gold particle กับ โปรตีนชนิดอื่น ซึ่งจะต้องนำ IgG ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง

การเชื่อมอนุภาคทองคำด้วยวิธี Nearly-covalent

จากปัญหาการจับตัวกันของ IgG และ อนุภาคทองซึ่งมีความไม่แน่นอนสูงหากมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในสารละลายเพียงเล็กน้อย ทำให้หลุดออกจากกันได้เพราะเป็นการจับตัวกันโดย Electrostatic force จึงทดลองเชื่อม IgG และ อนุภาคทองด้วยโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายโพลิเมอร์ หรือ Heterofuntional Linker เข้ากับตำแหน่ง Fc ของแอนติบอดีบริเวณหมู่คาร์โบไฮเดรต (polysaccharide) โดยการผสมแอนติบอดี กับ Sodium periodate (NaIO4) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Coupling ระหว่างแอนติบอดีและอนุภาคทองโดยพันธะกึ่งโควาเล้น หรือ Nearly-covalent ซึ่งจะทำให้แอนติบอดีและอนุภาคทองคำหลุดออกจากกันได้ยาก และ Blocking บริเวณที่ไม่มี Linker จับด้วยโปรตีน BSA 10% เพื่อป้องกัน Non-specific binding

เปรียบเทียบความเสถียรของอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดีแล้วระหว่างการจับกันแบบ Electrostatic force และ การใช้วิธี Nearly-covalent เปรียบเทียบกราฟผลการวัดค่า Absorbance UV-Vis spectra ช่วงความยาวคลื่นแสง 400 – 800 nm ระหว่าง IgG-linker และ อนุภาคทองคำ (Nearly-covalent) กับ IgG ที่เชื่อมกับอนุภาคทองคำแบบปกติ (Electrostatic force) ที่อุณหภูมิ 4^{o}C เป็นเวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ภาพที่)12) พบว่าการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG-linker มีความเสถียรและมีความหนาแน่นของ IgG บนอนุภาคทองคำมากกว่าการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติโดยค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อม อนุภาคทองคำกับ IgG-linker ที่ เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงมีค่ามากกว่าค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติและเมื่อเวลาผ่านไปพบว่า ค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อม อนุภาคทองคำกับ IgG-linker ลดลงเล็กน้อยและหยุดอยู่ที่ระหว่าง 0.3155 – 0.3194 ในขณะที่ค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วใน 48 ชั่วโมง

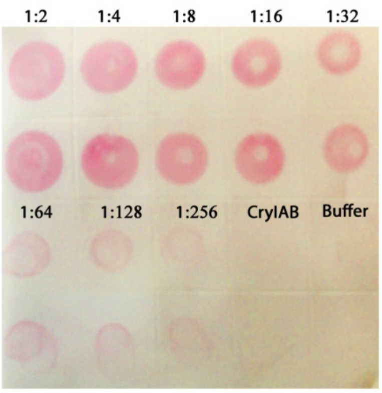
จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิการเก็บรักษาอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดี้แล้วมีผลต่อความเสถียรของแอนติบอดี้บนอนุภาคทองคำด้วย โดยพบว่าการเก็บรักษาอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับแอนติบอดี้แล้วที่อุณหภูมิห้อง ทำให้แอนติบอดี้หลุดออกจากอนุภาคทองคำได้ง่ายและเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C ทั้งสองกรณี คือทั้งการเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG-linker และ การเชื่อมอนุภาคทองคำกับ IgG ปกติ ภาพที่)14,15แต่ใน (กรณีของการเชื่อมด้วยIgG-linker ก็ยังมีความเสถียรมากกว่า IgG ปกติถึงแม้จะเป็นที่อุณหภูมิห้องก็ตามแต่ค่า $Absorbance_{max}$ ของการเชื่อมด้วย IgG-linker หยุดอยู่ที่ 0.341-0.374 ที่ 48 ชั่งโมง (ภาพที่ 15) ในขณะที่การเชื่อมด้วย IgG นั้น IgG หลุดออกจากอนุภาคทองคำทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง ที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) โดยค่า ($Absorbance_{max}$ กลับไปเท่ากับอนุภาคทองคำ Control) ที่ 48 ชั่วโมง

- การทดสอบหาปริมาตรที่เหมาะสมของ IgG-linker ในการเชื่อมกับอนุภาคทอง

พบว่าการผสม IgG-linker ปริมาตร 50 µl กับสารละลายอนุภาคทองคำ ได้ค่า λ_{max} ที่ 533 nm ซึ่งไม่เกิน 10 nm เมื่อเทียบกับค่า λ_{max} ของอนุภาคทองคำ และค่า $Absorbance_{max}$ ดีที่สุดเท่ากับ 0.3563 ดังนั้นจึงใช้ปริมาตร IgG-linker ที่อัตราส่วน 50 µl/ml gold solution ในการผสมสารละลายอนุภาคทองกับ IgG-linker

- การทดสอบ NCM ELISA (Dot blot) กับอนุภาคทองคำที่เชื่อมด้วย IgG-linker

พบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีบนอนุภาคทองกับโปรตีนเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมงไปแล้วโดยปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ถึงอัตราส่วน 1:256 หรือ ประมาณ 390 µg/mlและไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน CryIAB และ Negative control buffer (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผลการทดสอบ Dot blot จากอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับ IgG-linker

-การประกอบชุดตรวจสอบ Strip test

การทดสอบปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการพ่นลงบนแผ่น Gold conjugate release pad พบว่าที่ความเข้มข้น 15 µl/cm ให้ Test-line และ Control-line ที่ชัดเจนที่สุด

เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยขีดเส้น Test line ด้วย IgG Cry9c ความเข้มข้น 2.5 mg/ml และ Control line ด้วย Goat anti- rabit IgG ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปแช่ใน Blocking buffer (PBS (0.001 mol/L, pH 7.4), 1% concentration BSA) 30 นาที ที่ 37 $^{\circ}$C และตากให้แห้งที่ 37 $^{\circ}$C

ประกอบชุดตรวจสอบโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) ลงบนแผ่นรอง (Backing card) จากนั้นจึงวางแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ซึ่งได้รับการพ่นอนุภาคทองแล้วด้านล่างของแผ่นเมมเบรนโดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm จากนั้นจึงวางแผ่นรับตัวอย่าง)Sample application pad) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นซับอนุภาคทอง (Conjugate release pad) ประมาณ 1 mm เช่นกัน และวางแผ่นดูดซับ (Absorbance pad) ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (NCM) โดยให้เหลื่อมกับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 mm เมื่อประกอบเสร็จแล้วจึงนำไปตัด เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้าง 0.35 cm เพื่อให้สามารถใส่ลงตลับได้

การทดสอบปริมาณต่ำสุดที่ชุด Strip test สามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้

ทดสอบหาปริมาณต่ำสุดที่ชุด Strip test โดยเจือจางโปรตีนและทดสอบชุด Strip test จากความเข้มข้นโปรตีนตังแต่ 50 ng/µl, 25 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl 1 ng/µl พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้ที่ปริมาณโปรตีน Cry9c ต่ำสุดเท่ากับ 10 ng/µl

ภาพที่ 2 แสดงภาพการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของชุด Strip test สามารถตรวจพบโปรตีน Cry9c ได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

พัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CRY9C แบบ Strip โดยเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน CRY9C จากยีน cry9c ผู้วิจัยสกัดโปรตีนรีคอมบิแนนท์จากแบคทีเรีย Cry9c-Bl21 เพื่อใช้เป็นแอนติเจนผลิตแอนติซีรั่ม นำแอนติซีรั่มมาสกัดแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) แล้วเชื่อมกับอนุภาคทองคำขนาด 40 นาโนเมตร โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส เป็นวัสดุนำผ่านเปรียบเทียบการเชื่อมต่อ electrostatic force และ nearly covalent พบว่าการเชื่อม IgG กับอนุภาคทองคำแบบ nearly covalent ทำให้พันธะของอนุภาคทองคำและ IgG มีความเสถียรกว่าการเชื่อมแบบ electrostatic force เมื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบโปรตีน พบว่าการพ่นอนุภาคทองคำ-IgG ที่อัตรา 15ไมโครลิตร/เซนติเมตรให้ผลดีที่สุดโดยใช้ Goatanti-rabitIgG ความเข้มข้น 330 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น control line และใช้ Anti-CRY9C IgG ความเข้มข้น 2.3 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตร ขีดเป็นเส้น Test line ให้ผลการตรวจสอบโปรตีนชัดเจนที่สุดทั้งนี้จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ โปรตีน CRY9C ได้คือ 10นาโนกรัม/ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจนสามารถมองเห็นได้ชัดเจนประมาณ 20 นาทีโดยสามารถเก็บชุดตรวจสอบได้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

ทั้งนี้ในการทดลองพัฒนาเชิงพานิชย์สามารถกระทำได้โดยการพัฒนาคุณภาพและความบริสุทธิ์ของ IgG และพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเพื่อให้ชุดตรวจสอบมีอายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจาก 3 เดือน เป็น 1 ปี หรือมากกว่านั้น ทั้งนี้ชุดตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้น สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของโปรตีน Cry9C ในข้าวโพด ภายในประเทศ ซึ่งจะเป็นการลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศและลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเชิงพาณิชย์เป็น immune strip ให้มีความสะดวกและรวดเร็วในการใช้งานกับพื้นที่ในแปลงปลูกหรือด่านตรวจพืชได้อีกประการหนึ่งด้วย

การทดลองที่ 6 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423

อรรคพล ภูมีศรี ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Arkkapon Phoomeesri Khanitha Wongwathanarat Piyarat Thammakijjawat
Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

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

ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) เท่ากับร้อยละ 0.05, 0.5 และ 0.1 ตามลำดับ

คำสำคัญ : real-time PCR, LOD

บทนำ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่มีบริการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788, DP305423 และ DP356043 เป็นงานประจำ แต่เนื่องจากการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมีจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ และประเทศไทยต้องเปิดการค้าเสรี ทำให้สินค้าเกษตรจากประเทศเพื่อนบ้านและประเทศอื่นๆเข้ามาในประเทศได้ง่าย ส่งผลให้สินค้าเกษตรของไทยมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมโดยเฉพาะถั่วเหลืองที่มีการปลูกเพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการส่งออกสินค้าเกษตร จึงต้องเตรียมการและพัฒนาเทคนิคการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788, DP305423 และ DP356423 ให้ได้ตามมาตรฐานสากล เพื่อให้ประเทศคู่ค้าเกิดความมั่นใจ ข้อมูลโดยสังเขปของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ MON89788 ผลิตโดยบริษัท Monsanto โดยการตัดต่อยีน *Cp4EPSPS* เข้าสู่ถั่วเหลืองเพื่อให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชจำพวก Glyphosate ส่วน DP305423 ผลิตโดยบริษัท Dupont Pioneer โดยการตัดต่อยีน FAD2-1 เข้าสู่ถั่วเหลือง เพื่อเพิ่มปริมาณกรดโอเลอิคให้สูงขึ้นและลดปริมาณกรดไลโนเลอิคให้ต่ำลง และ DP356423 ผลิตโดยบริษัท Dupont Pioneer โดยการตัดต่อยีน gat 4601 และ gm-hra เข้าสู่ถั่วเหลือง เพื่อเพิ่มความต้านทานสารกำจัดวัชพืชจำพวก Glyphosate และ ALS inhibiting (Meyer *et al.*, 2006) (Pavely *et al.*, 2006) (Rood *et al.*, 2006)

โดยปกติ เมื่อต้องพัฒนาวิธีการตรวจยีนชนิดใหม่ ห้องปฏิบัติการฯ จะตรวจวิเคราะห์และจำแนกยีนโดยอ้างอิงวิธีการอ้างอิง (reference method) ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรป (the European Network of GMO Laboratories ENGL) ห้องปฏิบัติการฯ จะอ้างอิงลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ออกแบบเป็นไพรเมอร์และโพรบ รวมไปถึงอุณหภูมิในวงจรการทำงานของวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี real-time PCR ถึงแม้ว่าจะนำวิธีการจากห้องปฏิบัติการอ้างอิงมาใช้ แต่ก็ไม่สามารถทำตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงระบุไว้ได้ทั้งหมด เนื่องจากห้องปฏิบัติการฯ มีปัจจัยทางด้านอุปกรณ์ สารเคมีแตกต่างจากห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรป จึงมีความจำเป็นที่ต้องดัดแปลงวิธีการบางขั้นตอนเพื่อให้สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรได้ และต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการเพื่อพิจารณาว่า วิธีการดัดแปลง (in-house method) นี้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ สามารถใช้ได้กับอุปกรณ์ และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการฯหรือไม่ วิธีการดัดแปลงที่จะใช้ในห้องปฏิบัติการฯมีความแตกต่างจากวิธีการอ้างอิง (Delobel *et al.*, 2008) (Mazzara *et al.*, 2009)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ใช้พารามิเตอร์หลายอย่างในการพิจารณาว่าสามารถใช้วิธีการที่ดัดแปลงในห้องปฏิบัติการได้หรือไม่ พารามิเตอร์เหล่านั้นได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของ

กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน ความแม่น ความเที่ยง ความเบี่ยงเบน ความทวนซ้ำได้ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยในงานวิจัยมีวิธีการดำเนินการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423 ดำเนินการที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ในปี 2555- 2557 ระยะเวลา 2 ปี มีวิธีการ

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ใช้สารมาตรฐานที่ได้รับการรับรองแล้ว (Certified reference material: CRM) 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 DP305423 และ DP356043 ในระดับการปนเปื้อนร้อยละ 10 โดย CRM ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในรูปผงละเอียดซึ่งได้จากการบดเมล็ดถั่วเหลืองให้เป็นเนื้อเดียวกัน CRM ของ MON89788 จัดซื้อจาก American Oil Chemists' Society (AOCS) (Urbana, IL, USA) ส่วน CRM ของ DP305423 และ DP356043 จัดซื้อจาก Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (Geel, Belgium)

2. ไพรเมอร์และโพรบ

ใช้ฐานข้อมูล Online วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่จัดทำโดยห้องปฏิบัติการสหภาพยุโรป (Delobel *et al*., 2008) (Mazzara *et al*., 2009) ซึ่งระบุลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์และโพรบไว้ในเอกสารวิธีการตรวจวิเคราะห์ ทั้งไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการสังเคราะห์โดยบริษัท SIGMA ลำดับเบสของไพรเมอร์และโพรบแสดงไว้ในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ลำดับเบส (5 –3)	ขนาด (base pair)	วัตถุประสงค์	ความจำเพาะ
Lec for๒	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC	๒๐	ตรวจยีน endogenous (lectin)	ยีนถั่วเหลือง
GMO๓-๑๒๖ Rev	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC	๒๙		
Lec probe*	CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC	๒๔		
MON๘๙๗๘๘-F	TCC CGC TCT AGC GCT TCA AT	๒๐	ตรวจยีน MON๘๙๗๘๘ event-specific	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน MON๘๙๗๘๘ (Transgene-soybean genome junction site)
MON๘๙๗๘๘-R	TCG AGC AGG ACC TGC AGA A	๑๙		
MON๘๙๗๘๘-P*	CTG AAG GCG GGA AAC GAC AAT CTG	๒๔		
DP๓๐๕-f๑	CGT GTT CTC TTT TTG GCT AGC	๒๑	ตรวจยีน DP ๓๐๕๔๒๓ event-specific	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน DP ๓๐๕๔๒๓ (Transgene-soybean genome junction site)
DP๓๐๕-r๕	GTG ACC AAT GAA TAC ATA ACA CAA ACT A	๒๘		
DP๓๐๕-p*	TGA CAC AAA TGA TTT TCA TAC AAA AGT CGA GA	๓๒		
DP๓๕๖-f๑	GTC GAA TAG GCT AGG TTT ACG AAA AA	๒๖	ตรวจยีน DP ๓๕๖๐๔๓ event-specific	รอยต่อระหว่างยีนถั่วเหลืองกับยีน DP ๓๕๖๐๔๓ (Transgene-soybean genome junction site)
DP๓๕๖-r๑	TTT GAT ATT CTT GGA GTA GAC GAG AGT GT	๒๙		
Dp๓๕๖-p*	CTC TAG AGA TCC GTC AAC ATG GTG GAG CAC	๓๐		

*เส้นโพรบติดฉลากด้วย ๕'-carboxy-fluorescein (FAM) และ ๓' tetramethylrhodamine (TAMRA)

3. การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneScan ร่วมกับ lysis buffer ของ Eurofins (Hamburg, Germany) ในการสกัดดีเอ็นเอจาก CRM ทั้ง 3 ชนิด และใช้ Wizard mini column ในการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ แล้วประมาณการความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี real-time PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

4. สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

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

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา real-time PCR คือ 20 ไมโครลิตร (ul) โดยมีสารชนิดต่างๆตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงชนิดสารและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร		ปริมาณ (µL)/1 ปฏิกิริยา
น้ำยาโพรบ master	Master mix	๑๐
Forward ไพรเมอร์		๐.๕
Reverse ไพรเมอร์		๐.๕
โพรบ		๐.๕
น้ำ		๓.๕
ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA)		๕
ปริมาณรวม (Master mix + ดีเอ็นเอต้นแบบ)		๒๐

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

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอน อุณหฎูมิ และจำนวนรอบการทดงานของปฏิกิริยา Real-time PCR

ขั้นตอน		จำนวนรอบการทำงาน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (วินาที)
UNG*		๑	๕๐	๑๒๐
Initial denaturation		๑	๙๕	๖๐๐
Amplification	Denaturation	๔๕	๙๕	๑๕
	Annealing และ Extension		๖๐	๖๐

*เป็นขั้นตอนที่ใช้กับยีน MON๘๙๗๘๘ เท่านั้น ส่วนยีน DP๓๐๕๔๒๓ และ DP๓๕๖๐๔๓ ให้เริ่มที่ขั้นตอน Initial denaturation

5. สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ผลการทดลองและอภิปราย

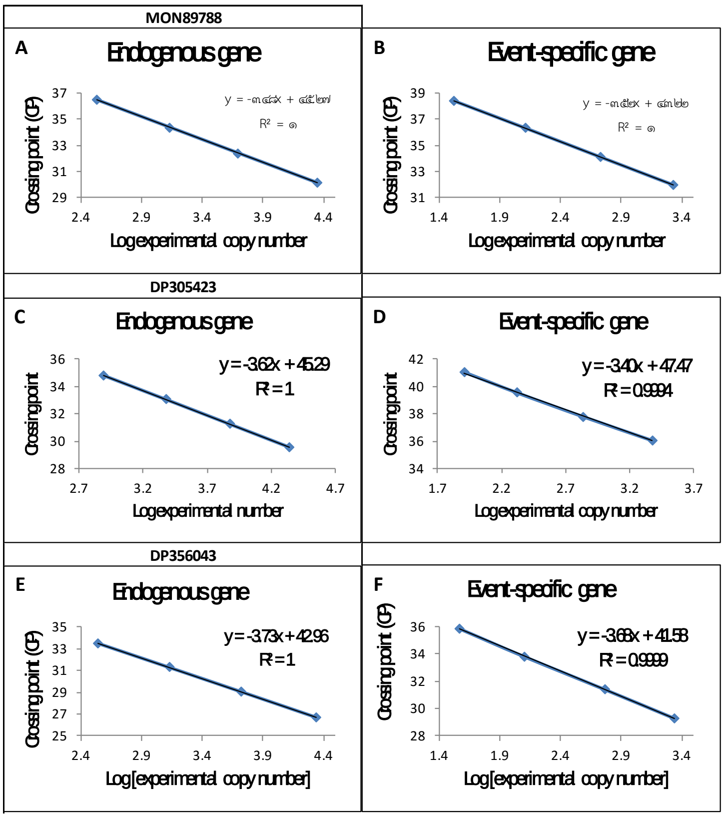
การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ

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

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

การสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ถูกตัดต่อเข้าไปในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788, DP305423 และ DP356043 เป็นการหาปริมาณการปนเปื้อนของยีน event-specific เทียบกับยีน endogenous (lectin) ซึ่งเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ที่มีอยู่แล้วในถั่วเหลือง โดยการเปรียบเทียบจะแสดงผลเป็นเป็นร้อยละ (%) การปนเปื้อน ดังนั้นการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific จะต้องหาปริมาณทั้งยีน event-specific และยีน endogenous ควบคู่ไปพร้อมกันเสมอ การคำนวณหาปริมาณของยีน event-specific และยีน endogenous สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของทั้งยีน event-specific และยีน endogenous กราฟความเข้มข้นมาตรฐานเป็นกราฟที่สร้างโดยใช้ค่าเฉลี่ย crossing point (CP) เป็นแกน X และค่าเฉลี่ย [log ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ] เป็นแกน Y สามารถสร้างเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน lectin และยีน event-specific ในถั่วเหลืองทั้ง 3 ชนิด ดังนี้



ภาพที่ 1 A, C และ E แสดงกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ Lectin endogenous gene สำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, DP 305423 และ DP356043 ตามลำดับ B, D และ F แสดงกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ Transgene ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, DP 305423 และ DP356043 ตามลำดับ

จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบ ทั้ง endogenouse gene และ envent-specific gene ในส่วนของข้าวโพด MON89788, ถั่วเหลือง DP305423 และถั่วเหลือง DP356043 มีค่าความชันและค่า R^2 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วนค่าค่า PCR efficiency ของ endogenouse gene และ envent-specific สำหรับ ข้าวโพด MON89788 เท่ากับ ร้อยละ 96.35 , ถั่วเหลือง DP305423 (ร้อยละ 94.7, ร้อยละ 102.9) และถั่วเหลือง DP356043 (ร้อยละ 87.5, ร้อยละ 88.5) ซึ่ง R^2 ที่ยอมรับได้ควรมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 0.98 เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือในการประมาณค่าบนแกน X โดยใช้ค่าบนแกน Y หรือการใช้ค่าบนแกน Y ในการประมาณค่าบนแกน X ค่าความชันของกราฟมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา PCR (PCR efficiency) ค่าความชันที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ควรอยู่ระหว่าง -3.1 ถึง -3.6 ค่า PCR efficiency ที่ได้จากเครื่อง real-time PCR ควรมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 95 กับ 105 (Hougs และ Žel, 2011)

ดังนั้นจึงสามารถใช้กราฟความเข้มข้นมาตรฐานทั้ง 2 กราฟในการคำนวณปริมาณของยีน endogenous และยีน event-specific ในถั่วเหลือง MON89788 มีความน่าอย่างน่าเชื่อถือ ส่วนถั่วเหลือง DP305423 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานของยีน event-specific มีความเป็นเส้นตรงสูง แต่กราฟความเข้มข้น

มาตรฐานของยีน endogenous มีความเป็นเส้นตรงที่คลาดเคลื่อนไปจากค่าปกติ ซึ่งอาจส่งผลต่อความแม่นยำและความน่าเชื่อถือในการคำนวนปริมาณยีน lectin และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 สำหรับกราฟในส่วนของยีน endogenous และ event-specific อยู่นอกช่วงค่าปกติ

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

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

ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นถั่วเหลืองที่มียีน event-specific ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณร้อยละ 10 ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบว่า อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลง สามารถให้ผลการตรวจที่มี ‘ความแม่น’ และ ‘ความเที่ยง’ ในการหาร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific เพียงใด รวมทั้งตรวจสอบว่าห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงหรือเบี่ยงเบนไปจากปริมาณการปนเปื้อนที่บริษัทผู้ผลิตระบุไว้ที่ร้อยละ 10 หรือไม่ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation: RSD) ของการหาปริมาณยีน endogenous (lectin) และยีน event-specific ทั้ง 3 ชนิด ในการทดลองทั้ง 4 รอบ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยการวัดค่า RSD (%) ในการหาปริมาณยีน event-specific ชนิด MON89788 DP305423 และ DP356043 ทั้ง 4 รอบ อยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ คือ ไม่เกินร้อยละ 25 (Hougs และ Žel,_2011) แสดงว่า อุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถให้ผลการตรวจที่มีความเที่ยงสูง นั่นคือจำนวน copy ของ endogenous gene (lectin) และยีน event-specific ทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละครั้งมีความใกล้เคียงกัน และจำนวน copy ยีนไม่แกว่งออกไปจากค่าเฉลี่ยมากนัก ยกเว้นการทดลองครั้งที่ 2 ในการหาปริมาณยีน event-specific ในถั่วเหลือง DP356043 ที่ได้ค่า RSD เท่ากับร้อยละ 26.94 ซึ่งออกนอกช่วงค่าปกติไปเล็กน้อย

ในส่วนของความแม่นของวิธีการตรวจ จะตรวจวัดโดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีน event-specific ที่ได้จากการทดลอง กับร้อยละการปนเปื้อนจริงที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต CRM จากการทดลองคำนวณร้อยละการเบี่ยงเบน (% bias) เท่ากับร้อยละ 4.75 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (±25%) สำหรับการทดลองทั้ง 4 รอบ สำหรับยีน MON89788 ส่วนยีน DP305423 และ DP356043 มีค่าเฉลี่ย % bias เท่ากับร้อยละ 6.82 และ 10.33 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ค่าอยู่ในช่วงค่าปกติ (±25%) (Hougs และ Žel, 2011) ดังนั้น อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ สามารถตรวจหาร้อยละการปนเปื้อนได้ใกล้เคียงกับค่าจริง

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

ความทวนซ้ำเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ว่า ค่าที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละครั้งมีความแปรปรวนมากน้อยเพียงใดเมื่อทำการตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ดัดแปลงให้เข้ากับห้องปฏิบัติการฯ ควรมีความทวนซ้ำได้อยู่ในเกณฑ์ดี โดยความทวนซ้ำได้จะรายงานผลในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความทวนซ้ำได้ (relative repeatability standard deviation: RSDr) ซึ่งค่า RSDr ที่ยอมรับได้ควรมีค่าไม่เกินร้อยละ 25 (Hougs และ Žel, 2011) และจากการทดสอบพบว่าค่า (% RSDr) ของการเพิ่มจำนวนยีน endogenous (lectin) ในทุกระดับความเข้มข้น มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ไม่เกินร้อยละ 25 ดังนั้น วิธีการดัดแปลงสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแปรปรวนน้อย เมื่อตรวจวัดโดยผู้ตรวจวัดคนเดียวกัน ตรวจวัดโดยใช้วิธีการเดียวกัน ใช้เครื่องมือตรวจวัดเดียวกัน ตรวจวัดในสถานที่เดียวกัน และตรวจวัดในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน

การเพิ่มจำนวนยีน event-specific ด้วยวิธี real-time PCR ดำเนินการไปพร้อมๆกันกับการเพิ่มจำนวนยีน endogenous เพื่อที่จะคำนวณความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOQ) ซึ่งค่า LOQ ของการทดสอบยีน MON89788 เท่ากับร้อยละ 0.092 แต่ LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (reference method) ซึ่งระบุว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 0.09 ซึ่งพบว่ามีความใกล้เคียงกันพอสมควร เช่นเดียวกับ DP305423 ค่า LOQ อยู่ที่ร้อยละ 0.462 หรือประมาณร้อยละ 0.5 (%copy/copy) แต่ LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.08) และการทดสอบยีน DP3560433 มีค่า LOQ เท่ากับร้อยละ 0.462 หรือประมาณร้อยละ 0.5 (%copy/copy) ซึ่ง LOQ ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าค่า LOQ ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.08) สาเหตุอาจเกิดจากวิธีการดัดแปลงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอ้างอิง

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

พบว่าการตรวจสอบยีน *MON*89788 ให้ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีน event-specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยวิธี real-time PCR (LOD) คือ 10 copy ของยีน หรือร้อยละ 0.05 (% copy/copy) ซึ่งแตกต่างไปจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิงเล็กน้อย (ร้อยละ 0.045) ส่วน LOD ของการตรวจสอบยีน DP305423 คือ 100 copy ของยีน หรือร้อยละ 0.5 (%copy/copy) ซึ่งแตกต่างจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.04) พอสมควร และ LOD ของการตรวจสอบยีน DP356043 คือ 20 copy หรือร้อยละ 0.1 (%copy/copy) ซึ่งแตกต่างจากค่า LOD ที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง (ร้อยละ 0.04) เช่นเดียวกับยีน DP305423 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากวิธีการดัดแปลงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ (10 ng/ul) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในวิธีการอ้างอิง (ไม่เกิน 100 ng/ul)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ค่าพารามิเตอร์ต่างที่ตรวจวัดได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ สำหรับถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 4 ดังนี้

ตารางที่ 4 สรุปค่าพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon89788 และ DP356043

พารามิเตอร์	ค่าที่วัดได้ในห้องปฏิบัติการ						ค่าปกติ*
	MON89788		DP305423		DP356043		
	ยีน endogenous	ยีน event-specific	ยีน endogenous	ยีน event-specific	ยีน endogenous	ยีน event-specific	
Linearity:							
$R^๒$	๑.๐๐๐	๑.๐๐๐	๑.๐๐๐	๐.๙๙๙	๑.๐๐๐	๐.๙๙๙	๐.๙๘-๑.๐๐๐
Slope	-๓.๔๘	-๓.๕๒	-๓.๖๒	-๓.๔๐	-๓.๗๓	-๓.๖๘	-๓.๑ ถึง-๓.๖
PCR efficiency	๙๗.๑๐%	๙๖.๓๕%	๙๔.๗๐%	๑๐๒.๙๐%	๘๗.๕๐%	๘๘.๕๐%	๙๕% - ๑๐๕%
Accuracy และ precision:							
%Bias	-	๔.๗๕%	-	๖.๘๒%	-	๑๐.๓๓%	±๒๕%
Relative standard deviation (RSD)	๕.๑๑%	๕.๙๙%	๙.๑๐%	๑๔.๕๖%	๙.๒๐%	๑๖.๕๒%	<๒๕%
Repeatability:							
Relative repeatability standard deviation (RSDr)	๔.๒๔%	๓.๗๒%	๑.๗๕%	๓.๙๙%	๔.๕๕%	๒.๓๕%	<๒๕%
Limit of quantification (LOQ)	-	๐.๑๐%	-	๐.๕๐%	-	๐.๕๐%	-
Limit of detection (LOD)	-	๐.๐๕%	-	๐.๕๐%	-	๐.๑๐%	-

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

จะเห็นได้ว่าค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม MON89788 อยู่ในช่วงค่าปกติทั้งหมด ในส่วนของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 นั้น พารามิเตอร์ของความเป็นเส้นตรง (Linearity) ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติ ซึ่งได้แก่ ความชัน (slope) และ PCR efficiency ของยีน endogenous นอกจากนี้ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP356043 ก็มีความชันและ PCR efficiency ของทั้งยีน endogenous และยีน event-specific ไม่อยู่ในช่วงค่าปกติเช่นกัน โดยอาจมีสาเหตุตามที่ได้กล่าวมาแล้วในผลการทดลองและวิจารณ์

นอกจากพารามิเตอร์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ค่า LOD และ LOQ ที่ได้จากวิธีการดัดแปลงก็แตกต่างไปจากที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง โดยเฉพาะค่า LOD และ LOQ ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม DP305423 และ DP356043 หากต้องนำวิธีการดัดแปลงนี้ไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการ อาจต้องเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นเพื่อให้ได้ค่า LOD และ LOQ ใกล้เคียงกับที่ระบุไว้ในวิธีการอ้างอิง

การทดลองที่ 7 วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ พงศกร สรรค์วิทยากุล อรรคพล ภูมีศรี
ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
Piyarat Thammakijjawat Pongsakorn Sunvittayakul Arkkapon Phoomeesri
Khanitha Wongwathanarat Prasert Wongwathanarat

บทคัดย่อ

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 เชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยวิธีมาตรฐาน JRC-EURL ดำเนินการระหว่างปี 2556-2558 ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม อาคารปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ สกัดดีเอ็นเอด้วย GeneScan Extraction buffer นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Wizard Miniprep DNA Purification วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 40 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LightCycler480 ตรวจความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สำหรับแต่ละกรณี และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเทียบกับยีนอ้างอิงพืชโดยไพรเมอร์ Adh1 หรือ hmg ตามกรรมวิธีมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์การเจือปน ผลการทดสอบพบว่าการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพแต่ละคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะในการตรวจยีน Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162 ที่ LOD 0.1 % การวิเคราะห์ค่าการทวนซ้ำของวิธี (repeatability) อยู่ในค่ามาตรฐาน RSdr < 0.5 ค่า Slope การทดสอบอยู่ในค่ามาตรฐาน คือ -3.2 ถึง -3.6 ทั้ง target gene และ reference gene ค่า R^2 coefficient สูงกว่า 0.98 ค่าความเที่ยงตรง (Trueness) พบว่ามีบางความเข้มข้นของตัวอย่างวิเคราะห์ได้เปอร์เซ็นต์ค่าความเบี่ยงเบน (bias) สูงกว่ามาตรฐานโดยเฉพาะข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR162 ซึ่งไม่มีค่าอ้างอิงมาตรฐานการเจือปน และมีความผิดพลาดการเจือจางให้ตัวอย่างมียีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ ซึ่งไม่สามารถใช้วัสดุอ้างอิงที่ไม่มีการรับรองค่าการปนเปื้อนใช้เทียบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้จึงสามารถใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพเท่านั้น
คำสำคัญ : Real-time PCR, ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

บทนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม มีการวิจัยพัฒนาและอนุญาตปลูกในเชิงการค้าในหลายประเทศ ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นยีนเดี่ยว (single gene) และยีนผสม (stack trait) บัจจุบันได้รับการอนุญาตจำนวนกว่า 120 กรณี (events) ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR 604 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทซินเจนทา เพื่อให้มีคุณสมบัติต้านทานจำเพาะต่อหนอนเจาะราก (Rootworm) ที่เป็นปัญหาแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อข้าวโพดในประเทศแถบยุโรป โดยโปรตีนจากยีนดังกล่าวไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย MIR604 เป็นยีน (trait) ที่ได้รับการรับรองให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ได้เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ และคน สำหรับประเทศในสหภาพยุโรปในปี 1999 (2542) มีชื่อการค้าเป็น Syngenta Agrisure™ RW โดยการโคลนยีนในตระกูล *Cry* ชื่อยีน *mCry3a* gene จากแบคทีเรีย *Bacillus turingenesis* (Bt) แปรรหัสโปรตีน Cry3a บริเวณรากของข้าวโพด โดยใส่ marker gene mpi จากแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งสามารถย่อยน้ำตาลแมนโนสได้ สามารถคัดเลือกได้โดยทดสอบการเจริญบนอาหารที่ผสมน้ำตาลดังกล่าวข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event

MIR604 ได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นอาหารสัตว์ อาหารคน ในหลายประเทศได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่นและการรับรองให้นำเข้าได้ในหลายประเทศ ได้แก่ เม็กซิโก ไต้หวัน เกาหลี จีน ฟิลิปปินส์ รัสเซีย ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR604 ห้องปฏิบัติการของ JRC-EC ได้ทำการพัฒนาวิธีการและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เสร็จสิ้นแล้วในปี 2007 (Mazzara *et al*., 2007)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MON 88017 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ สหรัฐอเมริกา โดยการพัฒนาให้เป็น stack traits โดยการตัดต่อยีนต้านทานแมลง *cry*3Bb1 จาก *Bacillus thuringiensis* (Bt) subspecies *kumamotoensis* แปรรหัสโปรตีน Cry3Bb ซึ่งจะเป็นพิษต่อตัวอ่อนของแมลงที่กินเข้าไป มีผลในการป้องกันแมลง western corn rootworm (*Diabrotica vigifera*) และ northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) และยีน *cp4 epsps* ที่ตัดต่อยีนเข้าไปเพื่อให้ข้าวโพดมีคุณสมบัติทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท โดยการถ่ายยีนสู่ข้าวโพดลูกผสมสายพันธุ์ LH198 โดยแบคทีเรียอโกรแบคทีเรีย ได้รับการรับรองแล้วในหลายประเทศ ตั้งแต่ปี 2005-2009 ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา จีน สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี เม็กซิโก ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ event-specific gene ในเชิงปริมาณ มีวิธีการตามมาตรฐาน JRC48920 (Delobel *et al*., 2008)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MON 89034 พัฒนาขึ้นโดยบริษัทมอนซานโต้ สหรัฐอเมริกา โดยแปรรหัสโปรตีน 2 ชนิด จากยีน *cry1A.105* และยีน *cry2Ab2* จากแบคทีเรีย Bacillus *thuringiensis* มีคุณสมบัติต้านทานต่อหนอน lepidopteran เช่น fall armyworm (*Spodoptera* sp.), black cutworm (*Agrotis ipsilon*), european corn borer (*Ostrinia nubilalis*) และ the corn earworm (*Helicoverpa* zea) ได้รับการรับรอง trait ในหลายประเทศ ตั้งแต่ปี 2007-2009 ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย บราซิล แคนาดา โคลัมเบีย สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ event-specific gene ในเชิงปริมาณ มีวิธีการตามมาตรฐาน JRC48921 (Savini *et al.,* 2008)

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event MIR 162 พัฒนาขึ้นโดยบริษัท ซินเจนทา โดยการถ่ายฝากยีน *vip*3Aa20 จาก *B. thuringiensis* strain AB88 เพื่อสร้างโปรตีน vip3Aa ที่เป็นพิษต่อหนอนแมลง Lepidopteran และยีน pmi จาก *E. coli* เพื่อสร้างเอนไซม์ Phosphomannose isomerase (PMI) เพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ซึ่งปัจจุบันมีหลายประเทศ เช่น อาร์เจนตินา บราซิล คานาดา และ สหภาพยุโรป เป็นต้น ที่ยอมรับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ MIR 162 ในเชิงการค้าเพื่อใช้เป็นอาหารและการแปรรูปในอุตสาหกรรม และเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งวิธีการมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ event-specific เชิงปริมาณ ตามมาตรฐาน EURL-GMFF report maize MIR 162 (Delobel *et al*., 2011)

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ยีนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon89034, Mon88017 MIR604 และ MIR 162 ได้พัฒนาขึ้นโดยบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มอนซานโต้ และ JRC reference methods โดยปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่ได้จัดทำข้อมูลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ของยีนทั้ง 4 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดยีนที่มีอยู่ในการทดสอบความชำนาญ (Proficiency test) ของ USDA-GIPSA งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรมจากข้าวโพดของยีนที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ โดยเป็นข้อมูลสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR 162 เพื่อให้ได้วิธีการและผลการทดสอบถูกต้อง ได้มาตรฐานสากล

ระเบียบวิธีการวิจัย

วิจัยและพัฒนาความใช้ได้ของวิธีการทดสอบการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 ดำเนินการที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ในปี 2555-2558 ระยะเวลา 3 ปี มีวิธีการ

1. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162

สืบค้นข้อมูลลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสาร Validation methods ของ JRC-EURL การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

2. การสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ด้วย Lysis buffer (GeneScan extraction method) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยผ่าน Wizard Miniprep DNA Purification Kit ทำการสกัดตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3. ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR และความจำเพาะของไพรเมอร์

ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีมาตรฐาน ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ทดสอบตามกรรมวิธีมาตรฐานดัดแปลงตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธ์อื่นๆ และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมประกอบด้วย ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017, Mon89034, MIR604, MIR162, Mon810 Bt11, Bt176, GA21, NK603, TC1507, Mon863, CBH351, RR soy และ DP356043

4. ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection)

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมแต่ละกรณี จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีความเข้มข้นหรือจำนวน copies ยีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ จากนั้นทำปฏิกิริยา real-time PCR ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้ทุกซ้ำคือค่า LOD ของการวิเคราะห์

5. ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบที่การปนเปื้อนระดับต่างๆ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ สำหรับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MIR604 มีตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่การปนเปื้อนระดับต่างๆ ได้แก่ Level1 0.1 % Level2 1.0 % และ Level3 10% และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมอีก 3 กรณี ไม่มีตัวอย่างวัสดุอ้างอิงระดับการปนเปื้อนต่างๆ จึงต้องคำนวณและทำการเจือจางจาก 10% ให้มีการปนเปื้อน ที่ระดับต่างๆ ได้แก่ U1 (non dilute), U2-10%, U3-5%, U4-1%, U5-0.5% และ U6-0.1%

ทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ยีนเป้าหมาย (ยีนที่ดัดแปรพันธุกรรม) และยีนอ้างอิงของพืช นำค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน กราฟความเข้มข้นมาตรฐานสร้างโดยใช้ค่า crossing point (CP) เป็นแกน Y และค่า log ฐาน 10 ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวน copies ของยีน) เป็นแกน X ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replicates) ทดลองซ้ำ 4 รอบ (repeat)

- วิเคราะห์ค่าความแม่น (Accuracy) ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) และค่าเบี่ยงเบน (Bias) ของการคำนวณปริมาณการปนเปื้อนของยีนจำเพาะที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม

คำนวณร้อยละการปนเปื้อนของยีนจำเพาะ ด้วยวิธี real-time PCR โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำ 4 รอบจากนั้นจึงหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation: RSD) ในส่วนของความแม่นและความถูกต้องของวิธีการตรวจ ทำการวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบร้อยละการปนเปื้อนของยีนจำเพาะแต่ละชนิดที่ได้จากการทดลอง เปรียบเทียบกับร้อยละการปนเปื้อนคำนวณค่าที่ระบุไว้ในเอกสารใบรับรองของ ERM-IRMM หรือ AOCS ซึ่งรายงานเป็นค่าการเบี่ยงเบนของวิธีการตรวจวิเคราะห์

- ตรวจวัดความทวนซ้ำ (repeatability) ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of quantification)

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยดีเอ็นเอข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม ให้มีความเข้มข้นของ copies ยีนในระดับต่างๆ จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมาเพิ่มปริมาณโดยใช้วิธี real-time PCR โดยในแต่ละความเข้มข้น (จำนวน copy ของยีน) จะทดสอบพร้อมกัน 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 4 รอบ จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยของค่า CP และคำนวณค่า RSD^r (repeatability relative standard deviation: RSD^r) รวมทั้งหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนจำเพาะที่สามารถหาปริมาณได้อย่างน่าเชื่อถือไปพร้อมๆ กัน

ผลการทดลองและอภิปราย

สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม event Mon88017 Mon89034 MIR604 และ MIR162

สืบค้นข้อมูลลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสาร Validation methods ของ JRC-EURL การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีไทด์ไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง
Mon88017-forward	5'-GAGCAGGACCTGCAGAAGCT -3'	Charles Deobel et al.
Mon88017-reverse	5'-TCCGGAGTTGACCATCCA-3'	2008
Mon88017-probe	5'-FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-TAMRA-3'	
Mon89034-forware	5'-TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT-3'	Savini et al. 2008
Mon89034-reverse	5'-CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA-3'	
Mon89034-probe	5'-FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGBNFQ-3	
MIR604-forward	5'-GCGCACGCAATTCAACAG-3'	Mazzara et al. 2007
MIR604-reverse	5'-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3'	
MIR604-probe	5'-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA-3'	
MIR162-forward	5'-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG -3'	Delobel et al. 2011
MIR162-reverse	5'-TGCCTTATTGTTGCCTTCAGA -3'	
MIR162-probe	5'-FAM-TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA-TAMRA-3'	
hmg primer1	5'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'	Savini et al. 2008
hmg primer2	5'-GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3'	Charles Deobel et al.
hmg probe	5'-FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA-3'	2008
Adh1-forward	5'-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3'	Mazzara et al. 2007
Adh1-reverse	5'-CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3'	Delobel et al. 2011
Adh1-probe	5'-FAM-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-TAMRA-3'	

การสกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม (ตารางที่ 2) ด้วย Lysis buffer (GeneScan extraction method) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยผ่าน Wizard Miniprep DNA Purification Kit ทำการสกัดตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (Thermo Scientific)

ตารางที่ 2 วัสดุอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

GM corn (events)	Product code	Certified Value (g/kg)
Mon88017	AOCS0406-D	>990.5
MON89034	AOCS 0906-E	>994.25 g/kg
MIR604	ERM-BF423 :	
	blank	<0.9 g/kg
	Level1 0.1%	1.0 g/kg
	Level2 1.0%	9.8 g/kg
	Level3 10%	98.5 g/kg
MIR162	AOCS1208-A	Not available
nonGM	0406-A AOCS	< 2.0 g/kg

วิธีการสกัดด้วย GenScan Extraction เป็นวิธีที่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิง โดยปริมาณขั้นต่ำของตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอคือ 0.1 กรัม ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ ได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร eluted 50-100 ไมโครลิตร คุณภาพของดีเอ็นเอ คำนวณค่า 260/280 เฉลี่ย 1.8-2.0 OD. ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดย ปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ inhibition test ของดีเอ็นเอที่สกัด 4 ซ้ำ ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9997 และมีค่า ∆Ct (extrapolated)=Extrapol. Ct - Mean Ct เท่ากับ 0.28, 0.16, 0.34 และ0.33 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือค่าต่ำกว่า 0.5 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่มีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ และมีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีมาตรฐาน (ตารางที่ 1) ทำปฏิกิริยา Real-time PCR ทดสอบตามกรรมวิธีมาตรฐานดัดแปลงองค์ประกอบของปฏิกิริยาตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ดังนี้

Component	X 1 reaction (ul)
2X Quantitect Probe (Roach)	10
Forward primer 10 uM	0.3
Reverse primer 10 uM	0.3
Probe 5uM	0.2
Nuclease free water	4.2
DNA template 10 ng/ul	5
Total	20

โปรแกรมการทำปฏิกิริยา LightCycler480 RT PCR

Step	Stage	Temp	Time	Acquisition	Cycles
1	Activation DNA polymerase and denaturation	95C	600s	No	1x
2	Denaturation	95C	15s	No	45x
3	Amplification Annealing and extension	60C	60s	yes	

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบในการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Mon88017 (*Cry3Bb1+EPSPS*), Mon89034 (*Cry1A.105+Cry2Ab2*), MIR604 (*Cry3A*) MIR162 (*Vip3A*), Mon810, Bt11, Bt167 (*CryIAb*), GA21, NK603 (*EPSPS*), TC1507 (*CryIF+PAT*), T25, Mon863, CBH351 (*Cry9C+PAT*) และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ 40-3-2 (*EPSPS*), DP356043 และ DP305423 ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีมาตรฐาน JRC พบว่าไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดสอบทุกยีนข้างต้นมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนนั้นๆเท่านั้น ไม่พบสัญญาณฟลูออกเรสเซนต์ในดีเอ็นเอของพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น

ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยีนที่ไพรเมอร์สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection)

ค่า LOD ในการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 เท่ากับ 10 copies สำหรับการทดสอบค่า LOD ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon89034, MIR604 และ MIR162 LOD เท่ากับร้อยละ 0.1 และเนื่องจาก Mon88017, Mon89034 และ MIR162 ไม่มีค่า certified จึงไม่สามารถคำนวณค่าขั้นต่ำได้แน่นอน

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมดำเนินการตามการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 อ้างอิง Delobel *et al.*, (2010) Mon89034 อ้างอิง Savini *et al.*, (2008) MIR604 อ้างอิง Mazzara *et al.*, (2007) และ MIR162 อ้างอิง Delobel *et al.*,(2011) โดยการตรวจวิเคราะห์ Mon88017 และ Mon89034 ทดสอบเทียบกับยีน hmg specific และการตรวจวิเคราะห์ MIR604 และ MIR162 ทดสอบเทียบกับยีน ZmAdh1 การวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 200 นาโนกรัม นำค่า copies no. ของตัวอย่าง unknown ที่วิเคราะห์เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเจือปนได้จากสมการ

GM% = (copies no. Target gene/ copies no. reference gene) x 100

พบว่าวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017 ด้วยวิธี Real-time PCR ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Mon88017 และ hmg (reference gene) เฉลี่ย -3.362 และ -3.350 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคือ -3.2 และ -3.6 มีค่า PCR efficiency ปฏิกิริยา 98.98 และ 99.40 ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity (R^2) เท่ากับ 1.0 ทั้งสองยีน การวิเคราะห์การทวนซ้ำได้ของวิธีทดสอบ Repeatability พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ RSDr เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.54 -2.32 ซึ่งค่าจะต้องไม่เกิน 25% การวิเคราะห์ความแม่นยำ Accuracy และความเที่ยงตรง Precision พบผลการวิเคราะห์มีค่า %Bias ของการวิเคราะห์การปนเปื้อน อยู่

ในช่วงที่ยอมรับได้คือไม่เกิน ± 25% การวิเคราะห์ค่า LOD มีค่าอยู่ที่จำนวนปนเปื้อน 10 copies มีค่าการตรวจวิเคราะห์ที่ทวนซ้ำได้ร้อยละ 0.5 และ 8

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89034 พบว่ามีค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Mon89034 และ hmg (reference gene) เฉลี่ย -3.56 และ -3.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน -3.2 และ -3.6 PCR efficiency 88 และ 102.4 ตามลำดับ เมื่อนำมาสร้างกราฟหาค่า Linearity (R^2) ได้ค่าเท่ากับ 0.98 และ 1.0 การวิเคราะห์ Repeatability ในการตรวจวิเคราะห์ยีน Mon89034 มีค่า RSDr เฉลี่ย 2.54 -3.32 การวิเคราะห์ Accuracy และ Precision พบว่าการตรวจวิเคราะห์ที่ทุกค่าเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อน มีค่า %Bias ของการวิเคราะห์การปนเปื้อนสูงมาก ซึ่งเป็นค่าที่นำมาใช้ไม่ได้เนื่องจากปัญหาจากการเจือจางตัวอย่างที่มีค่าการเจือปนไม่เที่ยงตรง การเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.1

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR604 ค่าความชันกราฟมาตรฐานของยีน MIR604 และยีน Adh ได้ -3.281 และ -3.326 ตามลำดับ ค่า R^2 เฉลี่ย 1 และ 0.99 ตามลำดับ PCR efficiency เท่ากับร้อยละ 101.7 และ 99.83 ตามลำดับ ค่าความเที่ยง ของการปนเปื้อนที่ 10% และ 1% ได้ค่าวิเคราะห์ 10.5 และ 1.11 ตามลำดับ ส่วนค่าที่ 0.1% วัดได้ 0.07 และค่าเบี่ยงเบนการตรวจวิเคราะห์ ที่ระดับการปนเปื้อน 10%, 1% และ 0.1% เท่ากับ 5%, 11% และ -26% ตามลำดับ

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MIR 162 โดยการตรวจความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ โดยทดสอบกับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ และถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม พบการสังเคราะห์ยีนจำเพาะเฉพาะกับข้าวโพดสายพันธุ์ MIR162 ไม่พบการสังเคราะห์ยีนในข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่น และเมื่อทดสอบสร้างกราฟมาตรฐานการสังเคราะห์ยีนอ้างอิง ผลการตรวจวิเคราะห์ยีน Adh และ MIR162 มีค่าความชัน (slope) ของกราฟเฉลี่ย -3.55 และ -3.44 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 1.93 และค่า R2 เท่ากับ 1.0 ค่าความเที่ยง (precision) หรือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เฉลี่ยของการวิเคราะห์ยีน Adh และ MIR162 เท่ากับ 2.20 และ 0.49 ตามลำดับ ค่าความแม่นยำ (accuracy) หรือค่าเฉลี่ยร้อยละการเบี่ยงเบน (% bias) จากการเจือจางความเข้มข้นยีน MIR162 กับข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรม ตามอัตราส่วน 10%, 1% และ 0.1% มีค่าเฉลี่ย 32, 28 และ 66 ตามลำดับ ค่าการทดสอบซ้ำ (repeatability) ในการตรวจยีน MIR162 เท่ากับ 0.45 โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) คือ 0.1%

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 เชิงคุณภาพและปริมาณ ด้วยวิธีมาตรฐาน JRC-EURL ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ สกัดดีเอ็นเอด้วย GeneScan Extraction buffer ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Wizard Miniprep DNA Purification วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 40 และ 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LightCycler480 ตรวจความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สำหรับแต่ละกรณี โดยใช้ดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 100 นาโนกรัม และทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของยีนจำเพาะเทียบกับยีนอ้างอิงพืชโดยไพรเมอร์ Adh1 หรือ hmg ตามกรรมวิธีมาตรฐาน ปริมาณดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา 200 นาโนกรัม นำค่า CP และ log copies สร้างกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์การเจือปน พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะในการตรวจยีน คือ Mon88017 ที่ 20 copies และ Mon89034, MIR604 และ MIR162 ที่ LOD 0.1% การวิเคราะห์ค่าการทวนซ้ำของวิธี (repeatability) อยู่ในค่ามาตรฐาน RSdr < 0.5 ค่า Slope การทดสอบอยู่ในค่ามาตรฐาน คือ -3.2 ถึง -3.6 ทั้ง target gene และ reference gene ค่า R^2 coefficient สูงกว่า 0.98 ค่าความเที่ยงตรง (Trueness) พบว่ามีบางความเข้มข้นของตัวอย่างวิเคราะห์ได้เปอร์เซ็นต์ค่าความเบี่ยงเบน (bias) สูงกว่ามาตรฐานเนื่องจากไม่มีวัสดุอ้างอิงรับรองมาตรฐานที่มีการเจือปนของยีนดัดแปรพันธุกรรมระดับต่ำ ต้องเตรียมตัวอย่างเอง จึงทำให้เกิดค่าความเบี่ยงเบนเกินกำหนดจากการเตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมด้วยข้าวโพดไม่ดัดแปรพันธุกรรมให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำ

สำหรับข้อเสนอแนะ คือ การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐาน JRC-EURL พบว่าข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon88017, Mon89034 และ MIR162 ไม่มีวัสดุอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองการปนเปื้อนในระดับต่ำ ดังนั้นไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ วิเคราะห์ร้อยละการปนเปื้อนของตัวอย่าง แต่สามารถใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ LOD จะต้องทำการเจือจางให้ได้ตัวอย่างที่มีการเจือปนร้อยละ 0.1 เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์

อีกทั้งวิธีการทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยดัดแปลงกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล นำมาปรับใช้และจัดทำเป็นคู่มือเป็นวิธีการทดสอบในงานตรวจสอบวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรม และใช้เป็น

วิธีการตรวจวิเคราะห์ทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency Test) ร่วมกับห้องปฏิบัติการอื่นได้

การทดลองที่ 8 การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล อรรคพล ภูมีศรี
พงศกร สรรค์วิทยากุล ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
Khanitha Wongwathanarat Chananton Danaisilichaichon Arkkapon Phoomeesri
Pongsakorn Sunvittayakul Srimek Chowpongpang

บทคัดย่อ

การตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในตัวอย่างมะละกอผลสดและผลิตภัณฑ์ ที่มีมะละกอเป็นส่วนประกอบ ด้วยเทคนิค Real-time PCR ของห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวัสดุอ้างอิงมาเป็นตัวควบคุมผลการทดสอบ แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวัสดุอ้างอิงสำหรับมะละกอทำออกมาจำหน่ายทางการค้า จึงได้พัฒนาดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมขึ้น โดยการสังเคราะห์ชุดยีนขึ้นมาสามชุด คือ 1) ชุดยีน GMOs-Hawaii ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii และยีน *papain* ขนาดประมาณ 624 คู่เบส 2) ชุดยีน GMOs-SC ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และยีน *papain* ขนาดประมาณ 502 คู่เบส และ 3) ชุดยีน GMOs-DOA ประกอบด้วยยีน *CaMV 35S, gus, nos*, *cp*-DOA และยีน *papain* ขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส โดยชุดยีนทั้งสามเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ทำให้ได้ชุดพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ขนาดประมาณ 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาดประมาณ 2,795 คู่เบส และพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ขนาดประมาณ 3,657 คู่เบส พลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 เพิ่มปริมาณภายในเซลล์ คัดเลือกโคลนและสกัดพลาสมิด นำมาทดสอบความถูกต้องด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าทุกโคลนให้ผลเป็นบวก และวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่สร้างขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้นแบบที่ออกแบบเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พบว่ามีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) เมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีนต่าง ๆ ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่า LOD ของดีเอ็นเอมาตรฐานทั้ง 3 ชุด อยู่ที่ระดับ 25-250 ชุด (copies) ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นสามารถพัฒนาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR เชิงปริมาณต่อไป

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอมาตรฐาน, Real-time PCR, พลาสมิดลูกผสม, LOD

บทนำ

มะละกอมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carica papaya* เป็นพืชที่เจริญเติบโตดีบริเวณประเทศเขตร้อน มีการปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนและปลูกเพื่อการค้า แต่จากการระบาดของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก ทำให้ผลผลิตมะละกอลดลงจนกระทั่งไม่ให้ผลผลิตเลย ซึ่งการใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค (วิชัย และคณะ, 2542) ถึงแม้จะมีการปรับปรุงสายพันธุ์มะละกอให้ได้สายพันธุ์ใหม่และการปลูกวัคซีนให้แก่มะละกอ แต่สายพันธุ์มะละกอที่ได้ก็ไม่สามารถต้านทานโรคได้อย่างแท้จริง

จึงมีการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมให้ต้านทานต่อไวรัส PRSV ขึ้นในหลายประเทศ เช่น ในปี 1992 Fitch *et al.* ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน *coat protein* (*cp*) ของไวรัส PRSV เข้าสู่โซมาติคเอมบริโอมะละกอสายพันธุ์ sunset โดยวิธี *Microprojectile* bombardment ด้วยพลาสมิด ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* ที่ขนาบด้วยยีน *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*) และยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ 55-1 ซึ่งมะละกอสายพันธุ์นี้ถูกนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์ Sun up (55-1 × 55-1) และสายพันธุ์ Rain bow (sun up × Kapoho) (Manshardt, 1998) ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้าในฮาวาย ส่วนในประเทศไต้หวัน Cheng *et al.* (1996) ได้สร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* เป็นตัวส่งถ่ายยีน *cp* ของไวรัส PRSV สายพันธุ์ไต้หวัน (PRSV-P YK) ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* PRSV ที่ขนาบด้วยยีน *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*) และยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) เข้าสู่เนื้อเยื่อเอมบริโอมะละกอสายพันธุ์ Tainung No. 2 ที่ทำให้เกิดบาดแผลด้วย carborundum ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมหลายสายพันธุ์ ได้แก่ GCP 16-0, GCP 17-0 และ GCP 17-1 ที่มีความสามารถสูงในการต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไต้หวันได้ สำหรับประเทศไทยมีการวิจัยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยนักวิทยาศาสตร์จากกรมวิชาการเกษตรร่วมกับนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยคอร์แนล ประเทศสหรัฐอเมริกา ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวลและแขกดำที่ได้รับการถ่ายยีน *cp* ของไวรัสสายพันธุ์ประเทศไทยจากจังหวัดขอนแก่น โดยพัฒนามะละกอดัดแปรพันธุกรรมพันธุ์แขกนวลได้ 3 สายพันธุ์ และพันธุ์แขกดำ 1 สายพันธุ์ ที่สามารถต้านทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนในประเทศไทยได้ (Mendoza *et al.*, 2008) ในเวลาเดียวกันมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (มก-ศช) ก็ประสบความสำเร็จในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยการถ่ายยีน *cp* ของไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ (PRSV-CMI) ซึ่ง cassette ยีน ประกอบด้วยยีน *cp* PRSV-CMI ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ *CaMV 35S* และ *nos terminator* และมี *npt II* (*neomycin phosphotransferase II*) เป็นยีนคัดเลือก เข้าสู่ somatic embryo ของมะละกอพันธุ์แขกนวล ด้วยวิธี particle bombardment ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรม ได้แก่ สายพันธุ์ KN 1.2.3, KN 13.2.3 และ KN 49 ที่มีความสามารถในการต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ได้ดี และมีแนวโน้มในการต้านทานไวรัส PRSV จากจังหวัดนครปฐม, ราชบุรี, สุราษฎร์ธานี, สกลนคร และยโสธร ซึ่งเป็น

ไวรัสตัวแทนสายพันธุ์ไวรัส PRSV ในแต่ละภาคของประเทศไทย ยกเว้นพันธุ์ KN 1.2.3 ซึ่งมีแนวโน้มที่จะอ่อนแอต่อไวรัส PRSV จากจังหวัดยโสธร (นุชนาถ และคณะ, มปป.)

แม้ในหลายประเทศอนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเพื่อการค้าได้ แต่ประเทศไทยยังไม่มีการอนุญาตให้ปลูกพืชดังกล่าวเพื่อการค้า แต่สามารถปลูกเพื่อการศึกษาวิจัยได้ โดยจะต้องได้รับการอนุมัติจากกรมวิชาการเกษตร อีกทั้งในการควบคุมสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ทำให้หลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรมในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับที่เข้มงวดขึ้น โดยกำหนดให้ต้องตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต จะต้องติดฉลากที่ระบุข้อความว่า “This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547) และมีการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากการสุ่มตรวจมะละกอส่งออก ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ในปี พ.ศ. 2554 และในปี พ.ศ. 2555 สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรป ได้รายงานปัญหาสินค้าเกษตรของไทยที่ส่งออกมายังสหภาพยุโรปผ่านระบบเตือนภัยด้านอาหารและอาหารสัตว์ของสหภาพยุโรป หรือ Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) ตั้งแต่เดือนมกราคม-พฤศจิกายน 2555 ว่ามีการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากไทยทั้งหมด 10 ครั้ง โดยประเทศสมาชิกอียูที่ตรวจพบมากที่สุด ได้แก่ ฝรั่งเศส (5 ครั้ง), เยอรมนี (3 ครั้ง) และฟินแลนด์ (2 ครั้ง) เป็นต้น (สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรป, 2555)

จากปัญหาการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในสินค้าเกษตรในหลายประเทศ จึงมีความพยายามในการพัฒนาการตรวจสอบมะละกอให้สามารถจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรม รวมถึงตรวจสอบจำแนกจากพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ ด้วย ทั้งในรูปตัวอย่างสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปรพันธุกรรม ไม่ว่าจะเป็นการตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ และตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใดนั้น การตรวจสอบการปนเปื้อนเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ โดยวัสดุอ้างอิงนี้อยู่ในรูปตัวอย่างสดของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ทราบสายพันธุ์ หรืออาจอยู่ในรูปพลาสมิดมาตรฐานซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *CaMV35s*, *Nos*, *cp*-55-1 และยีน *Gus* (Nakamura *et al*., 2013) ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปแบบของพลาสมิดเป็นวัสดุอ้างอิงนั้น สามารถเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์การปะปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม และยังเป็นตัวเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนว่ามีมากน้อยเพียงใด

ดังนั้นการทดลองสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปของพลาสมิดเพื่อเป็นวัสดุอ้างอิงในการควบคุมการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการ น่าจะช่วยพัฒนาเทคนิคการ

ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสำหรับการตรวจสอบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณให้ได้มาตรฐาน และถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น อีกทั้งช่วยลดการนำเข้าวัสดุอ้างอิงซึ่งมีราคาแพงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และเมื่อการตรวจสอบมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ย่อมส่งผลเชิงบวกต่อการควบคุมคุณภาพสินค้าส่งออกทางการเกษตรให้ปลอดการปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรม และเฝ้าระวังการแพร่กระจายของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในพื้นที่ปลูกภายในประเทศ

ระเบียบวิธีการวิจัย

การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมดำเนินงานที่สำนักเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ในปี 2557-2558 ระยะเวลา 1 ปี มีวิธีการ

1. การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน

- สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล

สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*), ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*), ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*), ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) และสายพันธุ์จากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) และยีน *papain* ของมะละกอ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Real-time PCR จากวารสารระดับนานาชาติ blast เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi? PROGRAM =blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

- วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus*, ยีน *nos*, ยีน *cp*-Hawaii, *cp*-SC, *cp*-DOA และยีน *Papain* มาเรียงกัน และเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน เพื่อประโยชน์ในการเพิ่มเติมหรือลดยีนที่ต้องการในภายหลัง จากนั้นใช้โปรแกรม Primer map (http://www.bioinformatics.org/sms2/primer_ map.html) ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมายที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ฮาวาย) และ GMOs-SC (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์เชียงใหม่) และ GMOs-DOA (ชุดยีนอ้างอิงสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ขอนแก่น)

- การสร้างชุดยีนสังเคราะห์และการสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สั่งสังเคราะห์ชุดยีนสังเคราะห์ที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus,* ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii และยีน *papain* ซึ่งมีขนาดประมาณ 624 bp, ชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-SC ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ขนาดประมาณ 502 bp และชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_DOA และ *papain* ขนาด

ประมาณ 1,379 bp โดยบริษัท Lifetechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนไพรเมอร์และโพรบสั่งสังเคราะห์โดยบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

- การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA เข้าสู่ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 โดยวิธีการ heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/L (อาหารคัดเลือก) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นานข้ามคืน แล้วคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารใหม่ เพื่อสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี alkaline lysis โดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบขนาดเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล และตรวจความถูกต้องของพลาสมิดด้วยวิธีพีซีอาร์

2. การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน

- การทดสอบโคลนโดยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณยีน *CaMV 35S* และ *nos* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

1. Sterile water (Wisent Inc., Canada)	13.375	ไมโครลิตร
2. 5x Green Go Taq® Flexi buffer (Promega, USA)	5.00	ไมโครลิตร
3. 25 mM MgCl2 (Promega, USA)	1.50	ไมโครลิตร
4. 10 mM dNTP (Fermentas, Canada)	0.50	ไมโครลิตร
5. 20 µM ไพรเมอร์ 35s_F (Qiagen, Germany)	1.00	ไมโครลิตร
6. 20 µM ไพรเมอร์ 180R (Qiagen, Germany)	1.00	ไมโครลิตร
7. Go Taq® DNA Polymerase (Promega, USA)	0.125	ไมโครลิตร
8. plasmid DNA template (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2.50	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.00	ไมโครลิตร

ผสมสารทั้งหมดในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Gene Amp® PCR System 9700 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation	94	5 นาที	
Amplification	94	30 วินาที	40 รอบ
	52	30 วินาที	
	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	
Hold	4	∞	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide (0.5 mg/ml) ใน 1X TAE buffer เป็นเวลา 50 นาที กระแสไฟ 135 โวลต์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation

- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดพลาสมิดจากโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป HiYield^{TM} Plasmid Kit mini จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดด้วยชุด Big dye dideoxy termination kit ด้วยไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำบนเวคเตอร์ คือ ไพรเมอร์ T7 promoter forward (5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´) จากนั้นเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานที่สังเคราะห์ขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs ต้นแบบที่ได้ออกแบบไว้ทั้งสามชุด ด้วยโปรแกรม ClustalW2, Multiple Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

- การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1 เพื่อตรวจสอบยีน *cp*-SC และยีน *cp*-Hawaii ตามลำดับ ด้วยวิธี Real-time PCR ในดีเอ็นเอของพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง *RR* และข้าวโพด *Mon 863* เป็นต้น โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

Water,PCR grade (Roche, Switzerland)		3.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ F (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ R (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
10 µM โพรบ (Qiagen, Germany)		0.5	ไมโครลิตร
2x Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland)		10	ไมโครลิตร
DNA template	Genomic DNA (10 ng/ul)	5.0	ไมโครลิตร
	หรือ Plasmid DNA (0.1 ng/ul)	5.0	ไมโครลิตร
	ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ hydrolysis โพรบ ด้วยเครื่อง qT0wer 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Pre-Incubation	95 °C	10 นาที	
Amplification	95	15 วินาที	50 รอบ
	60	1 นาที	

3. การศึกษาจำนวนชุด (copy number) ของดีเอ็นเอมาตรฐาน

- การเตรียมพลาสมิดมาตรฐานให้อยู่ในรูปเส้นตรงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดภายในเซลล์แบคทีเรีย และสกัดพลาสมิดดังกล่าวจากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Plasmid Kit mini วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer จากนั้นตัดดีเอ็นเอมาตรฐานทุกชุดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III โดยทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองดังนี้

- ปฏิกิริยาสำหรับดีเอ็นเอมาตรฐาน GMOs-Hawaii-C1

10x NEB buffer 2	5	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-Hawaii-C1	37.5	ไมโครลิตร (~3 ไมโครกรัม)
dH_2O	7.5	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-SC-C1

10x NEB buffer 2	8.5	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-SC-C1	47.5	ไมโครลิตร (~3 ไมโครกรัม)
dH_2O	18	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	3	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	85	ไมโครลิตร

- ปฏิกิริยาสำหรับพลาสมิด GMOs-DOA-C1

10x NEB buffer 2	8	ไมโครลิตร
Plasmid GMOs-DOA-C1	45	ไมโครลิตร (~1.2 ไมโครกรัม)
dH_2O	25	ไมโครลิตร
enzyme HindIII	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	80	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตรวจสอบการตัดดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดให้เป็นเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad)

- การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เป็นเส้นตรงด้วยชุด Hiyield ™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit แล้ววัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่ตัดด้วยเอนไซม์

ตัดจำเพาะ ที่ให้ชื่อว่า linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ด้วยเครื่อง Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer

- การคำนวณจำนวนชุด (copy number) ของพลาสมิดมาตรฐาน

คำนวณจำนวน copy number ของพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุด โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้คือ (Wei *et al.*, 2012)

Number of copies = (amount * 6.022×10^{23}) / (length * 1×10^{9} * 650)

4. การหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR

หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีนที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี Real-time PCR ได้แก่ linear pGMOs-Hawaii-C1 ทดสอบด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R และ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 ส่วน linear pGMOs-SC-C1 ทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R และ SC-F_new/SC-R และ linear pGMOs-DOA-C1 ทดสอบด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 3 ชุด คือ Papain-B1/Papain-B2 , 35S-F/35S-R, 180-F/180-R ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งหมดจะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100, 10, 1 ชุดต่อไมโครลิตร (copies/µl) นำไปทดสอบในปฏิกิริยา Real-time PCR แต่ละปฏิกิริยาปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบจะอยู่ที่ระดับ 250, 25 และ 2.5 ชุด (copies) ทำการทดสอบ จำนวน 9 ซ้ำ ในแต่ละไพรเมอร์ ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก คือ ดีเอ็นเอจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งสามสายพันธุ์ คือ PRSV-Hawaii, PRSV-SC และ PRSV-DOA ที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาเจือจางกับดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ได้เปอร์เซ็นต์ความปนเปื้อนเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ คือ ดีเอ็นเอจากมะละกอที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR 1ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

Water, PCR grade (Roche, Switzerland)	6.0	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ F (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 µM ไพรเมอร์ R (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
10 µM โพรบ (Qiagen, Germany)	0.5	ไมโครลิตร
2x Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland)	10	ไมโครลิตร
DNA template	2.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

ซึ่งสารเคมีข้างต้นจะถูกเตรียมแล้วหยอดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ hydrolysis โพรบ ด้วยเครื่อง qT0wer 2.0 ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

Pre-Incubation	95 °C	10 นาที	
Amplification	95	15 วินาที	50 รอบ
	60	1 นาที	

ผลการทดลองและอภิปราย

การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน

- สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) และสายพันธุ์จากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) และยีน *papain* ของมะละกอ พบว่างานวิจัยของ Xu *et al*. (2008), Nakamura *et al*. (2013) และ Nakamura *et al*. (2014) ได้รายงานการตรวจสอบยีนที่กล่าวมาข้างต้นโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะด้วยวิธี Real-time PCR ดังแสดงในตารางที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น และโพรบจำนวน 6 เส้น

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปร

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)	reference
	35S-F	5' GCCTCTGCCGACAGTGGT 3'		
CaMV35S	35S-R	5' AAGACGTGGTTGGAACGTCTT 3'	82	Nakamura *et al*. (2013)
	35S-P	5' FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA 3'		
	GUS Primer	5’ GGCCGTCGAGTTTTTTGATTT 3’		
Gus	P35S Primer	5’ GATCCCCGGGTGGTCAGT 3’	75	Nakamura *et al*. (2013)
	GUS-P35S probe	5’ FAM-CAGGACGTAACATAAGG-MGBNFQ 3’		
	180-F	5’ CATGTAATGCATGACGTTATTTATG 3’		
Nos	180-R	5’ TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT 3’	84	Nakamura *et al*. (2013)
	TM-180	5’ FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA 3’		
	55-1 Primer 1	5’ CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA 3’		
*cp*_Hawaii	55-1 Primer 2	5’ TCCGCCTCCATCCAGTCTATT 3’	71	Nakamura *et al*. (2013)
	55-1 Probe	5’ FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA 3’		
	Papain-B1	5' AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA 3'		
Papain	Papain-B2	5' AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG 3'	91	Xu *et al*. (2008)
	Papain-P	5' FAM-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-TAMRA 3'		
	SC-F new	5'- CATTTCATTTGGAGAGAACACG-3'		
cp-SC	SC-R	5' ACCAGCATCCACAGCTTC 3'	70	Nakamura *et al*. (2014)
	SC-P	5' FAM-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-TAMRA 3'		

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม blast เข้าไปในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม blastn ก็ทำให้เราพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่เราต้องการศึกษา ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Zea mays transgenic* line NK603 promoter region เลข ACCESSION: KJ608140 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 82 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase* (uidA), *coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 ในส่วนของยีน *gus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 75 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase* (*uidA*), *coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 84 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (*cp*-Hawaii) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya transgenic cultivar Rainbow beta-glucuronidase (uidA), coat protein* and *neophosphotransferase*, complete cds เลข ACCESSION: FJ467933 ในส่วนของยีน *coat protein* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 71 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *papain* ของมะละกอ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *Carica papaya papain mRNA*, complete cds เลข ACCESSION: M15203 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 91 คู่เบส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (*cp*-SC) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *coat protein (cp)* gene สายพันธุ์ Samut Sakhon SMK1, Kanjanaburi KJR1 และ Chiangmai ที่มีเลข ACCESSION: DQ085864, DQ085859 และ DQ085856 ตามลำดับ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 70 คู่เบส

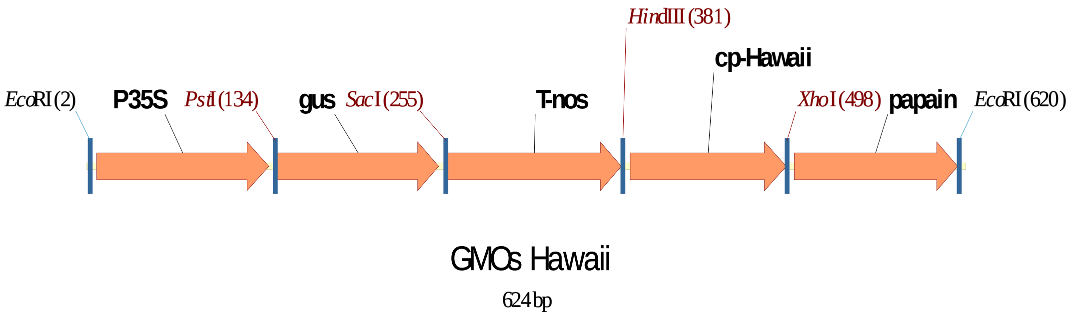
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *coat protein* (*cp*) gene ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Chiangmai, Chumporn, Ratchaburi ที่มีเลข ACCESSION: DQ085856, AY010713.1, AY010721.1 ตามลำดับ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ มีขนาด 866 คู่เบส

- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย

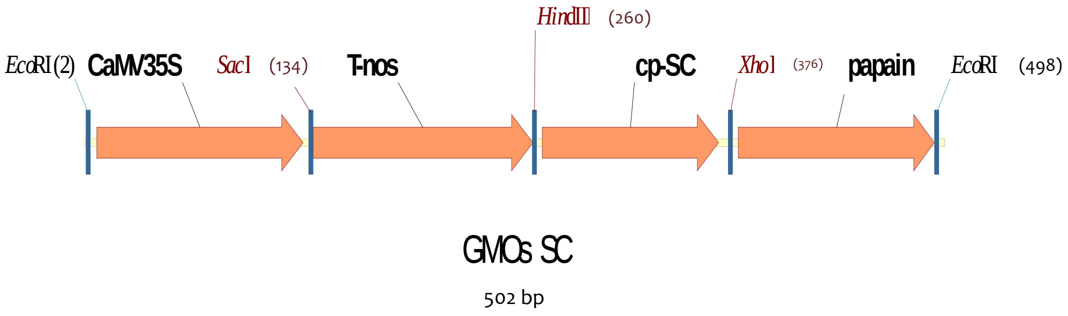
การออกแบบชุดยีนของดีเอ็นเอมาตรฐาน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus*, ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii, *cp*-SC, *cp*-DOA และยีน *Papain* มาเรียงกัน และเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของ

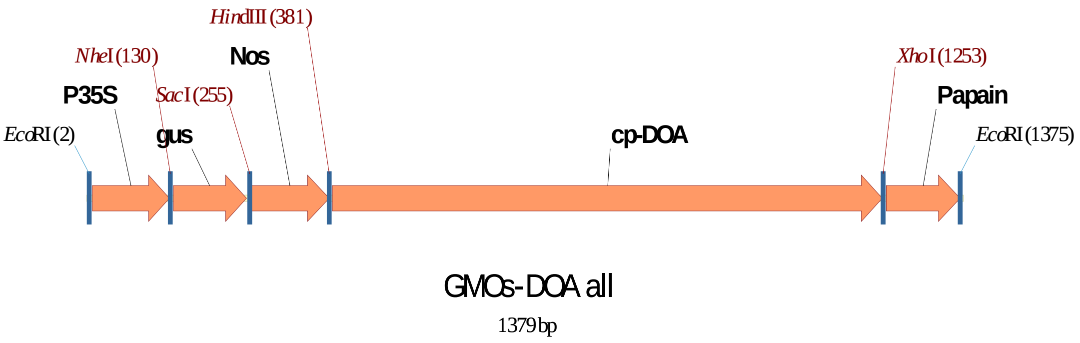
เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs-Hawaii มีขนาด 624 คู่เบส ดังภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs_SC มีขนาด 502 คู่เบส ดังภาพที่ 2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน GMOs_DOA มีขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs-Hawaii ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii, papain ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, PstI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs-SC ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของชุดยีน GMOs_DOA ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_DOA และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, NheI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ

- วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบจากตารางที่ 1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii, ชุดยีน GMOs-SC และชุดยีน GMOs-DOA โดยใช้โปรแกรม Primer map พบว่าไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมีความจำเพาะเจาะจงต่อชุดยีนทั้งสามชุด โดยชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 55-1, Gus, 180 และ papain ส่วนชุดยีน GMOs-SC ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35s, 180, papain และ SC และชุดยีน GMOs-DOA ตรวจสอบได้โดยใช้ชุดไพรเมอร์และโพรบ 35S, 180, Gus, และ papain เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 2

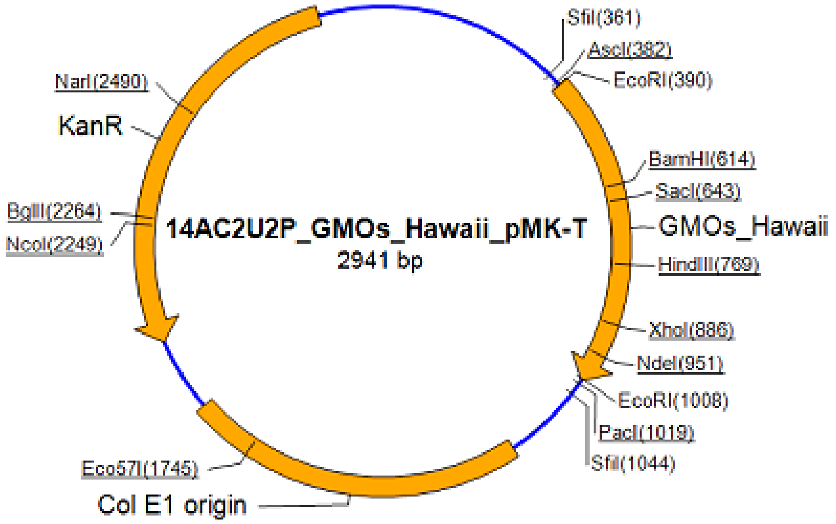
ตารางที่ 2 แสดงความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนเป้าหมาย GMOs-Hawaii, ชุดยีน GMOs-SC และชุดยีน GMOs-DOA โดยใช้โปรแกรม Primer map

ลำดับ	ยีน	Primer:	Sequence	ชุดยีน GMOs_Hawaii	ชุดยีน GMOs_SC	ชุดยีน GMOs_DOA
1	*CaMV35S*	35S-F	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	+	+	+
2		35S-R	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	+	+	+
3		35S-P	5'-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-3'	+	+	+
4	*cp*_Hawaii	55-1_Primer1	5'-CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3'	+	-	-
5		55-1_Primer2	5'-TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3'	+	-	-
6		55-1_Probe	5'-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-3'	+	-	-
7	*gus*	GUS_Primer	5'-GGCCGTCGAGTTTTTTGATTT-3'	+	-	+
8		P35S_Primer	5'-GATCCCCGGGTGGTCAGT-3'	+	-	+
9		GUS-P35S_probe	5'-CAGGACGTAACATAAGG-3'	+	-	+
10	*nos*	180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	+	+	+
11		180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT-3'	+	+	+
12		TM-180	5'-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-3'	+	+	+
13	*papain*	Papain-B1	5'-AGTGGCTCAATATGGTATTCACTACAGA-3'	+	+	+
14		Papain-B2	5'-AAAATGTAGATATACCTCCCTTGAGCG- 3'	+	+	+
15		Papain-P	5'-ATACTTACCCATATGAGGGAGTGCAACGTTATTG-3'	+	+	+
16	*cp*_SC	SC-F_new	5'- CATTTCATTTGGAGAGAACACG-3'	-	+	-
17		SC-R	5'-ACCAGCATCCACAGCTTC-3'	-	+	-
18		SC-P	5'-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-3'	-	+	-

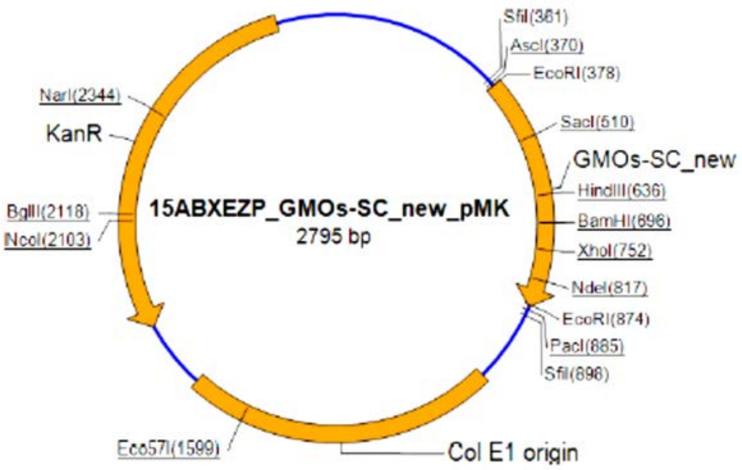
*หมายเหตุ + คือ detected และ – คือ not detected

- การสร้างชุดยีนสังเคราะห์และการสังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

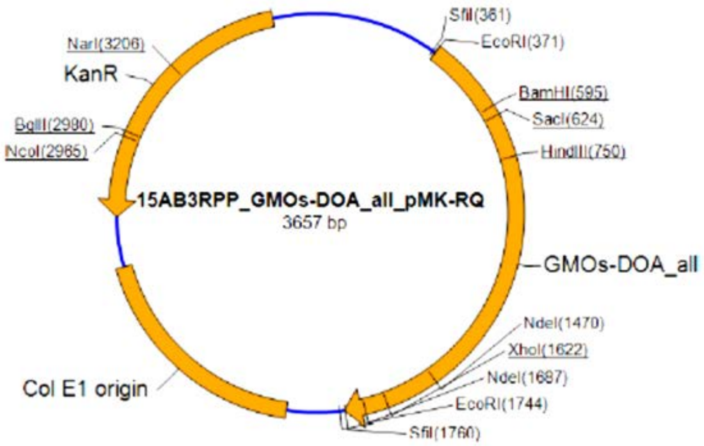
หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างชุดดีเอ็นเอมาตรฐานและสั่งสังเคราะห์ชุดยีนสังเคราะห์ ได้ชุดยีนสังเคราะห์เพื่อสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานจำนวน 3 ชุด ที่ให้ชื่อว่า GMOs-Hawaii ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S,* ยีน *gus*, ยีน *nos,* ยีน *cp*-Hawaii และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 624 bp, ชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-SC ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV35S*, ยีน *nos*, ยีน *cp*-SC และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 502 bp และชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ซึ่งเป็นชุดยีนที่ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CaMV 35S*, ยีน *gus*, ยีน *nos,* ยีน *cp*-DOA และยีน *papain* ซึ่งมีขนาด 1,379 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนที่สังเคราะห์ได้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไดท์ของชุดยีน GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA ที่ออกแบบไว้ สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชุดยีนสังเคราะห์ทั้งสามชุดที่สังเคราะห์ขึ้นได้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ได้พลาสมิดลูกผสมชื่อ GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 2,941 คู่เบส (ภาพที่ 4), พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่มีขนาด 2,795 คู่เบส (ภาพที่ 5), และพลาสมิด GMOs-DOA มีขนาด 3,657 คู่เบส (ภาพที่ 6) ซึ่งบนพลาสมิด backbone ของชุดยีนทั้งสามมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker สามารถใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin คัดเลือกโคลนที่ได้รับชุดยีนสังเคราะห์ในขั้นตอนการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม



ภาพที่ 4 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ขนาด 2,941 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-Hawaii ขนาด 624 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker



ภาพที่ 5 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาด 2,795 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-Sc ขนาด 502 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker

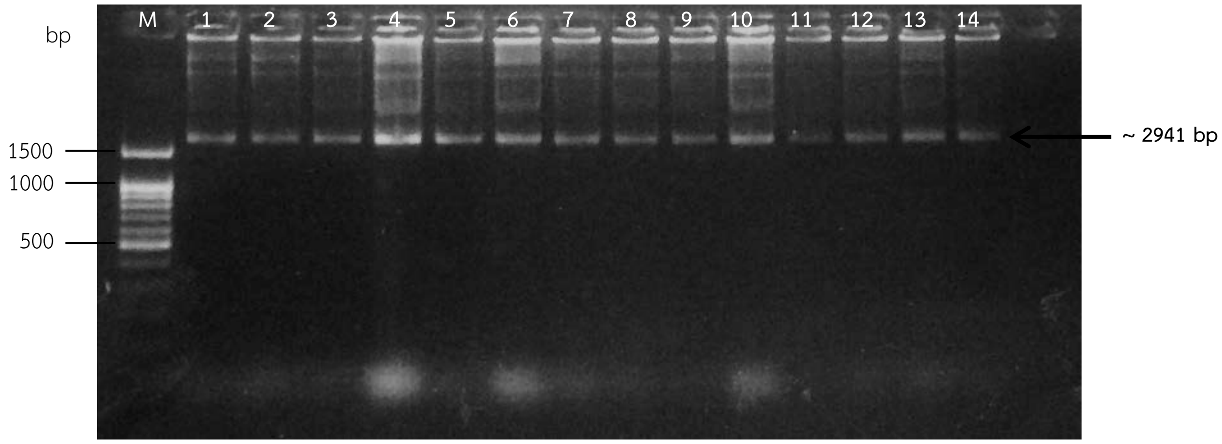


ภาพที่ 6 แสดงพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ขนาด 3,657 คู่เบส ประกอบด้วยชุดยีนสังเคราะห์ GMOs-DOA ขนาด 1,379 คู่เบส เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T โดยมียีน kanamycin resistance เป็นยีน selectable marker

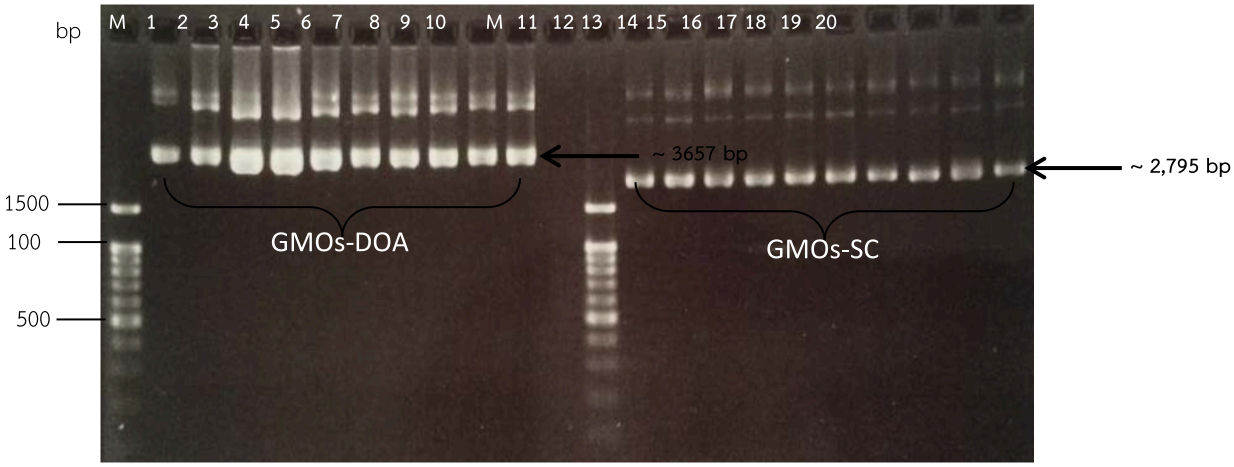
- การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ผลการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ขนาด 2,795 คู่เบส และ GMOs-SDOA ขนาด 3,657 คู่เบส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดลูกผสมจำนวนมากสามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/L ได้ (อาหารคัดเลือก) สำหรับแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม พบว่าไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแข็ง 2xYT ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชนิดที่

สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide พบว่าพลาสมิด GMOs-Hawaii จาก 14 โคโลนี, พลาสมิด GMOs-SC จาก 10 โคโลนี และพลาสมิด GMOs-DOA จาก 10 โคโลนี มีขนาด >1500 คู่เบส ทุกโคลน เมื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 7 แสดงขนาดของพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารจำนวนทั้งหมด 14 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 14 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ

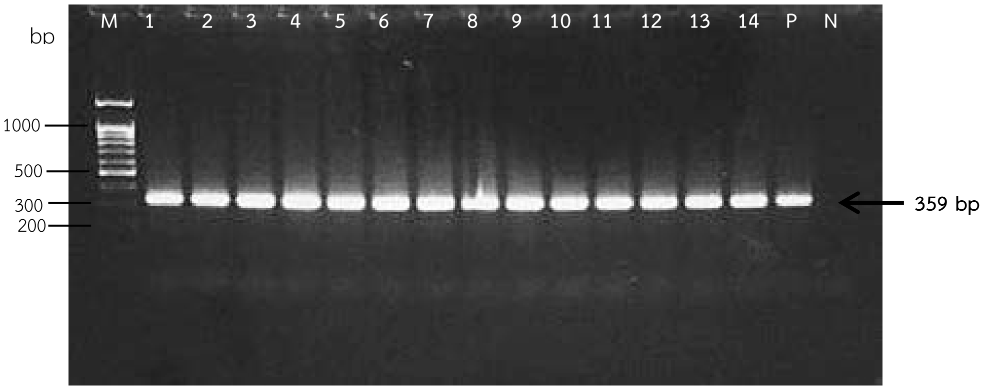


ภาพที่ 8 แสดงขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารจำนวนทั้งหมด 10 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิด GMOs-DOA ที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 10 ช่องที่ 11 ถึง 20 คือ พลาสมิด GMOs-SC ที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 10

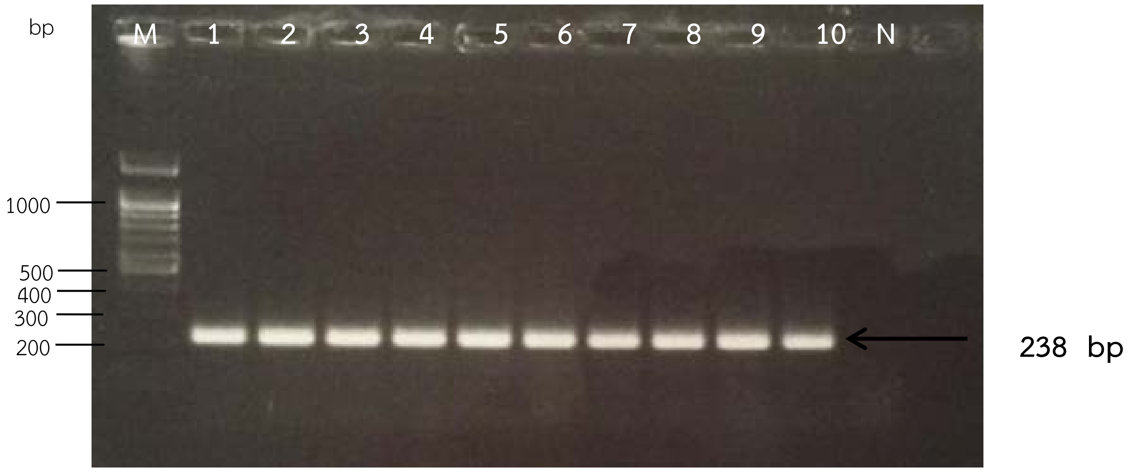
การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน

- การทดสอบโคลนโดยวิธีพีซีอาร์

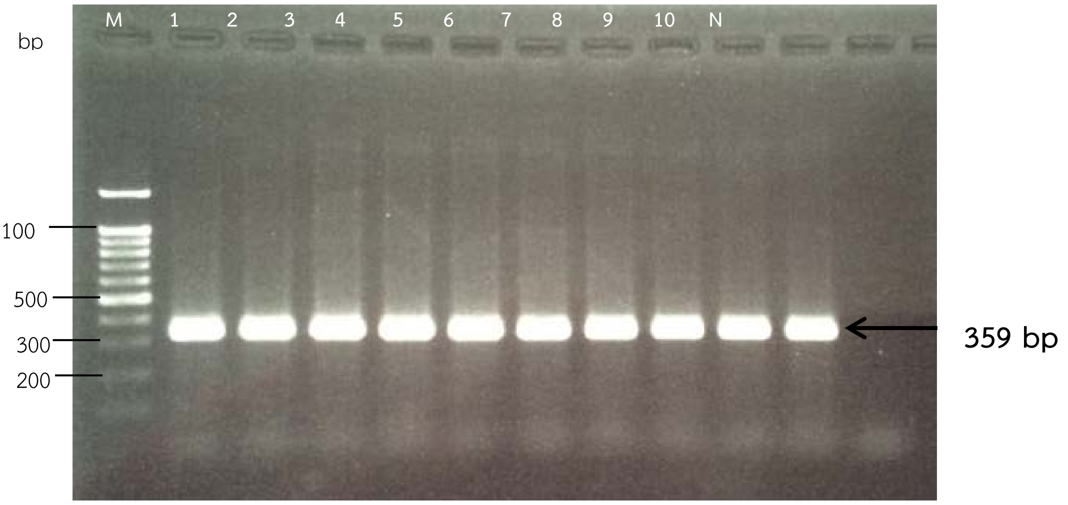
ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii และ GMOs-DOA (ภาพที่ 9 และ 11) จากทุกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก และตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC (ภาพที่ 10) จากทุกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกเช่นกัน ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่พบมีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในชุดพลาสมิดสังเคราะห์ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก และไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ



ภาพที่ 9 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส ด้วยวิธีพีซีอาร์ บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก จำนวนทั้งสิ้น 14 โคโลนี เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 14 คือพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 14 ตามลำดับ ส่วนช่องที่ 15 คือ Positive control (พลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ที่สังเคราะห์ขึ้น) และช่องที่ 15 คือ negative control (dH_2O)



ภาพที่ 10 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV, 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC ที่สกัดได้จากโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก ด้วยวิธีพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน GMOs-SC โคโลนีที่ 1 ถึง 10 และช่องที่ 11 คือ negative control (dH_2O)



ภาพที่ 11 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส บนพลาสมิดลูกผสม GMOs-DOA ด้วยวิธี PCR เมื่อตรวจสอบบน 2% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ถึง 10 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลน GMOs-DOA โคโลนีที่ 1 ถึง 10 และช่องที่ 11 คือ negative control (dH_2O)

- การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-Hawaii ด้วยเครื่องอัตโนมัติ พบว่าลำดับนิวคลีโอไดท์จากพลาสมิดลูกผสมโคโลนีที่ 1 (GMOs-Hawaii-c1) วิเคราะห์ได้ความยาวประมาณ 668 คู่เบส ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมโคโลนีที่ 8 (GMOs-Hawaii-c8) วิเคราะห์ความยาวได้ประมาณ 702 คู่เบส เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ต้นแบบที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-Hawaii-c1 และ GMOs-Hawaii-c8 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-Hawaii ต้นแบบ (ในส่วนของชุดยีน GMOs-Hawaii) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-SC จากโคโลนีที่ 1 (GMOs-SC-c1) วิเคราะห์ได้ความยาวประมาณ 582 คู่เบส, ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-DOA จากโคโลนีที่ 1 (GMO DOA-c1) วิเคราะห์ความยาวได้ประมาณ 1,392 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม GMOs-SC และ GMOs-DOA ต้นแบบที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด GMOs-SC-c1 และ GMOs-DOA-c1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมต้นแบบ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1

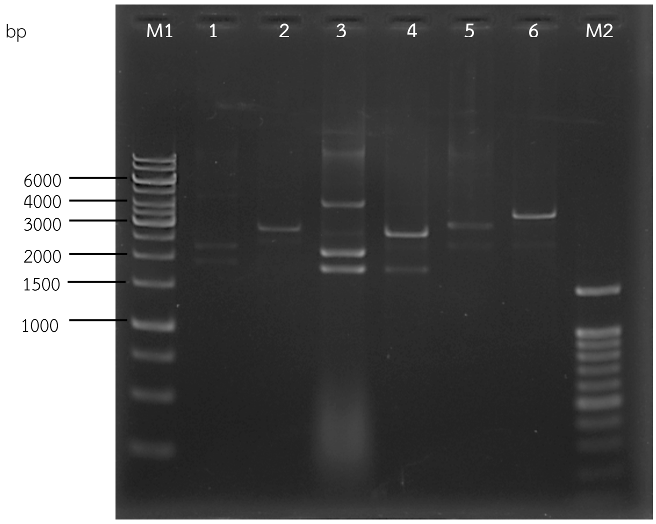
ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ 55-1 และ SC เพื่อตรวจสอบยีน *cp*-Hawaii และยีน *cp*-SC ตามลำดับ ด้วยวิธี Real-time PCR ในดีเอ็นเอของพืชดัดแปรพันธุกรรมอื่น ๆ ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม *RR* และและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม *Mon 863* เป็นต้น พบว่าไพรเมอร์ทั้งคู่มีความจำเพาะเจาะจง โดยไพรเมอร์และโพรบ 55-1 ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในตัวอย่างดีเอ็นเอมะละกอ GM6 (Hawaii genomic DNA) เท่านั้น ส่วนไพรเมอร์และโพรบ SC ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในตัวอย่างดีเอ็นเอมะละกอ GM9 (SC genomic DNA) เท่านั้น

การศึกษาจำนวนชุด (copy number) ของดีเอ็นเอมาตรฐาน

พลาสมิดมาตรฐานที่สกัดจากชุดน้ำยาสำเร็จรูปทุกชุดมีปริมาณและความบริสุทธิ์มากพอ (ตารางที่ 3) เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII เป็นเวลาข้ามคืน ก็สามารถตัดให้พลาสมิดมาตรฐานทุกชุดอยู่ในรูปเส้นตรงได้ เมื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส โดยก่อนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพลาสมิดทุกชุดจะอยู่ในรูปแบบขดเป็นวง (supercoiled) ทำให้มีขนาดเล็กจึงเคลื่อนที่บนเจลอะกาโรสได้รวดเร็วกว่า พลาสมิดที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรง (lineared) ซึ่งมีขนาดตรงกับพลาสมิดมาตรฐานแต่ละชุดที่ออกแบบไว้ คือ พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-Hawaii มีขนาด 2,941 คู่เบส, พลาสมิดมาตรฐาน GMOs-SC มีขนาด 2,795 คู่เบส และพลาสมิดมาตรฐาน GMOs-DOA มีขนาด 3,657 คู่เบส (ภาพที่ 12) ดีเอ็นเอมาตรฐานแต่ละชุดที่อยู่ในรูปเส้นตรงนี้ ให้ชื่อว่า linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 นำไปทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งปริมาณที่ได้มากพอที่จะใช้ในการทดสอบ Real-time PCR และความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกคำนวณกลับให้อยู่ในรูป copy number (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดมาตรฐานที่ทำบริสุทธิ์ได้

ชื่อพลาสมิดมาตรฐาน	ค่า A_{260}/A_{280}	ความเข้มข้น (ng/ul)
1. GMOs-Hawaii-c1	2.21	80.35
2. GMOs-SC-C1	2.08	114.8
3. GMOs-DOA-C1	2.28	34.1



ภาพที่ 12 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้อยู่ในรูปเส้นตรงโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII เมื่อตรวจสอบบน 1% อะกาโรสเจล ที่ผสม ethidium bromide โดยช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Gene ruler DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii (uncut) ช่องที่ 2 คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 2,941 คู่เบส ช่องที่ 3 พลาสมิด GMOs-SC (uncut) ช่องที่ 4 คือ พลาสมิด GMOs-SC ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 2,795 คู่เบส ช่องที่ 5 คือ พลาสมิด GMOs-DOA (uncut) ช่องที่ 6 คือ พลาสมิด GMOs-DOA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ HindIII มีขนาด 3,657 คู่เบส และ M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 Kb DNA

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนชุดของดีเอ็นเอมาตรฐานจากการคำนวณ

ชื่อดีเอ็นเอมาตรฐาน	ค่า A_{260}/A_{280}	ความเข้มข้น (ng/ul)	จำนวนชุด (copy number)
1. linear GMOs-Hawaii-c1	1.76	5.9	1.86×10^{9} copies
2. linear GMOs-SC-C1	1.75	20.45	6.78×10^{9} copies
3. linear GMOs-DOA-C1	1.70	13.75	3.48×10^{9} copies

การหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR

หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้ของดีเอ็นเอมาตรฐาน (LOD) โดยทดสอบที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน เท่ากับ 250, 25 และ 2.5 ชุด (copy) ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนต่าง ๆ ที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *papain, CaMV35s, nos, cp-Hawaii* และ *cp-SC* พบว่า 1. คู่ไพรเมอร์ Papain-B1/Papain-B2 สามารถตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ปริมาณต่ำสุด (LOD) เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 เท่ากับ 250 copies 2. คู่ไพรเมอร์ 35S-F/35S-R สามารถตรวจสอบยีน *CaMV35S* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 3. คู่ไพรเมอร์ 180-F/180-R สามารถตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 4. คู่ไพรเมอร์ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 สามารถตรวจสอบยีน *cp*_Hawaii บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 5. ไพรเมอร์ SC-F/SC-R สามารถตรวจสอบยีน *cp*-SC บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nakamura *et al*., (2013) ที่ได้ใช้ดีเอ็นเอพลาสมิดเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกในการตรวจสอบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Hawaii ในผลิตภัณฑ์มะละกอ ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าค่า LOD อยู่ที่ 250 ชุด (copies) เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) สำหรับตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Real-time PCR

คู่ไพรเมอร์และโพรบ	ค่า LOD ของดีเอ็นเอมาตรฐาน		
	linear pGMOs-Hawaii-C1 (copy number)	linear pGMOs-SC-C1 (copy number)	linear pGMOs-DOA-C1 (copy number)
Papain-B1/Papain-B2	25	250	250
35S-F/35S-R	250	250	250
180-F/180-R	25	250	250
55-1 Primer 1/55-1 Primer 2	250	-	-
SC-F/SC-R	-	250	-

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ ที่มีรายงานในวารสารระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลาสมิดมาตราฐานใช้ตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ต่อไปนี้ ได้แก่ ยีน *Cauliflower mosaic virus promoter* (*CaMV 35S*) ขนาด 82 คู่เบส, ยีน *beta-glucuronidase* (*gus*) ขนาด 75 คู่เบส, ยีน *nopaline synthase terminator* (*nos*) ขนาด 84 คู่เบส, ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ Hawaii (cp-Hawaii) ขนาด 71 คู่เบส, ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ (cp-SC) มีขนาด 70 คู่เบส, , ยีน *coat protein* (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV สายพันธุ์ไทยจากจังหวัดขอนแก่น (*cp*-DOA) มีขนาด 866 คู่เบส และยีน *papain* ของมะละกอ ขนาด 91 คู่เบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กล่าวมาข้างต้น มาเชื่อมต่อกันด้วย linker ซึ่งเป็นจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนเป้าหมายทุกยีน ทำให้สามารถออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีนมาตรฐานได้สามชุดด้วยกัน ประกอบด้วย 1) ชุดยีน GMOs-Hawaii ที่มีขนาด 624 คู่เบส ซึ่งชุดยีนนี้ประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *gus*, *nos*, *cp*_Hawaii, *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, PstI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ 2) ชุดยีน GMOs-SC ขนาด 502 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV35S*, *nos*, *cp*_SC และ *papain* ที่คั่นด้วยจุดตัดของเอนไซม์ EcoRI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ และ3 ชุดยีน GMOs-DOA ขนาดประมาณ 1,379 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *CaMV 35S, gus, nos*, *cp*-DOA และยีน *Papain* ที่คั่นด้วยจุดจดจำของเอนไซม์ EcoRI, NheI, SacI, HindIII, XhoI และ EcoRI ตามลำดับ

จึงดำเนินการสังเคราะห์ชุดยีนสามชุดด้วยกัน แต่ละชุดยีนให้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMK-T ทำให้ได้ชุดพลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-Hawaii ขนาดประมาณ 2,941 คู่เบส, พลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-SC ขนาดประมาณ 2795 คู่เบส และพลาสมิดลูกผสมมาตรฐาน GMOs-DOA ขนาดประมาณ 3,657 คู่เบส โดยพลาสมิดมาตรฐานทุกชุดสามารถเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ได้ คัดเลือกเอาโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ ซึ่งคาดว่าเป็นโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ จำนวน 10-14 โคลน มาตรวจสอบขนาดของพลาสมิด พบว่าขนาด พลาสมิดจากทุกโคลนที่คัดเลือกมา มีขนาดใหญ่กว่า 1,500 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และตรวจสอบพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S, gus* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 359 คู่เบส ในพลาสมิดที่สกัดจากโคลนของ GMOs-Hawaii และ GMOs-DOA ส่วนพลาสมิดที่สกัดจากโคลน GMOs-SC ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *CaMV 35S* และ *nos* ที่เชื่อมต่อกัน ขนาดประมาณ 238 คู่เบส ในทุกโคลนเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ทั้งเมื่อคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดยีนจากโคลนที่ 1 (GMOs-Hawaii-c1, GMOs-SC-c1, GMOs-DOA-c1) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมทั้งสามชุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมต้นแบบแต่ละชนิด พบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบ SC และ 55-1 กับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ SC และ Hawaii, ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม RR และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 863 พบว่าไพรเมอร์และโพรบ SC จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ SC (GM 9) ส่วนไพรเมอร์และโพรบ 55-1 จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ Hawaii (GM 6) เท่านั้น ดังนั้นไพรเมอร์และโพรบทั้งคู่นี้เหมาะสมในการใช้เพื่อจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้

ทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจสอบได้ (LOD) ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนต่าง ๆ ที่มีในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *papain*, *CaMV35s*, *nos*, *cp-Hawaii* และ *cp-SC* พบว่า 1. คู่ไพรเมอร์ Papain-B1/Papain-B2 สามารถตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ปริมาณต่ำสุด (LOD) เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *papain* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 เท่ากับ 250 copies 2. คู่ไพรเมอร์ 35S-F/35S-R สามารถตรวจสอบยีน *CaMV35S* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1, linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 3. คู่ไพรเมอร์ 180-F/180-R สามารถตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 25 copies แต่ LOD ของการตรวจสอบยีน *nos* บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 และ linear pGMOs-DOA-C1ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 4. คู่ไพรเมอร์ 55-1 Primer 1/55-1 Primer 2 สามารถตรวจสอบยีน *cp*_Hawaii บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-Hawaii-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies 5. ไพรเมอร์ SC-F/SC-R สามารถตรวจสอบยีน *cp*-SC บนดีเอ็นเอมาตรฐาน linear pGMOs-SC-C1 ได้ที่ LOD เท่ากับ 250 copies

สรุปได้ว่าการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานขึ้นมาสามชุด คือ พลาสมิด GMOs-Hawaii, GMOs-SC และ GMOs-DOA เพื่อเป็นดีเอ็นเออ้างอิงสำหรับการตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จำนวนสามสายพันธุ์ ประกอบด้วยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ฮาวาย, สายพันธุ์ของประเทศไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ และสายพันธุ์ของประเทศไทยจากจังหวัดขอนแก่น ในการตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR เชิงคุณภาพได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นเป็นชุดยีนที่เชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pMK-T และได้ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานได้อย่างรวดเร็ว และเพิ่มจำนวนไม่จำกัดภายในเซลล์ ด้วยการเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณที่ต้องการและสกัดพลาสมิดเพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุอ้างอิงได้ ภายในระยะเวลาไม่นาน และสามารถพัฒนาใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรงมาเปรียบเทียบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในเชิงปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR ต่อไปได้ในอนาคต และความรู้ที่ได้ยังเป็นพื้นฐานความรู้ในการพัฒนาสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นได้อีกด้วย

ในแง่การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นสามารถยืนยันความถูกต้องของผลการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากผลการตรวจสอบดีเอ็นเอ

มาตรฐานที่สร้างขึ้นมีความถูกต้องตรงกับข้อมูลที่มีรายงานในวารสารระดับนานาชาติ และถ้านำดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้อยู่ในรูปเส้นตรง จะสามารถพัฒนาไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธีการ Real-time PCR เชิงปริมาณได้ และองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังเป็นพื้นฐานในการพัฒนาสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ อีกด้วย

การทดลองที่ 9 การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล พงศกร สรรค์วิทยากุล
อรรคพล ภูมีศรี
Khanitha Wongwathanarat Chananton Danaisilichaichon Pongsakorn Sunvittayakul
Arkkapon Phoomeesri

บทคัดย่อ

สังเคราะห์ยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp โคลนเข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดโปรตีนขนาด 52 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 4.5 นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง แยกสกัด IgG จากแอนติบอดีปรับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 1:200 ทดสอบความใช้ได้ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองสด โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน EPSPS ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการกับชุดตรวจสอบทางการค้า (Agdia ELISA kit) ผลการทดสอบทั้งสองให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน
คำสำคัญ : SDS-PAGE, IgG, โปรตีน EPSPS, กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย มีการผลิตขึ้นเพื่อบริโภคและส่งออกต่างประเทศ ซึ่งประเทศไทยถือเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุดของโลก ข้าวไทยถูกส่งออกไปยังทวีปแอฟริกา (ประมาณ 54%), ทวีปเอเชีย (21%), ตะวันออกกลาง (10%), ยุโรป (7%), อเมริกา (6%), อินโดนีเซีย (2%) โดยประเทศที่นำเข้าข้าวไทยมากที่สุดเรียงตามลำดับดังนี้ 1) ไนจีเรีย 2) แอฟริกาใต้ 3) เบนิน 4) ไอเวอรรี่โคสต์ 5) สหรัฐอเมริกา 6) เซเนกัล 7) จีน 8) อิรัก 9) ฮ่องกง และ 10) ญี่ปุ่น (หอการค้าไทยและสำนักงานมาตรฐานสินค้านำเข้าและส่งออก, 2552) กลุ่มประเทศที่ส่งออกข้าวรองลงมา คือ เวียดนาม อินเดีย

ปากีสถาน และจีน ตามลำดับ ข้าวในประเทศไทยเป็นข้าวที่มีคุณภาพและเป็นที่น่าเชื่อถือของผู้จัดหาข้าวป้อนสู่ตลาดโลกและอุตสาหกรรมข้าว เนื่องจากในยุคปัจจุบันของการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพหรือพืชจีเอ็มโอที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศผู้นำในการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพ ได้มีการพัฒนาข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่มีความต้านทานยาฆ่าหญ้า เช่น ข้าวลิเบอร์ตี้ลิ้ง (Liberty Link, LL) โดยบริษัท ไบเออร์ (Bayer) (Bethell, 2002) ข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่นำมาใช้ในทางเภสัชวิทยา ประเทศจีนและสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ที่มีศูนย์วิจัยตั้งอยู่ภายในสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ ได้พัฒนาข้าวบีที (Bt Rice) เพื่อให้มีความต้านทานแมลง และยังมีข้าวสีทอง (Golden Rice) ซึ่งเป็นข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการตัดต่อยีนเพื่อเพิ่มระดับของสารเบต้าเคโรตีน (International, 1977) ได้มีการปลูกทดสอบในประเทศฟิลิปปินส์, บังคลาเทศ, อินเดีย, อินโดนีเซีย และเวียดนาม

ในปัจจุบันมีข้าวดัดแปรพันธุกรรม 3 ชนิดเท่านั้น ที่ได้รับการขึ้นทะเบียน ได้แก่ LL601, LL06/LL62 ข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL06/LL62 ได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศออสเตรีย, แคนนาดา, เม็กซิโก และสหรัฐอเมริกา เป็นประเทศเดียวที่ที่มีการอนุญาตให้มีการขึ้นทะเบียนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL601 ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมามีเหตุการณ์การปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม ข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ออกสู่สิ่งแวดล้อมในสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีผลกระทบก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมข้าว ข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ถูกพบว่าปนเปื้อนในระบบการค้าข้าวในทวีปยุโรป, แอฟริกา และเอเชีย เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 ทำให้หลายประเทศในทวีปยุโรปและญี่ปุ่นระงับการนำเข้าข้าวเมล็ดยาวจากสหรัฐอเมริกา คาดการณ์ว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของข้าวดัดแปรพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 741-1,285 ล้านดอลลาร์สหรัฐ จากเหตุการณ์ที่เกิดการปนเปื้อนของข้าวลิเบอร์ตี้ลิงค์ (LL601) ทำให้ประเทศญี่ปุ่นเพิ่มการตรวจสอบการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรมให้ครอบคลุมข้าวทุกชนิดที่นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ซึ่งรวมถึงข้าวเมล็ดกลางและเล็ก รวมถึงญี่ปุ่นจะมีการขอให้มีการตรวจสอบข้าวทุกชนิดที่มีการนำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการตรวจพบการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรม LL601 ในเอเชีย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ไม่อนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมภายในประเทศ แต่สืบเนื่องจากปัจจุบันเป็นยุคของพืชเทคโนโลยีชีวภาพ มีการวิจัยพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมกันหลายประเทศในแถบเอเชีย อย่างเช่น ประเทศจีน ซึ่งเป็นประเทศที่กำลังขยายฐานการผลิตวัตถุดิบสินค้าเกษตรมายังกลุ่มประเทศที่มีพื้นที่ใกล้เคียงกับประเทศไทย อาจมีการลักลอบนำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรม อย่างเช่น ข้าว Bt63 เข้ามาภายในประเทศ ถ้าเกิดกรณีดังกล่าวขึ้น จะมีมูลค่าความเสียหายเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล จากขั้นตอนการสุ่มเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ การดูแลรักษา แรงงาน และอื่น ๆ ซึ่งนั่นหมายถึง หากเกิดการปนเปื้อนข้าวดัดแปรพันธุกรรมจะต้องแบกรับต้นทุนในการจัดการให้มั่นใจว่าข้าวไทยปลอดจากจีเอ็มโอและส่งผลกระทบให้ประเทศคู่ค้า วางมาตรการการกีดกันทางการค้า หรือยุติการนำเข้าข้าวจากประเทศไทย

ปัจจุบันมีนักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบโปรตีนของพืชดัดแปรพันธุกรรม Yang, 2005 ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับตรวจสอบ hygromycin B phosphotransferase (HPT) ในข้าวดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA ด้วยเหตุนี้ทางกรมวิชาการเกษตร

ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจีเอ็มโอในพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการคิดค้นเทคโนโลยีในการตรวจสอบ เพื่อให้มีความสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ขนิษฐาและคณะ, 2554 ได้พัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready) โดยอิมมูโนโครมาโตกราฟี ซึ่งชุดตรวจสอบที่มีการวิจัยพัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้การตรวจคัดกรองวัตถุดิบในเบื้องต้น ลดการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นหน่วยงานต้นแบบในการพัฒนาชุดตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ นำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับตรวจสอบ

ระเบียบวิธีการวิจัย

การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ ดำเนินงานทีสำนักเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี 2554-2558 ระยะเวลา 4 ปี มีวิธีการ

1. การสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูลของข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 รวบรวมข้อมูลของรหัสพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกส่วนของยีนข้าวที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่ต้านทานแมลง คัดเลือกบริเวณของยีนดังกล่าว สังเคราะห์ยีน ขนาด 1,845 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® แล้วโคลนเข้าสู่ pET 200/D-TOPO® และถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย สกัดพลาสมิดลูกผสมตามวิธีการของ Sambrook and Russell, 2001 ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สังเคราะห์อีกครั้ง ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

2. การเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียและทำบริสุทธิ์ recombinant protein CryIAb/Ac

-การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณ Recombinant protein CryIAb/Ac ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน CryIAb/Ac มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ Recombinant protein CryIAb/Ac โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 transformants CryIAb/Ac-BL21 ในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 220 รอบต่อนาทีนานข้ามคืน (14-16 ชั่วโมง) เพื่อจะใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น จากนั้นเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 1% (final concentration) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 220 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง แล้วชักนำเซลล์ด้วยสาร IPTG เติมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ ชักนำเซลล์ให้ผลิตโปรตีนในระยะเวลาต่างกัน เพื่อหาว่าควรชักนำเซลล์ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลานานเท่าใดเซลล์ถึงจะผลิตโปรตีนลูกผสมออกมามากที่สุด

- การทำโปรตีน CryIAb/Ac ให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* CryIAb/Ac-BL21 transformants ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นชักนำให้แบคทเรียผลโปรตีนโดยเติมสาร IPTG ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ แล้วชักนำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ ตามวิธีในคู่มือการแยกและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (The QIA expressionist ของบริษัท QIAGEN) โดยใช้ nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin ชะโปรตีน CryIAb/Ac ที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ (elute) ด้วย buffer E (pH 3.5) ตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธีการ Bradford’s method (Bradford, 1776)

- การศึกษาขนาดและตรวจสอบ recombinant protein ด้วยเทคนิค Western blotting

ศึกษาขนาดของ recombinant protein CryIAb/Ac โดยแยกขนาดของ recombinant protein ด้วยวิธี SDS-PAG ด้วยชุดอุปกรณ์ของบริษัท Bio-Rad^{TM} จากนั้นถ่ายโอนโปรตีนจากเจลอะคริลาไมด์ขึ้นสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยเครื่อง transfer blotting (Biorad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในสารละลาย BSA/TBST blocker™ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย TBST 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในแอนติบอดี anti-6x His tag , Alkaline Phosphatatse (abcam, England) ที่เจือจางด้วย TBST ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวนอนจนเกิดปฏิกิริยาชัดเจน ล้างออกด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

- การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองเป็นกระต่ายเพศเมียพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 3 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัม โดยเจาะเลือดกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum, Ns) จากนั้นนำ recombinant protein CryIAb/Ac ที่ทำการสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund’s adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) ในครั้งแรก และฉีดแอนติเจนเข้มข้น 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับ Incomplete Freund’s adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิมในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4

เริ่มเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหูครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 5 และทำการเจาะเลือดทุก ๆ สัปดาห์จนครบ 10 ครั้ง นำเลือดมาปั่นที่ 8,000 rpmที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนซีรัมไปทดสอบ

- การตรวจสอบค่าไตเตอร์ (Titer) ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายด้วยเทคนิค indirect ELISA

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ recombinant protein CryIAb/Ac เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของ A_{405} ของซีรัมปกติ, Normal serum) ด้วยวิธีการ indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977)

- การแยกสกัดแกมมาอิมมูโนโกลบูลิน ชนิด G (IgG)

การแยกสกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP (GE, Germany) ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) นำ IgG ที่แยกสกัดได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG โดยใช้ค่า Extinction coefficient คำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร $OD_{280}/1.4 = X$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

โครงสร้างของชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ที่เรียกว่า อิมมูโนโครมาโทกราฟิคสตริป หรืออิมมูโนสตริป มีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ backing pad, sample pad, conjugate pad, reaction membrane และ absorption pad (Kumar, 2011)

- การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค electrostatic force

นำสารละลาย colloidal gold pH 7.4 ที่มีขนาดอนุภาค 40 นาโนเมตร มาทดสอบการเชื่อมต่อกับ IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย colloidal gold (ปรับให้ได้ pH 7.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 10% NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มอีก 5 นาที ตรวจวัดค่า $OD_{400\text{-}800}$ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG สร้างกราฟความสัมพันธ์ของค่า OD_{530} กับปริมาณ IgG คัดเลือกตราส่วนปริมาณ IgG ที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับอนุภาคทองไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

- การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค neary covalent

นำ IgG ที่ผ่านการทำ Desalting ใน 100 mM Na_2HPO_4 pH 7.5 เจือจางให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม $NaIO_4$ 10 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1X PBS ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา Oxydation โดยผสม IgG ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย purpald ถ้าเกิดการ Oxydation ของ IgG จะให้ผลการตรวจสอบเป็นสีม่วง เมื่อได้แอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยา Oxydation อย่างสมบูรณ์แล้ว ติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารละลาย 46.5 mM linker เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เติม 40 mM HEPES แล้วคัดแยก IgG ที่ตัดฉลากกับ linker จากโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนโดยการกรองด้วย 10K MW cut of (Michael, 2011)

ทดสอบหาปริมาณ IgG linker ที่เหมาะสมกับการเชื่อมต่อด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร โดยการผสม IgG linker ตรวจสอบการเชื่อมต่อของ gold conjugated IgG โดยการตรวจวัดค่า $OD_{400\text{-}800}$ นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ colloidal gold ปกติ คัดเลือก gold conjugated IgG ที่ให้ค่า $OD_{400\text{-}800}$ นาโนเมตร ที่มากกว่า colloidal gold ที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับ IgG

- การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ โดยใช้ตัวอย่าง supernatant ของเซลล์แบคทีเรีย และ recombinant protein CryIAb/Ac ที่ทำบริสุทธิ์ และตัวอย่าง recombinant protein CryIAb ด้วยเทคนิค DIBA

- การตรวจวิเคราะห์ลักษณะ colloidal gold และ gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เปรียบเทียบขนาดของ colloidal gold ก่อนและหลังการเชื่อมด้วย IgG โดยการนำหยดอนุภาคทองลงบนแผ่นกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอร์มวามและคาร์บอนซับให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตรวจดูที่กำลังขยาย 120,000 เท่า ที่ 100 กิโลโวลต์ วัดขนาดอนุภาคทอง ดูการกระจายและหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด colloidal gold และ gold conjugated IgG

- การทดสอบหาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อกับ IgG ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

ทดสอบสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 nm ที่ค่า pH 7.4 และ pH 9.0 เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมของ colloidal gold ที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อกับ IgG โดยใช้ IgG : colloidal gold ที่อัตราส่วน 1:100 กวนสารละลาย gold conjugated IgG ที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย BSA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ของปริมาตร gold conjugated IgG กวนสารละลายต่อที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน gold conjugated IgG ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอน gold conjugated IgG ด้วย Diluent buffer (1x PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% PEG) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำ gold conjugated IgG ที่ละลายใน diluent buffer ตรวจวัดค่า $OD_{400-800}$ นาโนเมตร เลือกค่า pH ของ colloidal gold ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่สูงกว่าไปพัฒนาชุดตรวจสอบ

- การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ conjugate pad

ทดสอบเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบ protein CryIAb/Ac บนแผ่นเมมเบรนที่ต่างชนิดกัน คือ AE 99 และ Unisart CN 140 และศึกษาเปรียบเทียบชนิดของ conjugate pad ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิด คือ glass fiber grade 8964 และ polyester sheet นำมาประกอบชุดตรวจสอบ คัดเลือกชนิดของเมมเบรนและconjugate pad ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้อง ชัดเจน ไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

- ปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของ control line และ test line

ปริมาณความเข้มข้นและความเข้มข้นของ control line ซึ่งใช้ Anti-Rabbit IgG F(ab)2, F cross absorbed antibody produced in goat (Sigma, USA) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ IgG ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายโดยเจือจาง GAR ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3 เพื่อศึกษาอัตราส่วนของ control line ที่เหมาะสมในการตรวจจับกับ gold conjugated IgG บริเวณ

control line และหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการพ่น บริเวณ test line ซึ่งห่างจากตำแหน่ง control line เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร

- การหาปริมาณความเหมาะสมของ gold conjugated IgG สำหรับลงบนแผ่น Conjugate pad

หาอัตราส่วน gold conjugated IgG ที่ใช้ IgG-linker ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ และปริมาณ 15 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร โดยการพ่น gold conjugated IgG แต่ละความเข้มข้นที่อัตราส่วน 10, 20 และ 30 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บนแผ่น Conjugate pad เปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยาบริเวณ control line และ test line โดยทดสอบกับ DOA extraction buffer และ recombinant protein CryIAb/Ac คัดเลือกช่วงของปริมาณ gold conjugated IgG ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำไปเป็นเกณฑ์กำหนดโดยการทดสอบซ้ำอีกในหลาย หลายอัตราส่วน

- ทดสอบหา Extraction buffer สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ

เปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของ Extraction buffer จำนวน 6 ชนิด คือ DOA extraction buffer pH 8.5, 1xPBS pH 7.4, 2% CTAB, Extraction strip kit Agdia, Borate buffer pH 7.4, Lysis buffer หยดตัวอย่าง Extraction buffer แต่ละชนิดตรงบริเวณ sample pad ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ให้ Extraction buffer เคลื่อนที่ ผ่าน conjugate pad, test line และ control line จนถึง absorption pad อ่านการเกิดปฏิกิริยาภายในเวลา 10 นาที คัดเลือก Extraction buffer สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง โดยให้ผลการตรวจสอบ บริเวณ control line และ test line ที่ชัดเจน ไม่เกิดผลการทดสอบลวง (false positive)

- การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ

ผลิตชุดตรวจสอบโดยการใช้ colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ค่า pH 7.4 เชื่อมต่อกับ IgG-linker ปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กวน gold conjugated IgG ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที แล้วเติมสารละลาย BSA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1% ของปริมาตร gold conjugated IgG กวนต่อไปที่ความเร็วรอบเช่นเดิมอีก 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน gold conjugated IgG ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ละลาย gold conjugated IgG ด้วย diluent buffer เติม 10% trehalose และ 20% sucrose นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{400-800}$ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 3.0 พ่นสารละลาย gold conjugated IgG บนแผ่น polyester sheet ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร นำ conjugate pad ไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ส่วนของการแสดงผลปฏิกิริยาใช้เมมเบรน Unisart CN 140 เตรียม control line โดยใช้ GAR 1:2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บริเวณ test line ใช้ IgG เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดเส้น control line และ test line ห่างกัน 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง ประกอบชุดตรวจสอบ โดยนำแต่ละส่วนมาประกอบบน plastic backing card ใช้ absorption pad grade 222, conjugate pad และ sample pad แต่ละชิ้นเหลื่อมกัน

ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เพื่อให้เกิดความต่อเนื่องของการไหล จากนั้นตัดให้มีขนาดกว้างชิ้นละ 3.8 มิลลิเมตร บรรจุลงตลับเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ

- ศึกษาความจำเพาะเจาะจงและประสิทธิภาพของความไวในการตรวจสอบได้ค่าต่ำสุดของชุดตรวจสอบ (LOD)

ทดสอบความจำเจาะจงของชุดตรวจสอบโดยใช้ตัวอย่างโปรตีน NK 603, EPSPS, NPTII, Cry9C, CryIAb, CryIAb/Ac ตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ข้าวที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของโปรตีน ด้วยเทคนิค Real time PCR เจือจางตัวอย่างด้วย DOA extraction buffer แล้วตรวจสอบกับชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น

ตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบในการตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac โดยใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบ 2 ชนิด คือ โปรตีน CryIAb/Ac บริสุทธิ์ที่มีระดับความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1:100, 1:200, 1:400, 1: 800, 1:1,600 และเจือจางเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีน CryIAb/Ac ที่ระดับความเจือจางเดียวกันใน DOA extraction buffer นำมาตรวจสอบกับชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น

- การหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างสำหรับใช้ทดสอบ

หาปริมาณตัวอย่างสำหรับการเตรียมตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการใช้กับชุดตรวจสอบ เพื่อให้ชุดตรวจสอบแสดงผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ชัดเจน

- การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเทียบกับชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของ Agdia ชุดตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมของประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลการทดลองและอภิปราย

การสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* ขนาด 1,839 bp ซึ่งปรับ codon usage ให้เหมาะสมกับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เชื่อมต่อยีน *CryIAb/Ac* เข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® ได้ Recombinant vector *CryIAb/Ac*_Lab ถ่ายโอนลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* BL21 คัดเลือกโคโลนีสกัดพลาสมิดส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบลำดับนิวคลีโอไทด์ *CryIAb/Ac*_Lab มีความคล้ายคลึงกับยีนต้นแบบ *CryIAb/Ac*_Protein_Syn ในข้าวดัดแปรพันธุกรรมBt 63 ถึง 99 % และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับ Accesion No. CryIAb/Ac_AF537267 ถึง 100 % แปลรหัสโปรตีนได้ 613 กรดอะมิโน คิดเป็นขนาดโปรตีน 68 กิโลดาลตัน

การเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียและทำบริสุทธิ์ recombinant protein CryIAb/Ac

- การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ Recombinant protein CryIAb/Ac

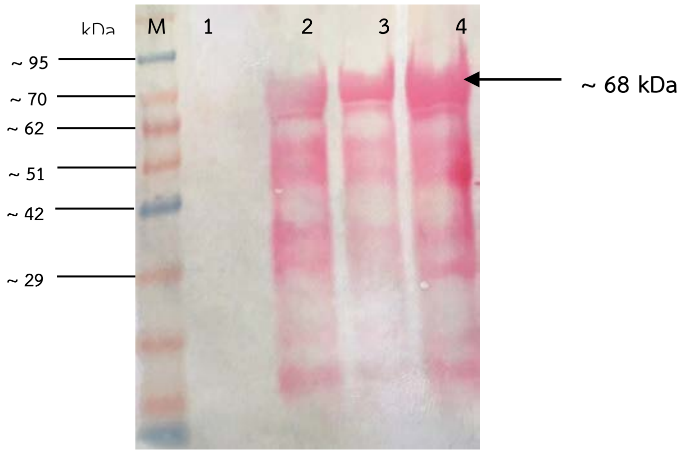
พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน ในการชักนำเซลล์ CryIAb/Ac -BL21 ที่เวลา 1-5 ชั่วโมง โดยโปรตีนจะผลิตได้มากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนลูกผสมออกมามากเทียบเท่ากับระยะเวลาการการชักนำนานข้ามคืน และมีปริมาณ host protein น้อย คือ เวลา 5 ชั่วโมง

- การทำโปรตีน CryIAb/Ac ให้บริสุทธิ์

พบว่า buffer E, pH 3.5 เป็นบัฟเฟอร์ที่มี pH เหมาะสมในการชะRecombinant protein CryIAb/Ac บริเวณ polyhistidine ทางปลาย N-terminal ของสายเปปไทด์ ให้หลุดออกจากคอลัมน์ Ni-NTA ได้ ซึ่งโปรตีนขนาด ~68 กิโลดาลตันนี้ น่าจะเป็นโปรตีน CryIAb/Ac ของข้าวดัดแปรพันธุกรรม สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยวิธี dialysis หรือ desalting และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนด้วยเทคนิค western blot ก่อนที่จะนำโปรตีนไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีต่อไป

- การศึกษาขนาดและตรวจสอบ recombinant protein ด้วยเทคนิค Western blotting

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติบอดีตรวจสอบ His tag ที่เชื่อมติดกับโปรตีน CryIAb/Ac พบว่าแอนติบอดี anti-6x His tag สามารถตรวจจับกับ His tag ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ทั้งในของ His tag ที่ติดกับโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียและในส่วนของโปรตีน CryIAb/Ac ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ ภาพที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทีผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นโปรตีนเป้าหมายที่สามรถนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองได้อย่างจำเพาะเจาะจง



ภาพที่ 1 แสดงแถบขนาดของ recombinant protein CryIAb/Ac ในข้าวดัดแปรพันธุกรรม ทดสอบด้วยเทคนิค Western blotting ใช้แอนติบอดี anti-6x His tag ตรวจจับ His tag ที่ติดกับโปรตีน CryIAb/Ac (M=Protein marker, ช่องที่ 1 คือ BSA, ช่องที่ 2 คือ Supernatant จากเซลล์แบคทีเรีย CryIAb/Ac-BL21, ช่องที่ 3 คือ โปรตีน CryIAb/Ac หลอดที่ 1, ช่องที่ 4 คือ โปรตีน CryIAb/Ac หลอดที่ 2)

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

ตรวจสอบค่าไตเตอร์แอนติซีรัมแต่ละหลอดด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 204,800-1,638,400 ซึ่งแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 6 และ 10 ให้ค่าไตเตอร์สูงสุด คือ 1,638,400 และแยกสกัด IgG ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน โดยใช้แอนติซีรัมเริ่มต้นที่ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจากแอนติซีรัม 1 มิลลิลิลิตร ตรวจวัดค่า UV1_280 ได้เท่ากับ 340 mAU ตรวจวัดค่าความเข้มข้นที่ $OD._{280}$ ได้เท่ากับ 2.381 คิดเป็นความเข้มข้นของ IgG เท่ากับ 1.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร IgG ที่แยกสกัดได้จะมี Heavy chain ขนาด 50 กิโลดาลตัน และ light chain และ 25 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี

- การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตรด้วยเทคนิค electrostatic force

เบื้องต้นพบว่า IgG ปริมาณ 16 ไมโครลิตร เหมาะสมกับการเชื่อมต่อกับอนุภาทอง เพราะเมื่อทดสอบกับ 10% NaCl ยังคงมีสีที่ใกล้เคียงกับ colloidal gold ปกติ ซึ่งหากปริมาณของ colloidal gold และ IgG มีอัตราส่วนที่ไม่สมดุลกันนั้น colloidal gold ซึ่งมีประจุบวก จะจับกับ NaCl ที่มีประจุเป็นลบ จนตกตะกอน หรือเปลี่ยนเป็นสีม่วงเทา เมื่อตรวจวัดค่าการดูกลืนแสดงที่ความยาวคลื่นแสง 400-800 นาโนเมตร colloidal gold conjugated IgG ให้ค่า $OD_{400-800}$ ต่ำกว่า Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร แต่ยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่า colloidal gold +10% NaCl แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของ IgG ที่ 16 ไมโครลิตร ยังเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับ colloidal

- การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตรด้วยเทคนิค neary covalent

การใช้ IgG linker ในการเชื่อมต่อกับอนุภาคทอง ซึ่งจะได้ colloidal gold conjugated IgG ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ colloidal gold และ IgG ที่เชื่อมต่อกันจะมีความเสถียรและไม่หลุดจากกันเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH หรือสภาวะต่างๆ จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{400-800}$ ของ gold และ gold conjugated IgG ช่วงของค่าดูดกลืนแสงสูงสุดควรแตกต่างกันไม่เกิน 10 นาโนเมตร จากการวัดค่าการดูด colloidal gold ให้ค่า $OD._{521}$ เท่ากับ 0.3781 และค่า gold conjugated IgG ที่อัตราส่วน 10 และ 15 ไมโครลิตร ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ $OD._{533}$ ที่ 0.3565 และ 0.3567 ตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วน 20 ไมโครลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกับ IgG อีก 2 อัตราส่วนมาก ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ $OD._{562}$ ได้เท่ากับ 0.3113 ความยาวของค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกับ colloidal gold ถึง 41 นาโนเมตร แสดงว่าที่ IgG อัตราส่วนมากเกินเมื่อไปจับกับ colloidal gold แล้วทำให้พื้นที่ผิวของ colloidal gold เสียสภาพไปจากเดิม จึงเป็นอัตราส่วนที่ไม่ควรนำไปใช้ในการพัฒนาชุด

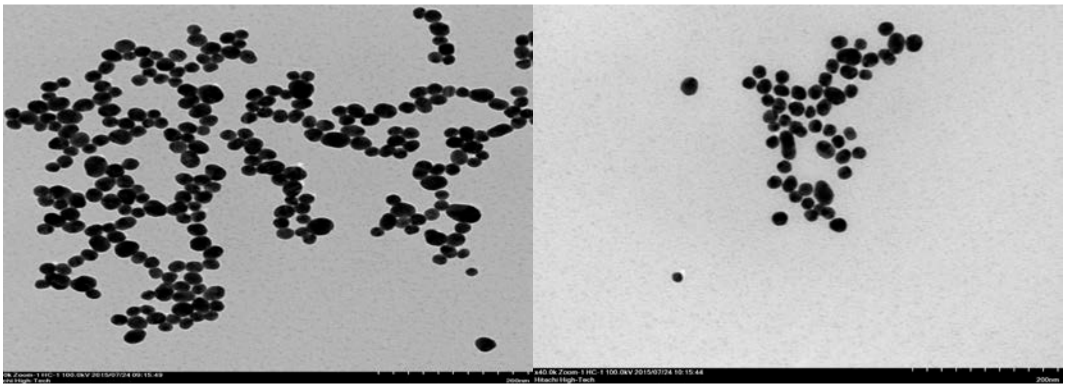
- การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG และ gold conjugated IgG ต่อตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ด้วยเทคนิค DIBA โดยใช้ IgG และ gold conjugated IgG ที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจสอบโปรตีนในตัวอย่าง supernatant ของเซลล์แบคทีเรีย และโปรตีน CryIAb/Ac ที่ทำบริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน CryIAb แต่ไม่เกิด fale positibve ในตัวอย่าง negative ที่เป็นเช่นนี้

เนื่องจากเมื่อตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CryIAb/Ac และ CryIAb พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้ง 2 มีความคล้ายคลึงกัน โดยโปรตีน CryIAb เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน CryIAb/Ac

- การตรวจวิเคราะห์ลักษณะ colloidal gold และ gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการตรวจสอบขนาดของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่านพบว่า ขนาดของ colloidal gold และ colloidal gold conjugated IgG มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ขนาดของ colloidal gold conjugated IgG มีขนาดเฉลี่ย 30 นาโนเมตร ใหญ่กว่า colloidal gold มีขนาดเฉลี่ย 22 นาโนเมตร ภาพที่ 2 ถึงแม้ขนาดของ colloidal gold ยังมีขนาดไม่ถึง 40 นาโนเมตร แต่ก็อยู่ในช่วง 20-40 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อกับแอนติบอดีและมีสีแดงทำให้แสดงผลการตรวจสอบที่ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาบนเมมเบรนที่มีสีขาว



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบขนาดของ Colloidal gold ก่อนและ gold conjugated IgG ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย x40.0k ที่ 100 กิโลโวลต์

ก) Colloidal gold ก่อนเชื่อมต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 22 นาโนเมตร

ข) Colloidal gold conjugated IgG ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 30 นาโนเมตร ตามลำดับ

- การทดสอบหาค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมต่อกับ IgG ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

จากการเปรียบเทียบค่า pH ของสารละลาย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ที่ค่า 7.4 และ 9.0 เพื่อคัดเลือกค่า pH ของ colloidal gold ที่ประสิทธิภาพและความเสถียรในการเชื่อมต่อกับ IgG พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดจาก colloidal gold pH 7.4 มีค่ามากกว่า colloidal gold pH 9.0 แสดงว่าบนพื้นที่ผิวของ colloidal gold pH 7.4 มีการเชื่อมต่อกับ IgG ได้มากกว่า colloidal gold pH 9.0 จึงควรเลือก colloidal gold pH 7.4 ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ

- การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ conjugate pad

จากการทดสอบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE 99 และ Unisart 140 gold conjugated IgG สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Unisart 140 เมมเบรนได้ดีกว่า AE 99 ผลการเกิดปฏิกิริยาบริเวณ

control line และ test line ให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน CryIAb/Ac สามารถเคลื่อนที่ผ่าน Unisart 140 ไก้ดีกว่าเมมเบรนชนิด AE 99 จึงควรคัดเลือกเมมเบรนชนิดดังกล่าวไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ และการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของ conjugate pad ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิดคือ glass fiber grade 8964 และ polyester sheet พบว่า polyester sheet สามารถปล่อย gold conjugated IgG ค่อยๆ ไหลผ่านไปได้รวดเร็ว เหลือปริมาณ gold conjugated IgG ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปได้ในปริมาณน้อยกว่า glass fiber grade 8964 แต่ควรเลือก glass fiber grade 8964 ไปพัฒนาชุดทดสอบเนื่องจากถ้าโมเลกุลเคลื่อนที่เร็วเกินไปจะทำให้ IgG มีระยะเวลาในการตรวจจับกับแอนติเจนน้อยเกิดไป ส่งผลให้มีแอนติเจนตกค้างอยู่บริเวณ conjugate pad ทำให้แอนติเจนไม่เพียงพอให้ตรวจจับได้บริเวณ test line ซึ่งชุดตรวจสอบจะไม่สามารถตรวจจับแอนติเจนหรือโปรตีน CryIAb/Ac ในปริมาณต่ำ ๆ ได้ แต่ควรมีการศึกษาสารละลาย blocking solution เพิ่มเติมเพราะชนิดของ blocking solution ที่มีส่วนผสมของ BSA และ Sucrose มีผลกระทบต่อการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่หยดบนชุดตรวจสอบ และมีส่วนช่วยในการป้องกันบริเวณพื้นผิวของ colloidal gold ที่ไม่ได้ตรวจจับกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบ และส่งผลให้การตรวจสอบสามารถตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

- ปริมาณความเข้มข้นและอัตราส่วนของ control line และ test line

พบว่าอัตราส่วนที่เกิดปฏิกิริยาบริเวณ control line และ test line ที่ชัดเจนที่สุดคือ GAR อัตราส่วน 1:2 ให้ผลการตรวจสอบที่บริเวณได้ดีกว่า อัตราส่วน 1:3 เมื่อใช้ GAR อัตราส่วน 1:2 ที่ปริมาณ 1, 1.5 และ 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างเมื่ออ่านผลการตรวจสอบในระดับสายตา ส่วน test line ที่เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจนเพียงพอ ฉะนั้นอัตราส่วนของ control line ที่ใช้ GAR อัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และ test line ที่เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ

- การหาปริมาณความเหมาะสมของ gold conjugated IgG สำหรับลงบนแผ่น Conjugate pad

จากการทดสอบอัตราส่วนของ gold conjugated IgG จำนวน 2 ความเข้มข้นคือ gold conjugated IgG ที่ใช้ IgG-linker ปริมาณ 10 และ 15 ไมโครลิตรต่อ colloidal gold 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปพ่นที่บริเวณ Conjugate pad พบว่าปริมาณ gold conjugated IgG ที่เหมาะสม คือ อัตราส่วน 12-14 ไมโครลิตร แต่ได้เลือกอัตราส่วนที่ 12.5 ไมโครลิตร สำหรับพ่นบน conjugate pad ไปพัฒนาชุดตรวจสอบ ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ไม่สิ้นเปลือง gold conjugated IgG และมีปริมาณที่พอเหมาะในการการจับกับโปรตีนเป้าหมายแล้วสามารถเคลื่อนที่ไปตามหลักโครมาโตกราฟฟีได้อย่างเหมาะสม

ชนิดของ Extraction buffer มีผลกระทบโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ ซึ่งคุณสมบัติของ Extraction buffer จะต้องที่ความสามารถในการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีปริมาณและรักษาสภาพโปรตีนได้ดี ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีน

เป้าหมาย ซึ่ง Extraction buffer ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่สุด คือ DOA extraction buffer pH 8.5 และ 1xPBS pH 7.4

- การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบพบว่า ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ชุดตรวจสอบไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนทั้ง NK 603, EPSPS, NPTII, Cry9C, BSA และ DOA extraction buffer แต่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน CryIAb ซึ่งพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีส่วนคล้ายคลึงกับโปรตีน CryIAb/AC จึงทำให้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนของโปรตีน CryIAb ได้เช่นกัน โดยสามารถอ่านผลการตรวจสอบได้อย่างชัดเจนภายในระยะเวลา 10 นาทีหลังจากหยดตัวอย่างทดสอบ แต่เมื่อนำไปทดสอบกับผลิตภัณฑ์ข้าวที่มีการปนเปื้อนของพืชดัดแปรพันธุกรรม พบว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาไม่สามารถตรวจสอบได้ อาจเนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดัดแปรพันธุกรรมในปริมาณน้อย และตัวอย่างผ่านการแปรรูปอาจทำให้โปรตีนมีการเสียสภาพไปจนแอนติบอดีไม่สามารถตรวจจับได้ ซึ่งอาจจะต้องทดสอบหาชนิดของ Extraction buffer ที่เหมาะสมกับการสกัดโปรตีนจากผลิตภัณฑ์ต่อไป

จากการทดสอบความไวในการตรวจสอบและระดับความเจือจางต่ำสุดของชุดตรวจสอบที่ประกอบด้วยcontrol line ที่เจือจาง 1: 2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และใช้ gold conjugated IgG ที่ 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ทดสอบโปรตีน Cry IAb/Ac บริสุทธิ์ ได้ที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่ 1:400 คิดเป็นความเข้มข้นโปรตีน 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสามารถตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มีโปรตีน CryIAb/Ac ที่ความเจือจาง 1:200 แสดงให้เห็นว่าแม้ตัวอย่างโปรตีนเป้าหมายปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ใช่สภาพตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ ชุดตรวจสอบที่ DOA extraction buffer สกัดโปรตีนยังคงสามารถตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ภาพที่ 3

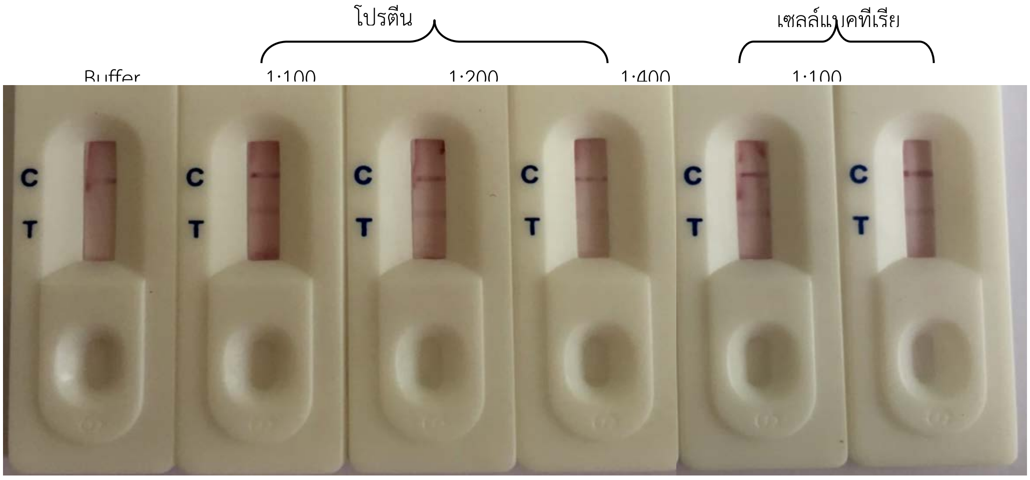
- การปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างสำหรับใช้ทดสอบ

ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบควรใช้ที่ 80 ไมโครลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการทดสอบ เพราะถ้าปริมาณตัวอย่างมากเกินไปจะทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่จับกับ gold conjugated IgG เคลื่อนที่ได้ช้าเมื่อเคลื่อนที่ถึง absorption pad ทำให้สารละลายส่วนที่เหลือเกินความสามารถในการดูดซับของ absorption pad ไหลย้อนกลับ อาจส่งผลกระทบ คือ มาบดบังการแสดงผลการตรวจสอบบริเวณของส่วน control line และ test line ดังภาพที่ 4

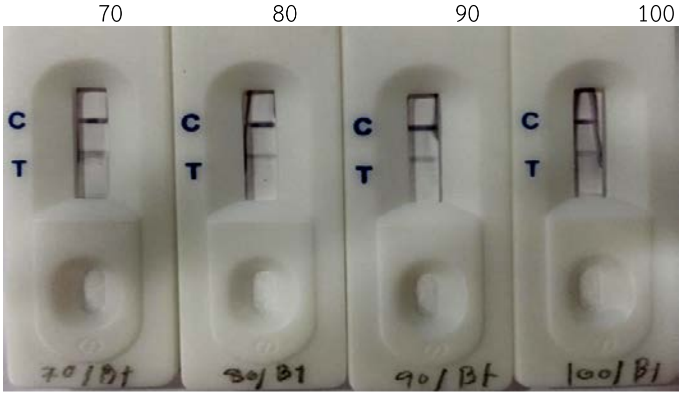
- การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้า

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน CryIAb/Ac ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ ซึ่งโปรตีนที่ได้อยู่ในสภาพ denature และตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ในสภาพ native พบว่าทั้งชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นและชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายทางการค้าสามารถตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่ได้อยู่ในสภาพ denature และสภาพ native ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ

บัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ทดสอบ ซึ่งชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของบริษัท Agdia สามารถตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (native) ได้ดีกว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ สามารถตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ได้ในระดับความเจือจางที่ 1:1,600 ภายในระยะเวลา 5 นาที ในขณะที่ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นตรวจสอบ recombinant protein ได้ที่ระดับความเจือจางที่ 1:200 แต่สามารถตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน CryIAb/Ac บริสุทธิ์ (โปรตีนที่อยู่ในสภาพ denature) ที่เจือจางโปรตีนความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:400 (ภาพที่ 5) ได้ดีกว่าชุดตรวจสอบที่จำหน่ายเพื่อการค้า เพราะจะนั้นชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นถือเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบชุดตรวจสอบที่ใช้ gold conjugated IgG อัตราส่วน 12.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร control line 1:2 อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร test line เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ที่ระยะเวลา 10 นาที หลังหยดตัวอย่าง



ภาพที่ 4 ผลการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบใช้ปริมาณตัวอย่างในการทดสอบความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ70, 80, 90 และ 100 ไมโครลิตรที่ระยะเวลา 10 นาที

Bf. ก : 1 2 3 4 ข : 5 6 7 8 9

ภาพที่ 5 ผลการทดสอบชุดตรวจสอบ Cry1Ab-Ac ของบริษัท Agdia ต่อโปรตีน CryIAb/Ac, ก : 1, 2, 3, 4 คือ โปรตีน CryIAb/Ac ที่เจือจาง 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 ส่วน ข : 5, 6, 7, 8, 9 คือ เซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant protein ในระดับความเจือจางที่ 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600 ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชุดตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63 เริ่มจากการสังเคราะห์ยีน *CryIAb/Ac* ขนาด 1,845 bp เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® แล้วถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนมาผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีน *CryIAb/Ac* มีขนาด 68 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 3.5 และเนื่องจากโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำทำให้กระบวนการทำบริสุทธิ์ทำได้ยาก กระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีนทำให้ได้โปรตีนที่เสียสภาพ ถึงแม้จะมีการนำโปรตีนดังกล่าวไปทำ dialysis เพื่อให้โปรตีนคืนกลับในสภาพธรรมชาติก็ไม่สามารถทำให้โปรตีนกลับสู่สภาพธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ ก่อนนำโปรตีนไปใช้เป็นแอนติเจนตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายอีกครั้งโดยใช้ anti-6x His tag ตรวจสอบ His-tag mujเชื่อมติดอยู่กับโปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค western blot จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ฉีดกระตุ้นกระต่าย เจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมมาแยกสกัด IgG ด้วยชุดสกัด protein A ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อ IgG โดยเฉพาะ ซึ่งพบว่าแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองมีผลกระทบต่อคุณภาพของแอนติบอดอย่างมาก เนื่องจากกระบวนการผลิตแอนติบอดีสัตว์ทดลองจะตอบสนองและจดจำแอนติเจนได้ในสภาพของแอนติเจนที่เป็นสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายอิพิโทปของแอนติบอดีจดจำแอนติเจนในรูปแบบที่เสียสภาพ เมื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบจึงส่งผลให้ ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ในสภาพธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการทดสอบไม่ดีเท่ากับชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทางการค้า แต่อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบก็สามารถตรวจสอบโปรตีนในข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ได้ทั้งในสภาพ denature และ native โดยสามารถ

ตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 62.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ตัวอย่างทดสอบครั้งละ 80 ไมโครลิตร โดยใช้ DOA extraction buffer ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจับกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่อ่อนสามารถทำลายได้ด้วยสารละลายที่เป็น กรด เบส หรือเกลือ เพราะฉะนั้นชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบมีผลโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ ควรมีการศึกษาพัฒนาสารละลายบัฟเฟอร์ในการสกัดโปรตีนในตัวอย่างทดสอบเพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ชุดตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้น สามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ภายในระยะเวลา 10 นาทีหลังจากหยดตัวอย่างทดสอบ ซึ่งผลการใช้ชุดตรวจสอบในการตรวจสอบโปรตีน CryIAb/Ac สอดคล้องกับการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค DIBA และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งชุดตรวจสอบนี้ถือว่าเป็นงานวิจัยต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อนำมาใช้ในการตรวจติดตามการแพร่ระบาดของข้าวดัดแปรพันธุกรรมในสภาพแปลง การนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตร การตรวจคัดกรองวัตถุดิบ นอกจากช่วยอำนวยความสะดวกในแก่เจ้าหน้าที่หน่วยงานของภาครัฐและเอกชน แล้วสามารถขยายผลการผลิตในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน CryIAb/Ac สามารถนำมาใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ด้วยเทคนิค PCR หรือ real-time PCR และ protein ที่ผลิตได้จากพลาสมิดลูกผสมยังสามารถนำมาใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt 63 ด้วยเทคนิค ELISA หรือ DIBA และพัฒนาเป็นโปรตีนในรูปแบบแห้งเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ที่สำคัญ งานวิจัยนี้ถือว่าเป็นต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ที่สามารถลดปริมาณและการใช้สารเคมี ลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลาและค่าใช้จ่าย เพื่อต่อยอดสร้างชุดตรวจในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

หลังจากดำเนินโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตรเสร็จสิ้น ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยการทดลองทั้งสิ้น 9 การทดลอง โดยเริ่มต้นการทดลองตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554 และสิ้นสุดในเดือน กันยายน พ.ศ. 2558 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 5 ปี สรุปได้ว่าการทดลองที่ทำทั้งหมดได้ผลผลิตดังนี้ คือ การทดลองที่ 1 ได้วิธีการทดสอบ (Validation method) ของการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลือง GTS 40-3-2 และข้าวโพด MON810 โดยวิธี Real-time PCR การทดลองที่ 2 สามารถสังเคราะห์ยีน Bt63 ในข้าว ที่ผลิตโปรตีน CryI A(b)+ CryI A(c) ใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน Bt63 และมีความไวในการตรวจสอบโปรตีนดังกล่าว ทำให้ประสบความสำเร็จในในการพัฒนาวิธีการประดิษฐ์ชุดตรวจสอบแบบ GLIFT Kit ได้ชุดตรวจสอบที่จำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสำหรับตรวจข้าว Bt63 ในภาคสนาม การทดลองที่ 3 สามารถสังเคราะห์ยีน CP4EPSPS ของข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready เพื่อผลิต recombinant protein ใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CP4EPSPS ของข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready ซึ่งสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความไว สามารถพัฒนาวิธีการประดิษฐ์ชุดตรวจสอบแบบ GLIFT Kit ได้ชุดตรวจสอบที่จำเพาะ

เจาะจงและมีประสิทธิภาพเพื่อตรวจข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช Roundup Ready ในภาคสนาม การทดลองที่ 4 ได้สังเคราะห์ยีน Cry1Ab ของข้าวโพดต้านทานแมลง เพื่อผลิต recombinant protein CryIAb ใช้เป็นแอนติเจน เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะและมีความไวในการตรวจหาโปรตีน CryIAb ของข้าวโพดต้านทานแมลง ทำให้พัฒนาวิธีการประดิษฐ์ชุดตรวจสอบแบบ GLIFT Kit ได้ชุดตรวจสอบเพื่อใช้ตรวจข้าวโพดที่ต้านทานแมลง สายพันธุ์ MON810, Bt176, Bt11 และ Bt10 การทดลองที่ 5 ได้สังเคราห์ยีน Cry9C ของข้าวโพดต้านทานแมลง สายพันธุ์ CBH351 (StarLink) เพื่อผลิต recombinant protein ดังกล่าว เพื่อใช้เป็นแอนติเจน ในการสร้างแอนติบอดี ที่มีความไวในการตรวจหาโปรตีน Cry9c เพื่อพัฒนาวิธีการประดิษฐ์ชุดตรวจสอบแบบ GLIFT Kit ได้ชุดตรวจสอบที่จำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพเพื่อตรวจข้าวโพดต้านทานแมลง สายพันธุ์ CBH351 (StarLink) ในภาคสนาม การทดลองที่ 6 ได้วิธีการทดสอบ (Validation method) ของการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม Mon 89788, 356043 และ 305423 โดยวิธี Real-time PCR การทดลองที่ 7 ได้วิธีการทดสอบ (Validation method) ของการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 88017, Mon89034, MIR604 และ MIR162 โดยวิธี Real-time PCR การทดลองที่ 8 ได้ชุดยีน ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสามชุด คือ พลาสมิด GMOs-DOA, GMOs-SC และ GMOs-Hawaii เพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุกรมวิชาการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Line 55-1 (ฮาวาย) ตามลำดับ ด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR ที่ได้มาตรฐาน และถูกต้องแม่นยำ และการทดลองที่ 9 ได้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

ซึ่งผลผลิตจากโครงการวิจัยนี้นับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่ง กล่าวคือ วิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากจะเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจรับรองสินค้าพืชดัดแปรพันธุกรรมให้ได้ตามมาตรฐานสากล และการขอการรับรองห้องปฏิบัติการให้เป็นมาตรฐานของ ISO/IEC17025 นำไปสู่การสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้าในการออกใบรับรองของห้องปฏิบัติการ ยังสามารถนำไปใช้เป็นคู่มือการปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของห้องปฏิบัติการ เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพืช ผลิตภัณฑ์แปรรูปและอาหารสัตว์ที่ต้องการการตรวจรับรองสำหรับการนำเข้า-ส่งออกสินค้าระหว่างประเทศ ทั้งยังตอบสนองต่อระเบียบมาตรการในการติดฉลากสินค้าดัดแปรพันธุกรรมกับประเทศคู่ค้าที่มีการกำหนดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนขั้นต่ำไว้ ในส่วนของการพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีนของข้าว Bt63, ข้าวโพด Roundup Ready, ข้าวโพดต้านทานแมลง และข้าวโพด StarLink ซึ่งเป็นการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว เป็นประโยชน์ต่อเจ้าหน้าที่ด่านกักพืช นักวิชาการและเจ้าหน้าที่ซึ่งต้องปฏิบัติงานภาคสนาม ให้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของพืชดัดแปรพันธุกรรมในเบื้องต้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวัง หรือติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปลงพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างง่ายและรวดเร็ว ทั้งนี้ภาคเอกชนก็สามารถใช้ชุดทดสอบในการคัดเลือกวัตถุดิบที่ปลอดการปนเปื้อนพืชดัดแปรพันธุกรรมเข้าสู่โรงงาน ซึ่งจะช่วยเพิ่มมาตรฐานสินค้าได้อีกด้วย เช่นเดียวกับการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบโปรตีน CP4EPEPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช สามารถใช้ชุดตรวจสอบนี้เพื่อตรวจสอบ

ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมภาคสนามอย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง ลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ เป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวัง หรือติดตามการแพร่กระจายพืชดัดแปรพันธุกรรมในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็ว ทั้งยังต่อยอดผลิตเป็นชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศได้อีกด้วย และประสบความสำเร็จในการสร้างชุดยืนซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นวัสดุอ้างอิงในการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสายพันธุ์ 55-1 (ฮาวาย) ได้อย่างถูกต้อง ช่วยลดการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ นับได้ว่าโครงการวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมเพื่อรับรองสินค้าเกษตร ติดตาม และเฝ้าระวังพืชดัดแปรพันธุกรรมอย่างมีประสิทธิภาพอย่างยิ่ง

บรรณานุกรม

การทดลองที่ 1

LauraBroeders S. et al. (2014). *Guidelines for validation of qualitative real-time PCR-methos.* Trends in Food Science & Technology.

EU-RL GMFF. (n.d.). *http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu,*. Retrieved from European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu,

European Commission. (2004). Commission recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. pp. 348: 18-26.

FOR, G. O. (2010). *http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf.* Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf

GMDD: a database of GMO detection methods. (n.d.). *http://gmdd.shgmo.org/*. Retrieved from http://gmdd.shgmo.org/

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. (n.d.). *http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/*. Retrieved from http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/: http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/

James, C. (2013). Global status of commercialized biotech. *GM crops*, p. Vol 46.

Laura, B. e. (2007). *Analytes and Related PCR Primers Used for GMO Detection and Quantification.* Join Research Center.

Meris, S. e. (2014). Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples. *genetics and molecular research*(13 (1)), pp. 116-1168.

Milavec M. et al. (2014). GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Anal Bioanal Chem*, pp. 406:6485-6497.

Papazova, N. (2013). Harmonised approaches for validation of methods for GMO detection in the NRL according to the last EU guidelines. *Labinfo*, pp. 13-17.

Rupert, H. (2014). Analytical strategies in GMO testing. *PDSF Thailand-EU*, (p. 15). Bangkok.

Yang L. et al. (2007). Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, pp. 15-24.

ขนิษฐา, และคณะ. (2449). การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป.

การทดลองที่ 2

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, สุรภี กีรติยะอังกูร, กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2554. การโคลนยีน *EPSPS* และการผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). http://it.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1035

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

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitivity method of measuring microorganism quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. **Anal. Biochem.** 72: 248-264.

Chalam, V. C. and R. K. Khetarpal. n.d. ELISA-based Detection of GMOs. Retrieved May 2, 2014, from http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/biosafety/Gef2/ T5/12%20Dr. %20Celia_ELISA%20based%20detection%20of%20LMOs.pdf

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol** 34: 475-483.

Honghong Wu , Yu Zhang , Changqing Zhu , Xiao Xiao , Xinghu Zhou , Sheng Xu , Wenbiao Shen and Ming Huang. 2012. Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. **J. Mol. Sci**. 13: 1919-1932.

Mette Lübeck. (n.d.) Detection of genetically modified plants. Retrieved May 1, 2014, http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/REPORT_rev_maj.pdf

Neogen corporation. 2001. Agri-Screen CP4 (Roundup Ready ® Strip Test. Retrieved April 25, 2014, (http://www.jsunitech.com/product/fkit/neogen/rCP4.pdf)

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1– 3.

Wei Wang. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutics**. 203: 1-60

การทดลองที่ 3

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, สุรภี กีรติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. **GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง**. วารสารวิชาการเกษตร 24 (2) : 168-177.

สุรภี กีรติยะอังกูร, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. **ชุดตรวจสอบโรคไวรัสกล้วยไม้ในกล้วยไม้**. วารสารโรคพืช 18 (1-2) : 1-14.

Jae H.K., Dabing Z., and Hae Y.K. 2014. Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems. **Food Control**. 35: 345-353.

James, C. 2013. Global status of commercialized biotech/GM crops 2012. **ISAAA.Brief No**. 44.

Jiang T., Liang Z.,Ren W.W., Chen J., Zhi X.Y., Qi G.Y., Liu X.T., and Cai X.P., 2011.A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatogarpic strip test for detection of FMDV serotype A**. VirologicaSinica**. Volume 26: 30-39.

KuangH., LiuL., LuoL., SuryoprabowoS., PengJ., and XuC. 2014.Development of anImmunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Ciprofloxacin in Milk Samples.**Sensors**.*14*:16785-16798.

Michael Ijeh. 2011. Covalent gold nanoparticle—antibody conjugates for sensitivity improvement in LFIA A dissertation submitted to the Mathematics, **Informatics and Natural Sciences Faculty of Hamburg University**

Omidfar K., Kia S., and Larijani B. 2011.Development of a Colloidal Gold-based Immunochromatographic Test Strip for Screening of Microalbuminuria.**HYBRIDOMA** 30: Number 2, 2011.

Pratixa P.J., Soon J.Y., William G.H., Stanislav E., and Konstantin V.S. 2013. Conjugation of antibodies to gold nanorods through Fc portion:Synthesis and molecular specific imanging. **Biocojuq Chem**. Jun19;24(6):878-888.

Seong H.L., Bu Y.Y., and Su J.K., 2009. Event-specific analytical methods for biotech maize MIR 604 and DAS-59122-7.**Journal Science Food Agricultural**, 89: 2616–2624.

http://www.isaaa.org The International Service for the Acquistion of Agri biotech ApplicationISAAA

การทดลองที่ 4

พระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507; (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2542; (ฉบับที่ 3) แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 215 พ.ศ.2544 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือ จำหน่าย โดยให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพันธุกรรมครายไนน์ซี (Cry9C DNA Sequence) หรือ โปรตีนที่สร้างมาจากสารพันธุกรรมนี้ ในข้าวโพดและถั่วเหลือง

Kumar S., Aaron J. and Sokolov K. 2008. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. Nature Protocols 3: 314 – 320.

Lambert B., Buysse L., Decock C., Jansens S., Piens C., Saey B., Seurinck J., Audenhove K., Rie J., Vliet A. and Peferoen M. 1996. A Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. Applied and Environmental Microbiology 62: 80-86.

Mettler M., Grimm F., Capelli G., Heinrich C. and Deplazes P. 2005. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs.Journal of Clinical Microbiology 43: 5515–5519.

Rica d. l., Roberto S., Molly M. 2012. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. Nature Nanotechnology 7: 821–4.

Michael I. 2011. Covalent gold nanoparticle-antibody conjugates for sensitivity improvement. A dissertation submitted to the Mathematics, Informatics and Natural Sciences Faculty of Hamburg University: 1-147.

การทดลองที่ 5

พระราชบัญญัติกักพืชพ2507 .ศ.; ฉบับที่) 2) พ.ศ.2542; (ฉบับที่ 3) แก้ไขเพิ่มเติม พ25 .ศ.51

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 2544.ศ.พ 215 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือ จำหน่าย โดยให้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพันธุกรรมครายไนน์ซี)Cry9C DNA Sequence) หรือ โปรตีนที่สร้างมาจากสารพันธุกรรมนี้ ในข้าวโพดและถั่วเหลือง

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

Investigation of Human Health Effects Associated with Potential Exposure to Genetically Modified Corn. 2001. **A Report to the U.S. Food and Drug Administration from the Centers for Disease Control and Prevention.**

KumarS., Aaron J.andSokolov K. 2008. Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties.**Nature Protocols** 3: 314 – 320.

Lambert B., Buysse L., Decock C., Jansens S., Piens C., Saey B., Seurinck J., Audenhove K., Rie J., Vliet A. and Peferoen M.1996.A Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology** 62: 80-86.

Mettler M., Grimm F.,Capelli G., Heinrich Camp. andDeplazes P. 2005. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology** 43: 5515–5519.

Rica d. l., Roberto, Stevens, Molly M. 2012.Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. **Nature Nanotechnology** 7: 821–4.

Michael I. 2011.Covalent gold nanoparticle-antibody conjugates for sensitivity improvement. **A dissertation submitted to the Mathematics, Informatics and Natural Sciences Faculty of Hamburg University**: 1-147.

การทดลองที่ 6

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

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

Pavely, C., M. Fedorova and N. Weber. 2006**.** Petition for the Determination of Nonregulated Status for High Oleic 305423 Soybean. Pioneer Hi-Bred International, Inc. USA**.**

Meyer, J. J., M. Horak, E. Rosenbaum and R. Schneider. 2006. Petition for the Determination of Nonregulated Status for Roundup RReady2Yield™ Soybean MON 89788. Monsanto Company. USA.

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

Mazzara, M., B. Munaro, E. Grazioli, C. Savini, C. Delobel and G. V. D. Eede. 2009. Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-356043-5 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol. European commission, Joint research center. MiniWebtool©2004, http://www.miniwebtool.com/relative-standard-deviation-calculator/

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

Rood, T. A., N. Weber, A. T. Gutsche, P. Commuri and M. Fedorova. 2006. Petition for the Determination of Nonregulated Status for Herbicide Tolerant 356043 Soybean. Pioneer Hi-Bred International, Inc.: USA.

การทดลองที่ 7

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

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

Clives, J. 2014. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2012. ISAAA Briefs No. 49: 2014

Delobel, C., L. Bonini, M. Querci, M. Mazzara, S. Cordeil and G. V. D. Eede. 2011. Event-specific method for the quantification of maize MIR162 using real-timePCR. JRC-EURL-GMFF:alidated method maize MIR162. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MIR162_validated_Method.pdf

Delobel C., E. F. N. Grazioli, M. Mazzara and G. V. D. Eede. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 88017 using Real-time PCR. *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.

ISO 21571. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-Nucleic acid extraction. International Organization for Standardization. 44 pp.

ISO 24276. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-General Requirement and definition. International Organization for Standardization. 44 pp.

JRC-EURL GMFF. 2008. Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON 88017 Using Real-time PCR. Method development; Monsanto company, CRL-GMFF: protocol MON 88017 maize. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/ MON88017 _validated_ Method_correctedversion1.pdf

JRC-EURL GMFF. Event-specific Method for the Quantification of Maize MIR162 Using Real-time PCR. Method development by Syngenta seeds S.A.S, EURL-GMFF: validated method maize MIR162. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries /MIR162_validated_Method.pdf

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

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

Savini, C., A. Bogni, E. Grazioli, B. Munaro, M. Mazzara and G. V. D. Eede. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 89034 using Real-time PCr. EUR23700 EN. Luxembourg:OPOCE, *In* Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.

การทดลองที่ 8

Guan, Q., X. Wang, D. Teng, Y. Yang, F. Tian. Q. Yin and J. Wang. Construction of a standard reference plasmid for detecting gm cottonseed meal. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 165: 24-34

Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio.Technology, 10: 1466-1472.

Kim, S.A., M. Lee, S.J. Yoo, J.H. Kim, H. Lee, K.S. Park, J. Jeong and H.Y. Kim. 2010. Detection of GM Papaya Event 55-1 in Fresh and Processed Papaya Using Duplex PCR. **Appl. Biol. Chem**. 53(2): 237-242.

Manshardt, R. M. 1998. 'UH Rainbow' papaya. University of Hawaii College of Tropical Agriculture and Human Resources. Germplasm G-1, 2pp.

Mendoza, M.C.T., A.C. Laurena and J.R. Botella. 2008. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. **Biotechnol Annu Rev**. 14: 423-62.

Nakamura, K., H. Akiyama, Y. Takahashi, T. Kobayashi, A. Noguchi, K. Ohmori, M. Kasahara, K. Kitta, H. Nakazawa, K. Kondo and R. Teshima. 2013. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. **Food Chem.** 136: 895-901

Nakamura, K., K. Kazunari, K. Tomoko, N. Akio, O. Kiyomi, T. Reona, K. Kazumi, A. Hiroshi, T. Reiko and N.M. Tomoko. 2014. Identification and Detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand. **Biol. Pharm. Bull.** 37(1): 1-5

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^{th} ed. Vol 1–3.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 12(74): 5463-5467.

Tripathi Leena. 2005. Techniques for detecting genetically modified crops and products. **African Journal of Biotechnology**. 4(13): 1472-1479.

Wang, X., D. Teng, Y. Yang. F. Tian, Q. Guan and J. Wang. 2011. Construction of a reference plasmid molecule containing eight target for the detection of genetically of genetically modified crops. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 90: 721-731

Wang, X., Q. Tang, L. Dong, Y. Dong, Y. Su, S. Jia and Z. Wang. 2014. Construction of a standard reference plasmid containing seven target genes for the detection of transgenic cotton. **Plasmid**. 74: 39-44.

Wei, T., B.S.M. Lebas, J.B. Shiller, B.D. Quinn and G.R.G. Clover. 2012. Detection of five viruses infecting dormant bulbs by TaqMan-based real-time-RT-PCR. **Australasian Plant Pathol**. 41: 93:98.

Xu, W., B. Weibin, G. Feng, L. Yunbo, Y. Yanfang and H. Kunlun. 2008. A papaya-specific gene 'papain' used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic papayas. **Eur. Food Res. Technol**. 228 : 301-309

การทดลองที่ 9

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, สุรภี กีรติยะอังกูร, กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2554. การโคลนยีน *EPSPS* และการผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). http://it.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1035
Article%2005-06. asp.

International Rice Institute. 1997. Bt rice: Research and Policy Issues, IRRI Information Series No. 5, July 1996, Revised June 1997.

Bethell, Delia. 2002. Lactiva and Lysomin: Helping to Save Lives By Improving Oral Rehydration Solution. Ventria Bioscience. http://www.ventria.com/news/ORS%20

Buddhirakkul, N., K. Balachandra, P. Pumthong, S. Chaelermtaranukul and P. Sawanpanyalert. 2004. Development of a simple strip test for the detection of Hepatitis B surface antigen. **Thai J. Health Res** 18 (1): 40-47.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitivity method of measuring microorganism quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. **Anal. Biochem.** 72: 248-264.

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol** 34: 475-483.

Hochleitner, K. and H. Kraus. 2002. Rapid assay formats, components and materials. pp. 10-45. *In* Awiruttakarn C., ed. **Introductory workshop on rapid diagnostic tests**. Biogenomed co.ltd., Bangkok.

Kumar, R. and R. P. Sinha. 2011. Colloidal gold based dipstick strip for detection of genetically modified crops and produce**. Int. J. of Pharma and Bio Sci.** 2: 110-121.

Michae I. 2011. Covalent gold nanopartical-antibody conjugates for sensitivity improvement. **Adissertation submitted to the Mathematics, Informatic and Natural Sciences Faculty of Hamburg University**: 1-147.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1–3.