การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

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

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[1/] *อัญชลี ศรีสุวรรณ*[1/]
กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร[2/]

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA กับเมล็ด กากถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป 4 วิธี คือ guanidinium-chloroform, GeneScan extractionn, Silica based DNA extraction และ PVP based DNA extraction หลังจากได้ DNA แบ่ง DNA ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ทำ DNA ให้บริสุทธิ์ กลุ่มที่ 2 ทำ DNA ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA Purification Kit วัดผลโดยตรวจคุณภาพของยีน lectin ด้วยวิธี PCR เพื่อดูการยับยั้งปฏิกิริยา PCR ของ DNA ผลการทดลองพบว่าวิธีสกัด DNA ที่เหมาะสมกับเมล็ดและกากถั่วเหลือง คือ วิธี guanidinium-chloroform และผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์เป็นวิธีที่ดีที่สุดเทียบเท่ากับวิธี GeneScan extraction และผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกัน สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปและขบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน

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

[1/] กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ

การสำรวจปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองจำนวน 316 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจำนวน 136 ตัวอย่าง นำมาสกัด DNA และตรวจการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM เบื้องต้นด้วยวิธี PCR โดยตรวจหายีน 35S CaMV promoter และ Nos terminator แล้วนำ DNA ที่ตรวจพบยีนทั้งสองมาตรวจหาปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR พบว่า มีการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ในเมล็ดและกากถั่วเหลือง จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยเป็นถั่วเหลืองนำเข้าทั้งหมด ซึ่งนำเข้าจากประเทศอาร์เจนตินา จำนวน 19 ตัวอย่าง ปนในระดับ 23-100% รองลงมาคือบราซิลพบจำนวน 10 ตัวอย่าง ปนในระดับ 2.3-100%, สหรัฐอเมริกา พบจำนวน 6 ตัวอย่าง ปนในระดับ 86.5-100%, อินเดีย พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนในระดับ 2-100%, อุรุกวัย พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนในระดับ 100%, แคนาดา พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนในระดับ 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรต พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ปนในระดับ 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้าพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.5-100% และพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปนเปื้อน ได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.4-27.8%, โปรตีนถั่วเหลืองพบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.1-0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.7-3.6%

คำนำ

จากสถานการณ์การปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงการค้าทั่วโลก พบว่าในปี 2550 มีประเทศปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก 22 ประเทศ คิดเป็นพื้นที่ปลูก 102 ล้านเฮกแตร์ พืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด คือ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือที่เรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready ซึ่งเป็นของบริษัทมอนซานโต้ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) และในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกเป็นจำนวนมาก ด้วยการปรับปรุงยีนใหม่ๆ เพื่อตัดต่อในพืช จึงทำให้ประเทศหลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม จากกฎระเบียบดังกล่าวส่งผลให้ประเทศไทยต้องประสบปัญหาและอุปสรรคมากในการส่งสินค้าเกษตรออก เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า และแอบแฝงการกีดกันทางการค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจากถั่วเหลืองหรือมีส่วนผสมของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (GM) เนื่องจากประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองภายในประเทศไม่เพียงพอ จึงต้องมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองสำหรับเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป ด้วยการนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมัน ผลิตอาหารเพื่อบริโภค เช่น เต้าหู้ น้ำเต้าหู้ ซีอิ๊ว ฯลฯ หรือกากถั่วเหลืองที่นำมาแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น การนำเข้าถั่วเหลืองของไทย ส่วนใหญ่สั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศที่เป็นแหล่งปลูกถั่วเหลือง GM ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะปนถั่วเหลือง GM และการส่งออกของผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจากถั่วเหลืองก็มีโอกาสที่จะผลิตจากถั่วเหลือง GM เช่นเดียวกัน

ในขณะเดียวกันภายในประเทศเองประชาชนและผู้บริโภคก็มีความวิตกกังวลเกี่ยวกับการบริโภคอาหาร GM และมีการเรียกร้องให้มีการติดฉลากสินค้า หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของ GM

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

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

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA

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

1. 10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
2. 25 mM $MgCl_2$	3	ไมโครลิตร
3. 10 mM dNTP (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP และ10 mM dTTP)	1	ไมโครลิตร

4. Lec1 Primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
5. Lec2 Primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
6. Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.25	ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (deionized water)	28.75	ไมโครลิตร
8. สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	10	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ DNA ของถั่วเหลือง (positive control) และตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารละลาย DNA (negative control) หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้ คือ

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

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

2. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของคู่ Primers และ probe ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

2.1.1 การเตรียม Reference ของตัวอย่างถั่วเหลือง GM เพื่อใช้ทำ standard curve

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

2.1.2 การออกแบบและสังเคราะห์คู่ primer และ probe

ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบคู่ primer และ probe ที่ใช้ตรวจยีน Roundup Ready และยีน Lectin 2 ชุด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบของชุดคู่ primer และ probe ที่ใช้ทำปฏิกิริยา Real-time PCR

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

2.1.3 การเตรียม Standard Curve

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

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

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด capillaries tube นำไป centrifuged ประมาณ 10-20 วินาที เพื่อให้ส่วนผสมตกอยู่ก้นหลอด แล้วนำไปวางใน LightCycler rotor หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) โดยมีรอบการทำ Real-time PCR ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้เครื่อง LightCycler

		Time (Sec)	Temperature °C
Pre-PCR-activation of DNA polymerase and denaturation of template DNA		900	95
PCR (45 cycles)			
Step 1	Denaturation	15	95
Step 2	Annealing Elongation	60	60

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ในปริมาณต่ำสุด ด้วยวิธี Real-time PCR

นำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0, 0.1, 0.5 และ 1% มาเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/ Sttmf2a และ probe Sttmpa และ ยีน Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1/ Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา Real-time PCR ซึ่งเตรียมปฏิกิริยาเหมือนการทดลองข้อ 2.1.3

3. สำรวจปริมาณการปนถั่วเหลือง GM

3.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างถั่วเหลือง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2548 ซึ่งได้จากการตรวจสินค้านำเข้าจากด่านต่างๆ การสุ่มจากร้านค้าขายเมล็ดและกากถั่วเหลือง เมล็ดพันธุ์จากสถาบันพืชไร่ และจากผู้ประกอบการส่งมาตรวจวิเคราะห์ จำนวน 316 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม พร้อมทั้งให้รหัสตัวอย่าง นำมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด นำตัวอย่างที่ทำให้ละเอียดแล้วมาผสมให้เข้ากัน สำหรับอาหารสำเร็จรูปสุ่มจากห้างสรรพสินค้าต่างๆ ผู้ประกอบการส่งออกและนำเข้า และผู้ประกอบการที่ผลิต เพื่อใช้บริโภคภายในประเทศ จำนวน 136 ตัวอย่าง ได้แก่ ผงปรุงรสชนิดต่างๆ 51, อาหารสัตว์ 20, นมถั่วเหลือง 12, แป้งถั่วเหลือง 9, แป้งข้าวโพดผสมเลซิติน 1, โปรตีนถั่วเหลือง 5, เลซิติน 5, ไขมันถั่วเหลือง 2, เครื่องดื่มธัญญาหาร 3, ซุปเต้าเจี้ยวผง 2, เต้าเจี้ยว 4, เต้าหู้ 2, ถั่วเหลืองหมักนัตโตะ 3, ผงเต้าหู้สำเร็จรูป 1, ฟองเต้าหู้ 2, ซอสดิบ 3, ซอสถั่วเหลืองผง 4, ซอสปรุงรส 1, ซอสหอยนางรม 2, ซีอิ๊วดิบ 1 และ Cracker 3 ตัวอย่างโดยทำการสุ่ม พร้อมทั้งให้รหัสตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม นำมาบดหรือปั่นให้เป็นละเอียดด้วยเครื่องบด ส่วนนมถั่วเหลือง สุ่ม 1,000 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที และเก็บตะกอนมารวมกัน นำตัวอย่างที่ทำให้ละเอียดแล้ว หรือตะกอนของนมถั่วเหลืองมาผสมให้เข้ากันของแต่ละตัวอย่าง เพื่อจะได้เป็นตัวแทนที่ดีในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

3.2 สกัด DNA ถั่วเหลือง และอาหารผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

นำตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลืองที่บดให้เป็นผงละเอียดมาสกัด DNA โดยสุ่มตัวอย่างละ 0.5 กรัม สำหรับอาหารผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสุ่มตัวอย่างละ 2 กรัม จำนวน 2 หลอด มาสกัด DNA โดยใช้ วิธี guanidinium-chloroform หลังจากนั้นนำ DNA มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Wizard® Miniprep DNA

Purification Kit ตามวิธีของ Spoth และ Strauss, 1999 แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณ DNA พร้อมทั้งปรับความเข้มข้นของ DNA ให้เท่ากัน คือ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจหายีน lectin โดยวิธี PCR เหมือนในข้อที่ 1

3.3 ตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองด้วยวิธี PCR

นำ DNA ที่ตรวจหายีน lectin ของถั่วเหลืองได้ มาตรวจจำแนกยีน CaMV 35S Promoter และ Nos terminator ด้วยวิธี PCR โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของ CaMV 35S Promoter ด้วยคู่ primer CaMV 35S Promoter Forward Primer และ CaMV 35S Promoter Reverse Primer และการเพิ่มปริมาณยีน Nos terminator ด้วยคู่ primer Nos1/Nos2 โดยใช้อัตราส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อที่ 1 โดยเปรียบเทียบกับ ตัวควบคุมที่เป็นบวก คือ DNA ของถั่วเหลืองที่เป็น GMOs (positive control) และตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ DNA ของถั่วเหลืองที่เป็น Non-GMOs (negative control) และตัวควบคุมที่เป็นลบที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทน สารละลาย DNA (negative control) เพื่อเป็นตัวควบคุมการปนเปื้อนในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

นำทุกหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำตาม PCR ดังนี้ คือ

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

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

3.4 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

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

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.1 ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA

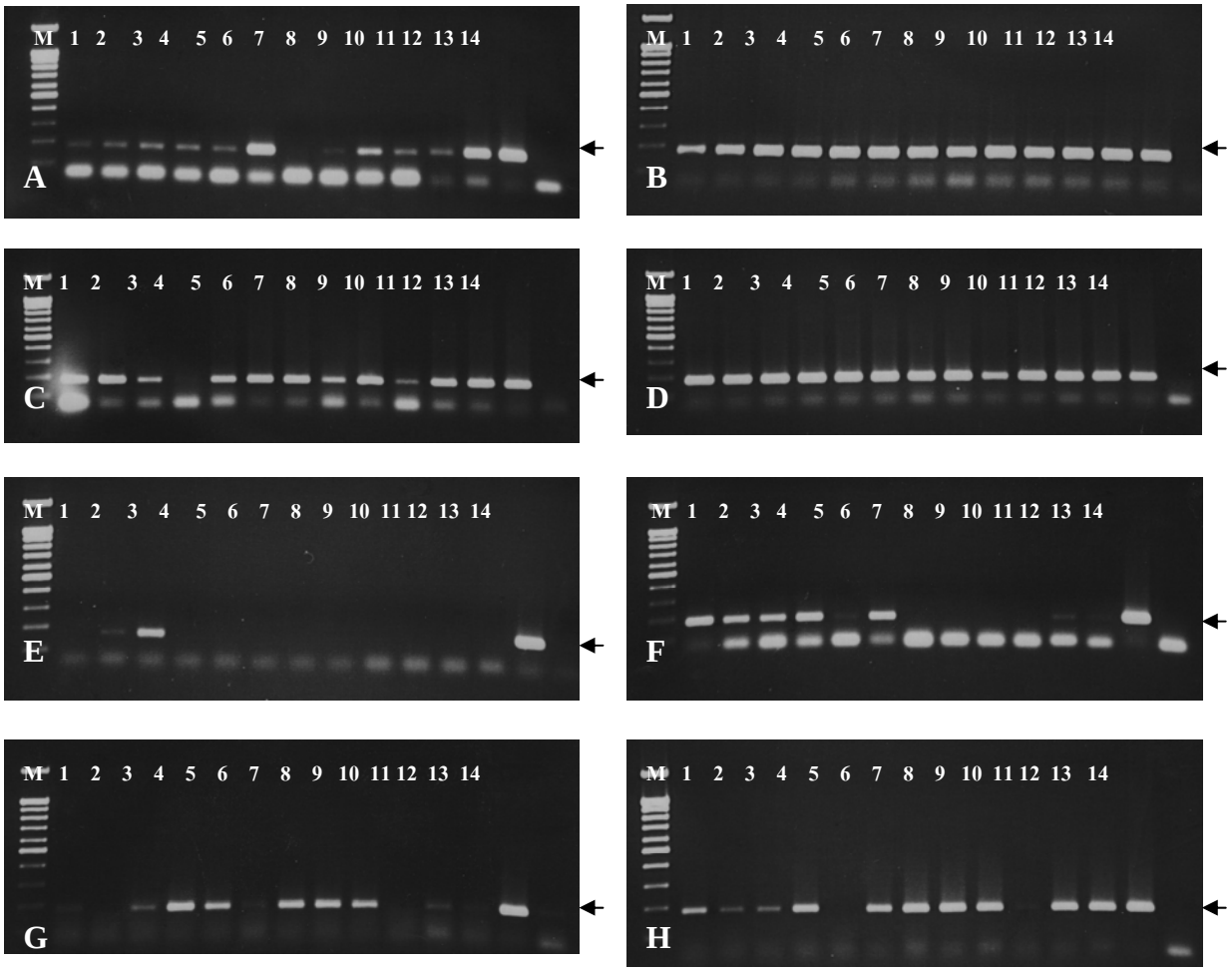
ได้ศึกษาหาวิธีการสกัด DNA ให้เหมาะสมกับเมล็ด และกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูป และเป็นพืชที่มีโปรตีนและไขมันสูง โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 4 วิธี คือ guanidinium-chloroform method, GeneScan extraction method, Silica based DNA extraction method และ PVP based DNA extraction method จากการทดลองพบว่าวิธีสกัด guanidinium-chloroform และ GeneScan extraction ที่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ เป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ทุกตัวอย่างเนื่องจากให้แถบ DNA ที่เข้ม ชัดเจน และขึ้นสม่ำเสมอทุกซ้ำ (ภาพที่ 1 B และ D) รองลงมา คือ วิธี GeneScan extraction ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ วิธี PVP ที่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ และ guanidinium-chloroform ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ คือ ทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด แต่แถบ DNA ที่ได้บางตัวอย่างจาง และบางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ สำหรับวิธี PVP ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ไม่ขึ้น 1 ตัวอย่าง และแถบ DNA ที่ได้บางตัวอย่างจาง และบางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ วิธี Silica ที่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ขึ้น 3 ตัวอย่าง บางตัวอย่างขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ ส่วนวิธี Silica ที่ไม่ผ่านการทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ขึ้นเพียง 1 ตัวอย่าง และซ้ำเดียว

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดของ DNA 4 วิธี นำ DNA ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน minicolumn และไม่ผ่าน minicolumn โดยการตรวจคุณภาพของ DNA ด้วยการตรวจยีน lectin (endogenous gene) ถั่วเหลือง

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

หมายเหตุ

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



ภาพที่ 1 การตรวจคุณภาพ DNA ของตัวอย่างเมล็ดและกากถั่วเหลือง ด้วยการเพิ่มปริมาณยีน Lectin ของถั่วเหลืองด้วยวิธี PCR:

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

เปรียบเทียบวิธีการสกัดกับผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปแต่ละชนิด พบว่า ซอสดิบ และ ซีอิ๊วดิบ วิธีที่สกัด DNA ได้ดี คือ PVP และ GeneScan extraction ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เป็นวิธีที่ดีที่สุด (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2) สำหรับเต้าหู้ถั่วเหลือง พบว่า ทุกวิธีทั้งที่นำ DNA ผ่านและไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด แต่ถ้านำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แถบ DNA ที่ได้ชัดเจนดีกว่าไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้เป็นเพราะเต้าหู้ถั่วเหลืองผ่านกระบวนการแปรรูปน้อย จึงสกัด DNA ได้ง่าย (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2) ผงปรุงรสชนิดต่างๆ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 3) พบว่า ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust ผงปรุงรสชนิด Zinger Batter และผงปรุงรสชนิด KFCH & Inject Marinade ทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด โดยให้แถบ DNA ที่เข้ม และชัดเจน แต่ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า วิธี guanidinium-chloroform, GeneScan extraction และ PVP ทำให้ได้แถบ DNA ของตัวอย่าง Zinger Predust และ Zinger Batter ชัดเจนเช่นเดียวกับนำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3) แต่ตัวอย่าง KFCH & Inject Marinade ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า แถบ DNA ของแต่ละวิธีการสกัดจะจางและขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกซ้ำ หรือไม่ขึ้นเลย สำหรับผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Breading ค่อนข้างสกัดยาก ถ้า DNA ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเกือบทุกวิธีไม่ให้แถบ DNA เลย ยกเว้นวิธี guanidinium-chloroform ซึ่งให้แถบ DNA มากและขึ้นไม่สม่ำเสมอ แต่ถ้านำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าวิธี guanidinium-chloroform ให้แถบ DNA ชัดที่สุด แต่ขึ้นเพียงซ้ำเดียว รองลงมา คือ GeneScan extraction แต่ก็ขึ้นเพียงซ้ำเดียวเช่นกัน ส่วนตัวอย่าง Hot & Spicy Marinade Predust DNA ของทุกวิธีสกัดไม่ได้แถบ DNA เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างมีส่วนประกอบของพริกป่น ซึ่งพริกจะมีพวก pigment ที่ทำให้เกิดสี และ pigment เหล่านี้ถ้ามีปริมาณมากจะไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ อาจแก้ปัญหาโดยการเจือจางตัวอย่าง DNA ลง เพื่อลดปริมาณสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR

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

ตัวอย่าง	guanidinium-chloroform		GeneScan		Silica		PVP	
	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA
1. ซอสดิบ	-	-	-	++	-	-	-	++
2. ซีอิ๊วดิบ	-	-	++	+++	-	+	+++	+++
3. เต้าหู้ถั่วเหลือง	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
4. ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
5. ผงปรุงรสชนิด Zinger Batter	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++

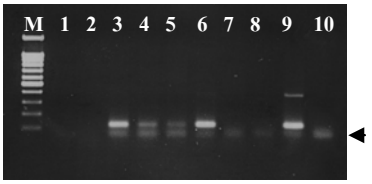
ตัวอย่าง	guanidinium-chloroform		GeneScan		Silica		PVP	
	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA	Unpurified DNA	Purified DNA
6. ผงปรุงรสชนิด Hot&Spicy Marinade	-	-	-	-	-	-	-	-
7. ผงปรุงรสชนิด Hot &Spicy Breading	+	+++	-	++	-	-	-	-
8. ผงปรุงรสชนิด KFCH & Inject Marinade	+++	+++	-	++	++	+++	+	++

หมายเหตุ

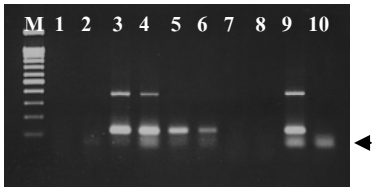
- หมายถึง ไม่เกิดแถบ DNA เป้าหมาย + หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายจางมาก

++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้ม +++ หมายถึง แถบ DNA เป้าหมายเข้มมาก

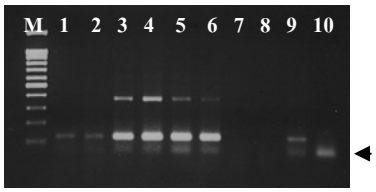
ซอสดิบ ไม่ผ่าน minicolumn



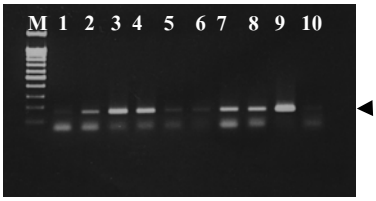
ซอสดิบ ผ่าน minicolumn



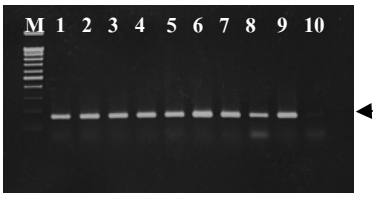
ซีอิ๊วดิบ ไม่ผ่าน minicolumn



ซีอิ๊วดิบ ผ่าน minicolumn

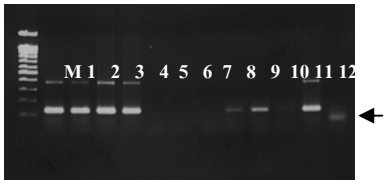


เต้าหู้ถั่วเหลือง ไม่ผ่าน minicolumn

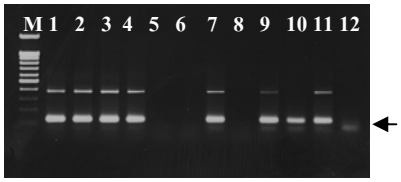


เต้าหู้ถั่วเหลือง ผ่าน minicolumn

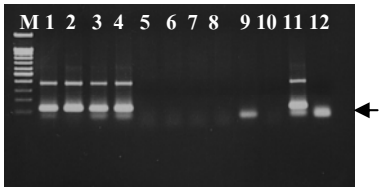
ภาพที่ 2 การตรวจคุณภาพ DNA ของซอสดิบ ซีอิ๊วดิบ และเต้าหู้ถั่วเหลือง ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ
แถบที่ 1-2 = Silica based DNA extraction method แถบที่ 3-4 = PVP method
แถบที่ 5-6 = GeneScan extraction method แถบที่ 7-8 = guanidinium-chloroform method
แถบที่ 9 = Positive control (ถั่วเหลือง) แถบที่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



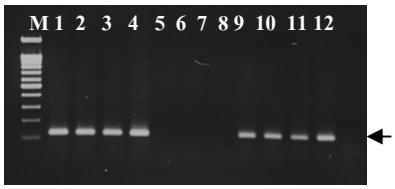
guanidinium-chloroform ไม่ผ่าน minicolumn



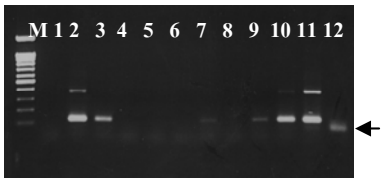
guanidinium-chloroform ผ่าน minicolumn



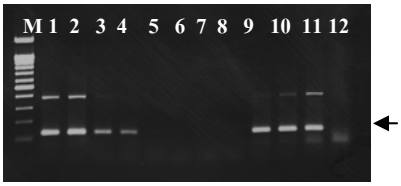
GeneScan ไม่ผ่าน minicolumn



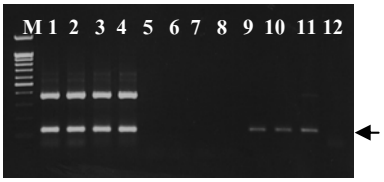
GeneScan ผ่าน minicolumn



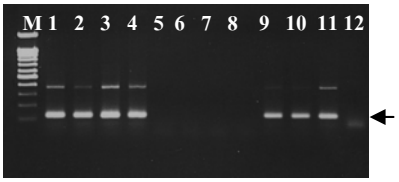
Silica ไม่ผ่าน minicolumn



Silica ผ่าน minicolumn



PVP ไม่ผ่าน minicolumn



PVP ผ่าน minicolumn

ภาพที่ 3 การตรวจคุณภาพ DNA ของผงปรุงรส 5 ชนิด ที่ได้จากการสกัด DNA ด้วยวิธีต่างๆ

แถบที่ 1-2 = Zinger Predust แถบที่ 3-4 = Zinger Batter

แถบที่ 5-6 = Hot & Spicy Marinade แถบที่ 7-8 = Hot & Spicy Breading

แถบที่ 9-10 = KFCH & Inject Marinade แถบที่ 11 = Positive control (ถั่วเหลือง)

แถบที่ 12 = Negative control (น้ำกลั่น) แถบที่ M = 100 bp DNA Ladder

2. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของคู่ Primers และ probe ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

ในการทดลองนี้ได้ทดสอบคู่ primer และ probe 2 ชุด ที่ได้จากการทดลองของ Pietsch and Waiblinger, 2000 คือ คู่ primer จำเพาะ RR-F/RR-R และ TaqMan probe RR-P และคู่ primer จำเพาะ Sttmf3a/ Sttmr2a และ TaqMan probe Sttmpa ที่ติดฉลากด้าน 5' เป็น FAM และ ด้าน 3' เป็น TAMRA ได้จากการทดลองของ Terry and Harris, 2001 ผลการทดลอง พบว่า การเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ด้วยคู่ primer จำเพาะ RR-F/RR-R และ TaqMan probe RR-P กับจำนวนรอบ ในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่า การเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA จึงทำให้ไม่สามารถทำ Standard curve ได้ และเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM 1% พบว่า การเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready อยู่ต่ำกว่า Reference ถั่วเหลืองที่เจือจางระดับ 1:64 เทียบการปนเปื้อน

เท่ากับ 0.08% ซึ่งจะทำให้การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ผิดพลาดได้ ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน lectin ด้วยคู่ primer จำเพาะ Lec1/Lec2 และ TaqMan probe Lecp กับจำนวนรอบในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่า การเพิ่มไม่เป็นไปตามสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA เช่นเดียวกัน จึงทำให้ไม่สามารถทำ Standard curve ได้ จากการใช้คู่ primer ชุดนี้ได้ทดลองเพิ่มเติมอีกโดยการทดลองเปลี่ยน ความเข้มข้นของ DNA, primer และ probe ตลอดจนอุณหภูมิในการ Hybridization แต่ก็พบว่าไม่สามารถทำ Standard cuve ได้ และได้นำเอาคู่ primer RR-F/RR-R และ Lec1/Lec2 มาทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจผลด้วย gel electrophoresis พบว่า ได้แถบ DNA เป้าหมายที่คมชัดดีมาก จึงสันนิษฐานว่าสาเหตุที่ทำให้ primer และ probe ชุดนี้เพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่เป็นไปตามสัดส่วนของความเข้มข้นของ DNA อาจเนื่องมาจาก probe ออกแบบไม่ดี หรืออาจเนื่องมาจาก probe ซึ่งแทนที่จะไป Hybridization กับ ผลผลิต PCR แต่กลับไป Hybridization กับ primer จึงทำให้การเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ไม่คงที่

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

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

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

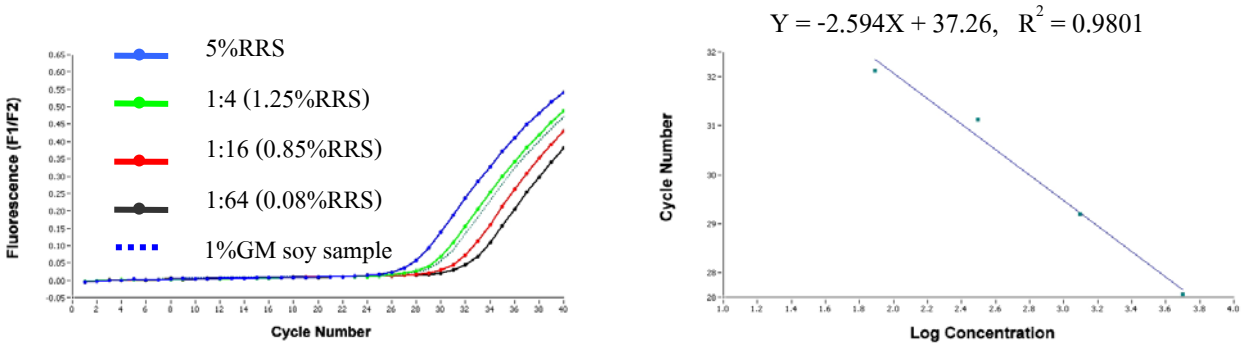
(a) หมายถึง ค่า Copy number ของยีนที่ใส่เข้าโปรแกรมของเครื่องครั้งแรก

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

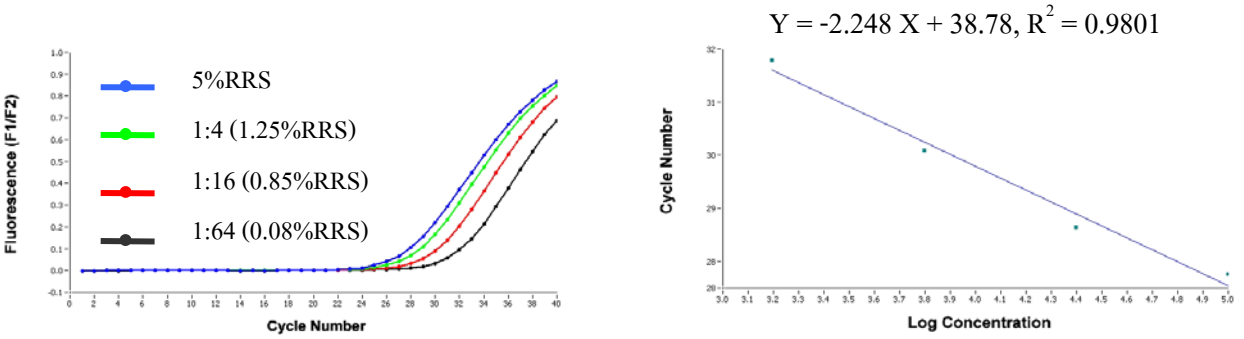
(c) หมายถึง จำนวนรอบที่ยีนถูกเพิ่มปริมาณครั้งแรก

(d) หมายถึง เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของถั่วเหลือง Roundup Ready

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



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



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

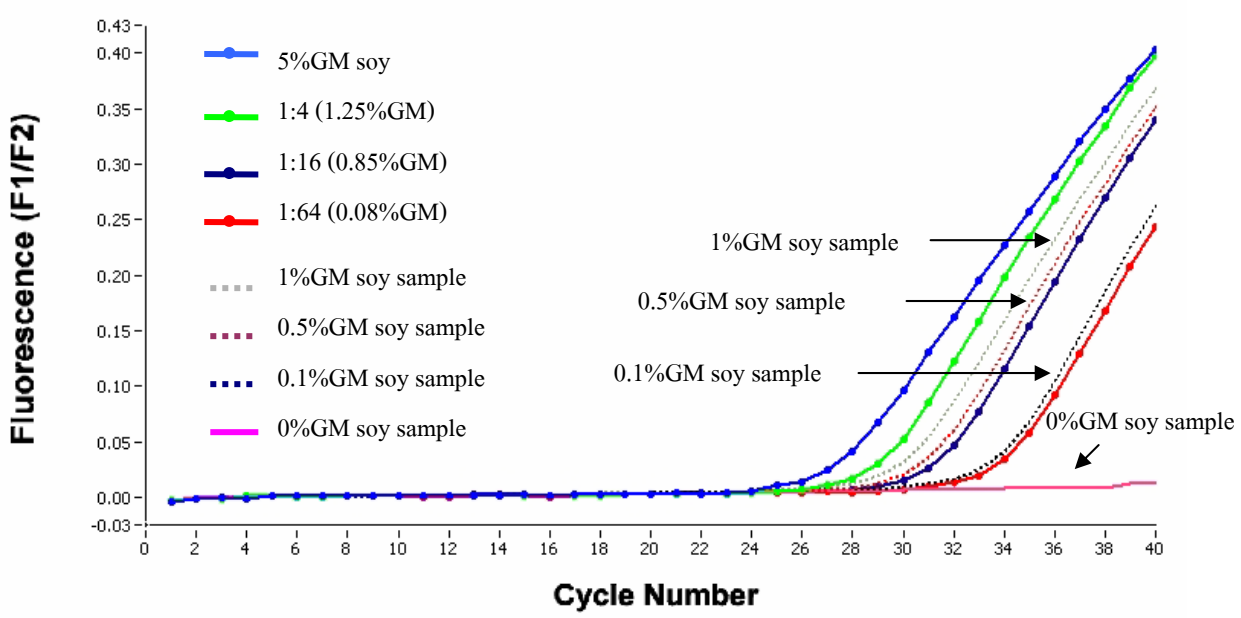
2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ในปริมาณต่ำสุด ด้วยวิธี Real-time PCR

จากการนำ DNA ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0 0.1 0.5 และ 1% มาตรวจสอบปริมาณยีน Roundup Ready ช่วง CP4 EPSPS เทียบกับ Standard ถั่วเหลือง 5% โดยใช้คู่ primer Sttmf3a/ Sttmf2a และ probe Sttmpa และ ยีน Lectin โดยใช้คู่ primer Sltm1/ Sltm2 และ probe Sltmp ในปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่า DNA ของตัวอย่างถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน ระดับ 0.1, 0.5 และ 1% สามารถเพิ่มปริมาณได้ เป็นสัดส่วนกัน (ภาพที่ 6) การเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ช่วง CP4EPSPS ของถั่วเหลือง GM ที่มีปริมาณการปนเปื้อน 0.1% จะเพิ่มในอัตราที่สูงกว่าเส้น Standard ของ ถั่วเหลือง GM 5% ที่เจือจาง 1:64 เล็กน้อย ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.08% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์

การปนเปื้อนจากการเทียบ copy number ของยีน Roundup Ready กับยีน lectin ได้เท่ากับ 0.12% สำหรับการเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ของถั่วเหลือง GM 0.5% เพิ่มในอัตราที่สูงกว่าเส้น Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:16 เล็กน้อย ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.31% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเท่ากับ 0.54% สำหรับการเพิ่มปริมาณของยีน Roundup Ready ของถั่วเหลือง GM 1% เพิ่มในอัตราที่อยู่ระหว่างเส้น Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:16 ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 0.31% กับ Standard ของ ถั่วเหลืองที่เจือจาง 1:4 ซึ่งปนเปื้อนประมาณ 1.25% และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเท่ากับ 0.97% สำหรับถั่วเหลือง GM ระดับ 0% พบว่า ไม่เพิ่มปริมาณยีนเลย

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

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



3. สำรวจปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM

จากการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในเมล็ดและกากถั่วเหลืองที่ตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นว่าเป็นถั่วเหลือง GM จำนวน 47 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6) จากตัวอย่างทั้งหมด 316 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนถั่วเหลืองนำเข้าที่ปนเปื้อน GM มากที่สุด ได้แก่ ประเทศอาร์เจนตินามีจำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกาก 17 ตัวอย่าง และเมล็ด 2 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 23-100% รองลงมา คือ บราซิล พบจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด โดยปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2.3-100%, สหรัฐอเมริกา พบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ดทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 86.5-100%, อินเดีย พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 2-100%, อุรุกวัย พบจำนวน

1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100%, แคนาดา พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรต พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้า พบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง 5 ตัวอย่าง และเมล็ด 1 ตัวอย่าง ปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในระดับ 0.5-100%

ตารางที่ 6 ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ของเมล็ดและกากถั่วเหลือง

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
1	2346	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	0.5	ไม่ระบุ
2	2347	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	89.5	ไม่ระบุ
3	2348	กากถั่วเหลือง	5/7/2545	GMOs	2.2	ไม่ระบุ
4	3136	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อุรุกวัย
5	3137	เมล็ดถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
6	3138	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
7	3139	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	26	บราซิล
8	3140	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
9	3141	กากถั่วเหลือง	4/11/2546	GMOs	100	บราซิล
10	3175	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	55.5	อาร์เจนตินา
11	3176	เมล็ดถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
12	3177	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	13.2	บราซิล
13	3178	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	94.7	อาร์เจนตินา
14	3179	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	90.6	อาร์เจนตินา
15	3180	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
16	3181	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	บราซิล
17	3182	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	23	อาร์เจนตินา
18	3183	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	91.6	อาร์เจนตินา
19	3184	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
20	3185	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
21	3186	กากถั่วเหลือง	1/12/2546	GMOs	36.6	อาร์เจนตินา
22	3187	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
23	3188	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา

ลำดับที่	รหัสเลขที่รับ	ตัวอย่าง	ว/ด/ป ที่สุ่มตรวจ	ผลการตรวจวิเคราะห์		ประเทศนำเข้า
				วิเคราะห์ผลด้วยวิธี PCR	ค่าเฉลี่ยปริมาณการปนเปื้อน GM (%)	
24	3189	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
25	3190	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อินเดีย
26	3191	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
27	3192	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
28	3193	กากถั่วเหลือง	2/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
29	3196	กากถั่วเหลือง	9/12/2546	GMOs	88.8	แคนาดา
30	3207	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	95.5	บราซิล
31	3208	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	28.1	บราซิล
32	3209	กากถั่วเหลือง	15/12/2546	GMOs	100	อาร์เจนตินา
33	3246	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
34	3247	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
35	3248	เมล็ดถั่วเหลือง	8/1/2547	GMOs	86.5	สหรัฐอเมริกา
36	3249	กากถั่วเหลือง	5/1/2547	GMOs	2.5	บราซิล
37	3288	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	77.7	อาร์เจนตินา
38	3289	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	2.3	บราซิล
39	3292	กากถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	21.1	บราซิล
40	3293	เมล็ดถั่วเหลือง	27/1/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
41	3299	เมล็ดถั่วเหลือง	29/1/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ
42	3318	เมล็ดถั่วเหลือง	4/2/2547	GMOs	100	สหรัฐอเมริกา
43	3332	กากถั่วเหลือง	12/2/2547	GMOs	2	อินเดีย
44	3382	กากถั่วเหลือง	19/3/2547	GMOs	1	ไม่ระบุ
45	3511	กากถั่วเหลือง	14/7/2547	GMOs	75.7	อินเดีย
46	3559	กากถั่วเหลือง	8/10/2547	GMOs	0.1	สาธารณรัฐอาหรับ อิมิเรต
47	6586	กากถั่วเหลือง	9/12/2547	GMOs	100	ไม่ระบุ

จากการสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจำนวน 136 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นโดยตรวจยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator พบว่า มีผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่ปนพืช GM จำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจากถั่วเหลืองทั้งหมด หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เป็น GM มาวิเคราะห์หาปริมาณการปนด้วยวิธี Real-time PCR โดยวิเคราะห์หายีน CP4EPSPS ซึ่งเป็นยีนของถั่วเหลือง GM ผลการทดลอง พบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปนเปื้อน ได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.4-27.8%, โปรตีนถั่วเหลืองพบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.1-0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนเปื้อนในระดับ 0.7-3.6% (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป

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

สรุปผลการทดลอง

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

2. การศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป พบว่า วิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปและขบวนการแปรรูปแตกต่างกัน ดังนี้

- ซอสดิบ และซีอิ๊วดิบ วิธีที่สกัด DNA ได้ดี คือ PVP และ GeneScan extraction ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

- เต้าหู้ถั่วเหลือง พบว่า ทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

- ผงปรุงรสชนิด Zinger Predust และ KFCH & Inject Marinade พบว่า ทุกวิธีที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้หมด

- สำหรับผงปรุงรสชนิด Hot & Spicy Breading พบว่า วิธี guanidinium-chloroform ที่นำ DNA ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดีที่สุด

- ส่วนตัวอย่าง Hot & Spicy Marinade Predust ไม่มีวิธีไหนสกัดได้

3. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่า คู่ primers sttmf3a/sttm2a และ probe Sttmpa สามารถเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ส่วน CP4 EPSPS ขนาด 145 bp และคู่ primers sltm1/sltm2 และ probe Sltmp เพิ่มปริมาณยีน lectin ขนาด 81 bp ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ความเข้มข้นของ DNA และสามารถตรวจปริมาณการปนถั่วเหลือง GM ได้ในปริมาณต่ำสุดถึง 0.1%

4. การสำรวจเมล็ดและกากถั่วเหลืองจำนวน 316 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยจำนวนถั่วเหลืองนำเข้าที่ปนเปื้อน GM มากที่สุด ได้แก่ ประเทศอาร์เจนตินา มีจำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกาก 17 ตัวอย่าง และเมล็ด 2 ตัวอย่าง ปนถั่วเหลือง GM ในระดับ 23-100% รองลงมา คือ บราซิล พบจำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด โดยปนในระดับ 2.3-100%, สหรัฐอเมริกา พบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ดทั้งหมด ปนในระดับ 86.5-100%, อินเดีย พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองทั้งหมด ปนในระดับ 2-100%, อุรุกวัย พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนในระดับ 100%, แคนาดา พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง ปนในระดับ 88.9%, สาธารณรัฐอาหรับอิมิเรต พบจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมล็ด ปนในระดับ 100% และไม่ระบุประเทศนำเข้าพบจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นกากถั่วเหลือง 5 ตัวอย่าง และเมล็ด 1 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.5-100%

5. การสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป 136 ตัวอย่าง พบว่า มีพืช GM ปนมาจำนวน 13 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาหาปริมาณการปนถั่วเหลือง GM ที่มียีน Roundyup Ready พบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปที่มีถั่วเหลือง GM ปน ได้แก่ อาหารสัตว์ พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.4-27.8%, โปรตีนถั่วเหลือง พบจำนวน 5 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.1-0.2% และแป้งถั่วเหลือง พบจำนวน 3 ตัวอย่าง ปนในระดับ 0.7-3.6%

การนำไปใช้ประโยชน์

1. นำเทคนิคการตรวจสอบมาใช้ประโยชน์ในงานบริการตรวจวิเคราะห์ และออกใบรับรองสินค้าพืช Non-GMOs และใช้เป็นเป็นข้อมูลในการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยสามารถระบุเปอร์เซ็นต์การปนถั่วเหลือง GM ได้ ตามกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม

2. ใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตรตามพระราชบัญญัติกักพืช และสร้างมาตรการควบคุมและตรวจสอบการแพร่กระจายพืช GM

3. ได้ข้อมูลการตรวจติดตามถั่วเหลืองทั้งนำเข้าภายในประเทศ และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาการนำเข้าสินค้าพืช Non-GMOs และเพิ่มประสิทธิภาพระบบการผลิตพืช Non-GMOs

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

ISO 2427. 2002. Foodstuffs-Methods of Analysis for the Detection of Genetically Modified Organisms and Derived Products-General Requirement and definition. International Organization for Standardization. 44 pp.

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

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

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

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

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

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