

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย :-
2. โครงการวิจัยเดี่ยว :พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม
กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธีชีวโมเลกุล
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) :-
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) ทดสอบความใช้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีนCaMV35S promoter และ Nos terminatorข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex real-time PCR
(ภาษาอังกฤษ) Validation study of CaMV 35S promoter andNos terminator multiplex real-time PCR screening method to detect GM maize
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน :นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวปิยนุช ศรีชัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวฐิติรัตน์ อัครวมงคลศิริ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีนCauliflower Mosaic Virus 35S promoter และ Nos terminator เชิงคุณภาพในข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex real-time PCR วิธีการดัดแปลงจาก Waiblinger et al. (2008)โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบอ้างอิงจากISO/IEC21569:2005 and 2013และ JRC-EURL ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมาย CaMV 35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงพืช (*high mobility group; hmg*) พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่ามีผลการตรวจวิเคราะห์เท่าเทียมหรือดีกว่าวิธีการตรวจแบบทีละยีน(single PCR, simplex)ทุกค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดได้อยู่ในเกณฑ์ค่าปกติที่ยอมรับได้ทั้งหมดได้แก่ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ50-200 นาโนกรัม มีความจำเพาะในการตรวจยีนโดยไม่พบ false positive/negativeขีดจำกัดการตรวจ (LOD)ที่ 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ PCR efficiency 102-115 เปอร์เซ็นต์(ค่าที่ยอมรับของวิธี multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์ Linearity(R^2) 0.998 ± 0.001 (ค่าที่ยอมรับ $R^2 \geq 0.98$) และค่าSlope -3.1 ถึง-3.26(ค่าที่ยอมรับ -3.1 ถึง -3.6) ดังนั้นวิธีการตรวจคัดกรองแบบ multiplex(triplex)Real-time PCR โดยตรวจยีนคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม CaMV35S promoterNos terminatorและยีนอ้างอิงข้าวโพด *hmg* ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดในเชิงคุณภาพได้

Abstract

The qualitative qPCR method validation for detecting on Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and Nos terminator of genetically modified maize using Multiplex real-time PCR according to modified Waiblinger et al. method (2008). Probes and Primers were referenced from ISO/ IEC21569: 2005, 2013 and JRC-EURL for detecting on CaMV 35S promoter Nos terminator and endogenous gene (*high mobility group; hmg*) in one reaction. All parameter results of qualitative qPCR method validation using Multiplex real-time PCR was similar to or better than Single PCR (Simplex) method within the acceptable standard : 50-200 ng of DNA concentration, Not found false positive and negative, Limited of detection at 0.001-0.01% , PCR efficiency at 102-115% , Linearity (R^2) at 0.998 ± 0.001 and Slope at -3.1 to -3.26. In summary, Multiplex real-time PCR technique is appropriate for qualitative GMO screening in GM maize and maize products.

6. คำนำ

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่ใช้วิธี DNA based technique เช่น เทคนิค PCR และ Real-time PCR โดยที่เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ และเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในห้องปฏิบัติการระดับสากลซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นการตรวจยีนอ้างอิงพืช (reference gene) และตรวจวิเคราะห์คัดกรอง (screening method) เช่น ยีน CaMV 35S promoter และ NOS-terminator ที่ติดต่อเชื่อมกับยีนจำเพาะเข้าไปในพืช ทั้งนี้การตรวจรับรองแต่ละครั้งต้องทำปฏิกิริยาทดสอบอย่างน้อย 3 ปฏิกิริยาๆ ละ 2 ซ้ำ ทำให้ต้องใช้เวลา สารเคมี และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์มาก ปัจจุบันห้องปฏิบัติการของสหภาพยุโรปใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ duplex real-time PCR (Waiblinger et al. (2008) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ติดฉลากสีของแต่ละยีนให้แตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกันและวิเคราะห์ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ละยีน ผลของปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ต้องเทียบเท่ากับวิธีการเดิมทดสอบ optimize ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบ ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ที่สามารถทำปฏิกิริยาในสภาวะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเดียวกัน ด้วยโพรบที่ติดฉลากสีต่างกัน ขั้นตอนการสังเคราะห์ของปฏิกิริยา เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative real-time PCR) ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดและถั่วเหลืองตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์การค้าที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในระดับต่ำ จัดทำขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เพื่อออกไปรับรองของห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ 35s CaMV promoter และ NOS-terminator ร่วมกับการตรวจยีนอ้างอิงพืชในขั้นตอนเดียว เพื่อลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ โดยคงประสิทธิภาพ ช่วยลดเวลาและต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน(Certified Reference Material, CRM)ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์เชิงการค้า ได้แก่ event Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162(IRMM:ERM) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และมีค่า Certified ดังตารางที่ 1
2. LightCycler480 Multiwell Plate 96, with sealing foil
- 3.Real-time PCR equipment model LightCycler 480(Roche Technologies, Santa Clara, CA)
4. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมีในการทำสกัดดีเอ็นเอและทดสอบปฏิกิริยา
- 5.ไพรเมอร์และโพรบ (Sigma-Aldrich Biotechnolgy)

ตารางที่ 1 วัสดุอ้างอิงมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

Source/code	Event	Certified value g/kg	%GM ($\pm$ Uncer.)	GM construct	
				35S promoter	Nos terminator
ERM-BF413ak	Mon810 ak	<0.9	<0.09	+	-
ERM-BF413ck	Mon810 ck	4.9	0.49 $\pm$ 0.1	+	-
ERM-BF413ek	Mon810 ek	19.8	1.98 $\pm$ 0.15	+	-
ERM-BF413gk	Mon810 gk	99	9.9 $\pm$ 0.5	+	-
ERM-BF411f	BT176	50	5 $\pm$ 0.18	+	-
ERM-BF412f	BT11	48.9	4.89 $\pm$ 0.21	+	+
ERM-BF415a	NK603 a	<0.4	<0.04	+	+
ERM-BF415b	NK603 b	1.0	0.1 $\pm$ 0.04	+	+
ERM-BF415c	NK603 c	4.9	0.49 $\pm$ 0.05	+	+
ERM-BF415d	NK603 d	9.8	0.98 $\pm$ 0.07	+	+
ERM-BF415e	NK603 e	19.6	1.96 $\pm$ 0.09	+	+
ERM-BF415f	NK603 f	49.1	4.91 $\pm$ 0.13	+	+
ERM-BF423a	MIR604 a	<0.9	<0.09	-	+
ERM-BF423b	MIR604 b	1.0	0.1 (-0.03;+0.1)	-	+
ERM-BF423c	MIR604 c	9.8	0.98 (-0.09;+0.13)	-	+
ERM-BF423d	MIR604d	98.5	9.85 (-0.26;+0.29)	-	+
AOCS 0607-A2	MIR604	NA	100	-	+
AOCS 1208-A	MIR162	NA	100	-	+
AOCS 0906-E	Mon89034	NA	99.425	+	+
AOCS 0406-D	Mon88017	>990.5	99.05	+	+

ERM-BF414f	GA21	42.9	4.29 ± 0.17	-	+
ERM-BF410gk	GTS 40-3-2	10	10 ± 0.7	+	+
AOCS	0406-A	<2.0	NA		

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงการตัดแปรพันธุ์มียีน CaMV 35S promoterและหรือNos terminator

; - (negative) หมายถึงไม่มียีน CaMV 35S promoterและหรือNos terminator, NA=Not available

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปลงพันธุ์กรรม (ตารางที่ 1) ด้วยการตัดแปลงจากวิธี GeneScanตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปรพันธุ์กรรม(Roger and Bendich, 1985)โดยชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 มก. ใส่หลอดทดลองขนาด 2มล. เติม Lysis buffer (Eurofin) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex บ่มตัวอย่างในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (heat block, Eppendorf) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชั่วโมง วางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอนที่ 14000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Chloroform :isoamyl alcohol (24:1) 1:1 สารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ปั่นตกตะกอนแล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลาย ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน) ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 รอบตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำอุ่น และนำมาทำจัด RNA โดยใช้ RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Raines, 1998) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับตัวอย่างสินค้าและผลิตภัณฑ์พืชจากข้าวโพดที่ทดสอบใช้วิธีการสกัดตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการ ได้แก่ GeneScan Cell breaking และ Guanidinium-chloroform

2. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของCaMV 35S promoter NOS terminatorและendogenous gene คือ *hmg* (*High mobility group* in maize) ของข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม และหาตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบจากเอกสารวิชาการต่างๆ (Waiblinger et al., 2008; Cottent et al., 2013; Huber et al., 2013; Broeders et al., 2014; Fraiture et al., 2015; Peng et al., 2016) และจากเอกสารการ Validation methods ของ JRC-EURL(JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบโดยเลือกติดฉลากสีโพรบที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วย Real time PCR model LC480 Cyclo (Roche Technologies, Santa Clara, CA) และใช้ BHQQuencer ดังนี้ โพรบ CaMV 35S promoter 5' FAM-3' BHQ, Nos terminator 5' HEX-3' BHQ, *hmg* 5' Cy5- 3' BHQ

3. ทดสอบความจำเพาะ(Specificity) ของปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และ Nos terminator แบบตรวจตัวอย่างทีละยีน (Single PCR, Simplex) ซึ่งเป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้ ทดสอบ เปรียบเทียบผลกับการทดสอบปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในปฏิกิริยาเดียวกัน (Waiblinger et al., 2008) และ การตรวจวิเคราะห์แบบ triplex โดยตรวจยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และยีนอ้างอิงพืช *hmg* gene ในปฏิกิริยาเดียวกัน (Huber et al., 2013) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชุดเดียวกัน โดยใช้สารเคมีไพรเมอร์และโพรบในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 2

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรม events ต่างๆ ได้แก่ Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162 ที่มีเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ (ตารางที่ 1) และ ตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุ์กรรมเช่นข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าว เป็นต้น

ตารางที่ 2 สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ตรวจยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* แบบ simplex และ multiplex (duplex และ triplex PCR)

Reagent	Final concentration/reaction		
	Simplex PCR	Duplex PCR	Triplex PCR
2XLightCycler Probe mastemix	1X	1X	1X
35S-F primer	2.5 pmol	0.1	0.1
35S-R primer	2.5 pmol	0.1	0.1
35S-Probe	2.5 pmol	0.1	0.1
Nos-F primer	(2.5 pmol)	1.0	1.0
Nos-R primer	(2.5 pmol)	1.0	1.0
Nos-Probe	(2.5 pmol)	0.2	0.2
<i>hmg</i> -F primer	-	-	0.05

<i>hmgR</i> primer-	-	-	0.05
<i>hmg</i> -Probe	-	-	0.25
DNA-extract (samples or standards)	50-100 ng	50-200 ng	50-200 ng
Total reaction volume	20	20	20

หมายเหตุ: simplex; ทดสอบที่ละยีน (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'TAMRA)โดยยีนอ้างอิงพืชทดสอบด้วยconventional PCR, Duplex; ทดสอบยีน 35S promoter (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'BHQ) +Nos terminator(โพรบติดฉลาก 5'HEX-3'BHQ) ในปฏิกิริยาเดียวกัน และยีนอ้างอิงพืชทดสอบด้วย conventional PCR, Triplex; ทดสอบยีน 35S promoter (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'BHQ) +Nos terminator(โพรบติดฉลาก 5'HEX-3'BHQ) + *hmg* (โพรบติดฉลาก 5'Cy5-3'BHQ) ในปฏิกิริยาเดียวกัน

เตรียมปฏิกิริยา Real-time PCR ปริมาตรตัวอย่าง 20ไมโครลิตรต่อหลุม ดังตารางที่ 2 ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายจำเพาะที่ต้องการตรวจหา ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LigheCycler 480 โดยใช้อุณหภูมิและรอบการทำงาน ดังนี้

Simplex: CaMV 35S promoter

Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40รอบ และ cooling ที่ 40องศาเซลเซียส

Simplex: Nos terminator

Initial denaturation ที่ 95องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15วินาที annealing และ extension 52องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 40รอบ และ cooling ที่ 40องศาเซลเซียส

Duplex และ Triplex: CaMV 35S promoter/Nos terminator/ *hmg*

Initial denaturation ที่ 95องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Amplification โดย denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40รอบ และ cooling ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยาMultiplex Real-time PCR

เจือจางดีเอ็นเอที่สกัดจากวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event MON 89034 ที่มีอัตราเจือปนรับรอง (Certified value 99.425 g/kg) คิดเป็น100%GMและevent Bt11 ที่มีอัตราเจือปนรับรองCertified value 48.9 g/kg คิดเป็น5%GMเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีการปนเปื้อนของการดัดแปลงพันธุกรรม5 ระดับได้แก่ event MON 89034 : 10% 1% 0.1% และ 0.01% ตามลำดับและ event

Bt11:0.5% 0.05% 0.005% และ 0.0005% ตัวอย่างละ 12 ซ้ำ ทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามขั้นตอนตารางที่ 2

การทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Amplification Range) โดยเตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON 89034 และ NK 603 จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีระดับการปนเปื้อน 1 และมีระดับ % ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ 50 100 150 200 ng จากนั้นทำปฏิกิริยา Real-time PCR ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

5. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย Triplex Real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์คัดกรองพร้อมตรวจยืนยันอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาเดียวกัน แบบ triplex real-time PCR เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดต่างๆ 17 ตัวอย่าง และมะละกออีก 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้น 100 ng จากนั้นนำมาตรวจสอบยืนยัน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene ด้วยการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 1 ปี เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

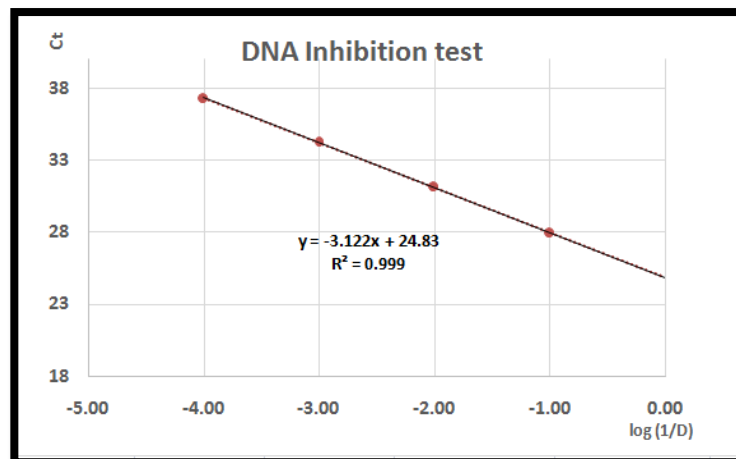
สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิงข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034, NK603, MIR604 และ MIR162 (ตารางที่ 1) ด้วยการดัดแปลงจากวิธี GeneScan (Roger and Bendich, 1985) ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปลงพันธุกรรม และนำมากำจัด RNA โดยใช้ RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Raines, 1998) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ MultiskanGO (ThermoFisher Scientific, Finland)

โดยผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี GeneScan ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปลงพันธุกรรมได้ดีเอ็นเอเฉลี่ยประมาณ 1,467.17 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตรที่ได้ 50 ไมโครลิตร คุณภาพของดีเอ็นเอคำนวณค่า 260/280 เฉลี่ย 1.8-2.0 OD. ทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยตรวจสอบปฏิกิริยา inhibition test ของดีเอ็นเอที่สกัด ซึ่งได้ค่า

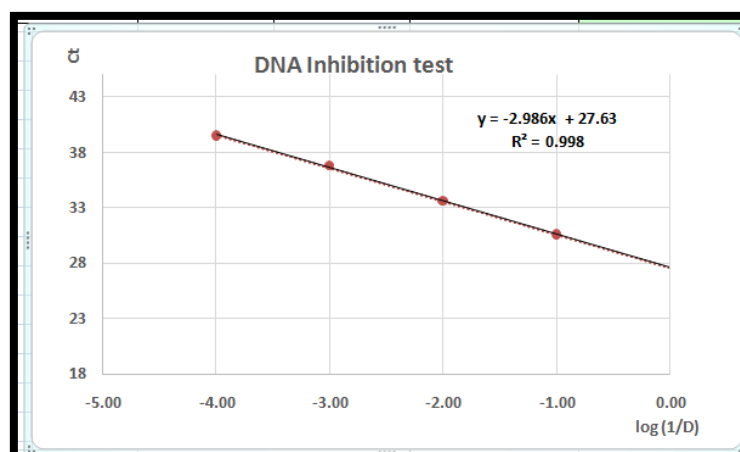
R^2 เท่ากับ 0.998 ± 0.001 และมีค่า ΔCt (extrapolated) = Extrapol. Ct - Mean Ct ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือค่าต่ำกว่า 0.5 (ภาพที่ 1)

จากการรายงานของ Cankar et al (2006) ที่กล่าวว่า การสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ inhibitor ที่เกิดจากสารภายในตัวอย่าง หรือ inhibitor ที่เกิดจากขั้นตอนการสกัด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธีเช่นการตรวจสอบจากการวัดคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร หรือการนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR, Real-time PCR เป็นต้น สอดคล้องกับการรายงานของ Turkec et al(2016) ที่กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นเอส่งผลต่อการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์ GMO จำเป็นต้องมีวิธีการสกัดที่สามารถให้คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ดี รวมถึงสามารถดึงเอาตัว Inhibitor ต่างๆออกได้มากที่สุด

สำหรับผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ไม่มีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 3) และมีคุณภาพเหมาะสมนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไปได้



ก



ข

ภาพที่ 1 การทดสอบ Inhibition test ปฏิกริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON89034(ก) และ NK603 (ข) ซึ่งมีค่า ΔCt (extrapolated) เท่ากับ 0.29 และ 0.13 และค่า R^2 เท่ากับ 0.999 และ 0.998 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้น คุณภาพดีเอ็นเอ และผลทดสอบ Inhibition test ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

GM (events)	% GMO Value	ความเข้มข้น (ng/ul)	Ratio of A260/280	Inhibition test	
				ΔCt (extrapolated)	R^2
Mon810	blank <0.04	1,035±132	1.87±0.11	NA	NA
	0.5%	1,570±192	1.89±0.05	NA	NA
	2	1,640±183	1.90±0.05	0.34	0.998
	9.9%	1,642±157	1.88±0.07	NA	NA
MON89034	100%	1,353±133	2.00±0.08	0.29	0.999
NK603	blank <0.04	1,630±347	1.89±0.02	NA	NA
	0.1%	1,539±179	1.87±0.07	NA	NA
	0.5%	1,008±152	1.84±0.05	0.13	0.998
	1.0%	1,156±163	1.86±0.04	NA	NA
	2%	1,038±135	1.91±0.08	NA	NA
	10%	1,299±190	1.90±0.03	NA	NA
MIR162	100	1,197±90	1.98±0.02	0.28	0.999
Bt11	4.89	1,508±151	1.87±0.06	0.25	0.997
Bt 176	5.00	1,849±85	1.92±0.10	0.32	0.999
MIR604	<0.09	1,897±131	1.93±0.05	NA	NA
	0.98	1,795±231	1.97±0.02	NA	NA
	9.85	1,499±167	1.97±0.08	0.24	0.999
nonGM	-	1,754±142	1.85±0.03	NA	NA
AVG		1,467.17	1.91	-	-

NA: ไม่ได้ทำการทดสอบ

2. สังเคราะห์ไพรเมอร์และโพรบ

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CaMV 35S promoter NOS terminator และ endogenous gene คือ HMG (High mobility group in maize) ของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม และหาตำแหน่งไพรเมอร์

และโพรบจากเอกสารวิชาการต่างๆ (Waiblinger et al., 2008; Cottent et al., 2013; Huber et al., 2013; Broeders et al., 2014; Fraiture et al., 2015; Peng et al., 2016) และจากเอกสารการ Validation methods ของ JRC-EURL (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) โดยเลือกใช้วิธีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วย Real time PCR model LC480 Cyclo (Roche Technologies, Santa Clara, CA)

หลังจากการรวบรวมข้อมูลไพรเมอร์และโพรบและวิธีการตรวจวิเคราะห์จากเอกสารต่างๆแล้วสามารถสรุปข้อมูลของไพรเมอร์และโพรบได้โดยใช้วิธีการ Validation methods และ ไพรเมอร์และโพรบจาก ของ JRC-EUROPEAN COMMISSION (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพต่อไป (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ HMG gene ของข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและการติดฉลากสี

Target	Sequences	Length	อ้างอิง
Screening target			ISO 21569:2005
35S-FTM	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	18	/Amd.1:2013
35S-RTM	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	22	(2013)
35S-TMP	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1-3'	22	
NOS180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	25	
NOS180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT-3'	25	
NOS180-P	5'-Hex-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1-3'	28	
Endogenous gene			EURL-GMFF- ENGL
HMG-F	5'TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'	23	(2010)
Hgm-R	5'GCTACATAGGGAGCCTTGTCCCT-3'	22	
HMG-P	5'Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ1-3'	23	
Probe ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชดัดแปลงพันธุกรรม			
35S-P	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG- TAMRA-3'	22	
NOS-P	5'-FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA -3'	28	

3. ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Real-time PCR

ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืช และทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Simplex) เปรียบเทียบกับการทดสอบปฏิกิริยาที่ดัดแปลงตามเอกสารวิชาการในรูปแบบ Duplex

PCR (CaMV 35S promoter กับ NOS terminator) และ รูปแบบ triplex (CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ดัดแปลงมาจาก EU database of Reference Methods for GMOs (JRC-EURL-GMFF-ENGL, 2010) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสอบสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชดัดแปรพันธุกรรมให้ผลค่า CP แตกต่างกันแต่อย่างชัดเจน โดยความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์จากการดัดแปลงมาจาก EU database of Reference Methods for GMOs (JRC-EURL-GMFF-ENGL, 2010) ให้ค่า CP น้อยกว่าชุดที่ 2 ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสอบสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชดัดแปรพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องจากโพรบและไพรเมอร์ทั้งสองชุดมีความแตกต่างกันเพียงการติดโพรบตำแหน่ง 5' ด้วย FAM หรือ Cy5 และติดโพรบที่ตำแหน่ง 3' ด้วย BHQ ทำให้การเรืองแสงสามารถตรวจสอบได้ดีกว่าการติดโพรบด้วย FAM ที่ปลาย 5' และ ติดโพรบ TAMRA ที่ปลาย 3' ที่มีการแผ่รังสีของแสงทั้งสองด้านซึ่งอาจจะซ้อนทับกันทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก (Johansson, 2006) นอกจากนี้ความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่ใช้ในชุดที่ 1 ยังมีปริมาณและความเข้มข้นสุดท้ายที่น้อยกว่า ซึ่งเหมาะสมสำหรับนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่มีการตรวจตัวอย่างจำนวนมากต่อปี ดังนั้นจากปัจจัยที่ 1 สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบในชุดที่ 1 เหมาะสมสำหรับนำมาทำปฏิกิริยา

ค่าความเข้มข้นของโพรบและไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำมาทดสอบปฏิกิริยาในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ไพรเมอร์และโพรบให้ค่า CP ในการตรวจสอบแต่ละยีนแต่ละรูปแบบไม่แตกต่างกันดังตารางที่ 5 แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการตรวจสอบพบว่ารูปแบบการตรวจสอบแบบ Simplex ใช้เวลานานกว่าเนื่องจากต้องทำแต่ละยีนแยกกัน และตรวจสอบยีนอ้างอิงพืชด้วย conventional PCR ทำให้ต้องใช้เวลามากขึ้น และมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การตรวจสอบรูปแบบ Triplex ใช้เวลาในการตรวจรวดเร็วกว่าและให้ผลของค่า CP ไม่แตกต่างกันกับการตรวจสอบด้วย Simplex และ Duplex ที่ความเข้มข้นโพรบและไพรเมอร์ชุดเดียวกัน

ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lab Life-Real-Time PCR (2015) ที่กล่าวว่า การตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ Multiplex ดีกว่าการตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ Simplex ในหลายด้านดังต่อไปนี้ ช่วยประหยัดเวลาในการทำงาน สามารถตรวจสอบได้หลายยีนในคราวเดียวกันและใช้สารเคมีเทียบเท่าการทำ Simplex แต่ให้ผลการตรวจสอบหลายยีนต่อ 1 ครั้ง ลดความเสี่ยงที่เกิดจากการปฏิบัติงานหลายครั้ง แต่อย่างไรก็ตามได้กล่าวถึงข้อเสียของการตรวจสอบแบบ Multiplex คือ จำเป็นจะต้องมีการหาความเหมาะสมของไพรเมอร์ หรือโพรบ และองค์ประกอบหรือสภาวะของสารเคมีร่วมกันก่อนที่จะปฏิบัติงานจริง ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานเช่น Alary et al., (2003) ที่เปรียบเทียบการทำ Simplex และ Duplex Real-time PCR เพื่อตรวจ GMO ในข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบ promoter และ terminator ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่าง multiplex กับ Simplex ผลการทดสอบพบว่า การตรวจสอบด้วย multiplex ใช้เวลาน้อย ประหยัดและเป็นเทคนิคที่แม่นยำ (Debode et al., 2013)

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาต่อดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงต่างๆ ดังต่อไปนี้ Mon810, Bt 11, Bt176, Mon89034 (Positive control), NK603, MIR604 และ MIR162 ที่มีเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่างๆ และ ข้าวโพดที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม(Negative control)เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Real-time PCR (ตารางที่ 6) event ละ 3 ซ้ำผลการทดสอบพบว่า ไพร์เมอร์และโพรบที่ทดสอบมีความจำเพาะกับตัวอย่าง Positive control (Mon89034) แต่ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับตัวอย่าง Negative control และสามารถตรวจพบยีน *hmg* ในตัวอย่างที่เป็นข้าวโพดทั้งหมด ทั้งในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นวัสดุอ้างอิงและข้าวโพดที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม และสามารถตรวจพบยีน CaMV35s promoter ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงดังต่อไปนี้ Mon810, Bt 11, Bt176, NK603 แต่สำหรับ Mon 810 และ NK603 ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน GMO ในระดับต่ำ (blank) ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบ NOS terminator ที่ตรวจพบในวัสดุอ้างอิงดังต่อไปนี้ Bt 11, NK603, MIR604 และ MIR162

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบปัจจัยความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีนจำเพาะและยีนอ้างอิงพืชและทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR ตามกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจสอบสินค้าผลิตภัณฑ์และพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Simplex) เปรียบเทียบกับการทดสอบปฏิกิริยาที่ดัดแปลงตามเอกสารวิชาการในรูปแบบ Duplex PCR (CaMV 35S promoter กับ NOS terminator) และ รูปแบบ triplex (CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene)

ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR														
Plant Event	35SCaMV promoter					NOS terminator					HMG(endogenous)			
	Simplex	Duplex	Triplex	Simplex	F test	Simplex	Duplex	Triplex	Simplex	F test	Simplex	Duplex	Triplex	Simplex
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2		ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2		ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2
Bt11	30±0.21	30±0.31	30±0.17	33±0.31	*	31±0.22	31±0.36	31±0.34	35±0.53	*	23±0.08	22±0.33	22±0.32	-
GMO5%	b ^{1/}	b ^{1/}	b ^{1/}	a ^{1/}		b ^{2/}	b ^{2/}	b ^{2/}	a ^{2/}		b ^{3/}	b ^{3/}	b ^{3/}	
NK603	31±0.41	32±0.14	32±0.24	34±0.27	*	32±0.52	33±0.33	33±0.42	36±0.37	*	23±0.12	23±0.23	22±0.35	-
GMO1%	b ^{1/}	b ^{1/}	b ^{1/}	a ^{1/}		b ^{2/}	b ^{2/}	b ^{2/}	a ^{2/}		b ^{3/}	b ^{3/}	b ^{3/}	
Mon-89034	28±0.47	28±0.18	28±0.28	31±0.32	*	29±0.26	29±0.31	30±0.41	34±0.39	*	22±0.17	22±0.13	21±0.13	-
GMO10%	b ^{1/}	b ^{1/}	b ^{1/}	a ^{1/}		b ^{2/}	b ^{2/}	b ^{2/}	a ^{2/}		b ^{3/}	b ^{3/}	b ^{3/}	
MIR 604						30±0.21	30±0.39	30±0.17	36±0.33	*	22±0.25	22±0.35	22±0.09	-
GMO 1%	ND	ND	ND	ND		b ^{2/}	b ^{2/}	b ^{2/}	a ^{2/}		b ^{3/}	b ^{3/}	b ^{3/}	

1/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนCaMV 35S promoter

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนNOS terminator

3/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ของการตรวจสอบยีนHMG

* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≥0.05)

ND = not detected หรือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาต่อดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิง

GM (events)	% GMO Value	ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR		
		35sCaMV promoter	NOS terminator	HMG
Mon810	blank <0.04	ND	ND	27.45±0.09
	0.5%	36.50±0.24	ND	25.51±0.03
	2	33.15±0.35	ND	25.76±0.15
	9.9%	29.88±0.11	ND	25.08±0.15
MON89034	100%	28.04±0.32	27.90±0.74	27.68±0.26
NK603	blank <0.04	ND	ND	28.77±0.11
	0.1%	38.72±0.27	39.12±0.17	28.80±0.07
	0.5%	37.29±0.15	38.11±0.42	32.03±0.17
	1.0%	35.36±0.11	36.21±0.10	30.92±0.09
	2%	34.55±0.24	35.41±0.24	28.51±0.09
	10%	30.88±0.56	32.74±0.60	29.63±0.14
MIR162	100	ND	28.36±0.13	29.35±0.09
Bt11	4.89	30.36±0.17	30.21±0.17	26.06±0.07
Bt 176	5.00	35.02±0.17	ND	29.56±0.16
MIR604	<0.09	ND	30.36±0.17	27.43±0.41
	0.98	ND	30.36±0.17	27.93±0.02
	9.85	ND	30.36±0.17	29.63±0.14
RR	0.1%	30.78±0.44	30.54±0.59	ND
	10%	38.56±0.15	39.11±0.13	ND
nonGM corn	-			25.36±0.03

ND = not detected หรือ ตรวจไม่พบ

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR

สกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event MON 89034 ที่มีอัตราเจือปนร้อยละ 100 และ event Bt11 ที่มีอัตราเจือปนร้อยละ 5 จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้มีให้มีการปนเปื้อนของการดัดแปลงพันธุกรรม 5 ระดับได้แก่ event MON 89034 : 10% 1% 0.1% และ 0.01% ตามลำดับ และ event Bt11: 0.5% 0.05% 0.005% และ 0.0005% ลำดับการเจือจางละ 12 ซ้ำ ให้มีจำนวน copies no. ของยีนที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมมาตรฐานเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิงของพืชดังตารางที่ 7 โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ(Federal office of consumer protection and food safety, 2016) ดังต่อไปนี้

$$\text{Number of genome equivalents per } \mu\text{l} = \frac{\text{DNA - concentration [ng/}\mu\text{l}] \times 1000}{\text{haploid genome mass [pg]}}$$

สำหรับดีเอ็นเอของข้าวโพดมีค่า haploid genome mass เท่ากับ 2.6พิโคกรัม (Federal office of consumer protection and food safety, 2016; Arumuganathan and Earle,1991) และจากการทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จึงสามารถสรุปได้ว่า 100 ng มีจีโนมของยีนอ้างอิงพืช 36,697 copies และหากตัวอย่างดีเอ็นเอพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการเจือปนยีนดัดแปลงพันธุกรรมร้อยละ 10จะมียีนที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม 3,669 copies ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างตั้งต้น 100 นาโนกรัมแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำจะได้ค่าดีเอ็นเออ้างอิงและดีเอ็นเอที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและจำนวน copies ของยีนดัดแปลงพันธุกรรมและยีนดั้งเดิมในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 และ Bt11

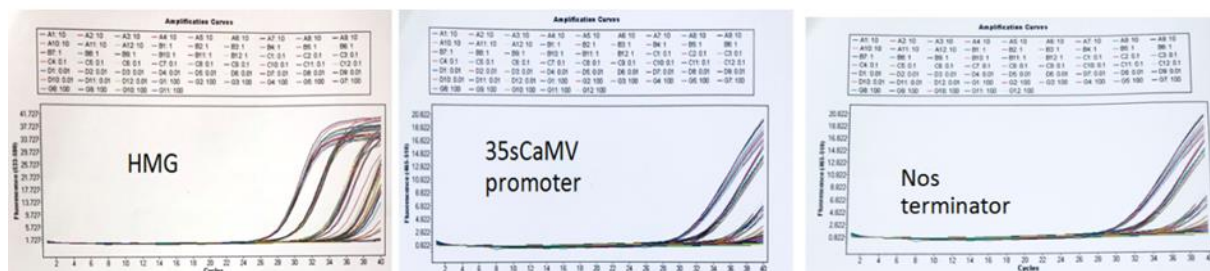
Plant Event	% GMO level	ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่อ 1 reaction (ng)	Reference Copies ในจีโนมข้าวโพด	Target Copies ในจีโนมข้าวโพด
MON 89034	100	100	36,697	36,697
	10	10	3,669	369.7
	1	1	369.7	36.97
	0.1	0.1	36.97	3.697
	0.01	0.01	3.69	0.369
Bt11	5	100	36,697	1,835
	0.5	10	3,669	183.5
	0.05	1	369.7	18.35
	0.005	0.1	36.9	1.835
	0.0005	0.01	3.69	0.1835

สำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน CaMV 35s promoter และ NOS terminator ที่จำเพาะต่อการดัดแปลงพันธุกรรมในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 เทียบกับยีนอ้างอิงของพืช (*hmg*) โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในการทดสอบครั้งเดียวกันนำค่า CP และ log ของ dilution factor มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำค่า CP (crossing point) กับค่า log ของ dilution factor เป็นกราฟมาตรฐาน ผลการทดสอบ ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน 35s CaMV promoter NOS terminator และ *hmg* (reference gene) เฉลี่ย -3.12 -3.104 และ -3.13 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ -3.1 ถึง -3.6 และมี PCR efficiency ของปฏิกิริยาเท่ากับ 109.04 116.17 และ 108.14

ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity R^2 เท่ากับ 0.99 ทั้งสามยีน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.01 ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน 35s CaMV promoter และ NOS terminator ที่จำเพาะต่อการดัดแปลงพันธุกรรมในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event Bt11 เทียบกับยีนอ้างอิงของพืช (*hmg*) ที่ได้ค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน 35s CaMV promoter NOS terminator และ *hmg* (reference gene) เฉลี่ย -3.26 -3.102 และ -3.25 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ -3.1 ถึง -3.6 และมี PCR efficiency ของปฏิกิริยา 102.65 115.60 และ 103.09 ตามลำดับ สร้างกราฟคำนวณค่า Linearity (R^2) เท่ากับ 0.99 ทั้งสามยีน (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 2) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเจือจางตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่า LOD สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.0005

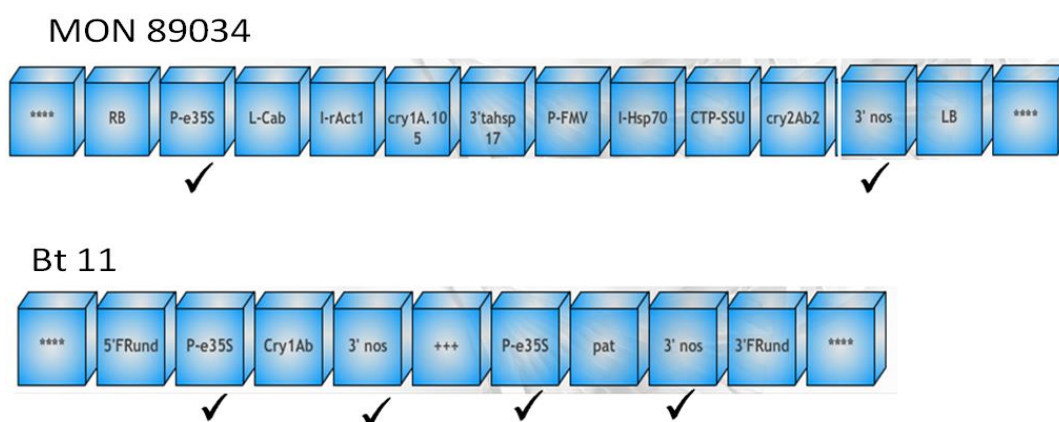
ตารางที่ 8 การตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene

Plant	%	Target	ยีนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR		
Event	GMO level	Copies	<i>CaMV</i> 35S promoter	NOS terminator	<i>HMG</i>
		No.			
MON 89034	100%	36,697	28.94±0.30	29.11±0.29	26.10±0.14
	10%	369.7	30.60±0.46	30.90±0.49	27.96±0.33
	1%	36.97	34.19±0.51	34.54±0.62	31.28±0.43
	0.1%	3.697	36.80±0.93	36.76±0.57	34.24±0.70
	0.01%	0.369	38.92±0.97	39.12±0.97	36.28±0.26
PCR efficiency (%)			109.04	116.17	108.14
Slope			-3.12	-3.104	-3.13
Bt 11	5%	1,835	31.38±0.45	31.51±0.30	28.23±0.42
	0.5%	183.5	34.42±0.28	34.54±0.83	31.48±0.35
	0.05%	18.35	35.70±0.71	35.90±0.57	33.37±0.42
	0.005%	1.835	36.44±0.54	36.44±0.28	34.55±0.88
	0.0005%	0.1835	37.54±0.34	37.66±0.46	34.67±0.35
PCR efficiency (%)			102.65	115.60	103.09
Slope			-3.26	-3.102	-3.25



ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON89034 ที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า ค่า LOD ของ MON89034 สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.01 ส่วนค่า LOD ของ Bt 11 สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.0005 ซึ่งอาจเกิดจากชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON89034 มี CaMV 35s promoter และ NOS terminator เพียง 1 ชุดเท่านั้น แต่ในขณะที่ ชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม Bt 11 มี CaMV 35S promoter และ NOS terminator ถึง 2 ชุด ซึ่งทำให้เราสามารถได้ค่า LOD ของ Bt11 ถึง 0.0005% ดังภาพที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนระหว่างยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปกับยีนที่ต้องการตรวจสอบของ MON89034 น้อยกว่า Bt11 ซึ่งผลต่อค่า LOD ของแต่ละ event ด้วย



ภาพที่3 แสดงชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม event MON89034 และ Bt11 ที่มา: ISAAA: GMaproval and CBD Biosafety Clearing House

สำหรับการทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยการเตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON 89034และ NK 603 จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงที่เป็นสารมาตรฐานให้ได้มีระดับการปนเปื้อน 1% และมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ 50 100 150 200 ng จากนั้นทำปฏิกิริยา Real-time PCR ความเข้มข้นละ 12 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ

ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON 89034 ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต่างกันส่งผลให้ได้ค่า CP ที่แตกต่างกันในทุกๆ ยีน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 ng ให้ค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน CaMV 35s promoter เท่ากับ 36.88 ± 0.54 และยีน NOS terminator เท่ากับ 37.00 ± 0.49 ซึ่งมีความมากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า CP ที่ได้จากความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 100 150 และ 200 ng ที่มีค่า CP เฉลี่ยจากการตรวจสอบยีน CaMV35s promoter เท่ากับ 35.54 ± 0.54 และ ยีน NOS terminator เท่ากับ 35.32 ± 0.37 ซึ่งสอดคล้องกับดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK 603 ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 ng ให้ค่า CP ที่ได้จากการตรวจสอบยีน CaMV35s promoter เท่ากับ 34.81 ± 0.33 และยีน NOS terminator เท่ากับ 38.00 ± 0.32 ซึ่งมีความมากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า CP ที่ได้จากความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 100 150 และ 200 ng ที่มีค่า CP เฉลี่ยจากการตรวจสอบยีน CaMV 35s promoter เท่ากับ 33.54 ± 0.25 และ ยีน NOS terminator เท่ากับ 36.32 ± 0.15 นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นให้ค่า CP ของยีน *hmg* ซึ่งเป็น endogenous gene ไม่แตกต่างกัน

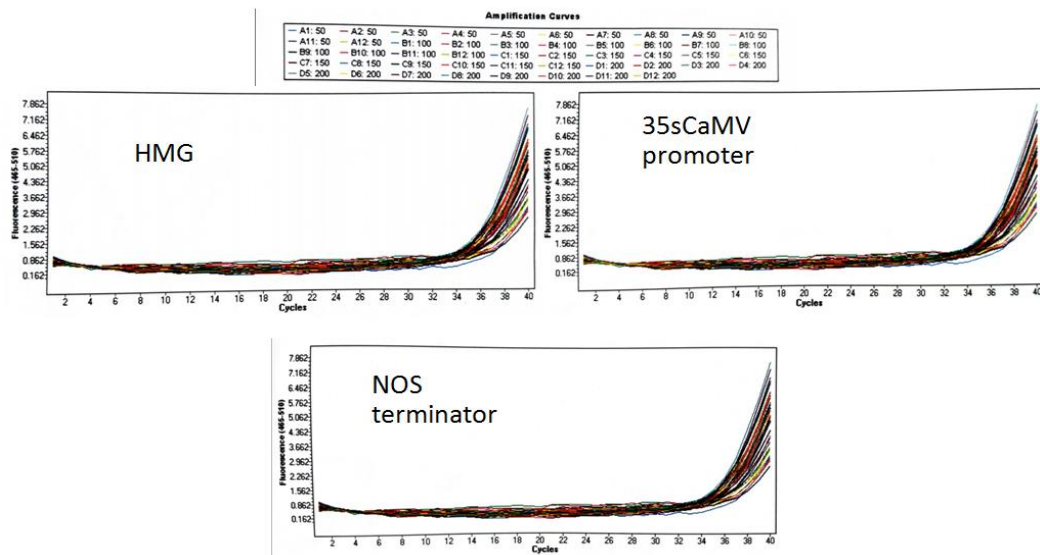
ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Realtime PCR คือ 100 ng (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cankar et al (2006) และ Turkec et al (2016) ที่กล่าวว่า การสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญอย่างมากและมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบปัจจัยที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ GMO ด้วยเทคนิคต่างๆ โดยปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ Real-time PCR โดยค่า CP จะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอความเข้มข้นน้อยจะมีค่า CP ที่สูงและในทางกลับกัน ถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาสูงจะทำให้ค่า CP ที่ต่ำ

แต่ในทางกลับกัน Ellison et al. (2006) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาใน Real-time PCR แต่ copy number ในดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้น ถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยแต่ถ้ามี copy number ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบในระดับตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไปก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยา real-time PCR ได้ตามทฤษฎี

ตารางที่ 9 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

EVENT	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ng ต่อ ปฏิกิริยา)	ค่า CP จากการตรวจสอบยีน		
		35sCaMV promoter	NOS terminator	<i>hmg</i>
MON89034 GMO 1%	50	$36.88 \pm 0.54a$	$37.00 \pm 0.49a$	36.45 ± 0.64
	100	$35.60 \pm 0.34b$	$35.67 \pm 0.34b$	35.13 ± 0.42
	150	$35.54 \pm 0.40b$	$35.62 \pm 0.40b$	35.23 ± 0.38
	200	$35.09 \pm 0.21b$	$35.14 \pm 0.24b$	34.77 ± 0.20

F-test	-	*	*	ns
	50	34.81±0.33	38.00±0.32a	35.85±0.51
NK603	100	33.60±0.66	36.42±0.41b	35.43±0.36
GMO 1%	150	33.59±0.32	36.32±0.50b	35.13±0.23
	200	33.72±0.53	35.59±0.44b	34.65±0.20
F-test	-	*	*	ns



ภาพที่ 4 แสดงผลปฏิกิริยาที่ได้จากการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

5. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วยTriplex Real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดต่างๆ 17 ตัวอย่าง และมะละกออีก 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้น 100 ng จากนั้นนำมาตรวจสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene ด้วยการทำปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 2 รอบการทดสอบ ผลการทดลองพบว่า ทุกๆ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตรวจด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ให้ผลการตรวจสอบเหมือนกับที่ตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR แบบ Simplex ซึ่งเป็นการยืนยันเทคนิค Multiplex Real-time PCR ว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมและสามารถใช้ในการตรวจสอบพืชและตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่10 ผลการตรวจสอบตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

พืช	รหัสตัวอย่างทดสอบ	ผลการตรวจ Multiplex Real-time PCR			ผลการตรวจ ของห้องปฏิบัติการ	
		35S CaMV	NOS	<i>HMG</i>	35S CaMV	NOS
ข้าวโพด	1895/1	+	-	+	+	-
	1895/2	+	-	+	+	-
	1895/3	+	+	+	+	+

	1895/4	+	+	+	+	+
	1895/5	+	+	+	+	+
	1895/6	+	+	+	+	+
	1895/7	+	-	+	+	-
	1895/8	+	-	+	+	-
	1895/9	+	+	+	+	+
	1895/10	+	-	+	+	-
	1895/11	+	-	+	+	-
	1895/12	+	-	+	+	-
	1895/13	+	-	+	+	-
	1895/14	+	-	+	+	-
	1895/15	+	-	+	+	-
	1895/16	+	+	+	+	+
	1895/17	+	+	+	+	+
มะละกอ	1960	+	+	-	+	+
	4910	+	+	-	+	+
	4911	+	+	-	+	+
	3771	-	-	-	-	-
	3775	-	-	-	-	-
	3820	-	-	-	-	-
	3822	-	-	-	-	-
	3830	-	-	-	-	-
	V1586	+	+	-	+	+
	V1589	+	+	-	+	+
	V1601	+	+	-	+	+
	V1594	+	+	-	+	+
	Positive	+	+	-	+	+
	papaya					
	Positive control	NK603	+	+	+	+
	Negative control	น้ำกลั่น	-	-	-	-

หมายเหตุ: + (positive) หมายถึงตรวจพบยีน; - (negative) หมายถึงตรวจไม่พบ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดสอบค่าพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดได้จากการทดลองการตรวจคัดกรองข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมด้วยวิธี multiplex real-time PCR แบบ triplex โดยตรวจยีน CaMV35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงพืช *hmg* ในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์ที่ยอมรับได้ดังนี้

ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50-200 นาโนกรัม มีความจำเพาะในการตรวจยืนยันโดยไม่พบ false positive/negative ขีดจำกัดการตรวจ (LOD) ที่ 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ PCR efficiency 102-115 เปอร์เซ็นต์ (ค่าที่ยอมรับของวิธี multiplex 80-120 เปอร์เซ็นต์ Linearity (R^2) 0.998 ± 0.001 (ค่าที่ยอมรับ $R^2 \geq 0.98$) และค่า Slope -3.1 ถึง -3.26 (ค่าที่ยอมรับ -3.1 ถึง -3.6) ดังนั้นวิธีการตรวจคัดกรองแบบ multiplex (triplex) Real-time PCR โดยตรวจยืนยันคัดกรองพืชตัดแปรพันธุกรรม CaMV35S promoter Nos terminator และยีนอ้างอิงข้าวโพด *hmg* ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดในเชิงคุณภาพได้

Parameter	Simplex	Multiplex	Acceptance parameter
Applicability	+	+	-Difference matrix : tissue and product -Difference DNA amount 50-200 ng
Practicability	+	+	Compare with other method
Specificity	+	+	No false positive and negative
Sensitivity (LOD)	+	+	0.001-0.01% for fresh tissue or CRM 0.01-0.1% for product :
PCR efficiency	+	+	90-110% for simplex 80-120% for multiplex
Linearity (R^2)	+	+	$R^2 \geq 0.98$
Slope	+	+	-3.1 to -3.6
Robustness	+	+	Correct positive /negative classification
+ : parameter to be evaluated LOD: Limit of Detection			

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-จัดทำเอกสารวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม โดยการตรวจวิเคราะห์ยีน *CaMV 35S promoter* NOS terminator และ endogenous gene (*HMG*) ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

-ขยายผลการใช้ประโยชน์งานวิจัย โดยอบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้กับเจ้าหน้าที่ทดสอบของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม และขยายขอบข่ายการทดสอบ เข้าสู่ระบบ ISO/IEC17025:2005

11.คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12.เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์. 2543. ความพร้อมและหลักการตรวจสอบพืชที่ได้รับการตัดแต่งสารพันธุกรรมของห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร. หน้า 21-26. ใน : การบรรยายเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงสารพันธุกรรม (GMOs Testing). วันอังคารที่ 6 มิถุนายน 2543. ณ ห้องประชุมกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Alary, R., A. Serin, D. Maury and P. Joudrier. 2003. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. Food control. 13:235-244.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol Rep 9: 208-218
- Broeders, S., I. Huber, L. Grohamann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens and D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends in Food Science and Technology 37:115-126.
- Cankar, K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of GMO. BMC Biotechnology. 15pp.
- Cottent, G., C. Blancpain, V. Sonnard and P. F. Chuah. 2013. Development and validation of multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. Anal Bioanal Chem. 405:6831-6844.
- Debode, F., E. Janssen and G. Berben. 2013. Developement of 10 new screening PCR assays for GMo detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminator (t35S, tE9, tOCS, tg7). Eur Food Res Technol. 236:659-669.

- Ellison, S.L.R., C. A. English, M. J. Burns and J. T. Keer. 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. BMC Biotechnology. 11 pp.
- Federal office of consumer protection and food safety. 2016. Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods.15pp.
- Fraiture, M-A., P. Herman, I. Taverniers, M. DeLoose, D. Deforce and N. H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International 22pp.
- Huber, I., A. Block, D. Sebah and et al.2013. Development and validation of duplex, triplex and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. Journal of Agricultural and food chemistry. 61:10293-1301.
- ISAAA 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No.52. ISAAA: Ithaca, NY.
- 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.
- Johansson M.K. (2006) Choosing Reporter-Quencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers. In: Didenko V.V. (eds) Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Methods in Molecular Biology™, vol 335. Humana Press
- JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011. JRC- Compendium of reference methods for GMO analysis. Luxembourg: Publication office of the European Union. 259 p. (http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/22754/1/gmo-jrc_reference%20report_2011_publ.pdf)
- Lab Life-Real-Time PCR. 2015. Compare and contrast: multiplex vs. singleplex PCR. Roche Life Science. Posted on September 19,2015.https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html

- Madic, J., C. Peytavin de Garam, N. Vingadassalon, E. Oswald, P. Fach, E. Jamet and F. Auvray. 2010. Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) fliC alleles and intimin (eae) variants associated with enterohaemorrhagic EHEC serotype O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:JH28 and O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 109(5):1696-1705.
- Mayer M. 1999. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food. *Food Control*. 10 :391-399.
- Mazzara M., Savini C., Munaro B., Foti N. and Van Den E.G. 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.
- Peng, C., P. Wang, X. Xu, X. Wang, W. Wei, X. Chen and J. Xu. 2016. Development of qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms. *Springer Plus*. 5:889.
- Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chemical Review* 98:1045-1056.
- Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 5:69-76.
- Savini C., Bogni A., Grazioli E., Munaro B., Mazzara M. and Van Den E.G. 2008. Event-specific method for the quantification of maize line Mon 89034 using Real-time PCR. EUR 23700 EN. Luxembourg: OPOCE, *In* Compendium of reference methods for GMO analysis 2010
- Waiblinger, H. U., B. Ernst, A. Anderson and K. Pietsch. 2008. Validation and collaborative study of a P35S and T nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organism in food product. *Eur Food Res Technol*. 226:1221-1228.
- Turkec, A., H. Kazan, B. Karacanli and S. J. Lucas. 2015. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modified organism (GMOs) in maize food and feed products. *J Food Sci Technol*. 52(8): 5164-5171.