รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้าเกษตร

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : วิจัยพัฒนาการตรวจ GM construct specific เพื่อการจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of GM construct specific detection method to identify GM papaya variety

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นายธีระ ชูแก้ว สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

นับตั้งแต่ปี 2555 เป็นต้นมา มะละกอผลสดส่งออกของไทยสู่สหภาพยุโรปได้รับการแจ้งเตือนว่ามีการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาติหลายครั้งและมีการตรวจพบการปนเปื้อนในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตร เช่น ในประเทศญี่ปุ่น เป็นผลให้คณะตรวจติดตามของ FVO จากสหภาพยุโรปเดินทางมาตรวจประเมินปัญหาการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อพิจารณาหากจะต้องระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากประเทศไทย หากสินค้าถูกตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนจะถูกตีกลับหรือทำลายและไม่สามารถเข้าวางขายในประเทศนั้นๆได้ อย่างไรก็ดีในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจนและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ตรวจพบปนเปื้อนในการส่งออกที่ดำเนินการทดสอบความใช้ได้แล้ว โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์แบบ Screening test เท่านั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาติและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus เมื่อทดสอบความใช้ได้แล้วพบว่ามีค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-

Chiengmai 2 อยู่ที่ 10 copies/µl (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พบว่า ค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า R^2 ≥ 0.98 เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น และสามารถทดสอบเชิงปริมาณได้ โดยมีค่า % Bias ที่ 9.94% วิธีการทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS จะช่วยยกระดับการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการและช่วยป้องกันการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในการส่งออกและการปลูกภายในประเทศได้

6. คำนำ

ทั้งนี้ตั้งแต่ปี 2555 เป็นต้นมา มะละกอผลสดส่งออกของไทยสู่สหภาพยุโรปได้รับการแจ้งเตือนจากระบบ RASFF ของสหภาพยุโรปว่ามีการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาติ ถึง 37 ครั้ง (Reference no. 2012.BBD, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) of European Commission, 14 May, 2012) และมีการตรวจพบการปนเปื้อนในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตรในประเทศญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของมะละกอซึ่งส่งออกจากไทยไปญี่ปุ่นจึงจะต้องถูกสุ่มตรวจ 100% ทุกเที่ยว

เป็นผลให้คณะตรวจติดตามของ FVO จากสหภาพยุโรปเดินทางมาตรวจประเมินปัญหาการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในมะละกอผลสดส่งออกจากไทยเพื่อพิจารณาหากจะต้องระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากประเทศไทยหากสถานการณ์ยังไม่ดีขึ้นและนอกจากมะละกอผลสดแล้วยังเกิดปัญหาการตรวจพบผลิตภัณฑ์ซึ่งมีส่วนผสมของมะละกอปนเปื้อน GM event ในประเทศผู้นำเข้ามะละกอซึ่งเข้มงวดในเรื่องการปนเปื้อนของยีนดัดแปลงพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเกษตรซึ่งนำเข้าสู่ญี่ปุ่นเป็นต้น โดยหากสินค้าที่ออกถูกตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนจะถูกตีกลับหรือทำลายและไม่สามารถผ่านด่านตรวจสินค้าเพื่อเข้าวางขายในประเทศนั้นๆได้ ความเสียหายที่เกิดขึ้นมีมูลค่าหลายล้านบาทต่อปี ทำให้ผู้ประกอบการหลายรายจำเป็นต้องหยุดส่งออกมะละกอเพื่อตัดปัญหาต้นทุนจากระบบควบคุมคุณภาพที่สูงเกินไป และหากทางสหภาพยุโรประงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากไทยอีกจะเกิดผลกระทบในวงกว้างเนื่องด้วยประเทศอื่นๆอาจจะระงับการนำเข้ามะละกอผลสดจากไทยตามยุโรปด้วยซึ่งจะทำให้ ธุรกิจส่งออกมะละกอของประเทศไทยประสบปัญหาขั้นรุนแรงได้

อนึ่งการส่งออกสินค้าดัดแปรพันธุกรรมไปยังประเทศต่างๆ ต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของแต่ละประเทศหรือทวีปในการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมสูประเทศนั้นๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่น การนำเข้าสินค้าซึ่งประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมจะต้องปฏิบัติตามกฎหมายการประเมินความเสี่ยงของอาหารที่ผลิตจากหรือมีส่วนผสมของสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม ลงวันที่ 1 เมษายน 2544 (Kosuke *et al.*, 2014) และสหภาพยุโรป ต้องปฏิบัติตามระเบียบ 2001/18/EC ในการลงทะเบียนสินค้า GMOs (Directive 2001/18/EC on the deliberate release of GMOs into the environment) เป็นต้น

ทั้งนี้หลังจากการตรวจติดตามของคณะ FVO จากสหภาพยุโรป คณะผู้แทนถาวรแห่งสหภาพยุโรปประจำประเทศไทยได้สนับสนุนการฝึกอบรมโดยผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจวิเคราะห์สินค้าดัดแปรพันธุกรรม และมีการร่างแผนการปฏิบัติงานเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวซึ่งเป็นที่มาของงานวิจัยในเรื่องการตรวจวิเคราะห์หาเอกลักษณ์และสืบหาที่มาของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนอยู่ในสินค้าส่งออกและในสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย

หลักการตรวจวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของ GMOs โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและสินค้าเกษตรที่มีความเสี่ยงนั้นวางอยู่บนพื้นฐานการตรวจ 2 หลักการใหญ่คือ การตรวจหาโปรตีน Marker เช่นโปรตีนที่ผลิตจาก Antibiotic resistance ยีนซึ่งใช้ในการดัดแปรพันธุกรรมและการตรวจหารหัสพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงของสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี PCR หรือ Real-time PCR โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 1.การตรวจ Screening เพื่อสืบหา GM Element specific (DNA) ในตัวอย่าง เช่น GM Promoter หรือ GM Terminator ซึ่งไม่ได้มีอยู่ตามธรรมชาติของตัวอย่างนั้นๆ 2.การตรวจโครงสร้างของ Insert gene และ GM element ที่อยู่ในจีโนมของตัวอย่าง (GM construct) ซึ่งช่วยให้สามารถระบุแหล่งที่มาของ GMOs ชนิดนั้นได้ว่าใครเป็นผู้ผลิตขึ้น 3.การตรวจ Event specific เป็นการตรวจระบุที่จำเพาะเจาะจงมากที่สุดซึ่งสามารถระบุแหล่งที่มาของ GMOs และตำแหน่งที่ตั้งของ GM construct บนจีโนม อย่างไรก็ดีการตรวจวิธีนี้ถึงแม้จะละเอียดมากที่สุด แต่เทคโนโลยีในปัจจุบันก้าวหน้าไปมากมีการถ่าย GM construct ชนิดเดียวกันเข้าไปในพืชหลากหลายชนิดซึ่ง GM construct นั้นๆ เข้าไปอยู่ในจีโนมแบบสุ่มดังนั้นการตรวจโดยวิธี Event specific อาจตรวจไม่พบหากมีการเปลี่ยนชนิดพืชและไม่ใช่พืชตั้งต้นที่ใช้ผลิต GMOs หรือเกิดการกลายตามธรรมชาติ การตรวจแบบ Event specific จึงเหมาะสมสำหรับการระบุสายพันธุ์แบบจำเพาะเจาะจงของผู้ผลิต GMOs มากกว่าที่จะใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการจึงเป็นการตรวจวิเคราะห์โดยการตรวจแบบ Screening และ GM construct เพื่อที่จะสามารถยืนว่าตัวอย่างนั้นปนเปื้อน GMOs รวมทั้งสามารถระบุที่มาได้อีกด้วย

การวิเคราะห์ผลการตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี Matrix approach จากการตรวจวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมยีน CP (ข้อมูลงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผชช.ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) พบว่ามีการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ในตัวอย่างที่ได้จากการสุ่ม นอกจากนี้จากการที่ประเทศญี่ปุ่นตรวจพบการปนเปื้อนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์แปรรูปส่งออกจากไทย กระทรวงสาธารณสุขของญี่ปุ่นได้ตรวจพบ GM Construct specific ชนิด PRSV-SC และได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Construct specific เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของมะละกอ GM ชนิด PRSV-SC ที่ตรวจพบใน ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากประเทศไทย (Kosuke *et al.*, 2014) นอกจากนี้ทางญี่ปุ่นยังใช้วิธีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบเดียวกันในการพัฒนาวิธีการตรวจหา การปนเปื้อนของมะละกอ GM ชนิด PRSV-YK ซึ่งเป็นของไต้หวัน (Kosuke *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจของญี่ปุ่นยังเป็นวิธีที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากปริมาณตัวอย่างที่ใช้มีจำกัดและได้มาจากมะละกอซึ่งแปรรูปแล้วอยู่ในผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจทำให้

DNA ที่ใช้ในการทดลองไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอและไม่มีการใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานเป็นเพียงการนำตัวอย่าง Positive มาวิเคราะห์เนื่องจากในมะละกอยังไม่มีการผลิตวัสดุอ้างอิงเชิงการค้าและไม่มีการ Validate วิธีการตรวจวิเคราะห์ การนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีมาตรฐานจึงทำได้ยาก

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านการแปลรหัสสายพันธุกรรมมีความก้าวหน้าไปมากเช่นระบบ NGS หรือ Next Generation Sequencing ทำให้สามารถสร้าง Genomic profiling ได้ง่ายขึ้นและด้วยความรวดเร็วกว่าในอดีตมาก เพราะในปัจจุบันเราสามารถถอดรหัส Genome ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆได้ภายในเวลาไม่ถึง 5 วัน และถ้าขนาดของ Genome ไม่ใหญ่มากก็สามารถทำได้ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงด้วยงบประมาณที่ถูกลงกว่าในอดีต (Alisa W. *et al*., 2012) นอกจากระบบ NGS จะเข้ามาปฏิวัติการศึกษาด้าน Genomic แล้วห้องปฏิบัติการอ้างอิงในสหภาพยุโรปเริ่มมีการนำระบบ NGS มาใช้ในการสืบหา Unapproved GM product หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน GMOs ที่ไม่ได้รับการอนุญาติเพื่อใช้ในการสืบหา GM Construct ที่มีหลากหลายชนิดและมากขึ้นเรื่อยๆ (UGMMONITOR project: Development of a molecular biology platform and a database (safety assessment) to detect unauthorized GMOs in the European food/feed chain)

ในการทดลองนี้จะเป็นการนำตัวอย่างมะละกอที่รวบรวมได้จากโครงการเฝ้าระวังการปนเปื้อน GMOs และยืนยันเบื้องต้นจากการตรวจ Screening ว่าเป็น GMOs (ข้อมูลงานวิจัยและตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จาก ผชช.ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์) มาใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ GM Construct specific โดยวิธีการวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมแบบ Real-time PCR เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ GM Papaya Construct specific และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งแบบ Qualitative และ Quantitative ที่ตรวจพบจากการส่งออกมะละกอของไทยประเทศไทย

นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้จะช่วยให้ภาครัฐสามารถระบุที่มาของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ปนเปื้อนในสินค้าส่งออกและในสิ่งแวดล้อมได้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นช่วยแก้ปัญหาการส่งออก และสามารถระบุได้ว่าเป็นการหลุดออกสู่ธรรมชาติโดยความผิดพลาดของสถาบันวิจัยหรือเป็นการลักลอบนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศมาปลูกซึ่งจะช่วยให้สามารถบังคับใช้กฎหมายได้ง่ายขึ้น

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ในสภาพจริง Roche Applied Science LightCycler 480

7.1.2 เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (GeneAmp PCR System 9700)

7.1.3 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Gel-electrophoresis

7.1.4 Vortex mixer

7.1.5 Water bath

7.1.6 เครื่องปั่นตกตะกอน Centrifuge

7.1.7 เครื่องวัดปริมาณ DNA GeneQuant II RNA/DNA

7.1.8 UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ

7.2 วิธีการ

7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอมะละกอด้วยวิธี Cell breaking

ดำเนินการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอมะละกอโดยวิธี Cell breaking หรือสกัดโดยชุดสกัด DNeasy mericon Food Kit โดยชั่งตัวอย่างหนัก 0.2-0.25 กรัม ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลูกปืนสเตนเลส ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้วลงไปในหลอด จำนวน 3 เม็ด เติม Homogenization buffer(Solution I buffer) (ที่เติม ß-mercaptoethanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้บัฟเฟอร์เข้ากับตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการใส่ทิวป์เข้ากับช่องใส่ทิวป์ของเครื่องตี ตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเปิดให้เครื่องทำงาน จำนวน 5 รอบ (ใช้เวลานาน 1 นาที ต่อรอบ) เติมLysis buffer (Solution II buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรพลิกหลอดไปมาให้สารละลาย ผสมกันนำไปบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Precipitation buffer (Solution III buffer) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Isopropanol (1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000rpm นาน 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งไป เติม 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไปแล้วเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกไป ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง GeneQuant IIRNA/DNA

7.2.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gene Scan การผสมตัวอย่างมะละกอ GM และ Non-GM เพื่อทดสอบความใช้ได้เชิงคุณภาพและปริมาณ

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai 2 และ ใบมะละกอ Non-GM โดยบดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วตักใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 200 mg สกัดดีเอ็นด้วยวิธี Gene Scan (Rogers *et al.*1985) โดย เติม Lysis buffer และ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่บรรจุตัวอย่างไว้แล้ว 200 mg (2 ซ้ำ) โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อ Lysis buffer และ Proteinase K ดังนี้

ตารางที่ 1. แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณตัวอย่างต่อการใช้ Buffer

Test portion	Lysis buffer (มิลลิลิตร)	Proteinase K (ไมโครลิตร)
0.1-0.3 กรัม	0.80 - 1.30	20

จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 2 ชั่วโมง วางหลอดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ปิเปตส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: Isoamyl (อัตราส่วน 24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ปิเปตได้ เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ปิเปตของเหลวที่อยู่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดใหม่

เติม 100% Isopropanal ที่แช่เย็นไว้จำนวน 2 ใน 3 ของปริมาตรของเหลวที่ปิเปตได้เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปแช่ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10นาที เท Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Wizard™ minicolumn โดยเติม Miniprep DNA Purification Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) ติดกับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Miniprep DNA Purification Resin จากข้อ 4.4.1 ลงในsyringe ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.2 หลังจากนั้นใช้ Plunge ค่อยดันสารละลายลงจนหมด ดีเอ็นเอจะเกาะติดกับ Silica ใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของเหลวนั้นไปเติม 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตรเพื่อล้างดีเอ็นเอ 1 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม 80% Isopropanol ให้ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn ก่อน

แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติด Syringe กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอด Syringe ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (อุ่น) นึ่งฆ่าลงใน Minicolumn จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

นำ GM และ Non-GM Genomic DNA ที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ ความเข้มข้น 40 ng/µl เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.* 1991) สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/µl (Arumuganathan K. *et al.*1991) ได้ดังนี้

(ความเข้มข้น DNA (ng/µl) X 1,000) / papaya haploid genome (in pg)

= (40X1,000) / 0.39

≈ 102,564 Copies/µl

นำ Stock Genomic DNA GM ไปเจือจางด้วย Non-GM Genomic DNA จนได้ความเข้มข้น GM genome copies 100 Copies/µl จากนั้นนำ DNA Genomic GM (100 Copies/µl) และ Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาตรเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2. แสดงขั้นตอนการผสม GM และ Non-GM Genomic DNA
เพื่อเตรียมทดสอบ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5	Dilution 6
Volume used GM genomic DNA (ul)	**40.00**	**20.00**	**10.00**	**4.00**	**5.00**	**5.00**
Volume used Non-GM genomic DNA (ul)	**60.00**	**80.00**	**90.00**	**96.00**	**95.00**	**95.00**
Total	100	100	100	100	100	100
	ดูด GM DNA จาก 100 copies/ul	ดูด GM DNA จาก 100 copies/ul	ดูด GM DNA จาก 100 copies/ul	ดูด GM DNA จาก 100 copies/ul	ดูด GM DNA จาก 40 copies/ul	ดูด GM DNA จาก 20 copies/ul
Final GM concentration	40 copies/ul	20 copies/ul	10 copies/ul	4 copies/ul	2 copies/ul	1 copies/ul
GM Genome Copies number	200	100	50	20	10	5

(in 20 ul mix)						
Total Genome Copies number (in 20 ul mix)	307,892	410,356	461,588	492,328	487,190	487,185
% Contamination ((GM Genome/Total Genome)X100)	0.065	0.0244	0.01	0.0041	0.00205	0.00103

7.2.3 การทำปฏิกิริยา PCR Screening test และ PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

การทำปฏิกิริยา PCR Screening test ดำเนินการโดยใช้ GoTaq® Green Master Mix ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3. แสดงขั้นตอนการเตียม Master-mix สำหรับ Screening test PCR

Combination	Final concentration	Volume (µL)
GoTaq® Green Master Mix, 2X	2X	12.5 µL
10 pmol/ul forward primer	500 nM	1.25 µL
10 pmol/ul reverse primer	500 nM	1.25 µL
DNA template	50 ng	NA
Nuclease-Free Water to		เติมจนได้ปริมาตร 25 µL
Total volume		25

ดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4. แสดง program การทำ Screening test PCR

Step	Temperature	Time
1st Denaturation	95°C	2 min
Denaturation	95°C	30 sec
Binding	45-60 °C	30 sec
Extension	72°C	30 sec - 1 min
Cooling	4°C	10 min

X 35 Cycles

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมด้วยคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R ขนาด 1,164 bp ดำเนินการโดยใช้ Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase ตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 5. แสดงการเตรียม Master-mix เพื่อการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

Combination	Final concentration	Volume (µL)
5X Phusion HF or GC Buffer	1X	4 µL
10 mM dNTPs	200 µM	0.4 µl
10 pmol/ul forward primer	500 nM	1 µL
10 pmol/ul reverse primer	500 nM	1 µL
DNA template	50 ng	NA
Phusion DNA Polymerase	0.5 units/25	0.2 µL
Nuclease-Free Water to		เติมจนได้ปริมาตร 20 µL
Total volume		20

ดำเนินการทำปฏิกิริยา PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6. แสดงการเตรียม program Phusion® High-Fidelity PCR

Step	Temperature	Time
1^{st} Denaturation	98°C	30 sec
Denaturation	98°C	10 sec
Binding	61 °C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Cooling	4°C	10 min

X 35 Cycles

7.2.4 การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method โดยวิธี Real-time PCR

ดำเนินการสกัดดีเอ็นใบมะละกอ GM 4 ตัวอย่างเพื่อทดสอบ Construct specific detection method ที่ออกแบบเบื้องต้นด้วยวิธี Real-time PCR ปรับความเข้มข้น DNA ให้เป็น 20 ng/µl แล้วเตรียม Real-time PCR Master-mix ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7. แสดงการเตรียม Master Mix การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS

detection method โดยวิธี Real-time PCR

Combination	Final concentration	Volume (μL)
LightCycler probe master	1X	10 μL
10 mM dNTPs	200 μM	0.4 µl
10 pmol/ul forward primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ul reverse primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ul probe	250 nM	0.5 μL
DNA template (40 ng/μl)	50 ng	5 μL
Nuclease-Free Water to		3.5 μL
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 8. แสดงการเตรียม Real-time PCR program
สำหรับ Construct specific 35S-CM2-NOS detection

Step	Temperature	Time
1st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45 Cycles

7.2.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method และปริมาณต่ำสุดที่ วิธีการตรวจวิเคราะห์จะตรวจพบสำเนาของจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiengmai 2

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR โดย ดูด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว Dilution 1-6 Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 4 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 16 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 9. แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR

Construct specific 35S-CM2-NOS detection validation

Combination	Final concentration	Volume (µL)
LightCycler probe master	1X	10 µL
10 mM dNTPs	200 µM	0.4 µl
10 pmol/ul forward primer	250 nM	0.5 µL
10 pmol/ul reverse primer	250 nM	0.5 µL
10 pmol/ul probe	250 nM	0.5 µL
DNA template (40 ng/µl)	200 ng	5 µL
Nuclease-Free Water to		3.5 µL
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 10. แสดง Real-time PCR program สำหรับ

Construct specific 35S-CM2-NOS detection method validation

Step	Temperature	Time
1st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45 Cycles

7.2.6 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai 2 40 ng/µl และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl เป็นBackground DNA เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.*1991) สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/µl (Arumuganathan K. *et al.*1991) ได้ดังนี้

(ความเข้มข้น DNA (ng/µl) X 1,000) / papaya haploid genome (in pg)

= (40X1,000) / 0.39

≈ 102,564 Copies/µl

สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl มี haploid genome (in pg) = 1.13 pg

(ความเข้มข้น DNA (ng/µl) X 1,000) / soybean haploid genome (in pg)

= (100X1,000) / 1.13

≈ 88,496 Copies/µl

นำ DNA Genomic GM และ Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาตรเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 11. แสดงขั้นตอนการผสม GM และ Non-GM Genomic DNA เพื่อเตรียมทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5
Volume used GM genomic DNA (ul)	**15.60**	**8.00**	**8.00**	**8.00**	**4.00**
Volume used Non-GM genomic DNA (ul)	**64.40**	**72.00**	**72.00**	**72.00**	**76.00**
Total (ul)	80	80	80	80	80
GM DNA pipeted	ดูดจาก Stock	ดูดจาก 20kcopies/µl	ดูดจาก 2kcopies/µl	ดูดจาก 200copies/µl	ดูดจาก 200copies/µl
Final concentration GM copies/ul (5 µl)	20,000 copies/ul	2,000 copies/ul	200 copies/ul	20 copies/ul	10 copies/ul
GM Genome Copies number (in 20 ul mix)	100,000	10,000	1,000	100	50
Total Genome Copies number (in 20 ul mix)	456,195	408,230	399,230	398,330	420,404
% Contamination	22%	2.45%	0.25%	0.025%	0.01%

((GM Genome/Total Genome)X100)					

ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR โดย ดูด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว Dilution 1-5 Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 2 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 8 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 12. แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR

Construct specific 35S-CM2-NOS detection validation

Combination	Final concentration	Volume (μL)
LightCycler probe master	1X	10 μL
10 mM dNTPs	200 μM	0.4 μl
10 pmol/ul forward primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ul reverse primer	250 nM	0.5 μL
10 pmol/ul probe	250 nM	0.5 μL
DNA template (40 ng/μl)	200 ng	5 μL
Nuclease-Free Water to		3.5 μL
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 13. แสดง Real-time PCR program สำหรับ

Construct specific 35S-CM2-NOS detection method validation

Step	Temperature	Time
1st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	40°C	10 min

X 45 Cycles

7.2.7 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของยีน Papain

เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai 2
40 ng/µl และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl เป็นBackground DNA เพราะฉะนั้น papaya haploid genome (in pg) = 0.39 pg (Arumuganathan K. *et al.*1991) สามารถคำนวณจำนวน Genome Copie/µl (Arumuganathan K. *et al.*1991) ได้ดังนี้

(ความเข้มข้น DNA (ng/µl) X 1,000) / papaya haploid genome (in pg)

= (40X1,000) / 0.39

≈ 102,564 Copies/µl

สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl มี haploid genome (in pg) = 1.13 pg

(ความเข้มข้น DNA (ng/µl) X 1,000) / soybean haploid genome (in pg)

= (100X1,000) / 1.13

≈ 88,496 Copies/µl

นำ DNA Genomic มะละกอ และ ถั่วเหลือง Non-GM Genomic DNA มาผสมกัน โดยให้มีปริมาตรเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทำ Real-time PCR ในขั้นตอนต่อไป ดังตารางที่ 1.

ตารางที่ 14. แสดงขั้นตอนการผสม DNA มะละกอ และ ถั่วเหลือง Non-GM Genomic DNA เพื่อเตรียมทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างของยีน Papain

	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4	Dilution 5
Volume used papaya genomic DNA (µl)	**15.60**	**8.00**	**8.00**	**8.00**	**4.00**
Volume used Soy Non-GM genomic DNA (µl)	**64.40**	**72.00**	**72.00**	**72.00**	**76.00**
Total (µl)	80	80	80	80	80
Papaya DNA pipeted	ดูดจาก Stock	ดูดจาก 20kcopies/µl	ดูดจาก 2kcopies/µl	ดูดจาก 200copies/µl	ดูดจาก 200copies/µl

Final concentration Papaya genome copies/ µl (5 µl)	20,000 copies/ µl	2,000 copies/µl	200 copies/ µl	20 copies/ µl	10 copies/ µl
Papaya Genome Copies number (in 20 µl mix)	100,000	10,000	1,000	100	50
Total Genome Copies number (in 20 µl mix)	456,195	408,230	399,230	398,330	420,404
% Papaya genome DNA ((Papaya Genome/Total Genome)X100)	22%	2.45%	0.25%	0.025%	0.01%

ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหายีน Papain ของ Wei J. *et* al. 2016 โดย ดูด DNA จาก Stock ที่ผสมแล้ว 5 Dilution Dilution ละ 4 ซ้ำ ดำเนินการทำ Real-time PCR 2 รอบ รวมทั้งหมด Dilution ละ 8 ซ้ำ โดยใช้ส่วนผสมสำหรับ Real-time PCR ดังตารางที่ 2.

ตารางที่ 15. แสดงการเตรียม Master-mix สำหรับ real-time PCR

Papain detection

Combination	**Final concentration**	**Volume (µL) (1x)**
Sterile water		3.5
LightCycler probe master	1x	10
10 µmol/µl forward primer	0.25 µmol/µl	0.5
10 µmol/µl reverse primer	0.25 µmol/µl	0.5
10 µmol/µl probe	0.25 µmol/µl	0.5
DNA template (40 ng/µl)	200 ng	5
Total volume		20

จากนั้นจึงดำเนินการ Run Real-time PCR โดยโปรแกรม ตารางที่ 16.

ตารางที่ 16. แสดง Real-time PCR program สำหรับ

Papain detection method

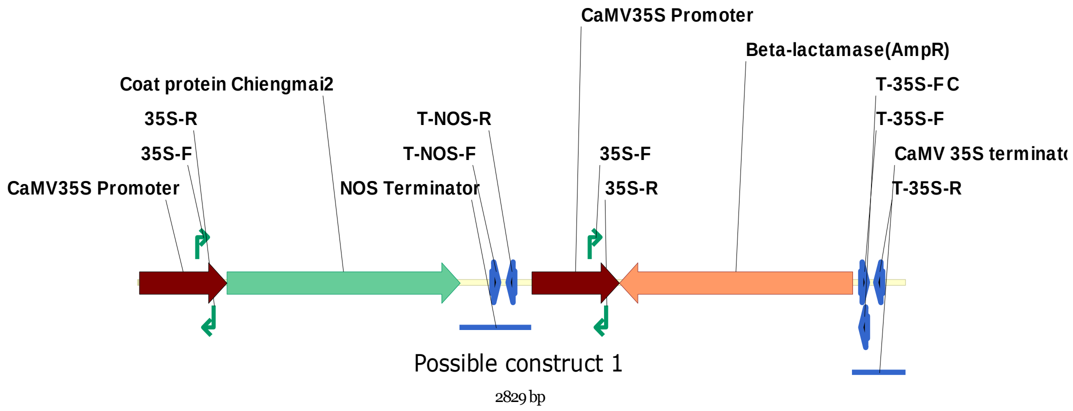
Step	Temperature	Time
1st Denaturation	95°C	15 min
Denaturation	95°C	15 sec
Binding&Extension	60°C	1 min
Cooling	4°C	10 min

X 45 Cycles

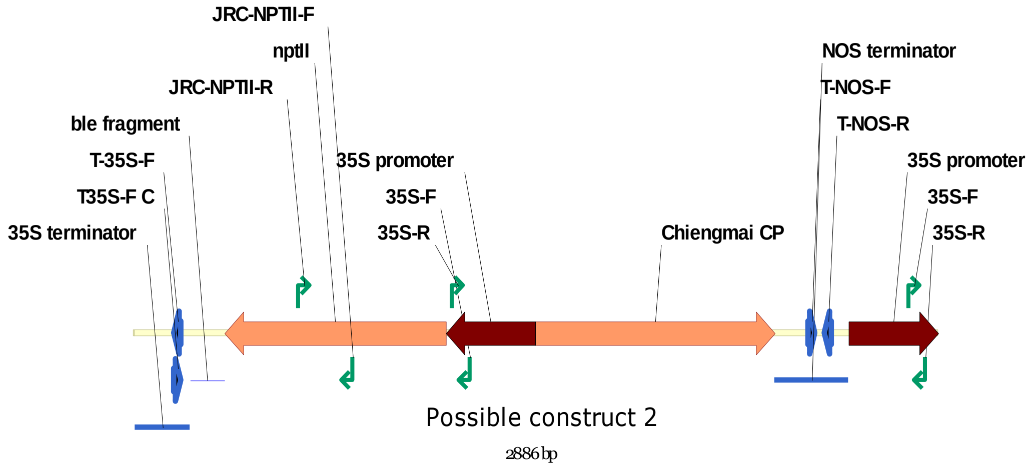
8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

8.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูล ชิ้นส่วนและโครงสร้างของรหัสพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าในมะละกอ GMOs

จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลต่างๆ สามารถตั้งสมมุติฐานโครงสร้างของรหัสพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าในมะละกอ GMOs ที่เป็นไปได้ 2 โครงสร้าง (ภาพที่ 1, 2)


CaMV35S Promoter
Beta-lactamase(AmpR)
Coat protein Chiengmai2
T-35S-F C
35S-R
T-NOS-R
T-35S-F
35S-F
T-NOS-F
35S-F
CaMV 35S terminat
CaMV35S Promoter
NOS Terminator
35S-R
T-35S-R
Possible construct 1
2829 bp

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะ GM construct ที่เป็นไปได้แบบที่ 1 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม


JRC-NPTII-F
nptII
NOS terminator
JRC-NPTII-R
T-NOS-F
ble fragment
T-NOS-R
T-35S-F
35S promoter
35S promoter
T35S-F C
35S-F
35S-F
35S terminator
35S-R
Chiengmai CP
35S-R
Possible construct 2
2886 bp

ภาพที่ 2. แสดงลักษณะ GM construct ที่เป็นไปได้แบบที่ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

จากโครงสร้างทางพันธุกรรมที่เป็นไปได้ทั้งสองโครงสร้างนั้นสามารถออกแบบและสังเคราะห์ primer เพื่อใช้ในการนำไปถอดรหัสสายพันธุกรรมเพื่อยืนยันรูปแบบโดยละเอียดได้ดังนี้

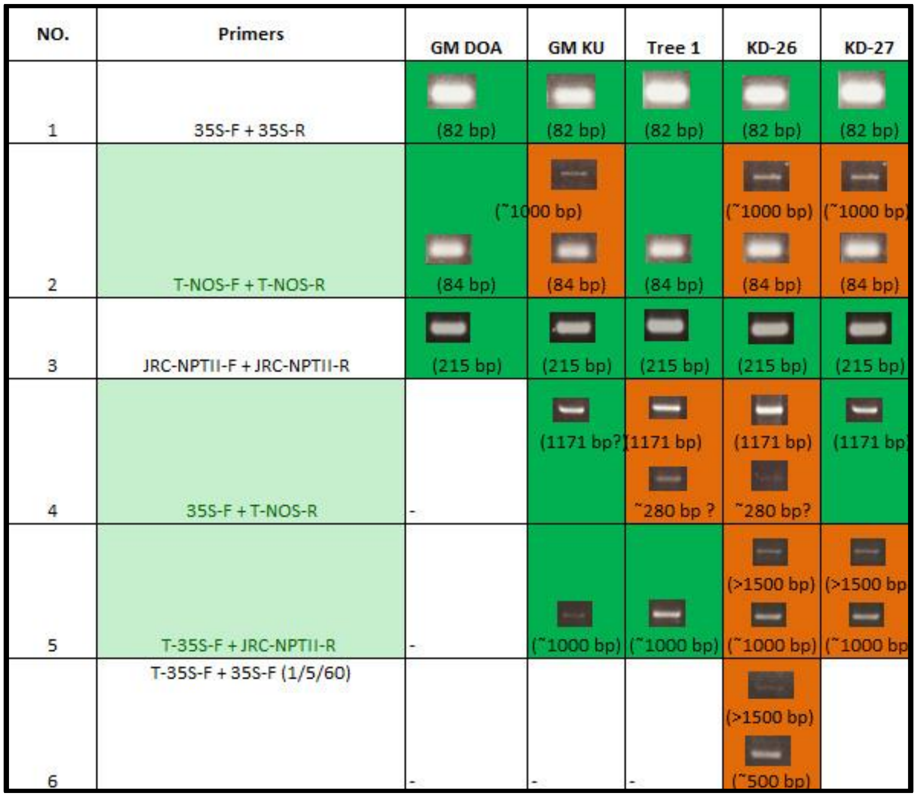
ตารางที่ 17. แสดง Primer และ probe สำหรับตรวจวิเคราะห์ GM elements และใช้สำหรับ GM papaya genome sequencing

Reference	**Name**	**Sequence(5'-3')**
Kosuke N. *et al.* 2014	p324-F	GACATCTCCACTGACGTAAGGG
Kosuke N. *et al.* 2014	p323-R	CTATCRCTCTCTCCAGTTTTTG
Kosuke N. *et al.* 2014	SC-F	CATTTCATTTGGAGAGAACACG
Kosuke N. *et al.* 2014	SC-R	ACCAGCATCCACAGCTTC
Kosuke N. *et al.* 2014	SC-P	(FAM)-ACTCTAGAGGATCCATGTCCAA-(TAMRA)
JRC method(QL-ELE-00-002)	JRC-NPTII-F	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA
JRC method(QL-ELE-00-002)	JRC-NPTII-R	CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC
JRC method(QL-ELE-00-004)	35S-TMP	(FAM)-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-(TAMRA)
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT
JRC method(QL-ELE-00-011)	T-NOS-P	(FAM)-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-(TAMRA)
This study	T-35S-F	ATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGG
This study	T-35S-F_C	CCTTATCTGGGAACTACTCACACAT

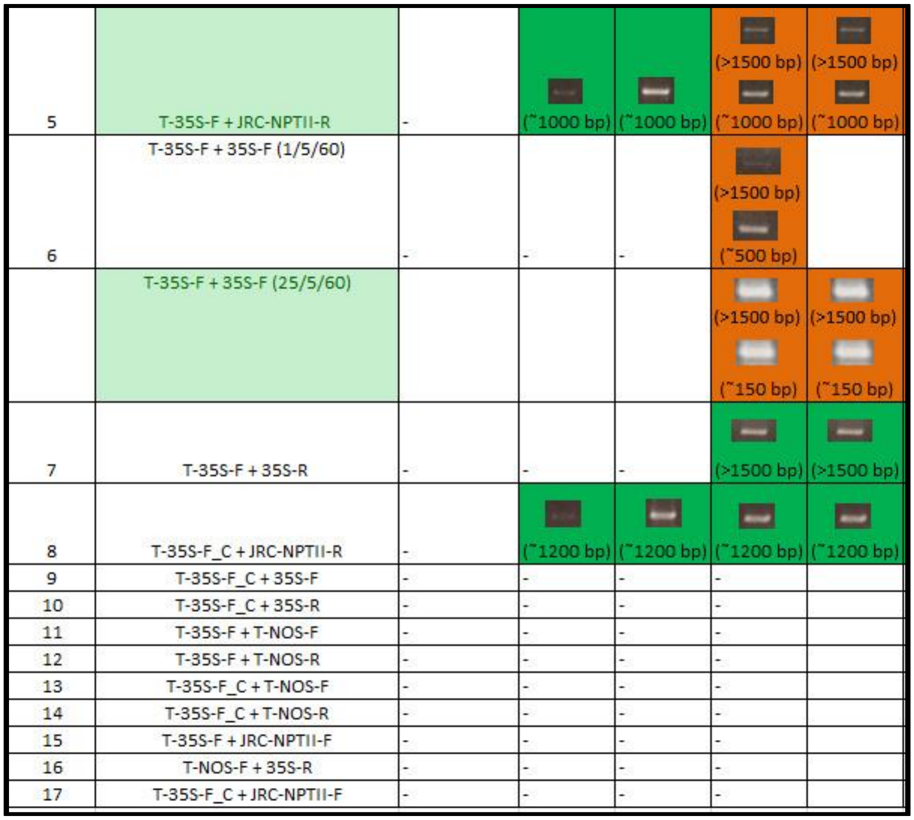
8.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR เพื่อถอดรหัสพันธุกรรม

นำตัวอย่าง Genomic DNA ที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง Positive มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR จาก primer ที่ได้จากการออกแบบตามสมมุติฐาน เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมในตัวอย่างที่ตรวจพบได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 18. แสดงผลของการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR จาก primers ที่ออกแบบตามสมมุติฐานบนตำแหน่งของ GM construct ต่างๆจากตัวอย่าง GM positive 5 ตัวอย่าง



NO.	Primers	GM DOA	GM KU	Tree 1	KD-26	KD-27
1	35S-F + 35S-R	(82 bp)	(82 bp)	(82 bp)	(82 bp)	(82 bp)
2	T-NOS-F + T-NOS-R	(84 bp)	(˜1000 bp) (84 bp)	(84 bp)	(˜1000 bp) (84 bp)	(˜1000 bp (84 bp)
3	JRC-NPTII-F + JRC-NPTII-R	(215 bp)	(215 bp)	(215 bp)	(215 bp)	(215 bp)
4	35S-F + T-NOS-R	-	(1171 bp?	(1171 bp) ˜280 bp ?	(1171 bp) ˜280 bp?	(1171 bp
5	T-35S-F + JRC-NPTII-R	-	(˜1000 bp)	(˜1000 bp)	(>1500 bp) (˜1000 bp)	(>1500 bp (˜1000 bp
6	T-35S-F + 35S-F (1/5/60)	-	-	-	(>1500 bp) (˜500 bp)	



5	T-35S-F + JRC-NPTII-R	-	(~1000 bp)	(~1000 bp)	(>1500 bp) (~1000 bp)	(>1500 bp) (~1000 bp)
6	T-35S-F + 35S-F (1/5/60)	-	-	-	(>1500 bp) (~500 bp)	
	T-35S-F + 35S-F (25/5/60)				(>1500 bp) (~150 bp)	(>1500 bp) (~150 bp)
7	T-35S-F + 35S-R	-	-	-	(>1500 bp)	(>1500 bp)
8	T-35S-F_C + JRC-NPTII-R	-	(~1200 bp)	(~1200 bp)	(~1200 bp)	(~1200 bp)
9	T-35S-F_C + 35S-F	-	-	-	-	
10	T-35S-F_C + 35S-R	-	-	-	-	
11	T-35S-F + T-NOS-F	-	-	-	-	
12	T-35S-F + T-NOS-R	-	-	-	-	
13	T-35S-F_C + T-NOS-F	-	-	-	-	
14	T-35S-F_C + T-NOS-R	-	-	-	-	
15	T-35S-F + JRC-NPTII-F	-	-	-	-	
16	T-NOS-F + 35S-R	-	-	-	-	
17	T-35S-F_C + JRC-NPTII-F	-	-	-	-	

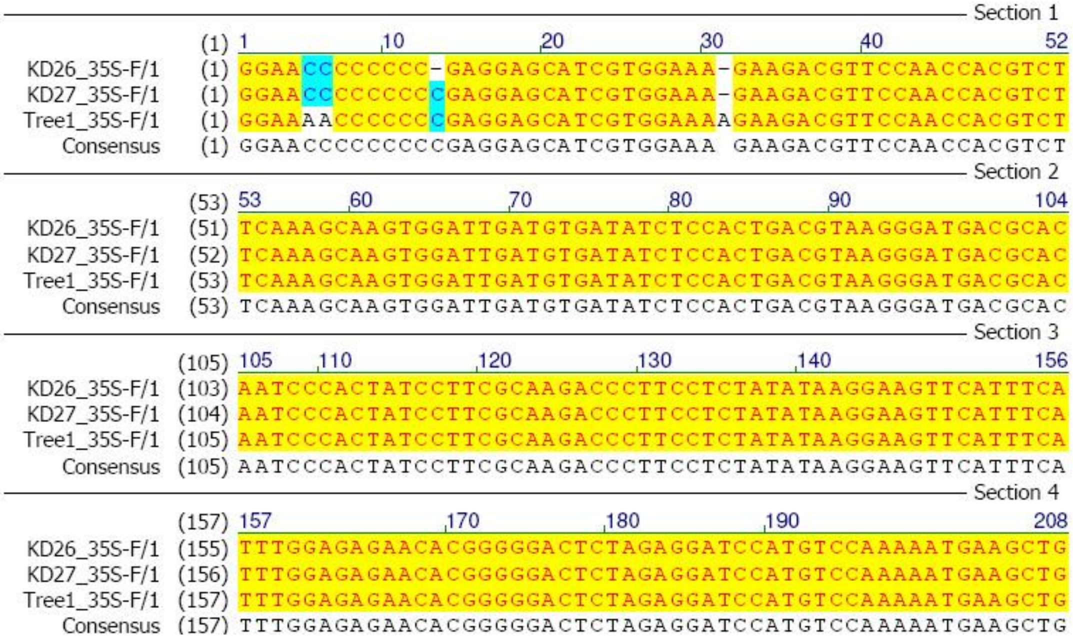
จากผลการทดลองพบว่า มีความแตกต่างของผล PCR ที่ได้จากตัวอย่าง Positive ที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยพบว่าผลการทดลองในส่วนของ GM_DOA มีความแตกต่างจาก GM_Ku, Tree1 และ KD26-27 อย่างเห็นได้ชัดซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า GM_Ku, Tree1 และ KD26-27 เป็นกลุ่ม มะละกอ GM ที่มาจากแหล่งที่คล้ายกัน

นำ PCR Product ที่ได้ จากคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R ไปทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 40 ng/µl จำนวน 12 ตัวอย่าง จากทุกแหล่ง ตัวอย่างละ 50 µl ต่อตัวอย่างเพื่อส่ง sequencing และเตรียมตัวอย่าง Genomic DNA ความเข้มข้น 50 ng/µl จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 µl รวม 5 µg ต่อตัวอย่างเพื่อส่ง Re-sequencing โดยวิธี Next generation sequencing สำหรับ Genomic DNA

8.3 การถอดรหัสพันธุกรรม DNA จากคู่ Primer 35SF และ T-NOS-R

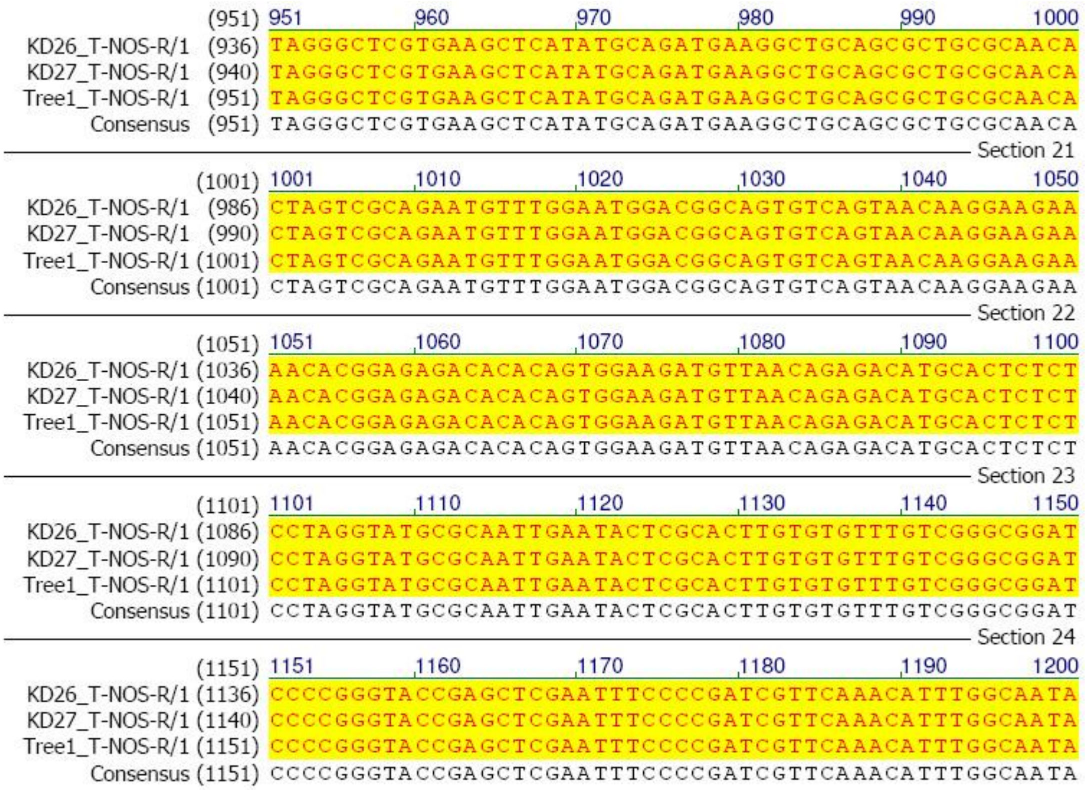
จากผลการทดลองโดยการนำ Primer 35SF และ T-NOS-R ไป Sequencing ในส่วนของตัวอย่าง Tree1 และ KD26, KD27 ซึ่งมาจากพื้นที่ แตกต่างกันได้ข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมดังนี้

ภาพที่ 3. แสดง Partial aligned sequences จาก 35S-F primer (1164 bp)
ของตัวอย่าง GM 3 ตัวอย่าง



```
                                                                         Section 1
                  (1) 1        10        20        30        40         52
KD26_35S-F/1      (1) GGAACCCCCCCC-GAGGAGCATCGTGGAAA-GAAGACGTTCCAACCACGTCT
KD27_35S-F/1      (1) GGAACCCCCCCCCGAGGAGCATCGTGGAAA-GAAGACGTTCCAACCACGTCT
Tree1_35S-F/1     (1) GGAAAACCCCCCCGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCT
Consensus         (1) GGAACCCCCCCCCGAGGAGCATCGTGGAAA GAAGACGTTCCAACCACGTCT
                                                                         Section 2
                 (53) 53     60        70        80        90        104
KD26_35S-F/1     (51) TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC
KD27_35S-F/1     (52) TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC
Tree1_35S-F/1    (53) TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC
Consensus        (53) TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC
                                                                         Section 3
                (105) 105  110       120       130       140            156
KD26_35S-F/1    (103) AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA
KD27_35S-F/1    (104) AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA
Tree1_35S-F/1   (105) AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA
Consensus       (105) AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA
                                                                         Section 4
                (157) 157          170       180       190              208
KD26_35S-F/1    (155) TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG
KD27_35S-F/1    (156) TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG
Tree1_35S-F/1   (157) TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG
Consensus       (157) TTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGTCCAAAAATGAAGCTG
```

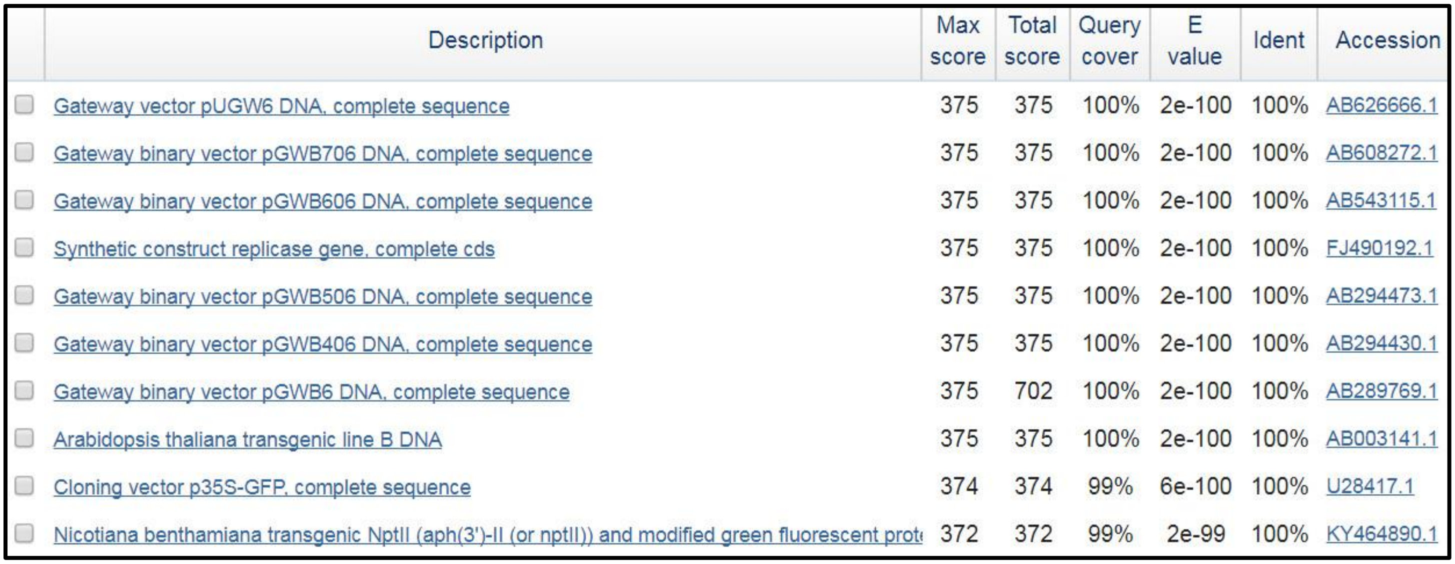
ภาพที่ 4. แสดง Partial aligned sequences จาก T-NOS-R primer (1274 bp) ของตัวอย่าง GM 3 ตัวอย่าง



```
                    (951) 951      960       970       980       990      1000
KD26_T-NOS-R/1      (936) TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA
KD27_T-NOS-R/1      (940) TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA
Tree1_T-NOS-R/1     (951) TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA
Consensus           (951) TAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGCGCAACA
-------------------------------------------------------------------- Section 21
                   (1001) 1001     1010      1020      1030      1040      1050
KD26_T-NOS-R/1      (986) CTAGTCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAA
KD27_T-NOS-R/1      (990) CTAGTCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAA
Tree1_T-NOS-R/1    (1001) CTAGTCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAA
Consensus          (1001) CTAGTCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAA
-------------------------------------------------------------------- Section 22
                   (1051) 1051     1060      1070      1080      1090      1100
KD26_T-NOS-R/1     (1036) AACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT
KD27_T-NOS-R/1     (1040) AACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT
Tree1_T-NOS-R/1    (1051) AACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT
Consensus          (1051) AACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCT
-------------------------------------------------------------------- Section 23
                   (1101) 1101     1110      1120      1130      1140      1150
KD26_T-NOS-R/1     (1086) CCTAGGTATGCGCAATTGAATACTCGCACTTGTGTGTTTGTCGGGCGGAT
KD27_T-NOS-R/1     (1090) CCTAGGTATGCGCAATTGAATACTCGCACTTGTGTGTTTGTCGGGCGGAT
Tree1_T-NOS-R/1    (1101) CCTAGGTATGCGCAATTGAATACTCGCACTTGTGTGTTTGTCGGGCGGAT
Consensus          (1101) CCTAGGTATGCGCAATTGAATACTCGCACTTGTGTGTTTGTCGGGCGGAT
-------------------------------------------------------------------- Section 24
                   (1151) 1151     1160      1170      1180      1190      1200
KD26_T-NOS-R/1     (1136) CCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATA
KD27_T-NOS-R/1     (1140) CCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATA
Tree1_T-NOS-R/1    (1151) CCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATA
Consensus          (1151) CCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATA
```

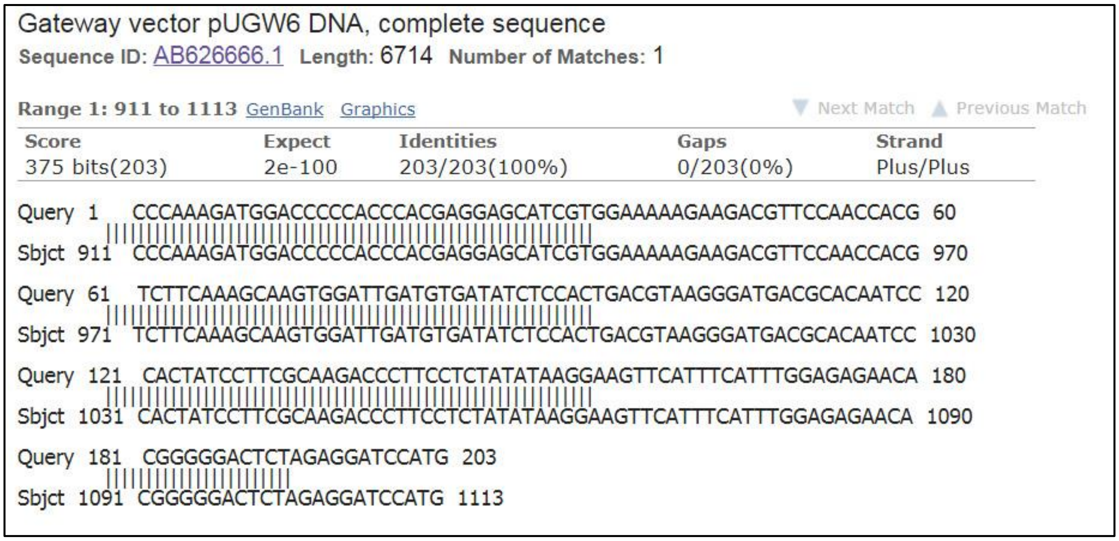
จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างมะละกอ GM ทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะสายรหัสพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ โดยมีความแตกต่างในส่วนต้นของ Promoter CaMV 35S เพียง 1 ตำแหน่งจึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์เดียวกันแม้จะรวบรวมมาจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงนำสายรหัสพันธุกรรมที่ได้มาทำการ Assembly ส่วนที่เหมือนกันได้ขนาด 1,335 bp จากนั้นนำสายรหัสพันธุกรรมที่ได้รับการ Assembly แล้วไป Blast กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ส่วน Upstream ตั้งแต่ 1-203 bp (Figure 5.) ตรงกับ Gateway vector และ Binary Vector หลายชนิด โดย 8 อันดับแรกมีความเหมือน 100% และไม่มีความแตกต่างเมื่อตรวจสอบกับ Blast ทั้งนี้ลำดับที่ 1 คือ Gateway vector pUGW6 Accession number AB62666.1 (Figure 6.) พบว่า ชิ้นรหัสพันธุกรรมดังกล่าวตรงกับตำแหน่งที่ 901 – 1113 bp ของ pUGW6 Accession number AB62666.1 ซึ่งตำแหน่งที่ 258 – 1091 bp ของ pUGW6 คือตำแหน่งของ 35S promoter จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือตำแหน่งของ 35S promoter และชิ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม ของ Gateway vector และ Binary Vector หลายชนิด เช่น pUGW6, pGWB706, pGWB606, pGWB506, pGWB406, pGWB6 เป็นต้น

ภาพที่ 5. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ upstream 1-203 bp sequencing



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Gateway vector pUGW6 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB626666.1
☐	Gateway binary vector pGWB706 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB608272.1
☐	Gateway binary vector pGWB606 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB543115.1
☐	Synthetic construct replicase gene, complete cds	375	375	100%	2e-100	100%	FJ490192.1
☐	Gateway binary vector pGWB506 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB294473.1
☐	Gateway binary vector pGWB406 DNA, complete sequence	375	375	100%	2e-100	100%	AB294430.1
☐	Gateway binary vector pGWB6 DNA, complete sequence	375	702	100%	2e-100	100%	AB289769.1
☐	Arabidopsis thaliana transgenic line B DNA	375	375	100%	2e-100	100%	AB003141.1
☐	Cloning vector p35S-GFP, complete sequence	374	374	99%	6e-100	100%	U28417.1
☐	Nicotiana benthamiana transgenic NptII (aph(3')-II (or nptII)) and modified green fluorescent prot	372	372	99%	2e-99	100%	KY464890.1

ภาพที่ 6. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามีการ match กับ pUGW6.



Gateway vector pUGW6 DNA, complete sequence

Sequence ID: AB626666.1 **Length:** 6714 **Number of Matches:** 1

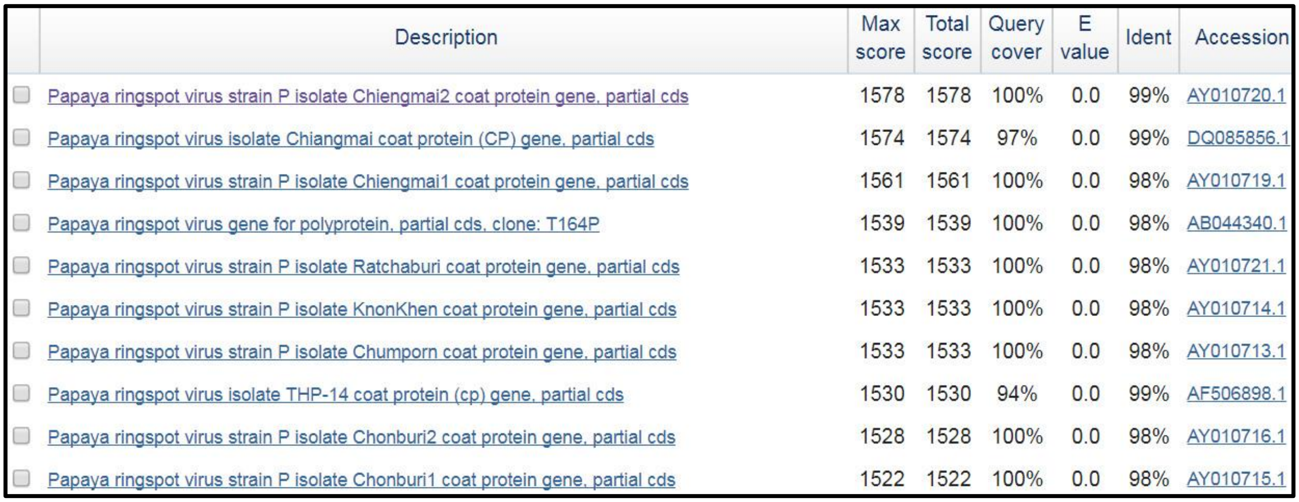
Range 1: 911 to 1113 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	2e-100	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     CCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  911   CCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACG  970

Query  61    TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  971   TCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC  1030

Query  121   CACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1031  CACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACA  1090

Query  181   CGGGGGACTCTAGAGGATCCATG  203
             |||||||||||||||||||||||
Sbjct  1091  CGGGGGACTCTAGAGGATCCATG  1113
```

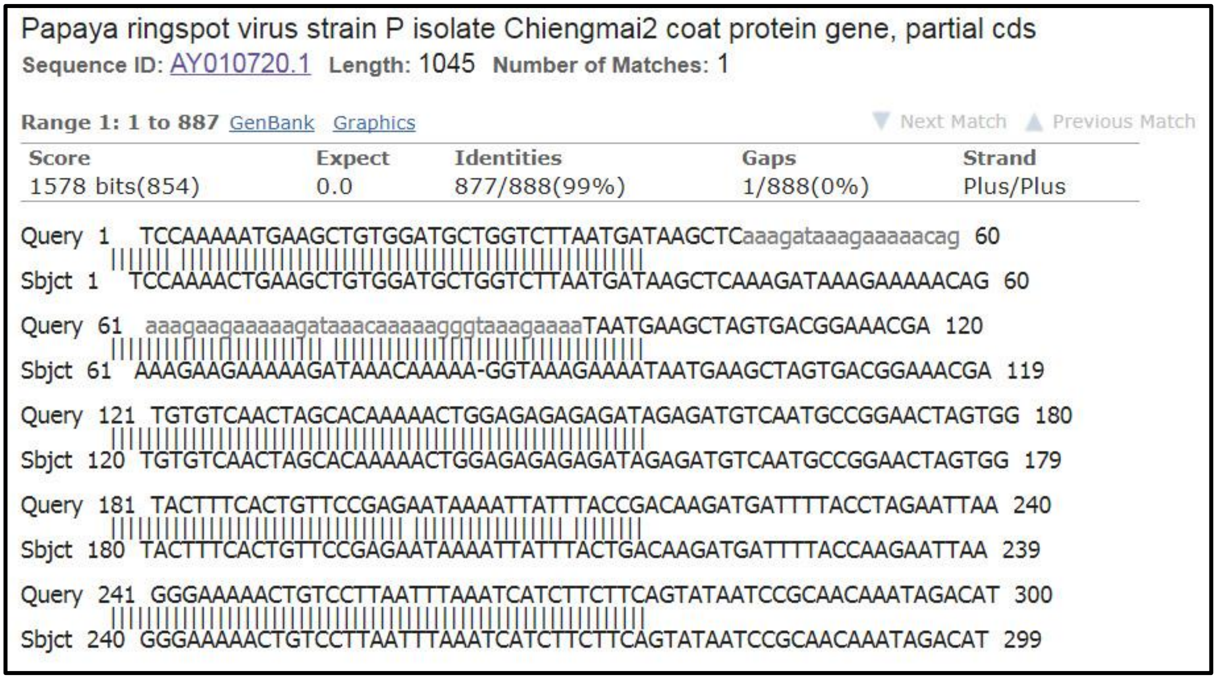
ในส่วนของตำแหน่งที่ 438 – 1,325 bp พบว่าตรงกับ Coat protein ไวรัสด่างจุดวงแหวนของมะละกอ (Papaya ringspot virus) (Figure 7.) โดยมีลักษณะเหมือนกับ Coat protein ของ ไวรัสสายพันธุ์ Chiengmai 2 Accession number AY010720.1 (Figure 8.) มากที่สุดที่ ID 99% โดยมี Gap เพียง 1 Gap และ Query cover เป็น 100% โดยตรงกับตำแหน่งที่ 1 – 887 bp ของยีน ซึ่งยีนมีขนาด 1,045 bp จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือตำแหน่งของ Coat protein ของ ไวรัสสายพันธุ์ Chiengmai 2 Accession number AY010720.1

ภาพที่ 7. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ upstream 438 – 1,352 bp sequencing result.



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Chiengmai2 coat protein gene, partial cds	1578	1578	100%	0.0	99%	AY010720.1
☐	Papaya ringspot virus isolate Chiangmai coat protein (CP) gene, partial cds	1574	1574	97%	0.0	99%	DQ085856.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Chiengmai1 coat protein gene, partial cds	1561	1561	100%	0.0	98%	AY010719.1
☐	Papaya ringspot virus gene for polyprotein, partial cds, clone: T164P	1539	1539	100%	0.0	98%	AB044340.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Ratchaburi coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010721.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate KnonKhen coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010714.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Chumporn coat protein gene, partial cds	1533	1533	100%	0.0	98%	AY010713.1
☐	Papaya ringspot virus isolate THP-14 coat protein (cp) gene, partial cds	1530	1530	94%	0.0	99%	AF506898.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi2 coat protein gene, partial cds	1528	1528	100%	0.0	98%	AY010716.1
☐	Papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi1 coat protein gene, partial cds	1522	1522	100%	0.0	98%	AY010715.1

ภาพที่ 8. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามีการ match กับ
Papaya ringspot virus Chiengmai 2 coat protein



Papaya ringspot virus strain P isolate Chiengmai2 coat protein gene, partial cds

Sequence ID: AY010720.1 **Length:** 1045 **Number of Matches:** 1

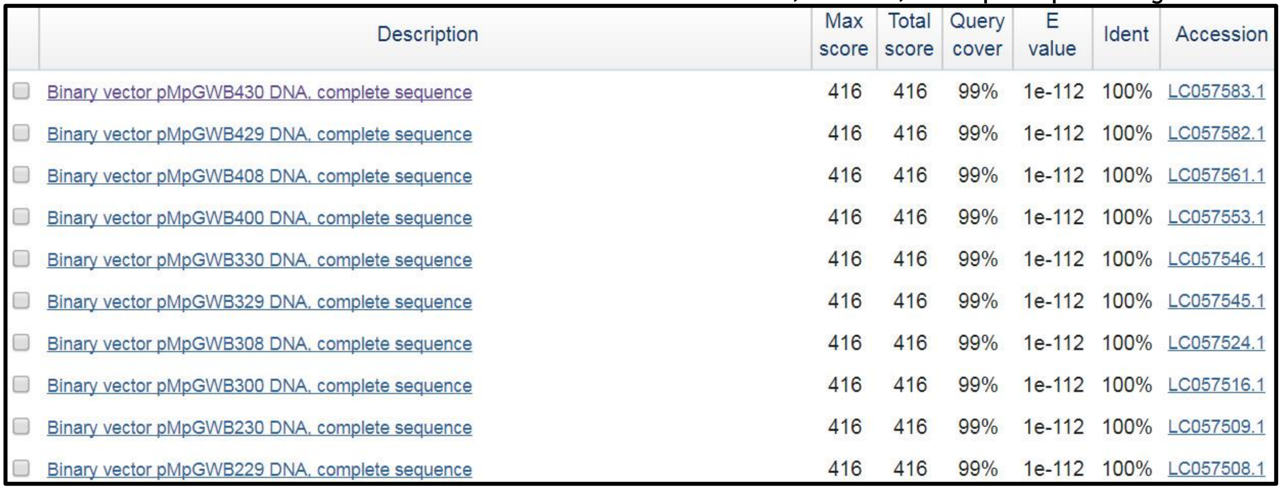
Range 1: 1 to 887 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1578 bits(854)	0.0	877/888(99%)	1/888(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCCAAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCaaagataaagaaaaacag  60
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TCCAAAACTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  60

Query  61   aaagaagaaaaagataaacaaaaagggtaaagaaaaTAATGAAGCTAGTGACGGAAACGA  120
            |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAA-GGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGACGGAAACGA  119

Query  121  TGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAACTAGTGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  120  TGTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAACTAGTGG  179

Query  181  TACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCTAGAATTAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  180  TACTTTCACTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACTGACAAGATGATTTTACCAAGAATTAA  239

Query  241  GGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATAGACAT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  240  GGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATAGACAT  299
```

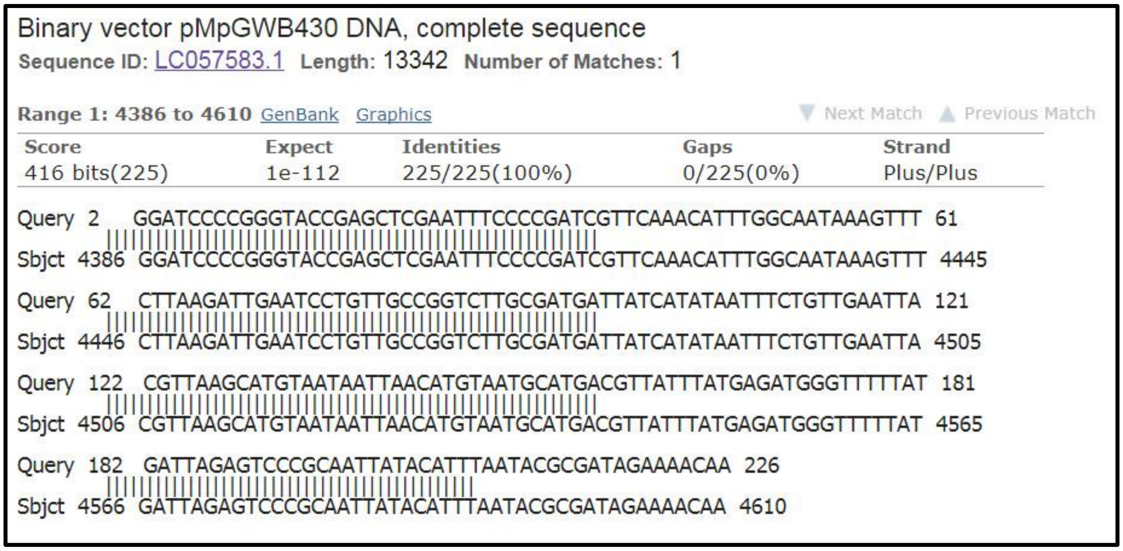
เมื่อนำตำแหน่ง Downstream ของชิ้นพันธุกรรม ตั้งแต่ 1326 – 1511 bp ไป Blast พบว่าตรงกับ Binary Vector หลายชนิด โดย 10 อันดับแรกมีความเหมือน 100% (Figure 9.) ทั้งหมดและไม่มีความแตกต่างเมื่อตรวจสอบกับ Blast ทั้งนี้ลำดับที่ 1 คือ Binary Vector pMpGWB430 Accession number LC057583.1 (Figure 10.) พบว่า ชิ้นรหัสพันธุกรรมดังกล่าวตรงกับตำแหน่งที่ 4386 - 4610 bp ของ pMpGWB430 Accession number LC057583.1 ซึ่งตำแหน่งที่ 4386 - 4610 bp ของ pMpGWB430 คือตำแหน่งของ NOS terminator และชิ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม จึงสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวคือตำแหน่งของ NOS termonator และชิ้นรหัสพันธุกรรมที่ใช้เชื่อม ของ Binary Vector หลายชนิด เช่น pMpGWB430, pMpGWB429, pMpGWB408, pMpGWB400 เป็นต้น

ภาพที่ 9. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ downstream 1,326 – 1,511 bp sequencing



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Binary vector pMpGWB430 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057583.1
☐	Binary vector pMpGWB429 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057582.1
☐	Binary vector pMpGWB408 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057561.1
☐	Binary vector pMpGWB400 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057553.1
☐	Binary vector pMpGWB330 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057546.1
☐	Binary vector pMpGWB329 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057545.1
☐	Binary vector pMpGWB308 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057524.1
☐	Binary vector pMpGWB300 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057516.1
☐	Binary vector pMpGWB230 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057509.1
☐	Binary vector pMpGWB229 DNA, complete sequence	416	416	99%	1e-112	100%	LC057508.1

ภาพที่ 10. แสดงรายชื่อผลการ Blast ของ query ที่พบว่ามีการ match กับ pMpGWB430.



Binary vector pMpGWB430 DNA, complete sequence

Sequence ID: LC057583.1 Length: 13342 Number of Matches: 1

Range 1: 4386 to 4610 GenBank Graphics

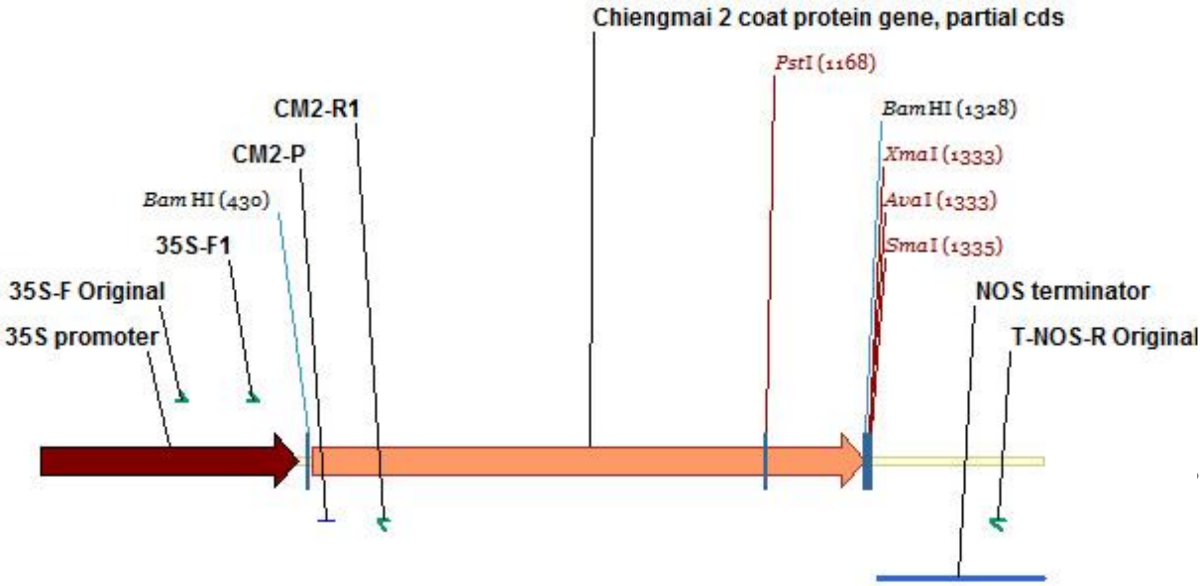
▼ Next Match ▲ Previous Match

```
Score           Expect    Identities       Gaps        Strand
416 bits(225)   1e-112    225/225(100%)    0/225(0%)   Plus/Plus

Query  2     GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTT  61
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4386  GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTT  4445

Query  62    CTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTA  121
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4446  CTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTA  4505

Query  122   CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT  181
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4506  CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT  4565

Query  182   GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAA  226
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4566  GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAA  4610
```

8.4 การร่าง Construct และการออกแบบ Construct specific detection method

จากข้อมูล Sequence และ ข้อมูลการ Blast และการตรวจสอบความถูกต้องกับฐานข้อมูลทั้งหมดสามารถร่าง Construct ของมะละกอ GM ระหว่าง Promoter 35S และ NOS-terminator ที่ถูกต้องได้ดังนี้ (Figure 11)

ภาพที่ 11. Construct ของตัวอย่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการยืนยันแล้ว



Chiengmai 2 coat protein gene, partial cds
PstI (1168)
CM2-R1
BamHI (1328)
CM2-P
XmaI (1333)
Bam HI (430)
AvaI (1333)
35S-F1
SmaI (1335)
35S-F Original
NOS terminator
35S promoter
T-NOS-R Original

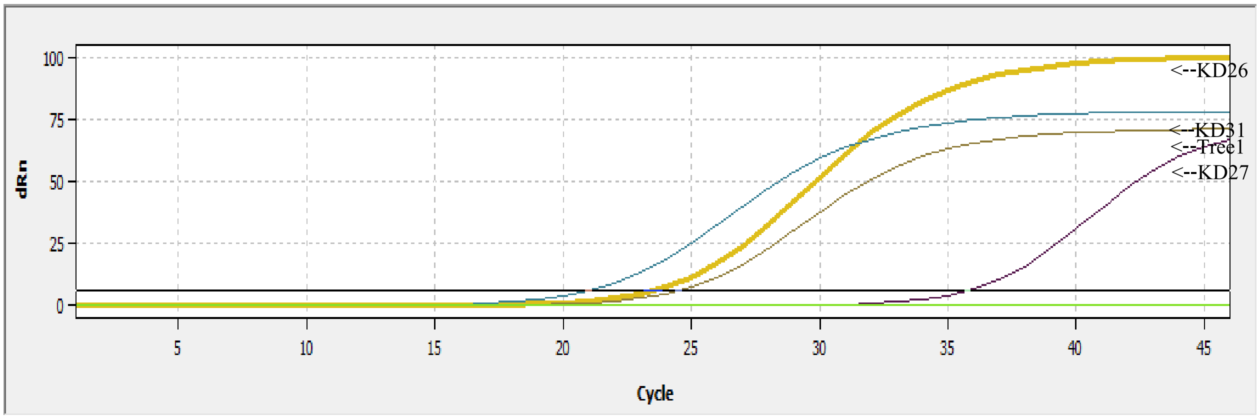
ขนาดของ Construct ทั้งชิ้นนี้คือ 1,612 bp ประกอบด้วย Promoter 35S ตำแหน่งตัดของ Restriction enzyme BamHI ชิ้นยีนบางส่วนของ Coat protein ไวรัสสายพันธุ์ Chiengmai 2 ต่อด้วย Multi-cloning site ที่บริเวณส่วนปลายของชิ้นยีน Coat protein และ NOS terminator ทั้งนี้สามารถออกแบบ Specific Probe และ Primer ได้ดังนี้

เป้าหมายการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม	ตำแหน่งที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่าง Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter (CaMV P-35S) และส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2
Primer Forward : 35S-F1	5’-**GACGTAAGGGATGACGCAC**-3’
Target element	CaMV P-35S
Primer Reverse : CM2-R1	5’-**ACATCGTTTCCGTCACTAGC**-3’
Target element	ส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2
Amplicon length	191 bp
Probe : CM2-P	5’-FAM-**AAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGA**-TAMRA-3’
Target element	ส่วนต้นของยีน Coat protein ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่ 2

การทดสอบ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method โดยวิธี Real-time PCR

ดำเนินการทดสอบ Construct specific detection method กับดีเอ็นใบมะละกอ GM 4 ตัวอย่างที่ออกแบบเบื้องต้นด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ภาพที่ 12. แสดงผล Sigmoidal curve ของ real-time PCR ในตัวอย่างที่แตกต่างกัน



ตารางที่ 19. แสดงค่า C_t (Threshold cycle) ของตัวอย่าง GM ที่แตกต่างกัน

Sample name	Sample type	Ct
KD26	Unknown	23.45
KD27	Unknown	35.77
KD31	Unknown	21.06
Tree1	Unknown	24.46
NTC	NTC	No Ct

จากผลการทดลอง ตรวจพบ Construct specific 35S-CM2-NOS ในตัวอย่าง GM ทั้ง 4 ตัวอย่าง KD26, KD27, KD31 และ Tree1 ซึ่งได้จาก 2 แหล่งที่มา (KD, Tree1) แตกต่างกัน โดยในกลุ่ม KD26, KD27, KD31 พบว่าถึงแม้มาจากแหล่งเดียวกัน แต่ได้ค่า Ct แตกต่างกันโดย KD26, KD31 พบว่าได้ค่า Ct ใกล้เคียงกันคือ 23.45 และ 21.06 ในขณะที่ KD27 มีค่า Ct ที่ 35.77 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวน Copies number ของ Construct 35S-CM2-NOS ในจีโนม KD26, KD31 อาจมีจำนวนใกล้เคียงกัน และมีจำนวน Copies number ในจีโนมมากกว่าในตัวอย่าง KD27 ทั้งนี้ตัวอย่าง Tree 1 มีค่า Ct 24.46 ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่าง KD26, KD31 จึงอาจกล่าวได้ในแนวทางเดียวกันว่า จำนวน Copies number ของ Construct 35S-CM2-NOS ในจีโนมตัวอย่าง Tree 1 และ KD26, KD31 มีจำนวนใกล้เคียงกัน

8.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method และปริมาณต่ำสุดที่ วิธีการตรวจวิเคราะห์จะตรวจพบสำเนาของจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiengmai 2

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ (Limit of detection, LOD) ด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ตารางที่ 20 แสดงผลการการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method

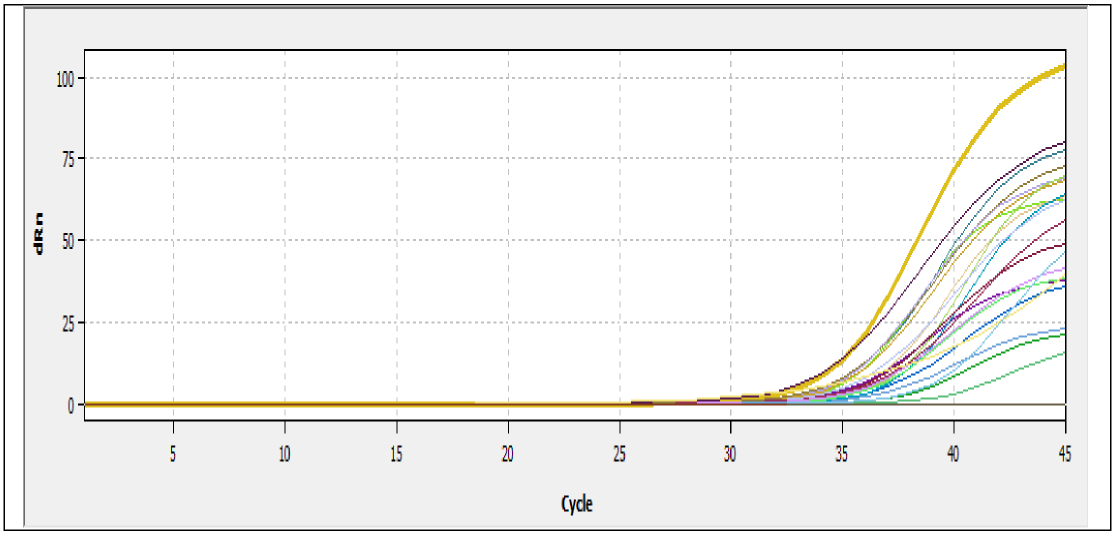
GM copies number	Rep	Ct				Mean	SD	RSDr (%)	Mean (Total)	SD (Total)	RSDr (%Total)
		1	2	3	4						
200	1	34.32	33.71	35.19	34.64	34.47	0.62	1.79	34.45	0.68	1.98
	2	34.49	34.87	35.05	35.06	34.87	0.27	0.76			
	3	33.09	33.08	33.97	35.14	33.82	0.97	2.88			
	4	34.49	35.04	34.27	34.82	34.66	0.34	0.99			
100	1	35.20	34.80	36.21	34.93	35.29	0.64	1.81	35.69	0.65	1.83
	2	35.01	37.07	35.73	35.75	35.89	0.86	2.39			
	3	35.96	35.25	34.71	36.01	35.48	0.62	1.75			
	4	36.07	35.87	36.19	36.33	36.12	0.19	0.54			
50	1	36.00	37.57	37.22	37.18	36.99	0.68	1.85	36.42	1.15	3.15
	2	35.98	36.98	35.63	36.59	36.30	0.60	1.67			
	3	34.37	34.24	35.14	35.98	34.93	0.80	2.30			
	4	37.42	37.50	36.90	38.06	37.47	0.47	1.27			
20	1	36.55	**NA**	35.81	36.83	36.40	0.53	1.45	37.78	1.28	3.40
	2	38.56	37.68	37.51	38.19	37.99	0.48	1.26			
	3	37.84	37.06	36.24	**NA**	37.05	0.80	2.16			
	4	39.66	40.10	39.32	37.52	39.15	1.13	2.89			
10	1	41.69	36.44	**NA**	36.52	38.22	3.01	7.87	38.78	1.58	4.06
	2	40.46	38.42	37.86	38.04	38.70	1.20	3.10			
	3	39.92	37.67	**NA**	38.21	38.60	1.17	3.04			
	4	38.75	**NA**	39.98	40.24	39.66	0.80	2.01			
5	1	35.07	37.83	39.50	39.17	37.89	2.02	5.32	38.88	2.23	5.74
	2	40.61	38.83	41.15	43.63	41.06	1.98	4.83			
	3	35.79	37.92	38.81	**NA**	37.51	1.55	4.14			
	4	**NA**	**NA**	37.48	39.59	38.54	1.49	3.87			

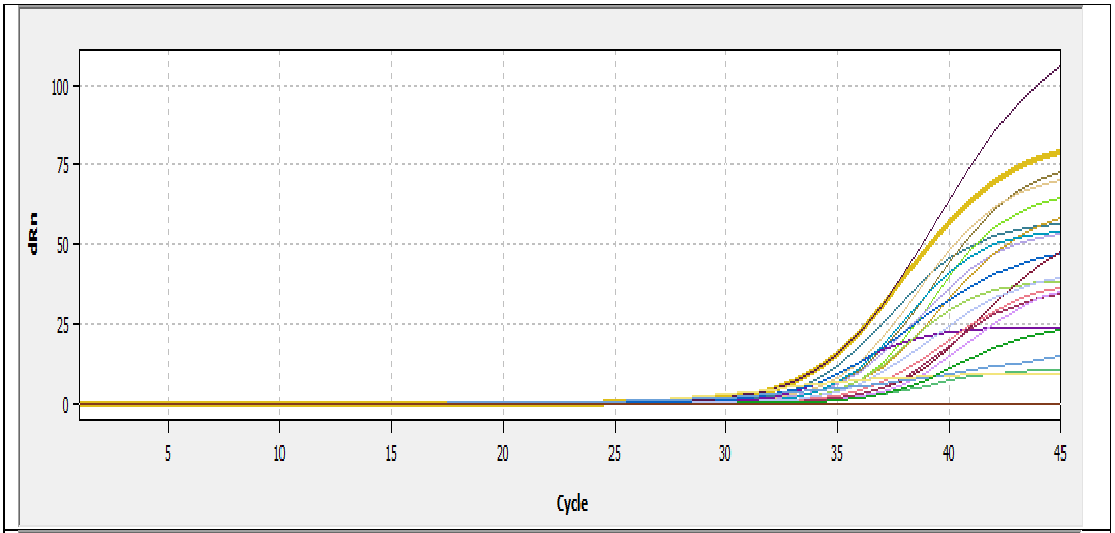
หมายเหตุ NA : Not available (ตรวจไม่พบสัญญาณ)

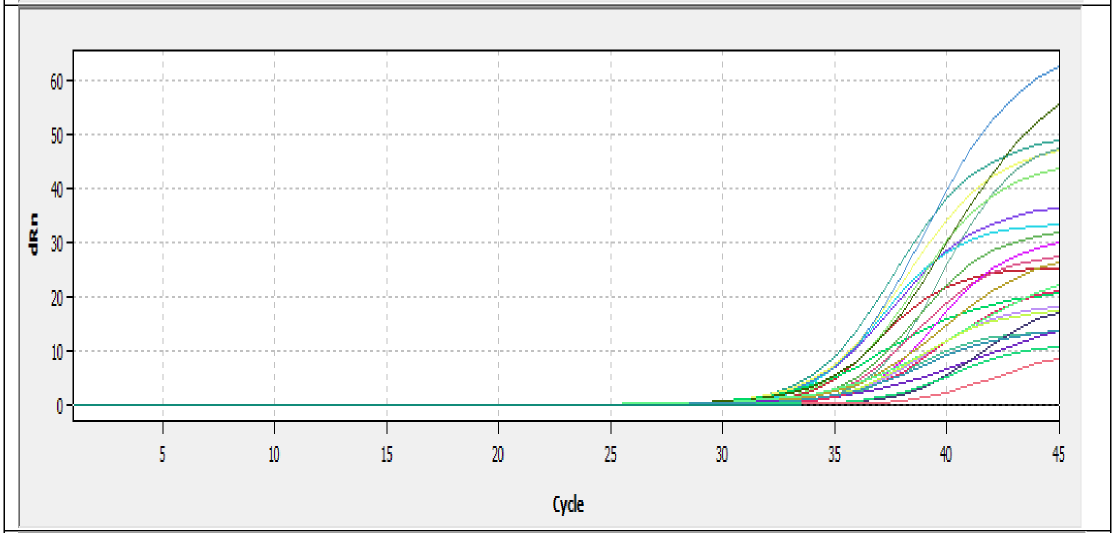
จากผลการทดลองพบว่า Construct specific 35S-CM2-NOS Detection method ตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มข้น 40 copies/µl (200 copies) , 20 copies/µl (100 copies), 10 copies/µl (50 copies) ทุกซ้ำการทดลองและ RSDr (%Total) < 25% อย่างไรก็ดีที่ความเข้มข้น 4 copies/ul (20 copies) พบว่าตรวจไม่พบสัญญาณ 2 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 12.5% (> 5%), ที่ความเข้มข้น 2 copies/ul (10 copies) พบว่าตรวจไม่พบสัญญาณ 3 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 18.75% (> 5%) และ ที่ความเข้มข้น 1 copies/ul (5 copies) พบว่า ตรวจไม่พบสัญญาณ 3 ซ้ำ ทำให้ %False negative = 18.75% (> 5%) ซึ่งหาก %False negative > 5% ไม่สามารถยอมรับได้ว่าเป็นค่าต่ำสุด (JRC Scientific and Technical Reports (EUR 24790 EN - 2011))

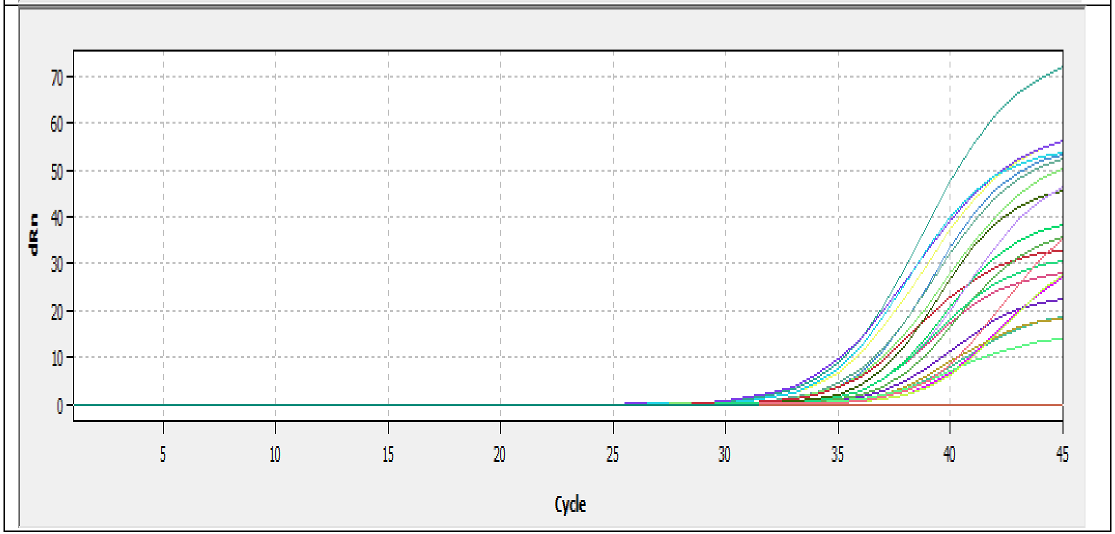
จึงสามารถสรุปได้ว่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiengmai 2 โดยใช้ Matrix เป็น Genomic DNA ซึ่งสกัดได้จากใบมะละกอ อยู่ที่ 10 copies/µl (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% ที่ความเข้มข้น DNA total 40 ng/µl

ภาพที่ 13. แสดง Amplification curve ของการทดสอบหา LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ซ้ำ 1-4




dRn
100
75
50
25
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Cycle


dRn
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Cycle


dRn
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Cycle

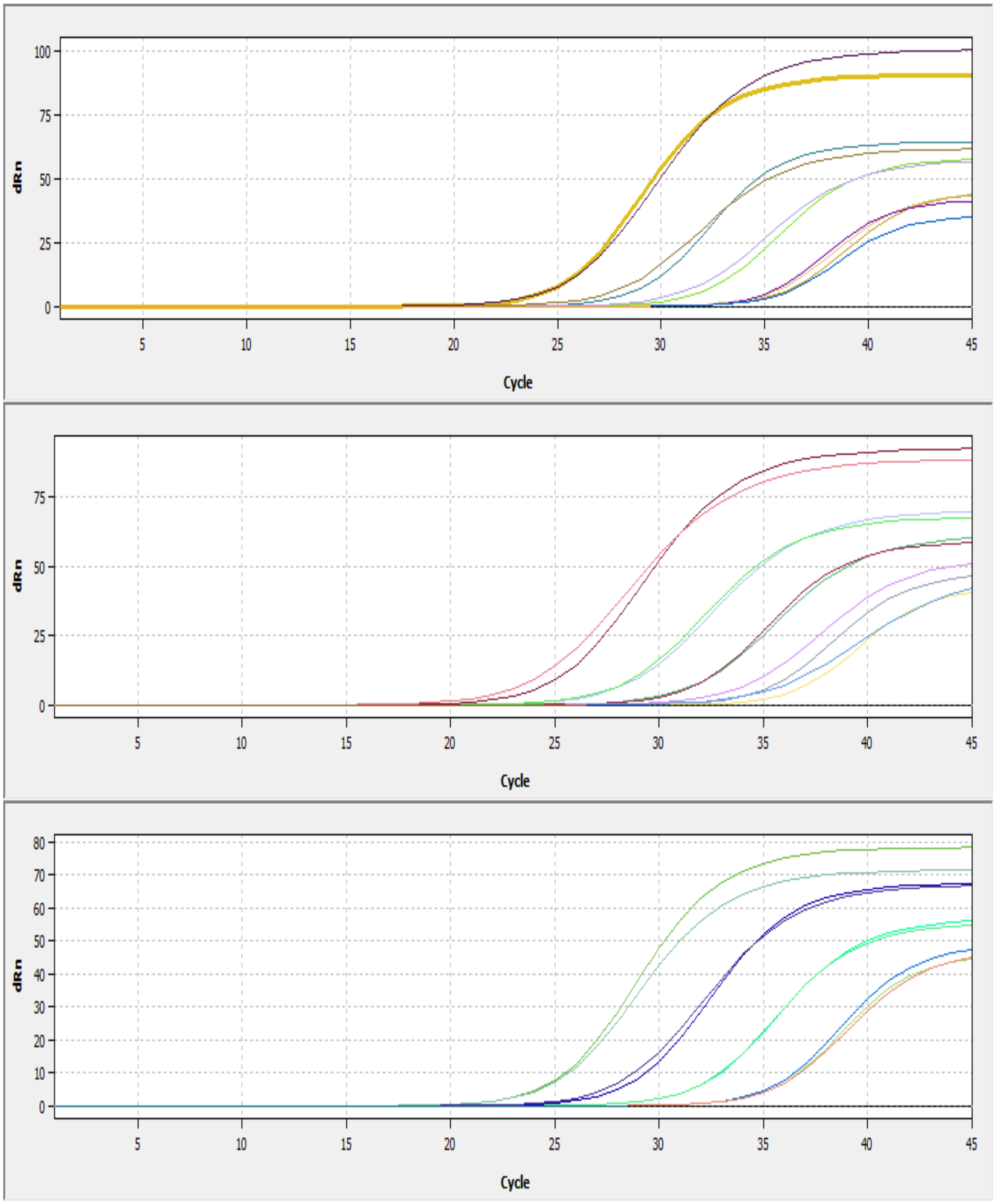
8.6 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

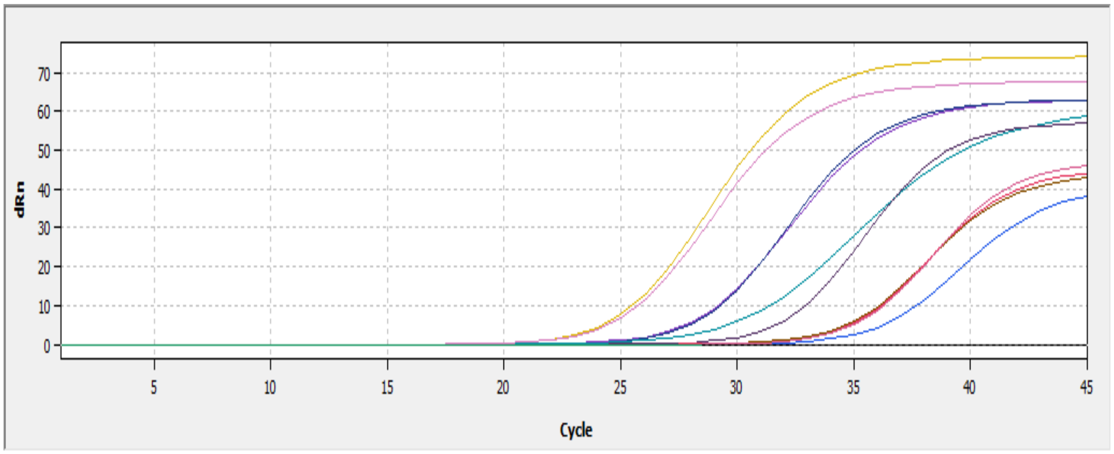
เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai 2 40 ng/µl และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl เป็นBackground DNA ได้ผลการทดลองดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 21. แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

GM copies number (x1000 Copies)	Rep	Ct				Mean	SDr	RSDr (%)	Mean (Total)	SD_R (Total)	RSD_R (%Total)
		1	2	3	4						
100	1	25.24	25.31	25	23.93	24.87	0.64	2.58	25.12	0.50	1.99
	2	25.28	25.4	25.29	25.48	25.36	0.10	0.38			
10	1	29.44	28.56	28.77	28.61	28.85	0.41	1.41	28.88	0.31	1.09
	2	29.12	28.56	28.98	29.03	28.92	0.25	0.86			
1	1	32.84	32.04	32.19	32.23	32.33	0.35	1.09	32.31	0.57	1.76
	2	32.71	32.67	31.1	32.68	32.29	0.79	2.46			
0.1	1	36.26	36.76	35.98	34.68	35.92	0.89	2.47	35.08	2.67	7.61
	2	36.5	28.65	35.83	35.96	34.24	3.73	10.91			
0.05	1	36.09	36.95	37.52	36.54	36.78	0.61	1.65	36.68	0.56	1.54
	2	36.29	36.52	37.43	36.09	36.58	0.59	1.62			

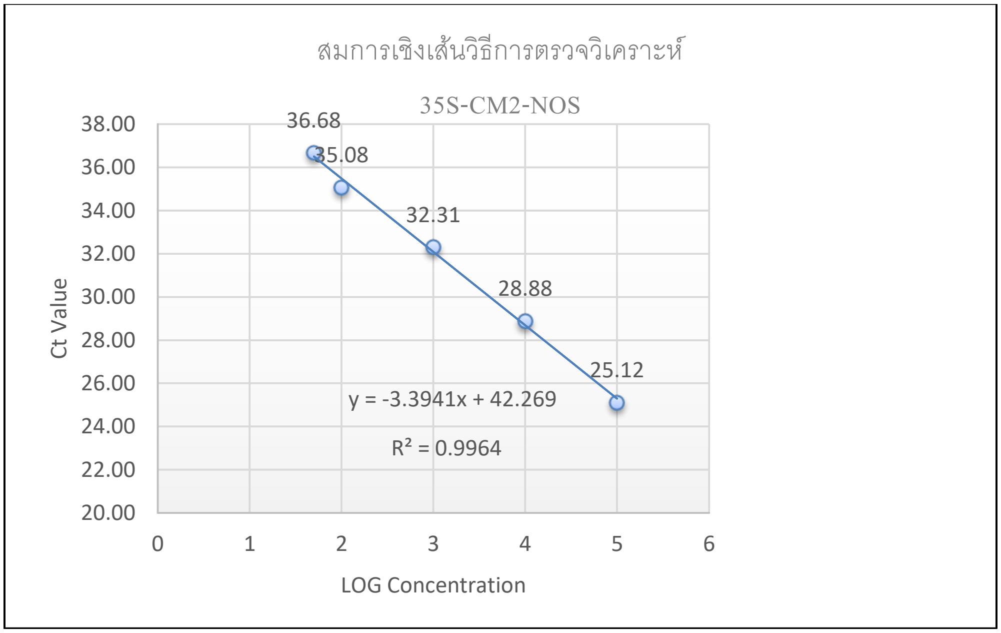
ภาพที่ 14. แสดง Amplification curve ของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)
ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ซ้ำ 1 – 4





จากการทดลองนำค่า GM copies number ของแต่ละ Dilution ไปใส่ค่า Log 10 และเทียบกับค่า เฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution เพื่อสร้างสมการเชิงเส้นดังกราฟต่อไปนี้

ภาพที่ 15. แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR



จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Background DNA เป็น ถั่วเหลือง Non-GM สามารถสร้างสมการเชิงเส้นได้โดยมีสมการเชิงเส้นดังนี้

y = -3.3941x + 42.269 และได้ค่า R^2 = 0.9964 พบว่าค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า -3.3941 ซึ่ง ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า R^2 ≥ 0.98 เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์โดย Construct specific detection method ที่ออกแบบสำหรับ 35S-CM2-NOS ด้วยวิธี Real-time PCR สามารถให้ผลการทดลองมีความใกล้เคียงแบบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) และเป็นช่วงที่วิธีการทดสอบสามารถทดสอบได้แม่นยำ คือ ตั้งแต่ 50 – 100,000 copies หรือ 10 copies/ul ถึง 20,000 copies/ul

8.7 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของยีน Papain

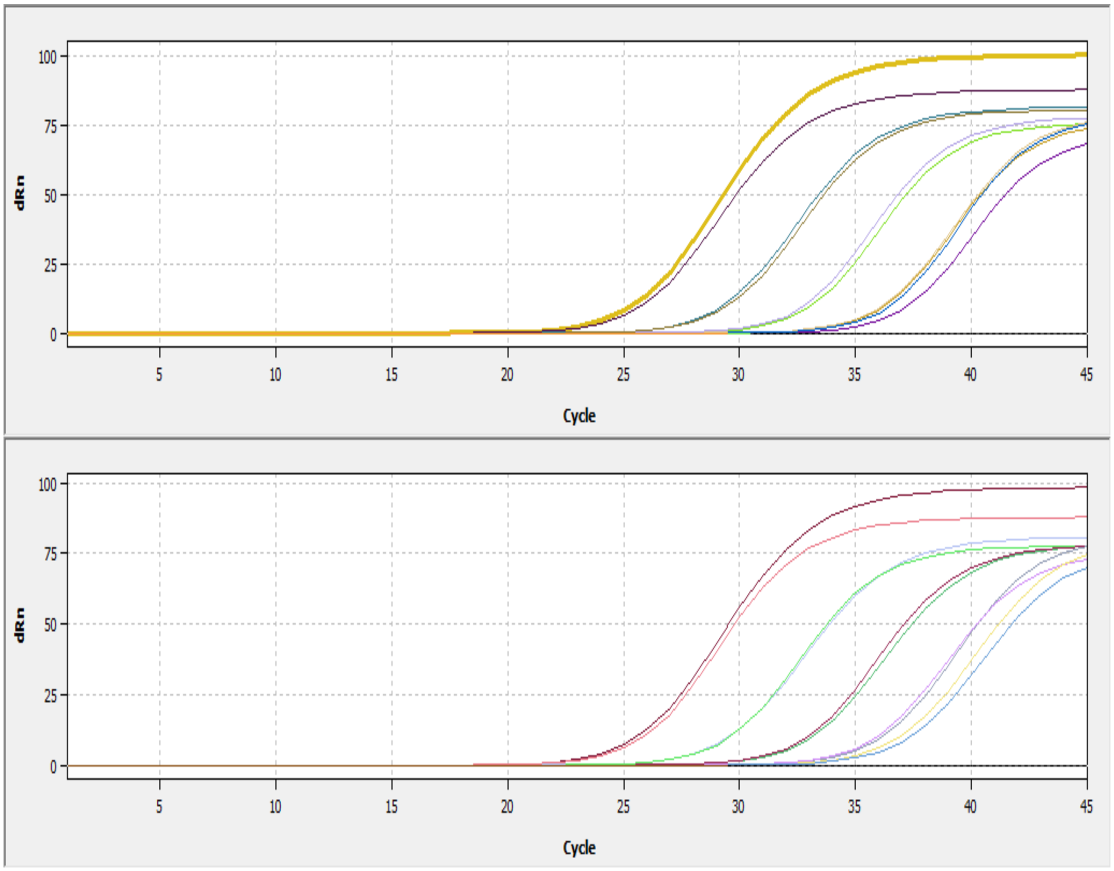
เตรียมตัวอย่างใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai 2 40 ng/µl และ ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจยืนยันแล้วว่าเป็น Non-GM ความเข้มข้น 100 ng/µl เป็นBackground DNA ดำเนินการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหายีน Papain ของ Wei J. *et* al. 2016
ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.

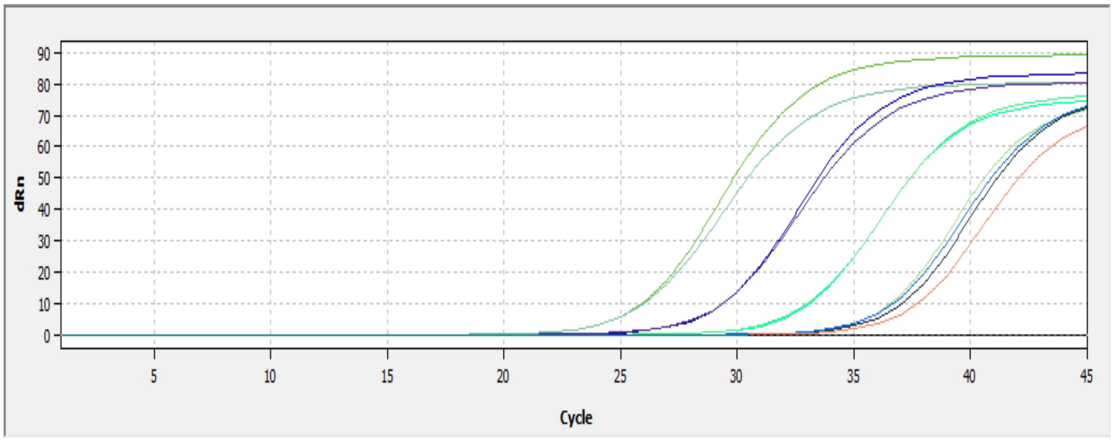
ตารางที่ 22. แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR

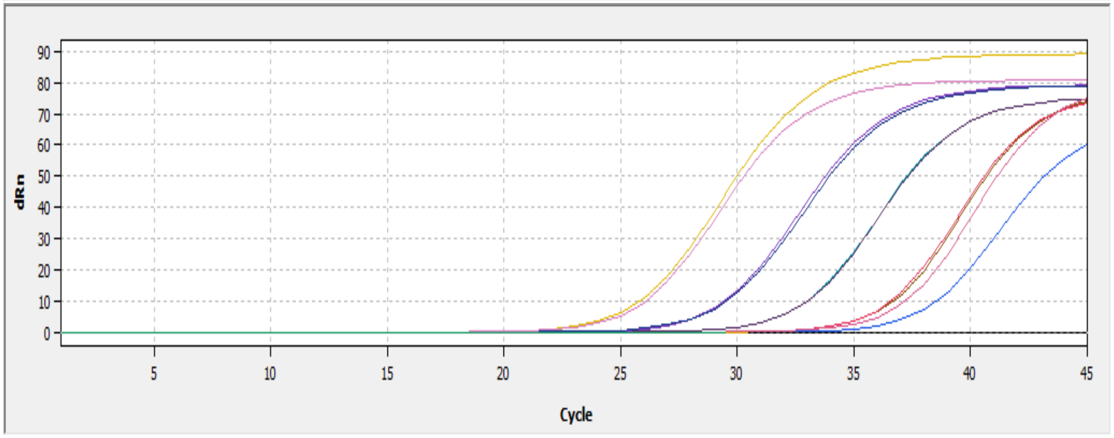
Papain copies number	Rep	Ct				Mean	SDr	RSDr (%)	Mean (Total)	SD_R (Total)	RSD_R (%Total)
		1	2	3	4						
100,000 copies	1	25.19	25.55	25.33	25.62	25.42	0.20	0.78	25.59	0.23	0.91
	2	25.73	25.82	25.59	25.87	25.75	0.12	0.48			
10,000 copies	1	29.1	29.31	29.31	29.37	29.27	0.12	0.40	29.26	0.09	0.30
	2	29.2	29.19	29.28	29.32	29.25	0.06	0.22			
1,000 copies	1	32.97	32.61	32.96	32.71	32.81	0.18	0.55	32.84	0.13	0.39
	2	32.95	32.83	32.81	32.85	32.86	0.06	0.19			
100	1	36.04	36.13	35.98	35.69	35.96	0.19	0.53	36.25	0.37	1.01

Copies	2	36.37	36.89	36.49	36.37	36.53	0.25	0.67			
50 copies	1	37.10	36.32	36.68	37.17	36.82	0.40	1.08	37.08	0.64	1.73
	2	36.47	37.56	38.32	37.04	37.35	0.79	2.11			

ภาพที่ 16. แสดง Amplification curve ของการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ซ้ำ 1 – 4

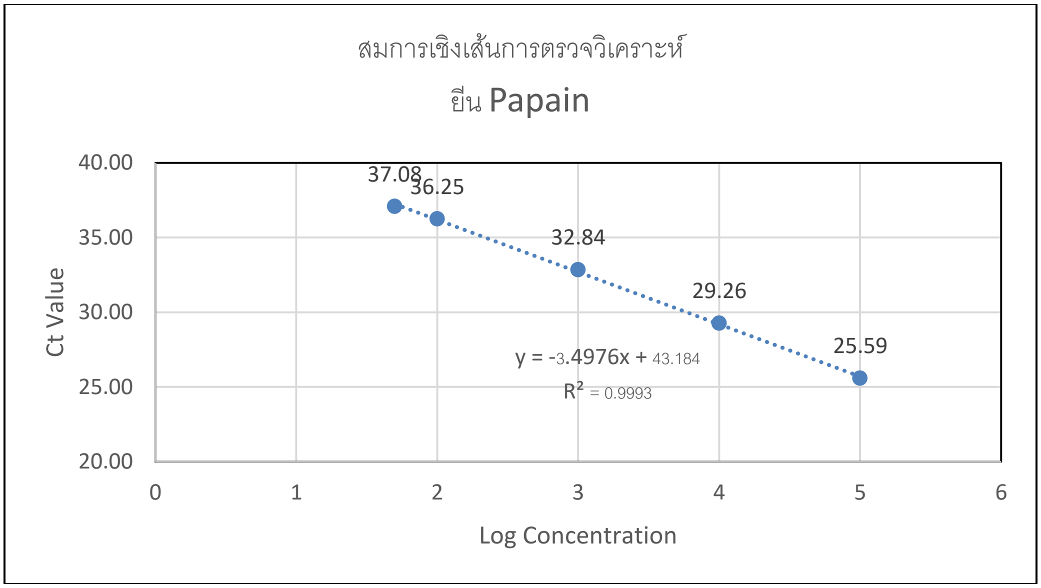






จากการทดลองนำค่า Papain copies number ของแต่ละ Dilution ไปใส่ค่า Log 10 และเทียบกับค่าเฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution เพื่อสร้างสมการเชิงเส้นดังกราฟต่อไปนี้

ภาพที่ 17. แสดงค่าเฉลี่ยของ Ct value ของแต่ละ Dilution และความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR



จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของ ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจหายีน Papain ของ Wei J. *et* al. 2016 (ภาพที่ 2.) ใช้ Background DNA เป็น ถั่วเหลือง Non-GM สามารถสร้างสมการเชิงเส้นได้โดยมีสมการเชิงเส้นดังนี้ $y = -3.4976x + 43.184$ และได้ค่า $R^2 = 0.9993$ พบว่าค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า -3.4976 ซึ่ง ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการตรวจวิเคราะห์โดย ยีน Papain ด้วยวิธี Real-time PCR สามารถให้ผลการทดลองมีความใกล้เคียงแบบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) และเป็นช่วงที่วิธีการทดสอบสามารถทดสอบได้แม่นยำ คือ ตั้งแต่ 50 – 100,000 copies หรือ 10 copies/ µl ถึง 20,000 copies/µl

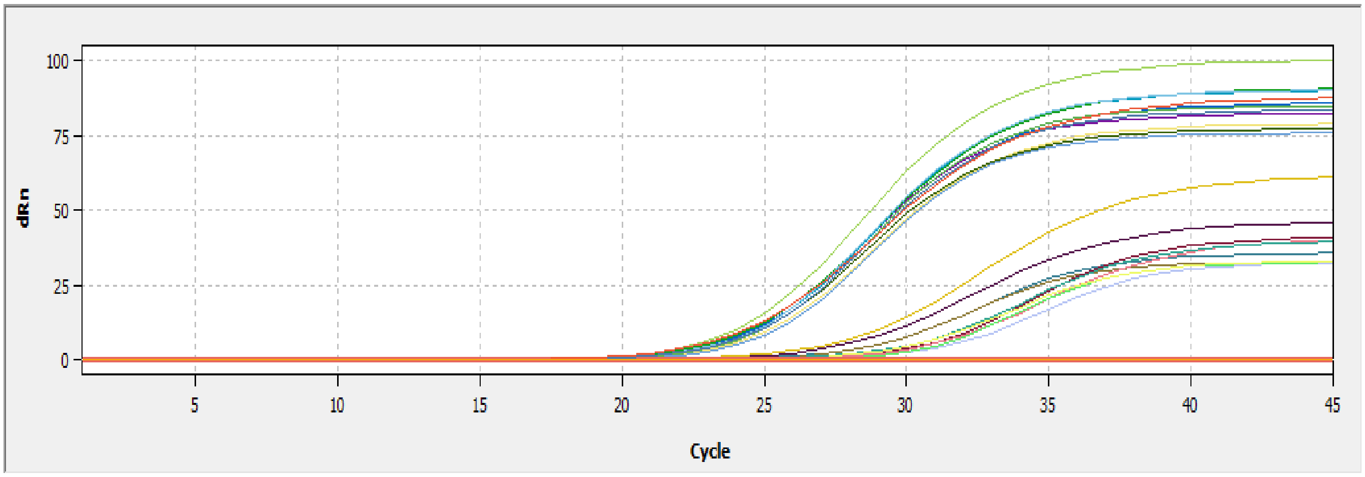
8.8 การทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

ตัวอย่าง CM2 (2%) ได้จากการผสมใบมะละกอ Non-GM 1g ที่มีส่วนผสมของ ใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai2 อยู่ 20 mg คิดเป็น % ปนเปื้อน น้ำหนัก : น้ำหนักได้ 2% เช่นเดียวกับตัวอย่าง CM2 (0.5%) ได้จากการผสมใบมะละกอ Non-GM 1g ที่มีส่วนผสมของ ใบมะละกอ GM (KD26) ที่ตรวจพบ Construct PRSV-Chiengmai2 อยู่ 5 mg คิดเป็น % ปนเปื้อน น้ำหนัก : น้ำหนักได้ 0.5% นำตัวอย่างทั้ง 2 มาสกัดดีเอ็นเอแล้วเจือจางด้วยน้ำเป็น 40 ng/µl จากนั้นนำไปทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Real-time PCR ได้ผลการทดลองดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 23. แสดงผลการทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้
ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ระหว่างยีน Papain และ Construct CM2

Sample	Ct				Mean	SD	RSD (%)	LogX	Experimental copies (Copies/µl)	Mean Experimental (%)	Bias%
	1	2	3	4							
CM2(2%)	27.55	28.15	29.36	29.36	28.61	0.91	3.17	**4.03**	10,612.30	2.20	9.94
Papain (CM2(2%))	23.51	23.38	23.5	22.83	23.31	0.32	1.38	**5.68**	482,627.01		
CM2(0.5%)	30.98	31.16	31.92	31.38	31.36	0.41	1.30	**3.214**	1,637.22	0.45	-2.34
Papain CM2(0.5%))	24.00	24.27	23.21	23.50	23.75	0.48	2.02	**5.56**	361,252.67		

ภาพที่ 18. แสดง Amplification curve ของทดสอบการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ



จากการทดลอง ปริมาณ Experimental copies (Copies/µl) ของ Construct CM2 และ Papain ได้จากการคำนวน ค่า LogX โดยใช้สมการเชิงเส้นจากการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของ Construct CM2 และ ยีน Papain ดังต่อไปนี้ y = -3.3941x + 42.269 และ y = -3.4976x + 43.184 ตามลำดับและเมื่อนำค่า Log X ไปถอด Log ออกจะได้ค่า Experimental copies (Copies/µl) ซึ่งสามารถคำนวน Mean Experimental (%) การปนเปื้อนได้โดย สมการดังต่อไปนี้ (Mean experimental copy number CM2/Mean experimental copy number papain) x 100 (ตารางที่ 7, ภาพที่ 3)

ทั้งนี้วิธีการตรวจวิเคราะห์ Construct specific 35S-CM2-NOS detection ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณโดยในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในที่นี้แสดงให้เห็นว่ามี % Bias 9.94%

ในการตรวจวิเคราะห์ที่การปนเปื้อน 2% และ % Bias -2.34% ในการตรวจวิเคราะห์ที่การปนเปื้อน 0.5% ซึ่งแสดงถึง Truness ที่ดีของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยในการตรวจวิเคราะห์ที่ % การปนเปื้อนทั้ง 2 ระดับ มีค่า Bias < 25% ตามเกณฑ์ของสหภาพยุโรป (Marchezi, U. et al. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed and European Network of GMO Laboratories, 2015))

วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถใช้ในการตรวจ Construct specific 35S-CM2-NOS detection ในมะละกอปนเปื้อน GMOs ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจนและวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ตรวจพบปนเปื้อนในการส่งออกของประเทศไทยที่ดำเนินการทดสอบความใช้ได้แล้ว โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์แบบ Screening test เท่านั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาติและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus เมื่อทดสอบความใช้ได้แล้วพบว่ามีค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiengmai 2 อยู่ที่ 10 copies/µl (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พบว่า ค่าความชันของสมการเชิงเส้นมีค่า ≥ -3.6 และ ≤ -3.1 และค่า $R^2 \geq 0.98$ เป็นไปตามหลักสมการเชิงเส้น และสามารถทดสอบเชิงปริมาณได้ โดยมีค่า % Bias ที่ 9.94%

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Construct specific และทดสอบความใช้ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อตรวจวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะเจาะจงกับยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ได้รับอนุญาติและตรวจพบการปนเปื้อน โดยสามารถออกแบบ Primer ที่จับกับตำแหน่ง Promoter CaMV 35S และ Insert รวมถึง Probe ที่จับแบบจำเพาะเจาะจงกับยีนของ Coat Protein Virus ที่ทดสอบความใช้ได้แล้วและมีค่า LOD ของ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ในการตรวจหาการปนเปื้อนจีโนม GM มะละกอ Construct PRSV-Chiengmai 2 อยู่ที่ 10 copies/µl (50 copies) หรือคิดเป็น % การปนเปื้อนของ GM Genome 0.01% วิธีการทดสอบ Construct specific 35S-

CM2-NOS จะช่วยยกระดับการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Construct specific อื่นๆได้ และช่วยป้องกันการปนเปื้อนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในการส่งออกและการปลูกภายในประเทศได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำ Construct specific 35S-CM2-NOS detection method ไปจดสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรรวมถึงตีพิมพ์ในวรสารต่างประเทศ และที่สำคัญสามรถนำไปใช้เพิ่มเติมในข้อกฎหมายหรือระเบียบว่าด้วยการส่งออกมะละกอผลสดสู่ต่างประเทศว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องตรวจไม่พบทุกกรณี เป็นต้น

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

12.เอกสารอ้างอิง

Alisa Wilantho1, Oranud Praditsup2, Wanwisa Charoenchim1, Supasak Kulawonganunchai1, Anunchai Assawamakin1 and Sissades Tongsima1* Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. Thai J. Genet. 2012, 5(2) : 104-129

Directive 2001/18/EC on the deliberate release of GMOs into the environment

Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Nat. Biotechnol.,10, 1466–1472 (1992).

Gonsalves D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. AgBioForum, 7, 36–40 (2004).

Jiaojun Wei, Huangying Leb, Aihu Pan, Junfeng Xu, Feiwu Li, Xiang Li, Sheng Quan, Jinchao Guo, Litao Yang. Quantitative PCR method for detection of papaya event Huanong N1. Food Chemistry Volume 194, 1 March 2016, Pages 20-25.

Kosiyachinda P, Srivatanakul M. The transgenic Thai papaya story: a milestone towards Thailand becoming a biotech crop country.Asia-Pacific perspectives on biotechnology and bioethics. (Calderbank D, Macer DRJ ed.) UNESCO Asia and Pacific Regional Bureau for Education, Thailand, pp. 11–15 (2008).

Kosuke NAKAMURA,a Hiroshi AKIYAMA,*,a Kiyomi OHMORI,bYuki TAKAHASHI,c Reona TAKABATAKE,d Kazumi KITTA,d Hiroyuki NAKAZAWA,c Kazunari KONDO,a and Reiko TESHIMA. an Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. Biol. Pharm. Bull. 34(10) 1648—1651 (2011).

Kosuke Nakamura,a Kazunari Kondo,*,a Tomoko Kobayashi,a Akio Noguchi,a Kiyomi Ohmori,b Reona Takabatake,c Kazumi Kitta,c Hiroshi Akiyama,a Reiko Teshima,a and Tomoko Nishimaki-Mogamia Identification and Detection of Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus Strains in Thailand. Biol. Pharm. Bull. 37(1) 1–5 (2014).

Reference no. 2012.BBD, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) of European Commission, 14 May, 2012.

Sakuanrungsirikul S, Sarindu N, Prasartsee V, Chaikiatiyos S, Siriyan R, Sriwatanakul M, Lekananon P, Kitprasert C, Boonsong P, Kosiyachinda P, et al (2005) Update on the development of virus-resistant papaya: virus-resistant transgenic papaya for people in rural communities of Thailand. Food Nutr Bull 26 422–426.

Tecson Mendoza EM, Laurena AC, Botella JR. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. Biotechnol. Annu.Rev., 14, 423–462 (2008).

UGMMONITOR project: Development of a molecular biology platform and a database

(safety assessment) to detect unauthorized GMOs in the European food/feed chain.