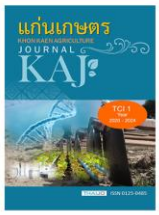
วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วย Tetraplex Real-time PCR เพื่อรับรองการนำเข้าสินค้าเกษตร

Detection of genetically modified soybeans by Tetraplex Real-time PCR for agricultural import authorization

ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ[1]*, สุธานันทน์ นาคประนม[1], พงศกร สรรค์วิทยากุล[1], ศิริพร เสนดำ[1], ปิยนุช ศรชัย[1], วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร[1] และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1]

Thitirut Assawamongkholsiri[1]*, Suthanun Nakpranom[1], Pongsakorn Sunvittayakul[1], Siriporn Sendam[1], Piyanuch Sornchai[1], Weerasak Pitaksaringkarn[1] and Piyarat Thammakijjawat[1]

[1] *กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร 10900*
[1] *Research and Development of GM Plant & Microbe Detection Laboratory, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok, 10900*

บทคัดย่อ: ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิต แต่ไทยไม่สามารถผลิตได้เพียงพอจำเป็นต้องนำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อบริโภคในประเทศ ซึ่งอนุญาตให้นำเข้าเฉพาะสายพันธุ์ที่ผ่านการประเมินเท่านั้น อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการทั่วไปทำการตรวจยืนคัดกรองด้วยวิธี Simplex Real-time PCR ซึ่งไม่สามารถตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมหลายสายพันธุ์ได้อย่างครอบคลุมในคราวเดียว ใช้เวลาทดสอบนาน สิ้นเปลืองสารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการประเมินและอนุญาตให้นำเข้า ได้แก่ สายพันธุ์ Mon87701, A2704-12, GTS 40-3-2, Mon87705, Mon87769 และ Mon89788 โดยใช้เทคนิค Tetraplex Real-time PCR โดยออกแบบ ทดสอบความจำเพาะและศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์-โพรบ จากนั้นทดสอบขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ และขยายผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่า การตรวจยืนคัดกรองและยืนจำเพาะด้วยไพรเมอร์-โพรบ 2 ชุด ได้แก่ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* 2) *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR สามารถจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ชุดไพรเมอร์-โพรบมีความจำเพาะและมีความเข้มข้นเหมาะสมที่ระดับ 1 เท่า ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ต่ำสุดเท่ากับ 0.1% มีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในช่วง 100 – 150 ng/reaction และผลการทดสอบอื่น ๆ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อขยายผลตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างพบว่าให้ผลการทดสอบถูกต้อง 100% นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุน และระยะเวลา เพื่อรองรับการตรวจวิเคราะห์ในการนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม

คำสำคัญ: สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม; ถั่วเหลือง; ตรวจยืนหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว; ยีนคัดกรอง; ยีนจำเพาะ

ABSTRACT: Soybean is an important raw material for the manufacturing industry, but Thailand cannot produce enough and must imported genetically modified (GM) soybeans for domestic consumption. This authorizes the importation of only approved GM events. However, the general laboratories detect the screening gene by Simplex Real-time PCR which cannot identify multiple GM soybean events at once, takes a long time for testing, wasted chemicals and scientific materials. Therefore, this research aims to develop using Tetraplex Real-time PCR assay to identify GM soybeans approved events namely Mon87701, A2704-12, GTS 40-3-2, Mon87705, Mon87769, and

* Corresponding author: thitirut.assawamongkholsiri@gmail.com

Received: date; October 14, 2021 Accepted: date; January 26, 2022 Published: date; June 30, 2022

Mon89788. The methods are the following: designed, specificity tested, and studied the optimum concentration of the primer-probe. Then, the limit of detection (LOD), DNA amplification range, and analysis in various samples was tested. The results found that the screening and specific genes were efficiently identified the 6 events of GM soybeans with two sets of primer-probes by Tetraplex Real-time PCR: 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac*, and *Lectin* 2) *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788, and *Lectin*. The primer-probe sets are specific, and the suitable concentration was 1X level. The LOD was determined to be 0.1%, the range of DNA amplification was 100–150 ng/reaction, and all other test results were within the basic range values. When expanding the assay to analyze the samples, it is shown that the test results are 100% accurate. It also reduces the cost and time required to support the detection of imported GM plants.
Keywords: genetically modified organisms (GMOs); soya bean; multiplex real-time PCR; screening gene; event-specific gene

บทนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่อคนไทยและเศรษฐกิจของประเทศ เป็นพืชที่ให้โปรตีนและน้ำมันสูง จึงเป็นวัตถุดิบสำคัญที่มีการใช้อย่างแพร่หลายสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน เนื่องด้วยประเทศไทยมีการบริโภคถั่วเหลืองปริมาณมากแต่ผลผลิตมีไม่เพียงพอกับความต้องการ จำเป็นต้องมีการนำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการบริโภคในประเทศ โดยในปี 2556 มีการนำเข้าเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมจากประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา ถึงร้อยละ 90 (1.68 ล้านตัน) คิดเป็นมูลค่า 31,323 ล้านบาท (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน, 2559)

การนำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่ออุตสาหกรรมนั้น ได้รับอนุญาตให้มีการนำเข้าเฉพาะสายพันธุ์ที่ผ่านการประเมินแล้วเท่านั้น โดยคณะอนุกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหาร และคณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ครั้งที่ 1/2560 ได้รายงานว่ามีถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการประเมินจำนวน 6 สายพันธุ์ (event) ได้แก่ ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทนทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟสิเนต (A2704-12) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานหนอนผีเสื้อศัตรู (Mon87701) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมให้มีกรดโอลิอิกสูง พร้อมทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสต (Mon87705) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมให้มีกรดไขมัน Omega-3 (Mon87769) ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสต (Mon89788) และถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสต (GTS-40-3-2) ซึ่งการนำเข้าถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมนั้นต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทดสอบ ซึ่งนิยมตรวจวิเคราะห์ยีนเชิงคุณภาพโดยการตรวจคัดกรองยีน *CaMV35S* promoter และ *Nos* terminator ที่ตัดต่อเข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมแบบทดสอบทีละยีน (Simplex Real-time PCR) ซึ่งไม่สามารถตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้อย่างครอบคลุม ใช้เวลาในการทดสอบนาน อีกทั้งยังสิ้นเปลืองสารเคมี และวัสดุวิทยาศาสตร์ (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561a)

ทั้งนี้มีการพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว (Multiplex Real-time PCR) เพื่อตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (Koppel et al., 2012; Grohmann et al., 2017) มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (ปิยนุช และคณะ 2563) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (Huang and Pan, 2004; ปิยรัตน์ และคณะ, 2561a; ปิยนุช และคณ, 2562) ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (Lu et al., 2016) ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม (Pitaksaringkarn et al., 2021) หรือในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่น ๆ (Bahrdt et al., 2010; Eugster et al., 2014; Bak and Emerson, 2019) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการตรวจยีน Mon89788, A5547-127, GTS-40-3-2, A2704-12 และ *lectin* ในถั่วเหลืองด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR (Koppel et al., 2012) หรือการตรวจยีนคัดกรอง *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *bar*, *ctp2-cp4epsps*, P35S-*pat*, *pat*, *cry1Ab/Ac*, P-FMV เพื่อตรวจสอบการปะปนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (Grohmann et al., 2017) แต่อย่างไรก็ตามการออกแบบและตรวจชุดยีนในงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่ครอบคลุมการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น โดยตามมาตรฐานการตรวจจำแนกยีนด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ควรมีค่าประสิทธิภาพพีซีอาร์ (PCR efficiency) อยู่ในช่วง 80 – 120% ค่าความชันของกราฟ (Slope) อยู่ในช่วง -2.92 ≥ Slope ≥ -3.91 (Bak and Emerson,

2019; Bustin et al., 2009) และค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (Limit of Detection; LOD) ไม่เกิน 0.1% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (European Network of GMO Laboratories, 2015)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ผ่านการประเมินและอนุญาตให้มีการนำเข้าในประเทศไทย ได้แก่ สายพันธุ์ Mon87701, A2704-12, GTS 40-3-2, Mon87705, Mon87769 และ Mon89788 โดยใช้เทคนิคตรวจจำแนกยีนสี่ชนิดในปฏิกิริยาเดียว (Tetraplex Real-time PCR) เพื่อรองรับการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการนำเข้า และเพื่อควบคุมกำกับดูแลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม สำหรับเปิดตลาดการค้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศให้สามารถมีวัตถุดิบเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ

วิธีการศึกษา

วัสดุอ้างอิงรับรอง

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

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

Target gene	Primer/ Probe	Sequences (5'-3')	Reference
CaMV35S promoter	35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	Waiblinger et al., 2008
	35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	
	35S-P	FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1	
Nos terminator	Nos -F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	Waiblinger et al., 2008
	Nos -R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT	
	Nos -P	HEX- ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA -BHQ1	
Cy1Ac	Cy1Ac-F	GAGGAAATGCGTATTCAATTCAAC	Grohmann et al., 2015
	Cy1Ac-R	TTCTGGACTGCGAACAATGG	
	Cy1Ac-P	TxRd-ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC-BHQ2	
rbcS E9 terminator	T E9-F	TTTTTATTCGGTTTTCGCTATCG	Debode et al., 2016
	T E9-R	TGAGAATGAACAAAAGGACCATATCA	
	T E9-P	HEX-TCATTAACTCTTCTCCATCCATTTCCATTTCACAGT-BHQ1	
Specific event Mon87705	87705-F	TTCCCGGACATGAAGCCATTTAC	Savini et al., 2012
	87705-R	ACAACGGTGCCTTGGCCCAAAG	
	87705-P	TxRd-AAGAGACTCAGGGTGTTGTTATCACTGCGG-BHQ2	
Specific event Mon89788	89788-F	TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT	Charles Delobel et al., 2013
	89788-R	TCGAGCAGGACCTGCAGAA	
	89788-P	FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA	
Lectin	Le1-F	TCCACCCCCATCCACATTT	Pauli et al., 2001
	Le1-R	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA	
	Le1-P	Cy5- AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-BHQ3	

ไพรเมอร์และโพรบ

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

ออกแบบการตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

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

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

GM Event	Condition of experiment A				Condition of experiment B			
	Element-specific gene				Element-specific and Event-specific gene			
	CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*
Mon87701	-	-	+	+	-	-	-	+
A2704-12	+	-	-	+	-	-	-	+
GTS 40-3-2	+	+	-	+	-	-	-	+
Mon87769	-	-	-	+	+	-	-	+
Mon87705	-	-	-	+	+	+	-	+
Mon89788	-	-	-	+	+	-	+	+
Non-GM	-	-	-	+	-	-	-	+

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

การสกัดดีเอ็นเอ และสภาวะปฏิกิริยา

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

ทำปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง LC480 cycler (Roche Diagnostics, Germany) โดยต่อหนึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 µl เริ่มจากขั้นตอน Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วยขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นไปที่ขั้นตอน Annealing และ Extension ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 45 รอบ และสุดท้าย คือ ขั้นตอนทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 1 รอบ

(Waiblinger et al., 2008) โดยสารปฏิกิริยา ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ความเข้มข้น 1 เท่า (1X) ของปฏิกิริยา Simplex และ tetraplex Real-time PCR ดังแสดงใน **Table 3** และ **Table 4**

การทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา

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

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

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

การทดสอบความจำเพาะด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

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

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ

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

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

Reagent	Stock (µM)	Simplex Real-time PCR for each target gene (µl)				Tetraplex Real-time PCR (µl)
		CaMV35S	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	
2XProbe master mix	2x	1x	1x	1x	1x	1x
35S-F	10	0.080	-	-	-	0.080
35S-R	10	0.080	-	-	-	0.080
35S-P	10	0.080	-	-	-	0.080
Nos-F	100	-	0.800	-	-	0.800
Nos-R	100	-	0.800	-	-	0.800
Nos -P	10	-	0.800	-	-	0.800
Cy1Ac-F	100	-	-	0.320	-	0.320
Cy1Ac-R	100	-	-	0.320	-	0.320
Cy1Ac-P	10	-	-	0.080	-	0.080
Lectin-F	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-R	10	-	-	-	0.050	0.050
Lectin-P	10	-	-	-	0.025	0.025
Template DNA (ng)	20	100	100	100	100	100
Total reaction (µl)	-	20	20	20	20	20

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

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

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

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

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ

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

การขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

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

การวิเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมดังแสดงใน **Table 5** ผลการทดลองพบว่ามีความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ในช่วง 364 ถึง 2,318 ng/µl โดยความเข้มดีเอ็นเอที่นำไปใช้ทดสอบเพียง 20 ng/µl ดังนั้นจึงมีปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอสำหรับการนำไปตรวจยีนด้วยวิธี Real-time PCR และดีเอ็นเอมีคุณภาพ โดยมีค่าเฉลี่ย A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.80 - 2.14 ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้และยังส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์สุดท้ายของการทำปฏิกิริยา Real-time PCR (Houge et al., 2017) โดยปกติอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ควรอยู่ระหว่าง 1.8 – 2.0 โดยหากมีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของโปรตีน หรือสารประกอบฟีนอลบางส่วนจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 280 nm และถ้า A_{260}/A_{280} มีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของอาร์เอ็นเอ (Fraga et al., 2014; Lucena-Aguilar et al., 2016)

Table 5 the DNA concentration and DNA Ratio of DNA extraction

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

การปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา

จากการทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม GTS 40-3-2 ที่ระดับการปะปน 10% โดยการตรวจยีน *Lectin* ด้วยวิธี Simplex real-time PCR ผลการทดลองในการทดสอบอัตราการเจือจางดีเอ็นเอพบว่ามีค่า ΔC_t เท่ากับ 0.02 (ค่ามาตรฐาน $\Delta C_t \leq 2$) ค่าความชันของกราฟเท่ากับ -3.35 (ค่ามาตรฐาน -3.1 ≥ Slope ≥ -3.6) ค่า PCR efficiency เท่ากับ 98.83% และค่า R^2 มากกว่า 0.99 ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน โดยค่า C_t ซึ่งเป็นสัญญาณเรืองแสงเริ่มต้นนั้นสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยตามทฤษฎีการที่ค่า C_t เพิ่มขึ้นเป็น 2 Copies ทุกรอบส่งผลให้ค่าความชันของกราฟเท่ากับ -3.322 ซึ่งทำให้มีค่า PCR efficiency เป็น 100% กล่าวคือ ปริมาณของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าอย่างสมบูรณ์ในแต่ละรอบของช่วง Exponential phase (อโนทัย, 2549; Life technologies, 2012) โดยการทดสอบการปนปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในการทดลองนี้พบว่ามีค่า PCR efficiency เท่ากับ 98.83% ซึ่งมีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 1.99 เท่าในแต่ละรอบปฏิกิริยา แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ที่มีสาเหตุมาจากดีเอ็นเอไม่มีคุณภาพ หรือสารตกค้างที่เกิดจากปฏิกิริยาการสกัดหรือทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งโดยปกติค่า PCR efficiency สำหรับวิธี Simplex Real-time PCR ควรอยู่ในช่วง 90 – 110% (Life technologies, 2012; Fraga et al., 2014)

ความจำเพาะด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และโพรบ **(Table 1)** ในการตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ด้วยวิธี Simplex Real-Time พบว่าโพรบและไพรเมอร์มีความจำเพาะสูงสำหรับตรวจยีน *CaMV35S* promoter*, Nos* terminator*, Cy1Ac, rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* โดยมีการแสดงสัญญาณค่า C_t ดังแสดงใน **Table 6** ซึ่งมีความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ 100% นอกจากนี้ชุดไพรเมอร์และโพรบดังกล่าวยังมีความจำเพาะสูงในการตรวจ 4 ยีนในปฏิกิริยาเดียวกันทั้งชุดการทดลอง A และ B ที่ได้ออกแบบไว้ โดยชุดการทดลอง A สามารถตรวจพบยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* และในชุดการทดลอง B สามารถตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* โดยตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นที่ไม่อยู่ในโครงสร้างยีน (Non-target GM DNA)

Table 6 The C_t of specific test on soybean GM by Simplex and Tetraplex Real-time

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

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

จากผลการทดสอบพบว่าค่า C_t ในการตรวจด้วยวิธี Tetraplex Real-Time มีค่าสูงกว่าวิธี Simplex Real-Time เมื่อตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Cy1Ac,* event Mon87705 และ event Mon89788 อย่างไรก็ตามค่า C_t ในการตรวจทั้งสองวิธีไม่ต่างกันเมื่อตรวจยีน *Nos* terminator, *rbcS E9* terminator (Mon87769, Mon89788) และ *Lectin* (**Table 6**) นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK 603 พบว่ามีการตรวจพบยีน *CaMV*35S promoter และ *Nos* terminator และตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นรวมถึงยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบถูกต้องสอดคล้องกับโครงสร้างการดัดแปลงพันธุกรรมของชนิดถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

โดยไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากหากมีการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (Random primers) หรือไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ำจะทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนเป้าหมายที่สนใจ หรืออาจเกิดการลดปริมาณของดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาได้ (Life technologies, 2012) นอกจากนี้การตรวจยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time ทำให้สามารถจำแนกได้ว่าตัวอย่างดังกล่าวเป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมใน 6 สายพันธุหรือไม่ ด้วยการตรวจยีนด้วยไพรเมอร์และโพรบจำนวน 2 ชุด (A และ B) ในขณะที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปนิยมตรวจเพียงยีน *CaMV*35S promoter ที่ได้จากไวรัสพืช *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) และยีน *Nos* terminator ที่ได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* (Bak and Emerson, 2019) ซึ่งเป็นยีนที่นิยมตัดต่อในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Simplex Real-Time แต่งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมถึง 4 สายพันธุ์ คือ Mon87701, Mon87769, Mon 89788 และ Mon87705 ซึ่งไม่มียีน *CaMV*35S promoter และ *Nos* terminator ในโครงสร้างยีน แสดงว่าการตรวจไม่พบทั้งสองยีนดังกล่าวไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นพืชที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ได้มีการรายงานว่าการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน (มีจำนวนตัวอย่างต่อเพลทมากขึ้น) ลดปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ลดปริมาณสารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์ได้ถึง 2 เท่า ลดความคาดเคลื่อนจากการใช้ปิเปต (Pipet precision errors) อีกทั้งยังประหยัดเวลาทำงาน เนื่องจากสามารถตรวจหลายยีนได้ภายในปฏิกิริยาเดียว (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561a; Bak and Emerson, 2019)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ

จากการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR ซึ่งได้มีการออกแบบฉลากสีโพรบที่แตกต่างกันเพื่อลดการซ้อนทับของช่วงคลื่นการดูดกลืนแสง ทำให้สามารถแยกการตรวจจับยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีฉลากสีโพรบ/ Quencher จำนวน 4 ช่วงแสงที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดสอบ ได้แก่ FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ซึ่งมีการปลอดปล่อยสเปกตรัมสูงสุดเท่ากับ 515, 555, 603 และ 674 nm ตามลำดับ นอกจากนี้ การเลือกใช้ Black Hole Quencher (BHQ) ยังช่วยลดการเรืองแสงของพื้นหลังเนื่องจากมีปลดปล่อยความร้อนแทนแสงปกติ และยังเพิ่มอัตราส่วนสัญญาณการตรวจจับยีนเป้าหมายต่อสัญญาณรบกวน ส่งผลให้ความไวในการตรวจจับสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Quencher ชนิด DABCYL หรือ TAMRA (Sigma-Aldrich, 2014) จากการทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 3 ระดับ คือ ที่สภาวะอ้างอิง (1X) ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่ลดลง -30% (0.7X) และความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่เพิ่มขึ้น +30% (1.3X) ผลการทดสอบพบว่าทุกสภาวะสามารถตรวจจำแนกยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* ในชุดการทดลอง A พร้อมทั้งตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* ในชุดการทดลอง B ซึ่งมีความถูกต้องโดยตรวจไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรมอื่นที่ไม่อยู่ในโครงสร้างยีนและตรวจพบทุกซ้ำ (100%) ที่ทำการทดสอบดังแสดงใน **Table 7**

ผลการทดลองพบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบอยู่ที่ระดับ 0.7X ทำให้ค่า C_t ของทั้ง 7 ยีนที่ทดสอบมีค่าเฉลี่ยสูงขึ้นซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แสดงถึงความไวและประสิทธิภาพของปฏิกิริยา Tetraplex Real-time PCR ที่ลดลง **(Table 7)** แต่เมื่อทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ระดับ 1X ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย C_t ของการตรวจจำแยกยีน *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ event Mon87705 มีค่าน้อยที่สุดเป็น 28.34, 29.77 และ 30.15 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ระดับ 1.3X ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย C_t ของการตรวจจำแยกยีน *CaMV35S* promoter และ event Mon89788 มีค่าต่ำที่สุด (ไม่รวมยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง) นอกจากนี้การตรวจจำแยกยีน *rbcS E9* terminator มีค่าเฉลี่ย C_t ไม่แตกต่างกันที่ระดับ 1X และ 1.3X เมื่อทดสอบในวัสดุอ้างอิงรับรอง Mon89788 และ Mon87705 ดังแสดงใน **Table 7** ดังนั้น ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่ระดับ 1X มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR เนื่องจากให้ค่าความไวของการตรวจจำแนกยีนที่มีประสิทธิภาพ และใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าส่งผลให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญของการเพิ่มประสิทธิภาพปฏิกิริยา Multiplex Real-time PCR โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มีจำกัดส่งผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายลดลง (Life technologies, 2012) ซึ่งเป็นสาเหตุให้สภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบต่ำ (0.7X) มีค่า C_t ที่สูงและความไวของปฏิกิริยาลดลง ในทางตรงข้ามความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงเกินไปทำให้เกิดสภาวะ Multiplex Real-time PCR อิ่มตัว เนื่องจากเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มากจนเกิดภาวะอิ่มตัว ส่งผลให้ DNA polymerase ยับยั้งการสังเคราะห์จากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีปริมาณน้อย (Life technologies, 2012) ซึ่งอาจเป็นผลให้ที่สภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบสูง (1.3X) มีค่า C_t และความไวของปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากสภาวะอ้างอิง (1X) สำหรับการตรวจยีน *rbcS E9* terminator อย่างไรก็ตามยีนเป้าหมายแต่ละชนิดมีปริมาณและจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาไม่เท่ากัน ยกตัวอย่างเช่น ยีน *Lectin* เป็นยีนอ้างอิงจำเพาะของถั่วเหลืองซึ่งโดยปกติมีจำนวนสำเนายีนที่สูง การใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่ต่ำเพียง 0.050 และ 0.025 µM ตามลำดับ ก็เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา อีกทั้งยังมีความไวในการตรวจจับที่สูงโดยมีค่า C_t อยู่ในช่วง 21.13 ถึง 29.22 ดังแสดงใน **Table 7** นั่นคือความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมนั้นต้องมีเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในขณะที่ต้องมีปริมาณต่ำพอเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หมดก่อนที่จะเกิดสภาวะดีเอ็นเอสะสมอิ่มตัว

Table 7 The C_t results of various primer-probe concentrations for detection genetically modified soybean by Tetraplex Real-time

Concentrations	Condition of experiment A (C_t)				Condition of experiment B (C_t)			
Target gene	*CaMV35S*	*Nos*	*Cy1Ac*	*Lectin*	*rbcS E9*	Mon87705	Mon89788	*Lectin*
GM-Event	**GTS 40-3-2**				**Mon87769**			
0.7X	32.66 c	31.17 c	ND	24.51 b	33.60 c	ND	ND	30.57 c
1.0X	30.13 b	28.34 a	ND	21.13 a	32.02 b	ND	ND	29.22 b
1.3X	29.64 a	30.14 b	ND	21.78 a	31.78 a	ND	ND	27.95 a
CV (%)	4.45	4.06	-	7.64	2.65	-	-	3.86
GM-Event	**A2704-12**				**Mon 89788**			
0.7X	28.51 c	ND	ND	25.40 c	32.77 b	ND	31.47 c	29.76 c
1.0X	26.54 b	ND	ND	23.28 b	30.97 a	ND	29.44 b	28.18 b
1.3X	25.10 a	ND	ND	21.15 a	30.59 a	ND	28.29 a	26.94 a
CV (%)	5.55	-	-	7.37	3.35	-	4.80	4.63
GM-Event	**Mon 87701**				**Mon87705**			
0.7X	ND	ND	31.00 c	26.37 c	33.38 b	30.96 c	ND	29.04 c
1.0X	ND	ND	29.77 a	23.51 b	31.70 a	30.15 a	ND	28.06 b
1.3X	ND	ND	30.25 b	22.30 a	31.14 a	30.65 b	ND	26.56 a
CV (%)	-	-	1.80	8.29	3.12	1.38	-	4.05

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

ค่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

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

Table 8 The results of C_t, PCR efficiency, and slope on LOD testing for genetically modified soybean by Tetraplex Real-time

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

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

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

ในช่วง Exponential phase นอกจากนี้ผลการทดลองใน **Table 8** ยังสอดคล้องกับค่าความชันของกราฟซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ -2.92 ≥ Slope ≥ -3.91

อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปการตรวจสอบยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Simplex Real-time PCR มักจะมีค่า LOD ในตรวจวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธี Multiplex Real-time PCR ภายใต้สภาวะการทดสอบเดียวกัน โดยตามมาตรฐานของ European Network of GMO Laboratories (2015) รายงานว่าควรมีค่า LOD ไม่เกิน 0.045% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ในขณะที่การจำแนกยีนด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR นั้นเป็นแบบอสมมาตร (asymmetric LOD) เนื่องจากมีปริมาณหรือความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอหลายเป้าหมายในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ขั้นต่ำคือในอัตราส่วน 1:1000 copies หรือ LOD ไม่เกิน 0.1% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามมาตรฐานของ EU (European Network of GMO Laboratories, 2015) แต่ในงานวิจัยที่มีการปรับปรุงสภาวะความเข้มข้นของไพรเมอร์ โพรบ หรือความเข้มข้นของสารเคมีให้เหมาะสมต่อการตรวจจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมพบว่าวิธี Multiplex Real-time PCR มีสามารถในการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณที่ต่ำกว่าวิธี Simplex Real-time PCR (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561a; ปิยนุช และคณะ, 2563) นอกจากนี้ Koppel et al (2012) ได้รายงานการตรวจวิเคราะห์ยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม Mon89788, A5547-127, GTS 40-3-2, A2704-12 และ *lectin* ด้วยวิธี Multiplex Real-Time PCR ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 0.1, 0.01, 0.032, 0.1 และ 0.22% ตามลำดับ โดยห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วไปที่ได้รับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 ได้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ยีน *CaMV35S* promoter และ *Nos* terminator ด้วยวิธี Simplex Real-Time ที่ค่า LOD เท่ากับ 0.1% (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561b) นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร ซึ่งผ่านการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้มีการรายงานผลการตรวจยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ที่ค่า LOD 0.1% เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR มีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 0.1% ซึ่งปฏิกิริยามีประสิทธิภาพเป็นไปตามเกณฑ์การตรวจวิเคราะห์ของมาตรฐานสากล

ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ

Table 9 แสดงผลการแปรผันปริมาณดีเอ็นต้นแบบที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 ng/reaction ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นดีเอ็นเอลดลงจาก 150 เป็น 25 ng/reaction ส่งผลให้ค่า C_t มีแนวโน้มสูงขึ้น ทำให้มีความไวในการตรวจจำแนกยีนลดลง โดยในชุดการทดลอง A พบว่าดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 150 ng/reaction ให้ค่า C_t ดีที่สุดสำหรับการตรวจยีน *Cry1Ac* และ *CaMV35S* promoter เมื่อใช้ Mon87701 และ A2704-12 เป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง โดยมีค่า C_t 31.36 และ 29.10 ตามลำดับ ซึ่งผลสอดคล้องในชุดการทดลอง B โดยที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 150 ng/reaction มีค่า C_t ต่ำที่สุดสำหรับการตรวจยีน *rbcS E9* terminator, event Mon87705 และ event Mon89788 เป็น 32.28 – 33.20, 32.09 และ 32.38 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator และ *Lectin* ให้ค่า C_t ไม่ต่างกันในวัสดุอ้างอิงรับรอง GTS 40-3-2 เมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ng/reaction **(Table 9)** ซึ่งการตรวจยีน *Lectin* โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง Mon89788 ก็ให้ค่า C_t ไม่แตกต่างเช่นเดียวกัน แสดงว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับตรวจคัดแยกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 6 สายพันธุ์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR อยู่ในช่วง 100 - 150 ng/reaction อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นต้นแบบที่มีความเข้มข้นต่ำ 25 - 50 ng/reaction มีความถูกต้องในการตรวจพบยีนลดลง โดยเฉพาะเมื่อใช้ GTS 40-3-2 และ Mon 87701 เป็นวัสดุอ้างอิงรับรอง

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

Table 9 The results of C_t on various DNA template concentrations for genetically modified soybean detection by Tetraplex Real-time

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

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

ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR

จากการขยายผลวิเคราะห์ในตัวอย่างถั่วเหลือง ตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญ และตัวอย่างพืชชนิดอื่น ๆ รวมจำนวน 30 ตัวอย่าง ดังแสดงใน **Table 10** ผลการตรวจคัดกรองยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ที่ได้จากการพัฒนาในงานวิจัยนี้ตรวจพบยีน *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator และ *Lectin* มีความถูกต้อง 100% ในทุกตัวอย่างทดสอบสอดคล้องกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งผ่านการรับรองจากมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025

จากการตรวจคัดกรองยีนด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการบริโภค จำนวน 10 ตัวอย่าง (1031 – 1572) ผลทดสอบไม่พบยีนดัดแปลงพันธุกรรม แต่เมื่อขยายผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่าตรวจพบยีนดัดแปลงพันธุกรรม *rbcS E9* terminator และ event Mon89788 จาก 4 ใน 10 ตัวอย่าง (1031, 1033, 1168 และ 1169) โดยจากโครงสร้างยีนที่ตรวจพบแสดงว่าทั้ง 4 ตัวอย่างดังกล่าวมีการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 ซึ่งไม่มียีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator อยู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างถั่วเหลือง 0354 – 0872 ที่ตรวจพบเพียงยีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator ด้วยวิธี Triplex Real-time PCR ยังตรวจพบยีนดัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นเพิ่มเมื่อขยายผลการตรวจสอบด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR โดยจากผลการทดสอบพบว่า 9 ใน 10 ตัวอย่างตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator ร่วมกับยีน event Mon89788 และอีก 2 ตัวอย่าง (0693 และ 0872) ตรวจพบยีน *Cy1Ac* ดังแสดงใน **Table 10** ซึ่งแสดงถึงการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 และ Mon87701 ตามลำดับ ซึ่งจาก 10 ตัวอย่างในกลุ่มตัวอย่างนี้มีเพียงตัวอย่าง 0445 เท่านั้นที่มีการปะปนเฉพาะถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์

GTS 40-3-2 หรืออาจมีสายพันธุ์ A2704-12 ปะปนร่วมด้วย เนื่องจากตรวจพบทั้งยีน *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator โดยตัวอย่างที่ขยายผลการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดนี้ไม่พบการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87705

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบในตัวอย่างถั่วเหลืองสำหรับทดสอบความชำนาญโดยที่ตัวอย่าง MyKIMIA PT soya V0667 และ USDA PT soya V0151 มีองค์ประกอบของยีนดัดแปลงพันธุกรรม *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator และ event Mon89788 อยู่ในตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ตรวจพบยีน *rbcS E9* terminator เพิ่มเติม ซึ่งเป็นยีนคัดกรองที่มีอยู่ในโครงสร้างของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon89788 นอกจากนี้ยังพบยีน *Cy1Ac* ที่อยู่ในโครงสร้างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon87701 ปะปนอยู่ในตัวอย่าง V0667 อีกด้วย ในขณะที่ตัวอย่าง USDA PT soya V0278 และ USDA PT soya V0150 มีองค์ประกอบของยีน *CaMV35*S promoter, *Nos* terminator, event GTS 40-3-2, event A2704-12 และ event DP305423 ในตัวอย่างทดสอบ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับทดสอบความชำนาญทั้ง 4 ตัวอย่าง มีการตรวจพบยีนคัดกรอง *CaMV35*S promoter และ *Nos* terminator ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจ โดยพบว่าเป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ event GTS 40-3-2 เนื่องจากมียีนทั้งสองอยู่ในโครงสร้างของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามการตรวจพบยีนคัดกรอง *CaMV35*S promoter ร่วมกับยีน *Nos* terminator อาจพบ event A2704-12 ปะปนร่วมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ได้เนื่องจากมียีน *CaMV35*S promoter อยู่ในโครงสร้าง ยกตัวอย่างเช่น V0278 และ V0150 มียีน event A2704-12 แต่ในตัวอย่าง V0667 และ V0151 ไม่พบยีน event A2704-12 ซึ่ง Huber et al (2013) ได้รายงานผลการตรวจตัวอย่างถั่วเหลืองและตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ และการตรวจพบเพียงยีน *CaMV35*S promoter แสดงถึงการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ A2704-12

Table 10 Soybean food and seed, PT samples, and plant samples screened by Tetraplex Real-time compared with Triplex Real-time PCR assay which analyzing by Research and Development of GM Plant & Microbe Detection Lab

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

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

นอกจากนี้ในตัวอย่างทดสอบอื่น ๆ ได้แก่ เมล่อน แป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดกระป๋อง และเมล็ดมะละกอ ตรวจไม่พบยีน *Lectin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง แสดงว่าการไม่มีการปะปนของถั่วเหลืองในการทดสอบ และวิธี Tetraplex Real-time PCR นั้นมีความจำเพาะในการตรวจตัวอย่างที่มีองค์ประกอบจากถั่วเหลืองอย่างมีประสิทธิภาพ **(Table 10)** อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่างซอสถั่วเหลืองนั้นตรวจไม่พบยีน *Lectin* ทั้งในวิธี Triplex และ Tetraplex Real-time PCR เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลายขั้นตอนส่งผลให้ดีเอ็นเอถูกทำลายและไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงตรวจไม่พบยีนดังกล่าว (เกศสุนี และคณะ, 2553; Cardarelli et al., 2005) โดยงานวิจัยนี้ได้ออกแบบให้มีการตรวจยีนคัดกรองซึ่งมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ขั้นต้นว่าถั่วเหลืองหรือพืชชนิดต่าง ๆ มีการดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ สามารถตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างได้อย่างกว้างขวาง แต่หากต้องการตรวจเพื่อแยกว่าเป็นสายพันธุ์ใดโดยละเอียดควรมีการตรวจแบบยีนจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้สามารถตรวจหายีนคัดกรองด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ในชุดการทดลอง A และยังสามารถตรวจยีนจำเพาะของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมในชุดการทดลอง B ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถใช้ทดสอบในตัวอย่างที่มีความหลากหลายทั้งพืชสด และผลิตภัณฑ์แปรรูป

สรุป

การตรวจยีนคัดกรองและยีนจำเพาะด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR สามารถจำแนกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่อนุญาตให้นำเข้า 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Mon87701, A2704-12, GTS 40-3-2, Mon87705, Mon87769 และ Mon89788 โดยใช้ไพรเมอร์-โพรบ 2 ชุด คือ 1) *CaMV35S* Promoter, *Nos* terminator, *Cy1Ac* และ *Lectin* 2) *rbcS E9* terminator, event Mon87705, event Mon89788 และ *Lectin* ซึ่งชุดไพรเมอร์และโพรบมีความเข้มข้นเหมาะสมที่ระดับ 1X ขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ต่ำสุดของวิธีเท่ากับ 0.1% และมีปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในช่วง 100 – 150 ng/reaction จากการขยายผลตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Tetraplex Real-time PCR ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการบริโภคจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบการปะปนของยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้เพิ่มจากเดิมถึง 65% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Triplex Real-time PCR ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตรวจเพียงยีน *CaMV35S* promoter และ *Nos* terminator ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปไม่เพียงพอสำหรับตรวจสอบการปะปนของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม โดยงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจจำแนกยีนถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง และสามารถตรวจสอบเพื่อรองรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ที่จะอนุญาตให้มีการนำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้เทคนิคตรวจจำแนกยีนสี่ชนิดในปฏิกิริยาเดียวยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้มีแผนการขยายผลเพื่อขอการรับรองวิธีการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 เพื่อให้บริการแก่ผู้มาใช้บริการทั้งภาครัฐ และภาคเอกชนต่อไป

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ตลอดโครงการ และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย รวมทั้งบุคลากรในกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bustin, SA., V. Benes, JA. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, MW. Pfaffl, GL. Shipley, J. Vandesompele, and CT. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry. 55: 611–622.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rogers, 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.

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

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

Sigma-Aldrich. 2014. Primers and fluorescent probes for quantitative Real-time PCR and other applications. World Headquarters St. Louis, Missouri, US.

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