

การทดสอบความใช้ได้ของการตรวจจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603
และยืนยันอ้างอิงพีชด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

Validation of the Method for Event Specific Mon810 and NK603
and Endogenous Gene Identification by using Multiplex
Real-time PCR Technique

ปิยนุช ศรชัย^{1*} วีระ ชูแก้ว^{2/} ณัฐวดี บุญทองดี^{1/} จิตติรัตน์ อัครมงคลศิริ^{1/} ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
Piyonuch Sornchai^{1*} Teera Chookaew^{2/} Nattawadee Buntongdee^{1/} Thitirut Assawamongkolsiri^{1/}
Khanitha Wongwathanarat^{1/}

Received 31 Jul 2019/Revised 21 Sept 2019/Accepted 02 Oct 2019

ABSTRACT

Genetically modified maize has been widely accepted for commercialization. The most popular approved events are lepidopteran insect resistance (Mon810) and glyphosate herbicide tolerance (NK603). However, importation conditions of GM products in some countries requires identification of the GM event and biosafety assessment. At present, the international laboratory analyzes GM event by using simplex real-time PCR technique which is lengthy, contains many steps and is prone to contamination. The multiplex real-time PCR had been developed for detecting multiple modified genes at the same time. We validated this method for GM maize: Mon810 and NK603 events detection. The results revealed that Mon810, NK603 and *HMG* primers and probes were absolutely specific to Mon810 and NK603 maize. The parameters of this multiplex real-time PCR method were within the acceptable parameter standard including 97 to 112 percentage of PCR efficiency, -3.38 to -3.07 of slope, 0.99 of linearity (R^2), limit of detection in 0.1 percentage and no false positive or negative results. In summary, multiplex real-time PCR in this study can be used for the events screening method of GM maize and maize products

Key words: genetically modified maize, multiplex real-time PCR technique, Mon810, NK603, validation

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture

^{2/} ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

^{2/} Suratthani Oil Palm Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture

* Corresponding author: butakurogo@hotmail.com

บทคัดย่อ

ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้รับการยอมรับให้มีการขายเชิงพาณิชย์ในหลายประเทศ โดยสายพันธุ์ที่ได้รับการอนุญาตให้ปลูกมากที่สุด ได้แก่ ข้าวโพดทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (NK603 event) และต้านทานแมลง (Mon810 event) แต่การนำเข้าสินค้าเกษตรของบางประเทศ จะต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ และผ่านการตรวจวิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรมก่อน ปัจจุบันห้องปฏิบัติการระดับสากลตรวจจำแนกสายพันธุ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค simplex real-time PCR ซึ่งมีขั้นตอนในการตรวจสอบหลายขั้นตอนส่งผลให้มีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้สูง และใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนาน จึงได้พัฒนาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค multiplex real time PCR โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการดังกล่าว ผลการทดลองพบว่า เทคนิค multiplex มีความจำเพาะในการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ได้ถูกต้อง 100% ค่าพารามิเตอร์ของปฏิกิริยาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้ ค่า PCR efficiency 97-112% ค่า linearity (R^2) และค่า Slope เท่ากับ 0.99 อยู่ในช่วง -3.38 ถึง -3.07 ตามลำดับ และระดับการปนเปื้อนต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 0.1% และไม่พบการเกิด false positive และ false negative สรุปได้ว่าเทคนิคการตรวจสอบ Mon810 NK603 และยีน HMG รวมกันในปฏิกิริยาเดียว แบบ multiplex real-time PCR สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจจำแนกยีนของตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดได้

คำสำคัญ: ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม, multiplex real-time PCR, Mon810, NK603, การทดสอบความใช้ได้

บทนำ

ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเป็นพืชที่มีการปลูกในเชิงพาณิชย์มากที่สุด 232 สายพันธุ์ โดยข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 ซึ่งประกอบด้วยยีน *Cry1A(b)* มีความสามารถต้านทานต่อแมลง และข้าวโพด NK603 ที่ประกอบด้วยยีน *cp4epsps* มีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และได้รับการยอมรับให้สามารถวางขายในตลาดสหภาพยุโรปได้ (Kramkowska *et al.*, 2013; ISAAA, 2018) แต่อย่างไรก็ตามการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรในบางประเทศจะต้องระบุสายพันธุ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (event) หรือต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์รายละเอียดของพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น โปรโมเตอร์ เทอร์มิเนเตอร์ ยีนต่าง ๆ เช่น construct หรือ event specific เป็นต้น

สำหรับการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นมาตรฐานสากลของสหภาพยุโรป (Joint Research Center-European Commission; JRC-EU) ได้แบ่งระดับของการตรวจวิเคราะห์เป็น 3 ระดับ คือ 1) การตรวจคัดกรอง (screening method) ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ หรือเทอร์มิเนเตอร์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมเกือบทุกชนิด แต่ไม่สามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม 2) การตรวจวิเคราะห์ยีนที่ถูกถ่ายเข้าในพืชดัดแปลงพันธุกรรม (target or construct gene) ซึ่งมีความจำเพาะต่อลักษณะของพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นกลุ่ม ๆ เช่น ยีน *Cry1Ab* ยีน *cp4epsps* เป็นต้น 3) การตรวจจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Event specific) จะตรวจสอบบริเวณเอกลักษณ์ คือ ตำแหน่งที่ยีนถูกถ่ายเข้าไปต่อกับส่วนของจีโนมพืช จึงมีความจำเพาะต่อชนิดพืชดัดแปลงพันธุกรรมสูง ซึ่งแต่ละระดับของการตรวจวิเคราะห์จะมีค่าใช้จ่ายที่ต่างกันด้วย

ปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการระดับสากลสามารถตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR ซึ่งเป็นการตรวจสอบยีนพร้อมกัน 3 ยีน ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์

ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจต่างกัน และ โพรบที่ติดด้วย Reporter ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแปลแสงที่ความยาวคลื่นที่ต่างกัน แต่สำหรับการตรวจจำแนกชนิดพืชตัดแปลงพันธุกรรมยังคงใช้เทคนิค simplex real-time PCR (JRC-EURL-GMFF- ENGL, 2011) เป็นการตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาแต่ละยีนแยกกัน ซึ่งต้องใช้เวลา สารเคมี และต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์มาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค multiplex real-time PCR มาใช้ในการตรวจจำแนกยีนข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 พร้อมกัน ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช และการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ (Validation) ประกอบด้วย ความแม่นยำ ความถูกต้อง ประสิทธิภาพของวิธีการ และขีดจำกัดของวิธีจะต้องอยู่ในมาตรฐานที่กำหนดของวิธีการนั้น ๆ ตามมาตรฐานระบบ ISO17025

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุอ้างอิง ตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษานี้ใช้วัสดุอ้างอิง (certificate reference material) ของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 NK603 ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของพืชตัดแปลงพันธุกรรมในระดับที่แตกต่างกัน Bt11 และ Bt176 ที่ระดับการปนเปื้อน 5% และ ถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ RR (GTS 40-3-2) ที่ระดับการปนเปื้อน 10% ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานจาก Institute for Reference Materials and Measurements เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Table 1) และสำหรับตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดกระป๋อง คริมข้าวโพด แป้งข้าวโพด และเกล็ดข้าวโพดได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชตัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

Table 1 GM certified reference materials information in this study

Plant	Source/code	Event	%GM (+ uncertainty)	Event specific	
				Mon810	NK603
Maize	ERM-BF413ak	Mon810 ak	<0.09	+	-
	ERM-BF413ck	Mon810 ck	0.49 + 0.1	+	-
	ERM-BF413ek	Mon810 ek	1.98 + 0.15	+	-
	ERM-BF413gk	Mon810 gk	9.9 + 0.5	+	-
	ERM-BF415a	NK603 a	<0.4	-	+
	ERM-BF415b	NK603 b	0.1 + 0.04	-	+
	ERM-BF415c	NK603 c	0.49 + 0.05	-	+
	ERM-BF415d	NK603 d	0.98 + 0.07	-	+
	ERM-BF411f	Bt176	5 + 0.18	-	-
	ERM-BF412f	Bt11	4.89 + 0.21	-	-
Soybean	ERM-BF410k	GTS 40-3-2	10 + 0.7	-	-

Notes: + (positive) = Event specific Mon810 or NK603 should detected, - (negative) = Event specific Mon810 or NK603 should not detected

2. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ

สกัดดีเอ็นเอของวัสดุอ้างอิง ตัวอย่างพืช และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทดสอบโดยตัดแปลงจากวิธี GeneScan ตามกรรมวิธีของ

ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัสดุอ้างอิงตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำดีเอ็นเอมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3. ศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค real-time PCR แบบ simplex

นำดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (positive control) (Table 1) และข้าวโพดที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม (negative control) จากห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืช และจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบดังแสดงใน Table 2 ซึ่งมีตำแหน่งของการเข้าจับไพรเมอร์และโพรบที่แตกต่างกัน สำหรับการตรวจสอบยีน Event specific Mon810 และ NK603 (Figure 1) และยีนอ้างอิงพืชสำหรับตรวจสอบข้าวโพดที่แตกต่างกัน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *Zein* ยีน *Alcohol dehydrogenase (Adh)* และยีน *High Mobility Group of maize (HMG)* การตรวจสอบด้วยเทคนิค Simplex Real-time

PCR ใช้สภาวะปฏิกิริยา initial denaturation ที่ 95°C. เป็นเวลา 10 นาที denaturation อุณหภูมิ 95°C. เป็นเวลา 30 วินาที annealing และ extension อุณหภูมิ 60°C. เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ ซึ่งในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัม โดยในปฏิกิริยา Real-time PCR ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้ น้ำ (PCR grade; Roche, Switzerland) ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้นไพรเมอร์และโพรบ 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร สาร Light Cycler® 480 Probes Master (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 2x ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (Sornchai *et al.*, 2018) ตรวจสอบผลค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากเครื่อง Real time PCR รุ่น LC480 Cycler (Roche Technologies, Santa Clara, CA) เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองเทียบกับ Table1

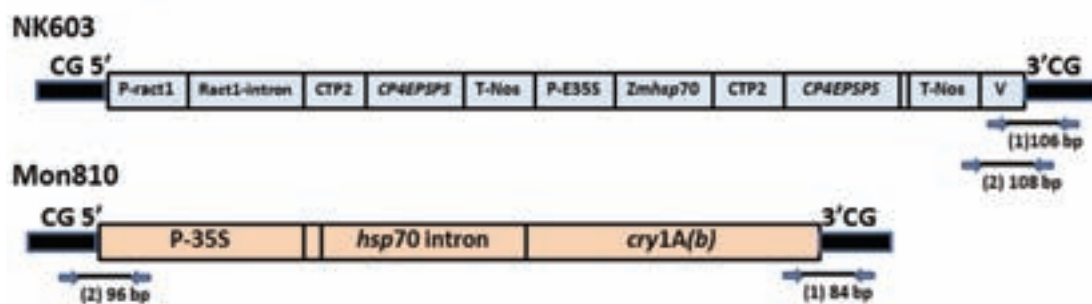


Figure 1 Construct maps of NK603 and Mon810 GM Maize events referring to the region amplification of event specific Real-time PCR primer and probes (1: the amplification area of 1st primer and probe, 2: the amplification area of 2nd primer and probe)

Table 2 Oligonucleotide sequences of primers and probes of event specifics and endogenous gene

Gene	GM event	Primer/ Probe	Sequence (5'-3')	Reference
Event -Specific	NK603 (1)	NK603-F	GACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGC	Shrestha <i>et al.</i> , (2010)
		NK603-R	CGAGAAGAGATAACAGGATCCACTC	
		NK603-P	FAM-TACCACGCGACACACT-BHQ1	
	NK603 (2)	NK603-F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		NK603-R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
		NK603-P	FAM-TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC-BHQ1	
	Mon810 (1)	Mon810-F	CACTTCTCCTTGGACATCGATG	Shrestha <i>et al.</i> , (2010)
		Mon810-R	GCAAGCAAATTCGAAATGAA	
		Mon810-P	HEX -AGGACTTTCGGTAGCCTT-BHQ1	
	Mon810 (2)	Mon810-F	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		Mon810-R	GCCACCTTCCTTTCCACTATCTT	
		Mon810-P	HEX-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC-BHQ1	
Endogenous gene	Zein	Zein-F	GCTTGCCAGCTTGATGGCGT	Shrestha <i>et al.</i> , (2010)
		Zein-R	GGCATCGTCTGAAGCGGTAAGG	
		Zein-P	Cy5-ATGCTGCAGCAACTG-BHQ3	
	Adh	Adh-F	CCAGCCTCATGGCCAAAG	Mazzara <i>et al.</i> , (2005); JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		Adh-R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG	
		Adh-P	Cy5CTTAGGGGACAGACTCCCGTGTTCCTBHQ3	
	HMG	HMG-F	TTGGAAGTAAATCTCGTGCTGA	Delobel <i>et al.</i> , (2008); JRC-EURL-GMFF-ENGL (2011)
		HMG-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT	
		HMG-P	Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ3	

Noted: F= Forward primer, R= Reverse primer, P=probe, (1)= the first primer and probe set, (2) = the second primer and probe set

4. ทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (Practicability and Specificity) ต่อปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม events ต่าง ๆ ได้แก่ Bt 11, Bt176, Mon810 และ NK603 ที่มีโครงสร้างของ

ยีน และเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนในระดับต่าง ๆ และตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ข้าวโพด มาทดสอบความเหมาะสม และความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ และโพรบต่อปฏิกิริยา multiplex real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3 นำมาตรวจวิเคราะห์ยีน Event specific

Mon810 Event specific NK603 และยีนอ้างอิง ข้าวโพด (ยีน *HMG*) ด้วยเทคนิค real-time PCR แบบตรวจตัวอย่างทีละยีน (simplex) เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์แบบ multiplex ที่ตรวจยีน Event specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงข้าวโพด *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกัน ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ บันทึกค่า Crossing threshold (Ct) ที่ได้จากปฏิกิริยาของแต่ละวิธี นำค่า Ct ที่ได้มาตรวจสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Ct ที่ได้จากวิธี multiplex กับ วิธี simplex ของแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Pair Sample T-test และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และโพรบจากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนใน Table 1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder *et al.*, 2014

5. การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เจือจางดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยน้ำบริสุทธิ์ (deionized water) ที่สัดส่วน 1:2, 1:4, 1:16 และ 1:256 โดยแต่ละลำดับทำ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 4 รอบ นำมาทดสอบปฏิกิริยา multiplex real-time PCR หลังจากนั้นนำผลของค่า Ct ของแต่ละยีน Event specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืช (ยีน *HMG*) มาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Broeder *et al.*, (2014) จากสมการของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานนำมาคำนวณหา ค่า PCR efficiency, ค่า linearity (R^2) และค่า slope จากนั้น นำค่าดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับค่าพารามิเตอร์มาตรฐานของ JRC-EURL

6. การทดสอบหาการปนเปื้อนและจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีน Event specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (Limit of detection: LOD)

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (deionized water) ในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.002 ถึง 2% โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR จำนวน 12 ซ้ำ ตามกรรมวิธีการทดสอบ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR หาค่าระดับ การปนเปื้อนต่ำที่สุดของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ และนำเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนระดับต่ำที่สุดนั้นมาหาจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ตามวิธีการของ Broeder *et al.*, 2014

7. การทดสอบความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 0.1% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ปรับให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบยีน Event specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR 4 ครั้ง ครั้งละ 12 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่า Ct โดยคำนวณหาค่าความเที่ยงของวิธีการตรวจสอบด้วยการคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) ของค่า Ct แต่ละยีน สำหรับค่าความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบ คำนวณโดยใช้ค่าเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (Coefficient of

variation: CV) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ของการตรวจสอบแต่ละครั้ง และรวมทั้ง 4 ครั้ง (Broeders *et al.*, 2014)

8. การทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

เตรียมดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ที่ระดับการปนเปื้อน 2% ผสมดีเอ็นเอทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยานำดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีน Event specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน HMG ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR จำนวนตัวอย่างละ 12 ซ้ำ บันทึกค่า Ct เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยได้จากดีเอ็นเอเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

9. การตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย multiplex real-time PCR

ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์คัดกรอง พร้อมตรวจยีนอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาเดียวกัน แบบ multiplex real-time PCR เตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างแบบ blind sample ระดับความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาตรวจสอบยีน Event specific Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีน HMG ด้วยการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบผลการทดสอบกับผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค real-time PCR แบบ simplex

จากการศึกษาตำแหน่งและชนิดของไพรเมอร์และโพรบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค simplex real-time PCR พบว่าไพรเมอร์และโพรบทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ (Table 2) สามารถใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมคิดเป็น 100% กล่าวคือ ไพรเมอร์และโพรบของยีนอ้างอิงข้าวโพดทั้งสามยีน *Zein Adh* และ *HMG* สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอและสามารถตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ในตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม และข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม แต่พบว่า เครื่องสามารถตรวจจับสัญญาณได้แตกต่างกันดังนี้ สัญญาณของยีน *HMG* และ *Adh* ตรวจพบเร็วที่สุด (ค่า Ct น้อยที่สุด) โดยมีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 25.84 และ 25.65 ซึ่งสามารถตรวจจับสัญญาณได้เร็วกว่า ยีน *Zein* ที่มีค่า Ct เฉลี่ยเท่ากับ 28.33 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนไพรเมอร์และโพรบของยีน Mon810 ทั้ง 2 ชุด สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 ในทุกระดับ ยกเว้นในระดับการปนเปื้อนที่ต่ำกว่า 0.09% แต่ไม่พบสัญญาณในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK603 และข้าวโพดที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ พบว่า ตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 2 ที่อยู่บริเวณด้านปลาย 5' สามารถตรวจพบสัญญาณได้ดีกว่าตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ที่อยู่บริเวณด้านปลาย 3' ถึง 2 cycles (ค่า Ct น้อยกว่า 2 cycles) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของไพรเมอร์ เช่น อุณหภูมิ ความยาว และ ค่า GC content (Bustin and Nalon, 2004) และลักษณะทางกายภาพของโพรบและไพรเมอร์ เช่น การเกิด hairpin และการเกิด primer dimer (Vallone and Butler, 2004) ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ตำแหน่ง Reverse มีค่า GC content ต่ำเพียง 38.10% และโพรบของชุดที่ 1 มีความยาวเพียง 18 ลำดับเบส จึงทำให้มีอุณหภูมิในการจับเกาะดีเอ็นเอต่ำเพียง 54°C. ซึ่งไม่สอดคล้องกับอุณหภูมิของไพรเมอร์ที่สูงถึง 60°C.

สำหรับไพรเมอร์และโพรบของยีน NK603 ทั้ง 2 ชุด ให้ผลสอดคล้องกับยีน Mon810 คือ สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในข้าวโพดดัดแปลง พันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ในทุกระดับการปนเปื้อน แต่ไม่พบสัญญาณในข้าวโพดดัดแปลง พันธุกรรม Mon810 และข้าวโพดไม่ดัดแปลง พันธุกรรม นอกจากนี้ พบว่า ไพรเมอร์และโพรบ ชุดที่ 2 สามารถตรวจพบสัญญาณได้ดีกว่า ตำแหน่งไพรเมอร์และโพรบชุดที่ 1 ถึง 3 cycles โดย พบว่า โพรบของชุดที่ 1 มีความยาวเพียง 16 ลำดับเบส จึงทำให้มีอุณหภูมิในการจับเกาะ ดีเอ็นเอต่ำเพียง 53.5°ซ. ซึ่งไม่สอดคล้องกับค่า อุณหภูมิที่ไพรเมอร์สามารถเข้ามายึดเกาะดีเอ็นเอได้ (Tm) ของ ไพรเมอร์ที่สูงถึง 62°ซ. โดยวีระพงศ์ (2557) กล่าวว่า ปัจจัยที่สำคัญที่สุดของการเพิ่ม ปริมาณยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR คือ การออกแบบไพรเมอร์และโพรบให้ถูกต้อง และมีความจำเพาะต่อยีนนั้น ๆ ที่ต้องการตรวจสอบและ หลีกเลี่ยงการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ เช่น การเกิด dimer หรือ การเกิด hairpin loop หรือ การเกิด self-dimer เป็นต้น นอกจากนี้ Bustin and Nalon (2004) ได้รายงานว่าการออกแบบ โพรบควรให้มีความสามารถที่จะยึดเกาะดีเอ็นเอ ในช่วงอุณหภูมิ (Tm) อยู่ในช่วง 68 ถึง 70°ซ. หรือ มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิ (Tm) ของไพรเมอร์ประมาณ 10°ซ.

จากผลการตรวจสอบตำแหน่งและชนิด ของไพรเมอร์และโพรบของยีน Event specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืชทั้ง 3 ยีน คือ ยีน *Zein* ยีน *HMG* และ ยีน *Adh* สามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งและลำดับเบสของไพรเมอร์ และโพรบมีผลต่อการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลง พันธุกรรม Mon810 และ NK603 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al.*, (2015) ที่กล่าวว่า การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเป็น ปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค real-time PCR นอกจากนี้ การทดสอบความใช้ได้ของโพรบและ ไพรเมอร์ก่อนจะใช้ก็มีความสำคัญเช่นกันถึงแม้ว่า จะใช้โปรแกรมที่น่าเชื่อถือในการออกแบบ และ

จากการทดลองเลือกใช้ไพรเมอร์และโพรบยีน Event specific Mon810 และ Event specific NK603 ชุดที่ 2 และยีนอ้างอิงพืชทั้ง 3 ยีน มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ถึงแม้ว่ายีน *Adh* จะให้ค่าในการตรวจสอบต่ำกว่ายีนอื่น ๆ เพราะการ ตรวจสอบยีนอ้างอิงพืชในปฏิกิริยาแบบ multiplex real-time PCR เป็นการควบคุมคุณภาพการ ตรวจสอบเท่านั้น โดยเป้าหมายหลักของการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม คือ ยีน Event specific Mon810 และ NK603 (Hugo *et al.*, 2002) โดยในการทดลองนี้เลือกยีน *HMG* เพื่อ ทำงานร่วมกับการตรวจสอบยีน Event specific Mon810 และ NK603 ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

2. ผลการทดสอบความเหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (Practicability and Specificity) ต่อปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์และโพรบต่อตัวอย่างวัสดุอ้างอิงข้าวโพด ดัดแปลงพันธุกรรม events ต่าง ๆ ได้แก่ Mon810, Bt11, Bt176, NK603 และตัวอย่าง พืชที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค simplex real-time PCR เปรียบเทียบกับ multiplex real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์และโพรบที่เลือกใช้ในปฏิกิริยามีความ จำเพาะกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจสอบคิดเป็น 100% เมื่อตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR โดยไพรเมอร์และ โพรบของ Mon810 สามารถตรวจจับได้ในข้าวโพด ดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 ทุกระดับ การปนเปื้อนตั้งแต่ 0.5% ขึ้นไป แต่ไม่พบสัญญาณ ดังกล่าวในการตรวจสอบข้าวโพดไม่ดัดแปลง พันธุกรรมและพืชชนิดอื่น ๆ ในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์และโพรบของ NK603 สามารถตรวจจับ ได้ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ NK603 ในทุกระดับตั้งแต่ 0.1% ขึ้นไป และไม่สามารถ ตรวจจับสัญญาณจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิด อื่นและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่นเดียวกัน สำหรับยีน

อ้างอิงพีช (HMG) พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณได้ในตัวอย่างข้าวโพดทุกตัวอย่างแต่ไม่พบสัญญาณในตัวอย่างพืชชนิดอื่น ๆ (Table 3) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ไพรเมอร์และโพรบที่นำมาใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603

เมื่อเปรียบเทียบค่า Ct ที่ได้จากการตรวจจับสัญญาณด้วยเทคนิค simplex และ multiplex real-time PCR (Table 3) พบว่า เทคนิค multiplex real-time PCR มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์จำแนกยีนเทียบเท่ากับเทคนิค simplex real-time PCR ซึ่งเมื่อตรวจสอบค่า Ct เฉลี่ย ยีน Event specific NK603 ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ทุกระดับการปนเปื้อนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค simplex ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับค่า Ct เฉลี่ยของการตรวจสอบยีน Event specific NK603 ด้วยเทคนิค multiplex แต่สำหรับการตรวจสอบยีน Event specific Mon810 พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค simplex real-time PCR ในระดับการปนเปื้อนตั้งแต่ <0.09 ถึง 10%

โดยค่า Ct เฉลี่ยของยีน Event specific Mon810 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex มีค่าต่ำกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค simplex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์จากความถูกต้องของการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับข้อมูลองค์ประกอบของยีนใน Table 1 แล้วนำมาหาค่า False negative rate และ False positive rate จากวิธีของ Broeder *et al.*, (2014) พบว่า การใช้เทคนิค multiplex real time PCR ตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 สามารถตรวจสอบได้ถูกต้องและไม่พบ False negative และ False positive

นอกจากนี้ ยังพบว่า เทคนิค multiplex real-time PCR มีข้อดีหลายประการคือ ประหยัดเวลาในการทำงาน ตรวจสอบได้หลายยีนในครั้งเดียวกัน และใช้สารเคมีน้อยกว่าหรือเทียบเท่ากัน ลดความเสี่ยงของผลการทดสอบจากการปฏิบัติงานหลายครั้ง (Lab Life-Real-time PCR, 2015) และสามารถตรวจคัดกรองสองยีนพร้อมกับการตรวจยีนจำเพาะพีช เพื่อการควบคุมคุณภาพได้ในคราวเดียวกัน (ปิยรัตน์และคณะ, 2562; Alary *et al.*, 2003; Debode *et al.*, 2013)

Table 3 Comparison of Event specific Mon810 and NK603 and endogenous gene detection by using simplex and multiplex real-time PCR

Event	GM Contaminated (%)	Ct Mean of								
		Event specific						Endogenous gene		
		Mon810			NK603			HMG		
		Simplex	Multiplex	T-test	Simplex	Multiplex	T-test	Simplex	Multiplex	T-test
Mon810 ak	<0.09	ND	37.62	*	ND	ND	ns	28.82	27.65	ns
Mon810 ck	0.5	35.44	34.25	*	ND	ND	ns	28.52	27.47	ns
Mon810 ek	2	33.76	31.8	*	ND	ND	ns	28.40	27.94	ns
Mon810 gk	10	31.24	28.04	*	ND	ND	ns	28.48	27.92	ns
NK603 a	0.1	ND	ND	ns	36.60	37.19	ns	28.27	28.14	ns
NK603 b	0.5	ND	ND	ns	33.30	33.92	ns	27.94	28.32	ns
NK603 c	1	ND	ND	ns	31.97	31.98	ns	28.32	27.98	ns
NK603 d	2	ND	ND	ns	30.31	29.72	ns	28.23	27.97	ns
Bt176	5	ND	ND	ns	ND	ND	ns	25.43	24.77	ns
Bt11	5	ND	ND	ns	ND	ND	ns	25.31	24.89	ns
Non-GM Maize	0	ND	ND	ns	ND	ND	ns	24.33	25.07	ns

Notes: ND=Not detected, ns= non-significant, * = significant at *p* value 0.05

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

การทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช HMG ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR ผลการทดลองพบว่า เทคนิค multiplex real-time PCR สามารถตรวจวัดได้ในระดับการเจือจางดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:16 หรือระดับการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตั้งแต่ 0.125% ถึง 2% โดยอัตราการเจือจางที่อัตรา 1: 256 ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้โดยค่า Ct ที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของปริมาณสำเนา ดีเอ็นเอต้นแบบ (copy number) ที่ลดลงเมื่อนำค่า Ct ที่ได้ของแต่ละระดับการเจือจางมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ตามวิธีของ Del Gaudio et al., (2012) พบว่าค่า slope ของการสังเคราะห์ยีน Event specific

Mon810 และ NK603 และ HMG เฉลี่ย คือ -3.10 -3.07 และ -3.38 ตามลำดับ ค่าประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา (PCR efficiency) ของปฏิกิริยายีน Event specific Mon810 และ NK603 และ HMG เท่ากับ 110.17 111.71 และ 97.63 ตามลำดับ (Table 4) และมีค่าสัมประสิทธิ์ของการเกิดปฏิกิริยาของทุกยีนเท่ากับ 0.99 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR (Broeders et al., 2014) ดังนั้น ค่า Slope -3.1 ถึง -3.6 ค่า PCR efficiency เท่ากับ 80 ถึง 120 และค่าสัมประสิทธิ์ของการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.99 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ร่วมกับยีนอ้างอิงพืช HMG ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำแนกยีน Event specific Mon810 และ NK603

Table 4 The PCR efficiency and slope of event-specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene that were detected by using multiplex real-time PCR

Dilution Rate GM: total volume	% GMO level	DNA conc.	Target Copies No.	Ct of target gene detection		
				Mon810	NK603	HMG
1:0	2%	100	7,339.4	28.040.12	27.180.15	24.230.02
1:2	1%	50	3,669.7	30.900.13	30.180.12	27.460.08
1:4	0.5%	25	1,834.9	34.240.25	33.270.36	31.320.14
1:16	0.125%	6.25	458.7	37.210.32	36.300.27	34.220.61
1:256	0.008%	0.39	28.67	-	-	37.540.4
PCR efficiency (%)				110.17	111.71	97.63
Slope				-3.10	-3.07	-3.38

4. ผลการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนและจำนวนสำเนา (copy number) ดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของยีน Event specific ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ (limit of detection: LOD)

การทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือ (LOD) ของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลง

พันธุกรรม Event specific Mon810 และ NK603 พร้อมกับยีน *HMG* ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR พบว่า สามารถตรวจจับสัญญาณในตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตั้งแต่ 369.7 - 7,339 Copies ได้ครบทั้ง 12 ซ้ำ ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 73.39 Copies

ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณของยีน Event specific Mon810 และ NK603 ได้ครบทุกซ้ำ ยกเว้น ยีน *HMG* ซึ่งเป็นยีน endogenous สามารถตรวจพบสัญญาณได้ตั้งแต่ 7.34-7,339 Copies เป็นต้นไป

สามารถสรุปได้ว่า การปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม Mon810 และ NK603 ที่ระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือคือ 0.1 % (Table 5)

Table 5 The limited of detection of Event specific Mon810 and NK603 and *HMG* gene were detected by using multiplex real-time PCR

GM Contaminated	DNA copy No.	Ct average	Replications				% detection	Ct average	SD	RSD (%)
			1	2	3	4				
2%	7,339	Mon810	31.14	31.52	31.78	31.80	100 %	31.56	0.27	0.84
		NK603	31.53	31.51	31.88	31.13	All gene	31.51	0.26	0.84
		<i>HMG</i>	25.54	25.83	25.59	25.99		25.74	0.18	0.71
0.2%	733.9	Mon810	35.34	35.61	35.63	35.46	100 %	35.51	0.12	0.33
		NK603	34.81	34.66	34.60	34.85	All gene	34.73	0.10	0.30
		<i>HMG</i>	29.10	29.61	29.54	29.47		29.43	0.19	0.66
0.1%	369.7	Mon810	36.76	37.34	37.40	37.69	100%	37.29	0.33	0.90
		NK603	36.17	37.32	37.19	36.82	All gene	36.87	0.45	1.21
		<i>HMG</i>	30.67	30.41	30.74	30.80		32.66	0.15	0.46
0.02%	73.39	Mon810	nd	nd	nd	nd	Only	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	<i>HMG</i> 100%	-	-	-
		<i>HMG</i>	34.61	34.72	34.75	34.02		34.52	0.34	0.99
0.002%	7.339	Mon810	nd	nd	nd	nd	Only	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	<i>HMG</i> 100%	-	-	-
		<i>HMG</i>	36.16	35.93	36.71	36.60		36.35	0.32	0.87
0.0002%	0.734	Mon810	nd	nd	nd	nd	0%	-	-	-
		NK603	nd	nd	nd	nd	All	-	-	-
		<i>HMG</i>	nd	nd	nd	nd	gene	-	-	-

Noted: nd = not detected

5. ผลการทดสอบความเที่ยงตรง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR

การทดสอบความเที่ยงตรง และความแม่นยำของวิธีนั้น บ่งบอกถึงความสามารถของวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 โดยค่าความเที่ยงตรง และค่าความแม่นยำของวิธีสามารถตรวจสอบได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD) และค่าเปอร์เซ็นต์เบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) ของการหาปริมาณยีน Event specific Mon810 และ NK603 และยีน

อ้างอิงพืช *HMG* จากการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 4 รอบ ผลการทดลองพบว่า % RSD และ SD ของการหาปริมาณ Event specific Mon810 มีค่าเท่ากับ 1.84 และ 0.67% และ % RSD และ SD ของการหาปริมาณ Event specific NK603 มีค่า 1.63 และ 0.61% (Table 6) โดยค่าความเที่ยงตรงและความแม่นยำของทั้งสองยีนมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ของการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR (Broeders *et al.*, 2014) คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ RSD ต้องไม่เกิน 25% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Del Gaudio *et al.*, (2012) ที่ได้รายงานว่า

การตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ ต้องมีความเที่ยงในการตรวจสอบไม่ควรเกิน 25% แสดงว่า เทคนิค multiplex real-time PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 มีประสิทธิภาพคงที่ นอกจากนี้ อาจกล่าวได้ว่า อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ รวมถึงวิธีการที่เกี่ยวข้อง เช่น การเตรียมตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอ มีความสม่ำเสมอสามารถทำให้ผลการตรวจจำแนกยีนที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ

Table 6 The repeatability and reproducibility of event-specific Mon810 and NK603 and HMG gene detection by using multiplex real-time PCR

Sample	Replicate	Ct average		
		Mon810	NK603	HMG
Mon810 : NK603 0.1% GM contaminated	1	36.33	36.80	27.93
	2	36.93	37.50	27.77
	3	37.16	37.58	27.73
	4	35.72	36.21	27.69
	Mean	36.51	37.10	27.76
	Min	35.71	36.21	27.51
	Max	37.36	37.80	27.93
	SD	0.67	0.61	0.14
	RSD (%)	1.84	1.63	0.49

6. ผลการทดสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา multiplex real-time PCR

จากการทดสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นในปฏิกิริยา real-time PCR ที่แตกต่าง 50 100 150 และ 200 นาโนกรัม ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON 810 และ NK603 ในระดับที่ต่าง ๆ กัน ส่งผลให้การตรวจจับสัญญาณแตกต่างกัน (ค่า Ct ที่แตกต่างกัน) ในทุก ๆ ยีน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 นาโนกรัม ให้ค่า Ct ที่ได้จากการตรวจสอบยีน Event specific Mon810 เท่ากับ 33.39±0.06 และยีน Event specific NK603 เท่ากับ 35.12±1.19 ซึ่งมีค่ามากที่สุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับค่า Ct ที่ได้

จากความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 100 150 และ 200 นาโนกรัม ที่มีค่า Ct เฉลี่ยจากการตรวจสอบยีน Event specific Mon810 เท่ากับ 31.27±1.06 และยีน Event specific NK603 เท่ากับ 32.33±1.27 นอกจากนี้ ยังพบว่า ในทุกระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นให้ค่า Ct ของยีน HMG ซึ่งเป็น endogenous gene ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้และเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR คือ 100 นาโนกรัม Cankar *et al.*, (2006) และ Turkec *et al.*, (2015) รายงานว่า ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบ คือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ Real-time PCR โดยค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จะแปรผกผันกับค่า Ct ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นสูงจะมีค่า Ct ต่ำ และในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นในปฏิกิริยาต่ำจะได้ค่า Ct สูง ขณะที่ Ellison *et al.*, (2006) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยาใน Real-time PCR แต่จำนวนสำเนา ในดีเอ็นเอเริ่มต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้น ถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อย แต่ถ้ามีจำนวนสำเนา (copy number) ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบระดับตั้งแต่ 10 สำเนาขึ้นไปก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยา real-time PCR ได้ตามทฤษฎี

7. ผลการตรวจคัดกรองตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชด้วย multiplex real-time PCR

ผลการทดสอบปฏิกิริยาการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างแบบ blind sample เปรียบเทียบผลกับผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชตัดแปลงพันธุกรรมพบว่า ทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบด้วยวิธี multiplex real-time PCR ให้ผลการทดสอบตรงกับผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ 100% โดยไม่พบการเกิด False positive และ False negative

สรุปผลการทดลอง

การตรวจจำแนกยีนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 และ NK603 ด้วยวิธี multiplex real-time PCR โดยการตรวจจำแนกยีน Event specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืช *HMG* ในปฏิกิริยาเดียวกันมีประสิทธิภาพสามารถใช้ในตรวจจำแนกยีนดังกล่าว โดยโพรบและไพรเมอร์มีความจำเพาะและเหมาะสมต่อการจำแนกยีน Event specific Mon810 และ NK603 และค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดสอบวิธี multiplex real-time PCR อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ และเมื่อทดสอบใช้ในการจำแนกยีน พบว่า เทคนิคดังกล่าวสามารถจำแนกยีนได้ถูกต้องโดยไม่มี False positive/negative

เอกสารอ้างอิง

- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ปิยนุช ศรชัย จิตรัตน์ อัครมงคลศิริ พงศกร สรรค์วิทยากุล. 2562. การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025. *วารสารวิชาการเกษตร*. ปีที่ 36 ฉบับที่ 3: 316-331
- วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2557. *เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ Real-time PCR*. บริษัท ดีทีโอ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 157 หน้า
- Alary, R., A. Serin, D. Maury and P. Joudrier. 2003. Comparison of Simplex and duplex Real-time PCR for quantification of GMO in maize and soybean. *Food control* 13:235-244.
- Broeders, S., I. Huber, L. Grohamann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens and D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative Real-time PCR methods. *Trends in Food Sci. Tech.* 37:115-126.
- Bustin, SA. and T. Nalon. 2004. Primer and Probes. Pages 279-328. In: SA. Bustin Eds. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla, California: International university line.
- Cankar, K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel and K. Gruden. 2006. Critical points of DNA quantification by Real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of GMO. *BMC Biotechnology* 15pp.
- Debode, F., E. Janssen and G. Berben. 2013. Development of 10 new screening PCR assays for GMo detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminator (t35S, tE9, tOCS, tg7). *Eur. Food Res. Technol.* 236:659-669.
- Del Gaudio, S., A. Cirillo, G. Di Bernardo, U. Galderisi and M. Cipollaro. 2012. Verification of Real-time PCR methods for qualitative and quantitative testing of genetically modified organism. *J. Food Qual.* 35: 442-447.
- Delobel, C., E. Grazioli, S. Larcher, M. Mazzara and G. Van Den Eede. 2008. *Event specic method for the quantication of maize line LY038 using Real-time PCR-validation report and protocol*. EUR 23647 EN. Luxembourg: Publication Office of the European Union. JRC48919 (ISBN 978-92-79-11047-4).
- Ellison, S.L.R., C. A. English, M. J. Burns and J. T. Keer. 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using Real-time PCR. *BMC Biotechnology* 11 pp.
- Hugo, R.P., I.R. Martin and H.V. Ruben. 2002. Detection and quantification of

- transgenes in grains by multiplex real and real time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 50(16): 4431-4436.
- ISAAA .2018. ISAAA's GM Approval Database. Available at: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Accessed: 12 June 2019
- JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011. *JRC-Compendium of reference methods for GMO analysis. Luxembourg: Publication Office of the European Union.* 259 p.
- Kramkowska, M., T. Grzelak and K. Czyzewska. 2013. Benefits and risks associated with genetically modified food products. *Ann. Agr. Envir. Med.* 20(3): 413-419.
- Lab Life-Real-time PCR. 2015. *Compare and contrast: multiplex real vs singleplex PCR. Roche Life Science.* Posted on September 19,2015. Available at: (https://www.lifescience.roche.com/en__th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-real-vs-singleplex-pcr.html) Accessed: 12 August, 2019.
- Mazzara M., Savini C., Munaro B., Foti N. and Van Den E.G. 2007. *Event specific method for the quantification of maize line MIR604 using Real-time PCR-Validation report and protocol-maize seeds sampling and DNA extraction.* EUR 22913 EN.Luxembourg: OPOCE. In Compendium of reference methods for GMO analysis. 2010.
- Rodriguez, A., M. Rodriguez, J.J. Cordoba and M.J. Andrade. 2015. Design of primers and probes for quantitative Real-time PCR method. *Methods Mol Biol.* 1275:31-56
- Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummied plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5:69-76.
- Shrestha H.K., H. Kae-Kang and C. Men-Chi. 2010. Detection of genetically modified maize (*Zea mays* L.) in seed samples from Nepal. *Afr. J. Biotechnol.* 9(34): 5581-5589.
- Sornchai, P., T. chookaew, N. Kaewnuy, T. Assawamongkolsiri and K. Wongwathanarat. 2018. Developing of Genetically Modified Maize, Mon810 and NK603 Detection Method using multiplex real-time PCR technique. Pages 27-40. In: *Proc. 15th KU-KPS National Conference Proceeding.* Dec. 6-7,2018. Nakhon Pathom.
- Turkec, A., H. Kazan, B. Karacanli and S. J. Lucas. 2015. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modified organism (GMOs) in maize food and feed products. *J. Food Sci. Technol.* 52(8): 5164-5171.
- Vallone, PM. And JM. Butler. 2004. Auto dimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques.* 37: 226-231.