

การสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม
**Standard DNA Construction for Genetically Modified
Soybean Detection**

ประสาน สืบสุข^{1/} กุหลาบ คงทอง^{1/} ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์^{1/} กิ่งกาญจน์ พิชญกุล^{1/}
Prasarn Seubsuk^{1/} Kularb Kongthong^{1/} Khanitha Wongwathanarat^{1/}
Kingkarn Pitchayakun^{1/}

ABSTRACT

Detection of genetically modified soybeans in the laboratory at all times needed using of a control reference for the analysis. The invention of standard DNA in plasmids form for using in the analysis of genetically modified soybeans was created at the Biotechnology Research and Development Office, the Department of Agriculture during October 2007 – September 2009 by amplifying DNA fragments of CP4EPSPS genes of genetically modified soybeans and soybean Lectin genes of non-genetically modified soybeans. The components of the two genes are ligated to the pCR8/GW/TOPO plasmid. It has been called “ pStdDOA/GMO1” standard DNA. When it was put to the accuracy test it was found that the pStdDOA/GMO1 standard DNA was a correctly and effective reference material. It can be used for analysis of genetically modified soybeans. The alternative is for replacing the importation of expensive reference materials from overseas and it can reduce cost of samples analysis.

Key-words : DNA standards genetically modified soybeans plasmid

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการทุกครั้ง ต้องใช้วัสดุอ้างอิง สำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่อยู่ในรูปพลาสมิดสำหรับการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ดำเนินงานการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 – กันยายน พ.ศ. 2552 โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanya Buri district, Pathum Thani province 12110

CP4EPSPS จากดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และยีน Lectin จากถั่วเหลืองที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม นำชิ้นส่วนของยีนทั้งสองเชื่อมต่อกันอยู่ในพลาสมิดเดียวกัน และให้ชื่อว่าดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1 เมื่อนำไปทดสอบความถูกต้องพบว่าดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้น ถือเป็นวัสดุอ้างอิงที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเป็นการทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง และทำให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างลดลง

คำหลัก : ดีเอ็นเอมาตรฐาน ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม พลาสมิด

คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาการเกษตรอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ที่ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช ต้านทานต่อโรคและแมลง และมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น ในประเทศไทยการผลิตถั่วเหลือง เพื่อใช้ภายในประเทศยังไม่เพียงพอ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการแปรรูป ปัญหาการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศ โดยเฉพาะจากประเทศที่มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา บราซิล และอาร์เจนตินา ซึ่งถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเป็นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่วงน้ำหนัก โดยการใส่ยีน

CP4EPSPS เพิ่มเข้าไปทำให้ถั่วเหลืองที่ถูกตัดต่อสารพันธุกรรมสามารถสร้างเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ได้ในปริมาณมาก โดยเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติในการต้านสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Roundup Ready Soybean : RRS) (Takabataka *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือพืชเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเป็นอาหารและวัตถุดิบในการผลิตอาหาร ยังเป็นที่ถกเถียงกันระหว่างข้อดีคือการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนอาหารของโลก แต่ข้อวิตกกังวลเกี่ยวกับผลกระทบที่มีต่อสุขภาพของผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมจากการมีพืชดัดแปลงพันธุกรรม ที่ปลูกปะปนอยู่กับพืชธรรมดา (มณี, 2547) ผู้ผลิตและผู้จำหน่ายหลายประเทศได้ออกกฎระเบียบสำหรับตรวจการปะปนของพืช และผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยการตรวจสอบการปะปนดังกล่าวสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะเจาะจงแบบ event-specific เป็นการตรวจตรงบริเวณลำดับเบสของยีนแปลกปลอมที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของจีโนมพืช จึงถือว่าเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะมาก (ชนิษฐาและคณะ, 2553) ซึ่งในกรณีนี้คือดีเอ็นเอของ CP4EPSPS ที่ใส่เข้าไปในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งในการตรวจสอบนั้นไม่ว่าจะเป็นตรวจว่ามีการปะปนหรือไม่ หรือมีการปะปนมากน้อยเพียงใด การตรวจทุกครั้ง ต้องใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับเป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูป

พลาสมิดจัดเป็นวัสดุอ้างอิงชนิดหนึ่ง ที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุมผลการตรวจวิเคราะห์การปะปนของพืชตัดแปลงพันธุกรรม และยังสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ในการเปรียบเทียบปริมาณการปะปนว่ามีมากน้อยเพียงใด ซึ่งในการหาปริมาณการปนเปื้อนนั้นจำเป็นต้องคำนวณ โดยอาศัยข้อมูลปริมาณของยีนแปลกปลอมที่ใส่เข้าไปในพืช และปริมาณยีนปกติที่มีอยู่แล้วในพืชนั้น ซึ่งยีน Lectin ที่อยู่ในถั่วเหลืองจัดเป็นยีนปกติที่สามารถนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณการปนเปื้อนได้ ในการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปพลาสมิดที่สามารถใช้คำนวณเชิงปริมาณได้นั้น จะต้องมีส่วนประกอบของยีนแปลกปลอมที่ใส่เข้าไปในพืช เชื่อมต่ออยู่กับยีนปกติที่มีอยู่แล้วในพืชนั้น และจะต้องเชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ที่ผ่านมาวัสดุอ้างอิงที่ใช้อยู่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศมีราคาสูง และยังคงผลให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างสูงด้วย ซึ่งในแต่ละปีห้องปฏิบัติการที่รับผิดชอบในการตรวจวิเคราะห์พืช และผลิตภัณฑ์จากพืชตัดแปลงพันธุกรรม ต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก หากมีการสร้างวัสดุอ้างอิงขึ้นใช้เองได้ก็จะมีประโยชน์อย่างยิ่ง จากรายงานที่ผ่านมาได้มีการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ หรือยีนที่สนใจ เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการตรวจสอบ และเปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอในพืชตัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด โดย Allnutt *et al.* (2005) ได้สร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปพลาสมิด pMON810 ที่มีส่วนยีน MON810 และพลาสมิด pSSIIB มียีน

Maize starch synthase II B เพื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม Takeshi (2001) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชตัดแปลงพันธุกรรมและอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่อยู่ในรูปพลาสมิดที่มีส่วนของ CaMV35S promoter และ NOS terminator เป็นดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิงถึงปริมาณการปนเปื้อนของพืชตัดแปลงพันธุกรรม ในงานวิจัยนี้จึงทำการสร้างดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบของพลาสมิดเพื่อการตรวจวิเคราะห์ยีน CP4EPSPS และ Lectin ในถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม เป็นการสร้างวัสดุอ้างอิงขึ้นใช้เองเพื่อทดแทนการนำเข้าวัสดุอ้างอิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่าการผลิตได้เองถึง 15 เท่า ส่งผลให้ต้นทุนค่าวิเคราะห์ตัวอย่างลดลงมาก และเป็นประโยชน์อย่างมากต่อห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืช และผลิตภัณฑ์จากพืชตัดแปลงพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีน CP4EPSPS และ Lectin

ข้อมูลของยีน CP4EPSPS และ Lectin ของถั่วเหลือง จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อหาชนิดของเอ็นไซม์ที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำลำดับเบสของยีนไปออกแบบไพรเมอร์ พร้อมทั้งเพิ่มเติมลำดับเบสที่

เหมาะสมสำหรับเชื่อมต่อยีน CP4EPSPS + Lectin เข้าด้วยกัน สกัดดีเอ็นเอจากใบของถั่วเหลืองที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม โดยนำไปบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง ส่วนเมล็ดถั่วเหลืองที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม นำเมล็ดไปแช่ในน้ำเป็นเวลา 24 ชม. นำส่วนที่เป็นต้นอ่อนในเมล็ดไปบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Extraction Kit (RBC bioscience, Taiwan) และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยนำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมไปเพิ่มปริมาณยีน CP4EPSPS โดยใช้ไพรเมอร์ CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R สำหรับยีน Lectin ใช้ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม เพิ่มปริมาณส่วนของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ Gmlectin-R นำตัวอย่างชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy (Promega, USA) และส่งผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 นำไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติม ampicillin (PhytoTechnology Laboratories, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชม. นำโคลนนี้ไปตรวจหายีนเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน CP4EPSPS และ Lectin แล้วนำโคลนที่ได้รับการคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณเพื่อสกัดพลาสมิด จากนั้นนำไปหาลำดับการเรียงตัว

ของสารพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด M13F และ M13R แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนยีนโดยการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน CP4EPSPS และ Lectin ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast

2. การสร้างชุดยีน CP4EPSPS และ Lectin

นำพลาสมิดที่ได้รับยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่มีการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จาก ข้อ 1 มาสร้างเป็นชุดยีนประกอบด้วย CP4EPSPS + Lectin โดยนำพลาสมิดทั้งสองมาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ NdeI (Fermentus, Lithuania) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกันโดยเติมเอ็นไซม์ T4 DNA Ligase (Fermentus, Lithuania) แล้วนำไปบ่มที่ 22°ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงนำปฏิกิริยาไปเจือจางด้วยน้ำ 1:20 เท่า และนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพื่อเลือกเฉพาะชิ้นที่มีการเชื่อมต่อกันของยีน CP4EPSPS + Lectin ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R นำตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, USA) และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Mach 1 T1R นำไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติม Spectinomycin (Sigma, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 16 ชม. นำโคลนนี้ไปตรวจหายีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R และตรวจสอบความถูก

ต้องของโคลนโดยวิธีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ SacI, NdeI และ SalI (Fermentus, Lithuania) รวมทั้งตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ของยีน CP4EPSPS และ Lectin

3. การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม

นำพลาสมิดที่มีชิ้นยีนเป้าหมาย CP4EPSPS และ Lectin เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เพื่อทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมคือไพรเมอร์ Sttmr3a และ Sttmr2a ในการตรวจยีน CP4EPSPS ส่วนยีน Lectin ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Sltm1, Sltm2 โดยใช้ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลืองที่ไม่ตัดแปลงพันธุกรรม และน้ำเป็นตัวควบคุมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีน CP4EPSPS และ Lectin

ยีน CP4EPSPS และ Lectin ในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI พบข้อมูลยีน CP4EPSPS ใน Accession no AB209952 มีขนาด 2,457 คู่เบส สำหรับยีน Lectin ของถั่วเหลืองพบใน Accession no K00821 มีขนาด 2,152 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของยีนทั้งสอง พบว่าไม่มีตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์

ตัดจำเพาะ SalI, NdeI และ SacI จึงได้นำลำดับเบสของเอ็นไซม์ดังกล่าวไปเติมที่ตำแหน่งปลายด้านปลาย 5' และ 3' ของแต่ละยีน ทั้งนี้เพื่อใช้ในการตัดต่อชิ้นส่วนยีนเข้าด้วยกัน และออกแบบการจัดวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยยีน CP4EPSPS ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ไว้ที่ปลายด้านปลาย 5' ด้วยเอ็นไซม์ NdeI ส่วนปลายด้านปลาย 3' ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดด้วยเอ็นไซม์ SacI ส่วนยีน Lectin ได้ออกแบบการวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ไว้ที่ปลายด้านปลาย 5' ด้วยเอ็นไซม์ SalI ส่วนปลายด้านปลาย 3' ได้ออกแบบตำแหน่งจุดตัดด้วยเอ็นไซม์ NdeI แสดงว่าการออกแบบการวางตำแหน่งจุดตัดของเอ็นไซม์ได้ออกแบบให้มีจุดตัดของเอ็นไซม์ NdeI ปรากฏอยู่บนสายดีเอ็นเอของทั้งสองยีน ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการต่อยีนทั้งสองเข้าด้วยกัน จากการนำข้อมูลลำดับเบสที่มีการตัดแปลงดังกล่าวไปออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CP4EPSPS ส่วนไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน Lectin คือ Gmlectin-F และ Gmlectin-R

การใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเหลือง พบว่าได้ดีเอ็นเอปริมาณมากเพียงพอสำหรับการทดลอง สำหรับขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดนั้น ในกรณีที่เมล็ดถั่วเหลืองไม่สามารถเพาะให้งอกเป็นต้นอ่อนได้ สามารถนำเอาต้นอ่อนที่อยู่

ในเมล็ดที่ผ่านแช่น้ำไว้ประมาณ 24 ชม. ไปใช้สกัดดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม เมื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณยีน CP4EPSPS โดยใช้ไพรเมอร์ CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,595 คู่เบส ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน Lectin จากถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ Gmlectin-R พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,025 คู่เบส (Figure 1) แสดงว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแต่ละยีนมีเพียงแถบเดียวเท่านั้น แสดงว่าลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณนั้น มีความจำเพาะกับยีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และมีความจำเพาะกับยีน Lectin ของถั่วเหลืองปกติ เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอของยีน CP4EPSPS และ Lectin มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T easy และถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์ แบคทีเรีย *E. coli* JM109 พบว่าสามารถตรวจพบโคลนนิ่งของแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นจำนวนมาก จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าได้โคลนดังกล่าวมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความถูกต้องในระดับการเรียงลำดับของสารพันธุกรรม จึงได้ทำการแยกสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียโคลนนิ่งที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ นำไปหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่แทรกตัวอยู่ในเวกเตอร์ pGEM-T easy ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R เมื่อทำการเปรียบเทียบ

เทียบลำดับเบสกับ CP4EPSPS และ Lectin ที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนทั้งสองที่โคลนได้ มีการเรียงตัวของลำดับเบสเหมือนกับยีน CP4EPSPS และ Lectin ที่มีรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูล NCBI แสดงได้ว่ายีนทั้งสองที่โคลนได้มีความถูกต้อง

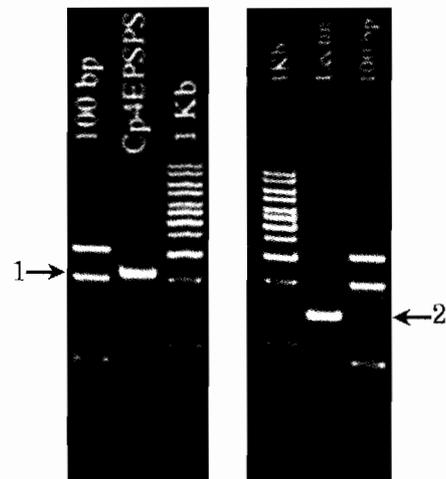


Figure 1. DNA fragment of CP4EPSPS genes from genetically modified soybean (arrow1) and DNA fragment of Lectin gene from non-genetically modified soybean (arrow 2) with 100 bp and 1 Kb DNA Ladder marker

2. การสร้างชุดยีน CP4EPSPS และ Lectin

การสร้างชุดยีนพบว่าการนำพลาสมิดที่ประกอบด้วยชิ้นส่วนยีน CP4EPSPS และ Lectin มาตัดและต่อเข้าด้วยกันได้ สามารถทำปฏิกิริยาในขั้นตอนตัดและต่อได้ภายในหลอดเดียวกัน โดยการตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ NdeI แล้วจึงให้ความร้อนแก่ปฏิกิริยาเพื่อทำให้เอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดเสร็จแล้วเสื่อม

สภาพ ไม่สามารถทำกิจกรรมการตัดได้อีกต่อไป แล้วเติมเอ็นไซม์ T4 DNA Ligase และ ATP ลงในปฏิกิริยาหลอดเติม เพื่อต่อชิ้นดีเอ็นเอของ CP4EPSPS และ Lectin ที่ถูกตัดมาเชื่อมต่อกัน เข้าด้วยกัน โอกาสการเชื่อมต่อกันของชิ้นดีเอ็นเอ นั้น มีลักษณะเป็นแบบสุ่ม มี 3 แบบ คือ (1) CP4EPSPS ต่อกับ CP4EPSPS (2) Lectin ต่อกับ Lectin และ (3) CP4EPSPS ต่อกับ Lectin แต่ในงานวิจัยนี้จะคัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันของ CP4EPSPS ต่อกับ Lectin เท่านั้น โดยการใช้เทคนิค PCR

นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถนำดีเอ็นเอปฏิกิริยาที่ผ่านการเชื่อมต่อไปเจือจางด้วยน้ำ 1:20 ให้ผลดีในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะชิ้นที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างยีน CP4EPSPS และ Lectin ถ้าหากไม่มีการเจือจางปฏิกิริยาก่อน จะส่งผลให้ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีหลายแถบ เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นมากเกินไป ซึ่งผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาด 2,620 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องตามที่คาดหวังไว้ ซึ่งเกิดจากการต่อเชื่อมรวมกันระหว่างยีน CP4EPSPS และ Lectin โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกันนี้ สามารถนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR8/GW/TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียได้ จากการใช้เทคนิค PCR ตรวจคัดเลือกโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอ CP4EPSPS และ Lectin เชื่อมอยู่ด้วยกัน ผลการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่

พบว่าได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอดังนี้ (1) Gmlectin-F และ CP4EPSPS-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,620 คู่เบส (2) Gmlectin-F และ Gmlectin-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,025 คู่เบส และ (3) CP4EPSPS-F และ CP4EPSPS-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,595 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเป็นขนาดที่ตรงกับค่าที่คาดหวังไว้ นอกจากนี้ได้ตรวจสอบโคลนเป้าหมายเพื่อยืนยันผลให้ชัดเจนโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *SacI*, *NdeI* และ *SalI* พบว่าขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมี 3 ขนาดคือ 1,025 1,595 และ 2,817 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีน Lectin, CP4EPSPS และเวกเตอร์ pCR8/GW/TOPO ตามลำดับ (Figure 2)

3. การทดสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ตรวจถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

การนำพลาสมิดของโคลนเป้าหมายที่มีชิ้นยีน CP4EPSPS และ Lectin เชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเดียวกันไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และมีดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่มี และไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ *SttMr3a* และ *SttMr2a* สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 146 คู่เบส ในดีเอ็นเอมาตรฐาน และในถั่วเหลืองที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในถั่วเหลืองไม่ดัดแปลงพันธุกรรม และเมื่อตรวจสอบยีน Lectin ซึ่งเป็นยีนพื้นฐานที่อยู่ในถั่วเหลือง

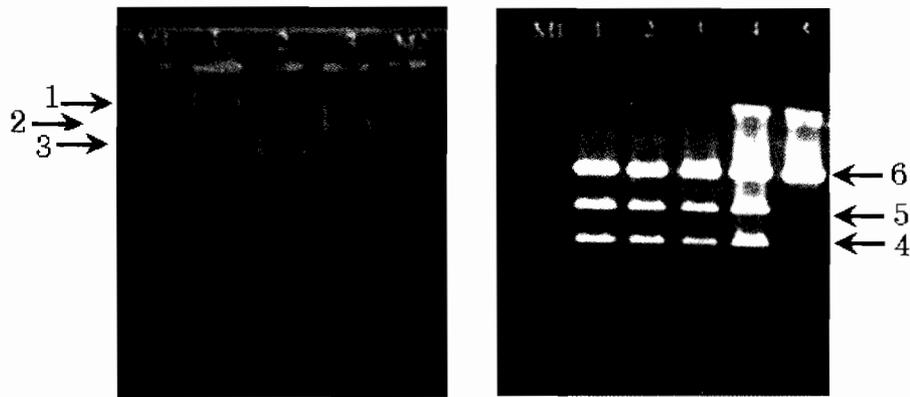


Figure 2. DNA band from inspection of the CP4EPSPS and Lectin gene containing clone the by the PCR technique : arrow 1 = CP4EPSPS + Lectin , arrow 2 = Lectin, arrow 3 = CP4EPSPS ; DNA band of CP4EPSPS and Lectin gene containing clone restricted by *SacI*, *NdeI* and *SalI*, lane 1-4 = the target gene cloned, lane 5 = non target gene cloned, arrow 4 = Lectin, arrow 5= CP4EPSPS, arrow 6 = pCR8/GW/TOPO vector with 100 bp and Kb DNA Ladder marker

ด้วยไพรเมอร์ Sltm1 และ Sltm2 ปรากฏว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 99 คู่เบส ซึ่งพบได้ทั้งในดีเอ็นเอมาตรฐาน ถั่วเหลือง ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และถั่วเหลืองไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (Figure 3) นอกจากนี้ได้ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสอง 2 คู่ ผสมกันในปฏิกิริยา PCR หลอดเดียวกัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งขนาด 146 และ 99 คู่เบส ที่เกิดจากการ ตรวจสอบเพียงครั้งเดียว จึงเป็นการลดขั้นตอน และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างลงอีกวิธี หนึ่ง (Figure 3) ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้นได้ ให้ชื่อว่า pStdDOA/GMO1 (p หมายถึง พลาสมิด Std หมายถึงมาตรฐาน DOA หมายถึง กรมวิชาการเกษตร GMO หมายถึงสิ่งมีชีวิต

ดัดแปลงพันธุกรรม และ 1 หมายถึงลำดับที่ ของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้สร้างขึ้น) ซึ่งประกอบ ด้วยชุดยีนของ CP4EPSPS และ Lectin ที่อยู่ในพลาสมิด pCR8/GW/TOPO (Figure 4) จัด เป็นวัสดุอ้างอิงที่เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในรูปแบบ ของพลาสมิด ที่ผลิตขึ้นเอง ที่สามารถใช้ในการ ตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตามมาตรฐานสากล เพื่อทดแทนการนำเข้าวัสดุ อ้างอิงที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูงกว่า การผลิตเองถึง 15 เท่า ส่งผลให้ช่วยประหยัด ต้นทุนค่าตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้มาก

ดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1 เป็นวัสดุอ้างอิงในรูปพลาสมิดที่โคลนได้ และเก็บ ไว้ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ One Shot Mach 1 T1R ที่สามารถนำออกไปใช้งานได้ง่าย

โดยการนำไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสกัดพลาสมิด สามารถนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพ (ตรวจว่ามีหรือไม่มีถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม) แต่ในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอมาตรฐาน pStdDOA/GMO1 นี้ไปใช้เปรียบเทียบในเชิงปริมาณ (มีการปนเปื้อนของถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมปริมาณมากน้อยเพียงใด) จำเป็นต้องทำพลาสมิดให้อยู่รูปของสายตรง (linearised plasmid) โดย

ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีจุดตัดเพียงครั้งเดียว และตำแหน่งที่ตัดต้องอยู่ภายนอกชิ้นส่วนของยีน CP4EPSPS และ Lectin เช่น เอ็นไซม์ Sac/ หรือ Sal/ จากนั้นจึงแยกดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปวัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกต้องและแน่นอน เพื่อนำปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไปคำนวณหาจำนวน copy number สำหรับใช้เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค Real-time PCR ต่อไป

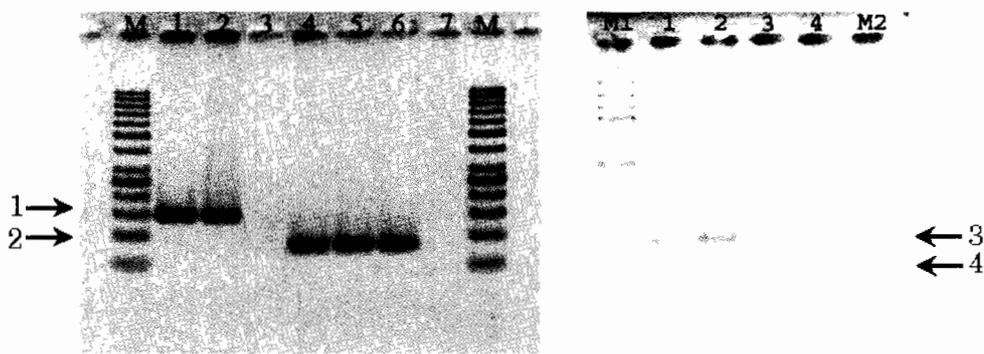


Figure 3. The size of DNA fragment to determine the accuracy of the pStdDOA/GMO1 standard DNA : arrow 1 lane1 = primers Sttmr3a + Sttmr2a / pStdDOA/GMO1
 arrow 1 lane2 = primers Sttmr3a + Sttmr2a / genetically modified soybeans,
 arrow 1 lane3 = primers Sttmr3a + Sttmr2a / non-genetically modified soybeans,
 arrow 2 lane1 = primers Sltm1 + Sltm2 / pStdDOA/GMO1,
 arrow 2 lane2 = primers Sltm1 + Sltm2 / genetically modified soybeans,
 arrow 2 lane3 = primers Sltm1 + Sltm2 / non-genetically modified soybeans,
 arrows 3,4 lane1 = primers Sttmr3a + Sttmr2a+ Sltm1 + Sltm2 / pStdDOA/GMO1,
 arrows 3,4 lane2 = primers Sttmr3a + Sttmr2a+ Sltm1 + Sltm2 / genetically modified soybeans,
 arrows 3,4 lane3 = primers Sttmr3a + Sttmr2a+ Sltm1 + Sltm2 / non-genetically modified soybeans and
 arrows 3,4 lane4 = distilled water, M1; 100 bp. DNA Ladder , M2; 50 bp. DNA Ladder

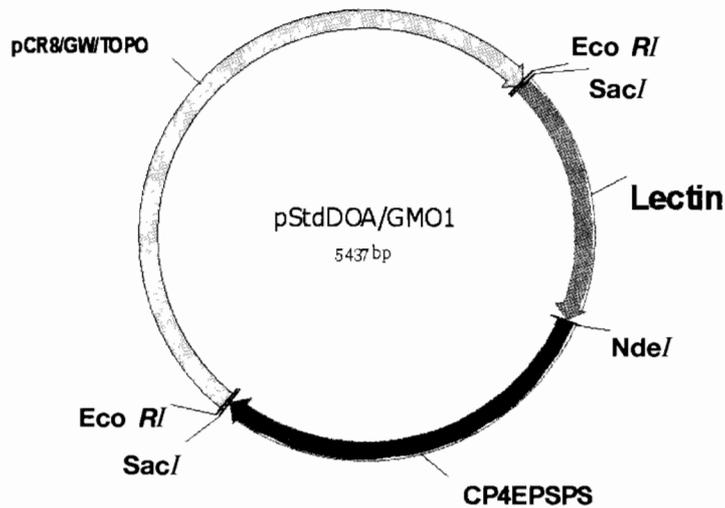


Figure 4. Map of the pStdDOA/GMO1 DNA standard containing the fragments of CP4EPSPS and Lectin genes within the pCR8/GW/TOPO vector

สรุปผลการทดลอง

สามารถโคลนยีน CP4EPSPS และ Lectin จากถั่วเหลืองที่มีและไม่มีกรดดัดแปลงพันธุกรรม ประสบผลสำเร็จด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยเทคนิค PCR และได้ผ่านการตรวจสอบลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมเรียบร้อยแล้วยีนมีความถูกต้อง และตรงกับลำดับของยีนที่ได้รายงานไว้แล้ว นอกจากนี้ได้นำยีนโคลนได้ไปผ่านกระบวนการตัดและต่อเข้าด้วยกันเพื่อสร้างเป็นชุดของยีนที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม ทำให้ได้ดีเอ็นเอมาตรฐานชื่อ pStdDOA/GMO1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ประกอบด้วยส่วนของยีน CP4EPSPS และ Lectin ดีเอ็นเอมาตรฐานนี้อยู่ในรูปพลาสมิดที่

เก็บไว้ในแบคทีเรีย สามารถผลิตออกมาใช้งานได้ง่ายมาก โดยการนำแบคทีเรียไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสกัดพลาสมิดนำไปใช้เป็นวัสดุอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างได้นี้มีประสิทธิภาพสูง ได้มาตรฐานสากล จึงนับเป็นวัสดุอ้างอิงที่น่าไปใช้ประโยชน์ได้จริง

เอกสารอ้างอิง

ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สุรภี กীরติยะอังกูร กิ่งกาญจน์ พิษณุกุล และอลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2553. การโคลนยีน EPSPS และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). หน้า 1-20.

- ใน : ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่
เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดี
เด่น ประจำปี 2553. กรมวิชาการเกษตร.
มณี ตันตริ่งกิจ. 2547. การตรวจสอบจีเอ็มโอใน
อาหาร. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัย
และเรือนปลูกพืชทดลอง 18(1) : 5-8.
- Allnutt, T.R., H. Hird, O. Oehlschlager and
C.M. Henry. 2005. *Plasmid
Standards for Real Time PCR and
GM Enforcement Testing*. [www.gm-
inspectorate.gov.uk/documents /
PLASMID.pdf](http://www.gm-inspectorate.gov.uk/documents/PLASMID.pdf), 11/6/2554.
- Takeshi M. 2001. *GMO Labeling and
Detection Methods in Japan*. [http//
apec.biotec.or.th/pdf/
MrTakeshiMatsuoka](http://apec.biotec.or.th/pdf/MrTakeshiMatsuoka), 11/6/2554.
- Takabatake, R., H. Akiyama, K. Sakata, M.
Onishi, T. Koiwa, S. Futo, Y.
Minegishi, R. Teshima, J. Mano, S.
Jurui and K. Kitta. 2011.
Development and evaluation of
event-specific quantitative PCR
method for genetically modified
soybean A2704-12. *Food Hyg. Saf.
Sci.* 52 : 100-107.