

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบข้าวสาลีกลูเตนต่ำปรับแต่งยีนอย่างง่าย ด้วยเทคนิค homo/hetero-duplexes และ T7E1

Development of Simple Detection Method of the Gene Edited Low Gluten Wheat by Homo/Hetero-Duplexes and T7E1 Technique

วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร*, อรทัย ทาก่อม, ปิยนุช ศรีชัย, ศุภรัตน์ ศรีทะวงษ์, พงศกร สรรค์วิทยากุล,
รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล, อรุณทัย ชาววา, ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร 10900

Weerasak Pitaksaringkarn*, Oratai Thakom, Piyanuch Sornchai, Suparat Srithawong,
Pongsakorn Sanvittayakul, Rungnapa Phitaktansakul, Aroonothai Sawwa,
Piyarat Thammakijjawat

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

Received 28 July 2023; Received in revised 11 March 2024; Accepted 29 April 2024

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีปรับแต่งยีน (Gene-editing) ทางกรมเกษตรในพืชหลากหลายชนิด สำหรับประเทศไทยยังไม่มีมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลที่ชัดเจน การตรวจสอบพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนเพื่อแยกความแตกต่างจึงมีความสำคัญ ดังนั้นการศึกษานี้จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนให้ง่ายและรวดเร็วมากขึ้น โดยใช้ตัวอย่างข้าวสาลีที่มีการปรับแต่งยีน α -gliadin family ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างกลูเตนในข้าวสาลีตรงตำแหน่งของยีน *sgAlpha-2* โดยมีการปรับแต่งเบสเพียงไม่กี่เบสให้หายไปจากจีโนมของข้าวสาลีทำให้โปรตีนกลูเตนในข้าวสาลีที่ผ่านการปรับแต่งลดลง ซึ่งการตรวจสอบจะใช้วิธี Homo/hetero duplex และ T7 endonuclease-I (T7E1) ที่อาศัยหลักการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอแบบที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม โดยจะเกิดลักษณะ Loop ซึ่งเกิดจากดีเอ็นเอสายคู่ที่เข้าคู่กันแบบไม่เป็นคู่สมไม่จับกับลำดับเบสตรงบริเวณที่มีการปรับแต่ง จากนั้นตรวจสอบด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทำให้ทราบว่าตัวอย่างใดเป็นตัวอย่างของข้าวสาลีปรับแต่งยีน

คำสำคัญ: ข้าวสาลี; ปรับแต่งจีโนม; กลูเตน; Htomo/hetero duplex; T7 endonuclease-I

Abstract

The development and application of agricultural gene-editing technology have been studied in various crops. The current regulation framework in Thailand is still under consideration. Therefore, the ability to detect gene-edited plants is essential for monitoring and verifying such plants as part of the preparation for the adoption of this technology. This study focuses on the research and development of an investigative method for detecting gene-edited wheat in a simpler and faster manner. Wheat with edited α -gliadin family genes in the *sgAlpha-2* region, a group of genes responsible for controlling wheat gluten production, was used in this study. The gene editing involved the deletion of only a few bases from the genome, resulting in a significant reduction in gluten protein levels in the edited wheat. The homo/hetero duplex and T7 endonuclease-I (T7E1) assay was employed as the detection technique. This method relies on the principle of pairing complementary and non-complementary DNA strands. Mismatched DNA pairs form a characteristic loop in the editable region, which can be detected using gel electrophoresis analysis to differentiate DNA bands. This approach enables the identification of gene-edited plant samples effectively.

Keywords: Wheat; Gene-editing; Gluten; Homo/hetero duplex; T7 endonuclease-I

1. บทนำ

ในปัจจุบันมีการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีปรับแต่งยีนทางการเกษตรในพืชหลากหลายชนิด ซึ่งได้พืชที่มีลักษณะที่ต้องการทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพที่เป็นลักษณะดีทางการเกษตร หลายประเทศได้มีกฎระเบียบในการควบคุมกำกับดูแลพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนเพื่อตั้งรับเทคโนโลยีที่กำลังจะเข้ามา โดยในแต่ละประเทศมีการควบคุมที่แตกต่างกัน เช่น สหรัฐอเมริกาถือว่าพืชที่มีการปรับแต่งยีนแบบ deletion ไม่ต้องมีการควบคุมกำกับดูแลแบบพืชดัดแปลงพันธุกรรม ในสหภาพยุโรปจัดให้พืชปรับแต่งยีนทุกรูปแบบมีการควบคุมกำกับดูแลแบบพืชดัดแปลงพันธุกรรม [1] สำหรับประเทศไทยยังไม่มีแนวทางปฏิบัติที่แน่นอนเกี่ยวกับพืชปรับแต่งยีน แต่อาศัยอำนาจภายใต้พระราชบัญญัติการกักพืชในการควบคุมกำกับดูแล นอกจากนี้ ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีมีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมและพืชที่ผ่านการปรับแต่งยีน

การควบคุมกำกับดูแลพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนสิ่งสำคัญคือการตรวจสอบเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพืชไม่ปรับแต่งยีนและพืชปรับแต่งยีน ปัจจุบันนิยมใช้อ่านลำดับเบส (Sanger sequencing) บริเวณยีนที่มีการปรับแต่งของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความแม่นยำแต่ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง ทำให้ไม่เหมาะสำหรับงานตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างพืชหรือสินค้าพืชปรับแต่งยีนที่มีปริมาณตัวอย่างมากและต้องการความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการศึกษาวิจัยและพัฒนาการตรวจสอบพืชที่ได้รับการปรับแต่งยีนที่มีความง่ายและรวดเร็วมากขึ้นจึงมีความจำเป็น เพื่อประยุกต์ใช้กับงานตรวจสอบพืชหรือสินค้าพืชปรับแต่งยีนและสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภคหรือความปลอดภัยทางอาหาร

กลูเตน (Gluten) เป็นไกลโคโปรตีนที่พบได้ตามธรรมชาติในธัญพืชบางชนิดเช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และข้าวไรย์ กลูเตนมีลักษณะยืดหยุ่น เหนียว และไม่ละลายน้ำ เนื่องจากกลูเตนมีกลุ่มโปรตีนกลูเตนิน (Glutenin) และไกลอะดิน (Gliadin) ที่รวมตัวกันด้วย

พันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide Bond) แต่อย่างไรก็ตามกลูเตนสามารถทำให้เกิดอาการแพ้ โดยโปรตีนกลุ่ม α -gliadin แม้กลูเตนินจะก่อให้เกิดภูมิแพ้น้อย แต่ไกลอะดินเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการแพ้หนักกว่า [2] ซึ่งอาการแพ้กลูเตนเรียกว่า Celiac disease (หรือ coeliac disease) โดยเมื่อได้รับโปรตีนกลูเตนเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุลำไส้หลั่งโปรตีนซูลิน (Zonulin) ออกมา ส่งผลให้ผนังลำไส้เล็กอักเสบและทำให้กลูเตนเข้าสู่กระแสเลือด ระบบภูมิคุ้มกันจึงเกิดการตอบสนองอย่างรุนแรงต่อกลูเตน ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย ท้องอืด มีผื่นขึ้นตามร่างกาย โลหิตจาง อ่อนเพลีย และส่งผลให้เกิดการขาดสารอาหารต่อมา [3] ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาข้าวสาลี Low-gluten โดยการปรับแต่งยีน α -gliadin family ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างกลูเตนในข้าวสาลีตรงตำแหน่งของยีน *sgAlpha-2* แบบ SDN1 โดยมีการปรับแต่งเบสเพียงไม่กี่เบสให้หายไปจากจีโนมของข้าวสาลี ทำให้โปรตีนกลูเตนในข้าวสาลีที่ผ่านการปรับแต่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [4] ซึ่งจุดประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจสอบตัวอย่างข้าวสาลี Low-gluten โดยใช้วิธี Homo/hetero duplex และ T7 endonuclease-I (T7E1) ที่อาศัยหลักการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอแบบที่เป็นคู่สมและไม่เป็นคู่สม โดยดีเอ็นเอสายคู่ที่เข้าคู่กันแบบไม่เป็นคู่สมจะเกิดการไม่จับกัน (Mismatch) ของลำดับเบสในบริเวณที่ปรับแต่ง (Indel) ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า Loop ซึ่งดีเอ็นเอที่มี Loop จะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสช้ากว่าดีเอ็นเอสายคู่สมที่ไม่มี Loop ทำให้สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนในเจลที่มีความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 4% ขึ้นไป [5] แต่ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือสามารถใช้ได้กับกรณีที่เกิด Mismatch ของลำดับเบส 2-7 คู่เบส หากเกิด Mismatch เพียง 1 คู่เบส จะต้องนำไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ T7 endonuclease-I ก่อน จึงจะได้ดีเอ็นเอคู่สมสายสั้นและสายยาวที่สามารถแยกด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้นปกติได้เป็น 2 แถบดีเอ็นเอ ทำให้ทราบว่าตัวอย่างใด

เป็นตัวอย่างของพืชปรับแต่งยีน โดยทั้งสองเทคนิคนี้ยังไม่มีการศึกษาในตัวอย่างพืช การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบการตรวจสอบพืชปรับแต่งอย่างง่ายให้มีความสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัยเมื่อเทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิคอื่น [6].

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสร้างพลาสมิดมาตรฐานสำหรับใช้เป็นวัสดุอ้างอิงทดสอบ

ทำการออกแบบพลาสมิดมาตรฐานที่ใช้สำหรับตรวจข้าวสาลีที่มีการปรับแต่งยีน α -gliadin แบบ SDN1 (Site-directed nuclease 1) โดยสืบค้นข้อมูลลำดับ

เบสยีน α -gliadin ของข้าวสาลีและตำแหน่งเบสลำดับที่มีการปรับแต่ง (Indel) ในแต่ละสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาอยู่ในปัจจุบัน โดยให้ลำดับเบสหายไปในจำนวนต่างๆ ได้แก่ ที่จำนวน 1, 3, 5, 8, 11 เบส จากนั้นสังเคราะห์พลาสมิดที่ออกแบบไว้ในรูปแบบที่พร้อมใช้และรูปแบบ Transformed *E.coli* โดยเลี้ยง Transformed *E.coli* ในอาหารเลี้ยง LB ที่มียาปฏิชีวนะชนิดเดียวกับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะในพลาสมิดที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นสกัด พลาสมิดดีเอ็นเอจาก Transformed *E.coli* และส่งอ่านลำดับเบส (Sequencing) เพื่อยืนยันความถูกต้องของพลาสมิดมาตรฐาน เก็บรักษาไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็นสต็อกดีเอ็นเอมาตรฐาน

α -Gliadin Full Length CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT
-1 bp CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT
-3 bp CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT
-5 bp CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT
-8 bp CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT
-11 bp CAATTTCCAGGGCAGCAACAACCATTTCCACCACAACAGCCATATCCGAGCGCGCAACCATTTCCATCACAACAACCATATCTGCAGCTGCAACCATTT

Figure 1 Sequencing of the α -gliadin full length and different deletion types in wheat.

2.2 การทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์ Hetero-/homo-duplexes

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยขึ้นดีเอ็นเอ (Amplicon) ที่ได้จากปฏิกิริยา ให้ครอบคลุมบริเวณที่ลำดับเบสหายไปใน (Indel) และขนาดความยาวของขึ้นดีเอ็นเอ (Amplicon) ที่ความยาว 300 เบส (Table 1) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิดวัสดุอ้างอิงทดสอบที่ได้ออกแบบไว้แล้ว โดยใช้พลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มีลำดับเบสที่หายไปใน (Full length) คู่กับพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสที่หายไปใน (Indel) ที่จำนวน 1 3 5 8 และ 11 เบส เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา สำหรับการทดสอบหาสัดส่วนที่เหมาะสมของการเกิด Hetero-/homo-duplexes จะนำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จาก

พลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มีลำดับเบสที่หายไปใน (Indel) มาผสมกับพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสที่หายไปใน (Indel) ที่จำนวน 1 3 5 8 และ 11 เบส ที่ระดับอัตราส่วน 1:1 (V/V) เพื่อทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำดีเอ็นเอผสมนั้นมาผ่านอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดการแยกสายของดีเอ็นเอ (Denature) และลดอุณหภูมิที่ 50-65 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (Annealing) ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 4% ที่ 100 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Ethidium bromine และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Gel document โดยผลที่ได้จะมีดีเอ็นเอสายคู่รูปแบบ Homo-duplexes ที่มีลักษณะแถบเจลดีเอ็นเอแถบเดียวและรูปแบบ Hetero-duplexes ที่มีลักษณะแถบเจลดีเอ็นเอสองแถบ ซึ่งเกิดขึ้นจากตำแหน่งเบสที่ขาดหายไป (Indel) [7]

Table 1 Primer designed for detection of α -gliadin gene-edited in wheat.

Sequences (5'->3')	Template strands
FORWARD PRIMER	CACCGCCACAATTGCAGTTAGA
REVERSE PRIMER	GAATACTGTGGTTGCGGTTGT
PRODUCT LENGTH (BP)	300

2.3 การทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์ T7 endonuclease-I (T7E1)

นำดีเอ็นเอจากข้อ 2.2 มาใส่ 10X NEBuffer2 (Buffer 1.8 μ l + dH₂O 11.2 μ l) จากนั้นนำมาตัดด้วย เอนไซม์ T7 endonuclease-I (T7E1) โดยใช้อัตราส่วน Product : T7 Endonuclease I (5 units/ μ l) ที่ 18:2 (V/V) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการตัดด้วย T7E1 มาแยกด้วย กระแสไฟฟ้าในเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้นของเจล ปกติ 1-2 % ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 45-60 นาที

2.4 การทดสอบตัวอย่างข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศด้วยเทคนิค Homo/Hetero-duplexes และ T7 endonuclease-I (T7E1)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวสาลีอื่นๆ มาเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากข้อ 2.2 เมื่อได้ผลผลิต PCR ให้แบ่งออกเป็น 2 หลอด หลอด แรกนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 4% ที่ 100 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Ethidium bromine และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย เครื่อง UV Gel document หลอดที่สองใส่ 10X NEBuffer2 (Buffer 1.8 μ l + dH₂O 11.2 μ l) จากนั้น นำมาตัดด้วยเอนไซม์ T7 endonuclease-I (T7E1) โดยใช้อัตราส่วน Product : T7 Endonuclease I (5 units/ μ l) ที่ 18:2 (V/V) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 4% ที่ 100 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Ethidium bromine และตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Gel document

2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ของตัวอย่างข้าวสาลี

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวสาลีที่มีความเข้มข้น ดีเอ็นเอ 0.1 1 5 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาเพิ่ม ปริมาณและเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ด้วยไพรเมอร์ที่มีขนาดความยาว 300 เบส โดยใช้เทคนิค พิซีอาร์จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ ความเข้มข้นเจล 1-2 %

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบ Homo/Hetero duplexes จาก ตัวอย่างพลาสมิดข้าวสาลี

การแยกผลผลิต PCR ที่ได้จากพลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มีลำดับเบสที่หายไปและพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบส ที่หายไปขนาดเล็กนั้นมีการตรวจสอบที่มีข้อจำกัด ดังนั้น การใช้วิธี Homo/hetero duplexes ที่มีการเคลื่อนที่ใน เจลอะกาโรสแตกต่างกันจึงสามารถช่วยตรวจสอบ ผลผลิต PCR ได้ โดยความเข้มข้นของเจลอะกาโรสที่ใช้ ตรวจสอบอยู่ที่ 4-6% และใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เนื่องจากการเคลื่อนตัวของเจลที่มีความเข้มข้นสูงและใช้ นานขึ้นจะทำให้สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่าง ที่มีการปรับแต่งยีนให้มีลำดับเบสที่หายไปขนาดเล็กได้ [7] ซึ่งในการศึกษานี้เราได้ทำการตรวจสอบด้วยตัวอย่าง พลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มีลำดับเบสที่หายไป (Full length) และพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสที่หายไป (Indel) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบ ผลการทดลองด้วยขั้นตอนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะ กาโรส 4% (รูปที่ 1) ขึ้นดีเอ็นเอของพลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มี ลำดับเบสที่หายไป (Full length) และพลาสมิดอ้างอิงที่

มีลำดับเบสหายไปจำนวน 1 เบส ให้ผลเจลที่แถบเดียว ที่ขนาดประมาณ 300 bp ในส่วนของพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสหายไปจำนวน 3 5 8 และ 11 เบส ให้ผลเจลที่สองแถบ การค้นพบนี้เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีนี้ใช้ได้กับการตรวจสอบกับตัวอย่างที่มีการปรับแต่งยีนที่มากกว่า 2 เบส และจุดที่น่าสนใจคือขึ้นดีเอ็นเอของพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสหายไปจำนวน 5 เบส มีแถบเกิดขึ้น 3 แถบ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดหายไปของเบสแต่ละประเภทให้ลักษณะของ Heteroduplex ที่เฉพาะเจาะจง

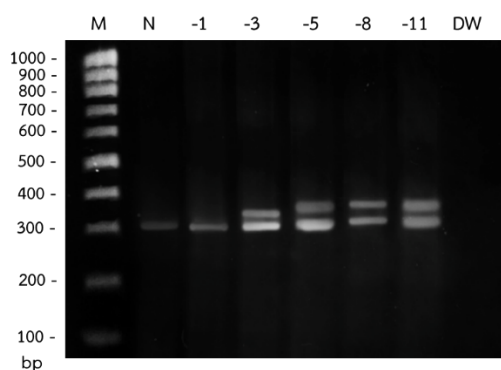


Figure 2 Detection of α -gliadin gene-edited wheat using the Homo/Hetero duplexes method. [M = 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne), N = full length plasmid, -1 to -11 = plasmid DNA with 1 to 11 bases missing, respectively, DW = Distilled Water (dH_2O)]

3.2 การทดสอบวิธีตรวจวิเคราะห์ T7 endonuclease-I (T7E1)

การตรวจสอบที่นิยมนำมาวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบบริเวณที่ปรับแต่ง (Indel) คือการตรวจสอบด้วย T7 endonuclease 1 (T7E1) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถตรวจสอบตำแหน่งที่ไม่จับกันได้ทั้งหนึ่งเบสและหลายเบสของตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยการจดจำและแยกดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้หากมีโครงสร้างผิดปกติ (โค้งงอ/หักงอ) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วดีเอ็นเอของ Heteroduplex จะมีบริเวณ

ที่มีลักษณะนูนเป็นรูป (Loop) เนื่องจากเกิดการไม่จับกันของลำดับเบสในบริเวณนั้นๆ ทำให้เอนไซม์ T7E1 สามารถแยกความแตกต่างได้ [8] จากผลการทดลองที่ 3.1 พบว่าตัวอย่างพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสหายไปจำนวน 1 เบส ให้ผลเจลที่แถบเดียว ไม่เกิดการแยกดีเอ็นเอออกจากกัน ดังนั้นเราจึงใช้เอนไซม์ T7E1 ในการแยกดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1-2% จาก Figure 2 พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ T7E1 สามารถแยกดีเอ็นเอของตัวอย่างพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสหายไปจำนวน 1 เบสได้ ดังนั้นการตรวจสอบ Homo/Hetero duplexes ด้วยการปรับแต่งยีนที่ 1 เบส สามารถตรวจสอบได้หากแยกด้วยเอนไซม์ T7E1

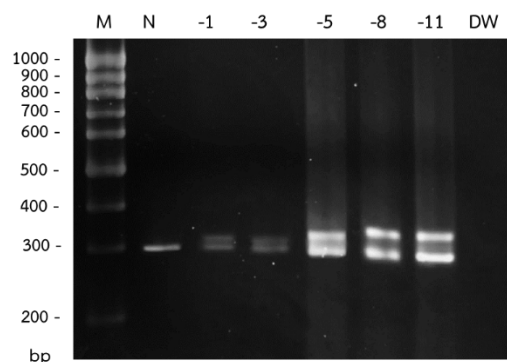


Figure 3 Detection of α -gliadin gene-edited wheat using Homo/Hetero duplexes and T7-endonuclease I (T7E1) assay. [M = 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne), N = full length plasmid, -1 to -11 = plasmid DNA with 1 to 11 bases missing, respectively, DW = distilled water (dH_2O)]

3.3 การทดสอบตัวอย่างข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศด้วยเทคนิค Homo/Hetero-duplexes และ T7 endonuclease-I (T7E1)

การทดสอบเทคนิค Homo/Hetero-duplexes และ T7 endonuclease-I (T7E1) มาใช้กับตัวอย่างจริง

เราได้นำตัวอย่างข้าวสาลีนำเข้าจากต่างประเทศมาทดสอบเปรียบเทียบกับพลาสมิดอ้างอิงที่ไม่มีลำดับเบสที่หายไป (Full length) และพลาสมิดอ้างอิงที่มีลำดับเบสที่หายไป (Indel) ด้วยเทคนิค Homo/Hetero-duplexes พบว่าตัวอย่างข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมดให้ผลเจลแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 300 bp (Figure 4a) เพื่อตรวจสอบให้แน่ชัดเนื่องจากตัวอย่างข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศอาจมีลำดับเบสหายไปจำนวน 1 เบส จึงทดสอบด้วย T7E1 ผลปรากฏว่าตัวอย่างข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมดยังคงให้ผลเจลแถบเดียวที่ขนาดประมาณ 300 bp (Figure 4b) จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างข้าวสาลีนำเข้าจากต่างประเทศไม่ใช่พืชปรับแต่งยีน

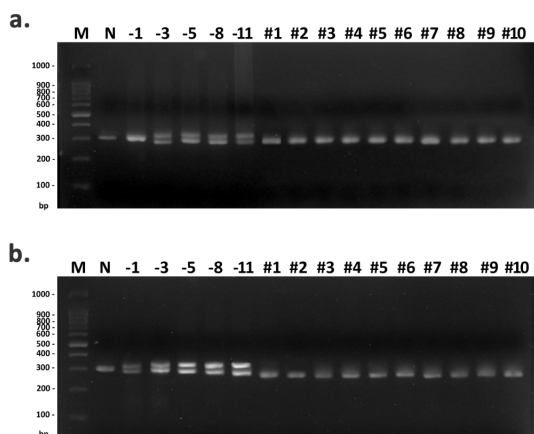


Figure 4 Detection and comparison of imported wheat samples with α -gliadin gene-edited wheat using a.) Homo/Hetero duplexes and b.) T7-endonuclease I (T7E1) assay. [M = 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne), N = full length plasmid, -1 to -11 = plasmid DNA with 1 to 11 bases missing, respectively, #1 to #10 = imported wheat samples]

3.4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ของตัวอย่างข้าวสาลี

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of detection; LOD) ทำให้สามารถกำหนดความเข้มข้นขั้นต่ำในการตรวจสอบตัวอย่างที่มีการปรับแต่งยีนด้วยวิธี Homo/hetero duplexes ดังนั้นเราจึงกำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวสาลีที่ 0.1 1 5 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่มีขนาดครอบคลุมยีนความยาว 300 เบส จากผลการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Figure 3) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่สามารถสังเกตเห็นได้น้อยที่สุดคือความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพราะฉะนั้นหากทำการตรวจสอบตัวอย่างข้าวสาลีที่มีการปรับแต่งยีนด้วยวิธี Homo/hetero duplexes สามารถใช้ความเข้มข้นขั้นต่ำได้ที่ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

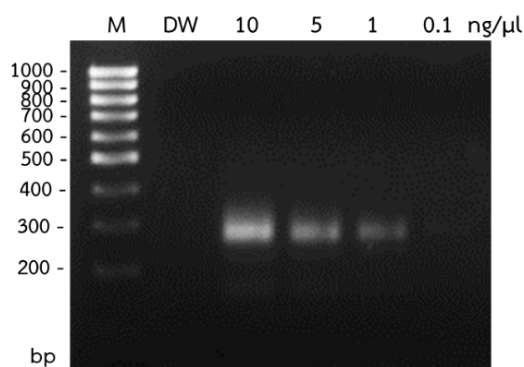


Figure 5 The limit of detection (LOD) of the PCR amplified from wheat sample. [M = 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne), DW = distilled water (dH₂O), 10 5 1 and 0.1 = wheat DNA concentration]

4. สรุปผลการทดลอง

การใช้วิธี Homo/hetero duplexes ตรวจสอบข้าวสาลีที่มีการปรับแต่งยีน α -gliadin โดยให้มีการลำดับเบสหายไปจำนวนต่างๆ ได้แก่ ที่จำนวน 1 3 5 8 และ 11 เบส สามารถตรวจสอบกับตัวอย่างที่มีการปรับแต่งยีนที่มากกว่า 2 เบส หากต้องการตรวจสอบตัวอย่างที่มีการปรับแต่งยีนที่น้อยกว่า 2 เบส สามารถใช้เอนไซม์ T7E1 แยกดีเอ็นเอในบริเวณที่มีการเกิด Loop ที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธี Homo/hetero duplexes เพียงอย่างเดียว และสามารถนำทั้งสองเทคนิคมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงโดยใช้ตัวอย่างข้าวสาลีนำเข้าจากต่างประเทศได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำหนดความเข้มข้นที่ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างข้าวสาลีได้

5. References

- [1] Kalaitzandonakes, N., Willig, C. and Zahringer, K., 2023, The economics and policy of genome editing in crop improvement, *Plant genome*. 16(2): e20248.
- [2] Howdle, P.D., 2006, Gliadin, glutenin or both? the search for the holy grail in coeliac disease, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. 18(7): 703-706.
- [3] Petersen, J., Montserrat, V., Mujico, J.R., Loh, K.L., Beringer, D.X., Lummel, M., Thompson, A., Mearin, M.L., Schweizer, J., Kooy-Winkelaar, Y., Bergen, J., Drijfhout, J.W., Kan, W., Gruta, N.L.L., Anderson, R.P., Reid, H.H., Koning, F., Rossjohn, J., 2014, T-cell receptor recognition of HLA-DQ2–gliadin complexes associated with celiac disease, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 21: 480-488.
- [4] Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF and Barro F, 2018, Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9, *Plant Biotechnol. J*. 16(4): 902-910.
- [5] Szurman-Zubrzycka, M., Chmielewska, B., Gajewska, P. and Szarejko, I., 2017, Mutation detection by analysis of DNA heteroduplexes in TILLING populations of diploid species, pp. 281-303, In Jankowicz-Cieslak, J., Tai, T., Kumlehn, J. and Till, B. (Ed.), *Biotechnologies for plant mutation breeding*, Springer, Cham.
- [6] Zhu, X. et al., 2014, An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system, *Sci. Rep*. 4: 6420.
- [7] Bhattacharya, D. and Van Meir, E.G., 2019, A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis, *Sci Rep*. 9(1): 4437.
- [8] Léna Vouillot, Aurore Thélie and Nicolas Pollet, 2015, Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases, *G3 (Bethesda)*. 5(3): 407-415.