การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-Time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

Development Triplex Real-Time PCR Screening Method to Detect GM Maize for ISO/IEC17025 Standard Accreditation

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1/] ปิยนุช ศรชัย[1/] จิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ[1/] พงศกร สรรค์วิทยากุล[1/]

Piyarat Thammakijjawat[1/] Piyanuch Sornchai[1/] Thitirut Assawamongkolsiri[1/]

Pongsakorn Sanvittayakul[1/]

ABSTRACT

Analysis of Genetically Modied plants in general laboratory uses qualitative PCR to detect CaMV 35S promoter and NOS terminator by single Real-Time PCR method. The quality of the DNA test was examined using plant specific reference gene, in the case of maize, the hmg gene was tested by PCR or Real-time PCR. This research has developed a method for screening genetically modified maize by testing three target genes simultaneously in a single reaction. The Triplex Real-Time PCR assay of CaMV 35S promoter, NOS terminator, and maize *hmg* gene were tested in the same reaction. Results show that the developed screening method was specific and sensitive for certified reference materials of corn-GM events. The Limit of detection was found at 0.01%. The concentration of the DNA template is 50-200 nanograms per reaction. Seventeen maize samples were also tested with this newly developed method. The test results were comparable to those of Single plex Real time PCR but this method was more efficient because it reduced both cost and time for the analysis It can be used as a standard screening method for maize and maize products. The method has already been approved as ISO / IEC17025 standard from Bureau of Laboratory Standards and used as a standard test method in laboratory of Department of Agriculture.

Key words: Genetically Modied Corn, Screening Method, Multiplex Real Time PCR, Triplex Real Time PCR

[/1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

[/1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ที่ตัดต่อเข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรม แบบทดสอบทีละยีน (Single Real-Time PCR) ควบคุมคุณภาพการทดสอบโดยตรวจยีนจำเพาะอ้างอิงของพืช (กรณีข้าวโพดทดสอบยีน *hmg*) ด้วย PCR หรือ Real-time PCR ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการทดสอบทีละปฏิกิริยา งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมโดยการทดสอบยีนเป้าหมายทั้งสามชนิดพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว (Triplex Real-Time PCR) จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ในการตรวจยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และยีน *hmg* ของข้าวโพด ในปฏิกิริยาเดียวกัน พบว่า มีความจำเพาะและความไวในการตรวจวิเคราะห์ ขีดจำกัดขั้นต่ำการปะปนที่สามารถตรวจได้ (Limit of detection) ร้อยละ 0.01 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบ 50-200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ผลการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดจำนวน 17 ตัวอย่าง ให้ผลถูกต้องตรงกับการทดสอบด้วยวิธีเดิมของห้องปฏิบัติการ วิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นใหม่สามารถลดต้นทุนและระยะเวลาในการทดสอบโดยมีประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์เทียบเท่าและดีกว่าวิธีการเดิม สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจคัดกรองข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม และได้ผ่านการรับรองวิธีการทดสอบตามมาตรฐานสากล ISO/IEC17025 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันได้ขยายผลใช้เป็นวิธีการทดสอบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ : ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม, การตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรม, CaMV35S promoter, Nos terminator, *hmg* gne, Triplex Real-time PCR

บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีความก้าวหน้าและมีศักยภาพสูงในการสร้างประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ทั้งการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น พืชทนแล้ง พืชทนเค็ม ทนทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืช เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ยืดอายุการเก็บรักษา รวมถึงสร้างพืชที่ให้มีสีสันแปลกใหม่ตามความต้องการของตลาด พืชดัดแปลงพันธุกรรมมีการปลูกและใช้ประโยชน์เชิงการค้าตั้งแต่ปี 2539 ล่าสุดปี 2560 มีรายงานการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมใน 24 ประเทศ คิดเป็นพื้นที่ 1,186 ล้านไร่ และมีประเทศที่ไม่อนุญาตปลูกแต่ให้นำเข้าเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอีก 43 ประเทศ ซึ่งมีพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับอนุญาตมากกว่า 30 ชนิด (Species) จำนวน 505 events จัดเป็นพืชไร่เศรษฐกิจ ไม้ผล ไม้ยืนต้น และไม้ดอกไม้ประดับ โดยพืชที่ปลูกมากในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย และคาโนลา (ISAAA, 2560) สำหรับสถานภาพของประเทศไทยไม่อนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม แต่อนุญาตให้นำเข้าข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่ออุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ทั้งนี้จากข้อกังวลด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ทำให้หลายประเทศใช้เป็นมาตรการกีดกันทางการค้า ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรและอุตสาหกรรม จึงมีความจำเป็นต้องมีผลการตรวจวิเคราะห์จาก

ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC17025 ตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้า

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยตรวจหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) และ Real-Time PCR ซึ่งในหนึ่งตัวอย่างทดสอบต้องทำการตรวจวิเคราะห์แบบทีละยีน (Single plex) จำนวน 3 ยีน ได้แก่ การตรวจยีนจำเพาะของพืช (reference gene) การตรวจยีนคัดกรอง (screening gene) ที่ตัดต่อเข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรม CaMV 35S promoter และ NOS terminator ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายของสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนสิ้นเปลืองทรัพยากรในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ถึง 12 วันทำการ

จากรายงานการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพหลายยีนในปฏิกิริยาเดียวกัน (Multiplex Real-Time PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์และโพรบที่จำเพาะสำหรับการตรวจแต่ละยีน ติดฉลากสีวิเคราะห์แตกต่างกัน สามารถทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว โดยใช้เทคนิค Duplex Real-Time PCR สำหรับตรวจยีนคัดกรองสองยีน (CaMV 35S promoter และ NOS terminator) ในปฏิกิริยาเดียวกัน (Waiblinger *et al.,* 2008) และเทคนิค Pentaplex Real-Time PCR สำหรับการตรวจห้ายีนในปฏิกิริยาเดียวกัน (Huber *et al.,* 2013) เป็นต้น ทำให้สามารถลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ ลดต้นทุนค่าสารเคมี วัสดุวิทยาศาสตร์ และระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ได้มาก

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจคัดกรองด้วยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์หลายยีนในปฏิกิริยาเดียวกัน (Multiplex Real-Time PCR) โดยตรวจยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ร่วมกับการตรวจยีนจำเพาะอ้างอิงของพืช แบบ Triplex Real-Time PCR เพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ของงานบริการตรวจวิเคราะห์รับรองของห้องปฏิบัติการ โดยยังคงประสิทธิภาพความถูกต้อง แม่นยำ และขยายผลสำหรับการขอรับรองวิธีการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certied Reference Material,CRM) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม events MON810, Bt11, Bt176, MON89034, NK603, MIR604 MIR162 และถั่วเหลือง (GTS 40-3-2) โดยวิธี GeneScan Extraction ซึ่งเป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในห้องปฏิบัติการฯ ชั่งตัวอย่าง 0.2 มก. ใส่หลอดทดลอง เติม Lysis buffer (GeneScan, Eurofin) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาต่ออีก 1 ชม. ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) แล้วนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Wizard Minipreps DNA purification resin (Promega corporation) ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Multiskan GO (Thermo Fisher Scientic, Finland)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยทดสอบการปนเปื้อนสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibition test) เตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์อัตรา 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:64 และ 1:256 ทำการทดสอบปฏิกิริยา Real-Time PCR ตรวจยีนจำเพาะข้าวโพด (*High mobility group*: *hgm*) บันทึกค่า Crossing Point (CP) วิเคราะห์ผลความแตกต่างของค่า CP โดยค่าที่ยอมรับได้ △Ct (extrapolated) ต้องต่ำกว่า 0.5 ค่า slope ของกราฟจะต้องอยู่ในช่วง -3.1 ถึง -3.6 โดย amplification efficiencies อยู่ในช่วง 90-110% (EURL standard)

2. สังเคราะห์ไพร์เมอร์และโพรบสำหรับการตรวจด้วย Triplex Real-Time PCR

วิเตราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และโพรบสำหรับยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* ของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม อ้างอิงจาก Waiblinger *et al.,* 2008 และ ISO 21569 (2550) สำหรับยีนจำเพาะของข้าวโพด ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์และโพรบจากข้อมูล Validation method ของ JRC-EURL (JRC-EURL-GMFF-ENGL, 2011) สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองแบบ Triplex Real-Time PCR วิเคราะห์ช่วงความยาวคลื่นและชนิดสีฟลูออเรสเซนส์ที่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจจับได้ ออกแบบการติดฉลากสีที่สามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง Real-Time PCR รุ่น LC480 Cycler (Roche Technologies, Santa Clara, CA) โดยโพรบสำหรับ CaMV 35S promoter ติดฉลากสี 5'FAM-3'BHQ1 โพรบสำหรับ NOS terminator ติดฉลากสี 5'HEX-3'BHQ1 และโพรบสำหรับยีนจำเพาะอ้างอิงข้าวโพดติดฉลากสี 5'Cy5- 3'BHQ3 เลือกใช้ Black Hole Quencher® (BHQ) ซึ่งมีช่วงการตรวจจับสัญญาณกว้างกว่า Quencher ชนิด TAMRA ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการปัจจุบัน ซึ่งจะเพิ่มความไวและความจำเพาะในการอ่านค่าปฏิกิริยาทดสอบ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และโพรบที่ใช้ในการทดลอง แสดงใน Table 1

Table 1 Oligonucleotide sequences of primer and probe labeling for detecting CaMV 35S promoter, NOS terminator and *hmg* gene

Target	Sequences	Length	Reference
Screening target			ISO 21569:2005
35S-FTM	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'	18	/Amd.1:2013
35S-RTM	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'	22	
35S-TMP	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1-3'	22	
NOS180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG-3'	25	
NOS180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT-3'	25	
NOS180-P	5'-Hex-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1-3'	28	
Endogenous gene			JRC-EURL-GMFF-
hmg-F	5'TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'	23	ENGL (2010)
hmg-R	5'GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3'	22	
hmg-P	5'Cy5-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ3-3'	23	
Probe for Single plex Real-Time PCR			ISO 21569:2005
35S-P	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG- TAMRA-3'	22	/Amd.1:2013
NOS-P	5'-FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA -3'	28	

3. ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของปฏิกิริยา Triplex Real-Time PCR ในการตรวจวิเคราะห์

ทดสอบความจำเพาะการตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมในการตรวจยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ร่วมกับยีนจำเพาะข้าวโพด *hmg* ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสม (optimize ความเข้มข้นของไพร์เมอร์และโพรบ) เมื่อได้สภาวะเหมาะสมแล้วจึงทำการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยากับข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทีละยีนเป้าหมาย บันทึกค่าการตรวจจับสัญญาณสีของโพรบ (Crossing point, CP) เปรียบเทียบผลกับวิธีทดสอบแบบปฏิกิริยาเดี่ยว (Single plex Real-Time PCR) ตามวิธีการเดิมของห้องปฏิบัติการฯ (ใช้โพรบติดฉลากสี 5'FAM-3'TAMRA) และเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจคัดกรองแบบ Duplex PCR ตามกรรมวิธีของ Waiblinger *et al.* (2008) และ ISO21569 (2005) วิเคราะห์ผลการตรวจวิเคราะห์ยีนคัดกรองและยีนจำเพาะของพืชเทียบกับองค์ประกอบโครงสร้างยีน (construct) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมแต่ละ events ปฏิกิริยาและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบแสดงใน Table 2

Table 2 Reagents used for Real-Time PCR reaction (Single plex, Duplex and Triplex) for detecting CaMV 35S promoter, NOS terminator and *hmg* gene

Reagent	Final concentration/reaction (M)		
	Single plex PCR	Duplex PCR	Triplex PCR
2XLightCycer Probe master mix	1X	1X	1X
35S-F primer	0.25	0.1	0.1
35S-R primer	0.25	0.1	0.1
35S-Probe	0.25	0.1	0.1
NOS-F primer	0.25	1.0	1.0
NOS-R primer	0.25	1.0	1.0
NOS-Probe	0.25	0.2	0.2
hmg-F primer	-	-	0.05
hmg-R primer	-	-	0.05
hmg-Probe	-	-	0.025
DNA template (ng)	50100-	50200-	50200-
Total reaction volume (ng)	20	20	20

สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Light Cycler 480 ตามโปรแกรมดังนี้

Single plex: CaMV 35S promoter

Initial denaturation ที่ 95°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำซ้ำ denaturation 95°ซ เป็นเวลา 5 วินาที annealing และ extension 60°ซ เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ cooling ที่ 40°ซ

Single plex: NOS terminator

Initial denaturation ที่ 95°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำซ้ำ denaturation 95°ซ เป็นเวลา 15 วินาที annealing และ extension 52°ซ เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ cooling ที่ 40°ซ

การควบคุมคุณภาพดีเอ็นเอตัวอย่างที่ทดสอบแบบ Single plex และ Duplex ใช้วิธี conventional PCR และตรวจผลด้วย gel electrophoresis (สำหรับการทดลองครั้งนี้ไม่ได้แสดงผล)

Duplex: CaMV 35S promoter and NOS terminator ; Triplex (เพิ่มยีน hmg)

initial denaturation ที่ 95°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำซ้ำ denaturation 95°ซ เป็นเวลา 5 วินาที annealing และ extension 60°ซ เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ cooling ที่ 4°ซ

4. ทดสอบความไว (Sensitivity) และปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (Amplification range)

ทดสอบความไวในการตรวจวิเคราะห์โดยเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีองค์ประกอบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในการทดลองนี้เลือกใช้ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event NK603 ที่มีการเจือปนยีนดัดแปลงพันธุกรรม 98 ก./กก. GM (Genefically Modified) คิดเป็น 10% และ MON89034 มีการเจือปน 994.25 ก./กก. คิดเป็น 100% GM สกัดดีเอ็นเอและเจือจางให้มีอัตราการปะปนยีนดัดแปลงพันธุกรรม event ละ 5 ระดับ ดังนี้ NK603 ปะปนที่ร้อยละ 10, 1, 0.1 0.01 และ 0.001 และ MON 89034 ปะปนที่ร้อยละ 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 คำนวณจำนวน copies ยีนจากค่า haploid genome mass ของข้าวโพด 2.6 พิโคกรัม ทดสอบที่ปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา copies ของยีนการปะปนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ร้อยละ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 โดยเฉลี่ย เท่ากับ 36697, 3669.7, 366.97, 36.697, 3.6697 และ 0.36697 ตามลำดับ ทดสอบปฏิกิริยา Triplex Real-time PCR จำนวน 12 ซ้ำ ตามกรรมวิธี

ทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (Amplification range) ที่ปฏิกิริยา Real-Time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง โดยเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK603 ที่มีการเจือปนยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม 1% ทดสอบปฏิกิริยา Triplex Real-time PCR โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา จำนวน 12 ซ้ำ 2 รอบการทดสอบ

บันทึกค่า CP ของปฏิกิริยาการตรวจจับฉลากสีโพรบ วิเคราะห์ค่าขีดจำกัดขั้นต่ำที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) ค่า PCR efficiency และค่าความชันของกราฟ (slope) ตามมาตรฐานการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

5. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการตรวจคัดกรองตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ (ตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ) ที่ผ่านการ

ตรวจคัดกรองแล้วว่าไม่เป็นข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ เมล็ดข้าวโพด เกร็ดข้าวโพด และน้ำนมข้าวโพด ตามวิธีการสกัดของห้องปฏิบัติการตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยการเจือปน (fortified) ด้วยดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม NK603 0.5% เจือปนให้ดีเอ็นเอตัวอย่างทดสอบมีความเข้มข้นปะปน 0.05% GM สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทดสอบเพื่อตรวจคัดกรองการปะปนข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกค่า CP ของการทดสอบยีน CaMV 35S promoter NOS terminator และ *hmg* gene จากนั้นวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะของวิธีทดสอบ จัดทำคู่มือขั้นตอนการปฏิบัติงาน ในระบบคุณภาพ เพื่อขอรับรองขอบข่ายการตรวจคัดกรองด้วยวิธี Triplex Real-Time PCR จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากนั้นทดสอบปฏิกิริยา Triplex Real-Time PCR ในการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator กับตัวอย่างข้าวโพดที่ส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ จำนวน 17 ตัวอย่าง ทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับผลการตรวจคัดกรองของห้องปฏิบัติการ (Single plex) ใช้ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 0.1% NK603 เป็นตัวอย่างอ้างอิงการทดสอบ positive control และน้ำกลั่นเป็น negative control วิเคราะห์ค่า CP ของปฏิกิริยาตัวอย่างที่แสดงค่า CP อยู่ในเกณฑ์ของค่า CP positive control ทั้งสองซ้ำ แปลผลว่าตรวจพบ (detected, +) ตัวอย่างที่ไม่แสดงค่า CP ทั้งสองซ้ำแปลผลว่าตรวจไม่พบ (not detected, -)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี GeneScan Extraction ได้ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเฉลี่ย 1,467.17 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร การตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ A260/280 มีค่า OD (Optical Density) เฉลี่ย 1.8-2.0 ผลการทดสอบปฏิกิริยา inhibition test ดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่สกัดได้ events MON810 (2%GM), MON89034 (100%GM), NK603 (0.5%GM), MIR162 (100%GM), Bt11 (0.48%GM), Bt176 (5%GM) และ MIR604 (9.85%GM) พบว่า ค่า CP ที่ทดสอบของอัตราการเจือจางดีเอ็นเอได้ △Ct (extrapolate) อยู่ในช่วง 0.13-0.34 (ค่ามาตรฐานจะต้องไม่เกิน 2) สัมประสิทธิ์ R^2 อยู่ในช่วง 0.997-0.999 ค่า amplification efficiencies เท่ากับ 99% (Table 3) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน แสดงว่าวิธีการสกัด GeneScan Extraction และดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถนำไปใช้ทดสอบการตรวจคัดกรองยีนขั้นตอนต่อไปได้ ทั้งนี้ วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ (Cankar *et al.,* 2006) สอดคล้องกับ Turkec *et al.,* (2016) รายงานว่า การสกัดดีเอ็นส่งผลต่อการตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ มีปริมาณเพียงพอสำหรับทดสอบปฏิกิริยา ไม่มีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา

Table 3 The DNA concentration, DNA ratio (A260/280) and △Ct (extrapolated) of inhibition test

GM Maize Event	% GMO Value	concentration (ng/ul)	Ratio of A260/280	Inhibition test	
				△Ct (extrapolated)	R^2
MON810	blank <0.04	1,035±132	1.87±0.11	NA	NA
	0.5%	1,570±192	1.89±0.05	NA	NA
	2	1,640±183	1.90±0.05	0.34	0.998
	9.9%	1,642±157	1.88±0.07	NA	NA
MON89034	100%	1,353±133	2.00±0.08	0.29	0.999
NK603	blank <0.04	1,630±347	1.89±0.02	NA	NA
	0.1%	1,539±179	1.87±0.07	NA	NA
	0.5%	1,008±152	1.84±0.05	0.13	0.998
	1.0%	1,156±163	1.86±0.04	NA	NA
	2%	1,038±135	1.91±0.08	NA	NA
	10%	1,299±190	1.90±0.03	NA	NA
MIR162	100	1,197±90	1.98±0.02	0.28	0.999
Bt11	4.89	1,508±151	1.87±0.06	0.25	0.997
Bt 176	5.00	1,849±85	1.92±0.10	0.32	0.999
MIR604	<0.09	1,897±131	1.93±0.05	NA	NA
	0.98	1,795±231	1.97±0.02	NA	NA
	9.85	1,499±167	1.97±0.08	0.24	0.999
Mean		1,467.17	1.91	-	-

NA: Not available

2. ทดสอบความจำเพาะ (Specificity) และประสิทธิภาพของปฏิกิริยา Triplex Real-Time PCR

ความจำเพาะของปฏิกิริยาในการตรวจยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และ *hmg* พบว่า มีความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์สามยีนได้ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจยีน CaMV 35S promoter (35S-FTM, 35S-RTM) และโพรบ 35S-TMP เท่ากับ 0.1 μM ขณะที่การตรวจยีน NOS terminator (NOS180-F, NOS180-R) ต้องใช้ความเข้มข้นของไพร์เมอร์ 1.0 M ต่อปฏิกิริยา และโพรบ NOS180-P ใช้ 0.2 M ทั้งนี้วิธีมาตรฐานเดิมของห้องปฏิบัติการทดสอบแบบ Single plex ใช้ปริมาณความเข้มข้นไพร์เมอร์และโพรบมากกว่า คือ 0.25 μM ต่อปฏิกิริยา และในปฏิกิริยาการตรวจยีน *hmg* ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพร์เมอร์ คือ 0.05 M และโพรบ 0.025 μM ซึ่งการตรวจด้วย Triplex Real-Time PCR มีข้อดีกว่าวิธี Single plex และ PCR คือช่วยลดขั้นตอน และระยะเวลาการทดสอบคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรม และควบคุมคุณภาพดีเอ็นเอในขั้นตอนเดียวกัน ลดโอกาสการปนเปื้อนที่อาจส่งผลกระทบต่อการทดสอบจากการดูดสารละลายจากตัวอย่างในการทดสอบหลายครั้ง และช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี Probe master mix ทำให้

ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ลดลงจากวิธีเดิม ผลการทดสอบเปรียบเทียบปฏิกิริยา Single plex, Duplex และ Triplex Real-time PCR วิเคราะห์ค่า CP ของการตรวจ พบว่า เทคนิค Triplex และ Duplex Real-Time PCR ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ต่างกันทางสถิติ ในขณะที่วิธี Triplex และ Duplex ได้ค่า CP ต่ำกว่าการตรวจวิเคราะห์แบบ Single plex อย่างมีนัยสำคัญ (Table 4) ผลการตรวจ CaMV 35S promoter ด้วยวิธี Single plex, Duplex และ Triplex สายพันธุ์ Bt11 ได้ค่า CP เฉลี่ย 33.21, 30.24 และ 30,17 ตามลำดับ ซึ่งวิธี Single plex มีค่า CP เฉลี่ยมากกว่า 3 รอบ และการตรวจ NOS terminator ค่า CP เฉลี่ย 34.97, 31.23 และ 31.18 ตามลำดับ มากกว่าประมาณ 4 รอบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการทดสอบในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event NK603, MON89034 และ MIR604 เนื่องจาก Quencher ชนิด BHQ ให้สัญญาณการตรวจวิเคราะห์ดีกว่า TAMRA ซึ่งสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สองด้านอาจซ้อนทับกันทำให้การอ่านค่าสัญญาณล่าช้ากว่า BHQ (Johansson, 2006) ผลการทดสอบสอดคล้องกับรายงานของห้องปฏิบัติการ Lab Life-Real-Time PCR (2015) ปฏิกิริยาแบบ Triplex ประหยัดเวลาในการทำงาน เพราะตรวจสอบได้หลายยีนในครั้งเดียวกัน Alary *et al.* 2003)) พบว่า การตรวจคัดกรองด้วย Duplex สามารถตรวจสองยีนพร้อมกันแต่ต้องควบคุมคุณภาพดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกหนึ่งการทดสอบซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนของตัวอย่าง ทั้งนี้การตรวจแบบ Triplex Real-time PCR สามารถตรวจคัดกรองสองยีนพร้อมกับการตรวจยีนจำเพาะพืชเพื่อการควบคุมคุณภาพ ใช้ระยะเวลาน้อย ประหยัดและเป็นเทคนิคที่ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำเทียบเท่ากับวิธีเดิม (Debode *et al.,* 2013)

Table 4 Comparison of GM maize screening technique using Single plex, Duplex and Triplex Real-Time PCR at each event and target gene

Target gene/	GM Maize event			
Real-time PCR	Bt11 5%	NK603 1%	MON89034 10%	MIR 604 1%
CaMV 35S promoter				
Single plex	33.21 b	34.33 b	31.21 b	Not detected
Duplex	30.24 a	32.15 a	28.38 a	Not detected
Triplex	30.17 a	32.43 a	28.32 a	Not detected
(C.V. %)	9.74	6.61	9.81	-
NOS terminator				
Single plex	34.97 b	35.94 b	34.46 b	36.19 b
Duplex	31.23 a	32.89 a	29.42 a	30.24 a
Triplex	31.18 a	32.95 a	30.21 a	30.18 a
(C.V. %)	11.68	8.99	16.07	18.66
hmg gene (maize endogenous)				
Triplex	22.17	22.28	21.57	21.78

Mean in the same column followed by a common letters are signicantly different at 5 % level by DMRT

ปฏิกิริยา Triplex Real-Time PCR ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องตามโครงสร้าง (DNA construct) ของการดัดแปลงพันธุกรรม event ต่าง ๆ การตรวจยีน CaMV 35S promoter ได้ค่า CP เฉลี่ย 29.88-38.72 ในการตรวจตัวอย่าง MON810, MON89034, NK603, Bt11, Bt176 และ GTS 40-3-2 การตรวจยีน NOS terminator ค่า CP เฉลี่ย 27.90- 39.11 ในตัวอย่าง MON89034, NK603, MIR162, Bt11, MIR604 และ GTS 40-3-2 ซึ่งให้ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้องตรงกับข้อมูลการดัดแปลงพันธุกรรม และไม่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม ในขณะที่ทุกตัวอย่างทดสอบที่มีองค์ประกอบของข้าวโพดจะต้องตรวจพบยีน *hmg* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงจำเพาะของพืช โดยตรวจไม่พบ *hmg* ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานถั่วเหลือง (GTS 40-3-2) ที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบ ดังแสดงใน Table 5

Table 5 The GM maize screening for specic detection using Triplex Real-time PCR

GM Event	% GMO Value	Crossing Point of target gene detection		
		CaMV 35S promoter	NOS terminator	*hmg*
MON810	blank <0.04	ND	ND	27.45±0.09
	0.5	36.50±0.24	ND	25.51±0.03
	2	33.15±0.35	ND	25.76±0.15
	9.9	29.88±0.11	ND	25.08±0.15
MON89034	100	28.04±0.32	27.90±0.74	27.68±0.26
NK603	blank <0.04	ND	ND	28.77±0.11
	0.1	38.72±0.27	39.12±0.17	28.80±0.07
	0.5	37.29±0.15	38.11±0.42	32.03±0.17
	1.0	35.36±0.11	36.21±0.10	30.92±0.09
	2	34.55±0.24	35.41±0.24	28.51±0.09
	10	30.88±0.56	32.74±0.60	29.63±0.14
MIR162	100	ND	28.36±0.13	29.35±0.09
Bt11	4.89	30.36±0.17	30.21±0.17	26.06±0.07
Bt 176	5.00	35.02±0.17	ND	29.56±0.16
MIR604	<0.09	ND	30.36±0.17	27.43±0.41
	0.98	ND	30.36±0.17	27.93±0.02
	9.85	ND	30.36±0.17	29.63±0.14
GTS 40-3-2	0.1	38.56±0.15	39.11±0.13	ND
	10	30.78±0.44	30.54±0.59	ND
NonGM maize	-	ND	ND	25.36±0.03

ND = Not Detected

3. ทดสอบความไว (Sensitivity) และปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (Amplification range)

ความไวในการตรวจยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และ NOS terminator และยีนอ้างอิงของพืช (*hmg*) ในตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม event NK603 โดยข้าวโพดมียีนที่ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปะปน 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 ผลการวิเคราะห์ค่า CP การตรวจยีน CaMV 35S promoter เท่ากับ 28.84, 33.80, 36.30, 38.97 และ ND ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการตรวจ NOS terminator ได้ค่า CP เฉลี่ย 29.20, 34.15, 36.23, 39.10 และ ND ซึ่งที่อัตราการปะปนร้อยละ 0.001 มีจำนวน copies ยีนที่ต่ำมากประมาณ 0.36697 ความไวของปฏิกิริยาที่ทดสอบตรวจไม่พบทุกตัวอย่างพบยีนจำเพาะ *hmg* ซึ่งเป็นยีนของข้าวโพด (CP เฉลี่ย 26.10- 38.47) ตามลำดับ (Table 6) นำค่า CP และ log ของอัตราการเจือจาง (dilution factor) สร้างกราฟมาตรฐาน วิเคราะห์ค่า slope ของการตรวจยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และ *hmg* ได้ค่าเฉลี่ย -3.27, -3.18 และ -3.14 ตามลำดับ โดยทุกการทดสอบค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (-3.1 ถึง -3.6) PCR efficiency ของปฏิกิริยาเท่ากับ 101.91, 106.47 และ 108.20 ผลการทดสอบสอดคล้องกับการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON89034 ดังนั้นสรุปได้ว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) ที่สามารถตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-Time PCR ได้ต่ำสุดอย่างน่าเชื่อถือที่ 0.01% โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Table 6)

Table 6 The results of GM detection, PCR efficiency and slope using Triplex Real-Time PCR

GM Maize Event	% GMO level	DNA conc.	Target Copies No.	Crossing Point of target gene detection		
				CaMV 35S promoter	NOS terminator	*hmg*
NK603	10%	10	3669.7	28.84±0.42	29.20±0.53	26.10±0.08
	1%	1	366.97	33.80±0.26	34.15±0.23	27.80±0.14
	0.1%	0.1	36.697	36.30±0.51	36.23±0.42	31.42±0.20
	0.01%	0.01	3.6697	38.97±0.92	39.10±0.67	34.42±0.66
	0.001%	0.001	0.36697	ND	ND	38.47±1.20
PCR efciency (%)				101.91	106.47	108.2
Slope				-3.27	-3.18	-3.14
MON 89034	100%	100	36,697	28.94±0.30	29.11±0.29	26.10±0.14
	10%	10	3669.7	30.60±0.46	30.90±0.49	27.96±0.33
	1%	1	366.97	34.19±0.51	34.54±0.62	31.28±0.43
	0.1%	0.1	36.697	36.80±0.93	36.76±0.57	34.24±0.70
	0.01%	0.01	3.6697	38.92±0.97	39.12±0.97	36.28±0.26
PCR efciency (%)				109.04	116.17	108.14
Slope				-3.12	-3.104	-3.13

ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดสอบโดย Triplex Real-Time PCR พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 50, 100, 150 และ 200 นาโนกรัม ได้ค่า CP การตรวจยีน CaMV 35S promoter เฉลี่ยเท่ากับ 37.18, 36.72, 36.21 และ 35.79 ตามลำดับ โดยดีเอ็นเอต้นแบบที่ 50 นาโนกรัม ค่า CP แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100, 150 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา สอดคล้องกับผลการตรวจยีน NOS terminator ค่า CP 37.23, 36.27, 35.72 และ 35.44 ซึ่งดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มขึ้นค่า CP จะลดลง (Table 7) ผลการทดสอบ CP ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100, 150 และ 200 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยค่า CP ทุกความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์การตรวจวิเคราะห์ที่ LOD 0.01 สรุปได้ว่า การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 50-200 นาโนกรัม สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Triplex Real-time PCR จึงเลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100 นาโนกรัม เป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน ในกรณีที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาจมีความเข้มข้นต่ำ สามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบทดสอบที่ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ทั้งนี้ในทุกระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นให้ค่า CP ของยีน *hmg* ซึ่งเป็นยีนจำเพาะพืชไม่แตกต่างกัน Cankar *et al.* (2006) และ Turkec *et al.* (2016) รายงานว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา Real-Time PCR ค่า CP จะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอความเข้มข้นน้อยจะมีได้ค่า CP ที่สูง และในทางกลับกันถ้าความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยาสูงจะได้ค่า CP ต่ำ ซึ่ง Ellison *et al.*, (2006) รายงานว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยา Real-Time PCR โดยจำนวน copies ยีนของ ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยเช่นเดียวกับผลการทดสอบในครั้งนี้

Table 7 The amplication range concentration of GM detection using Triplex Real-Time PCR

GM Maize Event	DNA concentration (ng/reaction)	Crossing Point of target gene detection		
		CaMV 35S	NOS	*hmg*
NK603 GMO 1%	50	37.18b	37.23b	24.62
	100	36.72a	36.27a	24.34
	150	36.21a	35.72a	24.42
	200	35.79a	35.44a	24.77
(C.V. %)	-	3.51	3.54	0.21

Mean in the same column followed by a common letter are signicantly different at 5 % level by DMRT

4. ทดสอบความใช้ได้ของวิธี Triplex Real-Time PCR ในการตรวจคัดกรองตัวอย่างข้าวโพดและผลิตภัณฑ์

การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ที่เจือปนดีเอ็นเอข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (fortied 0.05% NK603) ด้วยวิธี Triplex Real-Time PCR พบค่าเฉลี่ย CP การตรวจพบยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และ *hmg* เท่ากับ 35.07, 34.94 และ 27.62 ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่ไม่เป็น GM ตรวจพบเฉพาะยีนจำเพาะข้าวโพด CP เฉลี่ย 26.31 และตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปลง

พันธุกรรม NK 603 ที่ใช้เป็น positive control ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และ *hmg* โดยค่า CP ที่การเจือปน 0.5% เท่ากับ 30.14, 31.76 และ 29.42 และที่การเจือปน 0.05% NK603 มีค่า CP 35.15, 35.45 และ 29.79 ตามลำดับ ค่า RSDr (%) การตรวจวิเคราะห์ทั้งสามยีนเท่ากับ 1.05, 0.88 และ 0.79 ผลการทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์เกร็ดข้าวโพดและน้ำนมข้าวโพดที่เจือปน และไม่เจือปน GM ได้ค่า CP สอดคล้องกับผลวิเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด โดยมีความไว ความจำเพาะ และค่า RSDr ของการทดสอบ สามารถตรวจซ้ำโดยมีค่าความผันแปรต่ำ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยตัวอย่าง negative control ที่ใช้น้ำเป็นกรรมวิธีควบคุม ไม่เกิดปฏิกิริยา (Table 8)

Table 8 The results of GM detection using Triplex Real-Time PCR in fortified corn and corn products

Maize Sample	Fortified sample (0.05% NK603) Crossing Point (CP)				Non-GM (not fortified) Crossing Point (CP)			
	CaMV 35S	NOS	*hmg*	Result	CaMV 35S	NOS	*hmg*	Result
Corn grain								
Mean	35.07	34.94	27.62	Detected	-	-	26.31	ND
Min	34.69	34.68	27.26	Detected	-	-	25.84	ND
Max	35.91	35.24	27.90	Detected	-	-	26.62	ND
SD	0.36	0.31	0.22		NA	NA	0.26	
RSDr (%)	1.05	0.88	0.79		NA	NA	1.01	
Corn grit								
Mean	35.89	35.72	28.69	Detected	-	-	25.53	ND
Min	35.24	34.95	28.35	Detected	-	-	24.39	ND
Max	36.47	36.23	29.13	Detected	-	-	26.42	ND
SD	0.49	0.40	0.24		NA	NA	0.63	
RSDr (%)	1.39	1.12	0.84		NA	NA	2.50	
Corn Milk								
Mean	36.79	37.51	28.32	Detected	-	-	27.21	ND
Min	35.82	36.92	27.68	Detected	-	-	26.38	ND
Max	37.56	38.20	28.84	Detected	-	-	28.19	ND
SD	0.58	0.44	0.34		NA	NA	0.48	
RSDr (%)	1.58	1.18	1.24		NA	NA	1.76	
NK603 0.5%	30.14	31.76	29.42	Detected	NA	NA	NA	ND
NK603 0.05%	35.15	35.45	29.79	Detected	NA	NA	NA	ND
Negative control	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	ND

Remark: Mean of 10 replications, ND=Not detected, NA=Not available

ผลการทดสอบตัวอย่างข้าวโพด 17 ตัวอย่าง ในห้องปฏิบัติการ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter แต่ตรวจไม่พบยีน NOS terminator ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 2, 7, 8, 10-15 และกลุ่มที่ตรวจพบทั้งสองยีน ได้แก่ตัวอย่างที่ 3-6, 9, 16 และ 17

การทดสอบด้วยวิธี Triplex Real-Time PCR ให้ผลเช่นเดียวกับทดสอบด้วยวิธี Single plex ของห้องปฏิบัติการ (Table 9) แสดงว่าวิธีที่พัฒนาในการตรวจวิเคราะห์ Triplex Real-Time PCR สามารถตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมได้เทียบเท่ากับวิธีเดิมของห้องปฏิบัติการ จากนั้นได้จัดทำเป็นเอกสารขั้นตอนการปฏิบัติงานเรื่อง การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Triplex Real-Time PCR และขอรับรองขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ ISO/IEC 17205 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Table 9 Comparison GM screening results of naturally GM contaminated Maize using Triplex Real-Time PCR and Single plex Real-Time PCR

Corn sample (grain)	Triplex Real-Time PCR			Single plex Real-Time PCR	
	CaMV 35S	NOS	hmg	CaMV 35S	NOS
1, 2, 7, 8, 10-15	+	-	+	+	-
3-6, 9, 16 และ 17	+	+	+	+	+
Positive con. 0.1% NK603	+	+	+	+	+
Negative con. water	-	-	-	-	-

Notes: + (positive) GM detected; - (negative)Not detected

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Triplex Real-Time PCR โดยตรวจยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และยีนจำเพาะข้าวโพด (*hmg* gene) ในปฏิกิริยาเดียวกัน มีความจำเพาะและความไวในการตรวจเทียบเท่าและดีกว่าวิธี Single plex Real-time PCR โดยไม่พบ false positive หรือ false negative ทุกค่าพารามิเตอร์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ขีดจำกัดการตรวจได้ต่ำสุด (LOD) ที่ 0.01% สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์ในเชิงคุณภาพสำหรับห้องปฏิบัติการ

2. จัดทำคู่มือวิธีทดสอบและขั้นตอนการปฏิบัติงานตามระบบคุณภาพ นำไปขยายผลใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ และผ่านการประเมินจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC17025

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบุคลากรในระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

Alary, R., A. Serin, D. Maury and P. Joudrier. 2003. Comparison of single plex and duplex real-time PCR for quantication of GMO in maize and soybean. *Food control.* 13:235-244.

Cankar, K., D. Stebih, T. Dreo, J. Zel and K. Gruden. 2006. *Crtical points of DNA quantication by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quntication of GMO*. BMC Biotechnology. 15pp.

Debode, F., E. Janssen and G. Berben. 2013. Developement 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.

Ellison, S.LR., 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.

Huber, I., A. Block, D. Sebah and et al.2013. Development and validation of duplex, triplex and pentaplex Real-Time PCR screening assays for the detection of genetically modied organisms in food and feed. *J. Agri. food Chem*. 61:10293-1301.

ISAAA 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No.52. ISAAA: Ithaca, NY. Available at: (https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2017.pdf) Accesed : 26 July,2018

ISO 21569. 2005. Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modied organisms and derived products- Qualitative nucleic acid-based methods. Available at: (https://www.iso.org/standard/34614.html) Accessed: 4 August, 2018

ISO 17025. 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Available at: (https://www.iso.org/standard/39883.html) Accessed:4 August,2018

Johansson M.K. (2006) Choosing Reporter-Quencher Pairs for Efcient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers. *In*: Didenko V.V. (eds) *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*. Methods in Molecular Biology, vol 335. Humana Press

JRC-EURL GMFF-ENGL. 2011. JRC-Compendium of reference methods for GMO analysis. Luxembourg: Publication ofce of the European Union. 259 p. Available at: (http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/22754/1/gmo-jrc__reference%20report__2011__publ.pdf) Accessed :12 August,2018

Lab Life-Real-Time PCR. 2015. Compare and contrast: multiplex 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-vs-singleplex-pcr.html) Accessed : 12 August,2018

Turkec, A., H. Kazan, B. Karacanli and S. J. Lucas. 2015. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modied organism (GMOs)) in maize food and feed products. *J. Food. Sci. Technol.* 52(8): 5164-5171.

Waiblinger, H. U., B. Ernst, A. Anderson and K. Pietsch. 2008. Validation and collaborative study of a P35S and Tnos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modied organism in food product. *Eur Food Res Technol.* 226:1221-1228.