การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และ PCR-ELISA

Comparison of GM Soybean Analytic Techniques between PCR and PCR - ELISA

ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์

สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์

สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ (10900)

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม และได้นำมาปลูกในพื้นที่ที่เป็นแหล่งปลูกต่างๆในประเทศไทย เมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกและมีจำหน่ายอยู่ตามที่ต่างๆในประเทศไทย ได้ถูกสุ่มเก็บมาเพื่อตรวจหาการปนเปื้อน DNA ของ 35S promoter ของ Cauliflower Mosaic Virus (35S CaMV) และDNA ของยีนต้านทาน Roundup ซึ่งมีขนาด 195 และ172 bp ตามลำดับ ด้วยวิธี PCR และ PCR-ELISA การทดลองเริ่มต้นจากการสกัด Genomic DNA จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง แล้วนำ DNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยการตรวจหายีน *lectin* ของถั่วเหลือง ในตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองทั้งหมด 42 ตัวอย่าง พบ DNA ขนาด 181 bp ของยีน *lectin* ต่อจากนั้นจึงนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจหาชิ้น DNA ของ 35S CaMV promoter และยีนต้านทาน Roundup ด้วยวิธี PCR และ PCR-ELISA ผลการตรวจด้วยวิธี PCR พบว่า 7 และ 9 ใน 42 ตัวอย่าง เป็นถั่วเหลืองที่มีการปะปน DNA ของ 35S CaMV promoter และยีนต้านทาน Roundup ตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจด้วยวิธี PCR-ELISA พบว่า 10 ใน 42 ตัวอย่างเป็นถั่วเหลืองที่มีการปะปนของ DNA ทั้ง 2 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทั้ง 2 วิธีจะพบว่า การตรวจด้วยวิธี PCR-ELISA ในการตรวจหาDNAของ 35S CaMV promoter ให้ความแม่นยำและไวกว่าวิธี PCR ถึง 7% อย่างไรก็ตามสัดส่วนของถั่วเหลืองที่มีการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมแปลกปลอมอื่น ก็อาจจะแปรปรวนไปได้ซึ่งขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ระยะเวลาการสุ่มเก็บ และปริมาณตัวอย่างที่สุ่ม ตลอดจน gene ที่ใช้ในการตรวจหาเป็นต้น

Abstract

Soybean has been known as one of genetically modified crops and is widely planted in different soybean producing areas in Thailand. Soybean seeds grown and purchased in different areas in Thailand were collected to examine whether they were contaminated and modified with other genetic materials. PCR and PCR-ELISA were performed to dectect for 195 bp CaMV 35S promoter and 172 bp Roundup resistant gene. Genomic DNA from each seed sample was extracted and checked for *lectin* gene to determine their quality and quantity by PCR. It was shown that 181 bp *lectin* gene was amplified from genomic DNA of all samples. Genomic DNA of each sample was then used as a template to detect for 195 bp 35S CaMV promoter and 172 bp Roundup resistant gene

by PCR and PCR-ELISA. Results showed that 7 and 9 out of 42 seed samples were contaminated with 35S CaMV promoter and Roundup resistant gene respectively detected by PCR, while 10 out of 42 samples were contaminated with both genes detected by PCR-ELISA. Compared between both techniques, detection for 35S CaMV promoter by PCR-ELISA was more specific and sensitive than PCR by 7%. However, a ratio of GM soybean may be variable depending on several factors, for example,a sampling size and a sampling peroid as well as genes used for detection.

1. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง เมล็ดถั่วเหลืองนอกจากจะสามารถนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารได้โดยตรงแล้ว เมล็ดถั่วเหลืองยังนำมาแปรรูปเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อีกเช่น อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น ปริมาณการนำเอาเมล็ดถั่วเหลืองมาใช้บริโภคสดและนำมาแปรรูปเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆในปีหนึ่งๆ มีไม่พอเพียงกับความต้องการประเทศไทยจึงมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นจำนวนไม่น้อย จากรายงานของ [1] กล่าวว่าถั่วเหลืองเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม จำนวนของพื้นที่และประเทศที่ยอมให้มีการปลูกถั่วเหลืองที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรมก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จึงเป็นไปได้ว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่มีอยู่ในประเทศไทย อาจจะมีการปะปนของถั่วเหลืองที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม (ถั่วเหลือง GM) ดังนั้นหน่วยงานของรัฐที่เกี่ยวข้องในประเทศไทยจึงควรจะมีวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรม ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำและ ได้มาตราฐาน

วิธีการตรวจสอบพืชที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรมสามารถตรวจได้จากโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยการกำหนดจากยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในพืชนั้นๆ หรือตรวจได้จากยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปโดยตรง [2] การตรวจหายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปโดยตรง โดยทั่วไปจะตรวจโดยวิธี PCR (Polymerized Chain Reaction) [3] ถึงแม้ว่าการตรวจโดยวิธี PCR จะเป็นวิธีการที่สามารถตรวจได้รวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูงแล้ว แต่วิธี PCR ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น เกิดการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมอื่นที่มีอยู่ก่อนหรือในระหว่างการทำ PCR (เรียกว่า carry over contamination) อาจเป็นเหตุทำให้ผลการตรวจโดยวิธี PCR ผิดพลาดไปหรือตรวจไม่พบ [4] ปัจจุบันมีวิธีการอย่างหนึ่งเรียกว่า PCR-ELISA นอกจากจะสามารถขจัดปัญหาเหล่านี้ไปได้แล้วยังเป็นวิธีการที่สามารถตรวจหาDNA ที่เกิดขึ้นจากการทำPCR โดยดูจากการเปลี่ยนสี วิธีการนี้อาศัยหลักการนำเอาสาร dUTP ที่ถูกติดฉลากด้วยสาร digoxigenin แทรกตัวเข้าไปอยู่ในสาย DNAที่เกิดขึ้นจากการทำPCR digoxigenin ก็จะไปทำปฏิกิริยากับสาร ABTS { 2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) } โดยการทำงานของเอ็นไซม์ peroxidase ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีขึ้นในจานหลุม

ปัจจุบันวิธีการ PCR-ELISA ได้นำมาตรวจหา DNA ของเชื้อวัณโรค [5], เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่อคน ที่มีอยู่ปะปนในอาหาร เช่น *Listeria* species ต่างๆ รวมทั้ง *Listeria monocytogenes* ที่เป็นต้นเหตุของโรคหลายๆโรคที่เกิดขึ้นกับคน [6] และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นต้นเหตุทำให้อาหารเป็นพิษ [7] นักวิทยาศาสตร์เหล่านี้พบว่า วิธีการ PCR - ELISA สามารถตรวจให้ผลที่แม่นยำและชัดเจนกว่าวิธี PCR และเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือได้มากกว่าวิธี PCR

ดังนั้นรายงานเรื่องนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะเปรียบเทียบให้เห็นความถูกต้องแม่นยำและความไวในการตรวจเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรมระหว่างวิธีการ PCR และ PCR - ELISA

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสุ่มเก็บเมล็ดถั่วเหลือง

เมล็ดถั่วเหลืองสุ่มมาจากแหล่งต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 ในปริมาณตัวอย่างละ 1 กก. ทำการสุ่มระหว่างเดือน กรกฎาคม 2543 ถึง เดือน พฤษภาคม 2544

2.2 การสกัด DNA จากเมล็ดถั่วเหลือง

นำเมล็ดถั่วเหลืองจากแต่ละตัวอย่างที่สุ่มเก็บมา บดด้วยเครื่องบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดและคลุกเคล้ากันอย่างดีแล้วในแต่ละตัวอย่างจำนวน 5 กรัม มาสกัด genomic DNA ตามวิธีการของ [8] แต่ได้ดัดแปลงวิธี

การสกัดบางขั้นตอนด้วยการทำความสะอาด DNA ที่ละลายอยู่ในสารละลายด้วย phenol-chloroform หลังจากขั้นตอนการสกัด DNA ด้วย extraction buffer จากนั้นทำการสกัด DNA ไปตามขั้นตอนของ [8] จนเสร็จ แล้วจึงนำ DNA ที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างไปตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณพร้อมทั้งปรับความเข้มข้น DNA ในแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่าๆกัน คือประมาณ 50 ng /μl ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR

2.3 การออกแบบ primer และ biotin-probe

35SF (35S forward; 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3') และ 35SR (35S reverse 5'GATAGTGGGATTGTGCGTCA3') primers ออกแบบมาจาก 35S CaMV promoter (GeneBank accession no.AJ007626) Primer คู่นี้นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ขนาด 195 bp ของ 35S CaMV promoter ในปฏิกิริยา PCR

RRF (Roundup Ready forward; 5'-TGATGTGATATCTCCACTGACG-3') and RRR (Roundup Ready Reverse; 5'-TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT-3') primers ออกแบบจากยีนต้านทาน Roundup (GeneBank accession no. X04879 และ M21084 ตามลำดับ) Primer คู่นี้นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ขนาด 172 bp ของยีนต้านทาน Roundup ในปฏิกิริยา PCR

Lec1 (*Lectin* forward; 5'-GACGCTATTGTGACCTCCTC-3') และ Lec2 (*Lectin* reverse ; 5'-TGTCAGGGGCATAGAAGGTG3') primers (GeneBank accession no. K00821) ออกแบบจากยีน *lectin* ของถั่วเหลือง ตั้งแต่ลำดับเบสที่ 1131 ถึง 1311 และ นำมาใช้เพิ่มปริมาณชิ้น DNA ขนาด 181 bp

Biotin-probe แต่ละชนิด ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาภายในส่วนของ35S CaMV promoter และยีนต้านทาน Roundup ตามลำดับ แล้วนำ probes ทั้ง 2 ชนิดมาติดฉลากด้วยสาร D-biotin-N-hydroxysuccinimide ester ทางด้านปลาย 5'- ของแต่ละ probe

2.4 การตรวจเมล็ดถั่วเหลืองโดยวิธี PCR

Genomic DNA ที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในแต่ละตัวอย่างนำมาใช้เป็น DNA แม่พิมพ์ต้นแบบเพื่อ เพิ่มปริมาณของชิ้น DNA ขนาด 181, 195 และ 172 bp โดยใช้คู่ primers, Lec1 / Lec2 , 35SF / 35SR และ RRF/ RRR ตามลำดับ (ในข้อ 2.3) การเพิ่มปริมาณ DNA ขนาด 181 bp ด้วย Lec1 / Lec2 primers ในปฏิกิริยา PCR ดำเนินไปตามมาตราฐานวิธีการทำ PCR (standard PCR protocol) ด้วยเครื่อง DNA Thermal Cycler รุ่น 9700 โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้ 94°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 °C นาน 20 วินาที, 57°C นาน 20 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นต่อด้วย 72°C นาน 1 นาที อีก 1 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดแล้ว พักปฏิกิริยาไว้ที่ 4°C ส่วนการเพิ่มปริมาณ DNA ขนาด 195 และ 172 bp ด้วย 35SF / 35SR และ RRF / RRR primers ดำเนินรอบการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการใช้คู่ primers Lec1 / Lec 2 เพียงแต่เปลี่ยน annealling temperature ไปเป็น 54°C และ 60°C ตามลำดับ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างของแต่ละคู่ primers มาตรวจหาชิ้น DNA ขนาด 181, 195 และ 172 bp ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง ที่นำมาตรวจวิเคราะห์

ลำดับที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	แหล่งสุ่ม
1	เมล็ดถั่วเหลือง	1	บริษัท ผลิตถั่วเหลืองฝักสด
2	เมล็ดถั่วเหลือง	22	สินค้านำเข้าจากแคนาดา
3	เมล็ดถั่วเหลือง	005-2	สินค้านำเข้าจากแคนาดา

ลำดับที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	แหล่งสุ่ม
4	เมล็ดถั่วเหลือง	005-3	สินค้านำเข้าจากแคนาดา
5	เมล็ดถั่วเหลือง	005-4	สินค้านำเข้าจากแคนาดา
6	เมล็ดถั่วเหลือง	24	สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์
7	เมล็ดถั่วเหลือง	28	สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์
8	เมล็ดถั่วเหลือง	52	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์ (พันธุ์เชียงใหม่ 60)
9	เมล็ดถั่วเหลือง	53	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์ (พันธุ์เชียงใหม่ 60)
10	เมล็ดถั่วเหลือง	54	สุ่มตรวจ (ถั่วเหลืองผิวดำ)
11	เมล็ดถั่วเหลือง	101	สินค้านำเข้าจากไต้หวัน
12	เมล็ดถั่วเหลือง	112	บริษัทผลิตน้ำมันพืช
13	เมล็ดถั่วเหลือง	113	บริษัทผลิตน้ำมันพืช
14	เมล็ดถั่วเหลือง	114	บริษัทผลิตน้ำมันพืช
15	เมล็ดถั่วเหลือง	127	สินค้านำเข้าจากไต้หวัน
16	เมล็ดถั่วเหลือง	143	บริษัทผลิตปลาทูน่าในน้ำมันถั่วเหลือง
17	เมล็ดถั่วเหลือง	414	บริษัทผลิตฟองเต้าหู้
18	เมล็ดถั่วเหลือง	585	ห้างสรรพสินค้า
19	เมล็ดถั่วเหลือง	597	ห้างสรรพสินค้า
20	เมล็ดถั่วเหลือง	587	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
21	เมล็ดถั่วเหลือง	588	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
22	เมล็ดถั่วเหลือง	589	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
23	เมล็ดถั่วเหลือง	590	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
24	เมล็ดถั่วเหลือง	591	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
25	เมล็ดถั่วเหลือง	592	ร้านค้าขายเมล็ดพันธุ์
26	เมล็ดถั่วเหลือง	620	บริษัทผลิตอาหารแปรรูป ธัญพืช
27	เมล็ดถั่วเหลือง	845	บริษัทผลิตอาหารแปรรูป ธัญพืช
28	เมล็ดถั่วเหลือง	855	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์นครสวรรค์
29	เมล็ดถั่วเหลือง	859	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สจ. 4
30	เมล็ดถั่วเหลือง	860	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สจ. 5
31	เมล็ดถั่วเหลือง	863	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สุโขทัย 2
32	เมล็ดถั่วเหลือง	864	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สุโขทัย 4
33	เมล็ดถั่วเหลือง	865	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สุโขทัย 3
34	เมล็ดถั่วเหลือง	866	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์เชียงใหม่ 4
35	เมล็ดถั่วเหลือง	868	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์มข. 35

ลำดับที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	แหล่งสุ่ม
36	เมล็ดถั่วเหลือง	856	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์เชียงใหม่ 2
37	เมล็ดถั่วเหลือง	857	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สจ. 1
38	เมล็ดถั่วเหลือง	858	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สจ. 2
39	เมล็ดถั่วเหลือง	861	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์เชียงใหม่ 60
40	เมล็ดถั่วเหลือง	862	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์สุโขทัย 1
41	เมล็ดถั่วเหลือง	867	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์จักรพันธุ์ 1
42	เมล็ดถั่วเหลือง	869	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, พันธุ์เชียงใหม่ 1 (ถั่วเหลืองฝักสด)

2.5 การติดฉลากชิ้น DNA ด้วย digoxigenin

นำ genomic DNA ที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างในข้อ 2.2 อีกส่วนหนึ่ง มาใช้เป็น DNA แม่พิมพ์ต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยใส่ส่วนผสม PCR DIG Labelling Mix plus (ซึ่งประกอบด้วย dNTP, dUTP ติดฉลากด้วยสาร digoxigenin , 25mM $MgCl_2$ และ buffer) กับคู่ primer 35SF/ 35SR หรือ RRF / RRR คู่ใดคู่หนึ่ง (ในข้อ 2.3) ลงในหลอด eppendroff ขนาด 0.2 ml แล้วนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 20°C นาน 10 นาที ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR การทำปฏิกิริยา PCR ใช้สภาวะเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยา PCR ในข้อ 2.4 โดยเปลี่ยน annealling temperature ให้สัมพันธ์กับคู่ primers ที่ใช้

2.6 การทำ Hybridization ด้วยวิธี ELISA

ดูดสารละลาย DNA ที่ได้มาจากการทำ PCR ในข้อ 2.5 (DIG-labelled PCR product) มาตัวอย่างละ 10 μl ลงใน หลอด eppendroff ขนาด 1.5 ml แล้วเติม denaturation solution ลงไปหลอดละ 20 μl ตามด้วย Biotin labelling capture probes (ความเข้มข้น 50 ng / ml ที่ละลายผสมอยู่ใน Hybridization buffer ในอัตราส่วน 1 : 20) จำนวน 250 μl ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงให้ส่วนผสมตกตะกอน แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาณ 200 μl ลงในหลุม microtiter plate ดำเนินปฏิกิริยา Hybridization โดยนำ plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายออกจากแต่ละหลุม แล้วล้างด้วยน้ำยา washing solution หยดลงไปหลุมละ 250 μl แล้วดูดออก ทำซ้ำกัน 5 ครั้ง เติม Anti-DIG-POD working solution (Anti-DIG-POD Powder ซึ่งละลายด้วย ddH_2O 250 μl + Conjugate dilution buffer อัตราส่วน 1:100)หลุมละ 200 μl นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที บนเครื่องเขย่า แล้วล้างด้วย washing solution เติม ABTS solution หลุมละ 200 μl นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่า นาน 20-30 นาที จนกระทั่งสังเกตุเห็นการเปลี่ยนสี

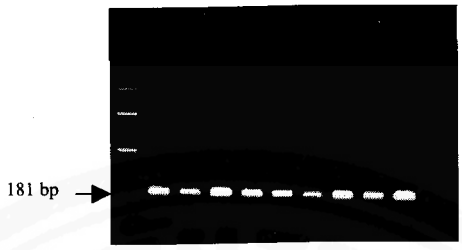
2.7 การวัดผล

นำ microtiter plate ที่เห็นการเปลี่ยนสีไปอ่านค่า Absorbance ด้วยเครื่องอ่านผล ELISA ที่ $OD._{405\ nm}$ เทียบกับตัวควบคุม (control)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบสภาวะของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *lectin* ของถั่วเหลืองเป็นมาตราฐานการตรวจสอบ

ก่อนที่จะทำการตรวจหาการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมแปลกปลอมในเมล็ดถั่วเหลืองโดยวิธี PCR จำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพ DNA แม่พิมพ์ และสภาวะของปฏิกิริยา PCR รวมถึงการควบคุมปฏิกิริยาให้ถูกต้องและเกิดความน่าเชื่อถือก่อน ในการทดลองนี้ได้ทำการตรวจหายีน *lectin* เพื่อตรวจสอบคุณภาพ DNA แม่พิมพ์ และใช้เป็นตัวควบคุมและตรวจสอบสภาวะของปฏิกิริยา PCR ผลการตรวจพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ขนาด 181 bp ของยีน *lectin* ได้ทุกตัวอย่าง (ภาพที่1 และตารางที่ 2) เหตุผลที่เลือกนำเอายีน *lectin* มาตรวจหา เนื่องจากยีน *lectin* เป็นยีนที่มีอยู่เฉพาะในเมล็ดของถั่วเหลือง และมักนิยมใช้เป็นยีนอ้างอิงในกรณีที่ต้องการตรวจเมล็ดถั่วเหลือง



ภาพที่1 แสดงผลการตรวจหายีน *lectin* ขนาด 181 bp จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง โดยวิธี PCR บน agarose; Lane M เป็นขนาด DNA มาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 bp DNA Ladder) , Lane 1-9 เป็นผลของการเพิ่มปริมาณDNA ขนาด 181 bp จากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง; Lane 10 เป็นผลของการเพิ่มปริมาณDNAจากน้ำกลั่น

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเมล็ดถั่วเหลืองที่สุ่มมา โดยวิธี Conventional PCR และ PCR-ELISA

ลำดับที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ผลการตรวจวิเคราะห์ GMOs				การตรวจยีนถั่วเหลือง
			Conventional PCR		PCR-ELISA		
			35S Promoter	Roundup Ready	35S Promoter	Roundup Ready	*Lectin*
1	เมล็ดถั่วเหลือง	1	-	-	-	-	+
2	เมล็ดถั่วเหลือง	22	-	-	-	-	+
3	เมล็ดถั่วเหลือง	005-2	+	+	+	+	+
4	เมล็ดถั่วเหลือง	005-3	+	+	+	+	+
5	เมล็ดถั่วเหลือง	005-4	-	-	-	-	+
6	เมล็ดถั่วเหลือง	24	+	+	+	+	+
7	เมล็ดถั่วเหลือง	28	-	-	-	-	+
8	เมล็ดถั่วเหลือง	52	-	-	-	-	+
9	เมล็ดถั่วเหลือง	53	-	-	-	-	+
10	เมล็ดถั่วเหลือง	54	-	-	-	-	+
11	เมล็ดถั่วเหลือง	101	-	-	-	-	+
12	เมล็ดถั่วเหลือง	112	-	-	-	-	+
13	เมล็ดถั่วเหลือง	113	-	-	-	-	+
14	เมล็ดถั่วเหลือง	114	-	-	+	+	+
15	เมล็ดถั่วเหลือง	127	-	-	-	-	+
16	เมล็ดถั่วเหลือง	143	-	-	-	-	+
17	เมล็ดถั่วเหลือง	414	-	-	-	-	+

หน้าว่าง

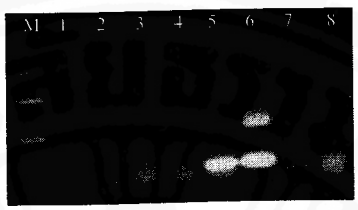
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
THAMMASAT UNIVERSITY
สำนักหอสมุด

หน้าว่าง

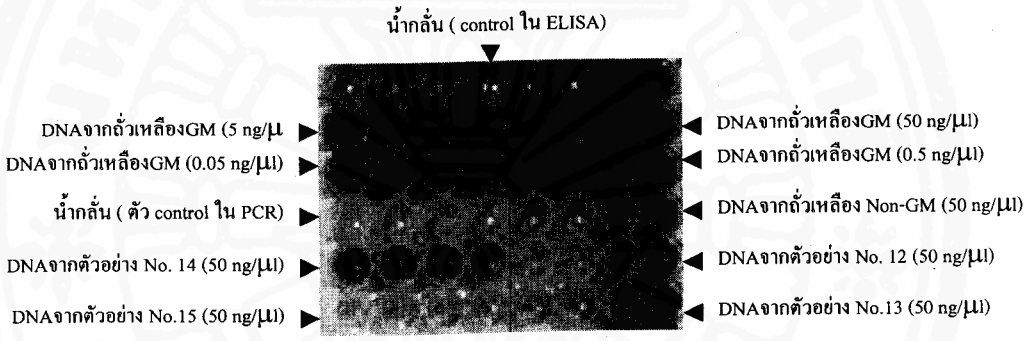
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
THAMMASAT UNIVERSITY
สำนักหอสมุด

ต้องการเพิ่มปริมาณขึ้นมาในขั้นตอนการทำ PCR ความจำเพาะเจาะจงชั้นที่สองเกิดจากการนำเอา probe ที่มีความจำเพาะกับ DNA หรือ ยีนเป้าหมายที่ดีกว่าการใช้คู่ primers มาตรึงชิ้น DNA หรือยีน ให้อยู่กับที่ด้วย biotin ที่ติดอยู่กับตัว probe biotin จะไปจับกับสาร streptavidin ที่เคลือบอยู่บนผิวของจานหลุม ELISA การที่ตัว probe มีความจำเพาะกับชิ้น DNA หรือ ยีนเป้าหมายที่ดีกว่าการใช้คู่ primers เพราะตัว probe ได้

3ก



3ข



ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจหาชิ้น DNA ของ 35S CaMV promoter โดย 3ก) gel electrophoresis ของตัวอย่างถั่วเหลืองลำดับที่ 14 ในตารางที่ 2 3ข). ELISA ของตัวอย่างถั่วเหลืองลำดับที่ 14 เทียบกับตัวอย่างลำดับอื่นๆ, ถั่วเหลืองNon-GM, ถั่วเหลืองGM ที่มีปริมาณgenomic DNA ระดับต่างๆ และน้ำ ใช้เป็น template ในภาพที่ 3ก Lane M เป็น 100 bp DNA Ladder; Lane 1 - 4 เป็นผลการเพิ่มปริมาณDNAจากตัวอย่างถั่วเหลือง No. 14 จำนวน 4 ซ้ำ; Lane 5 เป็นผลการเพิ่มปริมาณDNA จากถั่วเหลืองGM; Lane 6 เป็นผลการเพิ่มปริมาณDNAจากplasmidที่มี 35S CaMV promoter เป็นส่วนประกอบ; Lane 7 เป็นผลการเพิ่มปริมาณDNA จากถั่วเหลืองNon-GM; Lane 8 เป็นผลการเพิ่มปริมาณDNAจากน้ำกลั่น

สร้างและออกแบบขึ้นมา จากส่วนใดส่วนหนึ่งภายในชิ้น DNA หรือยีนเป้าหมาย จึงเปรียบเสมือนเป็นส่วนหนึ่งของ DNA เป้าหมาย

ความไว (sensitivity) ในการตรวจหา DNA เป้าหมายด้วยวิธี PCR-ELISA ตรวจจากการเปลี่ยนสีของสารในจานหลุม ELISA และสามารถวัดค่าออกมาเป็นตัวเลขได้จากการอ่านค่า Absorbance เมื่อเทียบกับ control การเปลี่ยนสีเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง digoxigenin ที่ติดอยู่กับ เบส dUTP ซึ่งแทรกตัวอยู่ในตำแหน่งที่แทนที่ของ dTTP ภายในชิ้น DNA หรือยีนเป้าหมาย กับสาร ABTS โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ peroxidase ด้วยวิธีการตรวจแบบนี้จึงทำให้การตรวจเห็นผลได้ชัดเจนกว่าการตรวจด้วยวิธีgel electrophoresis เพราะการตรวจด้วยวิธี gel electrophoresis จะสามารถเห็นแถบ (band) ของชิ้น DNA หรือยีนเป้าหมายได้ จะต้องมีปริมาณ DNA ไม่น้อยกว่า 5 - 7 ng และถ้าหากชิ้น DNAเป้าหมายมีขนาดเล็กเกินไป ก็จะทำให้การตรวจด้วยวิธี gel

electrophoresis ลำบากมากขึ้น ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณ DNA ของ 35S CaMV promoter หรือ genomic DNA ของแม่พิมพ์ต้นแบบในตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองในลำดับที่ 14 มีปริมาณน้อยเกินไปจากที่ได้วัดค่าไว้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจได้จากการทำ gel electrophoresis (ภาพที่ 3ก) แต่ตรวจได้จากวัดการเปลี่ยนสีของสารในวิธี ELISA (ภาพที่ 3ข) จากการทดลองของ [6] และ [7] ก็สนับสนุนว่า การตรวจด้วยวิธี PCR-ELISA สามารถตรวจวัดปริมาณ DNA เป้าหมายที่มีปริมาณน้อยกว่าการตรวจด้วย gel electrophoresis ถึง 10 เท่า

นอกจากการตรวจด้วยวิธี PCR-ELISA จะมีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวในการตรวจดีกว่าวิธี PCRแล้ว การตรวจด้วยวิธี PCR-ELISA ยังป้องกันปัญหาที่เกิดจาก carry over contamination ได้อีก เพราะอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ uracil DNA glycosyate ที่เติมหรือผสมลงไปใน PCR DIG Labelling Mix plus ก่อนนำไปทำ PCR เพื่อให้เอ็นไซม์ uracil DNA glycosyate ช่วยย่อยสลาย DNA อื่นที่ปะปนมา เนื่องจากเอ็นไซม์ uracil DNA glycosyate จะไปตัดพันธะระหว่างเบส dUTP ที่ต่ออยู่กับเบสอื่นในชิ้น DNA จึงทำให้ DNA อื่นที่ปะปนมาขาดเป็นชิ้นเล็กๆ ส่วน DNAเป้าหมายไม่มีผลกระทบเนื่องจากเอ็นไซม์ uracil DNA glycosyate เสื่อมสภาพไปเมื่อถูกความร้อนสูงก่อนทำ PCR [4]

4. สรุปผลการทดลอง

1. วิธีการตรวจถั่วเหลือง GM ด้วยวิธีการ PCR-ELISA จะให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำกว่าวิธีการ PCR แต่ค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการตรวจก็มีมากกว่าการตรวจด้วยวิธี PCR
2. การพิจารณาที่จะเลือกใช้วิธีการใดตรวจ ก็ขึ้นอยู่กับระดับความสำคัญของเรื่องที่จะนำผลการตรวจไปใช้ในการกล่าวอ้างอิง
3. ปริมาณการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมแปลกปลอมในตัวอย่างถั่วเหลืองย่อมแปรเปลี่ยนไปได้ นอกจากจะขึ้นอยู่กับวิธีการตรวจแล้ว ยังมีอีกหลายปัจจัยที่จะมีผลต่อการสรุปว่าตัวอย่างถั่วเหลืองที่ได้มานั้นจะมีการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมแปลกปลอมหรือไม่ เช่น เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง ปริมาณของตัวอย่างที่นำมาตรวจ ชนิดของยีนที่จะตรวจหา และมาตราฐานของวิธีการตรวจและห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ เป็นต้น

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Clive, J., Global Review of Commercialized Transgenic crop, 30 p., 1998.

[2] ปิยะศักดิ์ ชะอุ่มพฤกษ์, เทคนิคการวิเคราะห์ GMOs, น. 9-20 ใน สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ (ผู้รวบรวม) จีเอ็มโอ : สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์ การประชุมเชิงปฏิบัติการ 10-12 พฤษภาคม 2543 ณ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.

[3] Wolcott., M.J., Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods, Clin. Microbiol. Rev. 5 : 370-386, 1992.

[4] Longo, M.C.., Berninger, M.S and Hartley, J.L., Use of Uracil DNA Glycosylase to Control Carry-over Contamination in Polymerase Chain Reactions, Gene. 93 : 125-128, 1990.

[5] Mangiapan, G., Vokurka, M., Schouls, L., Cadranel, J., Lecossier, D., van Embden, J. and Hance, A.J., Sequence Captures- PCR Improves Detection of Mycobacterial DNA in Clinical Specimens. 34 : 1209-1215, 1996.

[6] Scheu, P., Gasch, A. and Berghof, K, Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA, Lett. in Appl. Microb. 29 : 416-420, 1999.

[7] Gilligan, K.., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T.L. and Ibrahim, M.S, Identification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A and B Genes by PCR-ELISA, Mol. Cel. Probes. 14 : 71-78, 2000.

[8] Spoth, B. and Strauss, E., Screening for Genetically Modified Organism in Food Using Promega's Wizard Resin, Promega Notes Magazine. 73 : 23-25, 1999.