การปรับแต่งกรรมวิธีของปฏิกิริยาลูกโซ่พอรีมอเรสสำหรับการตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

Refinement of Polymerase Chain Reaction (PCR) Process for GM Papaya Detection in Small Laboratory

ปิยนุช ศรชัย[1/] ณัฐวดี บุญทองดี[1/] ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ[1/] วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1/]

Piyanuch Sornchai[1/] Nattawadee Buntongdee[1/] Thitirut Assawamongkolsiri[1/]

Weerasak Pitaksaringkarn[1/] Piyarat Thammakijjawat[1/]

Received 12 Mar 2021/Revised 22 Apr 2021/Accepted 4 Jun 2021

ABSTRACT

The ban of Genetically Modified crops importation by many countries, had papaya exporters in Thailand screening for genetically modified (GM) papaya throughout the production chain i.e., seedling selection, raw material purchasing, and before product exporting to prevent the product from being rejected at the receiving end. Nowadays, Real-time PCR technique is popular for the GMO screening and recognized as an international standard method but is high cost to run and high investment for equipment. The aim of this study was to refine the PCR technique that was a basic technique for GM papaya detection in small laboratories. The internal factors (annealing temperature, primer set, DNA concentration and DNA extraction methods) and external factors (PCR machine brand, PCR programs and PCR cycles) for GM screening: the CaMV35S promoter, Nos terminator, *neomycin phosphotransferase* (*nptII*), and *papain* gene by PCR technique were improved. The studies revealed that GM screening by PCR technique have to consist of the following factors:1) The optimum annealing temperature was 58°C. 2) The primer final concentration was 0.2 uM and 3) the optimum initial DNA content was 50 nanograms per reaction. Improper DNA extraction methods that did not remove all inhibitors affect the PCR reaction yield. In addition, reducing the initial denaturation and extension steps by 5 min each and reducing the number of PCR cycles by 10 can help reduce the GM papaya detection processing time by 40 min. and be as effective as the original program that takes approximately 2 hrs.

Keywords: GM papaya, PCR technique, screening method

[1] กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[1] Research and Development of GM Plant and Microbe Detection Laboratory, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand, 10900

***Corresponding author: piyanuchsorn@gmail.com , butakurogo@hotmail.com**

บทคัดย่อ

จากมาตรการห้ามนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมในหลายประเทศ ผู้ประกอบการส่งออกมะละกอของประเทศไทย มีความจำเป็นต้องตรวจคัดกรองการปะปนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมตั้งแต่แปลงเกษตร การตรวจผลิตผลที่รับซื้อ และตรวจผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออกไปยังประเทศอื่น ๆ ซึ่งปัจจุบันการตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมนิยมใช้เทคนิค Real-time PCR ที่เป็นวิธีมาตรฐานระดับสากล แต่มีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อปรับแต่งเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานให้สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์การปะปนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ให้มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก และมีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ต่ำ โดยศึกษาปัจจัยภายในที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter Nos terminator ยีน *nptII* และยีน *papain* ได้แก่ ช่วงอุณหภูมิ annealing ที่สามารถตรวจพร้อมกัน 3 ยีน ชุดไพรเมอร์ของแต่ละยีน ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ และวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR และดำเนินการศึกษาปัจจัยภายนอกได้แก่ เครื่อง PCR โปรแกรมและจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ผลการศึกษา พบว่า การตรวจคัดกรองยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR ต้องประกอบด้วยปัจจัยดังต่อไปนี้ 1) อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณทุก ๆ ยีน คือ 58°ซ. 2) ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ คือ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ 3) ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา เป็นต้นไป โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสมอาจหลงเหลือสารยับยั้งปฏิกิริยา ซึ่งส่งผลต่อผลผลิตปฏิกิริยา PCR นอกจากนี้ การลดระยะเวลาในขั้นตอน Initial Denaturation และ Extension ลงขั้นตอนละ 5 นาที รวมถึงการลดจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นจำนวน 10 รอบ สามารถช่วยลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมได้ 40 นาที โดยให้ผลปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมดั้งเดิม ที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 ชม.

คำสำคัญ: มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม, เทคนิคพีซีอาร์, การตรวจคัดกรองยีน

บทนำ

จากปัญหาโรคไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอ สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมะละกอ และยังส่งผลต่ออุตสาหกรรมมะละกอไทย นักวิจัยทั่วโลกได้ร่วมกันแก้ไขปัญหา โดยการสร้างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวน (นุชนาถ และคณะ, 2546) แต่อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคบางส่วนยังมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยของพืชดัดแปลงพันธุกรรม และหลายประเทศมีมาตรการห้ามนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาคเกษตร ภาคอุตสาหกรรม และการส่งออกมะละกอเป็นอย่างมาก เช่น สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์ และสาธารณรัฐประชาชนจีน มีมาตรการการตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ในสินค้านำเข้าที่เกี่ยวข้องกับมะละกอ ทำให้เกษตรกร ผู้ส่งออก หรือผู้ประกอบการภาคอุตสาหกรรมของประเทศไทย จำเป็นต้องตรวจคัดกรองมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมก่อนการส่งออกตามประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ที่ประกาศให้มะละกอเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ต้องตรวจสอบการเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมก่อนส่งสินค้าไปยังประเทศดังกล่าว

ปัจจุบันการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมสามารถตรวจสอบได้ 2 รูปแบบ คือ 1) ตรวจสอบจากโปรตีน เช่น ใช้ชุดตรวจสอบโปรตีนสำเร็จรูป (Protein ELISA test kit) 2) ตรวจสอบ

จากดีเอ็นเอ เช่น เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และ Real-time PCR (Chris *et al*., 2014) การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมเบื้องต้นจะทำการตรวจคัดกรอง (screening method) ส่วนของยีนที่มีอยู่เฉพาะในพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น CaMV35S promoter NOS terminator และ *nptII* โดยนิยมใช้เทคนิค Real-time PCR เนื่องจากสามารถตรวจได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ และเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล แต่การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ไม่สามารถใช้เครื่อง Real-time PCR ได้ เนื่องจากมีอุปกรณ์ สารเคมี และต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์จำกัด จึงจำเป็นต้องปรับแต่งกรรมวิธี PCR ให้มีศักยภาพเทียบเท่ากับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real-time PCR งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ให้เหมาะสม เพื่อใช้ในการคัดกรองมะละกอสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างมะละกอและวัสดุอ้างอิง

ตัวอย่างที่นำมาใช้การทดลอง ได้แก่ 1) ตัวอย่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่า ประกอบด้วย CaMV 35S promoter NOS terminator และ *nptII* ที่ระดับการปะปน 10% โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์พืชดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 1 ตัวอย่าง 2) มะละกอไม่ดัดแปลงพันธุกรรม 1 ตัวอย่าง 3) ผลิตภัณฑ์จากมะละกอ มะละกอในน้ำเชื่อม 5 ตัวอย่าง 4) ผลิตภัณฑ์จากมะละกอในผลไม้รวม 5 ตัวอย่าง และ 5) ตัวอย่างวัสดุอ้างอิง (Certificate Reference Material: CRM) ของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ RR (GTS 40-3-2) ที่มีเปอร์เซ็นต์การปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม 10 และ 0.1% สำหรับใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอ (ข้อ 1) และวัสดุอ้างอิง ด้วยกรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985; ปิยนุช และคณะ, 2562) โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอชนิดละ 5 ซ้ำ และสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัสดุอ้างอิงชนิดละ 3 ซ้ำ ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การศึกษาปัจจัยภายในที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain*

3.1 ศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน Annealing

ทำการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 35SCaMV promoter Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* ของแต่ละชุดไพรเมอร์ (Table 1) โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X DreamTaq Mastermix (Thermo Scientific, USA) ไพรเมอร์ forward และ reverse ที่มีความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำส่วนผสมปฏิกิริยาไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Thermocycler (Biometra®, Germany) และกำหนดอุณหภูมิของ annealing ตั้งแต่ 55, 56, 57, 58, 59, 60 และ 61°ซ. โดยใช้โปรแกรมดังต่อไปนี้ Initial PCR activation step ที่ 95°ซ. นาน 10 นาที 3 steps cycling จำนวน 40 รอบ กำหนดอุณหภูมิ ดังนี้

Denature ที่ 96°ซ. นาน 30 วินาที

Annealing ที่ 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61°ซ. นาน 30 วินาที

Extension ที่ 72°ซ. นาน 40 วินาที

จากนั้น ตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ของทุก ๆ ยีน โดยการนำมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้อะกาโรสเจล 2% ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 35 นาที ในบัฟเฟอร์ 1X TBE เปรียบเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมป์ดาดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ

3.2 การศึกษาลักษณะของไพรเมอร์ที่ส่งผลต่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้น Annealing

จากการที่ผลผลิตปฏิกิริยา PCR สามารถนำไปใช้เพื่อตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ๆ ได้ นอกจากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ดังนั้น จึงศึกษาลักษณะของอุณหภูมิขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ 2 ลักษณะ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่ไม่ติดฉลาก (Set 1, control) และไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Non-radioactive (Set 2) สำหรับการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter Nos terminator, ยีน *nptII* และยีน *papain* (Table 1) โดยใช้ส่วนผสมและโปรแกรมปฏิกิริยา PCR รวมถึงอุณหภูมิของ annealing ที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 (58-60°ซ.) ทำการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมจากการใช้ไพรเมอร์ 2 ลักษณะ กับการตรวจสอบยีนทั้ง 4 ยีน

3.3 การศึกษาความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* ที่ 0.04, 0.2 และ 0.4 ไมโครโมลาร์ ในส่วนผสมปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X DreamTaq Mastermix ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และใช้โปรแกรมเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ตรวจ

Table 1 Primer sequences for 35SCaMV promoter, Nos terminator, *nptII*, and *papain* genes detections in genetically modified papaya

Target gene	set		Sequence (5- 3)	Product size (bp)
35S CaMV promoter	1	Forward	TAGCTGGGCAATGGAATC	194 (From this study)
		Reverse	AGACTGGCGAACAGTTCA	
	2	Forward	DIG-TAGCTGGGCAATGGAATC	
		Reverse	AGACTGGCGAACAGTTCA	
Nos terminator	1	Forward	GAATCCTGTTGCCGCTCTTG	180 (From this study)
		Reverse	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	
	2	Forward	DIG-GAATCCTGTTG0CCGCTCTTG	
		Reverse	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	
nptII	1	Forward	TGATGCTCTTCGTCCAGA	248 (From this study)
		Reverse	CTCGACGTTGTCACTGAAG	
	2	Forward	DIG-TGATGCTCTTCGTCCAGA	
		Reverse	CTCGACGTTGTCACTGAAG	
papain	1	Forward	GGCATTCTCAGCTGTTGT	191 (From this study)
		Reverse	CCTCATATGGGTAAGTATTTCTG	
	2	Forward	DIG-GGCATTCTCAGCTGTTGT	
		Reverse	CCTCATATGGGTAAGTATTTCTG	

สอบผลปฏิกิริยา PCR จากทุก ๆ ยีน ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.1 และตรวจสอบความเข้มของผลปฏิกิริยา PCR โดยเลือกแถบผลปฏิกิริยา PCR ที่ชัดเจน และไม่หลงเหลือแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลปฏิกิริยา PCR เช่น แถบดีเอ็นเอด้านบน และแถบไพรเมอร์ที่จับคู่กันเอง (primer dimer)

3.4 ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR

การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น จะใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย โดยให้มีดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10, 20, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter Nos terminator ยีน *nptII* และ ยีน *papain* ด้วยเทคนิค PCR จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำส่วนผสมของปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม และตรวจสอบผลปฏิกิริยา PCR ของทุก ๆ ยีน เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอมะละกอ 5 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 (Kasajima) ดัดแปลงจากวิธีของ Kasajima *et al.* (2004) วิธีที่ 2 (Hwang Bo) ดัดแปลงจากวิธีของ Hwang Bo *et al.* (2010) วิธีที่ 3 (Kim) ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2016) วิธีที่ 4 (Kit) จากชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (เลขคำขอจดอนุสิทธิบัตร 2003000065) และวิธีที่ 5 (Lysis) กรรมวิธีของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Roger and Bendich, 1985; ปิยนุช และคณะ, 2562) จากนั้นตรวจสอบค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 5 วิธี ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Multiskan FC Microplate Photometer, USA) นำดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากผลการทดสอบข้อ 3.1-3.4 และตรวจสอบผลปฏิกิริยา PCR โดยใช้โปรแกรมเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

4. การศึกษาปัจจัยภายนอกที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในเทคนิค PCR

4.1 ศึกษาผลของโปรแกรมและจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR

ศึกษาผลกระทบจากปัจจัยภายนอกที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา PCR คือ โปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ที่แตกต่างกันทั้งหมด 6 โปรแกรม โดยแต่ละโปรแกรมจะส่งผลต่อระยะเวลาของการทำ PCR และการตรวจสอบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในการวิจัยครั้งนี้ ทำการลดระยะเวลาแต่ละขั้นตอน ซึ่งมีรายละเอียดของโปรแกรมต่าง ๆ ดังแสดงใน Table 2 นอกจากนี้ ได้ทำการลดรอบของปฏิกิริยาลงจาก 40 รอบ ให้เหลือ 35, 30, 25, 20, 15, 10 และ 5 รอบ (Table 3) เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ของการลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยประเมินจากผลของปฏิกิริยา PCR ซึ่งทำการตรวจสอบ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

4.2 การศึกษาผลของเครื่อง PCR ต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR

การศึกษาครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบการใช้เครื่อง PCR 2 รูปแบบ คือ เครื่อง PCR ที่มีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ หรือ Ramp Rate เท่ากับ 8°ซ./วินาที (Tadvance, Biometra®, Germany) และเครื่อง PCR ที่มี Ramp Rate เท่ากับ 3°ซ./วินาที (miniPCR bio®, USA) ซึ่งทั้งสองเครื่องมีความแตกต่างในการเปลี่ยนผ่านอุณหภูมิ จึงอาจส่งผลให้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่างกัน และราคาของเครื่องก็แตกต่างกันด้วย ในการทดลองใช้โปรแกรมที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 และข้อ 4.1 มาทดสอบและเปรียบเทียบผลปฏิกิริยาจากทั้ง 2 เครื่อง เช่นเดียวกับข้อ 3.1

Table 2 Details and duration of 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th PCR program for genetically modified papaya detection

Step	Temp.	Time of Program					
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
Initial Denaturation	95C	10 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min
Denaturation	95C	30 sec	30 sec	30 sec	20 sec	20 sec	20 sec
Annealing	58C	30 sec	30 sec	30 sec	10 sec	20 sec	20 sec
Extension	72C	40 sec	35 sec	35 sec	30 sec	30 sec	30 sec
Final Extension	72C	7 min	5 min	5 min	5 min	5 min	7 min
All Process		1.41 hr	1.36 hr	1.31 hr	1.08 hr	1.14 hr	1.16 hr

Table 3 Total duration of PCR reactions at different number of cycles

No. of Cycles	Process time of Program					
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
40	1.41 hr	1.36 hr	1.31 hr	1.08 hr	1.14 hr	1.16 hr
35	1.30 hr	1.26 hr	1.21 hr	1.01 hr	1.06 hr	1.08 hr
30	1.20 hr	1.16 hr	1.11 hr	54 min	59 min	1.01 hr
25	1.10 hr	1.06 hr	1.01 hr	47 min	51 min	53 min
20	1.00 hr	56 min	51 min	40 min	43 min	45 min
15	49 min	46 min	41 min	33 min	35 min	37 min
10	39 min	36 min	31 min	26 min	28 min	30 min
5	29 min	26 min	21 min	19 min	20 min	22 min

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปัจจัยภายในที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain*

1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน Annealing

การศึกษาอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่อการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 4 ชนิด คือ 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน annealing แตกต่างกันในการเกิดปฏิกิริยา PCR ของแต่ละยีน สำหรับยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator และ ยีน *nptII* สามารถใช้อุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้ตั้งแต่ 58 - 61°ซ. แต่สำหรับยีน *papain* สามารถใช้อุณหภูมิขั้นตอน annealing ได้ตั้งแต่ 55 - 61°ซ. (Table 4) ทั้งนี้ เมื่อตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมตามหลักการ คือ ให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR จำนวนคู่เบสตรงตามเป้าหมาย มีความเข้มของผลผลิตปฏิกิริยา PCR เหมาะสม (Mehmet *et al*., 2001) ไม่เกิดผลของการปนเปื้อนที่เรียกว่า carry over และไม่มี primer dimer หลงเหลืออยู่ (Van Pelt-Verkuil *et al*., 2008) สำหรับการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 58°ซ.

1.2 ลักษณะของไพรเมอร์ที่ส่งผลต่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน Annealing

ผลการศึกษาอุณหภูมิขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ 2 ลักษณะ สำหรับการตรวจสอบยีน 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน annealing ที่ใช้ไพรเมอร์ที่ไม่ติดฉลาก คือ 58 - 60 °ซ. โดยอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมตามหลักการ คือ 60 °ซ. ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Non-radioactive พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นช่วงเดียวกันกับไพรเมอร์ที่ไม่ติดฉลาก แต่อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมตามทฤษฎี คือ 58 °ซ. (Table 4, Figure 1) จะเห็นได้ว่าลักษณะของไพรเมอร์ไม่ส่งผลต่อช่วงอุณหภูมิของขั้นตอน annealing ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Van Pelt-Verkuil *et al.* (2008) ที่กล่าวว่า การเพิ่มตำแหน่งของโพรบที่ด้านปลาย 5 ของไพรเมอร์ ไม่มีผลกระทบต่อการจับของไพรเมอร์ แต่ถ้าติดฉลากที่ตำแหน่งอื่น ๆ เช่น ด้านปลาย 3 จะทำให้เกิดการรบกวนไพรเมอร์ การเข้าจับของไพรเมอร์ทำให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมตามหลักวิชาการของ 2 ลักษณะไพรเมอร์ แตกต่างกัน 2°ซ. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการติดฉลากที่ตำแหน่งปลาย 5 ทำให้ไพรเมอร์มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้มีความไวในการเข้าจับมากขึ้น สามารถเข้าจับที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่า จึงหลงเหลือ primer dimer น้อยลง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า มีการนำไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย Non-radioactive มาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR นั้น ๆ ในการตรวจจับด้วยเทคนิค Spectroscopic and Immunochemical (Hahn *et al.*, 2001)

1.3 ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ผลการทดสอบความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ 35SCaMV promoter, Nos terminator, ยีน *nptII* และ ยีน *papain* ที่ 0.04, 0.2 และ 0.4 ไมโครโมลาร์ พบว่า ผลผลิตปฏิกิริยา PCR แปรผันตรงกับความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ในทุกผลผลิต เมื่อความเข้มข้นของไพรเมอร์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้ผลผลิต PCR เพิ่มมากขึ้นด้วย ทั้งนี้ ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์ มีความเหมาะสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR และโปรแกรมต่างๆ โดยพบแถบดีเอ็นเอชัดเจน และไม่มีแถบคู่ไพรเมอร์ที่เรียกว่า primer dimer หลงเหลืออยู่ แต่ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตปฏิกิริยาที่เข้มกว่า และพบแถบ primer dimer ซึ่งจะมีความยาวของแถบขนาดต่ำกว่า 100 คู่เบส เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) และสำหรับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.04 ไมโครโมลาร์ พบว่า ไม่สามารถเห็นผลผลิตปฏิกิริยา PCR ได้ เนื่องมาจากความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อปฏิกิริยา จึงทำให้ได้ผลผลิตปฏิกิริยาต่ำ ส่งผลให้การแยกผลผลิตปฏิกิริยาด้วยอะกาโรสเจลไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้ ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของไพรเมอร์ 35SCaMV promoter Nos terminator ยีน *nptII* และ ยีน *papain* คือ 0.2 ไมโครโมลาร์

การทดลองความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยานั้น ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Brownie *et al.* (1997) ที่พบว่า ปริมาณไพรเมอร์ที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมต่อปฏิกิริยา ซึ่งหากมีการใช้ไพรเมอร์ในปริมาณที่มีสัดส่วนมากเกินไปอาจเกิดการจับคู่กันของไพรเมอร์ (primer dimer) ทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้ ไม่ใช่ผลผลิต PCR จากดีเอ็นเอต้นแบบ

1.4 ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา PCR

ผลการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่

Table 4 Testing of annealing temperature for 35SCaMV promoter, Nos terminator, *nptII* and *papain* genes detections in GM papaya

Gene	Annealing Temperature (°C)							Appropriate Temperature (°C)
	55	56	57	58	59	60	61	
35SCaMV promoter	X	X	X	√	√	√	√	58-60
Nos terminator	X	X	X	√	√	√	√	
nptII	X	X	X	√	√	√	√	
papain	√	√	√	√	√	√	X	

Noted: : PCR product Detected X : PCR product Not Detected

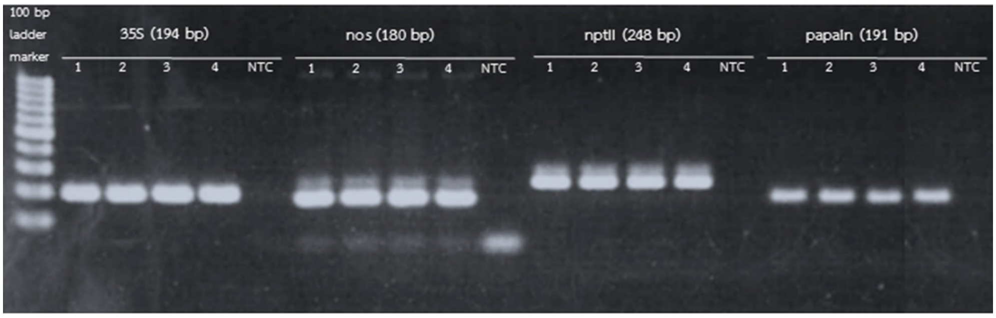

Figure 1 PCR products of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *nptII* and *papain* genes at 58°C annealing temperature using Non-radioactive primers

เหมาะสม พบว่า การใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 10 นาโนกรัม เป็นต้นไป สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *papain* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิตปฏิกิริยาทั้งหมด แต่สำหรับ 35SCaMV promoter, Nos terminator และ ยีน *nptII* ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา จึงจะให้ผลผลิตปฏิกิริยา จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 4 ยีน คือ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

1.5 ผลของวิธีการสกัดดีเอ็นเอต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR

ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอมะละกอทั้งหมด 5 วิธี โดยการตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากแต่ละวิธี และการหลงเหลือสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR พบว่า วิธีที่ 5 (Lysis) และวิธีที่ 4 (Kit) มีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.8-1.9 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งแต่ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตรขึ้นไป วิธีที่ 3 (Kim) ได้ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอประมาณ 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เท่ากับ 1.5 ซึ่งมีความสามารถเพียงพอในการทำปฏิกิริยา PCR แต่สำหรับวิธีที่ 2 (Hwang Bo) และวิธีที่ 1 (Kasajima) ให้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วงระหว่าง 100-200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 2 วิธี มีค่าความบริสุทธิ์ต่ำอยู่ในช่วง 0.9-1.2

เมื่อตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR จากภาพเจล พบว่า วิธีที่ 1 (Kasajima) ไม่สามารถตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR ได้ ขณะที่วิธีที่ 2 (Hwang Bo) วิธีที่ 3 (Kim) วิธีที่ 4 (Kit) และวิธีที่ 5 (Lysis) ให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่มีความเข้มแตกต่างกันไป โดยวิธีที่ 4 และวิธีที่ 5 มีความเข้มของแถบผลผลิตปฏิกิริยา PCR สูง รองลงมาคือวิธีที่ 2 (Hwang Bo) และตามด้วยวิธีที่ 3 (Kim) ดังแสดงใน Figure 2

เมื่อวิเคราะห์ภาพเจลร่วมกับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมะละกอ พบว่า วิธีที่ 5 (Lysis) ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม วิธีที่ 3 (Kim) วิธีที่ 4 (Kit) ชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย และวิธีที่ 2 (Hwang Bo) สามารถเห็นผลปฏิกิริยา PCR แต่สำหรับวิธีที่ 1 (Kasajima) ไม่สามารถเห็นผลของปฏิกิริยาได้ จะเห็นได้ว่า ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี Hwang Bo ถึงแม้จะมีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่สารยับยั้งในดีเอ็นเอมีน้อย ทั้งนี้ เนื่องมาจากในสารเคมีที่ใช้ในวิธี Hwang Bo คือ Chelex 100 ซึ่งมีความสามารถในการดึงสารทุติยภูมิออกจากดีเอ็นเอ (Walsh *et al*, 1991) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (Kit), Kim และ Hwang Bo สามารถนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้

ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาส่งผลโดยตรงกับปริมาณของผลผลิตปฏิกิริยา PCR แต่ในภาคสนาม การสกัดดีเอ็นเอมะละกอส่วนใหญ่จะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย อาจทำให้ได้ดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำ และยังคงมีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาอยู่ ส่งผลให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาหรือเพิ่มปริมาณยีนที่มีจำนวนสำเนาน้อย (low copy) เป็นไปได้ยากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Debnath *et al* (2010) ที่รายงานว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่ปราศจากสารยับยั้งที่ได้รับจาก

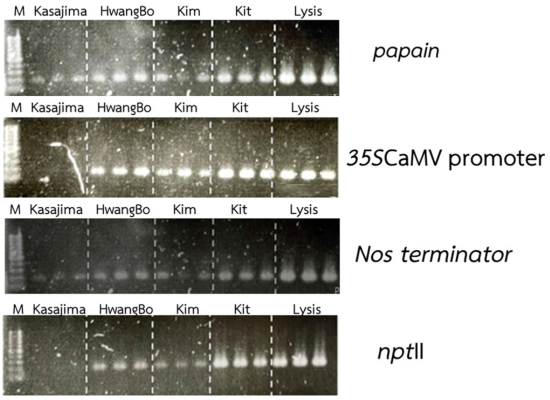

Figure 2 PCR products of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *nptII* and *papain* genes obtained from different DNA extraction methods (Kasajima, Hwang Bo, Kim, Kit and Lysis methods)

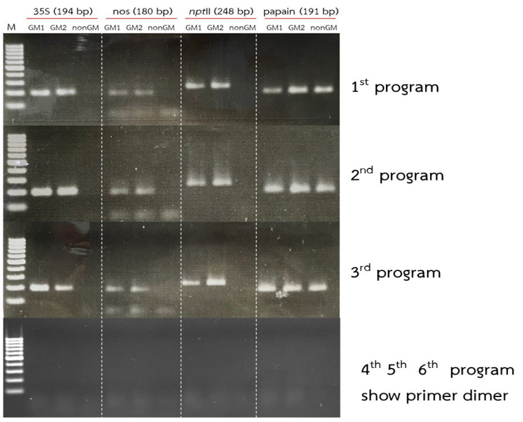

Figure 3 PCR products of 35SCaMV promoter, Nos terminator, *nptII* and *papain* genes from six PCR testing programs

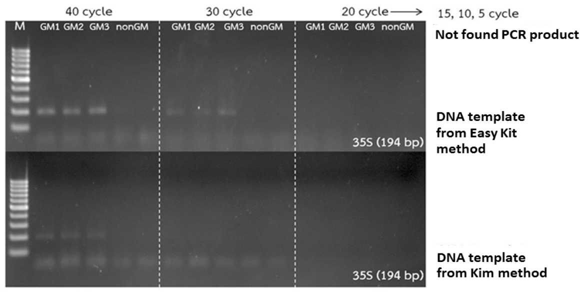

Figure 4 PCR products obtained from different DNA extraction methods and the number of PCR cycles with primer 35SCaMV promoter

ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ โดยตัวอย่างของสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR ที่เกิดในช่วงสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ฟีนอล โพลีแซ็กคาไรด์จากพืช เป็นต้น นอกจากนี้ Peist *et al.* (2001) รายงานว่า เอนไซม์ที่มาจากพืชระหว่างสกัดดีเอ็นเอ ไขมัน และสารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เช่น ไอโซโพรพานอล เอทานอล ก็สามารถส่งผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

2. ผลของปัจจัยภายนอกที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบ 35SCaMV promoter Nos terminator ยีน *nptII* และ ยีน *papain*

2.1 ผลของโปรแกรมและจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR

ผลจากการทดสอบทั้ง 6 โปรแกรม พบว่า โปรแกรมที่ 1 ซึ่งเป็นโปรแกรมตัวควบคุมให้ผลปฏิกิริยา PCR ที่แน่นอน และเมื่อลดระยะเวลาของแต่ละขั้นตอนลงมา พบว่า โปรแกรมที่ 2 และ 3 สามารถให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ได้ โดยสามารถลดระยะเวลาลงได้เพียง 10 นาที ในขณะที่โปรแกรมที่ 4, 5 และ 6 ถึงแม้จะลดระยะเวลาได้ถึง 30 นาที แต่ไม่สามารถพบผลผลิตปฏิกิริยา PCR บนอะกาโรสเจลได้ (Figure 3) ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า โปรแกรมที่ 3 มีขั้นตอน และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับการทดสอบจำนวนรอบปฏิกิริยา PCR ที่จำนวน 40, 30, 20, 15, 10, 5 รอบ (Table 3) พบว่า สามารถตรวจพบแถบผลผลิตดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 2% เมื่อทำปฏิกิริยา จำนวน 40 และ 30 รอบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอในผลผลิตปฏิกิริยาที่ 20 รอบลงมา (Figure 4) สอดคล้องกับการรายงานของ Van Pelt-Verkuil *et al.* (2008) ที่พบว่า ผลผลิตปฏิกิริยาขึ้นกับหลายปัจจัย โดยปัจจัยที่สำคัญคือจำนวนของรอบในการทำ PCR ซึ่งจำเป็นต้องมีจำนวนรอบมากพอให้ผลผลิตปฏิกิริยาถึงระยะ Plateus phase นอกจากนี้ ยังรายงานว่า จำนวนผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ได้จาก จำนวนรอบ 30 รอบขึ้นไป จะสามารถแสดงผลได้ในเจลอะกาโรส

2.2 ผลการเปรียบเทียบเครื่อง PCR ต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR

ผลจากการทดลองใช้โปรแกรมที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 ทดลองและเปรียบเทียบผลปฏิกิริยาจาก 2 เครื่อง พบว่า เครื่อง PCR ทั้ง 2 แบบ สามารถทำให้ได้ผลผลิตปฏิกิริยาเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เครื่อง PCR ที่มี Ramp rate สูง จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วกว่าถึง 30 นาที ทั้งนี้ จำเป็นต้องวิเคราะห์รายละเอียดอื่น ๆ เพิ่มเติมก่อนที่จะนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เช่น ราคาของเครื่อง จำนวนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบต่อวัน ระยะเวลาที่ผู้ประกอบการสามารถรอผลการทดสอบได้

สำหรับเทคนิค PCR หรือ Polymerase Chain Reaction เป็นการจำลองการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ซึ่งประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ การแยกสายของดีเอ็นเอ (denaturation) การเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) และการเติมเบสให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ทั้งนี้ แต่ละขั้นตอนอาจมีปัจจัยที่สามารถส่งเสริมให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น หรืออาจมีปัจจัยที่เป็นผลกระทบต่อการทำปฏิกิริยา PCR (Amersham Biosciences, 1998) เช่น อุณหภูมิของการเข้าจับของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น จำนวนรอบของปฏิกิริยาสารยับยั้งปฏิกิริยาของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ ยังพบว่า ปัจจัยภายนอกเช่น โปรแกรมการทำปฏิกิริยา PCR และ เครื่อง PCR ที่มี Ramp rate ต่างกัน ก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สรุปผลการทดลอง

ปัจจัยสำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีน CaMV35S promoter, Nos terminator, ยีน *neomycin phosphotransferase (nptII)* และยีน *papain* ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ที่พัฒนาขึ้นมาสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กต้องประกอบด้วย

1. อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณทุก ๆ ยีน คือ 58-60°ซ. และการติดฉลากด้วย Non-radioactive ที่ไพรเมอร์ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ annealing

2. ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ได้คือ 0.2 ไมโครโมลาร์

3. ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยาเป็นต้นไป โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสม อาจหลงเหลือสารยับยั้งปฏิกิริยาซึ่งส่งผลต่อผลผลิตปฏิกิริยา PCR ได้

4. วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม ได้แก่ วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Hwang Bo *et al.* (2010) วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kim *et al.* (2016) และวิธีสกัดโดยชุดสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย (เลขคำขอจดอนุสิทธิบัตร 2003000065) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้

5. การลดระยะเวลาลงในขั้นตอน Initial Denaturation และ Extension ขั้นตอนละ 5 นาที รวมถึงการลดจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR ลง 10 รอบ สามารถลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเหลือ 40 นาที โดยที่ยังให้ผลปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าโปรแกรมดั้งเดิมที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 ชม.

เอกสารอ้างอิง

นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, อัญจนา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โฆษิตรัตน, และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ.หน้า.539-546. *ใน: รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 14.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปิยนุช ศรชัย ธีระ ชูแก้ว ณัฐวดี บุญทองดี ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2562. การทดสอบความใช้ได้ของการตรวจจำแนกยีน Event specific Mon 810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR. *ว.วิชาการเกษตร*. 37 (3): 224-237.

Amersham Biosciences. 1998. *PCR Product Analysis: a guide to using semidry flatbed gel electrophoresis*. Amersham Biosciences Limited, USA, 52p.

Chris V., S. Agapito-Tenfen, and G. Abou-Sleymane. 2014. Overview of available detection methods, including validated methods in Summary of The activities under the electronic network of laboratories for the detection and identification of Living Modified Organisms (2012-2014). page 8-22. *In*: Conference of the parties to the convention on biological diversity serving as the meeting of the parties to the Cartagena protocol on Biosafety, 7th meeting Pyeongchang, Republic of Korea, 29 September-3 October 2014.

Debnath, M., Prasad G.B.K.S and Bisen P.S. 2010. *Molecular Diagnostics*: Promises and Possibilities Dordrech Heidelberg London, Springer, pp 129-152.

Hahn, M., J. Wilhelm and A. Pingoud. 2001. Influence of fluorophor dye labels on

the migration behaviour of PCR amplified short tandem repeat during denaturing capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 22: 2691-2700.

Hwang Bo, K., S.H. Son, J.K. Lee, S.R. Min, S.M. Ko, J.R. Liu, D. Choi and W.J. Jeong. 2010. Rapid and Simple Method for DNA Extraction from Plant and Algal Species Suitable for PCR Amplification Using a Chelating Resin Chelex 100. *Plant Biotechnol Rep* 4: 49-52.

Kasajima, I., Y. Ide, N. Ohkama-Ohtsu, H. Hayashi, T. Yoneyama and T. Fujiwara. 2004. A Protocol for Rapid DNA Extraction from Arabidopsis thaliana for PCR Analysis. *Plant Mol. Biol. Reporter* 22: 49–52

Kim, S.R., J. Yang, G. An and K.K. Jena. 2016. A Simple DNA Preparation Method for High Quality Polymerase Chain Reaction in Rice. *Plant Breed Biotech* 4(1):99-106.

Mehmet, D., F. Ahmed, JM. Cummins, R. Martin and J. Whelan. 2001. Quantification of the common deletion in human testicular mitochondrial DNA by competitive PCR assay using a chimaeric competitor. *Mol Human Rep*. 7:301-306.

Peist, R., D.Honsel, G.Twieling, and D. Lffert, 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *QIAGEN* News 3:7–9.

Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.

Walsh, P.S., Metzger D.A., and Higuchi, R. (1991). “Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material”. *BioTechniques*. 10 (4): 506–513.

Van Pelt-Verkuil, E., V.B. Alex and J.P. Hays 2008. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science + Business Media B.V., Springer, 332p.