การตรวจสอบข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Detection of Genetically Modified Maize and Products Using Polymerase Chain Reaction

นคร สอนสมบูรณ์[1], **ปาริยา ณ นคร**[1], **ธีระชัย ธนานันต์**[1] **และ นฤมล ธนานันต์**[2]*

Nakorn Sornsomboon[1], Pariya Na Nakorn[1], Theerachai Thanananta[1] and Narumol Thanananta[2]*

[1]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120;* [2]*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180*

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Pathum Thani 12120;* [2]*Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkrrn Rajabhat University under Royal Patronage, Pathum Thani 13180*

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

บทคัดย่อ

การปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณและพื้นที่ปลูก เพื่อรองรับทั้งภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม ผลิตผลของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ ผลสด อาหารสัตว์ และอาหารแปรรูป ข้าวโพดเป็นพืชอุตสาหกรรมอีกชนิดที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมและมีการปลูกอย่างแพร่หลายเพื่อนำไปผลิตอาหาร การตรวจสอบยีนจำเพาะของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมอาจมีความยุ่งยาก เพราะมีหลายยีน ดังนั้นโพรโมเตอร์ 35S ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่พบในพืชดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่จึงเป็นเป้าหมายในการตรวจสอบ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะกับโพรโมเตอร์ 35S ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด จำนวน 14 ตัวอย่าง พบ 1 ตัวอย่าง ที่มีการเจือปนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

ABSTRACT

The genetically modified (GM) plants are more planting. There are increasing both of fields and yields, for supporting agriculture and industry. Yields of GM plant are fruits, feed and processed products. Maize is one of most worldwide planting industrial crop that was modified genetic. The detection of specific gene may be complicate because a lot of gene in GM maize, so the 35S promoter, which is common promoter in GM plants, is introduce for detection. The result of PCR that amplified by specific primers show 1 from 14 samples of maize and product was contaminated GM maize.

คำสำคัญ: ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม, โพรโมเตอร์ 35S, ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอรเรส

Keywords: genetically modified maize, 35S promoter, polymerase chain reaction (PCR)

บทนำ

พืชดัดแปลงพันธุกรรมสร้างขึ้นเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหารในยุคปัจจุบัน โดยพืชดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนต่อโรคพืช แมลง วัชพืช สารเคมีกำจัดศัตรูพืช รวมไปถึงสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงต่างๆ อีกทั้งยังทำให้พืชสามารถผลิตสารอาหารอื่น ๆ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการอีกด้วย

แม้พืชดัดแปลงพันธุกรรมจะมีประโยชน์มากมาย แต่ก็มีกระแสต่อต้านออกมา เนื่องจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีการตัดเชื่อมยีนของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเข้าไป เมื่อเกิดกระแสต่อต้านขึ้น พืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงถูกควบคุมการปลูกและจำหน่าย มีการติดฉลากอาหารที่มาจากพืชดัดแปลงพันธุกรรม และมีการตรวจคัดกรองทั้งในระดับโปรตีนและดีเอ็นเอ การตรวจพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับโปรตีนทำโดยอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น วิธี ELISA เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตจากยีนที่ตัดเชื่อมเข้าไป ในส่วนการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอนั้นจะอาศัยหลักการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) (ขนิษฐา, 2548)

ข้าวโพด (*Zea mays*) เป็นพืชอุตสาหกรรมอีกหนึ่งชนิดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมมีหลายสายพันธุ์จากผู้ผลิตที่ต่างกัน (ขนิษฐา และคณะ, 2550) James (2510) รายงานว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งพื้นที่ปลูกและผลผลิต สำหรับข้าวโพดมีการปลูกเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 10 ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ถึง 4.3 ล้าน เฮกแตร์ อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่มีการอนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการค้า แต่พบว่ามีการเจือปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั้งในอาหารสัตว์และอาหารแปรรูปเนื่องจากการนำเข้าวัตถุดิบในการผลิตจากต่างประเทศ (ประศาสตร์, 2548)

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือการตรวจสอบชิ้นส่วนโพรโมเตอร์ 35S ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมหรือผลิตภัณฑ์ที่มีการเจือปนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมจากตัวอย่างที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 14 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมจากตลาดในประเทศไทย ได้แก่ ฝักข้าวโพด เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ และอาหารแปรรูปจากข้าวโพด โดยผ่านกระบวนการผลิตที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างที่เป็นเมล็ดพันธุ์จะปลูกในกระถางจนมีความสูงประมาณ 12 นิ้ว แล้วจึงตัดใบมาสกัดดีเอ็นเอ ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีส่วนผสมของเนย นม น้ำตาล จะแยกให้เหลือแต่ข้าวโพดด้วยการกรองหรือร่อนผ่านตะแกรง ล้างด้วยดีเทอเจนท์ (detergent) และอบให้แห้ง ตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมอ้างอิงได้จากข้าวโพดที่ผ่านการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากทั้ง 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

3. การตรวจสอบยีนพื้นฐานและการตรวจสอบโพรโมเตอร์ 35S

การวิจัยครั้งนี้ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *zein* ในข้าวโพด และไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อโพรโมเตอร์ 35S (ตารางที่ 2) โดยทั้งสองขั้นตอนใช้ตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.25 ไมโครโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมี dNTP 200 ไมโครโมลาร์ และใช้ *Taq* DNA Polymerase (Vivantis™ Technologies, Malaysia) 0.5 ยูนิต ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร การทำปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอน คือ (1) การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 °Cเป็นเวลา 5 นาที (2) สำหรับยีน *zein* ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที 59 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที ส่วนโพรโมเตอร์ 35S ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 20 วินาที 57 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที (Hsu-Yang, 2005) (3) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างและการผ่านกระบวนการผลิต

ลำดับที่	ชนิดของตัวอย่าง	การผ่านกระบวนการผลิต
1	ข้าวโพดดิบสำหรับทำข้าวโพดคั่ว	น้อย
2	ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	น้อย
3	ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	น้อย
4	ข้าวโพดดิบสำหรับทำข้าวโพดคั่ว	น้อย
5	ฝักข้าวโพดสด	ไม่ผ่าน
6	เมล็ดพันธุ์	ไม่ผ่าน
7	เมล็ดพันธุ์	ไม่ผ่าน
8	เมล็ดพันธุ์	ไม่ผ่าน
9	เครื่องดื่มธัญญาหารสำเร็จรูป	มาก
10	แผ่นข้าวโพดอบกรอบ	มาก
11	แป้งข้าวโพด	มาก
12	ข้าวโพดดิบปรุงรสสำหรับทำข้าวโพดคั่วสำเร็จรูป	มาก
13	ข้าวโพดดิบปรุงรสสำหรับทำข้าวโพดคั่วสำเร็จรูป	มาก
14	เครื่องดื่มธัญญาหารสำเร็จรูป	มาก
15	ผงข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมอ้างอิง	น้อย

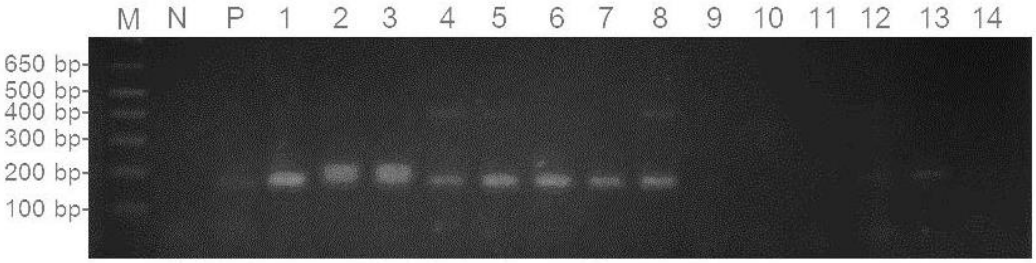
ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิจัย

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→ 3′)	บริเวณเป้าหมาย	ขนาด (bp)	การอ้างอิง
Zein-F	GGGCTTGCCAGCTTGATGG	*zein* gene	198	การทดลองนี้
Zein-R	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT			
35S-F	GCTCCTACAAATGCCATCA	35S promoter	195	Hsu-Yang, 2005
35S-R	GATAGTGGGATTGTGCGTCA			

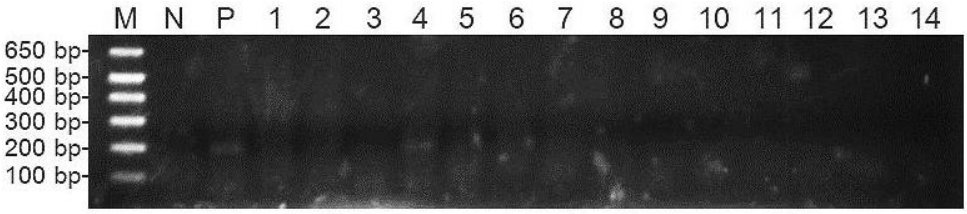
ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างด้วยการเพิ่มชิ้นยีน *zein* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นการยืนยันผลว่าในตัวอย่างนั้นมีส่วนประกอบของข้าวโพด ปรากฏว่าจาก 14 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นขนาด 198 คู่เบส (bp) 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1-8 และตัวอย่างที่ 13 แต่ตัวอย่างข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมและตัวอย่างที่ 13 พบแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างจางกว่าแถบอื่น ๆ เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่า โดยตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการมากจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ยกเว้นตัวอย่างที่ 13 ส่วนตัวอย่างที่ 4 และ 8 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส อาจเกิดจากการมียีน *zein* เชื่อมต่อกัน 2 ชุด ซึ่งได้จากการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ผลิตโปรตีนสูงขึ้น เพราะแถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดประมาณ 2 เท่า ของแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย

เมื่อเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการตรวจสอบโพรโมเตอร์ 35S เป็น 45 รอบ เพื่อเพิ่มความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวที่แสดงแถบดีเอ็นเอตรงกับที่คาดหมาย (195 คู่เบส) คือ ตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างข้าวโพดดิบสำหรับทำข้าวโพดคั่ว ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่เหมาะสม รวมทั้งอัตราส่วนการเจือปนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ถ้ามีปริมาณน้อยมากจะมีผลต่อความไว (sensitivity) ของการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการมากจะมีผลต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส เนื่องจากดีเอ็นเอเสียสภาพเมื่อผ่านกระบวนการผลิต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rafaat และคณะ (2011) ที่พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ไม่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอาหารที่เจือปนพืชดัดแปลงพันธุกรรม



รูปที่ 1 การเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *zein* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดย [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), N คือ ตัวควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายดีเอ็นเอ, P คือ ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (positive control), เลน 1-4 คือ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการน้อย, 5-8 คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการ และ 9-14 คือ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการมาก]



รูปที่ 2 การเพิ่มชิ้นส่วนของโพรโมเตอร์ 35S เพื่อตรวจสอบข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), N คือ ตัวควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายดีเอ็นเอ, P คือ ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (positive control), เลน 1-4 คือ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการน้อย, 5-8 คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการ และ 9-14 คือ ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการมาก] พบว่ามีเพียงเลนที่ 4 เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม 14 ตัวอย่าง พบ 9 ตัวอย่าง ที่ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และพบ 1 ตัวอย่าง ที่แสดงว่ามีการเจือปนข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, การตรวจวิเคราะห์พืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปรพันธุกรรม. เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. 2548.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ อัญชลี ศรีสุวรรณ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม.2550.

ประศาสตร์ เกื้อมณี, GMOs: ชีวิตที่ถูกดัดแปรพันธุกรรม. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 2548.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 1987. 19:11-15.

Hsu-Yang, L., Lih-Ching C. and Daniel Yang-Chih S. Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by the Polymerase Chain Reaction Method. Journal of Food and Drug Analysis. 2000. 8(3):200-207.

James, C., Global status of Commercialized biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief. 2010. 42.

Rafaat, M.E., Mohamed, F.R. and Klaus D.J., DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. Food Chemistry. 2011. 126(4):1883-1889.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., Melecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989