รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการพัฒนาการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยแนวใหม่ในวัตถุดิบและอาหารแปรรูป

DNA molecule for novel development in quality and safety analysis of raw materials and processed foods

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์[1]

นันทวัน หัตถมาศ[2]

ปาลิตา แปวไธสง[1]

มัลลิกา แก้วดี[1]

[1] ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2] ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2551 ภายใต้โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่และปีนปีที่ 2 ของโครงการ

โครงการขอขอบคุณ Prof. Dr. Eiichi Tamiya, Osaka Univerity, Japan ที่ได้ให้คำปรึกษาด้านเทคนิคในการตรวจสอบด้วยไบโอเซ็นเซอร์ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์อ้างอิง ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์คัด (breeder seed) ขอขอบคุณ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แท้ของธัญพืชต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ ขอขอบคุณ คณบดี คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ตัวอย่างส้มโอและเชื้อ ***Xanthomonas axonopodis pv citri*** ขอขอบคุณ อาจารย์อุดมศักดิ์ เลิศสุชาติวานิช และ รองศาสตราจารย์ ดร. นิพนธ์ ทวีชัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ตัวอย่างเชื้อ ***Xanthomonas axonopodis pv citri***

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีการตรวจคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารรูปแบบใหม่ โดยใช้โมเลกุลดีเอ็นเอเป็นสื่อเน้นวิธีที่ลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ โครงการแบ่งงานเป็น 4 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว การพัฒนาการตรวจสอบบนพื้นฐานทางเคมีไฟฟ้า การพัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงร่วมในการทดสอบ และการวางระบบในการตรวจสอบ โครงการสามารถพัฒนาเทคนิคและชุดสำเร็จรูปสำหรับตรวจการปนของข้าวตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม E176 และ GTS 40-3 ตรวจการปนของ bovine species ตรวจการปนของเชื้อ *Xanthomonas* ใช้ยีน *Xac*1 และการตรวจเพื่อหาการปนของดีเอ็นเอ จากวัตถุดิบถั่วลิสง โดยได้ทดสอบความเฉพาะเจาะจง ความไวของปฏิกิริยาและความสามารถในการทำซ้ำ ปฏิกิริยาอยู่บนพื้นฐานของ LAMP เพิ่มดีเอ็นเอได้ภายใน 40 นาที โดยไม่ต้องพึ่งพาเครื่อง PCR และแสดงผลได้ทั้งในรูปการเรืองแสงและการตรวจบนหลักการไฟฟ้าเคมี ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์บนหลักการไฟฟ้าเคมีได้ทดสอบภาวะที่เหมาะสม และการนำ DNA stick มาใช้งานในภาคปฏิบัติ ทั้งหมดทำให้การตรวจดีเอ็นเอง่าย รวดเร็วและสนองหลักการ point of care ท้ายสุดได้โคลนชิ้นส่วนของยีนเพื่อใช้เป็นอ้างอิงประกอบการวินิจฉัยกับชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นและได้วางและจัดระบบการตรวจสอบรองรับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Novel methods not depending on laboratory facilities were developed for food safety and quality assurance based on DNA detection. Results divided into 4 parts, the development of simple and rapid method for DNA analysis, the development of novel DNA amplification based on loop isothermal DNA amplification, the development of the detection system based on electrochemical biosensor, the development of reference DNA for testing and the establishment of testing system using DNA analysis . Results revealed the successful development of rice cultivar KDML105 DNA detection method, GMOs screening kit (E176 and GTS40-3), bovine species detection kit, *Xantomonas axonopodis* pv citri. detection kit and allergenic molecule of peanut detection kit, all based on LAMP principle which reactions completed within 40 min. Validation of methods based on their sensitivity specificity and reproducibility were also carried out. The test kits required neither themocycler nor standard laboratory facilities hence answering point of care need. Results of the test were displayed on both via fluorescence visualization and via electrochemical measurement. For the development of detection system based on electrochemical biosensor, conditions for Hoechst 33258 administrations had been examined and detection platform of DNA stick was introduced, all facilitating the simpleness and rapidness of the test without using laboratory facilities. Finally clones of genes involved in the test kits as well as the systems for GMOs detection were established. for animal species identification and clone of *sps* gene for rice DNA detection were developed. These could be used as reference DNA and working procedure for the DNA test.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญเรื่อง(Table of Contents)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
1. บทนำ	1
2. เนื้อเรื่อง	
2.1 วัสดุทดลองและวิธีการ (Materials and Methods)	
2.1.1 พัฒนาชุดสำเร็จในการตรวจสอบชนิดของข้าวและชนิดของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ	5
2.1.1.1 การทดสอบความตรงพันธุ์ของข้าว	5
2.1.1.2 การทดสอบภาวะการปนของ GMOs	6
2.1.2 การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว	6
2.1.3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์บนพื้นฐานการนำไฟฟ้าในโมเลกุลในลักษณะดีไวซ์	7
2.1.4 พัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการอ้างอิง	7
2.1.5 สร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงร่างการตรวจสอบต้นแบบที่ประกอบด้วยตัวอย่างเอกสารกำกับขณะดำเนินการวิเคราะห์	7
2.2 ผลการวิจัย	7
2.2.1 พัฒนาชุดสำเร็จในการตรวจสอบชนิดของข้าวและชนิดของรีคอมมิแนนท์ดีเอ็นเอ	7
2.2.1.1 การทดสอบความตรงพันธุ์ของข้าว	7
2.2.1.2 การทดสอบการปนของ GMOs	11
2.2.2 การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียว	16
2.2.3 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์พื้นฐานการนำไฟฟ้าภายในโมเลกุลดีเอ็นเอในลักษณะดีไวซ์	24
2.2.4 การพัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการอ้างอิง	30
2.2.5.การสร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงร่างการตรวจสอบต้นแบบที่ประกอบไปด้วยตัวอย่างเอกสารขณะดำเนินการวิเคราะห์	30
2.3 อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)	33
3. ปัญหาและอุปสรรค	36
3. บรรณานุกรม	37
4. ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	41

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (List of Tables)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
ตารางที่ 1 สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า วัดจากค่า anodic current peak (μA)	13
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ anodic current peak ระหว่างดีอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณด้วยระบบ PCR และ isothermal DNA amplification	26
ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการวัดค่า anodic current peak ของปฏิกิริยาภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่มีปริมาณต่างกันด้วยเทคนิค PCR	27
ตารางที่ 4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลาย Hoechst 33258 ต่อการวัด	28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
ภาพที่ 1 รูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของข้าวต่างพันธุ์ที่จำเพาะต่อไพร์เมอร์ 10 15 และ 17	8
ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอเฉพาะของข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อไพร์เมอร์เฉพาะ A10, A15 และ A17	9
ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้ของโคลนที่ได้จากไพร์เมอร์ A15	10
ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบขึ้นให้เฉพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้จากไพร์เมอร์ A15	10
ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน A15 กับพันธุ์ข้าวชนิดต่างๆ	11
ภาพที่ 6 รูปแบบการเรืองของปฏิกิริยาเมื่อใช้ Hoechst 33258 ความเข้มข้น 10, 20 และ 50 เมื่อได้รับUVความยาวคลื่น 312 nm	12
ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810	14
ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างปริมาณดีเอ็นเอ (log ของความเข้มข้น) และค่า anodic peak (μA) ของการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 และ ระดับปริมาณดีเอ็นเอจริงเมื่อทดสอบโดยการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก	15
ภาพที่ 9 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810	15
ภาพที่ 10 ชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม	16
ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป	17
ภาพที่ 12 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ เป็นแม่แบบ	17
ภาพที่13 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอ จากพืชดัดแปรพันธุกรรม E176 และ พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นรวมทั้งธัญพืชเป็นแม่แบบ	17
ภาพที่14 ชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ bovine species	18
ภาพที่15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป	19
ภาพที่ 16 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เนื้อสัตว์	20
ภาพที่17 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปในรูป limit of detection (LOD) กับผลิตภัณฑ์ที่ทราบปริมาณการปนในรูปเปอร์เซ็นต์	20

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หัวเรื่อง	เลขหน้า
ภาพที่18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป	21
ภาพที่ 19 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ *Xanthomonas axonopodis* pv citri ในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ(จำนวนชุดของดีเอ็นเอ) เป็นแม่แบบ	22
ภาพที่ 20 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เชื้อ *Xanthomonas* ต่างชนิด	22
ภาพที่ 21 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ธัญพืชต่างชนิด	23
ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์การปนของโมเลกุลที่เป็น allergen ของเนื้ออาหารที่มีถั่วลิสงประกอบ และความไวของปฏิกิริยาในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ(จำนวนชุดของดีเอ็นเอ) เป็นแม่แบบ	24
ภาพที่ 23 สัดส่วนเปรียบเทียบ anodic current peak ที่ initial stage และ pulse stage ของ binder กับดีเอ็นเอตัวอย่าง	25
ภาพที่ 24 รูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างกระแสขณะที่ในระบบมีและไม่มีดีเอ็นเอ	26
ภาพที่ 25 โครงสร้างของ DNA stick ที่ชี้ให้เห็นส่วนประกอบของchamber ปฏิกิริยา แผ่นเยื่อพลาสติก และบริเวณบรรจุสารละลาย Hoechst 33258 และ chip	29
ภาพที่ 26 รูปแบบการตรวจวัดด้วย DNA stick การทำปฏิกิริยาเพื่อทดสอบใน stick โครงสร้างของ stick ที่ใช้งาน การบ่มปฏิกิริยา การผสมและคว่ำหลอดเพื่อการตรวจวัดและช่องเสียบ electrode การแสดงผลผ่านหน้าจอ monitor	29
ภาพที่ 27 แสดงรูปแบบการทำงานรวมในการให้บริการตรวจวิเคราะห์และรับรองผล GMOs	31
ภาพที่ 28 แสดงรูปแบบการสุ่มตัวอย่างจาก 2 รูปแบบของตำแหน่งตัวอย่าง	32
ภาพที่ 29 แบบเอกสารที่เกี่ยวข้องในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ และรับรองผลการตรวจ GMOs	33

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviation)

μA	micro ampare
μM	micro Mole
μL	micro Litre
mM	milli Mole
ng	nano gram
Bp	base pair
PCR	Polymerase Chain Reaction
LAMP	loop mediated isothermal amplification
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
CRM	Certified Reference Material

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ (Introduction)

อุตสาหกรรมอาหารนำรายได้เข้าประเทศปีละไม่น้อยกว่า 5 แสนล้านบาท (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2547) คิดเป็น 8% ของ GDP และ 14.47% ของตัวเลขส่งออกรวม ภายใต้ภาวะแข่งขันอย่างรุนแรงของตลาดในปัจจุบันและการค้าเสรีที่จะมีขึ้นในอนาคต นอกจากการแข่งขันในเรื่องราคาแล้ว การแข่งขันในคุณภาพและความปลอดภัยในตัวสินค้าอาหารจัดเป็นดัชนีที่สำคัญ เมื่อรูปแบบและระเบียบควบคุมเกี่ยวกับอาหารเปลี่ยนไป(WHO, 2003) การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยในอาหารเพื่อหาหลักฐานที่เชื่อมโยงทางวิทยาศาสตร์ในการบ่งบอกคุณภาพและความปลอดภัย เพื่อสำรวจและยกระดับคุณภาพของอาหารของไทยไปสู่สากลเป็นเรื่องที่จำเป็นในการผลักดันยุทศาสตร์การแข่งขันเพื่อเป็นครัวของโลก

บทเรียนหลายครั้ง จากกรณีสินค้าอาหารส่งออกของไทย ไม่ว่าจะเป็นกุ้ง ไก่ และสินค้าปศุสัตว์ฯลฯ ต้องเผชิญกับมาตรการคุมเข้มตรวจสารตกค้างและการปนในรูปแบบต่างๆ จากกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (EU) หรือกรณีเคยถูกกล่าวหาเรื่องสารพิษ หรือสารปนเปื้อนในอาหารจากหลายประเทศ ชี้ให้เห็นว่า "ปัญหาคุณภาพ" ยังคงเป็นจุดอ่อนสำคัญของการเป็น "ครัวของโลก" การปฏิรูปคุณภาพและความปลอดภัยกันทั้งระบบเน้นให้ความสำคัญกับมาตรฐานและความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร

ปัญหาที่เกิดขึ้นในทศวรรษที่ผ่านมาทั้งการระบาดของวัวบ้า (BSE) ปัญหาการปน GMOs และการระบาดของไข้หวัดนก ทำให้การพัฒนาตรวจวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์บนพื้นฐานของการตรวจด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอ ได้รับความนิยมและพัฒนาก้าวหน้าไปมากกว่าเทคนิคการตรวจสอบบนพื้นฐานโมเลกุลอื่น (Lockley and Bardsley, 2000) เนื่องจากโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลในอาหารที่มีเสถียรภาพมากกว่า และจะสลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการได้ช้ากว่า (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543)

ที่ผ่านมาการตรวจบนพื้นฐานโมเลกุลดีเอ็นเอนิยมใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส(Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นหลัก ตัวเทคนิคกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเลียนแบบการจำลองตัวของเอนไซม์โพลีเมอเรส หัวใจสำคัญในการพัฒนาเทคนิคนี้อยู่ที่การออกแบบไพรเมอร์ให้เฉพาะเจาะจงกับชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับด้านคุณภาพและความปลอดภัย (Saiki, 1988)

แม้เทคนิค PCR ได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีหลักในการตรวจเพื่อบอกชนิด การตรวจการปนของพืชดัดแปรพันธุกรรม การตรวจการปนของโมเลกุลที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ การตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์ และความแท้ของสายพันธุ์ อย่างไรก็ดี เทคนิค PCR ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง ใช้บุคลากรที่ชำนาญการและเครื่องมือราคาแพงซึ่งเป็นข้อจำกัดในการขยายผลในเชิงปฏิบัติ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการตรวจในรูปแบบ on site monitoring หรือตรวจตามหลักการ point of care ที่ต้องดำเนินการในโรงงาน หรือในแหล่งผลิตวัตถุดิบ นอกจากนี้ยังพบปัญหาที่การพัฒนาเทคนิค

ในการตรวจวิเคราะห์อาหารของไทยที่มีอยู่น้อย ดังนั้นการพัฒนาให้การตรวจวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องพึ่งห้องปฏิบัติการ หรือพัฒนาให้การตรวจสามารถทำได้ในรูปชุดสำเร็จที่ใช้งานได้ง่ายมีความจำเป็นและจะเป็นประโยชน์ในการควบคุม กำกับ ดูแลและสอดคล้องกับหลักการ point of care ที่เป็นที่ยอมรับในงานสุขอนามัย(Chaumpluk, 2003)

การเปรียบเทียบนวัตกรรมทางเทคโนโลยีในปัจจุบันทั้งในรูปการเพิ่มปริมาณโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลัก (Compton, 1991) ซึ่งมีทั้งบนพื้นฐานการจำลองตัวเอง(Guatelli *et al.*, 1990) การใช้ปฏิกิริยาแทนที่ขณะสังเคราะห์ดีเอ็นเอ(Walker, 1992) การเพิ่มอุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วง (loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Notomi *et al.*, 2000) การใช้สัญญาณโมเลกุลสายสั้นๆ ในรูป branched DNA invader (Lyamichev *et al.*, 1999) และในระบบ rolling cycle (Lizardi *et al.*, 1998) ได้ข้อสรุปว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำในระบบห่วงหรือ LAMP มีข้อเด่นกว่าเทคนิคอื่น โดยเฉพาะการที่ขั้นตอนของปฏิกริยาดำเนินไปโดยใช้ไพรเมอร์มากถึง 2 คู่ สัมพันธ์กับ 6 บริเวณ และเกิดขึ้นต่อเนื่องโดยไม่มีจำนวนรอบ ทำให้ตัวปฏิกิริยามีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูงกว่า PCR ถึง 1,000 เท่า และที่สำคัญการที่ขั้นตอนของปฏิกริยาดำเนินไปในอุณหภูมิเดียวทำให้ไม่ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพงเช่น thermocycler จึงช่วยให้การตรวจวิเคราะห์เป็นไปได้อย่างแม่นยำแม้ในสถานที่ที่ขาดความพร้อมทางเครื่องมือและบุคลากร (Notomi *et al.*, 2000)

ที่ผ่านมามีผู้นำเทคนิคไปใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของแบคทีเรีย (Horisaka *et al.*, 2004) ไวรัสและรา(Parida, 2004) ซึ่งโดยหลักการมีหัวใจสำคัญอยู่ที่การออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 2-3 คู่ให้เหมาะสมกับบริเวณลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบโดยให้มีอุณหภูมิ annealingใกล้กัน

เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ใหม่มากและอยู่ระหว่างการเริ่มต้นพัฒนางานประยุกต์ การบุกเบิกต่อยอดเพื่อพัฒนาการตรวจวิเคราะห์อาหาร นอกจากจะช่วยให้การตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยทำได้แม้ในภาวะความไม่พร้อมทางเครื่องมือและบุคลากรชำนาญการ ซึ่งเหมาะกับในประเทศไทยแล้วยังช่วยสร้างโอกาสในการเป็นผู้นำที่ใช้นวัตกรรมนี้ในการตรวจวิเคราะห์อาหารอย่างกว้างขวางได้

ในการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจวิเคราะห์นอกจากต้องอาศัยกลไกการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว การตรวจสอบผลจัดเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ ในระยะหลังการค้นพบคุณสมบัติที่สำคัญในการนำไฟฟ้าภายในโมเลกุล และหลักการจับตัวหรือส่งสัญญาณจากตัวตรวจจับไปยังโมเลกุลเป้าหมายสามารถนำมาใช้ตรวจสอบโมเลกุลดีเอ็นเอในอาหารได้ โดยหลักการจะอาศัยความจำเพาะของโมเลกุลดีเอ็นเอร่วมกับความสามารถในการจับตัวของ binder ในลักษณะ electronic interface ทำให้เกิดสัญญาณจากโมเลกุลดีเอ็นเอในรูปการเคลื่อนตัวของอิเล็คตรอน โดย

จะตรวจสอบจำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอในรูปสัญญาณผ่านการไหลของกระแสไฟฟ้า ด้วยหลักการ redox current ด้วยตัวตรวจวัดแบบง่ายๆ จากการคำนวณการตรวจสอบด้วยวิธีนี้แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำสูงแม้จะมีปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบเพียงน้อยนิดก็ตาม(Mascini, 2001)

หลักการ electro chemical detection นี้สามารถนำมาใช้ร่วมกันกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเทคนิคทั้ง PCR และ LAMP จึงเหมาะสมในการบูรณาการร่วมกับเทคนิคทั้งสองในการตรวจสอบทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สำหรับประเทศไทยพบว่าจุดอ่อนที่สำคัญในเรื่องการทดสอบคุณภาพและความปลอดภัยในอาหารอยู่ที่ขั้นตอนการเอาใจใส่ในการตรวจสอบ การขาดการพัฒนาวิธีตรวจสอบที่เหมาะสมที่ใช้ง่ายในจุดที่ต้องการตรวจวัดจริงตามหลัก point of care ความจำเป็นในการแก้ปัญหาอย่างเร่งด่วนโดยพิจารณาตามความสำคัญของสินค้าในตลาด การเปลี่ยนแปลงของระเบียบและการเข้มงวดกับวิธีการตรวจสอบที่เป็นประเด็นปัญหาสำคัญได้แก่ การปนพันธุ์ข้าวระหว่างข้าวหอมมะลิและข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 หรือพันธุ์อื่น (มูลค่าตลาด 23,000 ล้านบาท) การปนด้วยวัตถุดิบดัดแปรพันธุกรรมในอุตสาหกรรมแปรรูปที่ใช้ถั่วเหลือง ข้าวโพด และในผลไม้บางชนิด (มูลค่าตลาด 16,000 ล้านบาท) การปนของชนิดของเนื้อที่มีโอกาสเป็นวัวบ้า (มูลค่าตลาด 3,000 ล้านบาท)(กรมส่งเสริมการส่งออก, 2547)

การนำจุดแข็งของความรู้ทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะความรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอมาบูรณาการร่วมกันกับนวัตกรรมทางเทคโนโลยีทั้งในกรณีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว การนำหลักการ electrochemical DNA detection technology และเสริมด้วยการสังเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิง จะช่วยแก้ปัญหาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศ ช่วยให้เกิดการบุกเบิกทางเทคโนโลยี เสริมการประยุกต์ในการตรวจอาหารด้วยดีเอ็นเอที่ยังมีอยู่น้อยในขณะนี้ ให้เป็นองค์ความรู้ที่สามารถต่อยอดไปสู่การตรวจด้วยดีเอ็นเอในรายการใหม่ๆ เพื่อประกันคุณภาพและความปลอดภัยและแสดงผลเหล่านั้นในรูปแบบสัญลักษณ์เพื่อเสริมภาพลักษณ์ในแง่บวกให้กับตัวสินค้าของประเทศและศักยภาพในการแข่งขันในทุกๆ ด้านต่อไปในอนาคต

ในปัจจุบันวิธีการทดสอบที่พัฒนาบนหลักการตรวจโมเลกุลดีเอ็นเอที่ประสบความสำเร็จในรูปชุดสำเร็จรูปมักอยู่บนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCRและตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรพอเรซิส เพียงประการเดียว ทำให้เกิดข้อจำกัด ไม่ตอบสนองหลักการ paint of care ขณะที่การพัฒนาชุดสำเร็จเพื่อการประยุกต์ บนพื้นฐานการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวร่วมกับหลักการทาง electrochemical biosensor ยังไม่มีการดำเนินการมาก่อน ดังนั้นแม้เพียงพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูปที่สามารถนำไปใช้งานในภาคสนามได้ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมกำกับทันที โดยไม่นับรวมถึงการพัฒนาโดยหลักการใหม่ๆ เช่น LAMP หรือ electrochemical detection ในรูปแบบ DNA stick ที่มี electrode เป็นตัวตรวจจับ ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องพึ่งเครื่องมือราคาแพง เหล่านี้มี

ศักยภาพในการดำเนินการในรูปสิทธิบัตรและจัดทำให้อยู่ในรูปอย่างง่ายเพื่อใช้งานนอกสถานที่ตามหลักการ point of care ได้

การพัฒนาการวิเคราะห์แนวใหม่นี้จึงช่วยให้การตรวจรับรองมีประสิทธิภาพซึ่งเชื่อมโยงทางอ้อมไปสู่ภาพลักษณ์และความเชื่อมั่นในตัวสินค้าที่มีมูลค่าส่งออกรวมไม่น้อยกว่า 40,000 ล้านบาท และช่วยให้เกิดการต่อยอดทางเทคโนโลยีแนวใหม่โดยเฉพาะการใช้ electrochemical detection มาประยุกต์ร่วมกับหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งในระบบ bead PCR LAMP และการประยุกต์ใช้โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจจับ เพื่อช่วยให้การวิเคราะห์ออกมาอยู่ในรูปชุดทดสอบอย่างง่ายที่ต่างไปจากที่มีอยู่ในปัจจุบัน ไม่มีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก ให้ผลการตรวจไว และนำไปใช้นอกสถานที่ได้เหล่านี้เหมาะสมกับภาวะของประเทศไทยและภาวะความจำเป็นที่จะต้องตรวจรับรองคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารตามหลัก point of care ที่ระบุไว้ในตอนต้น

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. พัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจรับรองคุณภาพอย่างง่ายแบบคล่องตัวในรูปแบบชุดสำเร็จ โดยพัฒนาต่อยอดจากเทคโนโลยีและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในปัจจุบันและเสริมการพัฒนามิติใหม่ในการตรวจบนพื้นฐานของโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถขยายผลไปใช้งานได้เร็วเพื่อทดสอบ

- ความตรงพันธุ์การปลอมปนหรือความแท้ของสายพันธุ์ข้าว
- ภาวะการปนและปลอด GMOs
- การปนของเชื้อและดีเอ็นเอจากโคและกระบือ

เน้น การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและมีประสิทธิภาพ การเลือกใช้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์และมาร์คเกอร์เพื่อการออกแบบคู่ไพรเมอร์และการประกอบปฏิกิริยาในการวิเคราะห์เบื้องต้น

2.พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจรับรองคุณภาพและความปลอดภัยโดยบูรณาการนวัตกรรมจากการเพิ่มปริมาณโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวร่วมกับหลักการตรวจสอบด้วยเทคนิค electro-chemical detection เน้น การปน การปลอมแปลง ที่พร้อมจะนำไปใช้ในภาคสนาม ซึ่งยังไม่มีการพัฒนามาก่อน

3.สร้างโมเลกุลในรูปแบบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อการนำไปใช้ร่วมในการตรวจสอบทดแทนการใช้ Certified Reference Material, CRM ที่มีราคาแพง

4. สร้างระบบการตรวจสอบที่เป็นหลักประกัน ผ่านการตรวจสอบและรับรองผลิตภัณฑ์ที่มีสัญลักษณ์เชื่อมโยงจากระบบที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ เพื่อยกระดับความเชื่อมั่นแก่ตัวสินค้าของประเทศ

การวิจัยในครั้งนี้ครอบคลุม การพัฒนาชุดสำเร็จในการตรวจสอบชนิดของข้าวและชนิดของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์บนพื้นฐานการนำไฟฟ้าภายในมวล

โมเลกุลในลักษณะดีไวซ์ และการสร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงร่างการตรวจสอบอย่างเป็นแบบแผน

สำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลอ้างอิงในรูปดีเอ็นเอทดแทนการใช้ CRM ซึ่งมีราคาแพงซึ่งอยู่ในแผนการดำเนินงานในครั้งนี้ได้พัฒนาเสร็จสิ้นในปีที่ผ่านมา และมีการพัฒนาเพิ่มเฉพาะส่วนที่เกี่ยวข้องกับชุดสำเร็จ โดยการพัฒนาทั้งหมดจะดำเนินการในรูประบบตรวจสอบร่วม (integration) ที่สอดคล้องกัน

เนื้อเรื่อง (Main Body)

วัสดุทดลองและวิธีการ (Materials and Methods)

1. **พัฒนาชุดสำเร็จในการตรวจสอบชนิดของข้าวและชนิดของรีคอมมิแนนท์ดีเอ็นเอ**

1.1 การทดสอบความตรงพันธุ์ของข้าว

ในปีที่ 2 การพัฒนาชุดสำเร็จ เน้นการประกอบชุดทดสอบสำเร็จรูป ทดสอบปฏิกิริยาและทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยใช้ตัวอย่างข้าวพันธุ์แท้ในรูป breeder seed สายพันธุ์หอมมะลิจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สายพันธุ์ปทุมธานี 1 จากสำนักงานเกษตรหลักของกรมวิชาการเกษตร สกัดดีเอ็นเอโดยชุดสำเร็จบนพื้นฐานของหลักการ boiling รวมกับ phenol extraction โดยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นตามแผนการดำเนินการในปี 2550 เป็นหลัก

การตรวจการปนของพันธุ์ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมาร์คเกอร์หลักโดยใช้ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และปทุมธานี 1 เปรียบเทียบอ้างอิง

ทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การตรวจสอบปฏิกิริยา (reaction) และทดสอบปฏิกิริยาผ่านมาตรฐาน 3 รูปแบบหลักได้แก่ ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา (specificity) ความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) และความสามารถในการทำซ้ำ (specificity)

1.2 การทดสอบภาวะการปนของ GMOs

ใช้ตัวอย่างข้าวโพดและถั่วเหลืองปลอดGMOsจากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยวิธี CTAB (Murray and Thomson, 1980) เพื่อใช้เป็นมาตรฐาน ตัวอย่างพืชร่วมวิเคราะห์ได้แก่ ข้าวโพด ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าวด้วยสารละลายด่างร่วมกับ detergent ที่อุณหภูมิ 68°C จากนั้นจับด้วยเรซิ่นสังเคราะห์ (Spoth and Strauss, 1998) เปรียบเทียบผลโดยใช้ ITS4 และITS1 เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอว่าไม่มีตัวยับยั้ง PCR ดีเอ็นเอควบคุมได้จากการสกัด Plasmid ด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al*, 1989) ส่วนการพัฒนาชุดทดสอบต่อยอดจากวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำโดยการใช้การจับตัวของโมเลกุลระหว่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ ได้กับสารเคมีในกลุ่มดีเอ็นเอไบน์เดอร์ (DNA binder) ที่ชื่อHoechst 33258 ในการชักนำให้เกิดสัญญาณในรูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า พัฒนาต่อยอดชุดทดสอบ 35S screening ทดสอบปฏิกิริยา และทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นผ่านปฏิกิริยา 3 รูปแบบหลักได้แก่ การทดสอบความไวของปฏิกิริยา การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ และการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา

2.การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว

พัฒนาชุดสำเร็จรูปบนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ผสม ที่ประกอบด้วย 10 pmole each ของ F3B3 และ 40 pmole ของ FIP และ BIP โดยชุดตรวจการปนของ GMOs ไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ 35S promoter element ชุดตรวจสอบการปนของ bovine species อาศัยความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อบริเวณยีน *Pth* (bovine parathyroid hormone) ยีน และชุดตรวจสอบการติดเชื้อของ *Xanthomonas axonopodis pv citri* ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *rpf* ยีน

ไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบด้วยโปรแกรม Primer Explorer (Fujitsu, Japan) และในปฏิกิริยาประกอบด้วย 40 mM Tris pH 8.8 20 mM KCl 16mM $MgSO_4$ 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% Tween 20 1.6 M Betaine 2.8 mM dNTP และ 8 U. *Bst* DNA polymerase ตามที่ระบุไว้โดย Notomi *et al*.,(2000)

ทดสอบปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา ความสามารถในการทำซ้ำและความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบ และประเมินผล สำหรับชุดดีเอ็นเอควบคุมและตัวอย่างได้จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์บนพื้นฐานการนำไฟฟ้าในโมเลกุลในลักษณะดีไวซ์

พัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์บนพื้นฐานการตรวจสัญญาณทางเคมีไฟฟ้าโดยตรงจากการเปลี่ยนสัญญาณทางเคมีภายในโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยโมเลกุล DNA binder (Kobayashi *et al.*, 2004) เน้นการทำให้อยู่ในรูปสำเร็จรูปมากขึ้น

ตรวจสอบประเมินผลการพัฒนาวิธีการตรวจโดยตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมในระหว่างช่วง 20-50 μM ของ DNA binder ในสารละลาย PBS ดำเนินการด้วย carbon screen printed electrode พื้นผิว 2.63 ตารางมิลลิเมตร โดยใช้ $AgCl_2$ เป็น pseudo reference electrode

ตรวจวัดสัญญาณด้วยหลักการ linear sweep voltrammetry (LSV) ด้วย DNA Chip Tester (Biodevice Technology, Japan)

ทำการทดลอง 3 ครั้งต่อหน่วยทดลอง จากนั้นใช้ค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนเป็นข้อมูลในการตรวจวัด

4. พัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการอ้างอิง

ได้ดำเนินการตามแผนเสร็จสิ้นในปีที่ผ่านมาทั้งหมด โดยดำเนินการเฉพาะในส่วนเพิ่มเติมนอกแผนในปีงบประมาณนี้เท่านั้น

5.สร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงร่างการตรวจสอบต้นแบบที่ประกอบด้วยตัวอย่างเอกสารกำกับขณะดำเนินการวิเคราะห์

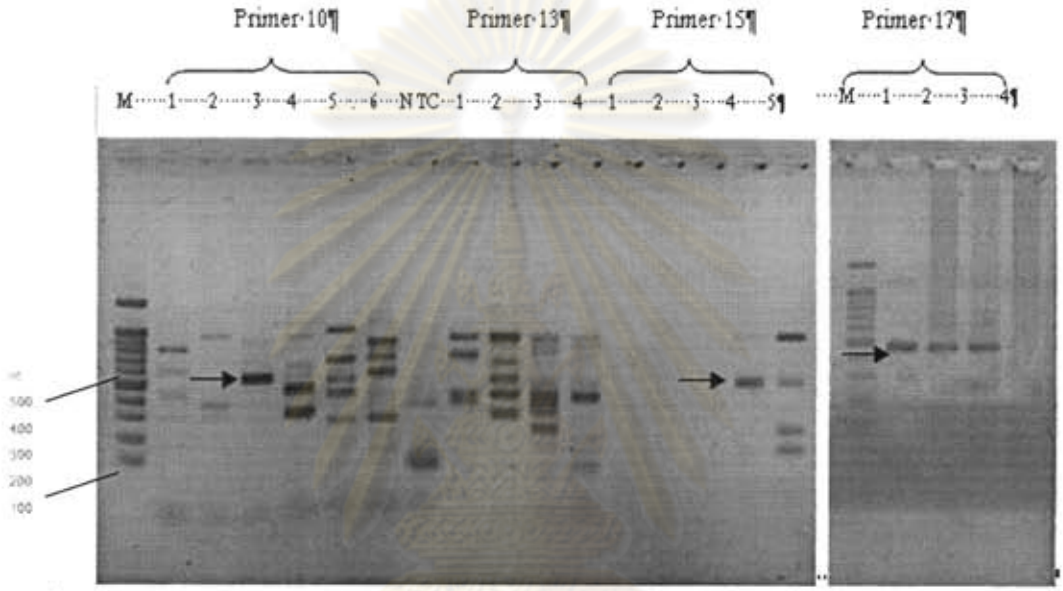
ออกแบบแบบฟอร์มเอกสารและระบบการทำงานเพื่อการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับหลักการ ISO17025 เน้นการนำหลักการ traceabilily ที่สามารถสอบทวนกลับได้ มาใช้ออกแบบแบบฟอร์มแสดงผลการวิเคราะห์ เพื่อใช้ประกอบกับระบบในการออกใบแสดงผล

ผลการวิจัย

1. **พัฒนาชุดสำเร็จในการตรวจสอบชนิดของข้าวและชนิดของรีคอมมิแนนท์ดีเอ็นเอ**

1.1 การทดสอบความตรงพันธุ์ของข้าว

ได้ดำเนินการทดสอบชนิดของพันธุ์ข้าวโดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ A10 A13 A15 และ A17 ซึ่งพัฒนาขึ้นบนพื้นฐานการตรวจจำแนกพันธุ์โดยโคลนชิ้นส่วนจำเพาะของดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ชัดเจน โดยไพร์เมอร์ A10 ให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอขนาด 550 นิวคลิโอไทด์ ไพร์เมอร์ A15 ให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอขนาด 530 นิวคลิโอไทด์และ ไพร์เมอร์ A17 ให้ความต่างของแถบดีเอ็นเอขนาด 450 นิวคลิโอไทด์(แถบจาง)โดยได้ดำเนินการโคลนชิ้นยีน 3 ชิ้นได้แก่ ชิ้นที่จำเพาะต่อไพร์เมอร์ A10 15 และ 17 (ภาพที่ 1 ศรชี้)



ภาพที่ 1 รูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของข้าวต่างพันธุ์ที่จำเพาะต่อไพร์เมอร์ 10 15 และ 17 ศรชี้แสดงความต่างของแถบดีเอ็นเอที่นำไปโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ หมายเลข 1-5 เป็นพันธุ์ข้าว มะลิดำ มะลิแดง โสมาลี มะลิ105 และปทุมธานี 1 ตามลำดับ หมายเลข M เป็นดีเอ็นเออ้างอิงขนาด100 base pair ladder หมายเลข 6เป็นข้าวพันธุ์

ผลการดำเนินการผ่านการโคลนด้วนระบบ TA cloning ได้โคลนที่จำเพาะ อย่างละ 5 โคลน เป็นตัวแทน โคลนดังกล่าว นำไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยวิธี dideoxy chain termination ได้ผลสรุปของลำดับนิวคลิโอไทด์จากทั้ง 15 โคลน เป็นดังภาพที่ 2

เนื่องจากโคลนที่ได้อยู่บนพื้นฐานของไพร์เมอร์ที่ต่างกัน การทดสอบโดยการนำลำดับนิวคลิโอไทด์ไป blast ทำให้ทราบว่าโคลนที่ได้จากไพร์เมอร์ แต่ละชนิดมีความเฉพาะที่ต่างกัน โคลนของไพร์เมอร์ 10 ที่ให้ความเฉพาะต่อพันธุ์ข้าวของกัมพูชานั้นเป็นลำดับนิวคลิโอไทด์ที่อาจเกี่ยวข้องกับ SINE 9 8 transposon และ MITE 6 MITE 7 transposon โคลนของไพร์เมอร์ 15 ที่เฉพาะต่อพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 เป็นลำดับนิวคลิโอไทด์ที่อาจเกี่ยวข้องกับ short interspersing element ที่สามารถพบในพืชอื่นด้วย (Arabidopsis) และโคลนนี้สำหรับในข้าว

ชิ้นดีเอ็นเอนี้มีความใหม่ ไม่มีการจำแนกรายละเอียดมาก่อน (ภาพที่ 3) ขณะที่โคลนของไพร์เมอร์ 17 เฉพาะต่อพันธุ์ข้าวหลายพันธุ์ เป็นลำดับนิวคลิโอไทด์ที่อาจเกี่ยวข้องกับทรานโพซอน

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอเฉพาะของข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อไพร์เมอร์เฉพาะ A10 (บน) A15 (กลาง) และ A17 (ล่าง)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ ที่ได้ไปออกแบบไพร์เมอร์ด้วยโปรแกรม primer explorer จะได้ไพร์เมอร์ 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยไพร์เมอร์เฉพาะต่อบริเวณดีเอ็นเอ 6 บริเวณ การทดสอบเบื้องต้นพบว่าไพร์เมอร์ A15 สำหรับชุดการตรวจข้าวหอมมะลิ 105 จะตอบสนองต่อการเพิ่มปริมาณมากสุด จึงได้สังเคราะห์ไพร์เมอร์และทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะไพร์เมอร์นี้เท่านั้น ไพร์เมอร์ดังกล่าวไม่ทำปฏิกิริยากับข้าวหอมมะลิดั้งเดิมที่เก็บรักษาพันธุ์โดยข้าวบ้านเป็นระยะเวลานานซึ่งคาดว่าจะต่างไปจากข้าวหอมมะลิ 105 ที่แพร่หลายในปัจจุบัน

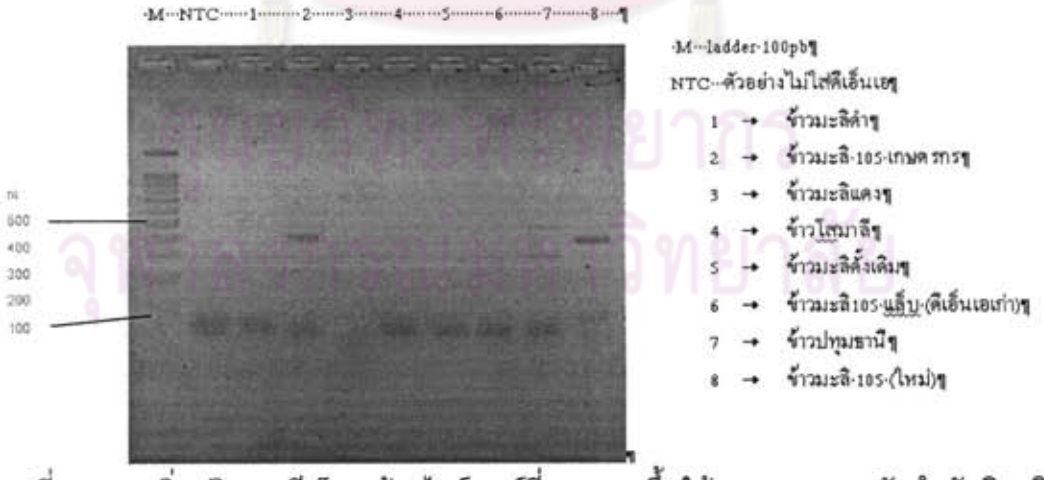
การดำเนินการโดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูกโซ่พอลิเมอร์เลส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบขึ้นให้ความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างข้าวพันธุ์ หอมมะลิ 105 และปทุมธานี 1(ภาพที่ 4) ไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับข้าวพันธุ์อื่น รวมถึงข้าวหอมมะลิ

ดั้งเดิมที่คาดว่าต่างไปจากพันธุ์หอมมะลิ 105 โดยแถบดีเอ็นเอเฉพาะนี้มีขนาดประมาณ 390-400 นิวคลิโอไทด์ การเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดที่ต่างกันช่วยให้การนำหลักการทางเคมีไฟฟ้ามาปรับประยุกต์ใช้สามารถทำได้ และช่วยตอบคำถามการตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพ อย่างไรก็ดีการดำเนินการดังกล่าวจะอยู่ในรูป PCR ที่ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการ ผลการดำเนินการดังกล่าวจะนำไปขยายสู่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Lin
AM909721.1	Cloning vector pFridcat2	183	183	100%	1e-43	100%	
AM491158.1	Enelx arcuatus microsatellite DNA, locus EA758, allele 1-758	183	183	100%	1e-43	100%	
EU874231.1	Burkholderia cenocepacia strain K56-2 hypothetical protein (Bck_01	183	183	100%	1e-43	100%	
FJ477116.1	Reporter vector p6851, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EF136864.1	Escherichia coli K12 lac operon, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
AB013921.2	Cloning vector pHS145 DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
FJ471021.1	Uncultured bacterium clone F_S_03_30_16S ribosomal RNA gene, pa	183	183	100%	1e-43	100%	
AB473551.1	Expression vector pZT90 DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
CU928158.2	Escherichia coli str. IAI1 chromosome, complete genome	183	183	100%	1e-43	100%	
CU928161.2	Escherichia coli str. 55989 chromosome, complete genome	183	183	100%	1e-43	100%	
AB472846.1	Hosa transformation vector pPIG1HGC DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
AB472845.1	Hosa transformation vector pPIG1HCG DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
AB472844.1	Hosa transformation vector pPIG1HG DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU919424.1	Himari-delivery and mutagenesis vector phBurk3, complete sequer	183	183	100%	1e-43	100%	
EU919423.1	Himari-delivery and mutagenesis vector phBurk3, complete sequer	183	183	100%	1e-43	100%	
AB303070.1	Gene silencing vector pBlerd-1 DNA, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU834546.1	Cloning vector pBGT1, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668536.1	Arabidopsis lyrata clone SINE9 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668533.1	Arabidopsis lyrata clone SINE8 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668532.1	Arabidopsis lyrata clone MITE7 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668531.1	Arabidopsis lyrata clone MITE6 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668522.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy21 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668521.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy20 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU668519.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy19 transposon-insertion display band	183	183	100%	1e-43	100%	
EU647236.1	Shuttle vector pUCG18, complete genome	183	183	100%	1e-43	100%	
EU648823.1	Cloning vector pMO117, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU648819.1	Cloning vector pMO131, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU648817.1	Cloning vector pMO117, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU648816.1	Cloning vector pMO113, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU649778.1	Shuttle vector pMK3, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU649778.1	Shuttle vector pMK4, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU641448.1	Gene silencing vector pJRTCLCrVA.009, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
EU641447.1	Gene silencing vector pJRTCLCrVA.008, complete sequence	183	183	100%	1e-43	100%	
AC202061.1	Solanum lycopersicum chromosome 11 clone C11SLM005JK14, cor	183	183	100%	1e-43	100%	
AC202058.1	Solanum lycopersicum chromosome 11 clone C11HBa0249B07, com	183	183	100%	1e-43	100%	
AC212431.2	Solanum lycopersicum chromosome 11 clone C11HBa0034I23, com	183	183	100%	1e-43	100%	
EU520539.1	Chloroplast transformation vector pL3-PpsbA-CT1, complete seque	183	183	100%	1e-43	100%	

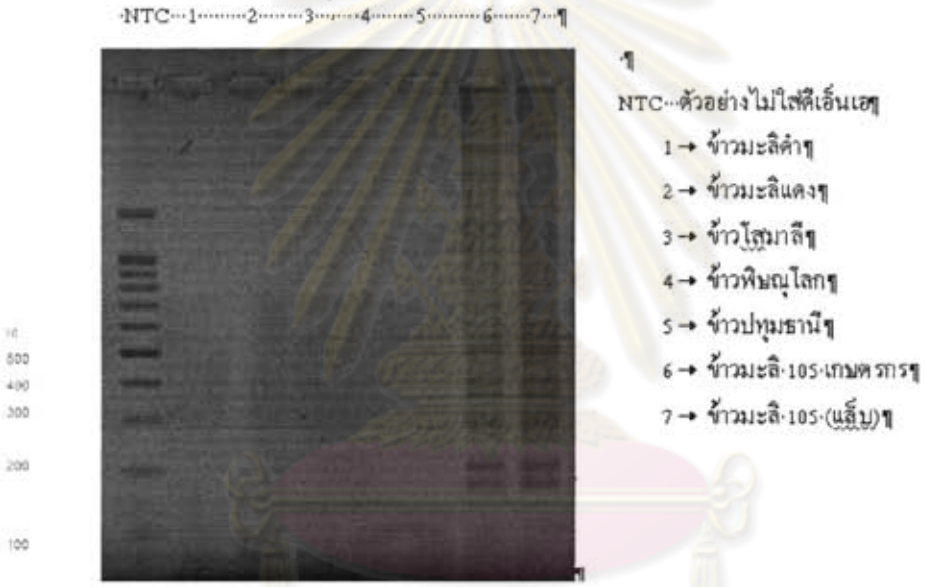
ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้ของโคลนที่ได้จากไพร์เมอร์ A15 โดยวิธีการ Blastn แถบแสดงผลการค้นหาที่สอดคล้องกับ Arabidopsis



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบขึ้นให้เฉพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้จากไพร์เมอร์ A15 เลน 1-8 แสดงพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์

นอกจากการเพิ่มปริมาณแบบลูกโซ่พอลิเมอร์เลสแล้ว ยังได้พัฒนาระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวให้จำเพาะต่อยีนดังกล่าว

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวต่างสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 64°C พบว่าเฉพาะข้าวหอมมะลิ 105 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาดเป็นจำนวนผลคูณของดีเอ็นเอขนาด 180และ 220 นิวคลิโอไทด์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบ (ภาพที่ 5) ความสำเร็จในการทดสอบด้วยระบบนี้มีผลดีต่อการขยายไปสู่ชุดสำเร็จรูปที่สามารถตรวจการปนของข้าวในภาคสนามได้โดยไม่ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการ ผลการดำเนินการดังกล่าวในขั้นต้นจะนำไปขยายสู่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน A15 กับพันธุ์ข้าวชนิดต่างๆ เลนซ้ายสุดเป็นดีเอ็นเอมาร์คเกอร์แลดเดอร์ขนาด 100 นิวคลิโอไทด์ เลน ntc และเลน 1-7 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์ต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การทดสอบการปนของ GMOs

ผลการดำเนินการในปีแรกได้พัฒนาวิธีการเพื่อสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายและวิธีการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 โดยใช้ปริมาณของยีน 35S ไพรเมอร์และ Cryl a/b วิธีสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายจากใบมะละกอและวิธีการตรวจสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสใบจุดวงแหวนของมะละกอ (PRSV) และวิธีการตรวจสอบข้าวดัดแปรพันธุกรรม (LL Rice) เป็นหลัก ซึ่งส่วนหนึ่งได้ครอบคลุมและเป็นไปตามแผนของปีที่2 ดังนั้นการ

ดำเนินการในปีที่ 2 นี้จึงได้นำโมเลกุลของ Hoechst 33258 มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการสำเร็จรูปให้สามารถแสดงผลการตรวจซึ่งจะทำให้ได้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้งานได้ง่ายขึ้น โดยแบ่งผลงานเป็น 2 ลักษณะได้แก่

- การใช้ Hoechst 33258 เป็นตัวสื่อสัญญาณการเรืองแสง และ
- การใช้ Hoechst 33258 เป็นตัวสื่อสัญญาณทางไฟฟ้า

การทดสอบการใช้ Hoechst 33258 ชักนำสัญญาณในรูปการเรืองแสงของปฏิกิริยาโดยการแปรผันความเข้มข้นของ Hoechst 33258 5 ระดับ ได้แก่..1 10 20 50 100. พบว่าที่ระดับความเข้มข้น..10 μM สามารถให้ผลเรืองแสงโดยที่ความเข้มข้นของ Hoechst 33258 จะไม่มีผลรบกวนการทำงานของปฏิกิริยาโดยเฉพาะสมดุลระหว่าง Mg^{2+}ในระบบ และการทำงานของเอนไซม์ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตามปกติและที่ความเข้มข้นเดียวกันยังสามารถชักนำให้เกิดการเรืองแสงของปฏิกิริยาได้มากพอ (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 รูปแบบการเรืองของปฏิกิริยาเมื่อใช้ Hoechst 33258 ความเข้มข้น 10 (ก) 20 (ข) และ 50 μM (ค) ตามลำดับ เมื่อได้รับUVความยาวคลื่น 312 nm - แสดงชุดควบคุมลบ

ความเข้มข้นของ Hoechst 33258 ดังกล่าวจึงเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ในการประกอบปฏิกิริยาสำเร็จรูป

สำหรับการทดสอบโดยใช้ Hoechst 33258 ชักนำสัญญาณในรูปการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า วัดจากค่า anodic current peak (μA) ภายหลังการจ่ายแรงเคลื่อนไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง ครั้งละ 1 mV บน carbon screened print electrode area 2.64 mm^2 โดยแปรผันความเข้มข้นของ Hoechst 33258 4 ระดับ คือ 30 40 50 และ 60 μM พบว่าได้ผลเป็นดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัญญาณการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า วัดจากค่า anodic current peak (μA)

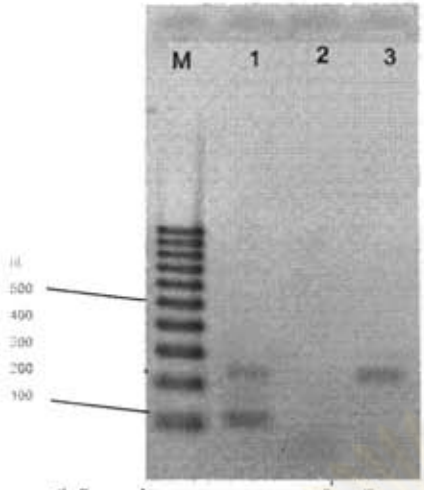
	ค่า anodic peak (μA, ±SD)				
ความเข้มข้นของ	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น(copies)				
Hoechst (μM)	0	10^2	10^4	10^6	(I^{10e6} / I_0)
30	1.98(0.07)	1.65(0.07)	1.54(0.06)	1.50(0.05)	0.757
40	2.21(0.10)	1.85(0.08)	1.35(0.07)	0.81(0.10)	0.366
50	2.35(0.10)	1.96(0.12)	1.65(0.10)	1.24(0.11)	0.527
60	2.54(0.05)	2.10(0.08)	1.76(0.11)	1.42(0.09)	0.559

จากตาราง ค่า anodic peak (μA) แปรผันจาก 0.81-2.54 μA โดยหลักการค่า anodic peak แปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอในระบบ ดังนั้นหากมีดีเอ็นเอมาก ค่า anodic peak ก็จะลดต่ำลงมากตาม ในทางปฏิบัติจึงมุ่งวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า anodic peak ซึ่งสะท้อนประสิทธิภาพในการตรวจวัด จากสัดส่วนการเปลี่ยนไปของสัญญาณจริง ตัวเลขดังกล่าวแสดงความกว้างของช่วงในการวัด ดังนั้นค่า I^{10e6} / I_0 จึงแสดงความกว้างของช่วงในการวัด ค่าที่ออกมาน้อยแสดงว่าช่วงกว้างของหน้าต่างของการวัดดีมาก

จากผลการตรวจวัดพบว่าความเข้มข้นของ Hoechst 33258 ที่ระดับ 40 μM ให้ช่วงต่างการตรวจที่กว้างสุด โดยมีค่า I^{10e6} / I_0 ต่ำเพียง 0.366 ต่ำกว่าค่าที่พบอื่นซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ประกอบรูปแบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการทางเคมีไฟฟ้าที่จะดำเนินการเผยแพร่ใช้งานในภาคปฏิบัติ

ทั้งการแสดงผลด้วยหลักการเรืองแสงและการแสดงผลด้วยหลักการตรวจวัดเคมีไฟฟ้าเมื่อนำมาต่อยอดประกอบกับชุดสำเร็จรูปเพื่อการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 การตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและการตรวจข้าวดัดแปรพันธุกรรม (LL rice) ที่ได้ดำเนินการแล้วจะทำให้การตรวจวิเคราะห์ผลทำได้รวดเร็วและลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผ่านเทคนิค gel electrophoresis ลงได้เนื่องจากทั้ง 2 กระบวนการตรวจใช้เวลาในการตรวจเพียง 10-15 วินาทีเท่านั้น -ขณะที่การดำเนินการผ่านเทคนิค gel electrophoresis ต้องใช้เวลาเพิ่มอีกอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

การประเมินประสิทธิภาพในการทดสอบขั้นต้นเมื่อใช้รูปแบบการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON 810 เป็นหลักร่วมกับหลักการทางเคมีไฟฟ้าบนอิเล็กโทรดเดียวกันกับที่ระบบที่ใช้ในตอนต้น พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างให้รูปแบบมาตรฐานและให้ผลการแยกด้วยสนามไฟฟ้าเป็นดังภาพที่ (7)

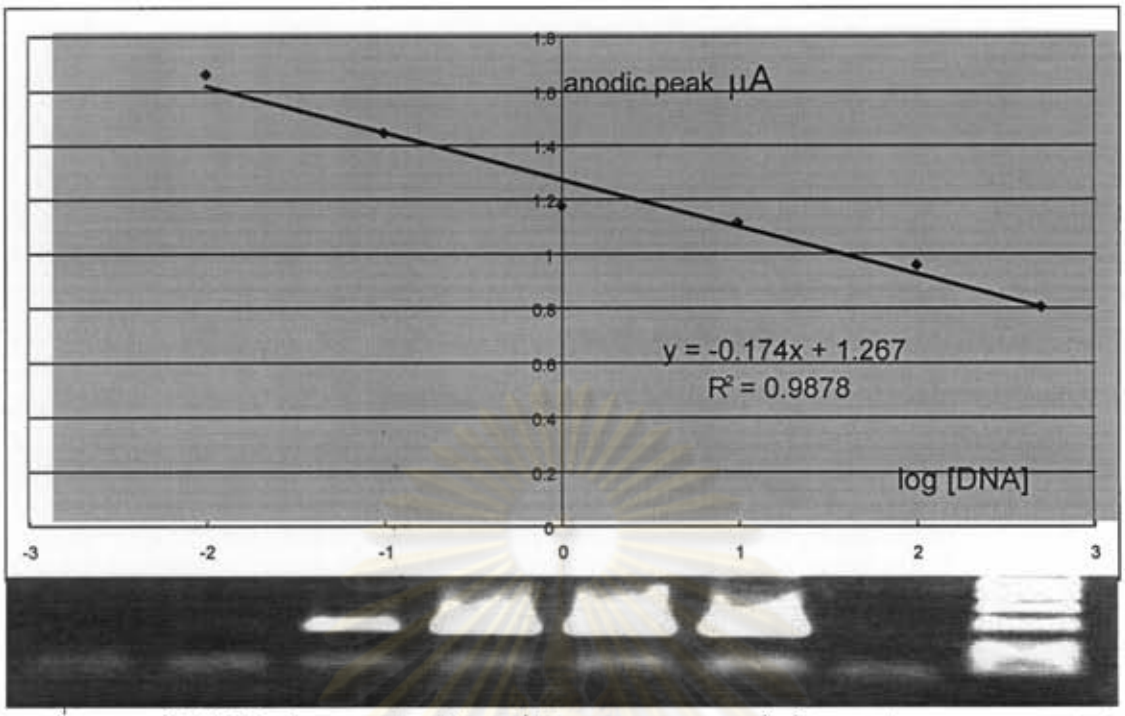


ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน 1 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอควบคุมบวกสกัดจากข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม เลน 2 ชุดควบคุมลบและ เลน 3 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอตัวอย่าง เลน M แสดง 100 nucleotide ladder

การตรวจสอบตามหลักการทางเคมีไฟฟ้าให้ค่า anodic current peak ตั้งแต่ 0.90-1.67 μA และเมื่อดำเนินการกับตัวอย่างที่เป็น blind samples 50 ตัวอย่างที่ภายในมีตัวอย่าง positive 5 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้องทั้งหมด โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีค่า anodic current peak ต่ำกว่า 1.9 μA และตัวอย่างที่ให้ผลลบมีค่า anodic current peak สูงกว่านั้น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทำซ้ำและความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ในระดับ 100%

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่างกันพบว่า ระบบสามารถตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าได้ผลชัดเจน โดยพบการเปลี่ยนแปลงของค่าทางไฟฟ้าในช่วง 0.85 – 1.85 μA (ภาพที่ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างปริมาณดีเอ็นเอ (log ของความเข้มข้น) และค่า anodic peak (μA) ของการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 (บน) และ ระดับปริมาณดีเอ็นเอจริงเมื่อทดสอบโดยการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก (ล่าง)

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาเมื่อทดสอบร่วมกับข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อื่นร่วมกับธัญพืชชนิดอื่น ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา (ภาพที่ 9) ชี้ให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาต่อดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบ

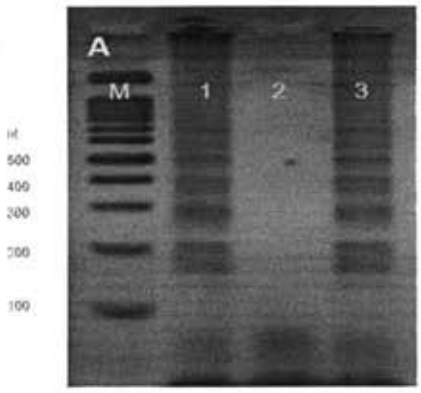
ภาพที่ 9 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ MON 810 เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน ntc ชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ เลน 1 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากตัวควบคุมบวก เลน 2-6 ตัวอย่างจากข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ E176 BT11 NK603 GA21 1507 เลน 7-12 ข้าวโพดอินทรีย์ ถั่วเหลือง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ และข้าว

2. การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียว

2.1 ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมในรูปแบบกึ่ง screening ของ 35S โปรโมเตอร์ สำหรับการตรวจพืชดัดแปรพันธุกรรม ถั่วเหลืองสายพันธุ์ GTS 40-3 และข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Event E176 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม 2 คู่จำเพาะต่อบริเวณ 35S โปรโมเตอร์ โดยสามารถต่อยอดให้ออกมาในรูปชุดตรวจสอบ Corn GMOs detection ในรูปแบบสำเร็จรูป (ภาพที่ 10)

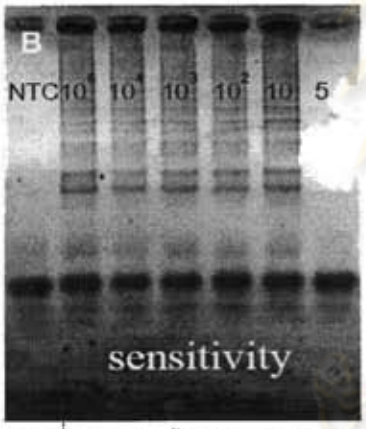
ภาพที่ 10 ชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

ชุดตรวจสำเร็จเน้นการทำงานบนหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว (isothermal DNA amplification) ที่ 63 °C ในชุดสำเร็จรูปประกอบด้วย reaction mixture ขนาดความเข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นจริงของปฏิกิริยา น้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อแล้ว ดีเอ็นเอควบคุมบวก เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่าเกี่ยวข้องกับการใช้ 35S โปรโมเตอร์เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนตัวหลักได้ในเวลา 40-60 นาที การทดสอบได้ผลลัพท์ดีเอ็นเอที่เป็นขั้นบันได (ภาพที่ 11) ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป็นขนาดผลคูณของ 185.นิวคลีโอไทด์ ทำนองเดียวกันชุดทดสอบสามารถตรวจสอบผลการเรืองแสงของปฏิกิริยาได้โดยตรงเมื่อใช้สีย้อมเป็น fluorescense

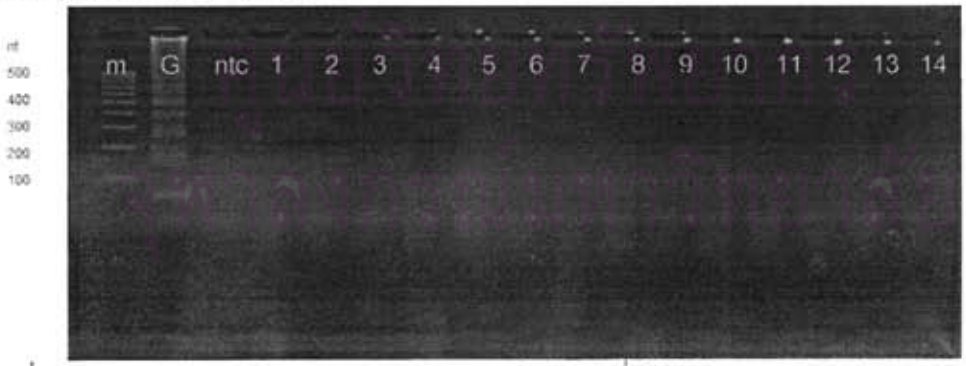


ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์แลดเดอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน 1 ชุดควบคุมบวก เลน 2 ตัวอย่างควบคุมลบและ เลน 3 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม

การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีทดสอบรายการนี้ ดำเนินการบนพื้นฐานการทดสอบความไวของปฏิกิริยา ความเฉพาะเจาะจง และความสามารถในการทำซ้ำ (ภาพที่ 12 และ 13)



ภาพที่ 12 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ (จำนวนชุดของดีเอ็นเอ) เป็นแม่แบบ



ภาพที่ 13 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจาก พืชดัดแปรพันธุกรรม E176 และ พืชดัดแปรพันธุกรรมอื่นรวมทั้งธัญพืชเป็นแม่แบบ เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน G ตัวอย่างควบคุมบวก เลน ntc ชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ เลน 1-12 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากตัวอย่างข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ BT11 NK603 GA21 1507 และธัญพืชได้แก่ ข้าวโพดอินทรีย์ ถั่วเหลือง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าว ข้าวสาลี และมันฝรั่ง

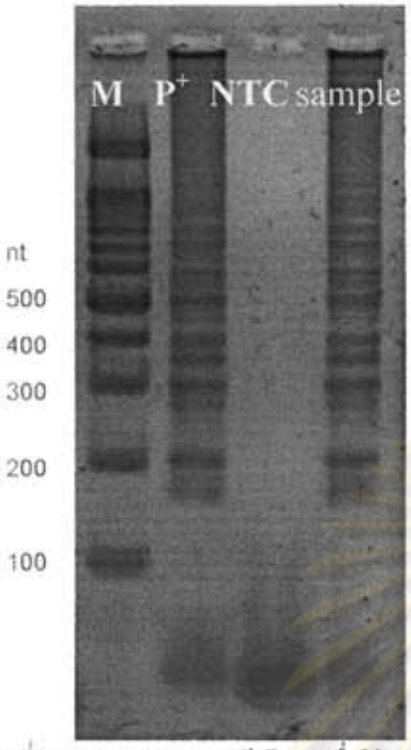
ผลการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมีความจำเพาะต่อถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ E176 ที่ใช้ 35S โปรโมเตอร์ เป็นตัวควบคุมหลัก ร่วมกับข้าวโพดสายพันธุ์อื่นไม่พบการทำปฏิกิริยา cross reaction กับดีเอ็นเอจากพืชอื่นที่ทดสอบแสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์พืชดัดแปรพันธุกรรมเป้าหมายเท่านั้น

ทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ไวสุดที่ 10 copies / ปฏิกิริยา เมื่อใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆกันเป็นแม่แบบร่วมกับ matrix ของจีโนมดีเอ็นเอของข้าวโพดอื่น ไพรเมอร์ที่ให้ความเฉพาะเจาะจงสูงกับพืชดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ E 176 จึงไม่ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างดีเอ็นเอจากพืชอื่นแต่อย่างใด การทดสอบ reproducibility กับตัวอย่างที่เป็น blind test 50 ตัวอย่างโดยมีตัวอย่าง positive 5 ตัวอย่าง พบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้องทั้งหมด แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทำซ้ำ และความถูกต้องของการวิเคราะห์ในระดับ 100 %

เนื่องจากชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียวนี้มีข้อเด่นกว่าการใช้พื้นฐานเทคโนโลยีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในแง่ของความง่าย สะดวก ความรวดเร็วในการทำปฏิกิริยาและการลดการพึ่งพาเครื่องมือหรือห้องปฏิบัติการ จึงทำให้ชุดสำเร็จรูปนี้ มีข้อได้เปรียบและสะดวกที่จะเผยแพร่ไปสู่การใช้งานจริง

2.2 ได้พัฒนาชุดสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ bovine species บนพื้นฐานของการตรวจยีนบริเวณ *Pth* bovine parathyroid gene เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของ bovine species โดยออกแบบไพรเมอร์เป็น 2 คู่เฉพาะต่อบริเวณ 6 บริเวณของยีน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานหลักการของเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออุณหภูมิระนาบเดียว (isothermal) ที่ 63 °C ชุดสำเร็จรูปประกอบด้วย reaction mix ขนาดความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นของปฏิกิริยาจริง น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ดีเอ็นเอควบคุมบวก เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้โดยตรงภายในเวลา 40-60 นาที (ภาพที่ 14)

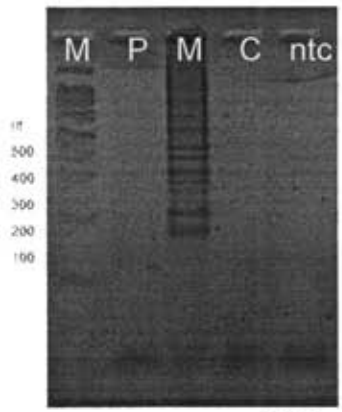
ภาพที่ 14 ชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ bovine species



ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลิโอไทด์ เลน P ชุดควบคุมบวก เลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบและ เลน sample ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากตัวอย่างเนื้อวัว

การทดสอบได้ผลลัพท์ดีเอ็นเอในรูปแบบขั้นบันได (ภาพที่ 15) ขนาดดีเอ็นเอที่ได้เป็นผลคูณของดีเอ็นเอขนาดเริ่มจาก..200..นิวคลีโอไทด์ ทำนองเดียวกันสามารถตรวจสอบผลจากความสามารถในการเรืองแสงของปฏิกิริยาได้โดยตรงเมื่อใช้สีย้อมที่เป็น fluorescense

การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบดำเนินการเช่นเดียวกันกับชุดสำเร็จในการตรวจ GMOs โดยพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบใช้งานมีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก bovine (ทั้ง _*Bos taurus* และ *Bos indicus*) ที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารและไม่เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จาก porcine และ poultry species (ภาพที่ 16) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านี้มักใช้เป็นองค์ประกอบของวัตถุดิบอาหารและอาหารสัตว์



ภาพที่ 16 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เนื้อสัตว์ เลน M ดีเอ็นเอ แลดเดอร์มาร์คเกอร์ขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน P ตัวอย่างเนื้อสุกร เลน M ตัวอย่างจากเนื้อวัว เลน C ตัวอย่างจากเนื้อไก่ และ เลน ntc ชุดควบคุมน้ำยาโดยไม่เติมดีเอ็นเอ

การทดสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ copy number พบว่าสามารถตรวจสอบการปนของดีเอ็นเอจาก bovine species แม้มีระดับการปนเพียง 10 copies/reaction (ภาพที่ 17)

ภาพที่ 17 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปในรูป limit of detection (LOD) กับผลิตภัณฑ์ที่ทราบปริมาณการปนในรูปเปอร์เซ็นต์ เลน 1- 7 ระดับการปนของ bovine species 10% 2% 1% 0.1% 0.01% 0.001% 0.0001% ตามลำดับ เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลีโอไทด์

การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) กับตัวอย่าง blind test 50 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่าง positive 5 ตัวอย่าง พบว่าสามารถวิเคราะห์ผลได้ถูกต้องทั้งหมด แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทำซ้ำได้ในระดับ 100%

ชุดตรวจสอบ bovine species นี้เฉพาะเจาะจงกับตัวอย่างที่อาจมีการปนของ bovine species ซึ่งเชื่อมโยงโดยตรงในการเฝ้าระวังปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อวัวบ้า (BSE)

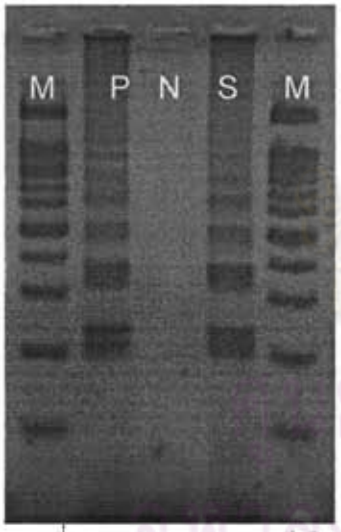
โดยเฉพาะกับตัวอย่างอาหารสัตว์ที่มักจะมีการใช้ส่วนประกอบที่ไม่ใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารคน เช่นของเหลือทิ้งมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์

เทคนิค isothermal DNA amplification ที่นำมาใช้ในการพัฒนาชุดสำเร็จรูปจะเหมาะอย่างยิ่งกับการตรวจดีเอ็นเอจากอาหารในรูป field monitoring ที่จำเป็นในภาคสนาม

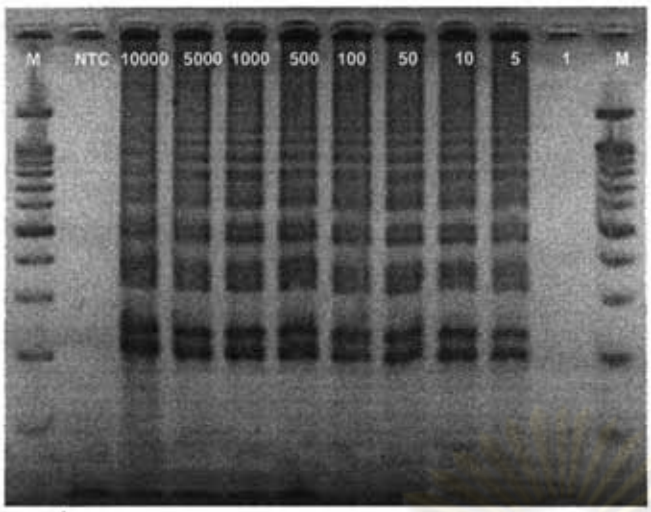
2.3 ได้พัฒนาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจการติดเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv citri ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์ในส้มโอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเฉพาะต่อยีน *rpf* ยีน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออยู่บนพื้นฐานของหลักการ isothermal DNA amplification เช่นเดียวกัน ตัวชุดสำเร็จรูปประกอบไปด้วย reaction mix ขนาดความเข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นของปฏิกิริยาจริง น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ดีเอ็นเอควบคุมบวก เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้โดยตรง ภายในเวลา 45 นาที

ผลลัพท์ดีเอ็นเอจากการทดสอบมีขนาดเป็นจำนวนเท่าของ 220 นิวคลีโอไทด์และทำนองเดียวกันสามารถตรวจสอบผลได้จากความสามารถในการเรืองแสงของปฏิกิริยาโดยตรงเมื่อใช้สีย้อมที่เป็น fluorescense

ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาทั้ง 3 รูปแบบแสดงดังในภาพที่ 18, 19 และ 20



ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลิโอไทด์ เลน P ชุดควบคุมบวกจาก clone DNA ของ *Xanthomonas axonopodis* pv citri เลน N ชุดควบคุมลบ เลน S ดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อ และเลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบที่ไม่มีดีเอ็นเอ



ภาพที่ 19 ความไวของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปสำหรับการตรวจ *Xanthomonas axonopodis* pv citri ในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ(จำนวนชุดของดีเอ็นเอ) เป็นแม่แบบ เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลิโอไทด์ และเลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบที่ไม่มีดีเอ็นเอ

M	ladder 100 nt
P^+	positive control
NTC	negative template control
1	*Xanthomonas axonopodis* pv. citri
2	*Xanthomonas* orizae pv. oryzae
3	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
4	*Xanthomonas campestris* pv. mulvacearum

ภาพที่ 20 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เชื้อ *Xanthomonas* ต่างชนิด

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อต่างสายพันธุ์ได้แก่ *X. orizae* pv. Oryzae *X. campestris* pv campestris และ *X. campastris* pv muluaceaum พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงต่อเฉพาะดีเอ็นเอจากเชื้อเป้าหมายเท่านั้น

การทดสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้โคลนของ *rpf* ยีนที่ทราบจำนวน copy number และเจือจางเป็นลำดับมาเป็นแม่แบบ พบว่าชุดตรวจสอบมีความไวของปฏิกิริยาถึงระดับการตรวจพบดีเอ็นเอที่ 5 copies/reaction

การตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค PCR และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ตัวอย่างเชื้อจากผลส้มโอจริงเป็นจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจสอบการปนของเชื้อได้ทั้ง 25 ตัวอย่าง ขณะที่เทคนิค PCR ทำได้เพียง 24 ตัวอย่างเท่านั้น

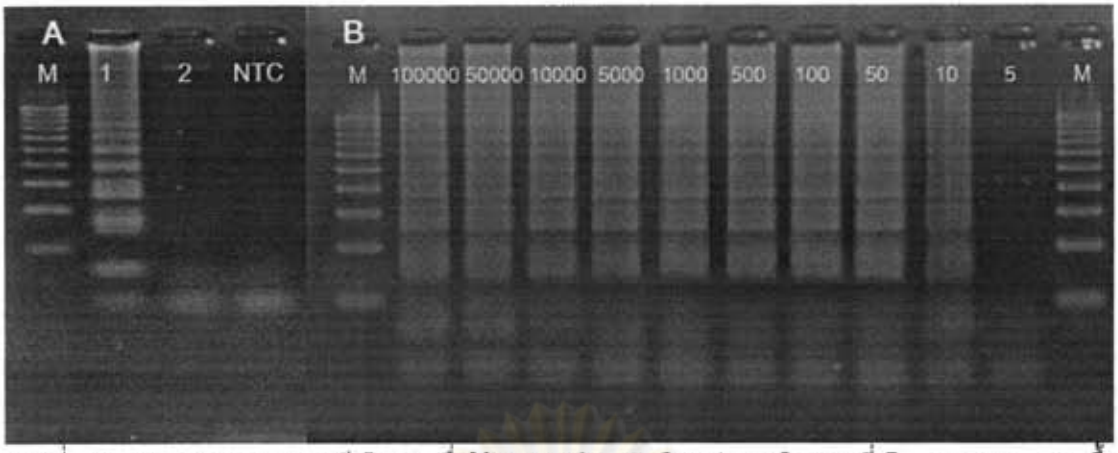
2.4 ได้พัฒนาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจการปนของโมเลกุลที่เป็น allergen ของเนื้ออาหารที่มีถั่วลิสงประกอบ

โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *Ara* h1 อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยหลักการ isothermal DNA amplification อีกเช่นกัน ตัวชุดสำเร็จรูปประกอบด้วยสารต่างๆ เช่นเดียวกับชุดสำเร็จรูปในข้อ 2.3

ผลลัพท์ดีเอ็นเอจากการทดสอบมีขนาดเป็นจำนวนเท่าของ 160 นิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบความจำเพาะใช้ปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากธัญพืชต่างชนิดได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไท ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา และเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอจากพืชเหล่านี้ (ภาพที่ 21)

ภาพที่ 21 ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของชุดสำเร็จรูปเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างธัญพืชต่างชนิด. เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลีโอไทด์ เลน P.ตัวอย่างดีเอ็นเอจากถั่วลิสงและเลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบที่ไม่มีดีเอ็นเอ เลน 1. ข้าวบาร์เลย์ เลน 2. ข้าวฟ่าง เลน 3. ข้าวไรย์ เลน4. ข้าวเจ้า เลน 5. ข้าวโพด เลน 6. ลูกเดือย เลน 7. งา เลน 8. เมล็ดทานตะวัน เลน 9. เมล็ดฟักทอง เลน 10. ลูกบัว เลน 11. พริกไทย เลน12. ถั่วเขียว เลน 13. ถั่วดำ เลน 14. ถั่วลันเตา และเลน 15. เมืดมะม่วงหิมพานต์

ขณะที่ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยแปรยีนความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากถั่วลิสง จากมากไปน้อย 10 ระดับ พบว่าสามารถตรวจสอบการปนของดีเอ็นเอโดยระดับการปน 0.005% (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 A) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ชุดตรวจวิเคราะห์การปนของโมเลกุลที่เป็น allergen ของเนื้ออาหารที่มีถั่วลิสงประกอบ เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลิโอไทด์ เลน 1 ชุดควบคุมบวกจาก clone DNA ของยีน AraH1 เลน 2 ชุดควบคุมลบ และเลน ntc ตัวอย่างควบคุมลบที่ไม่มีดีเอ็นเอ

B)ความไวของปฏิกิริยาในรูป limit of detection (LOD) เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ(จำนวนชุดของดีเอ็นเอ) เป็นแม่แบบ เลน M ดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ขั้นบันไดขนาด 100 นิวคลิโอไทด์

ผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่าง 50 ตัวอย่างโดยมีตัวอย่างที่เป็นบวก 45 ตัวอย่างและตัวอย่างที่เป็นลบ 5 ตัวอย่าง จัดเรียงอย่างสุ่ม สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นบวกได้ทั้งหมด โดยมีความแม่นยำทั้งหมด 100%

ความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสอบเหล่านี้ส่วนหนึ่งได้นำไปเสนอผลงานการประชุมนานาชาติทางด้านเคมี PACCON 2008 ที่โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทรัล พลาซ่า เมื่อวันที่ 28-30 มกราคม 2551 งานวันเกษตรแห่งชาติที่ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อวันที่ 22 กันยายน 2551 และส่วนหนึ่งได้สนับสนุนการผลิตมหาบัณฑิต 1 คน คือนาย วรุณ สุวรรณกิตติ ซึ่งเพิ่งจบการศึกษาไปเมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 ที่ผ่านมา

3.การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์พื้นฐานการนำไฟฟ้าภายในโมเลกุลดีเอ็นเอในลักษณะดีไวซ์

3.1 การศึกษารูปแบบการจับตัวระหว่าง DNA binder กับดีเอ็นเอในกระบวนการตรวจสอบที่เพิ่มปริมาณบนพื้นฐานทางเทคนิค PCR กับ LAMP อย่างละหนึ่งรูปแบบ

ศึกษารูปแบบการนำโมเลกุลสีในกลุ่ม minor groove blinder มาใช้กับการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการตรวจสอบกับสีทั้งสิ้น 6 ชนิดได้แก่ Hoechst 33258 Distamycin Nuclear Yellow Hoechst 33342 DAPI และ Berenil โดยทดสอบบน carbon screen printed electrode ร่วมกับ

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่สกัดได้จากพลาสมิด pUC 19 พบว่าค่า anodic peak ที่ initial stage และ pulse stage เป็นดังภาพที่ 23

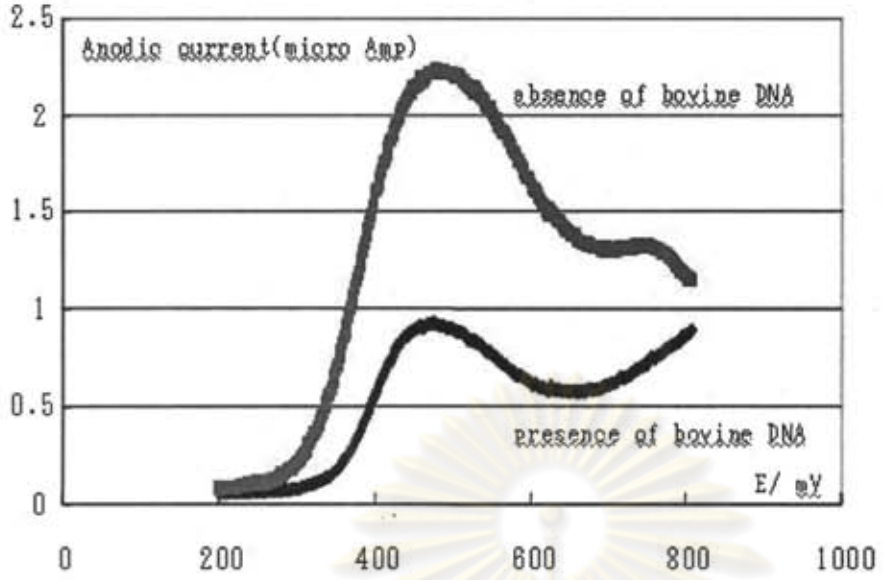
Indicator	I0 μA E(mV)	Ipa μA E(mV)	Ipa/ I0
Hoechst33258	-18.9(557)	-6.79(553)	0.36
Distamycin	-3.14(512)	-2.26(504)	0.85
Nuclear yellow	-11.24(570)	-6.09(581)	0.54
Hoechst33342	-21.46(584)	-16.57(576)	0.77
DAPI	-7.00(830)	-7.50(830)	1.07
Berenil	-3.21(256)	-3.34(263)	1.04
Sybergreen	-6.52(514)	-2.32(581)	0.36
Methylene blue	-10.44(-138)	-9.85(-138)	0.90
Ethidium bromide	-0.22(710)	-0.30(705)	1.35
Propidium iodide	-10.20(752)	-10.90(760)	1.07
Actinomycin D	-1.10(-219)	-1.13(-217)	1.03
Aminoacridine	-2.30(850)	-3.1(870)	1.35
Ellipticine	-1.10(690)	-0.95(650)	0.86

ภาพที่ 23 สัดส่วนเปรียบเทียบ anodic current peak ที่ initial stage และ pulse stage ของ binder ชนิดต่างๆ กับดีเอ็นเอตัวอย่าง

Binder ที่ทดสอบแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ minor groove binder และ intercalator จากผลการทดลอง Anodic current peak ที่ Initial stage แปรผันจาก-18.90 ถึง -0.22 uA ขณะที่ ที่pulse stage แปรผันจาก-16.57 ถึง -0.30 uA โดยผลการตรวจสอบค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแส (Ip/a: I_0)พบการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเมื่อใช้สี Hoechst 33258 เป็นตัวจับดีเอ็นเอในปฏิกิริยา ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณในรูป $I_{p/a} / I_0$ พบมีค่าต่ำสุดที่ 0.36 มีช่องว่างความต่างถึง -18.9 (μA) ถึง -6.79 (μA) ค่าที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้จากการทำปฏิกิริยาร่วมกับสารโมเลกุลสีชนิดอื่นที่พบอยู่ในช่วงที่ $I_{p/a} / I_0$ สูงกว่านี้จะถือเป็นค่าต่ำสุด

ผลการตรวจสอบให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการจับตัวกับดีเอ็นเอและกระตุ้นการเกิดสัญญาณ anodic current peak อันเป็นผลจาก free electron บนพื้นผิวอิเล็กโทรด

โดยปกติหากมีดีเอ็นเอในระบบ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นจะทำปฏิกิริยากับสีในรูปการจับตัว ผลดังกล่าวทำให้เกิด aggregation ของสีกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ส่งผลต่อปริมาณอิเล็กตรอนอิสระที่ปรากฏอยู่ในระบบที่ลดลง ดังนั้นหากมีดีเอ็นเอมากจะเกิดการลดลงของอิเล็กตรอนอิสระมาก เมื่อวัด Voltammetry จะพบว่าค่า anodic current peak (μA) จะลดลง ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 รูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างกระแสขณะที่ในระบบมีและไม่มีดีเอ็นเอ

การเปรียบเทียบการลดลงของ anodic current peak จะช่วยวิเคราะห์สัญญาณดีเอ็นเอได้อย่างถูกต้อง

เมื่อนำสารละลาย Hoechst 33258 มาทดสอบกับระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นระบบตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้แล้วในรูป PCR และ LAMP อย่างละรูปแบบ(ระบบการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม Mon 810, PCR และระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ bovine species) พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอสุทธิในระบบที่ต่างกัน ทำให้ส่งผลต่ออัตราการจับตัวของ Hoechst 33258ต่างกันตามไปด้วย โดยพบว่าการจับตัวกระตุ้นให้เกิดสัญญาณโดยรวมต่างกันดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ anodic current peak ระหว่างดีอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยระบบ PCR และ isothermal DNA amplification

ระดับปริมาณดีเอ็นเอ	ค่า anodic current peak (μA) และ SD (ในวงเล็บ)	
เริ่มต้นก่อนการเพิ่มปริมาณ	ปฏิกิริยา PCR	ปฏิกิริยา isothermal DNA amplification
0.1 ng	1.75 (0.10)	0.98(0.08)
1 ng	1.57(0.15)	0.85(0.19)
10 ng	1.28(0.17)	0.75(0.20)
100 ng	1.03(0.09)	0.58(0.08)
Negative control	1.95(0.14)	2.05(0.05)

พบการลดลงของค่า anodic peak (μA) มากในปฏิกิริยาที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Isothermal ในทุกค่า แม้จะมีแม่แบบน้อยเพียง 0.1 ng เท่านั้น ขณะที่การลดลงของค่า anodic peak จะค่อยๆลดลง สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระดับ 0.1 -100 ng โดยเทคนิค PCR ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงระดับปริมาณการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ประสิทธิภาพต่างกันและสอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้เมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาทั้งสองมาตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.2 การแปรผันภาวะของปฏิกิริยาพึ่งพาจุดเหมาะสมจากปัจจัย 3 ระดับได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ Hoechst 33258

ผลการทดสอบการแปรผันของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนไปของสัญญาณดีเอ็นเอในรูปการเปลี่ยนไปของค่า anodic current peak (μA) เมื่อใช้สารละลาย Hoechst 33258 เข้มข้น 50 μM ร่วมกับกระบวนการเพิ่มสัญญาณโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการวัดค่า anodic current peak ของปฏิกิริยาภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่มีปริมาณต่างกันด้วยเทคนิค PCR

ระดับปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นก่อนการเพิ่มปริมาณ	ค่า anodic current peak (μA) และ SD (วงเล็บ) เมื่อวัดที่อุณหภูมิต่างๆ		
	20°c	30°c	40°c
0.1 ng	1.64(0.15)	1.75(0.05)	1.96(0.10)
10 ng	1.25(0.17)	1.31(0.13)	1.40(0.12)
100 ng	1.02(0.09)	1.05(0.07)	1.11(0.09)
Negative control	2.01(0.10)	2.10(0.09)	2.41(0.11)

อุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการเพิ่มปริมาณอิเล็กตรอนอิสระที่กระทำต่อพื้นผิวอิเล็กโทรดทำให้ค่า anodic current peak สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการคลายตัวของดีเอ็นเอที่เกิดการ aggregationมาก่อนหน้า ขณะที่ที่อุณหภูมิ 20°C พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า anodic current peak เกิดขึ้นด้วยอัตราที่ต่ำกว่า ส่งผลให้ค่าตัวเลขของสัญญาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำๆมีค่าลดลง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างที่เป็นลบ การวัดตัวอย่างที่มีอุณหภูมิ 30°C จึงมีความเหมาะสมมากที่สุด นอกจากนี้การวัดที่อุณหภูมิ 30°C มีความใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องเฉลี่ยที่พบในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ของประเทศ ทำให้สะดวกในการนำไปประยุกต์ในการตรวจวัด

ผลการวัดความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยาโดยเฉพาะการเลือกปริมาตรของ PCR products ที่เหมาะสมและการเลือกใช้ชนิดของบัฟเฟอร์ระหว่าง PB (phosphate buffer) และ

Tris HCl บัฟเฟอร์ ชี้ให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของปฏิกิริยา PCR สูง (ใช้สัดส่วนที่มาก) โปรตีนในระบบ (โดยเฉพาะเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา) จะมีผลต่อการจับตัวของ Hoechst 33258 ทำให้เกิด noise ratio ที่สูง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดเป็นข้อผิดพลาดของค่า anodic current peak ที่วัดได้ ขณะที่หากใช้ความเข้มข้นของปฏิกิริยาต่ำจะส่งผลให้ปริมาณดีเอ็นเอที่นำเข้ามาตรวจวัดในระบบลดลงซึ่งสะท้อนประสิทธิภาพในการตรวจวัดโดยตรง ในทางปฏิบัติวิธีการที่เหมาะสมจึงควรใช้ DNA products รวมกับ Hoechst 33258 ในอัตรา 1:1 ขณะที่ผลการศึกษาหาความเหมาะสมของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในระบบตรวจวัดทั้ง PB และ Tris HCl ที่ความเข้มข้น 5 mMไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าการตรวจวัดและไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ดีเนื่องจาก PB เป็นบัฟเฟอร์ที่หาได้ง่ายและมีราคาถูกกว่า ดังนั้นการเตรียมระบบการวัดภายใต้การใช้งานของ PB จึงมีความเหมาะสมมากกว่า สำหรับการแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย Hoechst 33258 เมื่อใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Pth ด้วยเทคนิค PCR เป็นดังตารางที่ 4

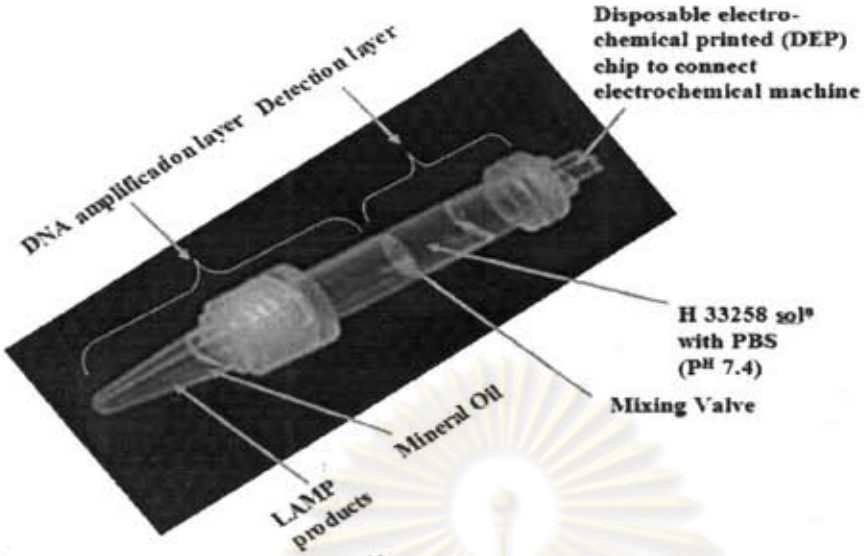
ตารางที่ 4 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลาย Hoechst 33258 ต่อการวัด

	ค่า anodic peak μA, (±SD)				
ความเข้มข้นของ	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น(copies)				
Hoechst (μM)	0	10^2	10^4	10^6	(I^{10e6} / I_0)
30	1.95(0.09)	1.67(0.10)	1.56(0.09)	1.48(0.09)	0.759
40	2.18(0.09)	1.79(0.09)	1.41(0.11)	0.83(0.11)	0.380
50	2.38(0.13)	1.93(0.11)	1.61(0.11)	1.26(0.09)	0.529
60	2.52(0.15)	2.15(0.13)	1.78(0.13)	1.39(0.13)	0.551

ผลการทดลองชี้ให้เห็นอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่า anodic current peak เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Hoechst 33258 ที่ 30 μM และ 60 μM เกิดขึ้นอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ขณะที่ที่ความเข้มข้น 40 μMให้ช่วงการเปลี่ยนแปลงของ anodic current peak สูงสุด (ค่า I^{pa}/I_0 ต่ำสุด)

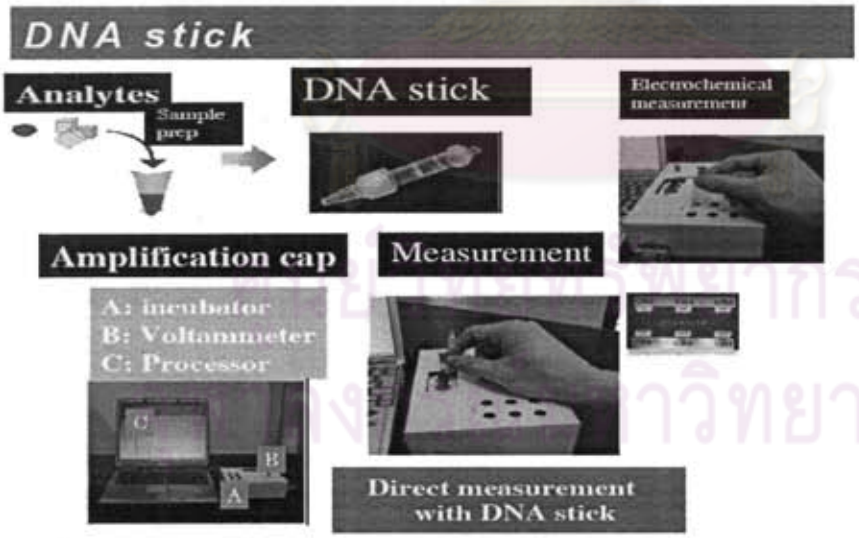
ผลการทดสอบสภาวะช่วยให้สามารถกำหนดสภาวะในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าอย่างเหมาะสม โดยจะใช้ความเข้มข้นของ Hoechst 33258 40μM ที่อุณหภูมิ 30 °C และใช้ปฏิกิริยา PCR ผสมกับสารละลาย Hoechst 33258 ในอัตราส่วน 1:1

และเพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบเคมีไฟฟ้าทำได้ง่ายขึ้นจึงได้ปรับประยุกต์หลอดทดลองให้สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็วในรูปแบบ DNA stick ซึ่งภายในประกอบด้วย chamber สำหรับใส่สารละลายปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และ chamber สำหรับใส่สารละลาย Hoechst 33258 และ อิเล็กโทรดแยกจากกัน (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 โครงสร้างของ DNA stick ที่ชี้ให้เห็นส่วนประกอบของchamberสำหรับทำปฏิกิริยา แผ่นเยื่อพลาสติก และบริเวณบรรจุสารละลาย Hoechst 33258 และ ตัว chip

การใช้งาน ทำได้โดยภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จสิ้น การบีบเบาๆจะทำให้เมมเบรนที่กั้นระหว่าง chamber ทั้ง 2 ขาดลง ทำให้ดีเอ็นเอและสารละลาย Hoechst 33258 มีโอกาสผสมกัน เมื่อคว่ำหลอกสารละลายทั้งหมดจะค่อมอยู่บนพื้นผิวของอิเล็กโทรดพอดี ทำให้สะดวกในการวัดและให้ค่าที่แม่นยำ โดยภายหลังผสม สามารถนำเข้าเครื่อง voltammetry ได้ทันที (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 รูปแบบและขั้นตอนการตรวจวัดด้วย DNA stick เริ่มจากซ้าย วนไปตามเข้มนาฬิกา การทำปฏิกิริยาเพื่อทดสอบใน stick โครงสร้างของ stick ที่ใช้งาน การบ่มปฏิกิริยา การผสมและคว่ำหลอดเพื่อการตรวจวัดและช่องเสียบ electrode การแสดงผลผ่านหน้าจอ monitor

4. การพัฒนาโมเลกุลดีเอ็นเอเพื่อการอ้างอิง

การโคลนชิ้นดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นโมเลกุลอ้างอิงส่วนใหญ่ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นไปแล้วในปีงบประมาณ 2550 สำหรับปีงบประมาณ 2551 มีการดำเนินการโคลนยีนเพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมบวกเฉพาะในรายการตรวจ canker ตรวจการปนของสารภูมิแพ้จากพืชที่อาจมีถั่วลิสงปนเปื้อน ซึ่งการใช้งานได้แสดงไว้แล้วในภาพที่ 19 และ 22 ตามลำดับ

5. การสร้างระบบการตรวจสอบโดยวางโครงร่างการตรวจสอบต้นแบบที่ประกอบไปด้วยตัวอย่างเอกสารขณะดำเนินการวิเคราะห์

เตรียมการให้การบริการตรวจวิเคราะห์ เริ่มจากออกแบบฟอร์มต่างๆ ที่ใช้ในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ แบบฟอร์มสุ่มตัวอย่าง แบบประวัติตัวอย่าง เอกสารกำกับตัวอย่าง แบบฟอร์มรับตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ work sheet ในการตรวจวิเคราะห์ เริ่มจาก worksheet ในการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และ worksheet การแสดงผลการวิเคราะห์ เป็นไปตามรูปแบบการดำเนินการของระบบ ISO 17025

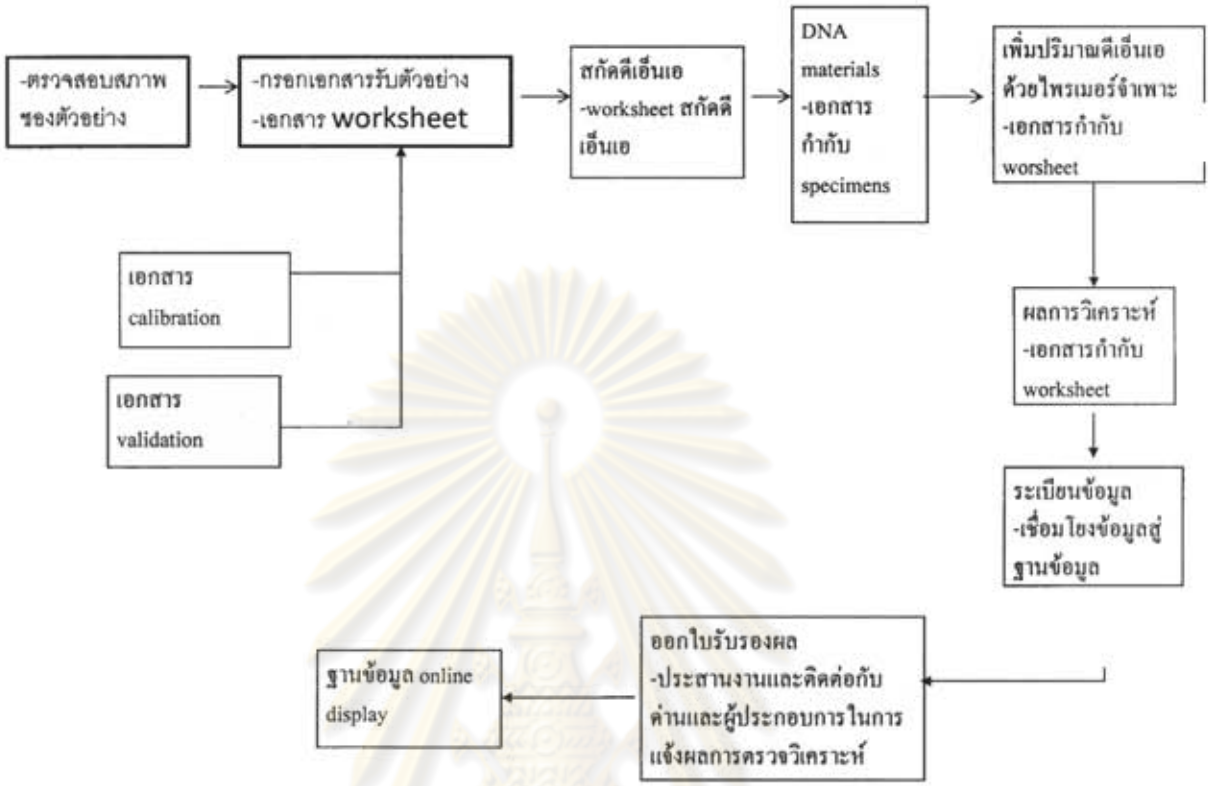
3.2 ซักซ้อมความเข้าใจในทีมงาน ในกระบวนการเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์ การบันทึกผล วินิจฉัย การดำเนินการรับรองผลตาม ISO 17025 และการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าสู่ฐานข้อมูล และการออกใบรับรองผล

3.3 จัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี reference materials สำหรับการตรวจวิเคราะห์

3.4 การตรวจสอบข้อมูลคู่ขนาน ระหว่างข้อมูลวัตถุดิบ ข้อมูลระหว่างการผลิตและ finish products เพื่อตรวจรับของปลอด GMOs ด้วยระบบเอกสาร

3.5 ประสานงานกับภาคอุตสาหกรรม แห่งประเทศไทยและสหฟาร์ม ซึ่งเป็นฟาร์มที่สนใจเข้าร่วมโครงการ เพื่อประชาสัมพันธ์ เผยแพร่ระบบและจัดโปรแกรมร่วมกันในการดำเนินการในการตรวจสอบและรับรอง ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ เพื่อทดสอบการใช้งานจริงในอุตสาหกรรมแปรรูปถั่วเหลืองหรืออาหารสัตว์เพื่อการผลิตเพื่อส่งออก (ภาพที่ 27 และ 28)

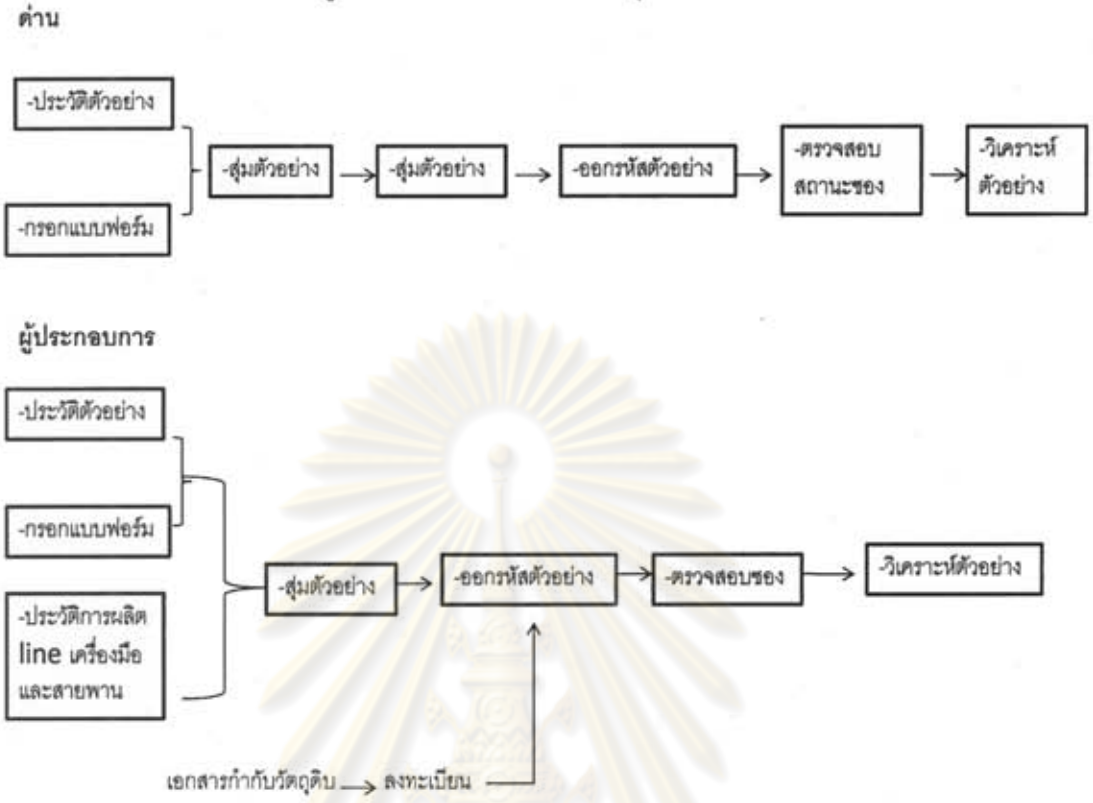
รูปแบบการดำเนินการในการวิเคราะห์ตัวอย่าง



ภาพที่ 27 แสดงรูปแบบการทำงานรวมในการให้บริการตรวจวิเคราะห์และรับรองผล GMOs

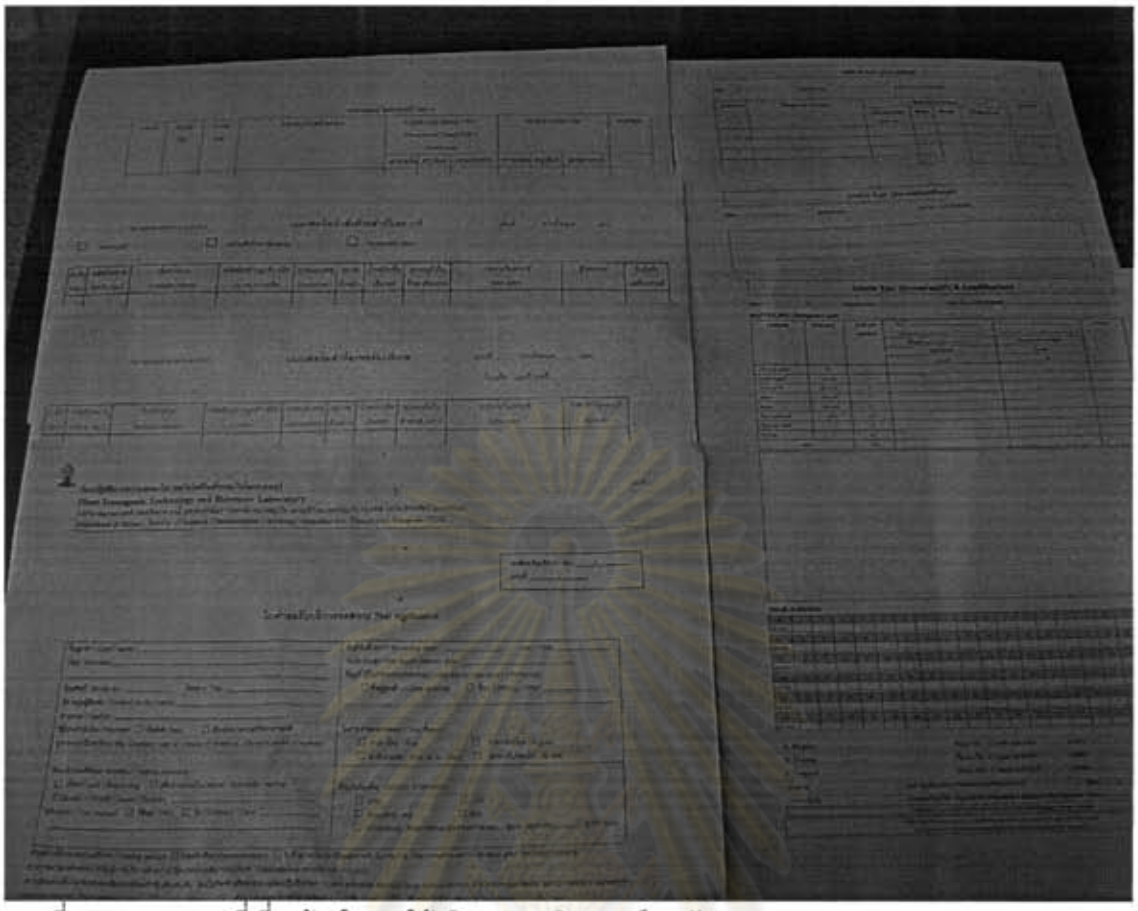
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบการดำเนินการในการสุ่มและรับตัวอย่าง



ภาพที่ 28 แสดงรูปแบบการสุ่มตัวอย่างจาก 2 รูปแบบของตำแหน่งตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 29 แบบเอกสารที่เกี่ยวข้องในการให้บริการตรวจวิเคราะห์และรับรองผลการตรวจ GMOs

อภิปราย/วิจารณ์ผล

การพัฒนาเทคนิคและชุดสำเร็จรูปเพื่อการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารในปีที่ 2 นี้ เน้นการพัฒนาปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปชุดสำเร็จที่สะดวกในการนำไปใช้ภาคสนาม เน้นการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ใช้หลักการอย่างง่ายไม่พึ่งพาห้องปฏิบัติการ ไม่พึ่งพาเครื่องมือราคาแพง เพื่อตอบสนองหลักการ point of care และที่สำคัญ การใช้งานทำได้ง่ายและลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ลง

ผลงานที่โครงการได้ดำเนินการจนสัมฤทธิ์ผลในปีที่ 2 เป็นชุดตรวจ 4 ชุด ได้แก่ ชุดตรวจวิเคราะห์ GMOs แบบ screening ในข้าวโพด E176 ถั่วเหลือง GTS40-3 ชุดตรวจการปนของ bovine species ชุดตรวจการปนและติดเชื้อของ canker และชุดตรวจการปนของอาหารที่มีส่วนประกอบส่วนหนึ่งส่วนใดจากถั่วลิสงซึ่งเป็นต้นตอของโมเลกุลสารก่อภูมิแพ้ในอาหาร ชุดตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวนำมาใช้เชื่อมโยงกับวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นในปีแรกได้ ทำให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ลงจนทำให้การวิเคราะห์ทั้งกระบวนการ เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ และตรวจวิเคราะห์) จบลงภายในเวลาเพียง 1-2 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับ 1 วัน ที่สำคัญไม่ต้องพึ่งเครื่องมือที่มีราคาแพง ไม่ต้องพึ่งห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่เทคนิค การเชื่อมโยง

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบอุณหภูมิระนาบเดียว (Notomi *et al*, 2000) ร่วมกับโมเลกุล fluorescence ยังผลให้สามารถตรวจวินิจฉัยผลด้วยตา ภายหลังส่องดูด้วยเครื่องตรวจสอบธนบัตรที่หาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง

นอกจากนี้ยังพัฒนาเทคนิคในการตรวจในห้องปฏิบัติการบนพื้นฐานทางเทคนิค PCR ได้แก่ การตรวจการปนสายพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1และหอมมะลิ 105 สำหรับรายการตรวจข้าวโดยมาร์คเกอร์ RM17 การตรวจการปนของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม MON 810 การตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรม การสำรวจการปนของข้าวดัดแปรพันธุกรรม (LL rice) ซึ่งอยู่ในปีที่ 2 นี้ ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นตั้งแต่ปีที่ผ่านมา

อย่างไรก็ดีทางโครงการได้ดำเนินการเพิ่มและประสบความสำเร็จในเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการตรวจข้าวหอมมะลิ 105 ผ่านปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว บนพื้นฐานของลำดับข้อมูลนิวคลิโอไทด์ ของไพร์เมอร์ 15 ซึ่งเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพที่เฉพาะเจาะจงสำหรับการตรวจการปนพันธุ์ข้าวหอมมะลิได้ ในปัจจุบันสถานการณ์การปนของข้าวเป็นปัญหามากต่อการค้าระหว่างประเทศ หากผู้ประกอบการมีวิธีที่ช่วยให้การตรวจสอบทำได้เองโดยง่ายก็จะช่วยบรรเทาปัญหาลงได้ อย่างไรก็ดีในอนาคตควรนำวิธีที่ได้มาขยายผลไปสู่การพัฒนาวิธีการสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณให้ได้ต่อไป แนวทางดังกล่าวแม้จะไม่ได้อยู่ในแผนแต่ส่วนหนึ่งโครงการจะดำเนินการเพื่อต่อยอดต่อไปในอนาคต

สำหรับการพัฒนารูปแบบการตรวจบนหลักการเคมีไฟฟ้า ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่โครงการให้ความสำคัญ พบว่าที่ผ่านมามีผู้ประยุกต์รูปแบบการตรวจบนพื้นฐาน electrochemical DNA Sensor น้อยมากและส่วนใหญ่เน้นการจับตัวของดีเอ็นเอไหลลงบนผิวอิเล็กโทรดก่อนการใช้งานจริง (immobolization) (Dasmmord et al, 2003) ซึ่งทำให้การใช้งานไม่สะดวก ดังนั้นจึงได้เลือกศึกษาการใช้งานของโมเลกุลเคมีที่เป็น miner groove binder ซึ่งจะช่วยให้กระบวนการทั้งหมดเป็นไปตามหลักการ non immobilization ช่วยลดขั้นตอนความซับซ้อนและลดระยะเวลาลงได้

ในปีนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้โมเลกุล Hoechst 33258 ให้ทำหน้าที่เป็น DNA mediated charge transport electrochemistry ต่างไปจากการทำงานในรูปแบบ specific redox indicator จำพวก CdS Zns pbS หรือ colloid metal nanoparticle (Yang 2002 และ Palacek, 2002) อย่างไรก็ดีการใช้โมเลกุล Hoechst 33258 จำเป็นต้องมีองค์ประกอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงมากเนื่องจาก Hoechst 33258 มีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของดีเอ็นเอน้อยกว่า จึง bind กับ DNA แทบทุกชนิดที่อยู่ในระบบ แต่จะไม่ bind กับ.RNA และ short oligo nucleotide (Kobayashi et al, 2004) เมื่อนำปฏิกิริยามาใช้ร่วมกันกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยรูปอุณหภูมิระนาบเดียวที่มีข้อเด่นตรงที่ความจำเพาะของปฏิกิริยา อันเป็นผล

เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ 4 ตัว จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ทำให้การตรวจวิเคราะห์เปี่ยมไปด้วยประสิทธิภาพ

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการที่เทคนิค isothermal DNA polymerase มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีกว่า ใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าการใช้เทคนิค PCR ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้ทำปฏิกิริยากับ Hoechst 33258 ได้ดี ส่งผลต่อการลดลงของสัญญาณอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นผลดีอย่างยิ่งในกรณีต้องการตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ และเมื่อใช้ปฏิกิริยาจากชุดสำเร็จรูปที่ได้พัฒนาขึ้นมาตรวจวิเคราะห์ไบโอเซ็นเซอร์ด้วย carbon screen pointed electrode ขนาดพื้นผิว 2.63 mm^2 สารละลาย Hoechst 33258 ความเข้มข้น 40 µM โดยใช้หลักการวัดในรูป linear sweep voltammetry ให้ผลการตรวจเป็นบวก ที่ค่าตรวจวัด ต่ำลงจาก 0.8-0.9 µA เป็น 0.3-0.8 µA โดยที่แม้ดีเอ็นเอในระบบมีการปนหรือมีจำนวน copy number อยู่น้อย ก็สามารถตรวจตรวจสอบได้และผลการตรวจวัดที่ได้แสดงให้เห็นเป็นตัวเลขชัดเจน

การทดสอบภาวะต่างๆช่วยให้การปรับประยุกต์ใช้เทคนิคเคมีไฟฟ้าลดตัวขึ้น การนำ DNA stick มาประยุกต์ยิ่งทำให้การพัฒนารูปแบบการตอบไม่จำเป็นต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี

สำหรับในส่วนการพัฒนาโมเลกุลที่ใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ได้ดำเนินการครอบคลุมเสร็จสิ้นตามแผนในปีตั้งแต่ปีที่แล้วซึ่งครอบคลุมการตรวจเนื้อ ไก่ โค สุกร แกะ แพะ การตรวจข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม การตรวจ internal gene ต่างๆและ2 ในปีนี้พัฒนาดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการตรวจการ screening 35S โปรโมเตอร์ การตรวจแคงเกอร์ และการตรวจการปนของโมเลกุลแพ้จากถั่วลิสง

นากจากนี้ยังได้สร้างระบบการตรวจสอบโดยจัดทำระบบ เอกสารสำหรับการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ทั้งขั้นตอน เพื่อรองรับกระบวนการให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ผลสัมฤทธิ์โครงการช่วยให้โครงการสามารถนำเสนอผลงานที่เป็น output ดังนี้

Piyasak Chaumpluk. 2008. Simple and Rapid Detection of Trace Amounts of Peanut in Foods Based on *Ala h1* Gene Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification and Electrochemical DNA Sensor. Pure and Applied Chemistry International Conference 2008 (PACCON2008) 30 Jan -3 Feb 2008. Sofitel Centara Grand Bangkok.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ และเออิชิ ทามิย่า. 2551.ดีเอ็นเอสติ๊คสำหรับการตรวจชนิดของเนื้อสัตว์และรับรองความถูกต้อง. การประชุมวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติ 8-10 กันยายน 2551. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ณัฐพร อุดมพงษ์ พีระศักดิ์ ฉายประสาท และเออิชิ ทามิย่า . 2551.การตรวจวิเคราะห์แคงเกอร์(*Xanthomonas axonopodis* pv citri)อย่างง่ายและรวดเร็วสำหรับสมโอส่งออก. การประชุมวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติ 8-10 กันยายน 2551. คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

วรุณ สุวรรณกิตติ ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ และเออิชิ ทามิย่า. 2551. การตรวจวิเคราะห์โมเลกุลภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากธัญพืชในอาหารที่ง่ายและรวดเร็ว. . การประชุมวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติ 8-10 กันยายน 2551. คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ วรุณ สุวรรณกิตติ. 2551. การตรวจการปนของโมเลกุลภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากไม้ผลบางชนิดด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์. . การประชุมวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติ 8-10 กันยายน 2551. คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

และส่วนหนึ่งของข้อมูลงาน meat species detection มาประกอบการตีพิมพ์ในผลงาน

Boonjira Boontha, Jeerawat Nakkuntod, Nattiya Hirankarn, Piyasak Chaumpluk, and Tirayut Vilaivan. 2008. Multiplex Mass Spectrometric Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Employing Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid in Combination with Ion-Exchange Capture. *Anal. Chem.*. 80 (21), 8178-8186.

ผลงานของโครงการวิจัยส่วนหนึ่งช่วยผลิตนักศึกษาจบการศึกษา 1 คน ได้แก่

นายวรุณ สุวรรณกิตติ. 2551. ELECTROCHEMICAL GENESENSOR BASED ON DNA SEQUENCES FOR THE DETECTION OF ALLERGENIC FOODS OF PLANT ORIGIN. Master Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University

โดยสรุป การดำเนินการดังกล่าวสัมฤทธิ์ผลตามแผนงานที่วางไว้ทุกประการ

สำหรับในอนาคต ส่วนหนึ่งของผลการทดลองที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ จะได้ดำเนินการจดสิทธิบัติและเผยแพร่ผ่านการตีพิมพ์ในระดับนานาชาติต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค

สำหรับปัญหาและอุปสรรคส่วนสำคัญจะเกี่ยวเนื่องกับงบประมาณที่ล่าช้ามาก ไม่สอดคล้องกับดัชนีความต้องการในการประเมินผลงาน นอกจากนี้เนื่องจากโครงการมีลักษณะรูปแบบงานย่อยที่ซับซ้อน งานมีความเกี่ยวพันธ์กันทั้งหมด ในบางกรณีหากระบบพื้นฐานไม่ลงตัวอาจทำให้ต้องรอ ขณะที่การพัฒนารูปแบบการตรวจนั้นลงตัวแล้ว

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการส่งออก. 2547. รายงานข้อมูลการส่งออกสินค้าของไทย ประจำปี 2547.กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. มปท.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543. GMOs สำหรับผู้ประกอบการ. เอกสารประกอบการสัมมนามาตรการและข้อกำหนดเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารของประเทศในทวีปยุโรป. สถาบันฝึกอบรมการค้าระหว่างประเทศ กรมส่งเสริมการส่งออก 14-15 มีนาคม 2543. ISBN: 974-333-625-7.

Chaumpluk Piyasak.2003.Tracing of DNA molecule for quality assurance in food matrix using PCR technique. 29th Congress on science and Technology of Thailand. 32. (invited)

Chaumpluk, P., Kargan, K., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2007. Accumulation of amplified target DNAs using thiol/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocene–streptavidin–magnetic system and a direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode. Science and Technology of Advanced Materials 8 :323 – 330.

Compton, J.1991. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350:91-92.

Daniel, R. M., and Cowan D. A. 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. Cell Mol. Life Sci. 57:250-264.

Drummond, T.G., Hill, M.G. and Barton, J.K. 2003.Electrochemical DNA sensor. Nature Biotechnology 21:1190-1199.

Guatelli, J.C., Whitefield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. and Gingeras, T.R.1990.Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retro viral replication. Proc.Nat. Acad. Sci., USA 87:392-396.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hirisaka, T., Fujita, Kayoko, Iwata, Taketoshi, Nakadai, Aya, Otani, T. A., Horikita, T., Taniguchi, T., Honda, E., Yokomizo, Y. and Hayashidani, H. 2004. Sensitive and specific detection of Yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification. J. Clinical Microbiol. 42(11):5349-5352.

Ikeda, N., Bautista, N.S., Yamada, T, Kamijima, O., and Ishii, T.2001. Ultra-simple DNA extraction method for marker-assisted selection using microsatellite markers in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 27–32.

John, M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. Nucleic Acids Res.20, 2381.

Kelley, S.O., Barton, J.K., Jackson, N.M. and Hill, M.G. 1997. Electrochemistry of methyleneblue bound to a DNA-modified electrode. Bioconj. Chem. 8:31-37.

Kobayashi, M., Kusakawa, T., Saito, M., Kaji, S. , Oomura, M. , Iwabuchi, S., Morita, Y. , Hasan, Q., Tamiya, E. 2004. Electrochemical DNA quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258, Electrochem. Commun. 6 : 337–343.

Li, W., Brlansky, R.H., and Hartung, J.S. 2006. Amplification of DNA of Xanthomonas axonopodis pv. Citri from historic citrus canker herbarium specimens. J. Microbiol. Met. 65:237-246.

Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification Nature Genetics 19:225-232.

Lockley, A.K. and Bardsley, R.G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Sci. and Technol.* 11: 6777-9.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Lyamichev, V., Mast, A.L., Hall, J.G., Prudent, J.R., Kaiser, M.W., Takova, T., Kwiatkowski, R.W., Sander, T. J., de Arruda, M., Arco, D.A., Neri, B.P. and Brow, M.A. 1999. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nature Biotech. 17:929-926.

Mascini, M., Palchetti, H., and Marrazza, G. 2001. DNA electrochemical biosensors. J. Anal. Chem 369:15-22.

Meyer, R., Hufelein, C., Luüthy, J.; Candrian, U., 1995. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in foods, *Journal of AOAC International*. 156: 1542-1551.

Miller, D.N. 2001. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. Journal of Microbiological Methods 44.49–58

Murray MG and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA.Nucleic Acids Res 8: 4321–4325.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.

Palecek, E., Fojta, M., and Jelen, F. 2002.New approaches in the development of DNA sensor: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surface. Bioelectrochemistry 56: 85-90.

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of west nile virus. J. Clinical Microbiol. 42(1):257-263.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Spoth, B., & Strauss, E. (1998). Screening for genetically modiWed organisms using Promega's Wizard resin. Promega Notes, 73, 23–25.

Takamura K., Aotsuka, T.1988 Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochemical Genetics 26: 815-819

Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.C. and Shank, D.D. 1992. Strand displacement amplification- isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Research 20:1691-1696.

WHO. 2003. Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems. Food and agricultue organization of United Nations World Health Organisation. Rome FAO/WHO publication. np.

Wolf, C. , Rentsch, J. , Hubner, P. 1999. PCR–RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification, J. Agric. Food Chem. 47 : 1350–1355.

Yang, I.V., Ropp, P.A., and Thorp, H.H. 2002. Toward electrochemical resolution of two genes on one electrode: using 7-deaza analogues of guanine and adenine to prepare PCR products with differential redox activity. Anal. Chem. 74: 347-354.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

(ภาษาอังกฤษ) MR. PIYASAK CHAUMPLUK

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-5494

โทรสาร 0-2252-8579 piyasakcha@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2540	ปริญญาเอก	PhD (Agri. Sci.)	Kyoto University	Japan

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Utilize marker gene for gene detection system development Molecular Biology

Production of high value substance by utilizing plant viral replication machinery in transgenic plant and algae Molecular Biology

GMOs detection and meat species identification Molecular Biology

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

1. Establishment of mother line of Gentian plant resistant to cucumber mosaic virus via genetic engineering Iwate Biotechnology Research Center , Iwate JAPAN Project member 1993-1996

2. ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข หัวหน้าโครงการ

3. Development of sample protocols to detect genetically modified orgamisms (GMOs) and the integration of the protocols together with Identity preserved (IP)- Handling approach for the assured production of GMOs- free products for export หัวหน้าโครงการ

4. Heat treatment during the soy milk preparation and its effect on the detection efficiency of polymerase chain reaction หัวหน้าโครงการ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Chaumpluk Piyasak, Chikae Miyuki, Takamura Yazuru and Tamiya Eiichi .2005. Novel Electrochemical Identification and Quantification of Bovine Species in Feedstuffs. JAIST International Symposium on Nano technology2005. September 15-17. Ishikawa Japan.
2. Chaumpluk Piyasak.2003.Tracing of DNA molecule for quality assurance in food matrix using PCR technique. 29th Congress on science and Technology of Thailand. 32. (invited)
3. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. เคล็บลับ PCR ในงานชีววิทยาโมเลกุล.เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องเคล็บลับ PCR กับการวิจัยและการตรวจวิเคราะห์. โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร. 28-30 กรกฎาคม 2546.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. เทคนิคการตรวจสอบ GMOs. โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อพัฒนาการ

เรียนการสอน มุมน่ามองของเทคโนโลยีสมัยใหม่ : แง่มุมสำคัญของGMOs กับบทบาทในชีวิตประจำวัน. โครงการความร่วมมือเพื่อพัฒนาการเรียนการสอนและการจัดการสอนวิชาคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี ระดับโรงเรียนของ สสวท.ร่วมกับ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 1 - 2 สิงหาคม 2546.

5. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2546. ดีเอ็นเอและยีนในพืช การทดลองขั้นสูงเกี่ยวกับดีเอ็นเอ. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอและยีนในพืช การทดลองขั้นสูงเกี่ยวกับดีเอ็นเอ. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช.คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.มหาวิทยาลัยนเรศวร.29 พฤศจิกายน 2546.

6. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.หวัดนก ตามติดและตามตรวจ. จุลสารพันธุศาสตร์ 24(1):6-7.

7. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. พันธุศาสตร์ของพืชดัดแปรพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ (1). จุลสารพันธุ

ศาสตร์ 24(1): 8-12.

8. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. การตรวจดีเอ็นเอและความปลอดภัยของผักและผลไม้. เอกสารประกอบการสัมมนาวันเกษตรแห่งชาติ. คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.มหาวิทยาลัยนเรศวร.มกราคม 2547.

9. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. ปฏิบัติการเรื่องของจีโนม ความสัมพันธ์เฉพาะระหว่างดีเอ็นเอ จีโนม และดีเอ็น เอนอกโครโมโซม. เอกสารประกอบการอบรมครูชีววิทยาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย หลักสูตรที่ 1 (ปฏิบัติการ). ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 26 เมษายน 7 พฤษภาคม 2547.

10. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.การสกัดจีโนมมิดดีเอ็นเออย่างง่ายจากมะละกอและการตรวจมะละกอ GMOs.เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล. ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

11. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547.เคล็ดลับ PCR ในงานชีววิทยาโมเลกุลอาหาร เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยา

โมเลกุล.ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.

12. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. รอบรู้กับ GMOs : GMOs สถานการณ์ การตรวจและตลาดสินค้า เอกสารประกอบการอบรมเชิง ปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล. ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.
13. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. โครงสร้างพื้นฐานของดีเอ็นเอกับการวิเคราะห์ เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องดีเอ็นเอกับการรับรองความ ปลอดภัยของอาหาร : มองผ่านมุมในการวิเคราะห์ GMOs และการวิเคราะห์เชิงชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 9-10 สิงหาคม 2547.
14. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2547. พันธุศาสตร์ของพืชดัดแปรพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ (2). จุลสารพันธุศาสตร์ 24(2): 11-15.
15. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2547. การประเมินระบบการแสดงฉลากเปรียบเทียบระหว่างประเทศและระบบควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมของญี่ปุ่น ยุโรป และสหรัฐอเมริกา. รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ I ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สิงหาคม 2547. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
16. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2547. มาตรการรองรับและปฏิบัติจริงเกี่ยวกับระบบตรวจบนพื้นฐานการทดสอบโปรตีนด้วยชุดสำเร็จและดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ. รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ 2 ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สิงหาคม 2547. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
17. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ .2548.สถานภาพของระบบอุตสาหกรรมและความเคลื่อนไหวสู่ระบบรับรองสอบทวนและตรวจติดตามอาหารดัดแปรพันธุกรรม.รายงานความก้าวหน้าฉบับที่ 3 ส่ง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มกราคม 2548. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน (ระบุชื่อโครงการวิจัย)

1. Authentical test for Halal products based on the determination of DNA from porcine species with genome specific primers to unique cDNA clone
2. Genetic Transformation and gene expression study in *Dunalliella sp.*

ผู้ประสานงานแผนงานวิจัย

1. ชื่อ นางสาวนันทวัน หัตถมาศ

Miss Nanthawan Hadthamard

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ –

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ 4 ระดับ 4

4. สถานที่ทำงาน ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพฯ 10330

5. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร ชั้น 16 อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์/โทรสาร (02) 218-7653

E-mail : hadthamard@yahoo.com

6. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน
2543	ตรี	วท.บ. (อุตสาหกรรมเกษต	อุตสาหกรรมเกษตร	มหาวิทยาลัยนเรศวร
2546	โท	วท.ม. (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

7. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุสาขาวิชาการ

- การตรวจวิเคราะห์การปนของดีเอ็นเอเนื้อโค และแกะในผลิตภัณฑ์อาหาร Molecular Biology
- การผลิตแป้งมันสำปะหลังดัดแปร Food processing

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็น

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

- การผลิตแป้งมันสำปะหลังดัดแปรเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ศึกษาแนวทางการยืดอายุการเก็บรักษาเงาะโรงเรียนโดยใช้กรดซาลิไซลิก และกรดแอบไซซิก
- การควบคุมการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสโดยโมเลกุลคลอโรฟิลเลสกลับทิศทางจากภายนอกต่อคุณภาพของ
  บรอคโคลี่

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ (ระบุชื่อโครงการวิจัย)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ(ภาษาไทย) นางสาว ปาลิตา แปวไธสง

   (ภาษาอังกฤษ) Miss Palita Paewthaisong

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

   -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัยประจำโครงการ

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและ E-mail

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ10330 โทรศัพท์ 02-218-5494 โทรสาร 02-218-5494 E-mail : palita_pa@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2545	ปริญญาตรี	วท.บ ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ประเทศไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุสาขาวิชาการ

Molecular for blood screening , Molecular biology.

7.ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็น ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ

ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

ผู้ร่วมวิจัย

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน(ระบุชื่อโครงการวิจัย)

การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคน ในกระสัง *Peperomia pellucida*(L.)Kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่(ระบุชื่อโครงการวิจัย) -

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว มัลลิกา แก้วดี

(ภาษาอังกฤษ) Miss Mallika Keawdee

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ -

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการ
ห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืช
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. หน่วยงาน ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-5494 โทรสาร 0-218-5494

E-mail : mallikakeawdee@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2545	ปริญญาตรี	วท.บ พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสุรินทร์	ประเทศไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

การสกัดดีเอ็นเอจากพืช Molecular Biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

1. การสร้างสายพันธุ์แท้เพื่อผลิตฟักทองลูกผสม
หัวหน้าโครงการ

2. ศึกษาระบบการควบคุมอาหารดัดแปรพันธุกรรมและสร้างรูปแบบจำลองเพื่อใช้ในการควบคุมกำกับดูแล
สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ผู้ร่วมวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ -