# บทที่ 5

## สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอ

เนื่องจากที่ผ่านมาไม่มีรายงานการพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอ โดยเฉพาะ การทดลองสกัดดีเอ็นเอจากมะละกอและผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีมะละกอเป็นส่วนประกอบในการศึกษาในครั้งนี้จึงอาศัยรูปแบบวิธีมาตรฐานที่มีผู้รายงานและใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจพืชดัดแปรพันธุกรรมมาก่อน (Vollenhofer และคณะ, 1999;Wolf และคณะ, 2000 ) โดยคาดว่าถ้าสามารถใช้ได้ผลจะไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจสอบรับรองความน่าเชื่อถือ ในครั้งนี้ได้นำวิธีที่เป็นมาตรฐานของทั้งสองรัฐบาล ได้แก่ วิธีมาตรรัฐบาลเยอรมันและวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ มาปรับใช้กับตัวอย่างมะละกอสดมะละกออบแห้ง มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม และมะละกอในโยเกิร์ต โดยในตัวอย่างที่เป็นมะละกอสด พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ดีโดยได้ดีเอ็นเอรวมไม่น้อยกว่า 12.42-19.5 μg / 300 มิลลิกรัมตัวอย่าง ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์โดยใช้เรซินแม้ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่าวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันแต่พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงกว่าซึ่งประเมินได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงตอบสนอง ต่อโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่มักจะปนเปื้อนขณะสกัดดีเอ็นเอ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรต่ำ แสดงว่ามีการปนเปื้อนน้อย และอัตราส่วนของค่า OD 260 ต่อ OD 280 นาโนเมตร มีค่าใกล้เคียงกับ 1.7 ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับที่ Anklam และคณะ (2002) ได้รายงานไว้กับพืชต่างชนิด แม้ว่าตัวอย่างมะละกอสดจะปะปนไปด้วยยางมะละกอซึ่งภายในประกอบด้วยสารหลั่งหลายชนิด เช่น พอลิฟีนอล เอนไซม์ต่างๆ (Wurz และคณะ, 1999) ซึ่งทั้งหมดมีรายงานว่ามีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอและมีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ( Lin และคณะ, 2001)

เมื่อทดสอบตัวอย่างมะละกอสดในรูปแบบต่างกัน ได้แก่ ใบสด เมล็ดสดและผลสด พบว่า ใบมะละกอสดให้ดีเอ็นเอ็นเอรวมในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ส่วนที่เป็นเมล็ดและผลสด เมื่อใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอเดียวกัน สำหรับผลมะละกอสด พบว่า ระดับการสุกของผลมีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ โดยพบว่าผลสดให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงกว่าผลที่เริ่มสุกหรือสุกมากแล้ว แสดงให้เห็นระยะของพัฒนาการของผลมีผลต่อทั้งปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่รบกวนประสิทธิภาพในการสกัด ในเมล็ดมะละกอสดปกติจะพบสารและโครงสร้าง

ของเนื้อเยื่อที่แตกต่างไปจากเนื้อเยื่ออื่นและถึงแม้ในเมล็ดจะพบทั้งส่วนที่เป็นเอมบริโอและเอนโดสเปิร์มก็ตามแต่สัดส่วนของสารเคมีต่างๆที่ปะปนในรูปปริมาณสุทธิต่อเนื้อเยื่อทั้งหมดอาจไม่เหมาะสมภายใต้เงื่อนไขในการสกัดโดยการใช้เรซินสังเคราะห์ได้จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอในปริมาณที่น้อย ที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ได้หลีกเลี่ยงโมเลกุลปะปนที่อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่และสารเคมีอื่นในกระบวนการสกัดด้วยการใช้ CTAB เป็นตัวตกตะกอนโดยที่ภาวะความเข้มข้นของเกลือสูง CTAB จะสร้างโมเลกุลเชิงซ้อนระหว่าง CTAB คาร์โบไฮเดรตและเกลือ จนตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตออกมาก่อนได้ (Meyer, 1999) การทดลองสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหารที่เป็นมะละกอแปรรูป ได้แก่ มะละกออบแห้ง, มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม และมะละกอในโยเกิตนั้น ไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธภาพ โดยไม่สามารถตกตะกอนดีเอ็นเอได้หรือตกตะกอนได้น้อยมากจากการใช้เรซินกับผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปดังกล่าวไม่สามารถทำได้ในทำนองเดียวกัน (ไม่แสดงผล) ผลการทดลองส่วนใหญ่จึงขัดแย้งกับผลการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์แปรรูปในกลุ่มถั่วเหลืองและข้าวโพด แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปต่างไปอย่างสิ้นเชิงกับผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองและข้าวโพด (Pauli และคณะ, 1998) ในภาวะเช่นนี้จึงไม่สามารถใช้ guanidine HCl และเรซินในการสกัดและจับดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ได้ จากการค้นคว้าพบว่าผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปจะมีชนิดและปริมาณของสารปรุงแต่งอาหารอื่น เช่น กรดซิตริก น้ำเชื่อม และผงแป้ง สารเหล่านี้มีผลโดยตรงต่อการสกัดดีเอ็นเอ การหลีกเลี่ยงไปใช้หลักการสกัดโดยวิธี CTAB ก็ไม่ได้ช่วยในการหลีกเลี่ยงโมเลกุลของสารปรุงแต่งเหล่านั้น ในเบื้องต้นได้แก้ไขโดยนำตัวอย่างมาแช่ข้ามคืนในสารละลาย TE ที่ปลอดนิวคลีเอส เพื่อลดอิทธิพลของสารเคมีปรุงแต่งที่ปะปนอยู่ในส่วนผสมลงแต่ก็ยังพบว่าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในระดับที่น่าพอใจ Anklam และคณะ (2002) ได้ทบทวนเอกสารถึงข้อดีข้อเสียและข้อจำกัดของวิธีการต่างๆ พบว่า นอกจากองค์ประกอบที่พบในเนื้ออาหารแล้วโครงสร้างทางกายภาพของเนื้ออาหารมีผลโดยตรงต่อการปลดปล่อยดีเอ็นเอเข้าสู่บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด และต่อมา Pauli และคณะ (1998) ชี้ให้เห็นว่าในบางชนิดของเนื้ออาหาร การทำให้แห้งโดยการใช้ความเย็นส่งผลต่อโครงสร้างของเนื้ออาหารทำให้การสกัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดีขึ้น ดังนั้นในการทดลองกับผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปต่อมาจึงนำมะละกอแปรรูปมาแช่แข็งแล้วทำให้แห้งและด้วยวิธีดังกล่าวสามารถสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ได้ จากผลการทดลองผลการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ในผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้ดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 11.40-324.96 μg ต่อ 300 mg ของตัวอย่าง โดยความเข้มข้นในช่วง 380-730 μg/ml ซึ่งสอดคล้องกับผลของการสกัดดีเอ็นเอจากพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวโพดและถั่วเหลืองอยู่ในช่วง 250-1200 μg/ml

ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอในมะละกอสดจึงใช้วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ ในส่วนของผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปต้องนำตัวอย่างมาทำให้แห้งด้วยการใช้ความเย็นก่อน แล้วจึงสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์

ผลการทดลองดังกล่าวตอกย้ำให้เห็นว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอซึ่งใช้เป็นมาตรฐานอยู่แล้วสามารถนำมาใช้ในการตรวจมะละกอได้เป็นอย่างดี

การพัฒนาระบบการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอ

การพัฒนาระบบการตรวจสอบขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 2 ประการ ได้แก่ การรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับยีนและโครงสร้างของยีนที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม การวิเคราะห์โดยการนำข้อมูลของยีนต่างๆ ที่พบมาเชื่อมโยงเข้าด้วยกันจะสามารถใช้เป็นหลักในการพิจารณาออกแบบวิธีการในรูปของไพรเมอร์จำเพาะที่เหมาะสมในการตรวจยีนเป้าหมายนั้นๆ จากการสำรวจโครงสร้างของชุดยีนที่มีรายงานในสิทธิบัตรที่ได้จดทะเบียนไว้ในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย พบว่า ชุดยีนทั้งหมดประกอบไปด้วยชุดยีนสำหรับการคัดเลือกในรูปของ gus gene ขณะที่ชุดยีนเป้าหมายจะสร้างแยกต่างหาก โดยประกอบไปด้วยบริเวณของ 35S promoter และชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (Fitch และคณะ, 1990;Fitch และคณะ, 1993)ในลักษณะคงสภาพทางธรรมชาติของยีนให้ใกล้เคียงกับขนาดความยาวที่สมบูรณ์ของยีนให้มากที่สุดแม้จะพบในบางกรณีที่จงใจใช้ชิ้นส่วนของยีนที่กลายพันธุ์เฉพาะที่รหัสเริ่มต้น (ATG) ก็ตาม ขณะเดียวกันผลการสำรวจโครงสร้างยังพบการใช้บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NOS เป็นเทอร์มิเนเตอร์หลักในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม (Fitch และ Manshardt, 1990) ดังนั้นการตรวจสอบ 35S promoter และหรือยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและหรือเทอร์มิเนเตอร์จึงเป็นแนวทางเลือกในการตรวจมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

อย่างไรก็ดีที่ที่ผ่านมาคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ 35S promoter ได้รับการยอมรับและนำมาใช้ในการตรวจสอบภาวะดัดแปรพันธุกรรมในพืชหลายชนิดรวมทั้ง ผลการตรวจสอบ 35S promoter ที่พบในเอกสารสิทธิบัตรของทั้งสายพันธุ์ SunUp และ สายพันธุ์ Rainbow (Chiangและคณะ,2001)ต่างก็อยู่ในรูปแบบที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกับรูปแบบที่พบในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม,ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม (Minunni และคณะ, 2001) ระบบดังกล่าวได้รับการพัฒนาจนสิ้นสุดแล้วทำให้การตรวจด้วย 35S promoter ไม่สามารถใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชหลายชนิดที่อาจมี 35S promoter เข้ามาปะปนได้ ดังนั้นการพัฒนาระบบวิธีการตรวจสอบในครั้งนี้จึงมุ่งประเด็นไปที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเฉพาะและเป็นหัวใจหลัก ซึ่ง

ได้แก่ ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสใบจุดวงแหวนซึ่งเป็นกุญแจหลักนำไปสู่การสร้างความต้านทานโรคไวรัสให้กับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนเปลือกหุ้ม 26 สายพันธุ์ ที่เป็นสายพันธุ์ที่พบครอบคลุมทุกทวีปทั่วโลกที่มีแหล่งปลูกมะละกอรวมถึงสายพันธุ์ที่นำไปใช้ในการตัดต่อยีนในครั้งนี้ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 26 สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันสูงถึงกว่า 90% แสดงให้เห็นถึงความอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ไวรัสซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานไว้ในเบื้องต้นแล้ว (Wang และ Yeh, 1997) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของแต่ละสายพันธุ์มีค่าแปรผันในช่วง 87%-99% และจากการเปรียบเทียบสายพันธุ์ HA กับสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแปรผันในช่วง 88%-99%

Wang และ Yeh (1997) ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของสายพันธุ์ที่พบในแต่ละสภาพภูมิศาสตร์มากกว่าชนิดของพืชเจ้าเรือนซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของไวรัสนั้น อย่างไรก็ตามการตรวจสอบยีนโปรตีนปลือกหุ้มในทุกสายพันธุ์ของมะละกอพบว่า ในการสร้างความต้านทานโรคไวรัสใบจุดวงแหวนส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มระหว่างสายพันธุ์สามารถใช้ชดเชยกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการใช้พันธุ์ที่เป็น mild-strain HA 5-1 ซึ่งมาจากพันธุ์ Sunset และเมื่อผสมพันธุ์เกิดเป็นพันธุ์ SunUp หรือจากการนำพันธุ์ SunUp ผสมกับพันธุ์ Kapoho Solo ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของฮาวาย เกิดเป็นพันธุ์ใหม่ เรียกว่า Rainbow ดังนั้นการคัดเลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันสูงจึงเป็นการตอบคำถามการกำหนดบริเวณสำหรับออกแบบไพรเมอร์ สำหรับในประเทศไทยงานวิจัยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมดำเนินการภายใต้ความรับผิดชอบของหลายหน่วยงานหลายสถาบันแต่พบว่าโครงสร้างของชุดยีนที่ใช้ส่วนใหญ่ยังคงสอดคล้องกับโครงสร้างหลักที่รายงานไว้ในหน้า 29 โดยที่ไม่ต้องคำนึงถึงการมีหรือไม่มีรหัสเริ่มจากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม พบว่า ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายพันธุ์เกิดจากบริเวณก่อนต้นๆ รหัสเริ่มทำให้บริเวณยีนจริงมีขนาดใกล้เคียงกันและไม่เป็นอุปสรรคต่อความเหมือนกันของโดเมน โดยพบโดเมนที่เหมือนกัน 5 โดเมน ในการทดลองได้เลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 7-33 สำหรับสาย forward และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 782-807 สำหรับสาย reverse เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่อาจเกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงบริเวณกลางนิวคลีโอไทด์ที่พบความแปรผันอยู่บ้าง โดเมนที่เลือกจึงครอบคลุมยีนส่วนใหญ่ของโปรตีนเปลือกหุ้ม เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ออกแบบไว้มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 800 นิวคลีโอไทด์

อย่างไรก็ดีในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบนอกเหนือจากการตรวจตัวยีนที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรมแล้ว การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างซึ่งรวมถึงมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอเป็นขั้นตอนขั้นแรกในการตรวจและคัดเลือกตัวอย่าง ในการทดลองได้ใช้ยีนที่พบเฉพาะในมะละกอในธรรมชาติ การสำรวจยีนต่างๆ ในเบื้องต้นพบว่ายีนพาเพนเป็นยีนที่น่าสนใจที่สุดและพบในทุกเซลล์ ทุกอวัยวะ ทุกระยะของการเจริญของมะละกอ จากการสำรวจข้อมูลของยีนพาเพนในฐานข้อมูล พบว่ายีนพาเพน 5 ข้อมูล และเป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ 3 ข้อมูล การตรวจสอบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้งสามข้อมูลในเบื้องต้นชี้ให้เห็นในยีนพาเพนว่ามีบริเวณที่เหมือนกัน 6 โดเมน ในการทดลองจึงเลือกบริเวณที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 61-88 สำหรับสาย forward และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 311-341 สำหรับสาย reverse เนื่องจากเป็นช่วงที่โดเมนมีความเหมือนมากที่สุด การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของแต่ละคู่ sequence ของยีนปาเปน พบว่า คู่ที่ 1 กับ2 มีความเหมือน 77% คู่ที่ 2 กับ 3 เหมือนกัน 77% เช่นเดียวกัน และคู่ที่ 1 กับ 3 มีความเหมือนกันสูงถึง 100% เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ยีนพาเพนที่ออกแบบได้มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 280 นิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบจริงเริ่มจากการตรวจสอบในส่วนของยีนพาเพนแล้วตามด้วยการตรวจสอบยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ระบบดังกล่าวจำเพาะกว่าการตรวจด้วย gus ของ Goda และคณะ (2001)

การตรวจสอบความจำเพาะของบริเวณโดเมนที่เลือกเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้งยีนปาเปนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มซึ่งเป็นยีนที่มีโดเมนไม่ซ้ำซ้อนกับระบบการตรวจของผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ข้าวโพด ใช้ยีน zein 35S promoter cry (Studer และคณะ,1998) ส่วนถั่วเหลืองใช้ยีน lectin 35S promoter EPSPS (Holst-Jensen และคณะ, 2003) และเมื่อนำโดเมนที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบความจำเพาะด้วยการทำ BLAST n พบว่าไพรเมอร์ยีนพาเพนทั้งสาย forward และสาย reverse ให้ผลการค้นหา local similarity ในลำดับต้นๆ เป็นยีนพาเพนจากมะละกอที่ได้จาก Carica papaya papain ให้ค่าคะแนนสูงสุดคิดเป็น 100% และยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสาย forward ให้ผลการค้นหา local similarity ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมากถึง 70 สายพันธุ์ โดยค่าคะแนนสูงสุดสายพันธุ์แรก Papaya ringspot virus type P Thailand โดยทั้ง 25 นิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมดคิดเป็น 100% และสาย reverse ให้ผลการค้นหา local similarity ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมากถึงกว่า 100 สายพันธุ์ โดยค่าคะแนนสูงสุดสายพันธุ์แรก Papaya ringspot virus strain W โดยทั้ง 26 นิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด คิดเป็น 100%

การปรับภาวะการทดลองให้เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์จริงในการทดลองทำโดยหาอุณหภูมิในช่วง annealing และความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมที่เหมาะสม พบว่าทั้งไพรเมอร์ยีนพาเพนและไพรเมอร์ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมีอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมเพียง 1อุณหูมิ คือ ที่ 52$^{0}$C และการปรับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียม ทั้งไพรเมอร์ยีนพาเพนและไพรเมอร์ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมที่เหมาะสมที่ 1.5 μmole ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในเรื่องอุณหภูมิ annealing ที่ 52$^{0}$C และความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมที่ระดับ 1.5 μmole จึงใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้

ในการทดลองได้ตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำและความน่าเชื่อถือ (validation) ด้วยการประเมินจาก ความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) และความน่าเชื่อถือในรูปการทำซ้ำ (reproducibility) เป็นหลักซึ่งสอดคล้องกับการประเมินวิธีการตรวจสอบที่เคยมีรายงานในระหว่างการพัฒนาวิธีการสำหรับตรวจ GMOs ในข้าวโพด ถั่วเหลือง จากผลการตรวจสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ยีนพาเพนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะดีเอ็นเอแม่แบบที่มาจากมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอ แต่จะไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบจากผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี ฝรั่ง สาลี ส้ม สับปะรด และผลิตภัณฑ์ต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลืองและข้าวโพด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะมะละกอดัดแปรพันธุกรรมซึ่งในการทดลองนี้ คือ เนื้อเยื่อมะละกอ นั่นแสดงถึงว่าคู่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดมีความจำเพาะเหมาะที่จะนำมาตรวจสอบภาวะการปลอดหรือเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในการตรวจดีเอ็นเอของยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอแม่แบบอยู่ที่ 1.9635 pg/μl และ 1.7538 pg/μl ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ไพรเมอร์จากทั้งยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบได้แม้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยในระดับพิโคกรัม การตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากมะละกอสด มะละกอบแห้ง มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต และเนื้อเยื่อมะละกอ ทดลองซ้ำ 200 ครั้ง ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ยีนพาเพนให้ผลความน่าเชื่อถือ 100% 99.5% 99.5% 99% และ100% ตามลำดับ ขณะที่การตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มให้ผลความน่าเชื่อถือ 100% ในทุกตัวอย่าง

ที่ผ่านมาการสร้างโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานเพื่อเป็นชุดควบคุมบวกใช้ประกอบในวิธีการตรวจสอบ ในปัจจุบันโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เป็นชุดควบคุมบวกพบเฉพาะในถั่วเหลืองและข้าวโพด อย่างไรก็ดียังไม่มีการสร้างโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานสำหรับการตรวจในมะละกอแต่อย่างใด ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้จึงได้สร้างโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานโดยอาศัยหลักการเชื่อมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้

ประกอบด้วย ยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และ NOS terminator เข้าด้วยกัน เมื่อสร้างชุดควบคุมบวกดังกล่าวได้แล้วนำมาตรวจสอบความไวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Taverniers และคณะ (2001) ตรวจสอบความไวของโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานจากถั่วเหลืองที่มียีนเลคตินเป็น internal control พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 1.7 ng/μl จากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.1 μg/μl ขณะที่การตรวจสอบความไวของโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานของมะละกอ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 2.9634 pg/μl จากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.9634 μg/μl

จากนั้นนำวิธีที่พัฒนาได้ไปใช้ในการตรวจมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอในท้องตลาด พบว่า มะละกอสดทั้งจากส่วนของใบ เมล็ด ผล อย่างละ 1 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป ได้แก่ มะละกออบแห้ง 14 ตัวอย่าง มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม 4 ตัวอย่าง มะละกอในโยเกิร์ต 2 ตัวอย่าง มะละกอจากแปลง 3000 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อมะละกอ 1 ตัวอย่าง พบว่า ทุกตัวอย่างเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์จากยีนพาเพนแล้วพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 280 นิวคลีโอไทด์ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่คาดหวังไว้ ในขณะที่ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะละกอเท่านั้นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากการใช้ไพรเมอร์ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(พบแถบดีเอ็นเอขนาด 800 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับค่าที่คาดหวัง) ดังนั้นสรุปได้ว่ามะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปทุกชนิด มะละกอจากแปลงเป็นมะละกอที่ปลอดการดัดแปรพันธุกรรม ขณะที่เนื้อเยื่อมะละกอเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ข้อเสนอแนะในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างมะละกอโดยให้ครอบคลุมพื้นที่การปลูกมะละกอทั่วประเทศเพื่อตรวจสอบภาวะการปะปนของเมล็ดมะละกอที่อาจปนเปื้อนด้วยเมล็ดมะละกอที่ดัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากในขณะนี้ประเทศไทยมีทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและมีการนำเข้าเมล็ดมะละกอพันธุ์ฮาวายซึ่งทั้งสองส่วนมีความเป็นไปได้ที่อาจเกิดการปะปนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากการนำเข้าหรือจากแปลงทดสอบ นอกจากนี้การนำวิธีตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอที่พัฒนาขึ้นไปใช้สามารถนำไปเชื่อมโยงสำหรับการตรวจรับรองภาวะปลอดมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในการส่งออกต่อไป และควรเพิ่มงานวิจัยต่อยอดในส่วนของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น