รายการอ้างอิง

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, ชลธิชา รักใคร, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ และหิรัญ หิรัญประดิษฐ์. การพัฒนาเทคนิค PCR-ELISA เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองที่มีการตัดต่อสารพันธุกรรม. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร, 115-134. กรุงเทพมหานคร : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2544.

ดุจฤทัย เชาวะวณิช. ผลของการปรุงอาหารต่อปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในพืชที่ใช้เป็นอาหารบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาอาหารเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2530.

ธนาคารกรุงศรีอยุธยา จำกัด(มหาชน). GMOS: ผลกระทบตลาดส่งออกสินค้าเกษตรไทย...?. วารสารเศรษฐกิจวิเคราะห์ 17(สิงหาคม 2542) : 9-22.

ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และ PCR-ELISA. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) 10(มกราคม-มิถุนายน 2545) : 10-19.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. เทคนิคการวิเคราะห์ GMOs. สุกัญญา สุนทรส, วิเชียร ริมพณิชยกิจ (บรรณาธิการ), จีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์, 9-20. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เลี่ยงเชียง, 2543.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. อาจารย์ ดร.. สัมภาษณ์การตรวจสอบ GMOs ในกลุ่มของขนมขบเคี้ยว, 10 กรกฎาคม 2542.

เมธินี ศรีวัฒนกุล. สถานภาพและการเตรียมความพร้อมด้าน GMOs ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกรมวิชาการเกษตร มีนาคม 2544. กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์, 2544.

เมธี ขำดวง. การศึกษาการแพร่กระจายของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเขตต่างๆ ของกรุงเทพมหานคร. โครงงานวิทยาศาสตร์ของนิสิต พสวท. ชั้นปี 2 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

รัชนี ไสยประจง. การโคลนและการแสดงออกของยีนกลูโคสไอโซเมอเรสจาก *Streptomyces* sp. 190-1 ใน *Escherichia coli*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

วราพร ลักษณสม้าย. GMOs: ความขัดแย้งที่ยังไม่มีคำตอบ. วารสารวิศวกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต 5(2544) : 13-22.

วัณชัย สมชิต. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สยามออฟเซ็ท จำกัด, 2527.

ศรัณพร ชวนเกริกกุล. GMOs ให้คุณหรือโทษ (1). ผู้ส่งออก 14(2544) : 41-44.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มก. โครงการศึกษาและพัฒนาระบบข้อมูลถั่วเหลืองและพืชน้ำมันอื่น กรณีศึกษาวิจัยอุตสาหกรรมถั่วเหลือง. ธุรกิจอาหารสัตว์ (2540) : 20.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. ผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์ที่ใช้ในภาคเกษตรและอุตสาหกรรม. สุกัญญา สุนทรส, วิเชียร ริมพณิชยกิจ (บรรณาธิการ), จีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์, 36-39. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เลี่ยงเชียง, 2543.

สาโรจน์ เกษมสุโชติกุล. GMOs ชีวภาพแปลงพันธุ์บนทางสองแพร่ง. Update 15(2543) : 51-58.

สุชาต อุดมโสภกิจ และ ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. GMOs มหันตภัยจากน้ำมือมนุษย์จริงหรือ (1). For quality 6(2543) : 159-163.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. พันธุวิศวกรรมด้านพืชกับจีเอ็มโอ. สุกัญญา สุนทรส, วิเชียร ริมพณิชยกิจ (บรรณาธิการ), จีเอ็มโอ: สิ่งมีชีวิตแต่งพันธุ์, 21-29. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เลี่ยงเชียง , 2543.

เสาวนีย์ ก่อวุฒิกุลรังษี. GMOs ในประเทศ. รูสมิแล 20(กันยายน-ธันวาคม 2533) : 61-65.

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. เทคโนโลยีชีวภาพ: พัฒนาการศักยภาพการใช้ประโยชน์ และข้อควรคำนึง. เอกสารประกอบการบรรยาย โครงการการศึกษาต่อเนื่อง หลักสูตร "วิสัยทัศน์: คลื่นลูกที่ 3 และ 4" รุ่นที่ 4 ระหว่าง วันที่ 18-20, 25-26 สิงหาคม 2543 ณ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์ กทม. 10240. 19 หน้า.

Allmann, M., Candrian, U., and Luthy, J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunological methods assuring safety and quality of food: detection of wheat-contamination in non-wheat food products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 196(1993) : 248-251 A.

Allmann, M., Hofelein, Ch., Koppel, E., Luthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmuller, B., and Candrian, U. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. Res. Microbiol. 146(1995) : 58-97 A.

Andras, B.P. Application of polymerase chain reaction (PCR) in veterinary virology (equine herpesvirus type1, bovine leukaemia virus, equine arteritis virus). Thesis (FIL.DR)-Sveriges Lantbruksuniversitet (Sweden), 1995.

Beck, E., Ludwig, E.A., Auerswald, B., and Schaller, H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycis phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19(1982) : 327-336.

De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montague, M., and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids-encoded octopine synthase gene. J. Molecular Applied Genetics 1(1993) : 499-511.

Draper, J., and Scott, R. Plant Biotechnology. 1st ed. New York : Blackie and Son, Chapman and Hall, 1991.

Duijin, G., Biert, R., Bleeker-Marcelis, H., Peppelman, H., and Hessing, M. Detection methods for genetically modified crops. Food Control 10(1999) : 375-378.

Erlich, H.A. PCR technology principles and applications for DNA amplification. 1st ed. The United Kingdom : United States and Canada by Stockton Press, 1989.

Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L., and Fraley, R.T. Selectable marker genes: safe for plants? Bio/technology 10(1992) : 141-144.

Gilbert, J. Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs. Food Control 10(1999) : 363-365.

Hemmer, W., BATS Report 2/97: Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. Basel, ISSN 1420-228X, 1997.

Hubner, P., Studer, E., and Luthy, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. Food Control 10(1999) : 353-358.

Hubner, P., Studer, E., Hafliger, D., Stadler, M., Wolf, C., and Looser, M. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. Accreditation and Quality Assurance 4(1999) : 292-298.

Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., and Engel, K.H. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 206(1998) : 203-207.

Jones, J.D.G., Shlumukov, L., and Carland, F. Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. Transgenic Research 1(1992) : 285-297.

Kuiper, H.A. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. Food Control 10(1999) : 339-349.

Lindahl, T., and Nyberg, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 11(1972) : 3610-3617.

Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362(1993) : 709-715.

Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K., and Pauwels, J. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soybeans and maize. Food Control 10(1999) : 379-383.

Lipp, M., Bluth, A., Ryquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., and Anklam, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. European Food Research and Technology 212(2001) : 497-504.

Luthy, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. Food Control 10(1999) : 359-361.

Marguet, E., and Forterre, P. Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. Extremophiles 2(1998) : 115-122.

Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., and Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. J. Food Hygienic Society of Japan 40(1999) : 149-157 A.

McElroy, D., and Brettel, R.I.S. Foreign gene expression in transgenic cereals. Trends in Biotechnology 12(1994) : 62-68.

Meyer, R. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the FLAVR SAVR tomato as an example. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 201(1995) : 583-586 A.

Meyer, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 10(1999) : 391-399.

Meyer, R., Chardonnens, F., Hubner, P., and Luthy, J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 203(1996) : 339-344 A.

Niederhauser, C., Gilgen, M., and Meyer, R. Genetically engineered food plants: research and detection with DNA-analytical methods. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 87(1996) : 307-367.

Parkes, H. Food for thought [online]. 1999. Available from: http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_may99.htm[2001, June 20].

Pauli, U., Liniger, M., and Zimmermann, A. Detection of DNA in soybean oil. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 207(1998) : 264-267 A.

Popping, B. Methods for the detection of detection of genetically modified organisms: precision, pitfalls, and proficiency. American Laboratory 33(2001) : 70-80.

Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., and Rasmussen, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. International Journal of Food Microbiology 17(1992) : 37-45.

Ryan, A., and Ho, M.W. Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation [online]. 2001. Available from: http://www.mindfully.Org/GE/DNA-Fragmentation_Ryan_Ho.htm[2001, June 20].

Sambrook, J., Maniatis, T. and Frisch, E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Habor Laboratory Press,1989.

Scheriber, G.A. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. Food Control 10(1999) : 351-352.

Spoth, B., and Strauss, E. Screening for genetically modified organisms in food using Promega's Wizard® resin [online]. 2000. Available from: http://www/promega.com[2000, August 2].

Stave, J.W. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. Food Control 10(1999) : 367-374.

Straub, J.A., Hertel, C., and Hammes, W. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. European Food Research and Technology 210(1999) : 62-67.

Suzuki, T., Ohsumi, S., and Makino, K. Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. Nucleic Acids Research 22(1994) : 4997-5003.

Thompson, C.J., Movva, N.R., and Tizard, R. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygrscopicus. EMBO Journal 6(1987) : 2519-2523.

Vodkin, L.O., Thodes, P.R. and Goldberg, R.B. Ca *lectin* gene insertion has the structural features of a transposable element. Cell 34(1983) : 734-737.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., and Kroath, H. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 47(1999) : 5038-5043.

Wolf, C., Scherzinger, M., Wurz, A., Pauli, U., Hubner, P., and Luthy, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35s-promoter screening results. European Food Research and Technology 210(2000) : 367-372.

Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Preifer, C., and Willmund, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. Food Control 10(1999) : 385-389.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. การจำลองการทำน้ำนมถั่วเหลืองประยุกต์จากวิธีของ วันชัย สมชิต, 2527

1. ในการทำน้ำนมถั่วเหลือง ชั่งเมล็ดถั่วเหลืองในปริมาณ 500 กรัม และในแต่ละการทดลองสุ่มตัวอย่างถั่วเหลืองตัวอย่างละ 50 กรัม

2. นำเมล็ดถั่วเหลืองที่สุ่มได้ ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร นาน 2 นาที

3. แช่เมล็ดถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 100°ซ และปล่อยทิ้งให้เย็นตามธรรมชาติเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดถั่วเหลืองนิ่มตัวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยอัตราส่วนของถั่วต่อน้ำกลั่นปลอดเชื้อไม่น้อยกว่า 1 ต่อ 3

4. ภายหลังจากการแช่ถั่วเหลืองแล้วคัดเอาเฉพาะถั่วเหลืองไว้ และลอกเปลือกจากเมล็ด

5. นำถั่วที่ได้มาบดในเครื่องบดให้ละเอียด ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อด้วยเครื่องบดอาหารอัตโนมัติ (homogenizer) โดยอัตราส่วนของน้ำกลั่นปลอดเชื้อต่อถั่วเหลืองหลังจากบดแล้วคือ 10 ต่อ 1

6. กรองเอากากถั่วเหลืองออกโดยใช้ผ้าขาวบาง

7. นำน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้มาต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที

8. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิคงที่ (70-80°ซ) ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิตลอดระยะเวลา 20 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การจำลองวิธีการทำซีอิ้วประยุกต์จากวิธีของ วันชัย สมชิต, 2527

2.1 การเตรียมถั่วเหลือง

2.1.1 ชั่งเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัม

2.1.2 นำถั่วเหลืองที่ได้มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร พร้อมคัดเลือกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก

2.1.3 แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 200 มิลลิลิตร เพื่อให้นิ่มตัวเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

2.1.4 นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้ไปต้มให้เดือด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.1.5 นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มแล้วมาสะเด็ดน้ำบนผ้าขาวบาง แล้วปล่อยให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง

2.2 การคลุกกับแป้ง

นำถั่วเหลืองที่ต้มแล้วผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วมาคลุกกับแป้งสาลีในปริมาณ 175 กรัม และหัวเชื้อรา *Aspergillus oryzae* 0.5 กรัม ต่อน้ำหนักถั่วเหลือง 500 กรัม

2.3 การเลี้ยงเชื้อบนลูกแป้งและถั่วเหลือง หรือที่เรียกว่า ขั้นโคจิ (Koji)

นำถั่วเหลืองที่คลุกกับแป้งและหัวเชื้อราแล้วมาเกลี่ยลงบนกระด้งไม้ไผ่ให้มีความหนาประมาณ 1-1.5 นิ้ว แล้ววางบนชั้นที่มีอากาศถ่ายเท ทิ้งไว้โดยไม่มีการรบกวน 5-7 วัน ระหว่างนั้นควรพลิกกลับแผ่นลูกแป้งสัก 2-3 ครั้ง ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือระยะก่อนที่เชื้อราจะสร้างสปอร์เนื่องจากเป็นระยะที่เชื้อสร้างเอนไซม์มากที่สุด โดยสังเกตจากสีบนแผ่นลูกแป้งกับถั่วที่มีลักษณะสีเหลืองแกมเขียวและสีเทาขึ้นปกคลุม ไม่ควรมีราดำปะปน

2.4 การนำลูกแป้งและถั่วเหลืองที่เลี้ยงเชื้อแล้วไปหมัก หรือที่เรียกว่า ขั้นโมโรมิ (Moromi)

หลังจากผ่านการเลี้ยงเชื้อจนได้ที่แล้วลูกแป้งและถั่วเหลืองจะมีลักษณะเป็นแผ่นแห้ง นำตัวอย่างที่ได้ในขั้นตอนนี้เรียงใส่ขวดและเติมน้ำเกลือ 22 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรน้ำเกลือที่ใส่ให้เป็น 2 เท่าของลูกแป้งและถั่วเหลืองที่เลี้ยงในชั้นโคจิ นำไปหมักต่อโดยใช้ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 30 ,60, 90, 120, 150 และ 180 วัน

3. **การจำลองวิธีการทำเต้าเจี้ยวประยุกต์จากวิธีของ วันชัย สมชิต**, 2527

การทำเต้าเจี้ยวมีวิธีการเช่นเดียวกับการจำลองวิธีการทำซีอิ้ว ต่างกันในช่วงอัตราส่วนของน้ำเกลือจะอยู่ที่อัตราส่วนไม่เกิน 1 ต่อ 1 ของลูกแป้งและถั่วเหลืองที่เลี้ยงเชื้อในขั้นโคจิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดถั่วเหลืองและตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป

1.1 **การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานของเยอรมัน** (Meyer, 1999) มีรายละเอียดของขั้นตอนการสกัดดังนี้

1) บดเมล็ดถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องบดจนละเอียด

2) นำตัวอย่างที่บดแล้วปริมาณ 150 มิลลิกรัม หรือตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลวปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม CTAB buffer (2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 1M Tris-HCl, pH 8.0) 600 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 30 นาที

4) สกัดด้วยฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol:chloroform: isoamylalcohol 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5) ใช้ปิเปตดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform:isoamylaichol 24:1) 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

6) ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม iso-propanol ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของน้ำใส ผสมให้เข้ากันและกลับหลอดไปมาเบา ๆ

7) นำตัวอย่างไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 15 นาที

8) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

9) นำตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้ง

10) ตากตะกอนที่ได้ให้แห้งใน vacuum desiccator และนำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

11) เติม RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

12) สกัดซ้ำด้วย CTAB buffer 200 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

13) ใช้ปิเปตดูดส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ ตกตะกอนอีเอ็นเอโดยเติม iso-propanol ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

14) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 15 นาที

15) นำมาปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

16) นำตะกอนมาล้างด้วย 70%Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นให้ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

17) ตากตะกอนที่ได้ให้แห้งด้วย vacuum desiccator และนำตะกอนที่ได้มาละลายใน TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานของสวิสเซอร์แลนด์ (Spoth และ Strauss, 2000) มีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหาร

1) บดตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปในรูปเมล็ดถั่วเหลืองจนละเอียด เก็บตัวอย่างปริมาณ 150 มิลลิกรัม หรือตัวอย่างอาหารในรูปของเหลวปริมาตร 300 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) เติม extraction buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1%SDS) 860 ไมโครลิตร สารละลาย 5M guanidine HCl 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) เติมเอ็นไซม์ proteinase K (20 mg/ml) 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง

4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เขย่าให้เข้ากันตลอดเวลาโดยใช้ shaking water bath

5) นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ปั่นได้ไว้สำหรับขั้นตอนต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 การจับดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเรซินสังเคราะห์

1) ต่อ column เข้ากับ manifolds โดยให้วาล์วของ manifolds อยู่ในตำแหน่งปิด

2) ต่อ syringe โดยดึงแกนสำหรับใช้ดันออกเข้ากับ column ระวังอย่าให้แกนหลอด syringe สัมผัสกับสิ่งต่างๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

3) เติมสารละลายเรซินสังเคราะห์ที่เขย่ากันดีแล้วลงสู่ syringe ที่เตรียมไว้หลอดละ 1 มิลลิลิตร

4) นำส่วนใสที่ปั่นได้ในข้อ 2.2.1 ข้อ6) มาผสมรวมกับสารละลายเรซินที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน

5) เปิดวาล์วของ manifolds ให้อยู่ในตำแหน่งเปิด และเพิ่มแรงดันโดยเสียบแกนหลอดลงใน syringe แล้วกดลงช้าๆ เพื่อดันให้สารผสมเข้าสู่ column

6) เมื่อสารผสมเข้าสู่ column หมดแล้วให้ล้าง column โดยการเติมสารละลาย 80%iso-propanol 2.1 มิลลิลิตร เพิ่มแรงดันอีกครั้งจนสารละลายเข้าไปล้าง column จนหมด

7) นำ column ที่ได้วางบนหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ไม่ปิดฝา ปั่นให้แห้งด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

8) ย้าย column ไปไว้บนหลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้ออุณหภูมิ 70°ซ 100 ไมโครลิตร ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

9) นำ column ไปปั่นเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการออกโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

10) เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20°ซ เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอสามารถทำได้พร้อมๆ กันโดยวิธี optical method ซึ่งเป็นวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีขั้นตอนดังนี้

1) นำสารละลายดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ใน TE buffer มาเจือจางในสภาพที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

2) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นมาตรฐาน (Blank)

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260, 280 และ 320 นาโนเมตร

4) นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตรดังนี้

$1\ OD_{260\ nm} = 50$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

หรือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ($\mu g/ml$) = $OD_{260nm} \times 50 \times$ dilution factor

5) ตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยดูอัตราส่วนของค่า OD_{260nm}/OD_{280nm} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ ถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในสารละลายดีเอ็นเอมี RNA ปนอยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

สารเคมีและบัฟเฟอร์

Phenol : Chloroform (1:1, v/v)

Phenol	250 ml.
Chloroform	250 ml.

0.1 M Tris-HCl, pH 7.6

เตรียมเสร็จแล้วเก็บในขวดสีชา

Chloroform : Isoamylalcohol (24:1, v/v)

Chloroform	24	ml.
Isoamylalcohol	1	ml.

CTAB extraction buffer

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	4	g.
1 M Tris-HCl, pH 8.0	20	ml.
0.5 M EDTA	8	ml.
5 M NaCl	56	ml.

ปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ครบ 200 ml.

*** CTAB ไม่สามารถ autoclave ได้

70% ethanol

Absolute ethanol (99.5%)	703.52 ml.
DW autoclave	296.48 ml.

0.5 M EDTA, pH 8.0

1 M Tris-HCl, pH 8.0	10	ml.
0.5 M EDTA	1	ml.

ปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ครบ 1000 ml.

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไป autoclave

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TAE buffer (50x)

Tris base	242 g.
Glacial acetic acid	57.1 ml.
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml.

ปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ครบ 1000 ml.

1 M Tris-HCl, pH 8.0

Tris	121.1 g.

ปรับความเป็นกรดด่างให้มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ด้วย conc. HCl

ปรับปริมาตรโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนครบ 1000 ml.

เตรียมเสร็จนำไป autoclave

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CAATGCCATCGTATCGTGTCACAATGGAATACAGCAATGAACAAATGCTATCCTCTTGAGAAA 63

AGTGAAATGCAGCAGCAGCAGCAGACTAGAGTGCTACAAATGCTTATCCTCTTGAGAAAAGT 125

GAAATGCAGCGGCAGCAGACCTGAGTGCTATATACAATTAGACACAGGGTCTATTAATTGAA 187

ATTGTCTTATTATTAAATATTTCGTTTTATATTAATTTTTTAAATTTTAATTAAATTTATATATATTATA 257

TTTAAGACAGATATATTTATTTGTGATTATAAATGTGTCACTTTTTCTTTTAGTCCATGTATTCTTC 324

TATTTTTTCAATTTAACTTTTTATTTTTATTTTTAAGTCACTCTGATCAAGAAAACATTGTTGACATA 392

AAACTATTAACATAAAATTATGTTAACATGTGATAACATCATATTTTACTAATATAACGTCGCATT 458

TTAACGTTTTTTTAACAAATATCGACTGTAAGAGTAAAAATGAAATGTTTGAAAAGGTTAATTGC 523

ATACTAACTATTTTTTTTCCTATAAGTAATCTTTTTTGGGATCANNTGTATATCATTGAGATACGA 589

TATTAAATATGGGTACCTTTTCACAAAACCTACCCTTGTTAGTCAAACCACACATAAGAGAGGA 653

TGGATTTAAACCAGTCAGCACCGTAAGTATATAGTGAAGAAGGCTGATAACACACTCTATTATT 717

GTTAGTACGTACGTATTTCCTTTTTTGTTTAGTTTTTGAATTTAATTAATTAAAATATATATGCTAAC 785

AACATTAAATTTTAAATTTACGTCTAATTATATATTGTGATGTATAATAAATTGTCAACCTTTAAAA 852

ATTATAAAAGAAATATTAATTTTGATAAACAACTTTTGAAAAGTACCCAATAATGCTAGTATAAAT 918

Le0 →

AGGGGCATGACTCCCCATGCATCACAGTGCAATTTAGCTGAAGCAAA**GCAATGGCTACTTCA** 980

AAGTTGAAAACCCAGAATGTGGTTGTATCTCTCTCCCTAACCTTAACCTTGGTACTGGTGCTAC1044

TGACCAGCAAGGCAAACTCAGCGGAAACTGTTTCTTTCAGCTGGAACAAGTTCGTGCCGAAG 1106

CAACCAAACATGATCCTCCAAGGAGACGCTATTGTGACCTCCTCGGGAAAGTTACAACTCAA 1168

GM03 →

TAAGGTTGACGAAAACGGCACCCCAAAACCCTCGTCTCTTGGTCGC**GCCCTCTACTCCACCC**1230

← Le1

CCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTG**CCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTC** 1292

← GM04

ACCTTCTATGCCCCT**GACACAAAAAGGCTTGCAGATGGGCT**TGCCTTCTTTCTCGCACCAATT 1355

GACACTAAGCCACAAACACATGCAGGTTATCTTGGTCTTTTCAACGAAAACGAGTCTGGTGAT 1418

CAAGTCGTCGCTGTTGAGTTTGACACTTTCCGGAACTCTTGGGATCCACCAAATCCACACAT 1480

CGGAATTAACGTCAATTCTATCAGATCCATCAAAACGACGTCTTGGGATTTGGCCAACAATAA 1543

AGTAGCCAAGGTTCTCATTACCTATGATGCCTCCACCAGCCTCTTGGTTGCTTCTTTGGTCTA 1606

CCCTTCACAGAGAACCAGCAATATCCTCTCCGATGTGGTCGATTTGAAGACTTCTCTTCCCG 1668

AGTGGGTGAGGATAGGGTTCTCTGCTGCCACGGGACTCGACATACCTGGGGAATCGCATG 1728

Le2

ACGTGCTTTCTTGGTCTTTTGCTTCCAATTTGCCACAC<u>GCTAGCAGTAACATTGATCCTTTGG</u> 1791

ATCTTACAAGCTTTGTGTTGCATGAGGCCATCTAAATGTGACAGATCGAAGGAAGAAAGTGT 1853

AATAAGACGACTCTCACTACTCGATCGCTAGTGATTGTCATTGTTATATATAATAATGTTATCT 1917

TTCACAACTTATCGTAATGCATTGTGAAACTATAACACATTTAATCCTACTTGTCATATGATAA 1981

CACTCTCCCCATTTAAAACTCTTGTCAATTTAAAGATATAAGATTCTTTAAATGATTAAAAAAAA 2046

TATATTATAAATTCAATCACTCCTACTAATAAATTATTAATTAATATTTATTGATTAAAAAAATAC 2112

TTATACTAATTTAGTCTGAATAGAATAATTAGATTCTAGA 2152

รูปที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ของถั่วเหลือง สำหรับออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของเมล็ดถั่วเหลืองและอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่สกัดได้

ที่มา : GeneBank accession no. K00821

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุนีย์ ลิ้มศรีวาณิชยกร เกิดวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2521 ที่โรงพยาบาลยศเส เขตป้อมปราบศัตรูพ่าย จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2545

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย