

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากมะละกอ ผลไม้ภัณฑ์มะละกอและการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

เมื่อนำมะละกอและผลไม้ภัณฑ์มะละกอแปรรูปมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานทั้งของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์และรัฐบาลเยอรมัน โดยเริ่มจากปริมาณน้ำหนักเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันในผลไม้ภัณฑ์ทั้ง 4 รูปแบบ คือ มะละกอสด 300 มิลลิกรัม ส่วนมะละกออบแห้ง มะละกอในโยเกิร์ต และมะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อมในรูปน้ำหนักแห้ง 300 มิลลิกรัม พบว่า

##### 1. มะละกอสด

ปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถสกัดได้จากมะละกอสดประเมินจากค่าความเข้มข้น ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันอ้างอิงจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรมีค่าแปรผันในช่วง 0.0325-0.0482 เมื่อนำมาคำนวณได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.65-0.96  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  โดยมีดีเอ็นเอรวม 19.5-28.92  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่าง ขณะที่เมื่อใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์จะได้ดีเอ็นเอที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0207-0.0255 และเมื่อคำนวณปริมาณได้ดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.414-0.510  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  หรือ 12.42-15.30  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่างสังเกตได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์มีค่าต่ำกว่าวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมัน

เมื่อพิจารณาผลดีเอ็นเอที่สกัดได้ในเชิงคุณภาพทั้งจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรและอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอตามมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร ในช่วง 0.0083-0.0194 และอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.4976-1.684 ขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรต่ำกว่าโดยพบค่าอยู่ในช่วง 0.0065-0.0123 โดยที่อัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.617-1.795 การประเมินจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร และอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์มีคุณภาพดีกว่าวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมัน (ดูตารางที่ 1 ประกอบ)

ผลการทดลองการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอสด พบว่า รูปแบบของตัวอย่างมีผลต่อการสกัดโดยการใช้ตัวอย่างในรูปใบสดจะให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าการใช้เมล็ดสดและการใช้ผลสุก

## 2. มะละกอบแห้ง

เนื่องจากไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากตัวอย่างมะละกอแปรรูปโดยตรงได้ ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์มะละกอทั้งหมดมาทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำเสียก่อน

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากมะละกอบแห้งด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมัน ให้ผลดีเอ็นเอที่สกัดได้ในรูปค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0177- 0.6283 และเมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้น ได้ดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.7026-12.566  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  โดยมีดีเอ็นเอรวม 21.07-376.58  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่าง ขณะที่การสกัดด้วยวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ดีเอ็นเอที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0190-0.2290 และเมื่อนำมาคำนวณได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.3801-10.832  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  โดยมีดีเอ็นเอรวม 11.40-324.96  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่าง สังเกตได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ยังคงต่ำกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมัน

และเมื่อดำเนินการประเมินผลดีเอ็นเอที่สกัดได้ในเชิงคุณภาพ พบว่า เมื่อใช้วิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมัน ได้ดีเอ็นเอที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0141-0.1186 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.01-2.49 ขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ได้ดีเอ็นเอที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0071-0.0918 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.50 -1.87 โดยสรุปจะพบว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ดีกว่าดีเอ็นเอที่ใช้วิธีสกัดของรัฐบาลเยอรมัน (รายละเอียดดังตารางที่ 1)

## 3. มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม

ดีเอ็นเอที่สามารถสกัดได้จากมะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อมแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0136-0.1560 เมื่อนำมาคำนวณได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.2734-3.1202  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  โดยได้ดีเอ็นเอรวม 8.20-9.36  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่าง ขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ได้ดีเอ็นเอที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0365-0.3141 เมื่อนำมาคำนวณได้

ความเข้มข้นดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.73-6.28  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  จะได้ดีเอ็นเอรวม 21.91-188.46  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่าง จะพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์เฉพาะมะละกอกระป๋อง ในน้ำเชื่อมปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงกว่าวิธีการสกัดของรัฐบาลเยอรมัน

เมื่อประเมินผลดีเอ็นเอที่สกัดได้ในเชิงคุณภาพด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันให้ค่าแปรผันในช่วง 0.0211-0.1182 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.99-2.2 ขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0070-0.0463 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.40-1.79 ซึ่งคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ดีกว่าวิธีการสกัดของรัฐบาลเยอรมัน

#### 4. มะละกอในโยเกิร์ต

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะละกอในโยเกิร์ตด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมัน ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0198-0.0832 และเมื่อคำนวณได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.39-1.66  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  และได้ดีเอ็นเอรวม 11.88-49.92  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่างขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0209-0.1267 เมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอแปรผันในช่วง 0.41-2.53  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  จะได้ดีเอ็นเอรวม 12.49-76.07  $\mu\text{g}$  ต่อตัวอย่างปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สูงกว่าวิธีการสกัดของรัฐบาลเยอรมัน

สำหรับคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่า ตัวอย่างกลุ่มมะละกอในโยเกิร์ตวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันให้ดีเอ็นเอที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0257-0.0589 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.10-1.26 ขณะที่วิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตรแปรผันในช่วง 0.0119-0.0332 และมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 แปรผันในช่วง 1.59-1.79 ซึ่งคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ดีกว่าวิธีการสกัดของรัฐบาลเยอรมัน

เมื่อนำผลการทดลองเปรียบเทียบโดยรวม พบว่า จากน้ำหนักแห้งเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี แม้จะมีอัตราส่วนของค่า OD ที่ 260 ต่อ 280 มีค่าแปรผันแตกต่างกันก็ตาม แต่โดยรวมให้ค่าอัตราส่วน OD ที่ 260 ต่อ 280 ใกล้เคียง 1.65-1.85 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่มีคุณภาพ

(รายละเอียดดูตารางที่ 1) ขณะที่เมื่อใช้วิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมันแม้จะได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่า แต่เมื่อพิจารณาในแง่คุณภาพจะพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีส่วนที่เป็นโมเลกุลปนเปื้อนค่อนข้างมากตามไปด้วย

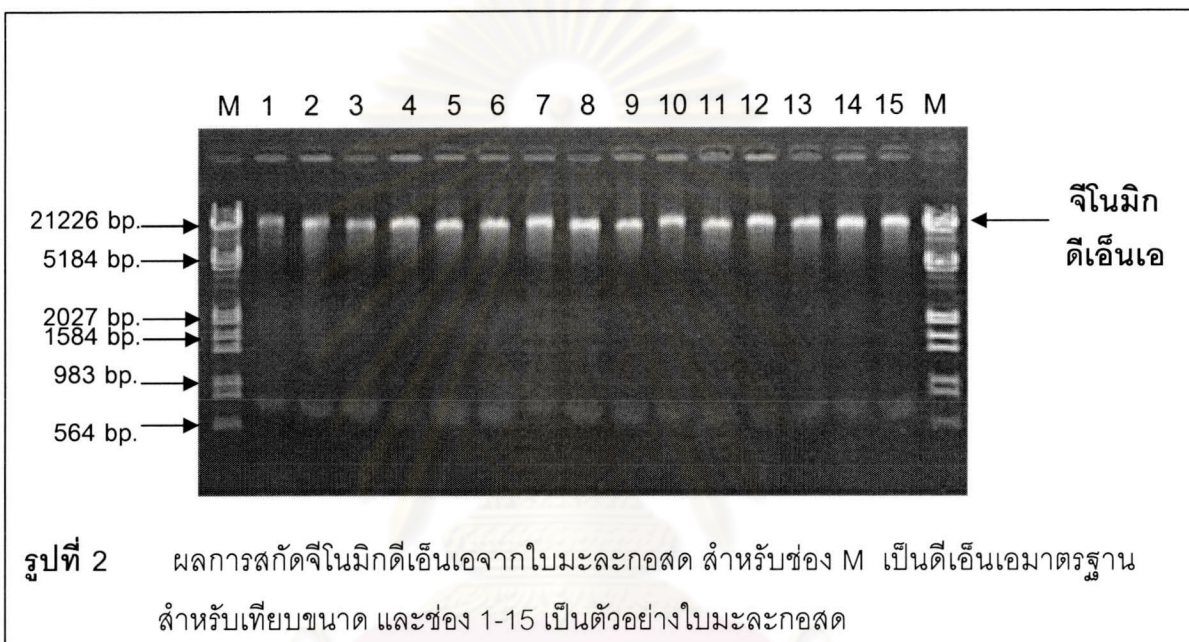
**ตารางที่ 1** ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มมะละกอและผลิตภัณฑ์แปรรูป

ผลิตภัณฑ์	วิธีมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอ									
	รัฐบาลเยอรมัน					รัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์				
	260	280	320	ความเข้มข้น (µg/µl)	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>	260	280	320	ความเข้มข้น (µg/µl)	OD <sub>260</sub> / OD <sub>280</sub>
1. มะละกอสด										
1.1 ใบ	0.0482	0.0286	0.0083	0.96	1.68	0.0255	0.0142	0.0107	0.51	1.79
1.2 เมล็ด	0.0342	0.0215	0.0157	0.68	1.59	0.0248	0.0152	0.0065	0.49	1.63
1.3 ผล	0.0325	0.0217	0.0194	0.65	1.49	0.0207	0.0128	0.0123	0.41	1.61
2. มะละกออบแห้ง										
2.1 ชนิดที่ 1	0.6283	0.2754	0.1186	12.56	2.28	0.0190	0.0102	0.0124	0.38	1.84
2.2 ชนิดที่ 2	0.3012	0.1312	0.0532	6.02	2.29	0.0252	0.0146	0.0122	0.50	1.71
2.3 ชนิดที่ 3	0.0360	0.0144	0.0141	0.72	2.49	0.1565	0.0961	0.0498	3.13	1.62
2.4 ชนิดที่ 4	0.1908	0.0914	0.0463	3.81	2.08	0.0632	0.0405	0.0153	1.26	1.55
2.5 ชนิดที่ 5	0.2880	0.1511	0.0931	5.76	1.89	0.1537	0.1011	0.0612	3.07	1.51
2.6 ชนิดที่ 6	0.1005	0.0878	0.0700	2.01	1.14	0.0234	0.0148	0.0071	0.46	1.57
2.7 ชนิดที่ 7	0.0442	0.0337	0.0221	0.88	1.31	0.1481	0.0906	0.0468	2.96	1.63
2.8 ชนิดที่ 8	0.0714	0.0514	0.0302	1.42	1.38	0.1002	0.0534	0.0342	2.00	1.87
2.9 ชนิดที่ 9	0.1094	0.0946	0.0726	2.18	1.15	0.0637	0.0423	0.0236	1.27	1.50
2.10 ชนิดที่ 10	0.1267	0.1033	0.0773	2.53	1.22	0.2084	0.1200	0.0208	4.16	1.73

2.11 ชนิดที่ 11	0.0228	0.0206	0.0222	0.45	1.10	0.5416	0.2916	0.0918	10.83	1.85
2.12 ชนิดที่ 12	0.0351	0.0256	0.0143	0.70	1.37	0.2290	0.1423	0.0805	4.58	1.60
2.13 ชนิดที่ 13	0.0430	0.0425	0.0429	0.86	1.01	0.0443	0.0260	0.0241	0.88	1.70
2.14 ชนิดที่ 14	0.0177	0.0150	0.0155	1.18	1.18	0.0298	0.0196	0.0151	0.59	1.51
3. มะละกอ กระป๋องใน น้ำเชื่อม										
3.1 ชนิดที่ 1	0.1560	0.0782	0.7306	3.12	1.99	0.0365	0.0203	0.0463	0.73	1.79
3.2 ชนิดที่ 2	0.0148	0.0067	0.0211	0.29	2.20	0.0702	0.0448	0.0070	1.40	1.56
3.3 ชนิดที่ 3	0.0136	0.0065	0.0783	0.27	2.10	0.3141	0.1791	0.0111	6.28	1.75
3.4 ชนิดที่ 4	0.1262	0.0630	0.1182	2.52	2.00	0.2495	0.1779	0.0331	4.99	1.40
4. มะละกอใน โยเกิร์ต										
4.1 ชนิดที่ 1	0.0832	0.0751	0.0589	1.66	1.10	0.1267	0.0705	0.0332	2.53	1.79
4.2 ชนิดที่ 2	0.0198	0.0145	0.0257	0.39	1.36	0.0209	0.0130	0.0119	0.41	1.59

จากตัวอย่างอาหาร เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะละกอที่จำหน่ายเป็นการค้า ด้วยวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมัน ผลลัพธ์ที่ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอจากมากไปน้อย ได้แก่ มะละกออบแห้ง มะละกอสด มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม และมะละกอในโยเกิร์ต ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันวิธีมาตรฐานสวิสเซอร์แลนด์ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์เรียงจากมากไปน้อยเป็น มะละกออบแห้ง มะละกอสด มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม และมะละกอในโยเกิร์ต ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเยอรมัน และคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานรัฐบาลเยอรมันเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ มะละกอสด มะละกออบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม และมะละกอในโยเกิร์ต ขณะที่วิธีมาตรฐานรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพเรียงจากไปน้อย ได้แก่ มะละกอสด มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกออบแห้ง และมะละกอในโยเกิร์ต

สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมะละกอสดจากแปลงปลูกด้วยชุด Genome Direct to View พบว่า สามารถสกัดจีโนมดีเอ็นเอได้จากทุกตัวอย่างโดยมีคุณภาพและระดับปริมาณดีเอ็นเอพิจารณาจากความเข้มและคุณภาพของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลใกล้ำเคียวกัน อย่างไรก็ตามการทดลองไม่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการแยกจีโนมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นดังรูปที่ 2 จากการทดลองพบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส่วนใหญ่ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพและปริมาณมากพอในการนำไปตรวจในขั้นตอนต่อไป



สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากผงดัวเหลืองดัดแปรพันธุกรรมและจากผลไม้อื่น และการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะละกที่เป็นโรค เนื่องจากการสกัดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการโคลนและการตรวจสอบอื่นจึงมิได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงครบทุกตัวอย่าง

## 4.2 การพัฒนาระบบการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

### 4.2.1 ศึกษาโครงสร้างของชุดยีนที่พบ

การพัฒนาระบบการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอเริ่มจากการสำรวจข้อมูลของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดที่มีรายงานเฉพาะเป็นการค้าและอยู่ในระหว่างดำเนินการเพื่อตรวจสอบชุดยีนที่เกี่ยวข้อง จากการตรวจสอบโครงสร้างของชุดยีนที่เกี่ยวข้องในกรณีของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่เป็นการค้าและอยู่ในระหว่างวิจัย 4 กรณี โดยแต่ละกรณีมีโครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องเป็นดังตารางที่ 2

## ตารางที่ 2 โครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

สายพันธุ์	ยีนที่ใช้ในการคัดเลือก	โปรโมเตอร์	ยีนเป้าหมาย	เทอร์มิเนเตอร์
1. SunUp (USA)	NPTII, GUS	CaMV 35S promoter	ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ HA 5-1	NOS terminator
2. Rainbow(USA)	NPTII, GUS	CaMV 35S promoter	ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ HA 5-1	NOS terminator
3.Taiwan	NPTII, GUS	CaMV 35S promoter	ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ YK	NOS terminator
4. Thailand	GUS	CaMV 35s promoter	ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ของไทย	NOS terminator

จากตารางพบโครงสร้างที่ใช้ในการคัดเลือก 2 รูปแบบ ได้แก่ การใช้ยีน GUS เป็นหลักหรือการใช้ยีน NPT II เป็นหลัก โดยมีโปรโมเตอร์ในรูป 35S promoter, ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และ NOS terminator โดยมีการเรียงตัวของโครงสร้างของยีน เป็นดังรูปที่ 3

NPT II CaMV 35S promoter 5' UT ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ HA 5-1 GUS NOS terminator

--	--	--	--	--	--

NPT II CaMV 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ YK GUS NOS terminator

--	--	--	--	--

GUS CaMV 35S promoter (ATG) ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสายพันธุ์ไทย NOS terminator

--	--	--	--

### รูปที่ 3 โครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ในส่วนของ 35S promoter พบรายงานการใช้โดเมนของโปรโมเตอร์สมบูรณ์มีขนาดไม่น้อยกว่า 350 นิวคลีโอไทด์ ส่วน NOS terminator ได้จากแหล่งของพลาสมิดที่ให้ลำดับนี้

วคลีไอโหดข์ของ NOS terminator ทั้ซุด 300 นืวคลีไอโหดข์ ฆณะเดียวกันนัสนัของยึนโปรตีน เปลือกหุ้มจะพบบริเวนหลักไกล้เดียงกับขนาดความยวเดีม (full length) ของยึนโปรตีนเปลือกหุ้มนั้

#### 4.2.2 เปรียบเทียบล้าดับนืวคลีไอโหดข์ของยึนที่เกียวฆ้องหลักนัซุด โครงสร้าง

##### การสืบคั้นข้อมูลของยึนพาเพน

จากการทดลองพบรายงานยึนพาเพนนัฐานข้อมูล 3 ฆ้อมูล โดยพบว่ายึนพาเพนที่ไต้ 1 ซนิตที่มีขนาด 1048 นืวคลีไอโหดข์ และ 2 ซนิตที่มีขนาด 1292 นืวคลีไอโหดข์ มีรายละเดียดเป็นดังตารางที่ 3

##### ตารางที่ 3 ล้าดับนืวคลีไอโหดข์ของยึนพาเพนจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ

accession number	Definitions	Nucleotides (bp)
M15203	Carica papaya papain, complete sequence.	1292
M26974	Synthetic papaya papain, complete sequence.	1048
M15204	Carica papaya papain, complete sequence.	1292

เมือไต้ข้อมูลล้าดับนืวคลีไอโหดข์ของยึนพาเพนแล้วนำข้อมูลเหล่านั้เข้าโปรแกรม Clustal W ซึ่เป็นโปรแกรมจัตรูปแบบนัการเรียงล้าดับนืวคลีไอโหดข์เพือดูความเหมือนและความต่างของล้าดับนืวคลีไอโหดข์ (รายละเดียดดังรูปที่ 4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

...61                                     120...

M15203      ATGGGTTTGTCAATTTGGTGATTTTTCTATTGTGGGTTATTCTCAAATGACTTGACATCC....
M15204      ATGGGTTTGTCAATTTGGTGATTTTTCTATTGTGGGTTATTCTCAAATGACTTGACATCC....
M26974      ATGGGTTTGTCTTTCGGTGATTTCTCTATCGTGGGTTACTCTCAAACGACTTGACTTCC....

***** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** **
...

...301                                     360...

M15203      AATGATGAATTCAAAGAAAAGTATACTGGTCTATTGCTGGAAATTATACAACAACCGAA....
M15204      AATGATGAATTCAAAGAAAAGTATACTGGTCTATTGCTGGAAATTATACAACAACCGAA....
M26974      AACGATGAATTCAAAGAAAAGTACTACTGGTCTATTGCTGGCAACTACTACAACCGAA....

** ***** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** **

```

**รูปที่ 4** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพาเพนบริเวณใกล้เคียงกับที่ออกแบบไพรเมอร์ (ข้อมูลสมบูรณ์ได้จากผนวก ง)

ผลการทำ total alignment เปรียบเทียบตลอดทั้งสายของยีนพาเพนมีความเหมือน 6 โดเมน ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 7-35 61-88 154-178 311-341 352-377 919-947 เลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 61-88 สำหรับสาย forward และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 311-341 สำหรับสาย reverse เนื่องจากเป็นช่วงที่โดเมนมีความเหมือนมากที่สุด

จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละคู่ sequence ของ ยีนพาเพน พบว่า M15203 กับ M26974 มีความเหมือน 77% คู่ที่ M15204 กับ M26974 เหมือนกัน 77% เช่นเดียวกัน และคู่ที่ M15203 กับ M15204 มีความเหมือนกันสูงถึง 100% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละคู่สายพันธุ์ของยีนพาเพน

	M15203	M15204	M26974
M15203			
M15204	100		
M26974	77	77	

เมื่อนำโดเมนที่คัดเลือกได้ทำนายการตรวจสอบความจำเพาะด้วยการทำ BLAST n พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย forward ให้ผลการค้นหา local similarity ในลำดับต้นๆ เป็นยีนพาเพนจากมะละกอ โดยพบว่าทุกตำแหน่งบนไพรเมอร์จำนวน 28 นิวคลีโอไทด์ เหมือนกันกับยีนพาเพนที่ได้จาก *Carica papaya papain* จาก 28 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนทั้ง 28 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคิดเป็น 100% อย่างไรก็ตามการค้นหา local similarity ในอันดับถัดไปเป็นยีนจาก Human DNA sequence from clone RP4-674K6 on chromosome X แม้จะให้ความเหมือนกันถึง 100% ก็ตาม แต่พบว่ามีส่วนเหมือนกันของจำนวนนิวคลีโอไทด์เพียง 21 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น สำหรับผลการวิเคราะห์ local similarity ในอันดับที่ 3 เหมือนกับยีนในบริเวณ *Oryza sativa* chromosome12 โดยมีมีส่วนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 19 นิวคลีโอไทด์

สำหรับสาย reverse การวิเคราะห์ local similarity จากการทำ BLAST n ให้ผลอันดับแรกมีความเหมือนกับ *Carica papaya papain* จากจำนวนนิวคลีโอไทด์ 38 นิวคลีโอไทด์ เหมือนกันทั้ง 38 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคิดเป็น 100% และในอันดับที่ 2 มีความเหมือนกับ Synthetic papain gene ใน 37 นิวคลีโอไทด์ จาก 38 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็น 97% และในอันดับที่ 3 มีความเหมือนกับ *Homo sapiens* chromosome5 clone RP11-203G23 มีความเหมือนกันเพียง 22 นิวคลีโอไทด์ แม้จะคิดเป็น 100% ก็ตาม (รายละเอียดดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พาเพนด้วยการทำ BLAST n

Definitions	Nucleotide	Score (bits)	Identities	Strand
สาย forward				
Carica papaya papain, complete sequence.	1292	56.0 (28)	28/28 (100%)	plus/plus
Human DNA sequence from clone RP4-674K6 on chromosome X , complete sequence.	90286	42.1 (21)	21/21 (100%)	plus/minus
Oryza sativa chromosome12,, BAC OSJNBa0039K19 of library OSJNBa from chromosome12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice) , complete sequence.	104291	38.2 (19)	19/19 (100%)	plus/plus
สาย reverse				
Carica papaya papain, complete sequence.	1292	75.8 (38)	38/38 (100%)	plus/minus
Synthetic papain gene,complete sequence.	1048	67.9 (34)	37/38 (97%)	plus/minus
Homo sapiens chromosome5 clone RP11-203G23, complete sequence	62986	44.1	22/22 (100%)	plus/plus

จากนิวคลีโอไทด์ที่ 61-341 จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาด 280 นิวคลีโอไทด์

### การสืบค้นข้อมูลของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม

จากการรวบรวมและเปรียบเทียบข้อมูลพบรายงานจำนวนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มในกลุ่มที่สนใจในฐานข้อมูลทั้งหมด 26 สายพันธุ์ โดยยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ได้มีขนาดนิวคลีโอไทด์ต่างกันและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 6 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ พวกที่มีขนาด 974 1022 1045 1058 1064 และพวกที่มีขนาด 1088 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ โดยพบความแตกต่างส่วนใหญ่ในบริเวณใกล้กับระบบเริ่มของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม อย่างไรก็ตามในบริเวณของตัวยีนโปรตีนเปลือกหุ้มพบความแตกต่างของขนาดอันเกิดเนื่องจากการแทรกตัว (insertion) หรือการหลุดหายไป (deletion) เกิดขึ้นน้อยมาก ขณะที่ส่วนใหญ่ของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในรูปทรานซิชัน (transition) (รายละเอียดเป็นดังตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ

Accession number	Definitions	Nucleotides (bp)
AJ012099	papaya ringspot virus isolate Veracruz (VPO-28) Coat protein (CP) gene, partial sequence.	974
AJ012649	papaya ringspot virus isolate Veracruz (VTB-6) Coat protein (CP) gene, partial sequence.	1064
AF309968	papaya ringspot virus isolate Colima Coat protein (CP) gene, partial sequence.	1058
AF196839	papaya ringspot virus isolate HA 5-1 coat protein gene, partial sequence.	1022
AF319488	papaya ringspot virus isolate OxT-27 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319490	papaya ringspot virus isolate OxT-80 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319491	papaya ringspot virus isolate QrFT-1 coat protein gene, partial sequence.	1064

AF319492	papaya ringspot virus isolate QrFC-2 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319493	papaya ringspot virus isolate QrFC-3 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319494	papaya ringspot virus isolate TmCM-25 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319496	papaya ringspot virus isolate VrAl-18 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319497	papaya ringspot virus isolate VrCo-1 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319498	papaya ringspot virus isolate VrGZ-18 coat protein gene, partial sequence.	1064
AF319503	papaya ringspot virus isolate TbC-42 coat protein gene, partial sequence.	1058
AF319504	papaya ringspot virus isolate TbC-43 coat protein gene, partial sequence.	1058
AF319505	papaya ringspot virus isolate VrAc-27 coat protein gene, partial sequence.	1058
AF319506	papaya ringspot virus isolate VrCa-15 coat protein gene, partial sequence.	1058
AF319507	papaya ringspot virus isolate VrCo-7 coat protein gene, partial sequence.	1058
AY010712	papaya ringspot virus strain P isolate Bangkok coat protein gene, partial sequence.	1045
AY010713	papaya ringspot virus strain P isolate Chumporn coat protein gene, partial sequence.	1045

AY010715	papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi 1 coat protein gene, partial sequence.	1045
AY010716	papaya ringspot virus strain P isolate Chonburi 2 coat protein gene, partial sequence.	1045
AY010717	papaya ringspot virus strain P isolate Lab-mild coat protein gene, partial sequence.	1045
AY010718	papaya ringspot virus strain P isolate Lab-severe coat protein gene, partial sequence.	1088
AY010720	papaya ringspot virus strain P Chiangmai 2 isolate coat protein gene, partial sequence.	1045
AY010721	papaya ringspot virus strain P isolate Ratchaburi coat protein gene, partial sequence.	1045

จากการประเมินความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่า ตลอดทั้งยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสใบจุดวงแหวนในมะละกอทั้ง 26 สายพันธุ์ มีความเหมือนกัน 5 โดเมน ได้แก่ ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 7-33 144-169 310-332 427-452 782-807 เนื่องจากในช่วงกลางของลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันน้อยจึงเลือกเลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 7-33 สำหรับสาย forward และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 782-807 สำหรับสาย reverse ทำให้ครอบคลุมทั้งโปรตีนเปลือกหุ้มเป็นบริเวณ 800 นิวคลีโอไทด์ (รายละเอียดดังรูปที่ 5)

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

1
AJ012649   TCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGGATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG
AJ012099   TCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG
AF319507   -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACTG
AF319506   -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG
60

```

AF319504 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319503 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319505 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCTCAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319494 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTTAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319496 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAGCAG  
AF319498 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319490 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAAGGAGAAAAACAG  
AF319488 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAAGGAGAAAAACAG  
AF196839 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAGAAAGAAAAACAG  
AF309968 -----AATGAAGCTGTGGATGCCGTTTGAATGAAAAGCTCAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AF319492 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAGAAGGAAAAACAG  
AF319491 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAGAAGGAAAAACAG  
AF319493 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAACTCAAAGAGAAGGAAAAACAG  
AF319497 -----AATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAGAAGCTCAAAGAAAAAGAAAAACAG  
AY010720 TCCAAAAGCTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  
AY010713 TCCAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTGAATGAGAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  
AY010716 TCCAGAACTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAAAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  
AY010715 TCCAGAACTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAAAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  
AY010712 TCCAAAAGCTGAAGCTGTGGATGCTGGTTTAAATGAAAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAG  
AY010721 TCCAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGCTCAAAGAGAAAGAAAAACAG  
AY010718 TCCAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTGAATGAAAACTCAAAGAGAAAGAGAAACAG  
AY010717 TCCAAAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTAAATGAGAACTCAAAGAGAAAGAGAAACAG

\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\* \*\* \*\* .\*\*\* .... \* \*\*.\*

...781

840...

AJ012649 AGTAATAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AJ012099 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAAAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319507 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAAAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319506 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319504 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319503 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319505 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319494 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319496 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAAAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319498 AGTAACGAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319490 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319488 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATGGAGACATGCAC

AF196839 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF309968 AGTAACAAGGAAGAAAACACAGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319492 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319491 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319493 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAATAGAGACATGCAC

AF319497 AGTAACAAGGAAGAAAATACGGAAAGACACACAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC

AY010720 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAGGATGTTAACAGAGACATGCAC

AY010713 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC

AY010716 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC

AY010715 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC



AY010712 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC  
 AY010721 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC  
 AY010718 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC  
 AY010717 AGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGGAAGATGTCAACAGAGACATGCAC

\*\*\*\*\* . \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\* \*\* . \*\*\*\*\*

**รูปที่ 5** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มบริเวณใกล้เคียงกับที่ออกแบบไพรเมอร์ (ข้อมูลสมบูรณ์ได้จากผนวก ง)

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีความเหมือนกันตั้งแต่ 87-99% โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในสายพันธุ์ HA 5-1 เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ไทยถึง 98% ผลดังตารางที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละคู่สายพันธุ์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1																											
2	98																										
3	94	95																									
4	97	97	94																								
5	98	98	93	97																							
6	94	94	94	93	94																						
7	94	94	94	93	93	99																					
8	94	94	94	93	94	99	99																				
9	94	94	92	93	94	93	93	93																			
10	98	98	95	98	98	94	94	94	94																		
11	94	94	92	93	94	93	93	93	99	94																	
12	94	94	93	93	93	93	93	93	94	94	94																
13	97	97	94	97	97	94	94	94	94	98	94	93															
14	90	90	91	89	89	89	89	90	89	90	89	89	89														
15	89	89	90	88	88	89	89	89	88	89	88	88	89	97													
16	89	89	90	88	89	89	88	89	88	89	88	88	89	94	93												
17	89	89	89	88	88	88	88	88	87	89	87	87	89	94	93	99											
18	89	89	90	88	88	89	89	89	88	89	88	88	88	97	97	93	93										
19	89	89	90	88	88	89	89	89	88	89	88	88	88	97	97	93	93	99									
20	89	89	90	88	88	88	88	88	88	89	88	88	89	97	97	93	92	97	97								
21	98	98	94	97	98	94	94	94	94	99	94	94	98	89	89	90	89	89	88	88							
22	89	89	90	88	89	89	89	89	89	89	88	99	97	97	93	92	98	98	97	89							
23	95	95	93	94	94	93	93	93	94	95	94	94	94	90	89	88	88	89	89	88	95	89					
24	96	97	93	97	97	93	93	93	93	99	93	93	96	89	89	89	89	89	88	89	98	89	95				
25	98	97	94	97	97	93	93	93	93	98	93	93	97	89	89	89	89	89	88	89	96	89	94	98			
26	96	96	94	97	96	94	94	94	94	99	94	94	96	89	89	89	89	88	88	88	99	89	95	98	98		

## จากตารางที่ 7

หมายเลข 1	accession number AJ012649	หมายเลข 2	accession number AJ012099
หมายเลข 3	accession number AF319507	หมายเลข 4	accession number AF319506
หมายเลข 5	accession number AF319504	หมายเลข 6	accession number AF319503
หมายเลข 7	accession number AF319505	หมายเลข 8	accession number AF319494
หมายเลข 9	accession number AF319496	หมายเลข 10	accession number AF319498
หมายเลข 11	accession number AF319490	หมายเลข 12	accession number AF319488
หมายเลข 13	accession number AF196839	หมายเลข 14	accession number AF309968
หมายเลข 15	accession number AF319492	หมายเลข 16	accession number AF319491
หมายเลข 17	accession number AF319493	หมายเลข 18	accession number AF319497
หมายเลข 19	accession number AY010720	หมายเลข 20	accession number AY010713
หมายเลข 21	accession number AY010716	หมายเลข 22	accession number AY010715
หมายเลข 23	accession number AY010712	หมายเลข 24	accession number AY010721
หมายเลข 25	accession number AY010718	หมายเลข 26	accession number AY010717

โดเมนที่เลือกนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ได้วิเคราะห์ความจำเพาะโดยตรวจสอบจากการทำ BLAST พบว่า สาย forward ให้ผลของการค้นหาในรูปลำดับนิวคลีโอไทด์โดยที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมากถึง 70 สายพันธุ์ โดยค่าคะแนนสูงสุด 3 สายพันธุ์แรก ได้แก่ Papaya ringspot virus type P Thailand ทั้ง 25 นิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด คิดเป็น 100% ขณะที่สายพันธุ์ที่ 2 ได้แก่ Papaya ringspot virus strain P isolate Lab-mild coat protein gene โดยทั้ง 25 นิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด คิดเป็น 100% เช่นเดียวกัน และสายพันธุ์ที่ 3 Papaya ringspot virus strain W และมีส่วนเบสที่เหมือนกัน 21 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็น 100%

สำหรับสาย reverse มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมากถึงกว่า 100 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ที่มีค่าคะแนนสูงสุด ได้แก่ สายพันธุ์แรก Papaya ringspot virus strain W จากจำนวน 26 นิวคลีโอไทด์ เหมือนกันทั้ง 26 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคิดเป็น 100% และสายพันธุ์ที่ 2 Papaya ringspot virus strain PRSV-W-3 coat protein จากจำนวน 26 นิวคลีโอไทด์ เหมือนกันทั้ง 26 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็น 100% และในสายพันธุ์ที่ 3 Papaya ringspot virus W isolate CI จากจำนวน 26 นิวคลีโอไทด์ เหมือนกันทั้งหมด คิดเป็น 100% เช่นกัน (รายละเอียดดังตารางที่ 8)

**ตารางที่ 8** การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มด้วยการทำ BLAST n

Definitions	Nucleotides	Score (bits)	Identities	Strand
สาย forward				
Papaya ringspot virus type P Thailand, complete genome	10323	50.1 (25)	25/25 (100%)	plus/plus
Papaya ringspot virus strain P isolate Lab-mild coat protein gene, partial coat.	1045	50.1 (25)	25/25(100%)	plus/plus
Papaya ringspot virus strain W ,complete genome.	10323	42.1 (21)	21/21 (100%)	plus/plus
สาย reverse				
Papaya ringspot virus strain W, complete genome	10323	52.0 (26)	26/26 (100%)	plus/minus
Papaya ringspot virus strain PRSV-W-3 coat protein , partial sequence.	931	52.0 (26)	26/26 (100%)	plus/minus
Papaya ringspot virus W isolate CI ,complete genome.	10334	52.0 (26)	26/26 (100%)	plus/minus

จากนิวคลีโอไทด์ที่ 7-807 จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวัง 800 นิวคลีโอไทด์

ผลการเลือกบริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ สรุปได้ดังตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** บริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์

บริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์	ขนาดนิวคลีโอไทด์
1. ยีนพาเพน จากนิวคลีโอไทด์ 61-341	280
2. ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มจากนิวคลีโอไทด์ 7-807	800

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเบื้องต้นต่อไป

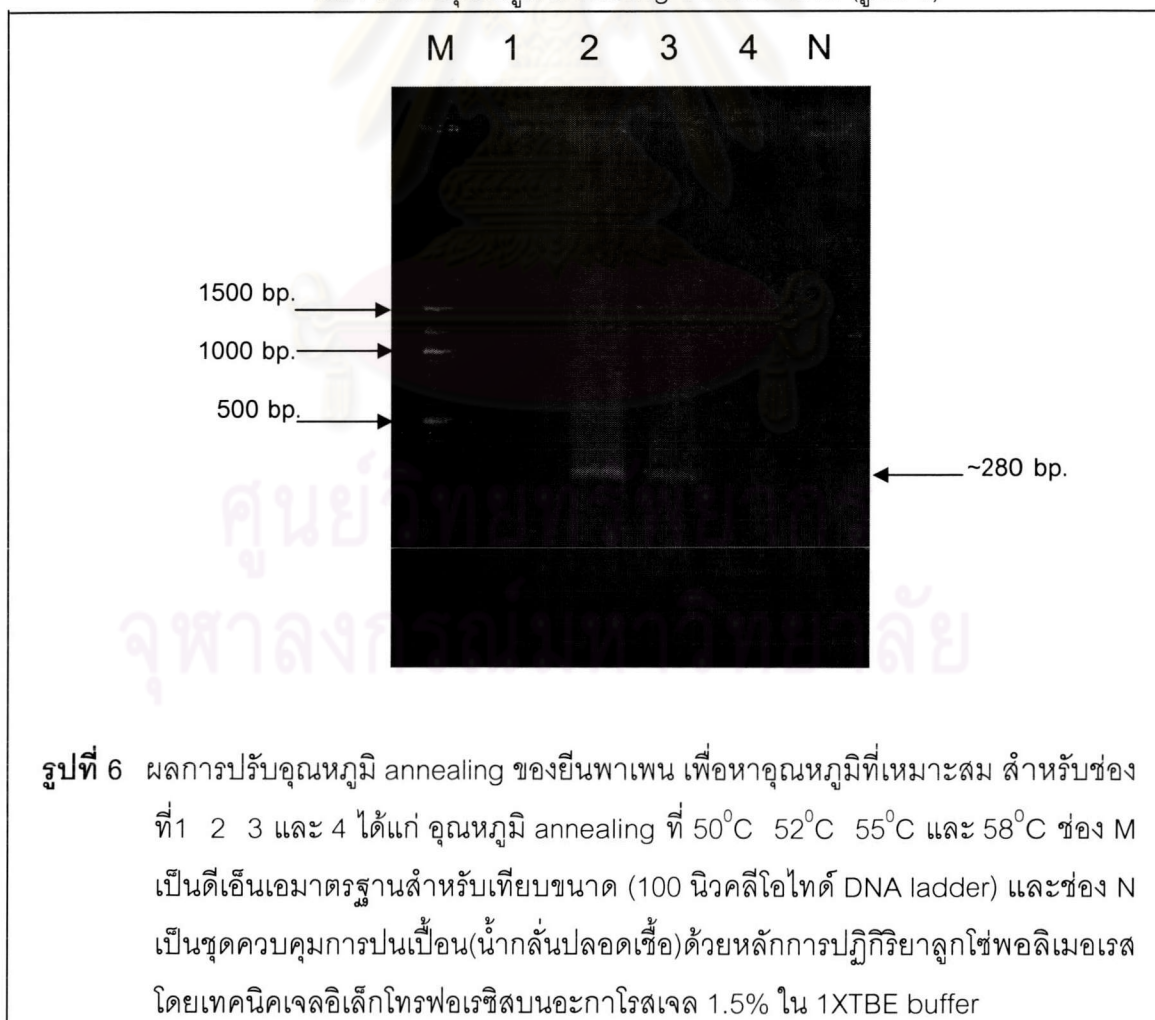
#### 4.2.3 ตรวจสอบปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ได้

##### 4.2.3.1 การปรับภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การปรับปฏิกิริยาของไพรเมอร์พาเพนและโปรตีนเปลือกหุ้มโดยภาวะเหมาะสม 2 ประการ ได้แก่ การปรับอุณหภูมิ annealing และการปรับระดับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียม ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังหัวข้อย่อยต่อไปนี้

4.2.3.1.1 จากการทดสอบการปรับอุณหภูมิ annealing ของยีนพาเพน และยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ทั้ง 4 ระดับ ได้แก่  $50^{\circ}\text{C}$   $52^{\circ}\text{C}$   $55^{\circ}\text{C}$  และ  $58^{\circ}\text{C}$  พบว่า ผลการทดลองของทั้ง 3 ซ้ำ ซึ่งดำเนินการแยกจากกัน ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน

ผลการปรับอุณหภูมิ annealing ของยีนพาเพน (รูปที่ 6)



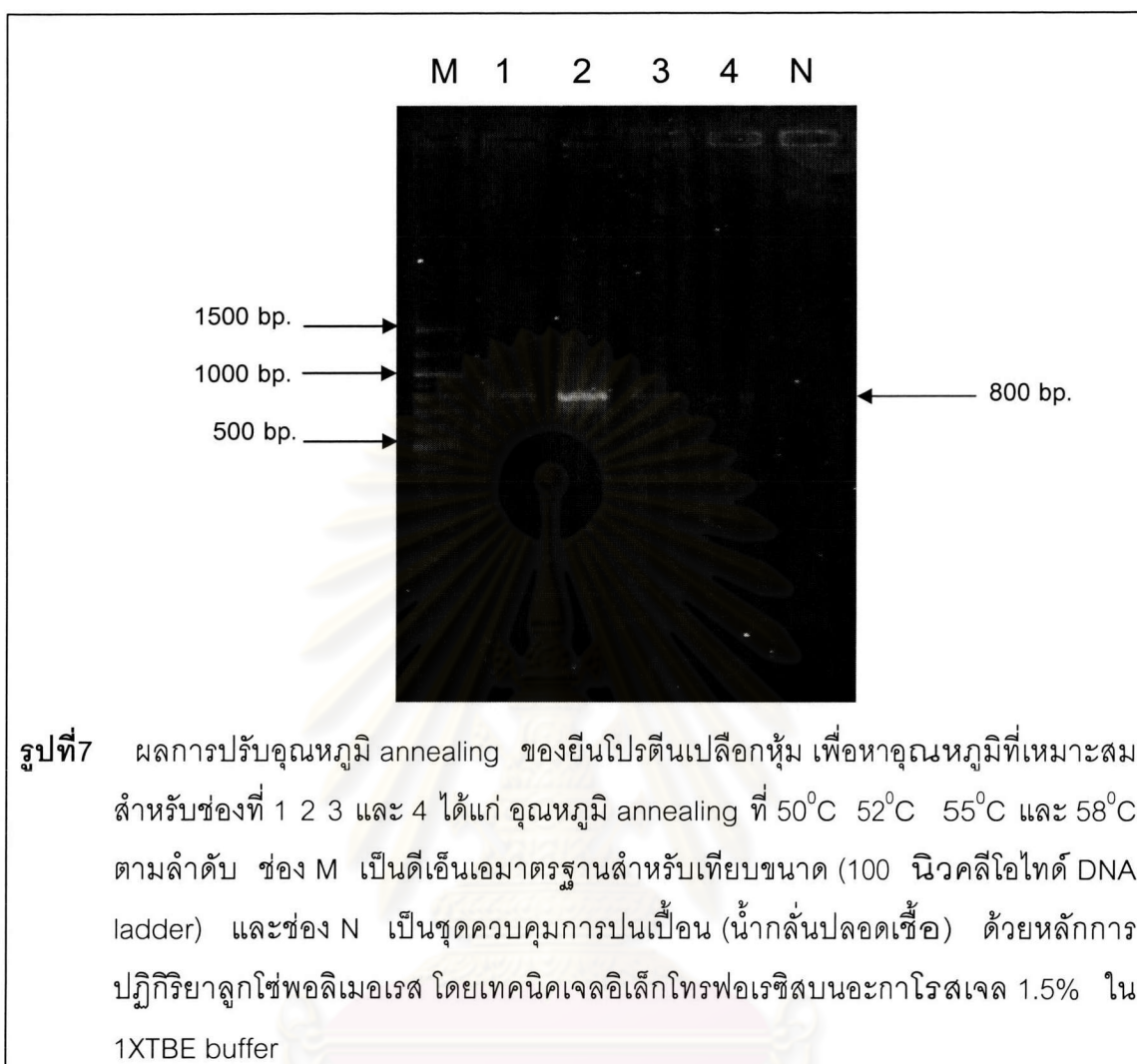
จากผลการทดลองสำหรับยีนพาเพน พบว่า ที่อุณหภูมิ annealing  $50^{\circ}\text{C}$  ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ขณะที่อุณหภูมิ  $52^{\circ}\text{C}$  พบแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความคมชัดและมีขนาดประมาณ 280 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับขนาดของยีนพาเพนที่ได้ออกแบบไว้ ที่อุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  พบแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกันแต่แถบที่ได้จางมาก และที่อุณหภูมิ  $58^{\circ}\text{C}$  ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายแต่อย่างใด

ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิขั้น annealing ที่  $52^{\circ}\text{C}$  เป็นหลัก เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนพาเพนต่อไป

#### สำหรับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม

จากผลการทดลองโดยการปรับค่าอุณหภูมิ annealing ในขณะที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้อยู่ในช่วง  $50^{\circ}\text{C}$  -  $58^{\circ}\text{C}$  พบว่าที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$   $55^{\circ}\text{C}$  และ  $58^{\circ}\text{C}$  พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจางขาดความคมชัด ขณะที่อุณหภูมิ  $52^{\circ}\text{C}$  แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มและคมชัดโดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 800 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับขนาดของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเป้าหมายที่ได้ออกแบบสำหรับคูโพรเมอร์นี้ (รูปที่ 7)

ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิ annealing ที่  $52^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มต่อไป



การปรับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมที่เหมาะสม

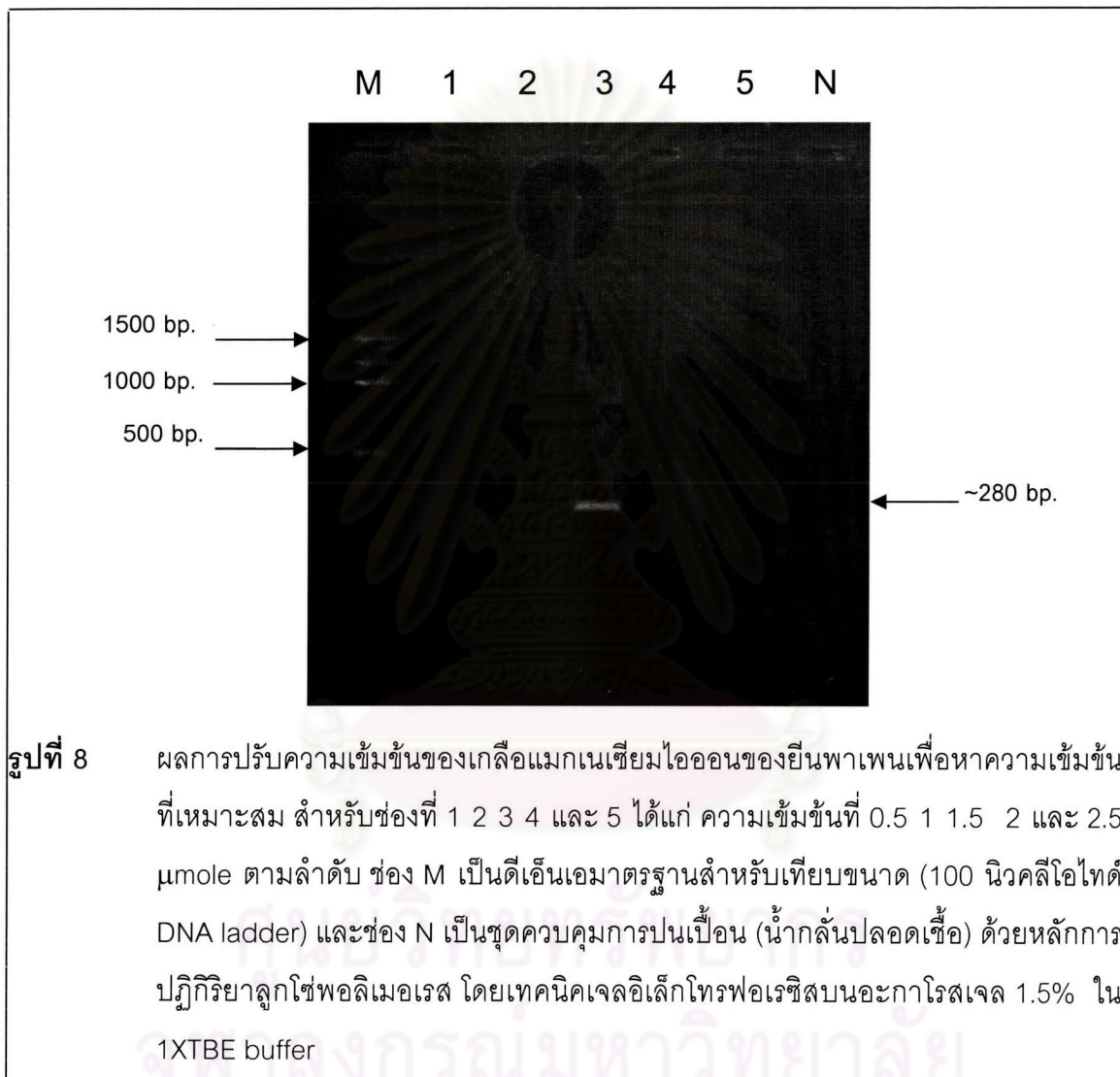
4.2.3.1.2 เมื่อปรับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมสำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม 5 ระดับ ได้แก่ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5  $\mu\text{mole}$  พบว่าผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน ให้ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

สำหรับยีนพาเพน

เมื่อปรับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมไอออนที่ 0.5  $\mu\text{mole}$  ไม่พบแถบดีเอ็นเอแต่อย่างใด ขณะที่เมื่อปรับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมไอออนไปที่ 1.0 และ 2.0  $\mu\text{mole}$  แม้จะพบแถบดีเอ็นเอแต่แถบที่ได้จางและมีความคมชัดน้อยมาก อย่างไรก็ตามเมื่อปรับความเข้มข้น

ของเกลือแมกเนเซียมไปที่ 1.5  $\mu\text{mole}$  พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 280 นิวคลีโอไทด์ที่ทั้งเข็มและมีความคมชัด (รูปที่ 8)

ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมที่ระดับ 1.5  $\mu\text{mole}$  เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



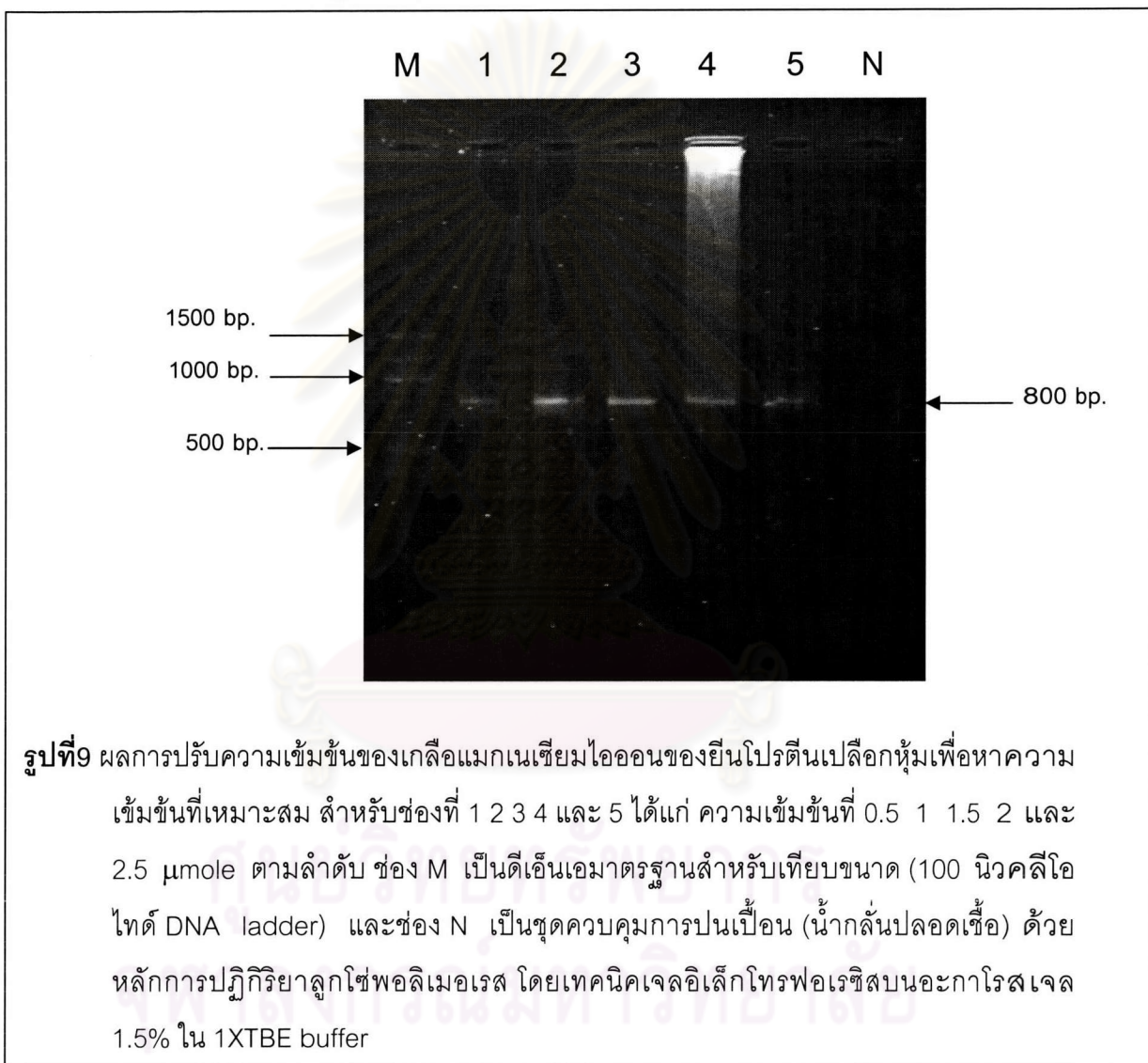
สำหรับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม

เมื่อปรับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมในปฏิกิริยาให้อยู่ในระหว่างความเข้มข้น 0.5 - 2.5  $\mu\text{mole}$  พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียม 0.5  $\mu\text{mole}$  พบแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดน้อย และที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.5  $\mu\text{mole}$  พบแถบดีเอ็นเอที่มีความ



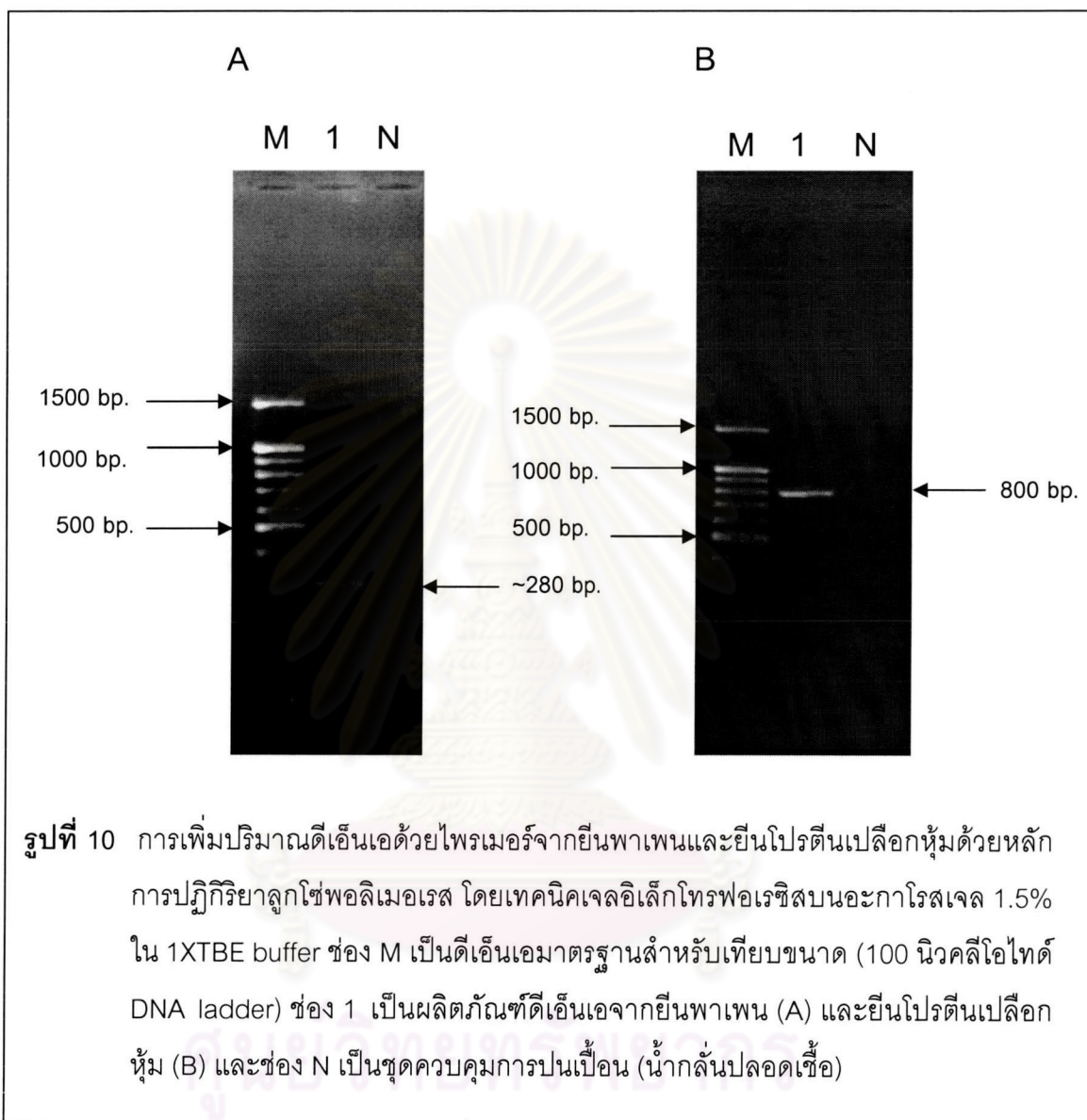
คมชัดน้อยเช่นเดียวกัน ขณะที่ความเข้มข้น 2.0  $\mu\text{mole}$  กลับพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด และมีผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะตลอดทั้งช่องของเจล อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมเป็น 1.5  $\mu\text{mole}$  แถบดีเอ็นเอที่ได้มีทั้งความเข้มและมีความคมชัด (รูปที่ 9)

ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมที่ 1.5  $\mu\text{mole}$  ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



4.2.3.2 เมื่อนำไพรเมอร์ฟาเพนและโปรตีนเปลือกหุ้มที่ออกแบบไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ภาวะของปฏิกิริยา ขั้น denature 93°C 1 นาที ขั้น annealing 52°C 2 นาที และขั้น extension 73°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ และความเข้มข้นของเกล็ดแมกเนเซียมที่ 1.5  $\mu\text{mole}$  ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ภายหลังการเพิ่มปริมาณดี

เอ็นเอ พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 280 และ 800 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับขนาดของ ส่วนยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มที่ได้ออกแบบไว้ตามทฤษฎี (รูปที่ 10)



**รูปที่ 10** การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จากยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1 เป็นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากยีนพาเพน (A) และยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (B) และช่อง N เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

ผลการทดลองปรับภาวะที่เหมาะสมจากอุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมในข้อ 4.2.3.2 นำมาใช้ประกอบในการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเพื่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ตัดแปรพันธุกรรมต่อไป

4.2.3.3 การประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบ ดำเนินการประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบใน 3 รูปแบบ ได้แก่ ความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) และความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำ (reproducibility)

#### 4.2.3.3.1 การประเมินบนพื้นฐานของความจำเพาะของวิธีการตรวจ (specificity)

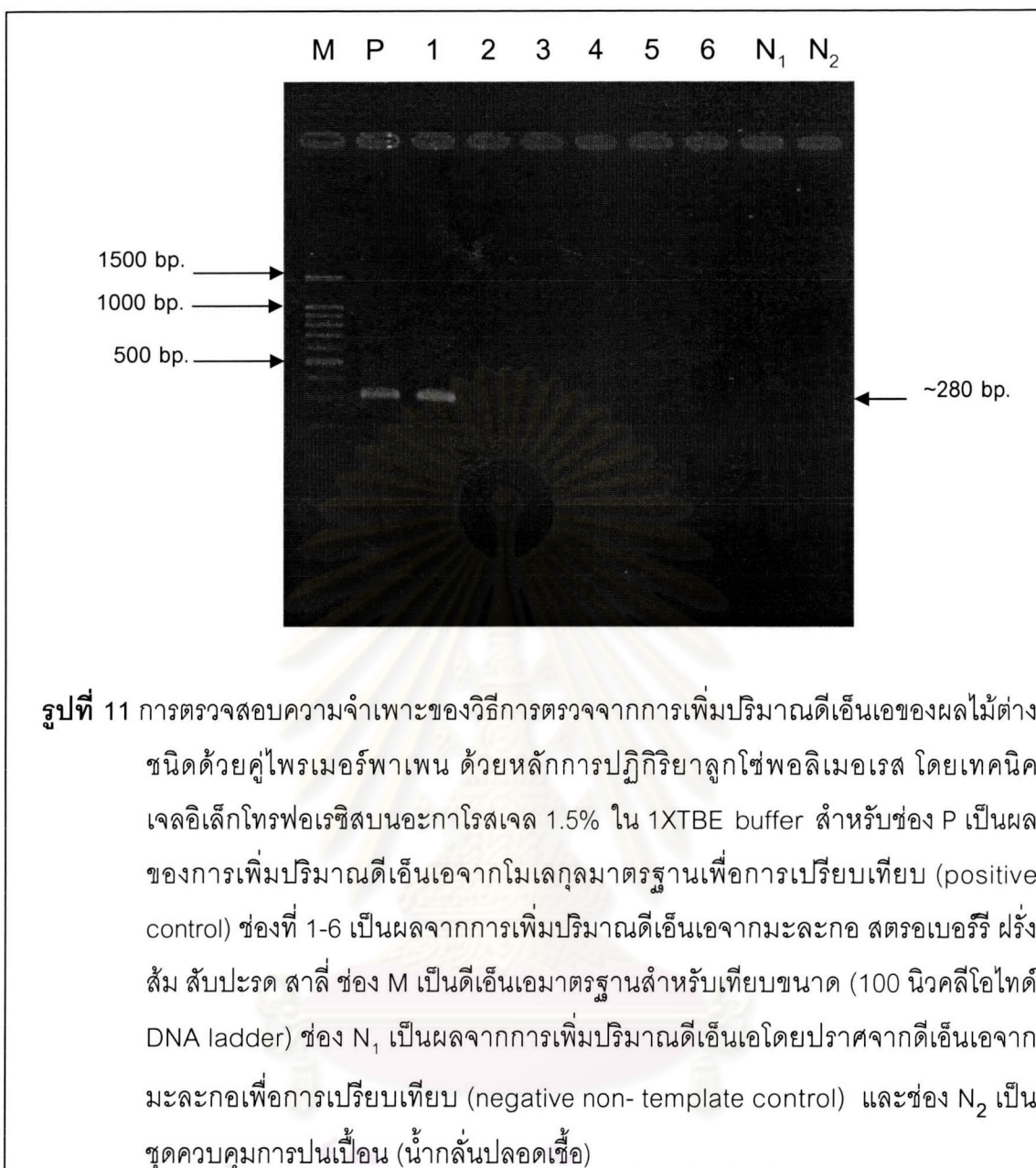
จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและผลไม้ต่างชนิดด้วยไพรเมอร์ยื่นพาเพนและไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มเพื่อหาความจำเพาะ

##### คู่ไพรเมอร์พาเพน

##### 1. ผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่

การตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์พาเพน จากดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากมะละกอและผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่ พบว่าคู่ไพรเมอร์พาเพนมีความจำเพาะสำหรับใช้ในการตรวจดีเอ็นเอแม่แบบที่มาจากมะละกอ (พบแถบดีเอ็นเอขนาด 280 นิวคลีโอไทด์) โดยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวจะไม่ทำปฏิกิริยาถูกไซฟอลิเมอเรสกับผลไม้ต่างชนิด (ไม่พบแถบดีเอ็นเอ) (ดังรูปที่ 11)

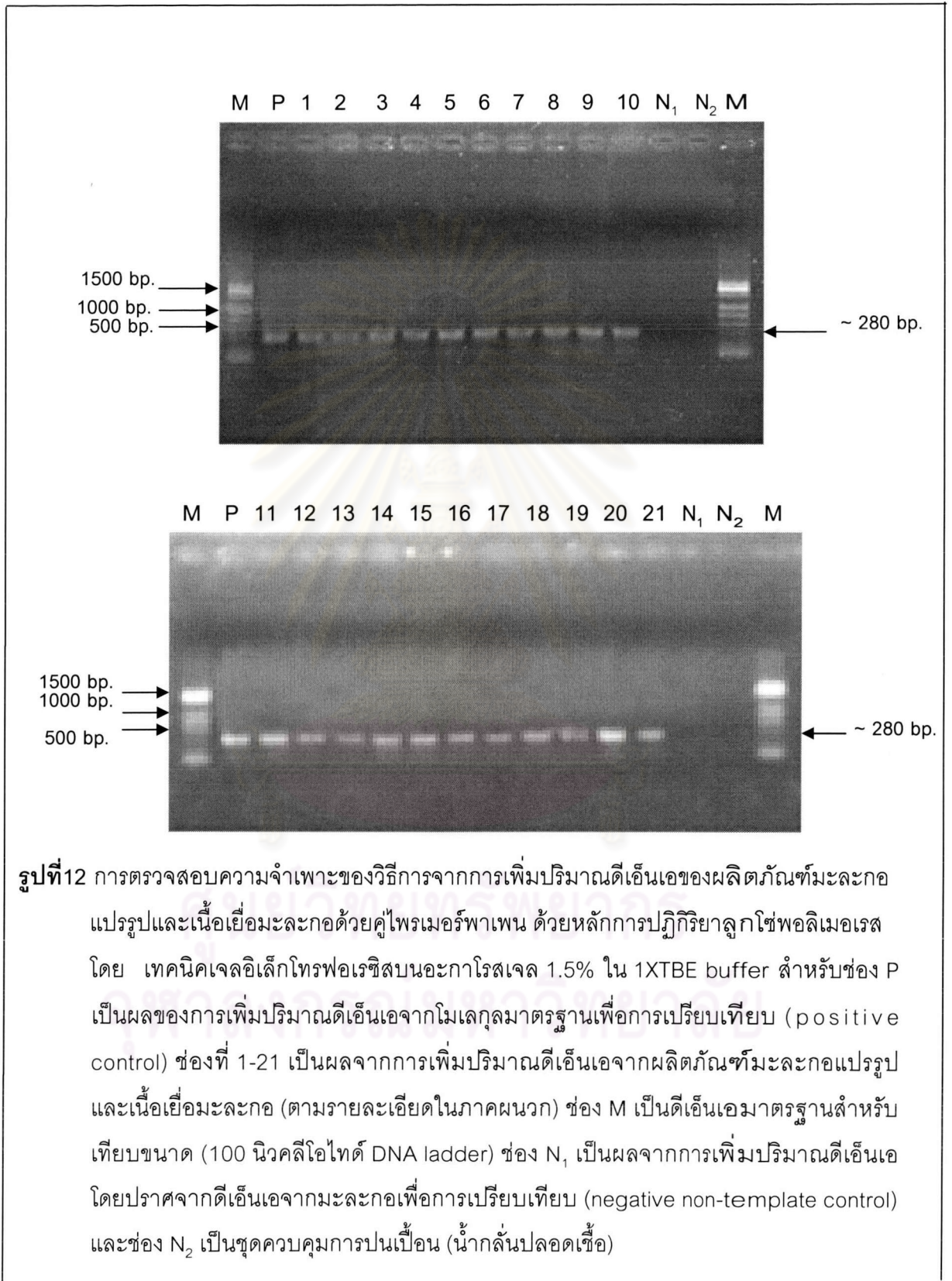
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 11** การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลไม้ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer สำหรับช่อง P เป็นผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโมเลกุลมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ (positive control) ช่องที่ 1-6 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากมะละกอ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่ ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง N<sub>1</sub> เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปราศจากดีเอ็นเอจากมะละกอเพื่อการเปรียบเทียบ (negative non- template control) และช่อง N<sub>2</sub> เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

การตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์พาเพนจากดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปจำนวน 20 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อมะละกอ 1 ตัวอย่าง รวมเป็น 21 ตัวอย่าง พบว่าคู่ไพรเมอร์พาเพนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบจากผลิตภัณฑ์มะละกอทุกชนิดรวมทั้งเนื้อเยื่อมะละกอด้วย โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 280 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับค่าที่คาดหวัง (รูปที่ 12)

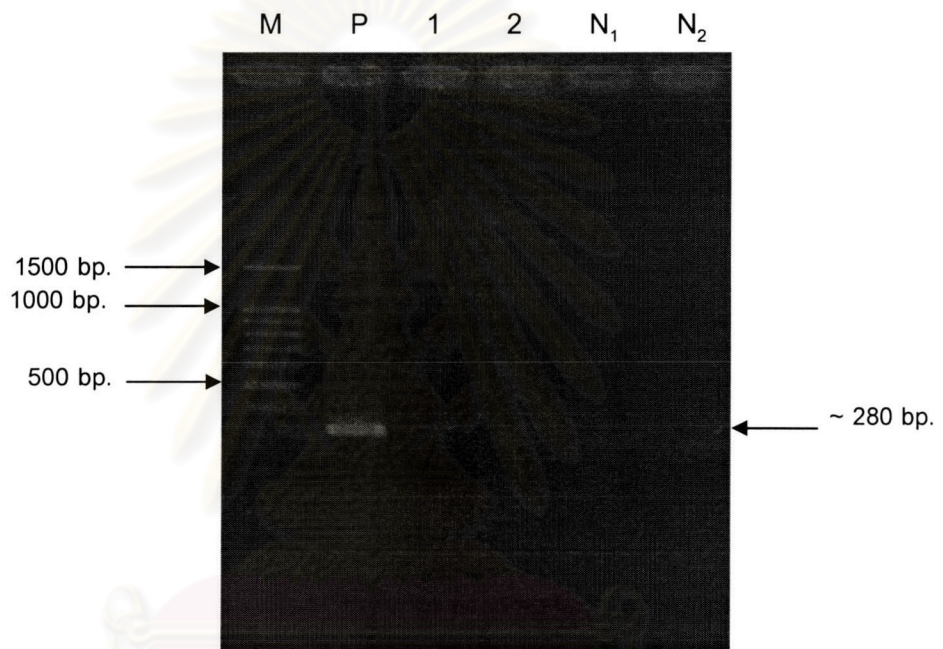
## 2.ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป



**รูปที่ 12** การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและเนื้อเยื่อมะละกอด้วยคู่มือไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดย เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer สำหรับช่อง P เป็นผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโมเลกุลมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ (positive control) ช่องที่ 1-21 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและเนื้อเยื่อมะละกอ (ตามรายละเอียดในภาคผนวก) ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง N<sub>1</sub> เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปราศจากดีเอ็นเอจากมะละกอเพื่อการเปรียบเทียบ (negative non-template control) และช่อง N<sub>2</sub> เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

นอกเหนือไปจากการตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์พาเพนจากดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นมะละกอ ผลิตรหัสที่แปรรูปมะละกอแล้วยังมีการตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบจากผลิตรหัสต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวโพดพบว่า คู่ไพรเมอร์พาเพนไม่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับผลิตรหัสดังกล่าว (ไม่พบแถบดีเอ็นเอ) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์พาเพนที่มีต่อดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นมะละกอ (รูปที่ 13)

### 3. ผลิตรหัสต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง และ ข้าวโพด

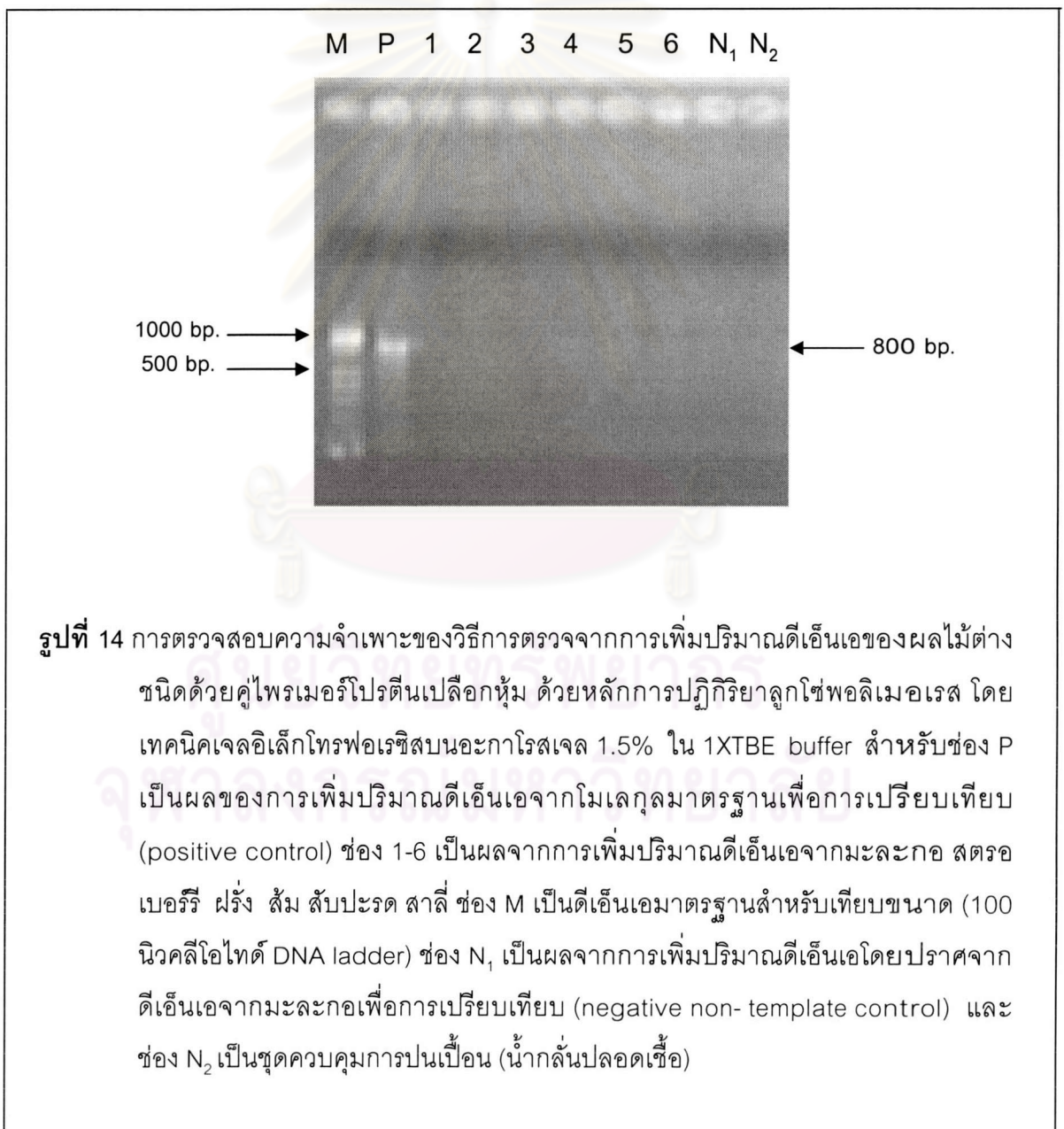


**รูปที่ 13** การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตรหัสต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer สำหรับช่อง P เป็นผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโมเลกุลมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ (positive control) ช่องที่ 1 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากถั่วเหลือง ช่อง 2 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากข้าวโพด ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง N<sub>1</sub> เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปราศจากดีเอ็นเอจากมะละกอเพื่อการเปรียบเทียบ (negative non-template control) และช่อง N<sub>2</sub> เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

การตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม จากดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากมะละกอและผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่ พบว่าคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มมีความจำเพาะสำหรับการตรวจดีเอ็นเอแม่แบบที่มาจากมะละกอตัดแปรพันธุกรรม โดยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวจะไม่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับมะละกอปลอดการตัดแปรพันธุกรรมและผลไม้ต่างชนิด (ไม่พบแถบดีเอ็นเอ)(ดังรูปที่ 14)

#### คู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม

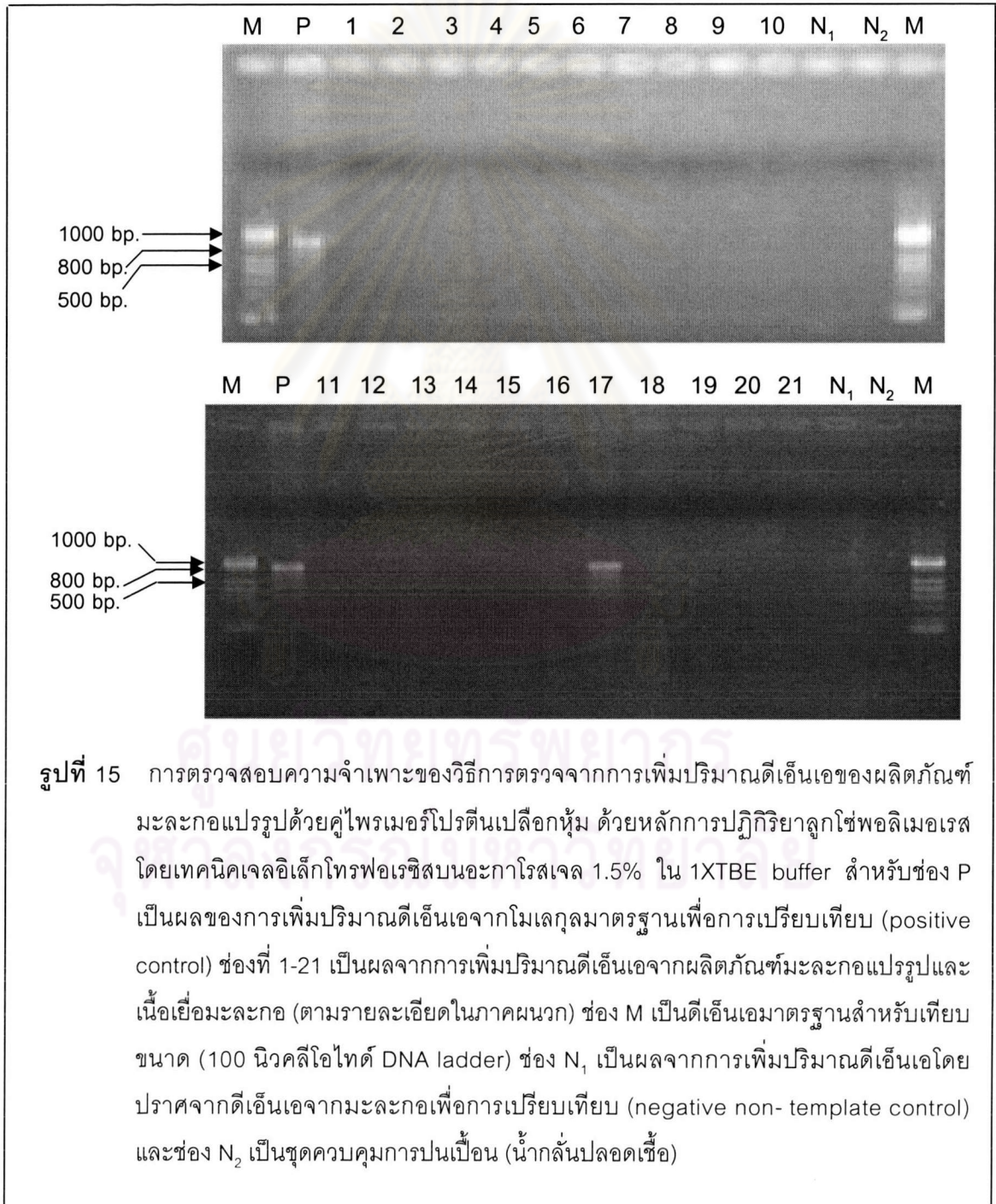
##### 1. ผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรดและสาลี่



**รูปที่ 14** การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลไม้ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer สำหรับช่อง P เป็นผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโมเดลมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ (positive control) ช่อง 1-6 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากมะละกอ สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่ ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง N<sub>1</sub> เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปราศจากดีเอ็นเอจากมะละกอเพื่อการเปรียบเทียบ (negative non- template control) และช่อง N<sub>2</sub> เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

การตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปจำนวน 20 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อมะละกอ 1 ตัวอย่าง รวมเป็น 21 ตัวอย่าง พบว่าคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มไม่ทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสกับผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป (ไม่พบแถบดีเอ็นเอ) แต่คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบจากเนื้อเยื่อมะละกอ โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 นิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับค่าที่คาดหวัง (รูปที่ 15)

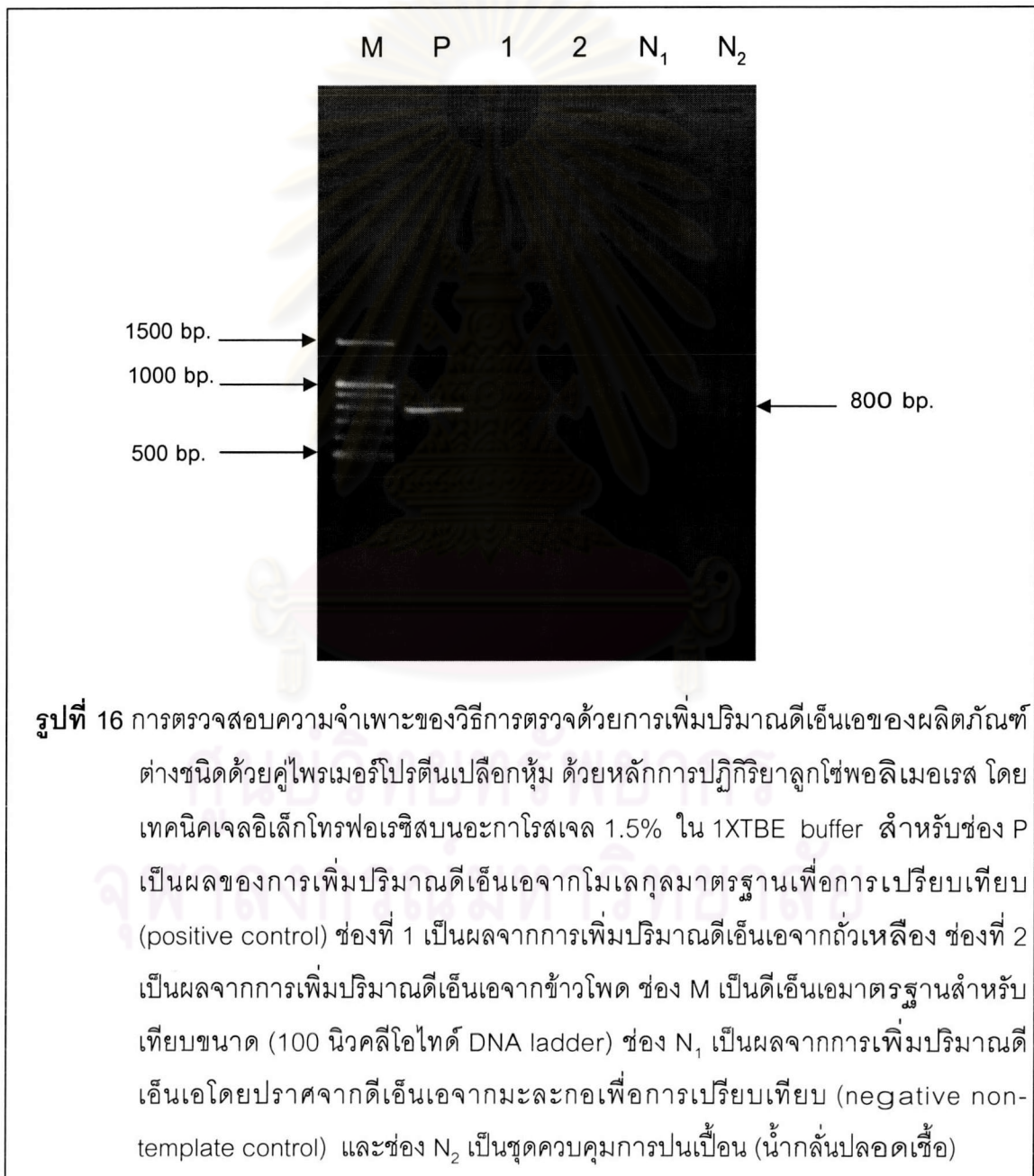
## 2. ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป





นอกเหนือไปจากการตรวจสอบความจำเพาะของคู่โปรตีนเปลือกหุ้มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นมะละกอ ผลิตรหัสที่มะละกอแล้วยังมีการตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบจากผลิตรหัสที่ต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวโพด พบว่า คู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มไม่ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันกับผลิตรหัสดังกล่าว (ไม่พบแถบดีเอ็นเอ) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มที่มีต่อดีเอ็นเอแม่แบบที่เป็นมะละกอตัดแปรพันธุกรรม (รูปที่ 16)

### 3. ผลิตรหัสที่ต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลืองและข้าวโพด



**รูปที่ 16** การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตรหัสที่ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer สำหรับช่อง P เป็นผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโมเลกุลมาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ (positive control) ช่องที่ 1 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากถั่วเหลือง ช่องที่ 2 เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากข้าวโพด ช่อง M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง N<sub>1</sub> เป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปราศจากดีเอ็นเอจากมะละกอเพื่อการเปรียบเทียบ (negative non-template control) และช่อง N<sub>2</sub> เป็นชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

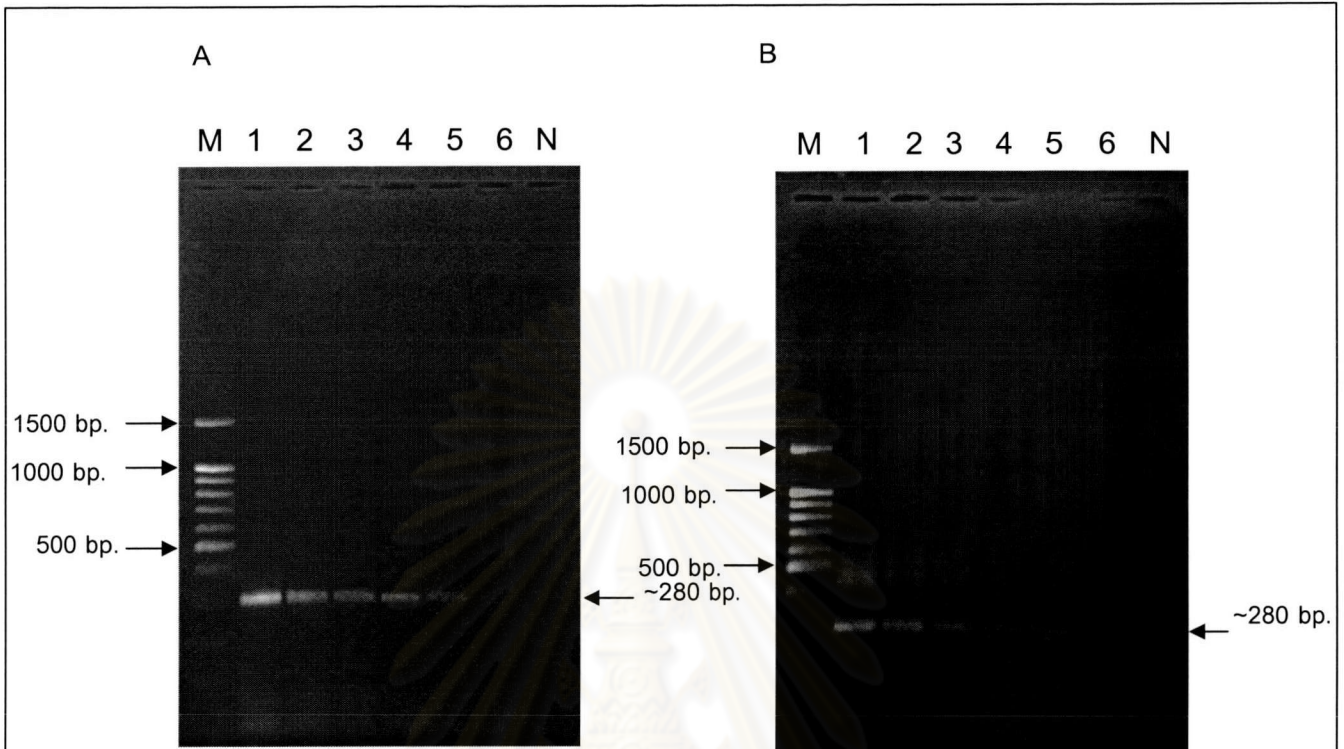
4.2.3.3.2 การประเมินบนพื้นฐานของการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity)

ภายหลังจากการสุ่มเลือกมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและเนื้อเยื่อมะละกอ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มะละกอสดในรูปของใบและเนื้อเยื่อมะละกอ

ความเข้มข้นดีเอ็นเอของมะละกอสดในรูปของใบจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.9635  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  เรียงลำดับความเข้มข้นมากไปน้อยต่างกัน 6 ระดับ ระดับละ 10 เท่า ได้แก่ 0.1963  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  0.0196  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  1.9635  $\text{ng}/\mu\text{l}$  0.1963  $\text{ng}/\mu\text{l}$  1.9635  $\text{pg}/\mu\text{l}$  และ 0.1963  $\text{pg}/\mu\text{l}$  ตามลำดับ และความเข้มข้นดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อมะละกอจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.7538  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  เรียงลำดับความเข้มข้นมากไปน้อยต่างกัน 6 ระดับ ระดับละ 10 เท่า ได้แก่ 0.1753  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  0.0175  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  1.7538  $\text{ng}/\mu\text{l}$  0.1753  $\text{ng}/\mu\text{l}$  1.7538  $\text{pg}/\mu\text{l}$  และ 0.1753  $\text{pg}/\mu\text{l}$  ตามลำดับ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน ให้ผลการทดลองเป็นไปในลักษณะเดียวกัน

จากผลการทดลองที่สุ่มเลือกมะละกอในรูปใบสดและเนื้อเยื่อมะละกอ พบว่าทั้งสองตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนพาเพนได้จนถึงความเข้มข้นที่  $10^5$  เท่า (1.9635  $\text{pg}/\mu\text{l}$  และ 1.7538  $\text{pg}/\mu\text{l}$  ตามลำดับ) โดยความคมชัดของแถบดีเอ็นเอจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่  $10^6$  เท่า (0.1963  $\text{pg}/\mu\text{l}$  และ 0.1753  $\text{pg}/\mu\text{l}$  ตามลำดับ) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 17)

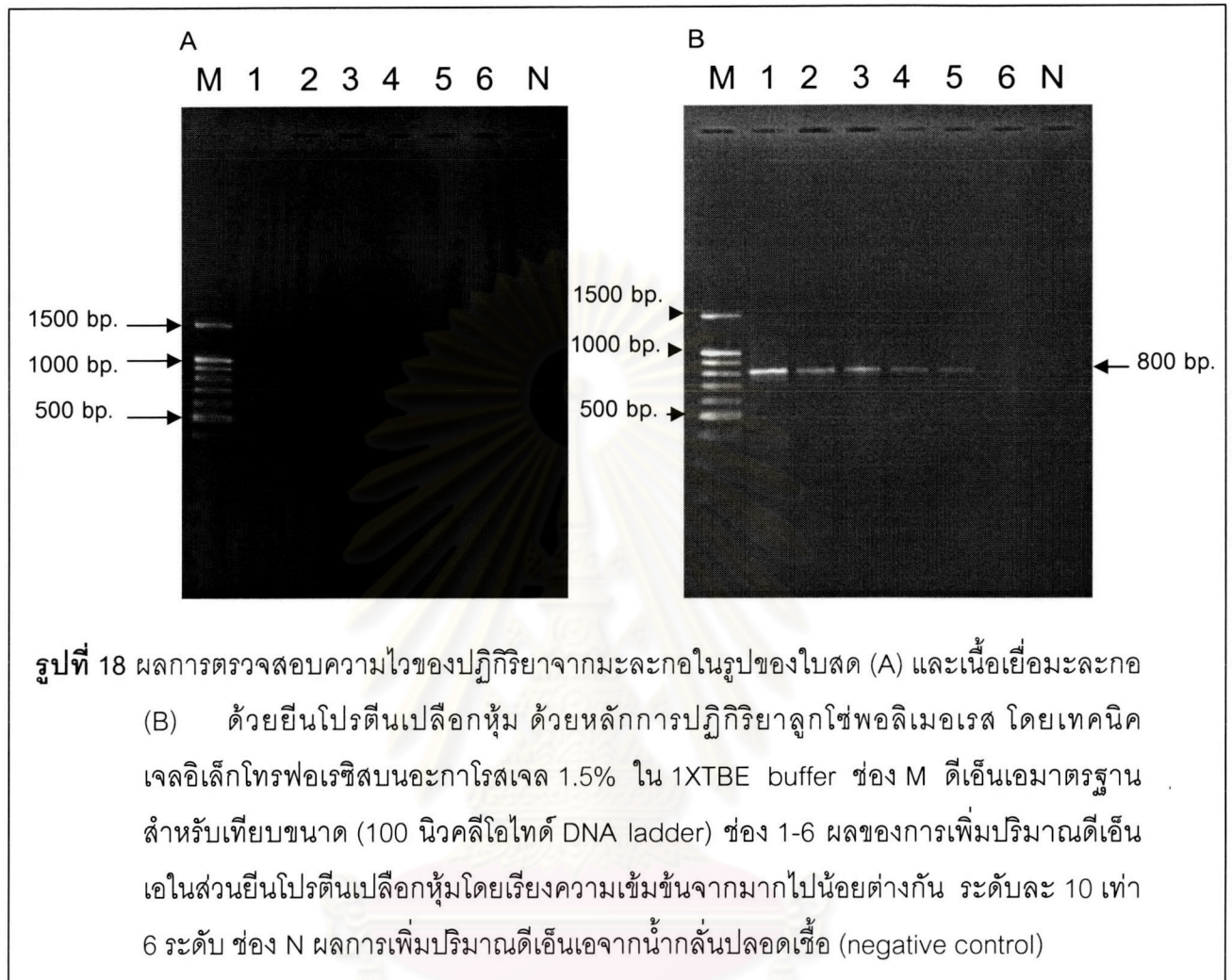
คู่มือไพรเมอร์พาเพน



**รูปที่ 17** ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากมะละกอสดในรูปของใบ (A) และเนื้อเยื่อมะละกอสด (B) ด้วยไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1-6 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีนพาเพนโดยเรียงความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน ระดับละ 10 เท่า 6 ระดับ ช่อง N ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

จากผลการทดลองที่สุ่มเลือกมะละกอสดในรูปใบสดและเนื้อเยื่อมะละกอสด พบว่าตัวอย่างที่เป็นมะละกอสดในรูปใบสดเมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่มือไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มแล้วไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มได้ในทุกความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากเนื้อเยื่อมะละกอสดเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้ว พบแถบดีเอ็นเอมีความคมชัดลดลงเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้นที่  $10^5$  เท่า (1.7538 pg/ $\mu$ l) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่พบแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอ และที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ  $10^6$  เท่า (0.1753 pg/ $\mu$ l) คู่มือไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 18)

### คู่มือพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม



**รูปที่ 18** ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากมะละกอในรูปของใบสด (A) และเนื้อเยื่อมะละกอ (B) ด้วยยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน สำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1-6 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มโดยเรียงความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน ระดับละ 10 เท่า 6 ระดับ ช่อง N ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

#### 4.2.3.3.3 การประเมินบนพื้นฐานของการตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำ (reproducibility)

สุ่มตัวอย่างที่เป็นมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้แก่ มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต และเนื้อเยื่อมะละกอ รวม 5 กลุ่มกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 ซ้ำ การตรวจสอบในแต่ละซ้ำเป็นอิสระต่อกัน ตรวจสอบและประเมินโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยพรเมอร์ยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม พบว่ามะละกอสดเมื่อตรวจสอบด้วยคู่มือพรเมอร์ทั้งสองให้ผลความน่าเชื่อถือ 100% เช่นเดียวกับเนื้อเยื่อมะละกอเมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยคู่มือพรเมอร์ทั้งสองให้ผลความน่าเชื่อถือ 100% ส่วนผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้แก่ มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อมและมะละกอในโยเกิร์ตตรวจสอบด้วยพรเมอร์ยีนพาเพนให้ผลความน่าเชื่อถือ 99.5%, 99.5% และ 99% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอ

ด้วยคู่มือโปรตีนเปลี่ยนเปลือกหุ้มให้ผลความน่าเชื่อถือ 100% ทั้งสามกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำโดยใช้ตัวอย่างมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอ ได้แก่ มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต และเนื้อเยื่อมะละกอ

ผลิตภัณฑ์	คู่มือโปรตีนที่ใช้					
	ยีนพาเพน			ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม		
	จำนวนครั้งที่ตรวจ	จำนวนครั้งที่คาดหวัง	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์	จำนวนครั้งที่ตรวจ	จำนวนครั้งที่คาดหวัง	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์
1.มะละกอสด	200	200	100	200	200	100
2.มะละกอบแห้ง	200	199	99.5	200	200	100
3.มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม	200	199	99.5	200	200	100
4.มะละกอในโยเกิร์ต	200	198	99	200	200	100
5. เนื้อเยื่อมะละกอ	200	200	100	200	200	100

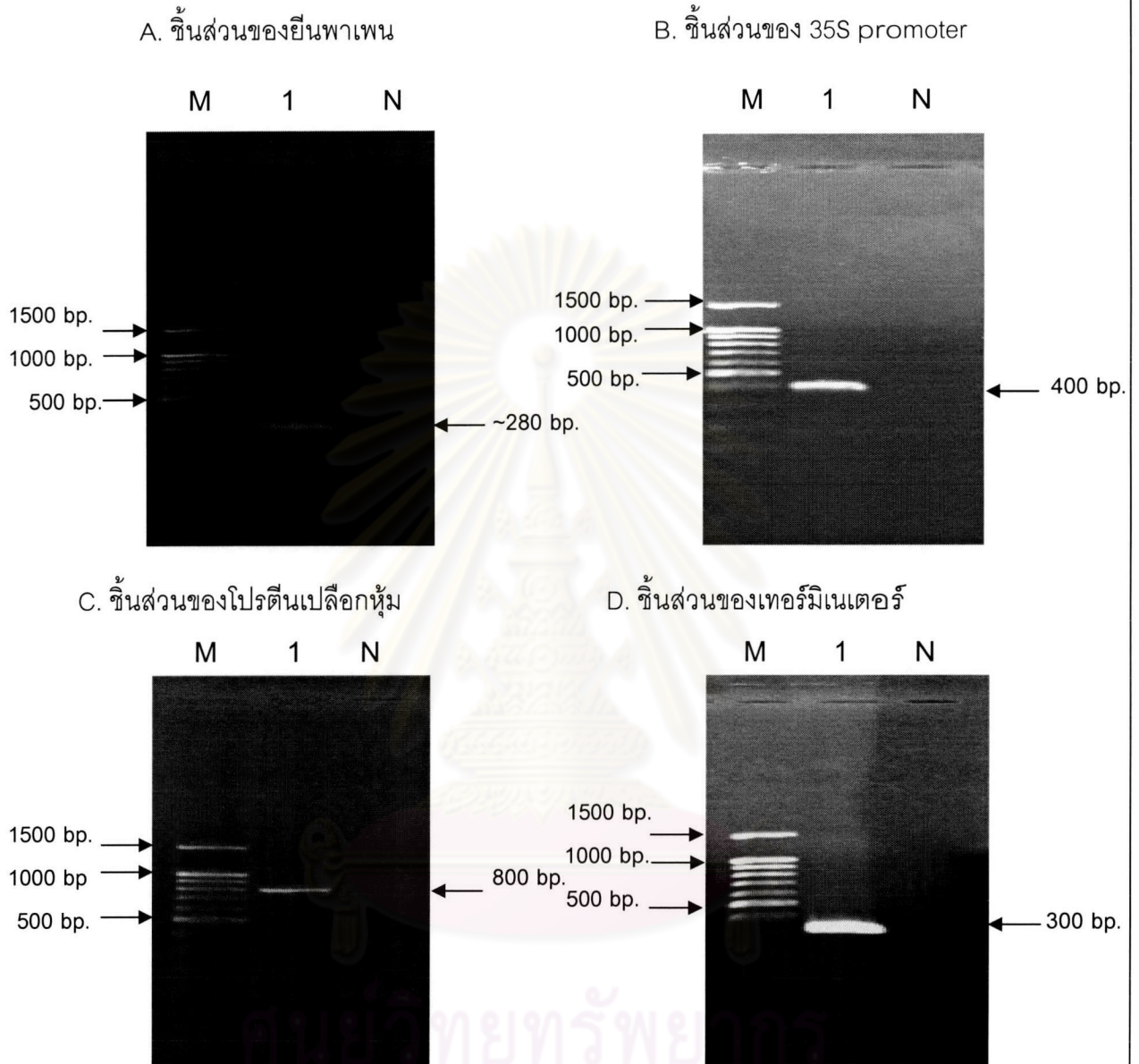
#### 4.2.3.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมเลกุลเพื่อใช้เป็นโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐาน

4.2.3.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างๆ จากการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและเทอร์มินเตอร์ มีขนาด 280 400 800 และ 300 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับสอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอตามที่คาดหวังดังรูปที่ 19 โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความจำเพาะ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปแยกในสนามไฟฟ้า นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนพาเพนกับ 35S promoter 35S promoter กับ ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และ ยีนโปรตีน

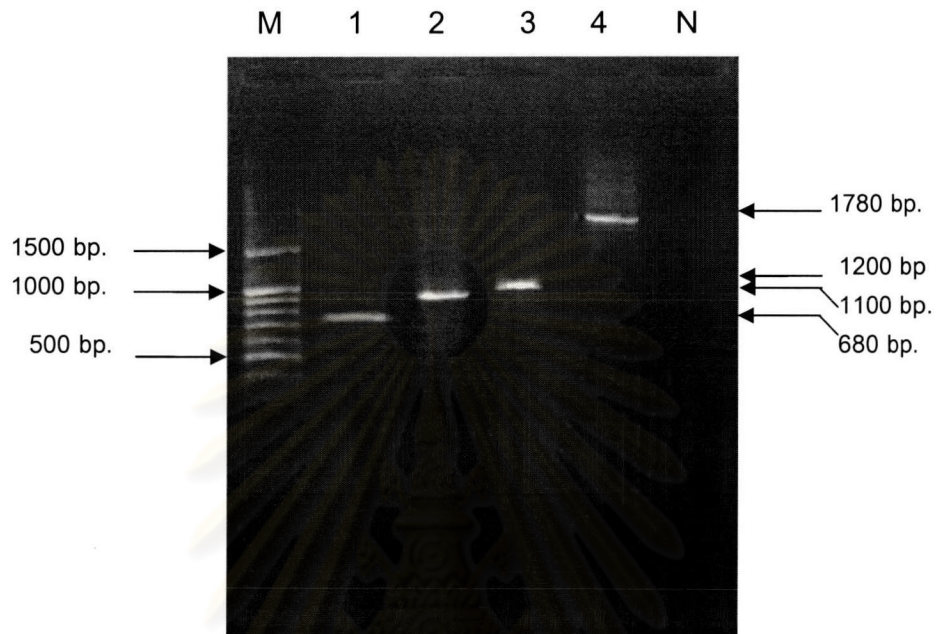
เปลือกหุ้มกับเทอร์มิเนเตอร์ด้วยเอนไซม์ไลเอสนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 5' Papain กับ 3' Bics, 5' Bics กับ 3' CP และ 5' CP กับ 3' Terตามลำดับเพื่อบังคับเอาเฉพาะส่วนที่ต่อกันได้สนิทและมีทิศทางถูกต้องให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ขนาด 680 1200 และ 1100 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ทั้งสามมารวมกันแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 5' Papin กับ 3' Ter จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1780 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นไปตามค่าที่ได้ออกแบบไว้ ดังแสดงในรูปที่ 20

ตารางที่ 11 ภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ภาวะของปฏิกิริยา
Papain		
Papain5'	5'- atgggtttgtcatttggtgattttcta -3'	93°C 1 นาที 52°C 2 นาที
Papain3'	5'- ccagcaatagaaccagtatacttttcttgaattcatc -3'	73°C 3 นาที : 40 รอบ
35S promoter		
Bics5'	5' - ctactcctccaaatgcaagatacag -3'	93°C 1 นาที 55°C 2 นาที
Bics3'	5' - ggcctctccaaatgaaatgaactcc -3'	73°C 3 นาที : 40 รอบ
Coat protein		
CP5'	5' - aatgaagctggtgctggtctaaat -3'	93°C 1 นาที 52°C 2 นาที
CP3'	5' - gtctctccgtgtttctccttgta -3'	73°C 3 นาที : 40 รอบ
NOS terminator		
Ter5'	5' - gctgaaatcaccagtctctccta -3'	93°C 1 นาที 55°C 2 นาที
Ter3'	5'- ccaagcttggcgacggatctataggg -3'	73°C 3 นาที : 40 รอบ



รูปที่ 19 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนของยีนพาเพน (A) 35S promoter (B) ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(C) และเทอร์มิเนเตอร์(D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนของยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและเทอร์มิเนเตอร์ ช่อง N ชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

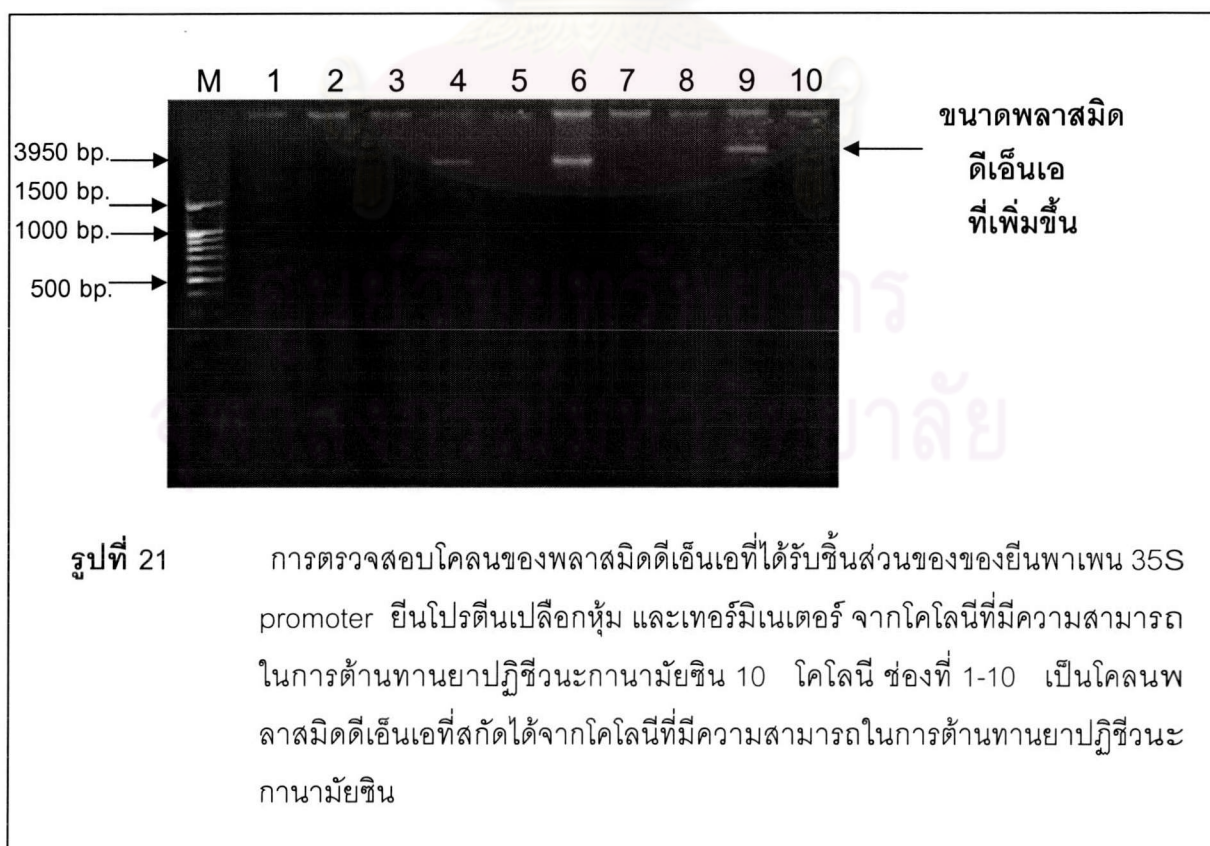


**รูปที่ 20** การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนที่เชื่อมต่อกัน 4 ส่วนด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1-4 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนของยีนพาเพนกับ 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มกับเทอร์มิเนเตอร์ 35s promoter กับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์รวมกัน ช่อง N ชุดควบคุมการปนเปื้อน (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)



#### 4.2.3.4.2 การโคลนชิ้นส่วนของยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์

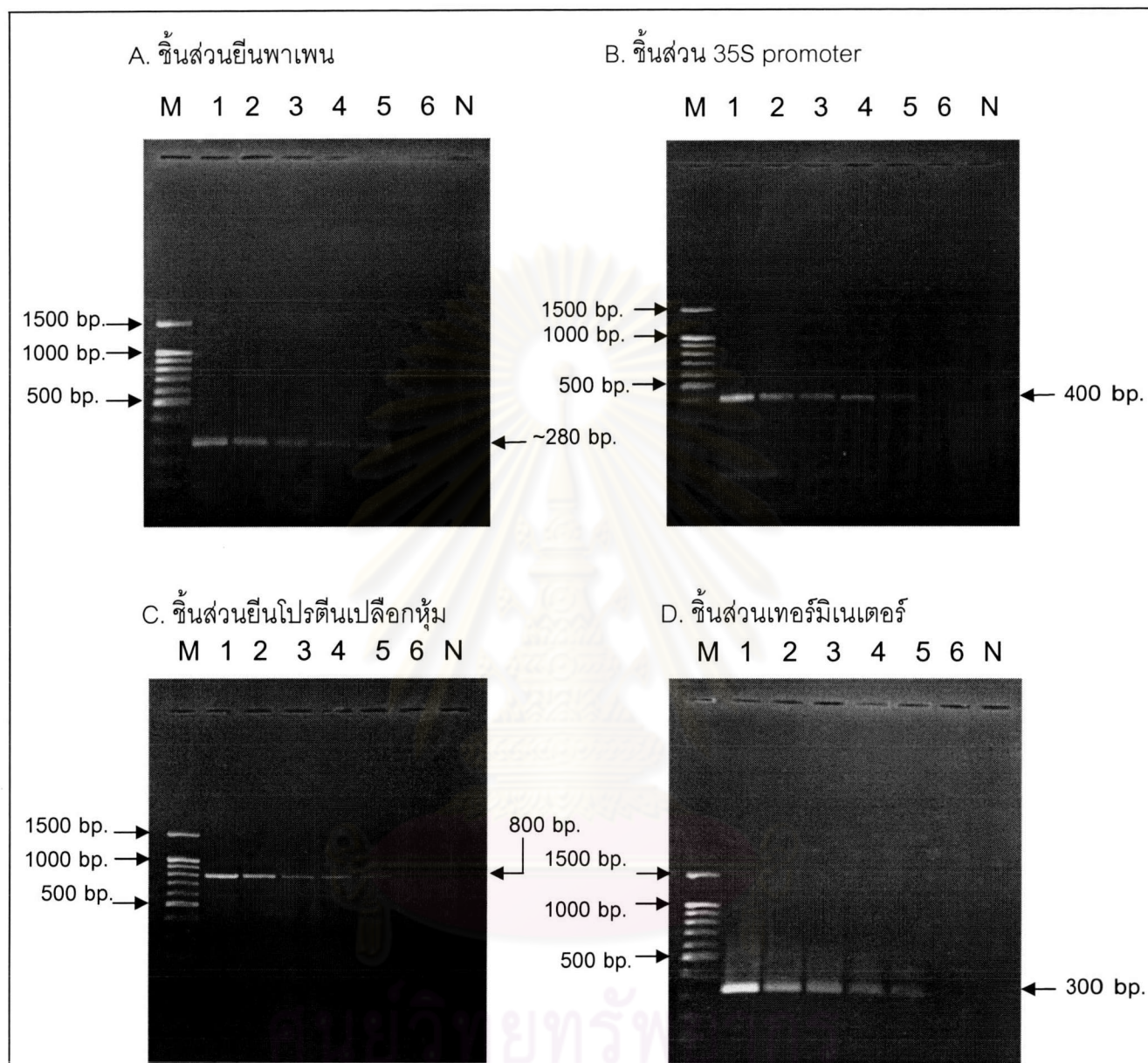
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีนรวมที่ประกอบไปด้วยยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์ ได้ผลิตพันธุ์ดีเอ็นเอรวมขนาด 1780 นิวคลีโอไทด์ ที่มีปริมาณมากพอที่จะนำไปโคลนเข้าสู่พลาสมิดตามหลักการ TOPO โดยใช้พลาสมิด PCR script II และคัดเลือกโคโลนีที่ได้โดยอาศัยความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่าสามารถคัดเลือกโคโลนีได้ 10 โคโลนี การตรวจสอบต่อเนื่องเพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1780 นิวคลีโอไทด์ ในเบื้องต้นทำโดยการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิดโดยการทำ small scale plasmid DNA preparation กับพลาสมิดที่ไม่ได้รับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ทำการคัดเลือกเฉพาะพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งในการทดลองได้เลือกพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนหมายเลข 9 ที่ให้ขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอใหญ่กว่าพลาสมิดดีเอ็นเอพาพะปกติที่ไม่มีชิ้นส่วนของยีน (รูปที่ 21) จึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอนี้ไปตรวจสอบต่ออีกครั้งโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ 5' Papain กับ 3' Ter พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 1780 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงถึงความสำเร็จในการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอดังกล่าว



4.2.3.4.3 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นชุดควบคุมบวก (positive control) ตรวจสอบและประเมินผลการใช้พลาสมิดเป็นชุดควบคุมบวกโดยใช้พื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) แปรผันความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 2.9634  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  เรียงลำดับความเข้มข้นมากไปน้อยต่างกัน 6 ระดับ ระดับละ 10 เท่า ได้แก่ 0.29634  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  0.0296  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  2.9634  $\text{ng}/\mu\text{l}$  0.2963  $\text{ng}/\mu\text{l}$  2.9634  $\text{pg}/\mu\text{l}$  และ 0.2963  $\text{pg}/\mu\text{l}$  ตามลำดับ ผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน พบว่า (รูปที่ 22)

พลาสมิดดีเอ็นเอทั้งในส่วนของยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอมีความคมชัดลดลงเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่  $10^5$  เท่า (2.9634  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 280 400 800 และ 300 นิวคลีโอไทด์เป็นไปตามค่าที่ได้คาดหวังไว้ และที่ความเข้มข้น  $10^6$  เท่า (0.2963  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย

ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ



รูปที่ 22 ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากชิ้นส่วนยีนพาเพน(A) ชิ้นส่วน 35S promoter(B) ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(C) และชิ้นส่วนเทอร์มิเนเตอร์(D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1-6 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนยีนจาก A-D โดยเรียงความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน 6 ระดับระดับละ 10 เท่า ช่อง N ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

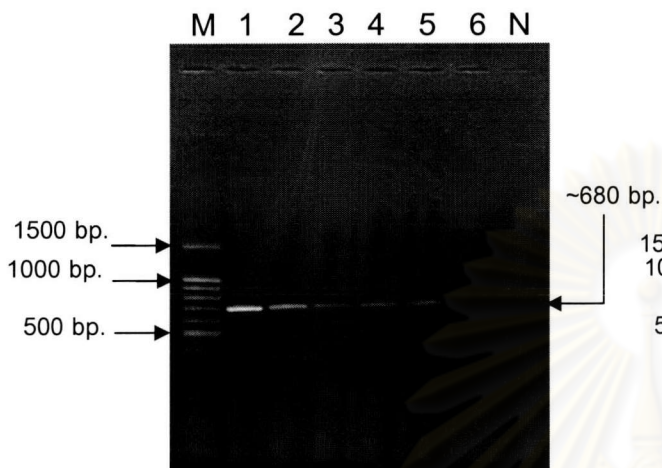
### ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีนพาเพนที่เชื่อมกับ 35S promoter ส่วน 35S promoter เชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์ และรวมทุกชิ้นส่วนที่เชื่อมกัน มีความคมชัดลดลงตามความเข้มข้นจนถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่พบแถบดีเอ็นเอที่  $10^5$  เท่า (2.9634 pg/ $\mu$ l) และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 680 1200 1100 และ 1780 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับสอดคล้องกับค่าที่คาดหวังไว้ (รูปที่ 23)

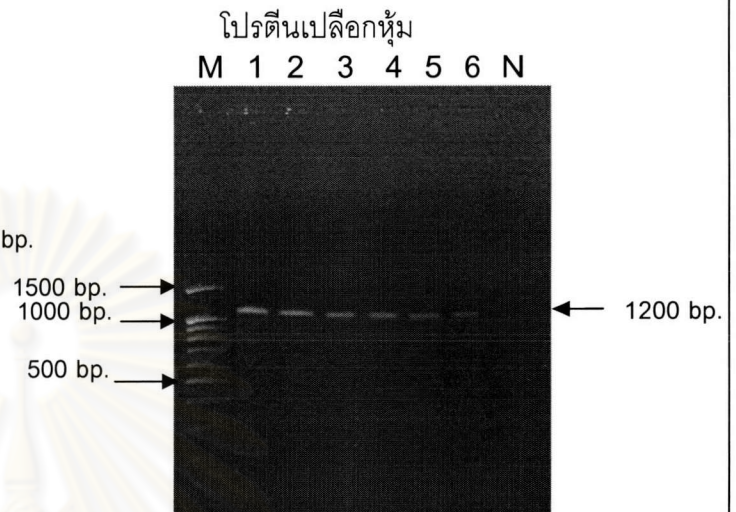


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

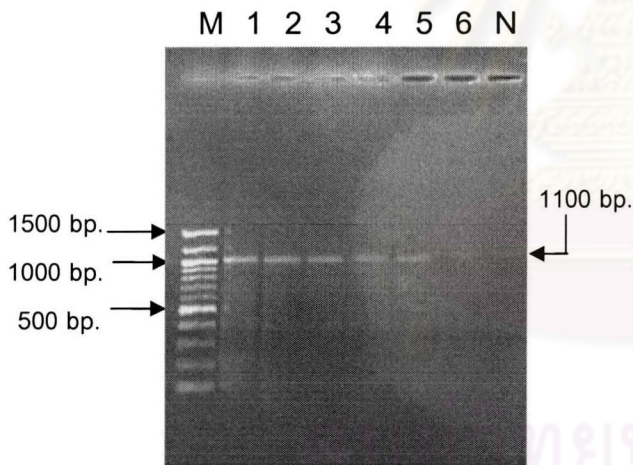
A. ชิ้นส่วนยีนพาเพนเชื่อมกับ 35S promoter



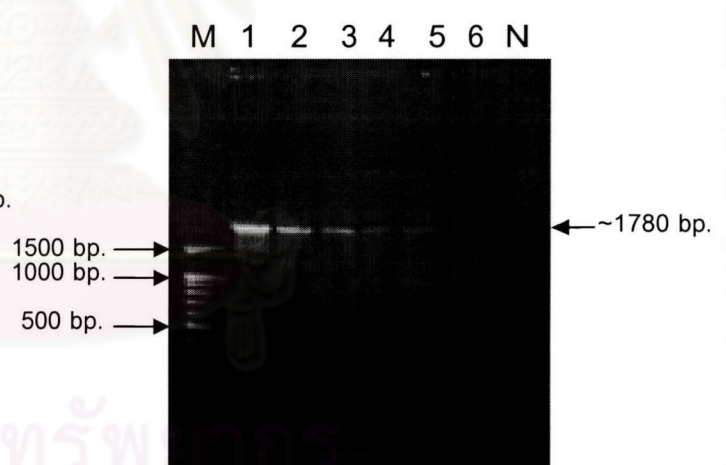
B. ชิ้นส่วนยีน 35S promoter เชื่อมกับยีน



C. ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์

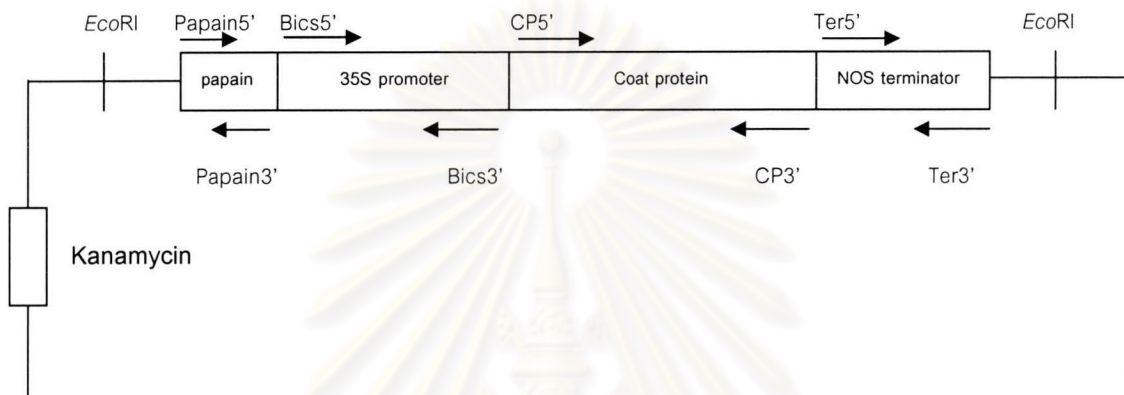


D. ชิ้นส่วนยีนรวม



**รูปที่ 23** ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากพลาสติกดีเอ็นเอในชิ้นส่วนพาเพนที่เชื่อมกับ 35S promoter (A) ชิ้นส่วนยีน 35S promoter เชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (B) ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์ (C) และชิ้นส่วนยีนรวม (D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder) ช่อง 1-6 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสติกดีเอ็นเอในชิ้นส่วนพาเพนที่เชื่อมกับ 35S promoter (A) ชิ้นส่วนยีน 35S promoter เชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (B) ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์ (C) และชิ้นส่วนยีนรวม (D) โดยเรียงความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน ระดับละ 10 เท่า 6 ระดับ ช่อง N ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

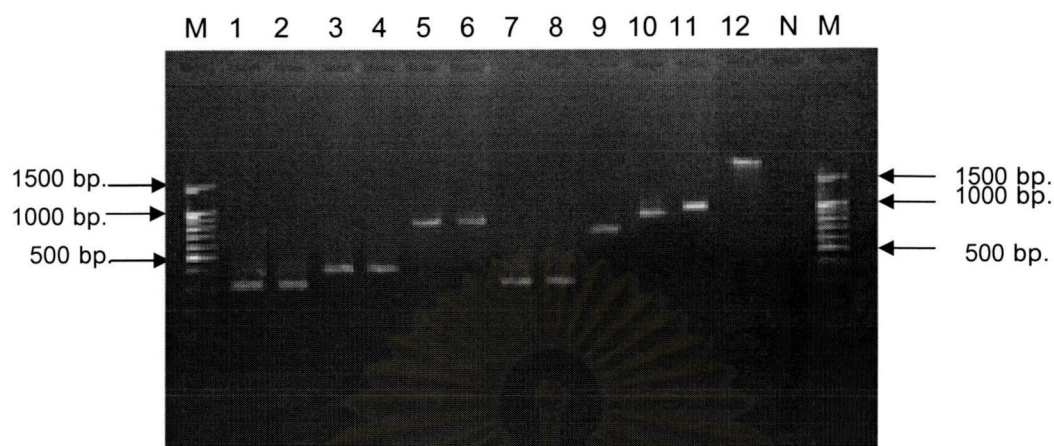
สรุปภาพรวมจากการเชื่อมพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีนพาเพนที่เชื่อมกับ 35S promoter ชิ้นส่วนของยีน 35S promoter เชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้มชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์ จนเกิดเป็นชิ้นส่วนยีนรวมที่โคลนเข้าสู่พลาสมิด



**รูปที่ 24** โครงสร้างของพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีนพาเพน 35S promoter ยีน โปรตีนเปลือกหุ้ม เทอร์มิเนเตอร์ และยีน kanamycin ส่วนที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ โดยมีคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณ คือ Papain5'/Papain3', Bics5'/Bics3', CP5'/CP3' และ Ter5'/Ter3' ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผลรวมของผลิตภัณฑ์จากพลาสมิดดีเอ็นเอในทุกส่วน



- รูปที่ 25** ผลของผลิตภัณฑ์จากพลาสมิดดีเอ็นเอในทุกส่วน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer
- ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder)
- ช่อง 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีนพาเพน (positive control)
- ช่อง 2 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนยีนพาเพน
- ช่อง 3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 35S promoter (positive control)
- ช่อง 4 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วน 35S promoter
- ช่อง 5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (positive control)
- ช่อง 6 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม
- ช่อง 7 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนเทอร์มิเนเตอร์ (positive control)
- ช่อง 8 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนเทอร์มิเนเตอร์
- ช่อง 9 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนยีนพาเพน + 35S promoter
- ช่อง 10 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม + เทอร์มิเนเตอร์
- ช่อง 11 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม + 35S promoter
- ช่อง 12 ผลการเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนของยีนพาเพน + 35S promoter + ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม + เทอร์มิเนเตอร์
- ช่อง N ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (negative control)

นำวิธีการที่พัฒนามาใช้ประกอบการทดสอบดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดได้จาก มะละกอสด มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต มะละกอจากแปลง และเนื้อเยื่อมะละกอ เมื่อนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยไพรเมอร์ซินพาเพนให้ผลการทดสอบเป็น 100% ขณะที่การตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบจาก เนื้อเยื่อมะละกอด้วยคู่ไพรเมอร์ซินโปรตีนเปลือกหุ้ม พบว่าให้ผลการตรวจสอบ 100% คือ คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกครั้ง ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะละกอสด มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต และมะละกอจากแปลง ไม่พบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนั้นในการตรวจสอบครั้งนี้ มะละกอสด มะละกอบแห้ง มะละกอกะป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ตและมะละกอจาก แปลงเป็นมะละกอที่ปลอดการดัดแปรพันธุกรรม ขณะที่เนื้อเยื่อมะละกอเป็นมะละกอดัดแปร พันธุกรรม (ตารางที่ 12)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 12 ผลการตรวจมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป ได้แก่ มะละกอบแห้ง มะละกอบรรจุน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต มะละกอจากแปลง และเนื้อเยื่อมะละกอ

ผลิตภัณฑ์	คูโพรเมอร์ที่ใช้	
	ยีนปาเปน (280 นิวคลีโอไทด์)	ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(800 นิวคลีโอไทด์)
1. มะละกอสด		
1.1 ใบ	+	-
1.2 เมล็ด	+	-
1.3 ผล	+	-
2. มะละกอบรรจุน้ำเชื่อม		
2.1 ชนิดที่ 1	+	-
2.2 ชนิดที่ 2	+	-
2.3 ชนิดที่ 3	+	-
2.4 ชนิดที่ 4	+	-
2.5 ชนิดที่ 5	+	-
2.6 ชนิดที่ 6	+	-
2.7 ชนิดที่ 7	+	-
2.8 ชนิดที่ 8	+	-
2.9 ชนิดที่ 9	+	-
2.10 ชนิดที่ 10	+	-
2.11 ชนิดที่ 11	+	-
2.12 ชนิดที่ 12	+	-

2.13 ชนิดที่ 13	+	-
2.14 ชนิดที่ 14	+	-
3. มะละกอกะป่องในน้ำเชื่อม		
3.1 ชนิดที่ 1	+	-
3.2 ชนิดที่ 2	+	-
3.3 ชนิดที่ 3	+	-
3.4 ชนิดที่ 4	+	-
4. มะละกอในโยเกิร์ต		
4.1 ชนิดที่ 1	+	-
4.2 ชนิดที่ 2	+	-
5. มะละกอจากแปลง	+	-
6. เนื้อเยื่อมะละกอ	+	+

**หมายเหตุ** + หมายถึง สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้และมีขนาดตามที่คาดหวังโดยเทคนิค PCR  
- หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้และมีขนาดตามที่คาดหวังโดยเทคนิค PCR

จากผลการทดลอง พบว่า ทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบพบยีนพาเพน และมะละกอสด ทั้งในรูปของใบ เมล็ด ผล มะละกอบแห้งทั้ง 14 ชนิด มะละกอกะป่องในน้ำเชื่อมทั้ง 4 ชนิด มะละกอในโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิด และมะละกอจากแปลงทั้ง 3000 ตัวอย่าง ผลการตรวจไม่พบยีน โปรตีนเปลือกหุ้ม ซึ่งแสดงถึงว่าเป็นมะละกอที่ปลอดการดัดแปรพันธุกรรม (free GMOs) ขณะที่ เนื้อเยื่อมะละกอผลการตรวจพบยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ซึ่งแสดงถึงว่าเป็นมะละกอที่ดัดแปรพันธุกรรม (GMOs)