บทที่ 6
การตรวจสอบและวิเคราะห์จีเอ็มโอในอาหาร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบวิธีการสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างอาหารจีเอ็มโอ
2. เพื่อให้ทราบวิธีการตรวจสอบวิเคราะห์จีเอ็มโอด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3. สามารถตรวจวิเคราะห์จีเอ็มโอ โดยการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอของ 35S promoter
4. ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

ทฤษฎีเบื้องต้น

จีเอ็มโอ (Genetically modified organisms; GMOs) คือสิ่งมีชีวิตที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม (DNA) หรือ ยีน และสิ่งมีชีวิตที่ว่านี้อาจเป็นพืช สัตว์ หรือ จุลินทรีย์ ขณะนี้ในโลกมีผลิตภัณฑ์จีเอ็มโอที่เป็นจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์ที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมอาหารและยา สัตว์บางชนิด เช่น ปลาแซลมอน แต่จีเอ็มโอจะนิยมทำในพืชเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการดัดแปลงพันธุกรรมในพืชเกิดขึ้นจากการใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม โดยนำยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งใส่เข้าไปในพืชเพื่อต้องการให้พืชมีลักษณะใหม่ ซึ่งไม่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น ความสามารถในการผลิตสารพิษฆ่าแมลง ความสามารถในการต้านทานสารปราบวัชพืช เป็นต้น

ในการตรวจสอบจีเอ็มโอ และผลิตภัณฑ์จากจีเอ็มโอนั้น อาศัยหลักการคือ การตรวจหายีนหรือสารพันธุกรรมที่ถูกดัดแปลง หรือที่ตัดต่อเข้าสู่สิ่งมีชีวิตนั้น หรือตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนนั้น วิธีการส่วนใหญ่ที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบันเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอมากกว่าการตรวจสอบโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอ ทั้งนี้เพราะโมเลกุลดีเอ็นเอมีความคงตัวมากกว่าอาร์เอ็นเอและโปรตีน ดีเอ็นเอยังสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ตลอดจนเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองได้เป็นจำนวนล้านๆ เท่า ภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) สำหรับการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอและโปรตีนจะช้ากว่ามาก และที่สำคัญคือการดัดแปลงพันธุกรรมจะเกิดขึ้นที่โมเลกุลของดีเอ็นเอโดยตรง

ในปัจจุบันพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่จะมีโปรโมเตอร์เป็น CaMV 35S promoter (มาจาก 35S rRNA ของไวรัส *Cauliflower mosaic*) และมีเทอร์มิเนเตอร์เป็น NOS terminator (มาจากยีน *Nopaline synthase* ของ *Agrobacterium tumefaciens*) ซึ่งจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2540 พบว่าในพืชที่ศึกษาเกือบทั้งหมด (27 ชนิดจาก 28 ชนิด) ของพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะพบลำดับเบสของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ดังนั้นในการตรวจสอบจีเอ็มโอ หรือผลิตภัณฑ์จากจีเอ็มโอ จึงนิยมใช้การตรวจสอบยีนดังกล่าว โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณ CaMV 35S promoter หรือ NOS terminator โดยการออกแบบไพร์เมอร์จำเพาะต่อยีนทั้งสอง (ตารางที่ 6.1)

ตารางที่ 6.1 แสดงลำดับของไพร์เมอร์สำหรับ CaMV 35S promoter และ NOS-terminator ในการทำพีซีอาร์

35S promoter oligonucleotide primers	
Sense	5’ GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3’
Antisense	5’ GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3’

NOS terminator oligonucleotide primers	
Sense	5’ GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3’
Antisense	5’ TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3’

โดยขั้นตอนเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากสารตัวอย่าง จากนั้นทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอโดยการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) สำหรับผลผลิตของพีซีอาร์ของ CaMV 35S promoter และ NOS terminator จะมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป็น 195 คู่เบสและ 180 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 6.1)

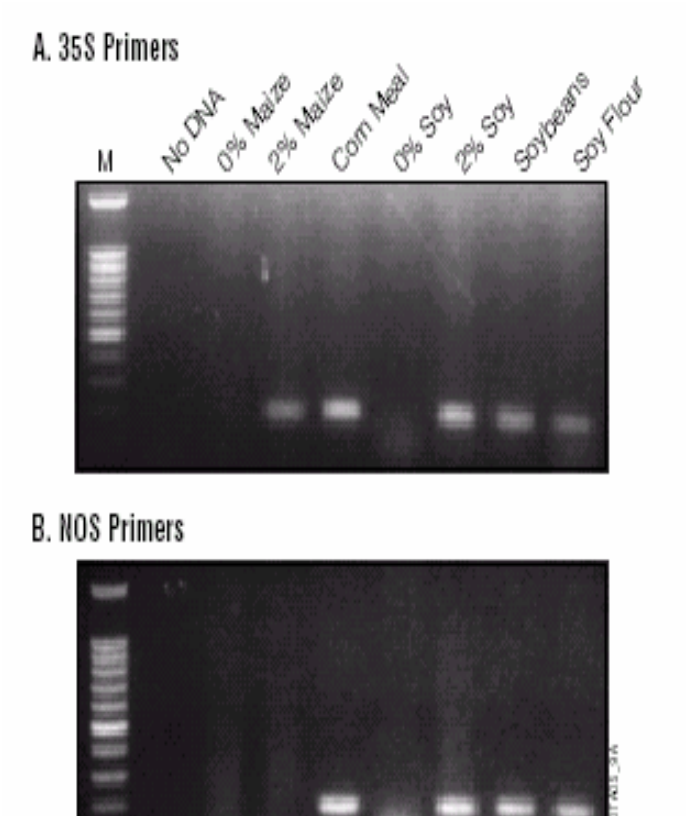
นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหายีนจำเพาะ หรือสารพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าไป (coding sequence) เช่น ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ยีนต้านทานโรคและแมลง ยกตัวอย่างเช่น ยีน chitinase ยีน *Bt*-toxin เป็นต้น และยังสามารถตรวจหายีนคัดเลือก (selectable marker gene) ที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เช่นเดียวกัน

การตรวจจีเอ็มโอ ใช้มาตรฐานเดียวกับการตรวจสอบในกลุ่มประเทศยุโรป ให้ผลแบบมีหรือไม่มีจีเอ็มโอปลอมปน ซึ่งในเดือนเมษายน พ.ศ. 2543 ได้มีการกำหนดสินค้าทางการเกษตรที่ส่งไปขายในสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่น จะต้องมีการระบุว่าเป็นจีเอ็มโอหรือไม่

<u>ขั้นตอนในการตรวจสอบชิ้นส่วนวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชที่ได้รับการตกแต่งยีน</u>

1. การสุ่มตัวอย่างและขนาดของตัวอย่างที่จะใช้เป็นตัวแทนของการตรวจสอบ
2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่เหมาะสม
3. ตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์
4. วิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

โดยยีนที่ได้รับการตกแต่งจะประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนของยีนที่ใส่เข้าไป (coding sequence) โปรโมเตอร์ (promoter) และเทอร์มิเนเตอร์ (terminator) ซึ่งจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงชิ้นส่วนวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูปอาหารต่างๆ ว่ามีการปลอมปนจีเอ็มโอหรือไม่



รูปที่ 6.1 แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตของ 35S promoter (A) และ NOS terminator (B) จากการทำพีซีอาร์

ประเภทของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์จีเอ็มโอ

1. วัตถุดิบ (raw material)

1. ถั่วเหลือง - เมล็ดถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง แป้งถั่วเหลือง
2. ข้าวโพด - เมล็ดข้าวโพด กากข้าวโพด โปรตีนข้าวโพด (corn gluten) ข้าวโพดฝักอ่อนสด แป้งข้าวโพด
3. ข้าวสาลี - เมล็ดข้าวสาลี แป้งข้าวสาลี โปรตีนข้าวสาลี (wheat gluten)
4. ฝ้าย - เมล็ดฝ้าย สมอฝ้าย ใบฝ้าย
5. ถั่วเขียว - เมล็ดถั่วเขียว โปรตีนถั่วเขียว
6. พริก - พริกแห้ง
7. มันสำปะหลัง - ท่อนมันสำปะหลังแห้ง แป้งมันสำปะหลัง
8. อื่นๆ - งา ข้าวกล้อง มันฝรั่งสด ลำต้นสับปะรด

2. ผลิตภัณฑ์ (processed products)

1. ถั่วเหลือง - ซอสปรุงรส ซอสถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว ซีอิ้ว เต้าหู้ยี้
2. ข้าวโพด - เมล็ดข้าวโพดกระป๋อง ข้าวโพดฝักอ่อนกระป๋อง
3. ข้าวสาลี - อาหารสำเร็จรูป
4. ผลไม้ - ผลไม้อบแห้ง อาทิเช่น มะพร้าว แคนตาลูป มะละกอ ฝรั่ง สับปะรด กล้วย ขิง แอปเปิล แอปริคอท มะเขือเทศ พีช แพร์ สตรอเบอรี่
5. อาหารสัตว์ - อาหารไก่เนื้อทุกระยะ
6. อื่นๆ - ปูอัด กะทิกระป๋อง น้ำจิ้มไก่ ซอสพริก ซอสมะเขือเทศ

ขั้นตอนในการตรวจสอบและวิเคราะห์จีเอ็มโอในอาหาร

1. การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป
2. ตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3. วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีส

การทดลอง

ตอนที่ 1 การสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างอาหารด้วยวิธี CTAB/phenol-chloroform-isoamyl

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารที่มีเนื้ออาหารต่างชนิดกัน มีหลักการพื้นฐานอยู่ 2 ประการคือ การบดย่อยเนื้ออาหารโดยใช้โกร่งบดจนเป็นผงละเอียดและเข้ากัน จากนั้นทำการย่อยตัวอย่างอาหารด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในบัฟเฟอร์ที่มี guanidine hydrochloride และ sodium dodecyl sulfate (SDS) และบางกรณีอาจมีการกำจัดคาร์โบไฮเดรทด้วยสารละลาย CTAB ดีเอ็นเอในเนื้ออาหารจะละลายปะปนรวมอยู่กับบัฟเฟอร์ และ

ทำให้ตกตะกอนด้วยแอบโซลูทเอทานอล หรือจะถูกเรซินสังเคราะห์จับไว้ในกรณีใช้ชุดสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นล้างดีเอ็นเอให้สะอาด แล้วละลายในสารละลายที่เหมาะสมต่อไป

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. โกร่งบด (mortar)
2. เครื่องเขย่า (vortex mixture)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro centrifuge)
4. ตาชั่งละเอียด (balance)
5. หลอดไมโครฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath)

<u>สารเคมี</u>

1. อาหารตัวอย่างจีเอ็มโอ
2. สารละลายสำหรับสกัด (extraction buffer) ประกอบด้วยสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์และสารละลาย 1% SDS
3. สารละลาย proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลาย 10 % SDS
5. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0
6. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0
7. สารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0)
8. สารละลาย CTAB (CTAB 10% โดยปริมาตร และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์)
9. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์
10. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ (Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25:24:1
11. เอทานอล 70% (v/v)
12. แอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. บดอาหารตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่งบดที่ปลอดเชื้อ
2. ชั่งตัวอย่างอาหารหนัก 150 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน โดยการใช้เครื่องเขย่า เพื่อกระจายตัวอย่างอาหารให้ทั่ว
4. เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและสารละลาย proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่องเขย่า
5. นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าให้เข้ากันตลอดเวลาโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า
6. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10% CTAB-NaCl ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7. นำหลอดทดลองไปปั่นในเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วถ่ายสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ อย่าให้มีตะกอนติดมาเป็นอันขาด
8. เติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (หรือประมาณ 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้) ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลง จนสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน (สารละลายที่ได้จะมีลักษณะเป็นของผสมขุ่นๆ) จากนั้นนำไปปั่นแยกในเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
9. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายใสชั้นบนที่มีดีเอ็นเอถ่ายลงสู่หลอดไมโครฟิวจ์อันใหม่ ให้สังเกตดูว่าระหว่างชั้นของสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ มีตะกอนสีขาวของโปรตีนเหลืออยู่หรือไม่ หากถ้ามีให้ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง หรือทำการสกัดจนไม่สามารถสังเกตเป็นตะกอนสีขาวระหว่างชั้นของสารละลาย
10. นำสารละลายชั้นบนที่ผ่านการสกัดจนสะอาดมาเติมแอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (หรือประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลาย) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
11. ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุด) แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นแยกในเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
12. ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง (ระวังตะกอนหลุด) ทิ้งไว้พอหมาด จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ที่มี RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

<u>ตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์จีเอ็มโอ โดยการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 35S promoter ด้วยเทคนิคพีซีอาร์</u>

ในการตรวจวิเคราะห์ในอาหารที่เป็นจีเอ็มโอนั้น อาศัยหลักการที่ว่าส่วนใหญ่จะมีดีเอ็นเอที่มีส่วนของ 35S promoter (เป็น promoter ที่นิยมใช้ในการโคลนยีนเข้าสู่พืชหรือทำ GMOs ชนิดอื่นๆ) การวิเคราะห์ทำได้โดยการใช้ primer ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลิโอไทด์สายสั้นๆ 1 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลิโอไทด์บน 35S promoter แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 35S promoter ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และให้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ขนาด 195 คู่เบส ซึ่งสามารถติดตามดีเอ็นเอโดยการตรวจ สอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เครื่องควบคุมปฏิกิริยาอัตโนมัติ (PCR)
2. หลอดไมโครฟิวจ์ และหลอดทำปฏิกิริยา (reaction tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
3. ออโตปิเปตต์ ขนาดต่างๆ (p10, p20, p100, p1000)

<u>สารเคมี</u>

1. ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
2. dNTP mix ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์
3. PCR system ประกอบด้วย เอนไซม์, บัฟเฟอร์และ $MgCl_2$
4. Forward primer (5′ GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3′)
5. Reward primer or reverse primer (5′ GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3′)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ผสมสารละลายที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยทุกขั้นตอนต้องทำในภาวะที่เย็น (ในน้ำแข็ง) ในกรณีที่จำนวนตัวอย่างมากควรผสมปฏิกิริยามากขึ้นตามสัดส่วนจำนวนตัวอย่าง แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างภายหลัง ตามตารางที่ 6.2
2. เมื่อผสมปฏิกิริยาดังกล่าวแล้ว ให้นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้ภาวะในการทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 6.3 ต่อไป

ตารางที่ 6.2 แสดงองค์ประกอบในการทำพีซีอาร์

องค์ประกอบ	ปริมาตร / หลอด (μl)	ปริมาตร /10 หลอด (μl)
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	18.8	188
10X reaction buffer	2.5	25
25 mM $MgCl_2$	1.5	25
10 mM dNTP mix	0.5	5
DNA จากตัวอย่าง	1.0	10
Forward primer	0.25	2.5
Reward primer	0.25	2.5
เอนไซม์ *Taq* polymerase 5 U/μl	0.2	2
ปริมาตรรวม	25	250

ตารางที่ 6.3 แสดงภาวะในการทำพีซีอาร์

ขั้นตอน	สภาวะ (อุณหภูมิ / เวลา)
Denaturation	94 °C / 3 min
Amplification	94 °C / 20 sec
	54 °C / 40 sec
	72 °C / 60 sec
จำนวนรอบ	45
Final extension	72 °C / 3 min
Cooling	4 °C / หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา

ตอนที่ 3 การตรวจวิเคราะห์จีเอ็มโอ โดยการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอของ 35S promoter ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์ ตลอดจนทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถนำไปแยกดีเอ็นเอที่มีรูปร่างและขนาดต่างกันออกจากกัน โดยอาศัยเทคนิคที่ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีการนี้มักจะทำในตัวกลาง (supporter) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกในตัวกลาง แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ซึ่งตัวกลางที่นิยมใช้มีหลายตัว เช่น อะกาโรส (agarose) และพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide)

ในการแยกดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส จะทำในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่ค่าพีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต โดยอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของอะกาโรส และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้

การตรวจวิเคราะห์อาหารที่เป็นจีเอ็มโอ นั้นทำได้โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 195 คู่เบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 35S promoter ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส แล้วย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบรไมด์

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
2. เจลแชมเบอร์ (gel chamber)
3. ออโตปิเปตต์ ขนาดต่างๆ (p10, p20, p100, p1000)
4. Horizontal gel electrophoresis system
5. UV transilluminator และอุปกรณ์บันทึกภาพ

<u>สารเคมี</u>

1. Agar/TBE buffer
2. Ethidium bromide ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. loading dye
4. 100 base pair ladder

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมเจล 1.5% อะกาโรส โดยชั่งอะกาโรสหนัก 1.5 กรัม ผสมกับ 1x TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทอะกาโรสลงในชุดเซตเจลที่ปรับระดับสมดุล และวางหวีไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออก
3. นำเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ จากนั้นเท 1x TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
4. นำดีเอ็นเอผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นจึงหยอดตัวอย่างลงในหลุมด้วยไมโครปิเปตต์ โดยใช้ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรต่อหลุม
5. ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองบนแชมเบอร์เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวล์ต เป็นเวลาประมาณ 50 นาที
6. ทำอิเลกโทรโฟรีซีสจนสีย้อมตัวอย่างอยู่ห่างจากปลายแผ่นเจลทางด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่อง
7. นำอะกาโรสเจลไปแช่ในกล่องพลาสติกที่มีสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที
8. นำอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายบัฟเฟอร์ 10x TBE

-ชั่ง Tris-HCl 107.78 กรัม (0.89 M), $Na_2EDTA.2H_2O$ 7.44 กรัม (0.02 M) และ Boric acid 55.0 กรัม (0.89 M) ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. สารละลายสีสำหรับเตรียมดีเอ็นเอ (loading dye)

-ละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น

-เติมสารละลายกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ของสารละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$

-เติม bromophenol blue 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

-ละลายเอทิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น

รายงานผลการทดลอง
เรื่อง การตรวจสอบและวิเคราะห์จีเอ็มโอในอาหาร

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____ รหัส_____

ชื่อผู้ร่วมทดลอง 1. _____ รหัส_____

2. _____ รหัส_____

กลุ่มที่_____section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1. _____

2. _____

.....

<u>ตอนที่ 1</u> การสกัดดีเอ็นจากตัวอย่างอาหารด้วยวิธี CTAB/phenol-chloroform-isoamyl

ตัวอย่าง	ชนิดของจีเอ็มโอ	ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม)
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

<u>ตอนที่ 2 และ 3</u> การตรวจวิเคราะห์จีเอ็มโอ โดยการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 35S promoter ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

รูปแสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรส

<u>สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

<u>คำถามท้ายบท</u>

1. เพราะเหตุใด ในการตรวจสอบอาหารตัวอย่างที่คาดว่าอาจเป็นจีเอ็มโอ จึงนิยมใช้การตรวจสอบดีเอ็นเอ จงอธิบาย
2. CaMV 35S promoter และ NOS terminator มีความสำคัญอย่างไรต่อการตรวจสอบอาหารจีเอ็มโอ จงอธิบาย
3. นักศึกษาคิดว่ามีสาเหตุใดได้บ้าง ที่อาจทำให้ตรวจสอบอาหารที่เป็นจีเอ็มโอไม่พบทั้งๆ ที่ผลิตภัณฑ์นั้นเป็นจีเอ็มโอ
4. นักศึกษาคิดว่าประเทศที่อนุญาตให้มีการจำหน่ายอาหารจีเอ็มโอได้ ควรจะมีมาตรการอย่างไร เพื่อไม่ให้มีการปลอมปนของอาหารจีเอ็มโอ
5. ในปัจจุบันประชากรโลกได้เพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณของอาหารที่ลดน้อยลง และนักวิจัยได้พยายามผลิตอาหารที่เป็นจีเอ็มโอมากขึ้นเรื่อยๆ และอนุญาตให้จำหน่ายได้ในบางประเทศนั้น นักศึกษาคิดว่าอาหารจีเอ็มโอที่ผลิตขึ้นนั้นมีความปลอดภัยมากน้อยเพียงใด และนักศึกษาสนับสนุนหรือคัดค้านการทำจีเอ็มโอ เพราะเหตุใด