การพัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอสำหรับตรวจวิเคราะห์ข้าวดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt63 เพื่อทดแทนสารมาตรฐาน

Development of plasmid Bt63 rice DNA as positive control material

ปวีณา พานิชกุล*, นิตยา พันธุ์บัว, สีแพร ชูชีวา, สุพัฒตา ท้าวมา

Paveena Panichakul, Nittaya Phunbua, Siprae Shooshewa, Supatra Taoma

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากข้าวดัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt63 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอโดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูง และในการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องมีการใช้สารมาตรฐานชนิดดีเอ็นเอที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศที่มีราคาสูงเพื่อเป็นตัวควบคุม มีอายุการใช้งานประมาณ 6 – 12 เดือน จึงทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมีราคาสูง การศึกษานี้จึงได้พัฒนาสารควบคุมขึ้นมาใช้เองโดยการใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสของยีน Bt63 เข้าไปในเวคเตอร์ด้วยเทคนิค TA-cloning ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลมเรียกว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ เมื่อนำมาทดสอบความไวและความจำเพาะเทียบกับสารมาตรฐานชนิดดีเอ็นเอที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบัน ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้นมี specificity และ sensitivity เท่ากับ 100% แต่ต้องใช้ปริมาณในการวิเคราะห์แต่ละครั้งเท่ากับ 50 ng/ Reaction มากกว่าดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งใช้ 50 pg/ Reaction แต่อย่างไรก็ตามยังถือว่าเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์แบบคุณภาพ และยังสามารถลดค่าใช้จ่ายได้อย่างน้อย 10 ปี (จากข้อมูลสารควบคุมชนิดพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพดสตาร์ลิ้งค์ที่จัดทำตั้งแต่ 2548 ซึ่งยังคงสามารถใช้งานได้ถึงปัจจุบัน)

คำสำคัญ: พลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวดัดแปรพันธุกรรม Bt63, Real-time PCR

Abstract

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences uses real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) for transgenic Bt63 rice analysis. This technique has high precision and high sensitivity but requires reference standard for testing. At present, the only reference standard commercially available is DNA, but it is very costly and has a short shelf-life of only 6 – 12 months. In this study, an alternative standard control was developed by inserting Bt63 sequence into vector using TA-cloning technique. As a result, recombinant circular-DNA (plasmid DNA) was obtained. When this plasmid DNA was tested against reference DNA using real-time PCR technique, the result showed 100% specificity and sensitivity. However, an amount of our plasmid DNA required for each reaction is 50 ng which is much higher than 50 pg of reference DNA used for each reaction. Nevertheless, our in-house developed plasmid DNA is considered appropriate for qualitative analysis of Bt63 rice and by using this plasmid DNA, it will help reduce analytical cost for at least 10 years (According to data from the starlink maize plasmid, which has been develop since 2005, can still be used until now).

Key words: Plasmid DNA, GM Bt63 rice, Real-time PCR

***Corresponding author**

E-mail: paveena.p@dmsc.mail.go.th