

การพัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA *Cry9C*) โดยวิธีโคลนนิ่ง ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์

ปรีณา พานิชกุล และจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิดสตาร์ลิงค์ของห้องปฏิบัติการตรวจอาหารดัดแปรพันธุกรรม สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูง และในการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องมีการใช้สารมาตรฐานเพื่อเป็นตัวควบคุม เดิมใช้สารมาตรฐานที่มากับชุดทดสอบสำเร็จรูป (Starlink Kit) ซึ่งมีราคาแพงและต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศมีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน ทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมีราคาสูงมาก จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ โดยไม่ต้องใช้ชุดทดสอบ โดยพัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอโดยโคลนนิ่งยีน *Cry9C* จากเมล็ดข้าวโพดสตาร์ลิงค์เพื่อใช้เป็นสารควบคุม (internal positive control) ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ขึ้นทดแทน โดยใช้วิธีทำ PCR ในส่วนของยีนที่สนใจแล้วโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ pDrive ก่อนถ่ายฝากเข้าเซลล์ของ *E.coli* ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ระดับ (1 : 5 และ 1 : 10) และปริมาณในการถ่ายฝากเข้าเซลล์ 2 ระดับคือ 2 μ l และ 5 μ l ซึ่งผลการโคลนนี้จะได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนของข้าวโพดสตาร์ลิงค์ที่ต้องการนำมาใช้เป็นสารควบคุมในการวิเคราะห์ เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้นี้มาทดสอบเปรียบเทียบกับ genomic DNA ของข้าวโพดสตาร์ลิงค์พบว่าความไวและความจำเพาะของการตรวจจากดีเอ็นเอทั้งสองนี้ไม่มีความแตกต่างกัน พลาสมิดดีเอ็นเอช่วยลดต้นทุนค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่างได้และมีอายุการเก็บรักษายาวนานกว่า สะดวกในเวลาที่ต้องการใช้งานเพราะใช้เวลาเตรียมและสกัดออกมาใช้งานได้ในเวลา 3 วัน ไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และยังสามารถนำกระบวนการเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมสารควบคุม (plasmid internal control) ในพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ที่ยังไม่สามารถจัดหาได้

บทนำ

ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิดสตาร์ลิงค์เป็นข้าวโพดที่พัฒนาขึ้นมาโดยบริษัท Aventis Cropscience โดยการใส่ยีน *Cry9C* จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* strain BTS02618A เพื่อให้ข้าวโพดทนต่อหนอนเจาะฝักข้าวโพด แต่เนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้จากยีนนี้ที่ทนต่อการย่อยด้วยเปปซินที่ pH 2.0 นาน 4 ชั่วโมง ทนความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสนาน 10 นาทีโดยไม่เสียสภาพ จึงมีการอนุญาตให้ใช้พืชนี้เป็นอาหารสัตว์เท่านั้น⁽¹⁾ ต่อมาเมื่อ 18 กันยายน 2543 มีรายงานการตรวจพบยีนนี้ในอาหาร taco shell

จึงทำให้หลายประเทศทั่วโลกมีการตรวจหา ยีนนี้ในข้าวโพดและผลิตภัณฑ์ข้าวโพด

การตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมชนิดสตาร์ลิงค์ของห้องปฏิบัติการตรวจอาหารดัดแปรพันธุกรรม สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูง และในการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องมีการใช้สารมาตรฐานเพื่อเป็นตัวควบคุม เดิมใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Starlink Kit) ซึ่งมีราคาแพงและต้องสั่ง

ชื่อจากต่างประเทศ ปัจจุบันเราสามารถตรวจพัฒนาวิธีวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ได้โดยไม่ต้องใช้ชุดทดสอบ แต่สารมาตรฐานที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบันเป็นสารมาตรฐานที่ได้มากับชุดทดสอบ ทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมีราคาแพงมาก จึงได้พัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นสารควบคุม (internal positive control) ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ขึ้นทดแทนสารมาตรฐาน เพื่อให้มีราคาที่ถูกลงและสามารถใช้งานได้สะดวกขึ้นทั้งการเพิ่มจำนวนและการเก็บรักษา

หลักการในการพัฒนาพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นสารควบคุมในการตรวจวิเคราะห์นั้นใช้วิธีการโคลนยีน โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (ดีเอ็นเอของยีน *Cry9C*) เชื่อมต่อกับเวกเตอร์แล้วถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ ซึ่งมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นด้วย จากนั้นจึงสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ผู้รับ จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ในรูปพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

ขั้นตอนในการโคลนยีนคือ นำยีนที่สนใจหรือช่วงยีนเป้าหมายมาเชื่อมกับเวกเตอร์ก่อนโดยใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายพร้อมเวกเตอร์ และใช้ ligation enzyme บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วนำมาถ่ายฝากในเซลล์ผู้รับในที่นี้คือ *E.coli* โดยแช่เซลล์ผู้รับในสภาพที่มีไอออนของแคลเซียม (แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50mM) ที่ 0 - 5 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์ผู้รับง่ายต่อการถ่ายฝาก (competent cell) แล้วใส่เวกเตอร์ที่ใส่ดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วลงไป แช่ต่อประมาณ 15 - 30 นาที แล้วทำ Heat shock ช่วงเวลาสั้นๆ ที่ 42 องศาเซลเซียส (30 วินาที - 2 นาที ขึ้นกับ strain ของเซลล์ผู้รับ) แล้วเลี้ยงเซลล์ผู้รับที่ได้รับการถ่ายฝากแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective medium และนำเชื้อที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีทำให้เซลล์ *E.coli* ในสภาพที่มีความเป็นด่างสูง (high pH) และความเข้มข้นของประจุลบหนาแน่น (strongly anionic detergent) เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก โปรตีนและโครโมโซมของ *E.coli* เสียสภาพและตกตะกอนออกมา เหลือเพียงพลาสมิดดีเอ็นเอละลายอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมชนิดสตาร์ลิงค์ (Starlink-corn)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Centrifuge ขนาด 1.5-ml ความเร็วรอบ 12000 g, Spectrophotometer 260 และ 280 nm, Pipette 0.5-10 μ l, 1-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l พร้อม pipette tip, Reaction tube 0.2-, 0.6-, 1.5-, 2.0-ml, Refrigerator-freezer, Ice-box, Arctic box, Heat block, Spreader, จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

PCR purification Kit (PB, PE, EB, purification column, resin), Cloning Kit Plus (2 $\times$ Ligation master-mix, pDrive cloning vector, EZ competent cell, SOC medium), IPTG, X-gal, Kanamycin, Alkaline Lysis I, Alkaline Lysis II, Alkaline Lysis III, Iso-propanol, 70% Ethanol, 1xTE, 80% Glycerol, LB Agar, LB broth

วิธีปฏิบัติ

มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ การเตรียม PCR-product การโคลน PCR-product ใส่ในเซลล์ *E.coli* การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ การทดสอบเชื้อและการเก็บรักษา

1. วิธีการเตรียม PCR-product

เตรียม PCR-product ของ Cry9C ขนาด 171 bp (PCR reaction/1 Rxn: 1xPCR buffer, 3mM $MgCl_2$, 0.2mM dNTP, 0.2 μ M each primer (Cry9C-f: 5' - TAC TAC ATC gAC CgC ATC gA - 3' และ Cry9C-r: 5' - CCT AAT TCC CTT ATC Tgg gA - 3'), 0.5U HotStart Taq DNA polymerase, DNA template 50 ng) โดยใช้เครื่อง ThermalCycler MJ PTC-200 (ใช้ time-temperature : Denature 95°C 10 min, Amplification 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s 40 cycles, Final extension 72°C 10 min)

นำ PCR-product ที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis (3% agarose in 1xTAE, 100V ~ 30 นาที) เพื่อทราบขนาดและปริมาณของ PCR-product ที่ได้แล้ว

กำจัดสารเคมีอื่นๆ ที่ปะปนอยู่จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ PCR purification kit (QIAGEN) ตามวิธีระบุใน QIAquick® Spin Handbook for QIAquick PCR purification Kit, July 2002⁽²⁾ จากนั้นทำการเจือจางดีเอ็นเอที่ได้ในปริมาณ 10 ng/ μ l

2. ขั้นตอนการโคลน

โคลน PCR-product ใส่ใน *E.coli* ปฏิบัติตามวิธีที่ระบุใน QIAGEN® PCR Cloning Handbook for QIAGEN PCR Cloningplus Kit, April 2001⁽³⁾ และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Mini-prep alkaline lysis ตามวิธีระบุใน Chapter 1: Protocol 1, Molecular Cloning: A laboratory manual 3rd edition, Cold spring Harbor Laboratory Press 2003.⁽⁴⁾

ใช้ molar ratio ของ Vector : PCR Product = 1 : 5 และ 1 : 10 (ใช้ λ -Hind III DNA เป็น control)

$$\text{การคำนวณค่า ng} = \frac{50 \text{ ng} \times \text{PCR product size} \times \text{molar ratio}}{3851 \text{ bp}}$$

2.1 ขั้นตอน Ligation: นำยีนที่สนใจหรือช่วงยีนเป้าหมายมาเชื่อมกับเวกเตอร์ก่อนโดยใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายพร้อมเวกเตอร์ และใช้ ligation enzyme บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

2.2 ขั้นตอน Transformation: ถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอให้เซลล์ผู้รับ

2.2.1 ใช้ EZ competent cell เป็นเซลล์ผู้รับ โดยใช้ Ligation mixture 2 μ l และ 5 μ l และทำ Heat shock ที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

2.2.2 Spread ที่ผิวหน้าอาหาร LB agar ที่มี Kanamycin 30 (g/ml ด้วย IPTG (20%w/v) 7 μ l และ X-gal (2%w/v) 40 องศาเซลเซียส (LB-KIX)

2.2.3 Spread สารจากข้อ 2.1 ลง LB-KIX ที่เตรียมไว้ใน 2.2.2 บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

2.3 ทดสอบโคโลนีและการเก็บเชื้อ

2.3.1 โคโลนีที่ขึ้นบน plate จะมีสีฟ้าและสีขาวให้เลือกโคโลนีสีขาวที่แสดงว่ามีการถ่ายฝากดีเอ็นเอได้สำเร็จ จำนวน 5 โคโลนี re-streak บน LB-KIX บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

2.3.2 เชื้อเชื้อจาก plate ที่มีโคโลนีสีขาวลงใน LB broth ที่มี Kanamycin 30 μ g/ml บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมงพร้อมเขย่า

2.3.3 สกัดโดยวิธี Mini-prep alkaline lysis

2.3.4 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้ทำ PCR กับ primer *Cry9C* แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis

3. วิธีการเก็บรักษา

3.1 เพิ่มจำนวนเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวก กับ Primer *Cry9C* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth

3.2 Aliquot 500 µl ใส่หลอดขนาด 2.0-ml ที่มี 80% glycerol 200 µl เก็บที่ -70°C

4. วิธีการทดสอบพลาสมิดที่ได้ โดยหาค่า sensitivity และ specificity

4.1 ทดสอบ sensitivity ของพลาสมิด ดีเอ็นเอกับ primer *Cry9C* ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ในปริมาณ 10 pg/Rxn เทียบกับดีเอ็นเอจาก ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ปริมาณ 75 ng/Rxn ทำการทดสอบครั้งละ 10 ซ้ำทำทั้งหมด 3 ครั้ง

4.2 ทดสอบ specificity กับ primer สำหรับ Bt176, Bt11, MON810 และ T25 ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการในปริมาณ 10 pg/Rxn เทียบกับดีเอ็นเอ จากข้าวโพดสตาร์ลิงค์ปริมาณ 75 ng/Rxn ทำการทดสอบ primer ละ 10 ซ้ำ

ผล

การใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไปในเวกเตอร์ที่ ความเข้มข้นระดับ 1 : 5 และ 1 : 10 molar ratio ให้ โคลนีสีขาวได้ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นแม้ว่าเมื่อใช้ 1 : 10 molar ratio มีโคลนีสีขาวที่แสดงว่ามีการ ถ่านฝากดีเอ็นเอได้สำเร็จมากกว่าเมื่อใช้ในระดับ

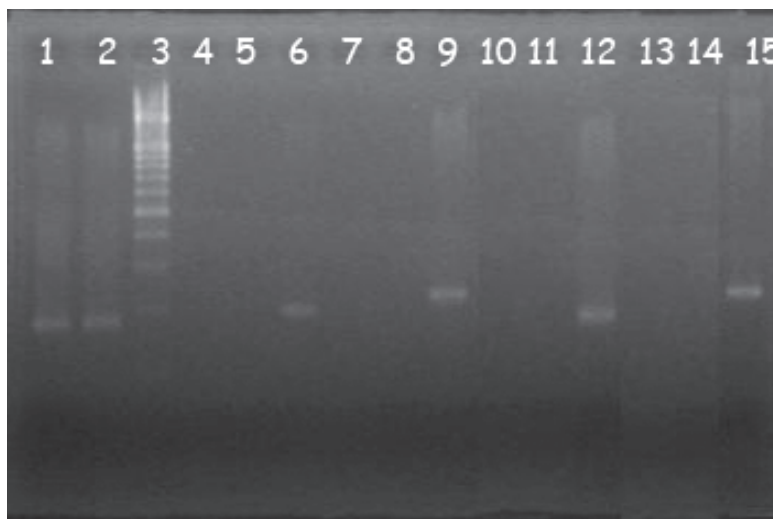
1 : 5 molar ratio บ้าง และเวลาในการบ่มทั้งสอง ช่วงเวลาที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้ง 4 และ 24 ชั่วโมง ให้จำนวนโคลนีสีขาวใกล้เคียงกันเมื่อสกัดพลาสมิด ดีเอ็นเอจากทุกโคลนีสีขาวแล้วนำมาทดสอบโดยใช้ ปฏิกริยา PCR สำหรับ *Cry9C* พบว่าเชื้อที่ให้การ เจริญเป็นโคลนีสีขาวให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย *Cry9C* primer ทุกโคลนีสี และเมื่อนำพลาสมิดดี เอ็นเอที่ได้มาทดสอบเปรียบเทียบ specificity และ sensitivity กับสารมาตรฐานให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยให้ผลบวกทั้งหมดกับ primer *Cry9C* ทั้ง 30 ซ้ำที่ 10 pg/Rxn (sensitivity 100%) และให้ผลลบทั้งหมดกับ primer สำหรับ Bt176, Bt11, MON810 และ T25 (specificity 100%) ภาพที่ 1 สามารถเก็บรักษาเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด ดีเอ็นเอนี้ที่ -70 องศาเซลเซียสได้นานถึง 26 เดือน และจะมีการตรวจสอบระยะเวลาการเก็บต่อไปอีก เมื่อต้องการใช้งานจะนำ *E.coli* มาเลี้ยงเพิ่มจำนวน เชื้อใน LB broth และสกัดเพื่อใช้เป็นสารควบคุม (internal positive control) ในการตรวจวิเคราะห์ ข้าวโพดสตาร์ลิงค์เพื่อทดแทนสารมาตรฐาน

Lane 1-2 : primer *Cry9C*, lane 3 : 100-bp ladder, lane 4-6 : primer Bt11, lane 7-9 : primer Bt176, lane 10-12 : primer MON810, lane 13-15 : primer T25

Lane 1, 4, 7, 10 และ 13 : plasmid DNA *Cry9C*, lane 2, 5, 8, 11 และ 14 : ข้าวโพด starlink, lane 6 : ข้าวโพด Bt11, lane 9 : ข้าวโพด Bt176, lane 12 : ข้าวโพด MON810, lane 15 : ข้าวโพด T25

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนนิ่งได้เทียบกับดีเอ็นเอจากข้าวโพดสตาร์ลิงค์

Primer	ผลการทดสอบ			
	พลาสมิดดีเอ็นเอ		ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ดีเอ็นเอ	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Cry9C	30/30	-	30/30	-
Bt 11	-	10/10	-	10/10
Bt 176	-	10/10	-	10/10
MON 810	-	10/10	-	10/10
T 25	-	10/10	-	10/10
Specificity	$40 \times 100/40 = 100\%$		$40 \times 100/40 = 100\%$	
Sensitivity	$30 \times 100/30 = 100\%$		$30 \times 100/30 = 100\%$	



ภาพที่ 1 ; ผล PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอเทียบกับข้าวโพดสตาร์ลิงค์

วิจารณ์

การตรวจผลการโคลนว่าสามารถถ่ายฝาก Cry9C เข้าไปในเซลล์ *E.coli* โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Kanamycin, X-gal และ IPTG เพราะการโคลนจะใส่ชิ้นส่วนที่ต้องการเข้าไปในเวกเตอร์ pDrive (ที่มียีนที่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะชนิด Kanamycin) ในตำแหน่งที่แทรกเข้าไปในอยู่ภายในลำดับของยีน Lac Z ทำให้ยีน LacZ ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -glucogalactosidase

ได้ ทำให้ *E.coli* ที่มีเวกเตอร์ดังกล่าวแต่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ภายในเซลล์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้และยีน Lac Z จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย IPTG และเปลี่ยน X-gal ได้สารสีฟ้าทำให้มองเป็นโคโลนีของเชื้อเป็นสีฟ้า ในทางตรงกันข้ามถ้ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่ระหว่าง Lac Z ยีนดังกล่าวจะไม่ทำงาน ทำให้ได้โคโลนีสีขาว ดังนั้นการทดสอบผลการ

โคลนนิ่งจะทำการนับจำนวนและเลือกโคลนที่มีสีขาวที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการโคลนในขั้นตอน ligation มีการเลือกปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการใส่เข้าไปในเวกเตอร์ 2 ความเข้มข้นคือ 1 : 5 และ 1 : 10 บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง สามารถให้โคลนที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอเหมือนกัน ดังนั้น ligation ที่ 4 องศาเซลเซียสใช้เวลาแค่ 4 ชั่วโมงเป็นการลดเวลาได้ ส่วนปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ใช้ใน ligation ใช้ได้ทั้งระดับ 1 : 5 หรือ 1 : 10 ก็ได้ ในขั้นตอนการ transformation เลือก 2 และ 5 μ l ผสมกับ EZ competent cell จะเลือกทำทั้ง 2 ปริมาณ เพราะไม่สามารถทราบได้ว่าปริมาณเท่าไรจะให้ออกาสของการถ่ายฝากเกิดมากกว่ากัน และได้โคลนสีขาวที่ไม่มากหรือน้อยเกินไป การใช้ที่ 2 μ l แม้ได้โคลนที่มีสีขาวน้อยแต่ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างโคลนสีขาวและสีขาวได้ง่ายขึ้น ส่วนการใช้ปริมาณมากอาจทำให้โคลนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจนความต้องการแต่เป็นการให้ออกาสของเวกเตอร์ที่จะเข้าไปในเซลล์ผู้รับขณะถ่ายฝากถ่ายมีเพิ่มขึ้น ในส่วนราคาของสารมาตรฐานต่อตัวอย่างวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับแล้วมีราคาถูกกว่า จากเดิมถ้าใช้สารมาตรฐานจากชุดสำเร็จรูปที่ซื้อมาจากต่างประเทศต้นทุนจะสูงถึง 250 บาท/ตัวอย่าง และมีอายุการใช้งานไม่เกิน 1 ปี ในขณะที่พลาสมิดที่เราโคลนมีราคาไม่ถึง 50 บาท/ตัวอย่าง และสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 2 ปี ซึ่งช่วยลดทั้งต้นทุนและสะดวกในการใช้งานมากกว่าโดยมีผลการใช้งานไม่แตกต่างจากการใช้สารมาตรฐาน

สรุป

จากผลการโคลนนิ่งดีเอ็นเอเป้าหมาย ได้พลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นสารควบคุม (internal positive control) ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวโพดสตาร์ลิงค์ขึ้นทดแทนสารมาตรฐานที่ทำได้ยากและ

มีราคาแพง ซึ่งผลการโคลนนิ่งทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานได้ตามต้องการ ลดต้นทุนค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่างได้ และมีอายุการเก็บรักษายาวนานกว่า สะดวกในเวลาที่ต้องการใช้งานเพราะใช้เวลาเตรียมและสกัดออกมาใช้งานได้ในเวลา 3 วัน โดยไม่ต้องมีการรอส่งซื้อจากต่างประเทศและยังสามารถนำกระบวนการเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมสารควบคุม (plasmid internal control) ในพืชตัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่นๆ เช่น ข้าวโพดตัดแปรพันธุกรรมชนิด Bt176, MON810, T25, GA21 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมชนิด sunup และ rainbow ซึ่งมีปัญหาในการหาสารควบคุมและมีราคาสูงเช่นเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ร่วมงานทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี ขอขอบคุณนางนิตยา พันธุ์บัว นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 7ว ที่ได้สนับสนุน ให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขให้งานลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Database Product Description: ACS-ZM4-3 (CBH-351); [cited 2004 Feb 16]; [6 screens]. Available at: URL : <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=CBH-351&format=LONG#>
2. QIAquick(r) Spin Handbook for QIAquick PCR purification Kit, July 2002.
3. QIAGEN(r) PCR Cloning Handbook for QIAGEN PCR Cloningplus Kit, April 2001.
4. Joseph M and Russell DW, editors. Molecular Cloning : A laboratory manual 3rd ed, New York : Cold spring Harbor Laboratory Press; 2003. p. 1.32 - 1.34.

Developing of Plasmid DNA *Cry9C* for Starlink Maize Detection by Cloning Technique

Paveena Panichakul and Chanchai Jaengsaewang

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT The Laboratory for Genetically Modified Food of Bureau of Quality and Safety of Food (BQSF), Department of Medical Sciences (DMSc) use Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for transgenic maize testing. This technique has high performance, but require reference control for testing. The laboratory use Starlink maize-test kit at the beginning, but the kit is very expensive and has 6-months shelf life only. In order to reduce cost of testing and extend period of shelf life, the laboratory has developed an inserted *Cry9C* plasmid DNA to replace the reference standard. The techniques are insertion of target DNA region from Starlink maize into vector (molar ratio target of DNA to vector are 1 : 5 and 1 : 10), transformation 2 level of recombinant DNA into *E.coli* cell (2 µl and 5µl), then cultivation to increase cell amount, and extraction of plasmid DNA. After those steps, the laboratory has tested for sensitivity and specificity by comparing plasmid DNA to Starlink maize DNA. The investigation indicated no difference of sensitivity and specificity of both DNA. Using of plasmid DNA for Starlink maize detection have many advantages : lower cost of detection, longer shelf life, and no need to imported reference control. This technique can be used to prepare plasmid for other GMOs detection.

Keywords : Starlink maize, plasmid DNA, pDrive