การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองกรดโอลิอิกสูงที่ผ่านการปรับแต่งยีน *FAD3A* ด้วยเทคนิค Duplex PCR

วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร* , ปรียาภรณ์ สีคราม , ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และ อรุโณทัย ซาววา

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

*weraouddy@hotmail.com

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของโลก จัดอยู่ในพืชที่มีแหล่งอาหารที่สำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน แต่ไขมันที่ได้จากถั่วเหลืองเป็นไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงทำให้การเก็บรักษาได้ไม่นาน ซึ่งในกระบวนการอุตสาหกรรมจึงมีการเติมไฮโดรเจนเพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษา แต่เนื่องจากการเติมไฮโดรเจนทำให้เกิดไขมันทรานส์ (Tran-fatty acid) โดยไขมันชนิดนี้จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในถั่วเหลือง พบว่าการปรับแต่งยีน Fatty Acid Desaturase *(FAD2)* และ *(FAD3)* สามารถควบคุมกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในถั่วเหลืองได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองกรดโอลิอิกสูงที่ผ่านการปรับแต่งยีนด้วยเทคนิค Duplex PCR ผลการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนมในยีน *FAD3A* ในปฏิกิริยาแบบยีนเดียว (Simplex PCR) พบว่าคู่ไพรเมอร์ FAD3_T1F และ FAD3_T1R มีความจำเพาะเจาะจงต่อถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม และเมื่อเพิ่มคู่ไพรเมอร์ LectinF และ LectinR เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD3_T1 ในปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน (Duplex PCR) และทำการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing พบว่าที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอขึ้น 2 แถบได้ชัดเจนที่สุดเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

คำสำคัญ: ถั่วเหลือง ปรับแต่งจีโนม กรดโอลิอิก ยีน *FAD3A*

Development of detection method for *FAD3A* gene edited high oleic acid soybean by duplex PCR technique

Weerasak Pitaksaringkarn* , Preeyaporn Seekram , Thitirut Assawamongkholsiri and Aroonothai Sawwa

Biotechnology Research and Development Bureau Department of Agriculture, Chatuchak District, Bangkok
* weraouddy@hotmail.com

Abstract

Soybeans are one of the world's most economically important crops. It were classified in plants that are important food sources of protein and fat. However fat from soybeans is highly polyunsaturated fat which is the cause of shorter shelf life. In the industrial process, hydrogen is utilized to increase shelf life, but since hydrogenation produces trans fats (Tran-fatty acid), this type of fat has a huge impact on the consumer health. Because it may increase the risk of heart disease and high blood cholesterol. From the study of fatty acid biosynthesis pathway in soybeans, it was found that Fatty Acid Desaturase (*FAD2*) and (*FAD3*) genes were able to regulate the polyunsaturated fatty acid synthesis in soybeans. The purpose of this research is to develop a technique for detection the high-oleic-acid in the mutated soybeans which is undergone the duplex Polymerase chain reaction (PCR) technique based on the results of a primer pair test used in PCR reaction. The wild type soybean DNA was compared with the synthetic gene edited soybean DNA in the *FAD3A* gene in a single-gene reaction (Simplex PCR). Specific DNA band of *FAD3A* gene was not found in mutant. The LectinF and LectinR primer pairs were added to the PCR reaction in the FAD3_T1 primer pair in the duplex PCR reaction, and adjusted in the annealing step at 56 °C, The two DNA bands were most clearly visible in wild type soybean while in mutant showed single DNA band in gel electrophoresis.

Keywords: Soybean, genome editing, oleic acid, *FAD3A* gene

1. บทนำ

เทคโนโลยีการดัดแปลงพันธุกรรมพืชยังคงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและแพร่หลายมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งวิธีการดัดแปลงพันธุกรรมก็มีหลายวิธีการ อาทิเช่น การใช้สารเคมี การฉายรังสี การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และการแก้ไขยีน เป็นต้น ซึ่งเทคโนโลยีการแก้ไขยีน (Gene-editing) เป็นกระบวนการที่เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาสายพันธุ์พืชมากขึ้น เนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีความหลากหลายในการแก้ไขยีนเพื่อจัดลำดับยีนตามลำดับจีโนมที่ดัดแปลง ปัจจุบันมีพืชที่มีการปรับแต่งจีโนมหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง เห็ด แตงกวา มะเขือเทศ แอปเปิ้ล และไม้ดอก เป็นต้น โดยลักษณะการปรับแต่งจีโนม เช่น ลักษณะความต้านทานและทนทาน ทนแล้ง ทนเค็ม ต้านทานฝน ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช และลักษณะการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ กรดโอลิอิกสูง ใยอาหารสูง ปราศจากกลูเตน ลดไขมันอิ่มตัว ต้านสารอนุมูลอิสระ และเพิ่มโอเมก้า 3 เป็นต้น Islam *et al.* [1] ซึ่งถั่วเหลืองก็เป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการนำมาปรับแต่งแก้ไขยีนอย่างแพร่หลาย เนื่องด้วยถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของโลก ที่เกษตรกรในทวีปต่าง ๆ โดยเฉพาะในเขตที่มีอากาศอบอุ่นและค่อนข้างร้อนนิยมปลูก ถั่วเหลืองจัดอยู่ในพวกพืชตระกูลถั่วที่มีแหล่งอาหารที่สำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน อีกทั้งมีสารอาหารหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพที่ช่วยป้องกันโรค ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองในปี พ.ศ. 2564 มากถึง 3,500,000 ตัน เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารคนและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น โดยเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 40% และมีน้ำมันประมาณ 20% Cheng *et al.* [2] โดยน้ำมันที่ได้จากถั่วเหลืองมักพบว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบจึงส่งผลทำให้เก็บรักษาได้ไม่นานเนื่องจากจะเกิดการเหม็นหืนได้ง่าย ซึ่งในกระบวนการอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันจากถั่วเหลืองจึงมีการเติมไฮโดรเจนลงไปเพื่อให้ไฮโดรเจนเข้าไปสร้างพันธะเดี่ยวกับคาร์บอนในกรดไขมัน เรียกกระบวนการนี้ว่า ไฮโดรจีเนชั่น (Hydrogenation) ทำให้ผลลัพธ์จากกระบวนการนี้จะได้น้ำมันถั่วเหลืองที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่สูงขึ้น แต่การเติมไฮโดรเจนเข้าไปในกรดไขมันมักพบว่าเกิดการเติมแบบไม่สมบูรณ์ (Partial hydrogenation) ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้ได้ไขมันทรานส์ (Tran-fatty acid) โดยไขมันชนิดนี้จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากอาจทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน มะเร็งเต้านม และโรคตับ เป็นต้น Khamphanh [3] ดังนั้นถั่วเหลืองที่ผลิตไขมันอิ่มตัวโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีจึงเป็นที่ต้องการมากขึ้นในปัจจุบัน จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในถั่วเหลืองพบว่ายีน Fatty Acid Desaturase *(FAD2)* และ *(FAD3)* สามารถควบคุมกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวในถั่วเหลืองได้ Demorest *et al.* [4] และมีรายงานของ Haun *et al.* [5] ได้ทำการศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ทำให้ยีน *FAD2-1A* และ *FAD2-1B* ปรับแต่งจีโนม พบว่าสามารถลดปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ Linoleic และ Linolenic ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในถั่วเหลืองที่ทำให้ยีน *FAD3* ปรับแต่งจีโนม พบว่าถั่วเหลืองที่ปรับแต่งจีโนมทั้ง 3 ยีน *FAD2-1A FAD2-1B* และ *FAD3* มีองค์ประกอบของน้ำมันที่ได้จากถั่วเหลืองสายพันธุ์นี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลงอย่างมาก

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองกรดโอลิอิกสูงที่ผ่านการปรับแต่งจีโนม

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *FAD3A* และออกแบบไพรเมอร์

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *FAD3A* จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อหาตำแหน่งลำดับเบสที่หายไปของยีน *FAD3A* ในถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนม และทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบยีน *FAD3A* และยีน *Lectin* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนนั้น ๆ โดยทำการออกแบบด้วยโปรแกรม Primer designing tool – NCBI สำหรับนำไปใช้ทดสอบการมีอยู่ของยีนเป้าหมายในถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม และการขาดหายไปของยีน *FAD3A* ในถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนม

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

3.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองด้วยวิธี Lysis

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ผสมกับ Lysis buffer (Eurofin) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ตกตะกอนโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตด้วย Chloroform จำนวน 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Wizard^{tm}Minicolumn เติม Miniprep DNA Purification Resin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน (อัตราส่วน Miniprep DNA Purification Resin ต่อสารละลายดีเอ็นเอ คือ 2:1) ใช้ Minicolumn และเครื่องดูดสารละลาย (Vacman) ทำความสะอาดดีเอ็นเอด้วย 80% Isopropanol จำนวน 2 มิลลิลิตร นำ Minicolumn ที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด นำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (อุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) ลงใน Minicolumn ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอออกจาก Minicolumn ให้หมด และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ บันทึกข้อมูลปริมาณดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์

3.3 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* competent cell และการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.3.1 ออกแบบพลาสมิดโดยการสังเคราะห์

ออกแบบพลาสมิดที่มียีน *FAD3A* และยีน *Lectin* โดยการสั่งสังเคราะห์ยีนเป้าหมายทั้ง 2 ยีน โดย GenScript นำชิ้นยีนที่สังเคราะห์ได้มาโคลนนิ่งเข้าสู่เวคเตอร์ pUC57 ทำการตรวจสอบลำดับเบสเพื่อยืนยันความถูกต้อง โดยยืนยันการขาดหายไปของลำดับเบสของยีน *FAD3A* ในตำแหน่งที่ออกแบบไว้

3.3.2 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* competent cell

โดยทำการดูดสารละลายพลาสมิดอ้างอิงทดสอบของถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนมของยีน *FAD3A* ที่มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงหลอดที่มี *E. coli* competent cell (DH5α) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer เป็นเวลา 1 วินาที และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำไป Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นทำการดูดของเหลว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Spread plate ลงบนอาหาร Luria-Bertani (LB) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.3.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

โดยนำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดของยีน *FAD3A* เข้าไปในเซลล์แล้วมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ที่มียาปฏิชีวนะ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (ทิ้งส่วนใส) ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิด GenUP^{TM} นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ Resuspension ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer เติมบัฟเฟอร์ lysis LP ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง 7 ครั้ง และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Neutralization ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง 7 ครั้ง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที นาน 8 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสที่ได้ใส่ในตัวกรองที่ซ้อนด้วยหลอดเปล่าอีกชั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (ทิ้งสารละลายที่เป็นของเหลว) เติมบัฟเฟอร์ WASA PA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในตัวกรองที่ใส่ไว้ในหลอดอันเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (ทิ้งสารละลายที่เป็นของเหลว) เติมบัฟเฟอร์ WASA PB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในตัวกรองที่ใส่ไว้ในหลอดอันเดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการปั่นเหวี่ยงต่ออีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที (เพื่อเอาเอทานอลที่เหลือออกให้หมด) จากนั้นนำตัวกรองใส่ในหลอดอันใหม่ เติม

บัฟเฟอร์ Elution EP ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (ทิ้งตัวกรอง) และนำหลอดที่มีส่วนใสไปเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 10xbuffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10μM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10μM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Extaq DNA polymerase (TAKARA) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ ปริมาตร 13.1 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ที่ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ Pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที (จำนวน 30) รอบ และ ขั้น Post-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (จำนวน 1 รอบ) ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)

3.4 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์

ทำการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามวิธีการข้อ 3.3.4 ในการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนมในยีน *FAD3A* และ *Lectin* ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบยีนเดียว (Simplex PCR) ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis) ชนิดตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR

3.5.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดสังเคราะห์และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากข้อ 3.4 โดยทำการเพิ่มคู่ไพรเมอร์ Lectin เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD3_T1 ในปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน (Duplex PCR) ทำการเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 10xbuffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ FAD3_T1 (10μM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ FAD3A (10μM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Lectin (10μM) ด้าน Forward ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Lectin (10μM) ด้าน Reverse ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Extaq DNA polymerase (TAKARA) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ ปริมาตร 12.3 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ที่ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ Pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้น Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำการปรับอุณหภูมิขั้น Annealing เพื่อหาสภาวะที่สั้นที่สุดและเหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอ จึงทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 56 , 57, 58 และ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้น Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที (จำนวน 30) รอบ และ ขั้น Post-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (จำนวน 1 รอบ) ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)

3.5.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดที่สกัด

ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากข้อ 3.5.1 โดยการนำพลาสมิดที่สกัดได้มาทดสอบกับชุดไพรเมอร์ FAD3_T1 และ Lectin ในปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ 2 ยีน (Duplex PCR) โดยใช้สภาวะอุณหภูมิและสัดส่วนเคมีที่ได้จากข้อ 3.5.1 ทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type) จำนวน 4 ตัวอย่าง กับพลาสมิดที่สกัดได้จำนวน 4 ตัวอย่าง การทดสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)

4. ผลการวิจัย

4.1 การออกแบบไพรเมอร์

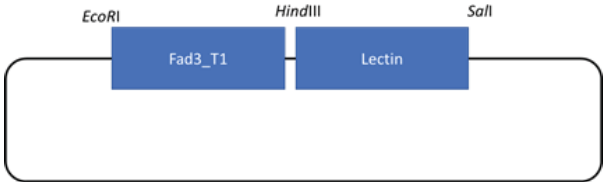
จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *FAD3A* และ *Lectin* จากฐานข้อมูล NCBI และทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบยีน *FAD3A* และ *Lectin* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนนั้น ๆ ที่เกิดจากการออกแบบด้วยโปรแกรม primer designing tool – NCBI แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่สำหรับทดสอบยีน *FAD3A*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์
FAD3A	FAD3_T1F	ATT GAA CAG TGG CCA T	223
	FAD3_T1R	AAA CGC GTT TCC GAA CAC GC	
Lectin	LectinF	GCT ATT GTG ACC TCC TCG GG	304
	LectinR	ACT CAA CAG CGA CGA CTT GA	

4.2 การออกแบบพลาสมิดของยีนเป้าหมาย

สังเคราะห์ยีนเป้าหมาย *FAD3A* และ *Lectin* สามารถสร้างแผนภูมิพลาสมิดที่แสดงจุดตัดเอนไซม์ในแต่ละยีน และผลการตรวจสอบลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบการขาดหายไปของลำดับเบสในยีน *FAD3A* แสดงดังภาพที่ 1




```
     TAATTAATTAATTTGTTGTTACTTTTTTGTTATAATATGAATCTCACACACTGCTTTGTT
     ************************************************************
-390 TAATTAATTAATTTGTTGTTACTTTTTTGTTATAATATGAATCTCACACACTGCTTTGTT

     ATGCCTACCTCATTTCATTTGGCTTTAGACAACTTAAATTTGAGATCTTTATTATGTTTT
     ************************************************************
-450 ATGCCTACCTCATTTCATTTGGCTTTAGACAACTTAAATTTGAGATCTTTATTATGTTTT

     TTGCTTATATGGTAAAGTGATTCATTCTTCAC--------------------ATGGAAGCT
     ********************************                    *********
-510 TTGCTTATATGGTAAAGTGATTCATTCTTCACATTGAATTGAACAGTGGCCATGGAAGCT

     TTTCAGACAGCCCTTTTCTAAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCATTCCTCAATTCTTG
     ************************************************************
-570 TTTCAGACAGCCCTTTTCTAAATAGCCTGGTGGGACACATCTTGCATTCCTCAATTCTTG

     TGCCATACCATGGATGGTTAGTTCATCCCGGCTTTTTTGTTTGTCATTGGAAGTTCTTTT
     ************************************************************
-630 TGCCATACCATGGATGGTTAGTTCATCCCGGCTTTTTTGTTTGTCATTGGAAGTTCTTTT
```

ภาพที่ 1 พลาสมิดที่สังเคราะห์ขึ้นที่ประกอบด้วยยีน *FAD3A* และ *Lectin* โดยแสดงลำดับเบสที่ขาดหายไปของยีน *FAD3A* เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ปรับแต่งจีโนม

4.3 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* competent cell และการสกัดพลาสมิด

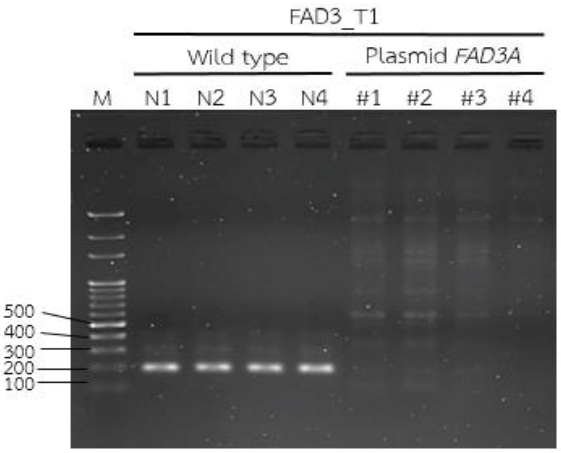
จากการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับฝากพลาสมิดบนอาหาร Luria-Bertani (LB) ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin จำนวน 4 โคโลนี แล้วนำมาเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของแต่ละโคโลนี และวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดที่สกัดได้แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดที่สกัดได้

โคโลนี	**ความเข้มข้น** (ng/μl)	**A260/280**
1	618.70	1.80
2	706.97	1.80
3	715.72	1.81
4	714.18	1.80

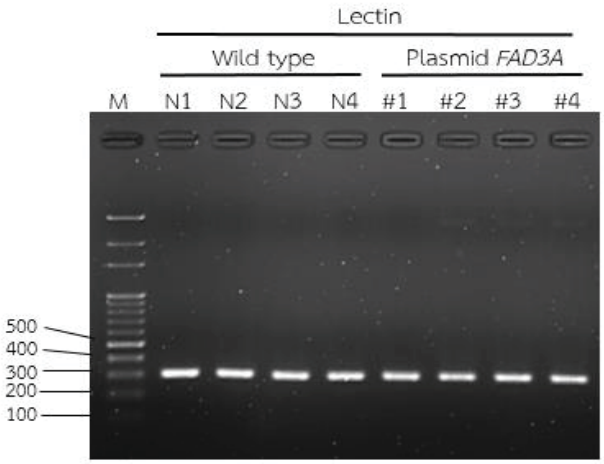
4.4 ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดกับชุดไพรเมอร์ทดสอบแบบยีนเดียว (Simplex PCR)

นำพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 4 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการทดสอบถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมกับถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับแต่งจีโนมในยีน *FAD3A* ทดสอบด้วยไพรเมอร์ FAD3_T1 พบว่าพลาสมิด *FAD3A* (#1 #2 #3 และ #4) ไม่พบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 200 bp เนื่องจากพลาสมิดที่สกัดมาไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *FAD3A* ได้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type) ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ จึงพบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 200 bp ภาพที่ 2 และจากการทดสอบด้วยไพรเมอร์ Lectin พบว่า พลาสมิด *FAD3A* (#1 #2 #3 และ #4) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้จึงพบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 300 bp ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกับของถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type) ภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบพลาสมิดที่ออกแบบกับไพรเมอร์ FAD3-T1

Lane 1 : DNA standard marker, Lane 2-5 : Wild type soybean และ Lane 6-9 : ตัวอย่างพลาสมิด *FAD3A*

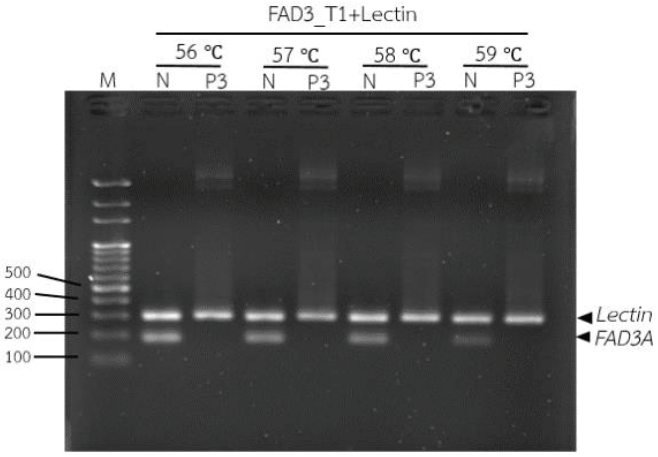


ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบพลาสมิดที่ออกแบบกับไพรเมอร์ Lectin
Lane 1 : DNA standard marker, Lane 2-5 : Wild type soybean และ Lane 6-9 : ตัวอย่างพลาสมิด *FAD3A*

4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน (Duplex PCR)

4.4.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดสังเคราะห์

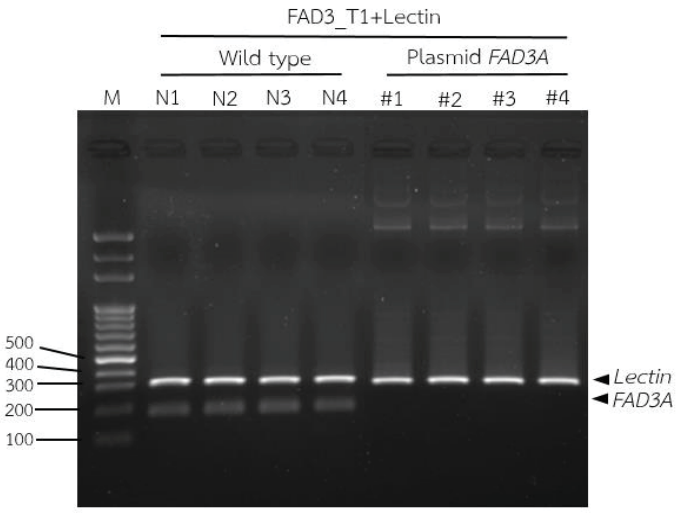
จากการทดสอบปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ที่ได้ทำการเพิ่มคู่ไพรเมอร์ Lectin เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD3_T1 และทำการปรับอุณหภูมิขั้น Annealing พบว่า ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบปฏิกิริยา เนื่องจากเห็นแถบดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมและแถบพลาสมิดดีเอ็นเอสังเคราะห์จากการใช้ 2 คู่ไพรเมอร์ คือ Lectin และ FAD3_T1 ได้ชัดเจนที่สุดที่ขนาด 200 และ 300 bp ตามลำดับ ดังภาพที่ 4 จึงทำการเลือกอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส ไปศึกษาต่อในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน (Duplex PCR)
Lane 1 : DNA standard marker, Lane 2, 4, 6, 8 : Wild type soybean และ Lane 3, 5, 7, 9 : พลาสมิดสังเคราะห์

4.4.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดที่สกัดได้

จากผลการทดสอบก่อนหน้านี้พบว่าการใช้อุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมและแถบพลาสมิดดีเอ็นเอสังเคราะห์ได้ชัดเจนที่สุดในปฏิกิริยาแบบ 2 ยีน จึงเลือกอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Lectin และ FAD3_T1 ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบ 2 ยีน เพื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมและพลาสมดดีเอ็นเอที่สกัดได้ 4 ตัวอย่าง พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 4 ตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *FAD3A* ในคู่ไพรเมอร์ FAD3_T1 ได้ แต่สามารถเพิ่มจำนวนในคู่ไพรเมอร์ Lectin ได้ โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเอที่ 300 bp ในขณะที่ถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนมมีแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ 200 bp และ 300 bp จากการใช้คู่ไพรเมอร์ Lectin และ FAD3_T1 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบตัวอย่างพลาสมิดที่สกัดได้กับถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ FAD3_T1 กับ Lectin
Lane 1 : DNA standard marker, Lane 2-5 : Wild type soybean และ Lane 6-9 : ตัวอย่างพลาสมิด *FAD3A* ที่สกัดได้

5. อภิปรายผลการวิจัย

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์พืชที่ได้จากเทคโนโลยีปรับแต่งจีโนม (Genome editing) มีมากมายหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับข้อมูลจากแหล่งที่มาของตัวอย่างว่าทราบมากน้อยเพียงใด หากไม่ทราบเลยว่าตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบมีการปรับแต่งยีนใดที่ตำแหน่งใด จะทำให้การตรวจสอบนั้นยากและใช้ค่าใช้จ่ายสูงมาก กรณีที่ทราบตำแหน่งของยีนและลำดับเบสที่ขาดหายไป สามารถใช้เทคนิค PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ถูกปรับแต่ง ซึ่งการปรับแต่งยีนนั้นมีได้ทั้งการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสใหม่หรือการขาดหายไปของลำดับเบสเดิม Carroll [6] การตรวจสอบด้วย PCR นั้นง่ายและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ต่ำ โดยการตรวจวิเคราะห์นิยมตรวจยีนอ้างอิงจำเพาะพืชนั้น ๆ เช่น กรณีตรวจถั่วเหลืองนิยมใช้ยีน *Lectin* เป็นยีนอ้างอิง เทคนิค Duplex PCR จะช่วยประหยัดเวลาและต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ให้สามารถตรวจสอบยีนเป้าหมายสองยีนได้ในปฏิกิริยาเดียว โดยในตัวอย่างของถั่วเหลืองปรับแต่งจีโนมจะแสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *Lectin* เท่านั้น ในขณะที่ถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งจีโนมจะแสดงแถบดูเอ็นเอสองแถบ Long *et al.* [7] ทั้งนี้การออกแบบไพรเมอร์จะต้องคำนึงถึงขนาดผลผลิตปฏิกิริยา PCR ให้มีขนาดต่างกันเพื่อให้แยกแถบดีเอ็นเอชัดเจนในเจลอะกาโรส วัสดุทดสอบมาตรฐาน (Certified reference material) สำหรับพืชปรับแต่งจีโนมในปัจจุบันนั้นยังไม่มีการจำหน่าย ทำให้การตรวจวิเคราะห์จะต้องมีวัสดุทดสอบที่มีความคงทน พลาสมิดดีเอ็นเอจึง

นิยมถูกใช้เป็นวัสดุทดสอบงานด้านดีเอ็นเอโดยมีความสะดวกที่สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะ สามารถเลือกเวคเตอร์ที่ต้องการโคลน และเพิ่มปริมาณเพื่อเก็บไว้ใช้เองได้ เป็นการลดต้นทุนการจัดซื้อวัสดุทดสอบมีความคงทนและลดความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบ

6. สรุปผลการวิจัย

จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *FAD3A* และ *Lectin* จากฐานข้อมูล NCBI และได้ทำการออกแบบพลาสมิดกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *FAD3A* กับ ยีน *Lectin* พบว่าไพรเมอร์ FAD3_T1 และ Lectin มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนดังกล่าว

จากการคัดเลือกโคโลนีจำนวน 4 โคโลนี ที่มีการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอ *FAD3* บนอาหาร Luria-Bertani (LB) มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด GenUP^{TM} และวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าตัวอย่างโคโลนีที่ 1 2 3 และ 4 มีความเข้มข้นเท่ากับ 618.70 ng/μl 706.97 ng/μl 715.72 ng/μl และ 714.18 ng/μl ตามลำดับ เมื่อจากการนำทั้ง 4 ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 20 ng/μl แต่ละตัวอย่างไปทดสอบแบบยีนเดียว (Simplex PCR) กับชุดไพรเมอร์ FAD3-T1 และ Lectin พบว่าพลาสมิด *FAD3A* (1 2 3 และ 4) ไม่พบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 200 bp เนื่องจากพลาสมิดที่สกัดมาไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *FAD3A* ได้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type) ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ จึงพบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 200 bp และจากการทดสอบด้วยไพรเมอร์ Lectin พบว่าพลาสมิด *FAD3A* (1 2 3 และ 4) สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้จึงพบแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ขนาด 300 bp ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกับของถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนม (Wild type)

สำหรับการทดสอบแบบ 2 ยีน (Duplex PCR) โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์กับพลาสมิดสังเคราะห์เพื่อหาความจำเพาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิด ผลจากการทดสอบปฏิกิริยาแบบ Duplex PCR ที่ได้ทำการเพิ่มคู่ไพรเมอร์ Lectin เข้าไปในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในคู่ไพรเมอร์ของ FAD3_T1 และทำการปรับอุณหภูมิขั้น Annealing พบว่าที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบปฏิกิริยา การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับพลาสมิดที่สกัดทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยทำการปรับอุณหภูมิขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้ทั้ง 4 ตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน FAD3A ในคู่ไพรเมอร์ FAD3_T1 ได้ แต่สามารถเพิ่มจำนวนในคู่ไพรเมอร์ Lectin ได้ โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเอที่ 300 bp ในขณะที่ถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการปรับแต่งจีโนมมีแถบดีเอ็นเอขึ้นที่ 200 bp และ 300 bp จากการใช้คู่ไพรเมอร์ Lectin และ FAD3_T1 ตามลำดับ

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 ควรศึกษาปริมาณและความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เหมาะสม

7.2 ควรทำการศึกษายีน *FAD2-1A* กับ *FAD2-1B* และออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับยีนทั้ง 2 เพิ่มเติม

7.3 ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีน *FAD2-1A* กับ *FAD2-1B*

8. เอกสารอ้างอิง

[1] Islam, N., Stupar, R. M., Qijian, S., Luthria, D. L., Garrett, W., Stec, A. O., Roessler, J. & Natarajan, S. S. (2019). Genomic changes and biochemical alterations of seed protein and oil content in a subset of fast neutron induced soybean mutants. **BMC plant biology**, 19(1), 1-12.

[2] Cheng, M. H., & Rosentrater, K. A. (2019). Techno-economic analysis of extruding-expelling of soybeans to produce oil and meal. **Agriculture**, 9(5), 87.

[3] khamphanh Panya. (2563). **ผลของการใช้ถั่วเหลืองอินทรีย์หมักในอาหารไก่เนื้อต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต ค่าโลหิต วิทยา คุณภาพซาก และคุณภาพเนื้อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาสหวิทยาการเกษตร สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

[4] Demorest, Z. L., Coffman, A., Baltes, N. J., Stoddard, T. J., Clasen, B. M., Luo, S., Retterath, A., Yabandith, A., Gamo, M. E., Bissen, J., Mathis, L., Voytas, D. F. & Zhang, F. (2016). Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic s
oybean oil. **BMC plant biology**, 16(1), 1-8.

[5] Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Voytas, D. F. & Zhang, F. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. **Plant biotechnology journal**, 12(7), 934-940.

[6] Carroll, D. (2017). Focus: genome editing: genome editing: past, present, and future. **The Yale journal of biology and medicine**, 90(4), 653.

[7] Long, L., Yan, W., He, Y., Dong, L., Xing, Z., Li, C., Xia, W. & Li, F. (2021). Development of a Duplex Digital PCR Method to Quantify Five Genetically Modified Soybean Events. **Food Analytical Methods**, 1-13.