สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๔
รับที่ ๔๑๕๕
วันที่ ๒๑ / มิ.ย. / ๖๖
เวลา ๑๖.๑๖ น.

# บันทึกข้อความ

**ส่วนราชการ** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ฝ่ายบริหารทั่วไป โทร ๐ ๒๙๐๔ ๖๘๘๕ ต่อ ๔๐๖

**ที่** กษ ๐๙๑๕/ ว. ๑๙๗๕ **วันที่** ๒๐ มิถุนายน ๒๕๖๒

**เรื่อง** แจ้งเวียนบทคัดย่อผลงานทางวิชาการเพื่อตรวจสอบ

เรียน ผอ.กอง / สถาบัน / สำนัก / ศทส. / สวพ. ๑-๘

ด้วย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ตำแหน่งเลขที่ ๑๐๒๙ กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มีความประสงค์จะเข้ารับการคัดเลือกประเมินผลงานเข้าดำรงตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร (นักวิชาการเกษตรเชี่ยวชาญ ตำแหน่งเลขที่ ๑๐๑๒) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จึงขอส่งบทคัดย่อผลงานทางวิชาการเพื่อพิจารณาตรวจสอบ จำนวน ๓ เรื่อง ดังนี้

๑. การพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ ได้มาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการตรวจวิเคราะห์

๒. การพัฒนาวิธีตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมภาคสนามด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification

๓. การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน Cry1Ab ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา และแจ้งให้นักวิชาการในสังกัดทราบ ทั้งนี้ หากไม่ตอบกลับมา **ภายในวันที่ ๘ กรกฎาคม ๒๕๖๒** จะถือว่าไม่มีผู้ใดคัดค้าน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จะนำผลงานดังกล่าวเสนอเข้ารับการประเมินต่อไป

**(นายดนัย นาคประเสริฐ)**
**ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**

**ที่ กษ.๐๙๒๐/** ว ๑๙๙๙
**เรียน** ผอ.สวพ.๔/ผชช./ผอ.ศวพ./ศพก./ผอ.กลุ่ม.....
- ☑ เพื่อโปรดทราบ
- ☐ เพื่อโปรดทราบและถือปฏิบัติ
- ☐ เพื่อโปรดทราบและดำเนินการ
- ☐ เพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการ
- ☐ ข้อเสนอแนะ.....

๒๑ มิ.ย. ๖๖

(นายบุญชู สายธนู)
ผู้อำนวยการกลุ่มประสานและบริหารนโยบาย รักษาราชการแทน
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๔

**ส่งผ่านระบบงานสารบรรณอิเล็กทรอนิกส์**
**กล่องสีส้ม**
รับในระบบ
วันที่ ๒๑ มิ.ย. ๖๖ เวลา ๑๖.๑๐ น.

# การพัฒนาเทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ ได้มาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการตรวจวิเคราะห์

# Development Multiplex Real-time PCR Method for Qualitative Screening of Genetically Modified Commodity, Accredited ISO/IEC 17025 and Improved the Analysis Service Process

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] ปิยนุช ศรชัย[1] ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ[1] วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร[1] พงศกร สรรค์วิทยากุล[1]

## บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม เป็นการดำเนินงานตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้าที่ใช้เป็นเงื่อนไขนำเข้า ตรวจวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดิมใช้วิธี PCR ร่วมกับ Simplex Real-Time PCR ในการตรวจยีนจำเพาะพืชเพื่อควบคุมคุณภาพ จากนั้นตรวจยีนคัดกรองที่ตัดต่อเข้าสู่พืชดัดแปลงพันธุกรรม ทั้งกระบวนการใช้ระยะเวลารวม 12 วันทำการหรือมากกว่า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ทั้งสามยีนในปฏิกิริยาเดียวกัน ประกอบด้วยยีน CaMV 35S promoter Nos terminator และยีนจำเพาะพืช (*hmg* ในข้าวโพด และ *lectin* ในถั่วเหลือง) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบอ้างอิงจาก ISO/IEC 21569:2005 amd 2013 และ JRC-EURL ตามลำดับ ออกแบบการติดฉลากสีโพรบแต่ละยีน จากนั้นทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาร่วมกัน ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยพบว่าปฏิกิริยา Multiplex Real-Time PCR มีความจำเพาะในการตรวจยีนแต่ละชนิด โดยไม่พบ false positive หรือ false negative ขีดจำกัดการตรวจ (LOD) ยีนคัดกรองร้อยละ 0.01-0.1 และทุกค่าพารามิเตอร์อยู่ในช่วงการยอมรับตามมาตรฐานการตรวจคัดกรองเชิงคุณภาพ ได้แก่ ประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยา (PCR efficiency) ร้อยละ 99-115 ความเป็นเส้นตรง (Linearity, $R^2$) 0.998± 0.001 และค่าความชัน (Slope) -3.1 ถึง -3.3 โดยวิธีทดสอบมีประสิทธิภาพ ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาการตรวจร้อยละ 60.6 (จาก 5.46 วัน เหลือ 2.15 วัน) ลดต้นทุนค่าสารเคมีร้อยละ 26.4 จากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการกับหน่วยงานระหว่างประเทศมีความถูกต้องทุกรายการทดสอบ สามารถขยายผลการตรวจคัดกรองครอบคลุมสินค้าพืชที่สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าว และมะละกอ รวมถึงผลิตภัณฑ์ของพืชดังกล่าว จากนั้นจัดทำเอกสารในระบบคุณภาพ ยื่นขยายขอบข่าย ผ่านการตรวจประเมินจนได้รับการรับรองวิธี Multiplex Real-Time PCR ในการตรวจคัดกรองพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อวันที่ 9 พฤศจิกายน 2561 นำวิธีทดสอบมาปรับปรุงกระบวนการตรวจวิเคราะห์งานบริการของห้องปฏิบัติการ ช่วยลดเวลาดำเนินการตามคู่มือประชาชนจาก 12 วันทำการเป็น 7 วันทำการ ส่งเสริมการดำเนินงานภาครัฐตามมาตรการปรับปรุงประสิทธิภาพในการปฏิบัติราชการ

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

# การพัฒนาวิธีตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมภาคสนามด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification

# Development for Field Examination of Genetically Modified Plant using Loop-Mediated Isothermal Amplification Techniques

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] ปิยนุช ศรชัย[1] ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ[1] พงศกร สรรค์วิทยากุล[1]

## บทคัดย่อ

กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบกำกับดูแล ตาม พ.ร.บ. กักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ประกาศให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นสิ่งต้องห้าม ห้ามปลูก และห้ามนำเข้ายกเว้นเพื่อการศึกษาวิจัย แต่อนุญาตให้นำเข้าข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการอุตสาหกรรม ซึ่งการค้าระหว่างประเทศอาจเกิดการหลุดลอดมาแพร่กระจายในพื้นที่เกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มีภารกิจตรวจติดตามเฝ้าระวัง รวมถึงการตรวจรับรองแปลง GAP มะละกอซึ่งเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ตัวอย่างจำนวนมากถูกส่งเข้าตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ บางครั้งตัวอย่างพืชสดเกิดความเสียหายระหว่างการขนส่ง เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) โดยการตรวจคัดกรองและตรวจจำแนกยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม ประกอบด้วยการทดสอบชุดไพรเมอร์ตรวจยีนคัดกรอง CaMV 35S promoter และ Nos terminator และชุดไพรเมอร์ตรวจจำแนกยีน Cry1Ab และ cp4epsps ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สังเคราะห์ยีนที่อุณหภูมิเดียว ใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐานข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ Mon810 BT11 BT176 NK603 MIR604 MIR162 Mon89034 และถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม GTS40-3-2 ปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วย 2X *Bst* buffer, 0.4mM dNTPs, 0.5M Betaine, 0.2µM F3-B3 & FIP-BIP primers, 0.1µM Loop primers, 8 unit *Bst* polymerase, ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-200 นาโนกรัม โดยการตรวจยีน CaMV 35S promoter *Cry1Ab* และ *CP4* epsps ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 61 และ 68 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ Nos terminator ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยเติมสาร SYBR greenI ตัวอย่างที่มียีนพืชดัดแปลงพันธุกรรม หลอดของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนสีจากส้มเป็นเขียวอมเหลือง โดยเทคนิค LAMP มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่การปะปนร้อยละ 0.04 ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชอย่างง่าย 30-60 นาที ร่วมกับการตรวจด้วยปฏิกิริยา LAMP 1-2 ชั่วโมง สามารถอ่านผลวิเคราะห์ได้ทันที จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจเฝ้าระวังพืชดัดแปลงพันธุกรรม และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในภาคสนามได้

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

# การพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน Cry1Ab ในข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม

# Development Cry1Ab Protein Strip Kit for Genetically Modified Corn Detection

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] พงศกร สรรค์วิทยากุล[1] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[1]

## บทคัดย่อ

ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต้านทานแมลง ผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพและการอนุมัติใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 โดยการตัดต่อยีน *Cry1Ab* จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringienesis* เข้าสู่พืชให้สร้างสารที่เป็นพิษต่อแมลง ทั้งนี้ประเทศไทยโดยอาศัยอำนาจ พ.ร.บ. กักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ประกาศให้พืชดัดแปลงพันธุกรรม 31 ชนิด 51 สกุล และ 1 วงศ์ จากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้าม ยกเว้นการนำเข้าข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้สำหรับภาคอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน CryAb ในการตรวจสอบข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่นำเข้าเพื่อเป็นวัตถุดิบ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Cry1Ab* จากฐานข้อมูล GenBank ขนาด 2457 นิวคลีโอไทด์ ทำการออกแบบไพรเมอร์ และโคลนยีนขนาด 1377 bp เข้าสู่เวคเตอร์ pET200 ถ่ายยีนเข้าแบคทีเรีย *Eschericia coli* สายพันธุ์ BL21 จากนั้นคัดเลือกโคลนแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB และเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์โปรตีน Cry1Ab ด้วย IPTG แล้วสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน ทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ตรวจสอบด้วย SDS-PAGE ได้โปรตีน Cry1Ab ขนาดประมาณ 51 kdal ใช้เป็นแอนติเจน ฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติซีรัม จำนวน 3 ครั้ง (อัตรา 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) เจาะเก็บแอนติซีรัมทุกสัปดาห์รวม 9 ครั้ง ตรวจวัดค่าไตเตอร์สูงสุดได้ 1 : 204,800 จากนั้นสกัดแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) แล้วเชื่อมต่ออนุภาคทองคำ (Colloidal Gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ด้วยวิธีการเชื่อมต่อแบบ nearly covalent ซึ่งให้พันธะของอนุภาคทองคำและ IgG มีความเสถียร พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยการพ่น Colloidal Gold-IgG อัตรา 15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร และขีดเส้นควบคุม (Control Line) ด้วย Goat anti-rabbit IgG 330 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเส้นทดสอบ (Test line) ใช้โปรตีน CrylAb-IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อัตรา 3 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Lateral Flow Strip test แล้วทดสอบปฏิกิริยาการตรวจโปรตีนด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน Cry1Ab หลังหยดสารละลายตัวอย่างเป็นเวลา 5-10 นาที ตัวอย่างที่ตรวจพบโปรตีน Cry1Ab บริเวณเส้นทดสอบและเส้นควบคุมจะเกิดแถบสีม่วง โดยตัวอย่างที่ไม่มีโปรตีน Cry1Ab จะเกิดแถบสีม่วงเฉพาะเส้นควบคุม ซึ่งขีดจำกัดของชุดตรวจโปรตีนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ขั้นต่ำ 0.03 มิลลิกรัม เมื่อทดสอบการเก็บรักษาชุดตรวจสอบโปรตีนบรรจุในซองอลูมินัมฟรอย์ปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้เป็นเวลา 3 เดือน

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร