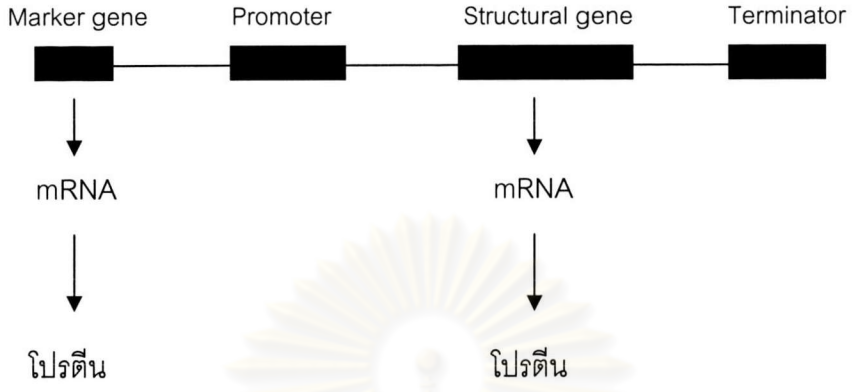
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การนำพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อรองรับปัญหาต่างๆ ทางการเกษตรทำให้ได้พืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปลูกเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลายในหลายประเทศซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (agronomic traits) เช่น ถั่วเหลือง ฝ้ายและข้าวโพด สร้างขึ้นเพื่อให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ข้าวโพดหรือฝ้ายที่สร้างขึ้นเพื่อต้านทานแมลง มะละกอที่สร้างขึ้นเพื่อต้านทานโรคไวรัส และมะเขือเทศเพื่อชลอการสุก ในอนาคตอันใกล้ผลงานวิจัยทำให้ได้พันธุ์พืชที่สามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้ง ทนต่อความเค็ม ทนต่อความหนาวเย็นและให้มีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีวิตามินเอ อี หรือธาตุเหล็ก เพิ่มขึ้น (quality traits) หรือใช้พืชเป็นแหล่งของวัคซีนที่รับประทานได้ (อาคม สีทับทิม,2542)

สำหรับพืชดัดแปรพันธุกรรม พบว่า ส่วนใหญ่ของการดัดแปรพันธุกรรมเกิดจากการถ่ายฝากยีนโดยมียีนที่เกี่ยวข้องจัดอยู่เป็นระบบในรูปของแคสเสต (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543) ซึ่งประกอบไปด้วย ส่วนสำคัญ 2 ส่วนหลัก คือ แคสเสตยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเป้าหมาย ซึ่งมักเชื่อมโยงกับความสำคัญทางด้านเศรษฐศาสตร์ เรียก แคสเสตยีนนี้ว่า แคสเสตยีนเป้าหมาย และอีกส่วนหนึ่ง คือ แคสเสตยีนที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือกเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปรากฏตัวของชุดยีนที่เกี่ยวข้องหรือใช้ติดตามหรือสะกดรอยแคสเสตของยีนหลังกระบวนการถ่ายทอดยีนในรูปแบบการตรวจสอบสัญญาณเพื่อเป็นหลักประกันให้สามารถคัดเลือกเซลล์หรือต้นพืชที่ได้รับยีนออกจากพวกปกติได้ แคสเสตยีนนี้ เรียกว่า แคสเสตยีนคัดเลือกหรือ selectable marker cassette (Lipp และคณะ, 2001) แคสเสตยีนทั้ง 2 ชุดต่างประกอบไปด้วยโครงสร้างหลักเพื่อควบคุมการทำงานของยีนให้มีการแสดงออกหรือมีพฤติกรรมสอดคล้องกับวัตถุประสงค์เป้าหมายซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างย่อย 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนควบคุมให้มีการเริ่มต้นการแสดงออก เรียก ส่วนนี้ว่า โปรโมเตอร์ (Tozzini และคณะ, 2002) ส่วนสร้างโปรตีนเป้าหมายที่ให้ผลลัพธ์ที่ต้องการ ในที่นี้ถ้าเป็นยีนเป้าหมายก็จะได้แก่ ยีนที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจและยีนสำหรับคัดเลือก(selectable marker) หรือยีนที่ใช้ในการติดตาม (reporter gene) และส่วนสุดท้าย คือ ส่วนควบคุมกระบวนการหยุดหรือจบตัวในขณะที่มีการสร้างอาร์เอ็นเอ เรียกส่วนนี้ว่า เทอร์มิเนเตอร์ (ศรันพร ชวนเกริกกุล, 2544) ดังในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แคสเสตของยีน (gene cassette) ซึ่งประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย โปรโมเตอร์ ยีนเป้าหมาย และเทอร์มิเนเตอร์

จากการสืบค้นข้อมูลนับจนถึงปัจจุบัน พบว่า 35S promoter เป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้สูงสุดถึงร้อยละ 80 และ NOS terminator นิยมใช้สูงถึงร้อยละ 70 ขณะที่นิยมใช้ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะและยาปราบวัชพืชเป็น selectable marker (Hemmer, 1997;liham และคณะ, 2003)

โครงสร้างของแคสเสตยีนทั้งสองเมื่อนำไปประกอบร่วมกับวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของพืช กระบวนการคัดเลือกและตรวจสอบทำให้สามารถเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีชิ้นส่วนของแคสเสตยีนเหล่านั้นและมีการทำงานในรูปของการแสดงออกเป็นไปตามเป้าหมาย ดังนั้นการตรวจสอบจึงมุ่งเน้นไปที่ตัวยีนและหรือผลิตภัณฑ์จากตัวยีน ซึ่งในที่นี้คือโปรตีนของทั้งแคสเสตยีนเป้าหมายและแคสเสตยีนสำหรับการคัดเลือก (Lipp และคณะ, 2001)

การตรวจสอบไปที่โปรตีนเป้าหมายโดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยามีข้อจำกัด (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2543) ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบอาหารมักผ่านกระบวนการแปรรูปทำให้โมเลกุลส่วนใหญ่ที่เป็นโปรตีนเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปที่รุนแรงจะเปลี่ยนรูปไปจนส่งผลกระทบต่อความสามารถและประสิทธิภาพในการตรวจสอบ (Straub และคณะ, 1999) การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบในระยะหลังจึงมุ่งไปที่การใช้โมเลกุลดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลอ้างอิงตรงในระบบการตรวจ (Allmann และคณะ, 1993;Meyer และคณะ, 1996) ดังนั้นการตรวจสอบ GMOs จึงอยู่บนพื้นฐานของการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่พบอยู่ในแต่ละโครงสร้างที่แทรกตัวอยู่ในจีโนมิกของพืชซึ่งต่อมาเมื่อแปรรูปเป็นอาหารก็คือ ดีเอ็นเอที่หลงเหลืออยู่ในอาหารนั่นเอง (Hupfer และคณะ, 2000)

เนื่องจากความต้องการเทคนิคการตรวจสอบที่มุ่งเน้นประสิทธิภาพ ความไวต่อการทดสอบแม้เพียงเล็กน้อย ความรวดเร็ว แม่นยำ และง่ายต่อการทำงาน ทำให้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือ PCR (polymerase chain reaction)ได้รับการตอบรับและนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง (Jankiewicz และคณะ, 1999) เทคนิคดังกล่าวคิดค้นขึ้นโดย Mullis (Mullis, 1990) อยู่บนหลักการพื้นฐานของความจำเพาะของบริเวณดีเอ็นเอโดยอาศัยไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นๆ เป็นตัวเริ่มต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่โดยอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำด้วยเอนไซม์พอลิเมอเรสทนร้อน (thermophilic polymerase) จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นจำนวนมาก หัวใจสำคัญในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอใดๆ จึงขึ้นอยู่กับความสามารถที่จะสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะนั้นได้หรือไม่

ในทางปฏิบัติปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะอาศัยไพรเมอร์จำเพาะ 1 คู่ ไพรเมอร์ดังกล่าวจะจับกับแม่แบบที่เป็นคู่สมต่อกันทำให้เกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอตามต้องการโดยมีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denature ทำให้สายดีเอ็นเอแม่แบบแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนต่อมา ได้แก่ annealing ไพรเมอร์จำเพาะเข้าจับตัวกับดีเอ็นเอแม่แบบและขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเป็นขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เรียกว่า extension ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เอนไซม์พอลิเมอเรสทนร้อนมาจับตัวเข้ากับแม่แบบและไพรเมอร์และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันสร้างสายดีเอ็นเอ (Mullis, 1990)

Poping (2001) ได้ศึกษาผลการวิจัยและรวบรวมเอกสารชี้ให้เห็นว่าได้มีการนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาใช้ในการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรมโดยตรงซึ่งมีความไวและประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เทคนิคการตรวจสอบโปรตีน สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้บ้างแล้ว (Hardegger และคณะ, 1999;Vollenhofer และคณะ, 1999;Lin และคณะ, 2001)

การตรวจ GMOs ในอาหารและผลิตภัณฑ์โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน (Anklam และคณะ, 2002)

1. การสุ่มเก็บตัวอย่าง
2. การสกัดดีเอ็นเอ
3. การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
4. การประมวลผลข้อมูล

ในขั้นแรกการสุ่มเก็บตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญและมีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจควรเป็นตัวแทนที่ดีซึ่งได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่สามารถอ้างอิงรูปแบบมาตรฐานที่มีรายงานไว้บ้างแล้วได้

ขั้นตอนต่อมา ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอซึ่งถือว่าเป็นขั้นตอนหัวใจ ทั้งนี้เนื่องจากคุณ

สมบัติของดีเอ็นเอที่พบในอาหารมีความแตกต่างไปจากดีเอ็นเอที่พบในต้นพืชอย่างมาก นอกจากนี้คุณสมบัติของอาหารเองก็มีผลโดยตรงต่อคุณภาพและประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอ (Pauli และคณะ, 1998)

Straub และคณะ (1999) ชี้ให้เห็นถึงคุณภาพดีเอ็นเอที่สูญเสียไปในระหว่างขบวนการผลิตเนื่องจากแรงเฉือน ความร้อน ความเป็นกรดหรือ pH ที่ต่ำ และการปะปนของเอนไซม์นิวคลีเอส ความร้อนมีผลต่อการลดขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะที่อุณหูมิ สูงกว่า 250 ^{0}C (สุนีย์ ลิ้มศรีวาณิชยกร, 2545)

Bauer และคณะ (2003) ได้สรุปว่าการแตกหักของดีเอ็นเอมีค่า pH เป็นปัจจัยหลักและอุณหภูมิเป็นปัจจัยรอง นอกจากนี้ สุนีย์ (2545) ยังพบว่า ความดันและกระบวนการหมักมีผลต่อการสูญเสียคุณภาพในเรื่องของขนาดของดีเอ็นเออย่างชัดเจน

ในเนื้ออาหารนอกจากจะมีดีเอ็นเอซึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายแล้วยังพบว่าโมเลกุลที่ปะปนมากับเนื้ออาหารต่างชนิดมีผลกระทบโดยตรงต่อการตรวจสอบ เช่น สารบางชนิดในกลุ่มพอลิฟีนอลและในกลุ่มนิวคลีเอสมีผลโดยตรงต่อเสถียรภาพของดีเอ็นเอตั้งแต่เริ่มกระบวนการของการสกัด บางชนิดโดยเฉพาะพวกพอลิแซ็กคาไรด์โมเลกุลใหญ่อาจรบกวนกระบวนการตกตะกอนของดีเอ็นเอจนทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ไม่ค่อยมีคุณภาพ และมีผลไปถึงขั้นตอนการทำ PCR การเลือกวิธีสกัดที่เหมาะสมจึงเป็นเงื่อนไขหลักที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการทำ PCR ในขั้นตอนแรก

ความบริสุทธิ์และผลิตผลของดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นปัจจัยวิกฤติในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Vollenhofer, 1999) บ่อยครั้งทั้ง 2 ปัจจัยจะเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือ ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากแต่ความบริสุทธิ์ก็ต่ำหรือได้ความบริสุทธิ์สูงแต่ปริมาณที่ได้น้อยมาก

Meyer และคณะ (1999) เสนอภาพรวมเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้อยู่ในช่วงแรกของการพัฒนาวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์และรัฐบาลเยอรมันทำให้เห็นข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธี หนึ่งในนั้นได้แก่วิธีที่อยู่บนพื้นฐานของการใช้ CTAB (cetyl trimethyl-ammonium bromide) เป็นโมเลกุลเชื่อมโยงในการจับตัวระหว่างดีเอ็นเอ เกลือ และ CTAB ทำให้สามารถตกตะกอนโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตออกจากดีเอ็นเอดีขึ้น ซึ่งต่อมาได้รับการอ้างอิงให้เป็นวิธีการมาตรฐานที่รัฐบาลเยอรมันใช้ และการใช้โมเลกุลซิลิกาเรซินสังเคราะห์ทำหน้าที่จับตัวเฉพาะกับดีเอ็นเอหลังจากที่เซลล์ที่ผ่านกระบวนการย่อยและทำให้แตกตัวด้วยเอนไซม์ proteinase K และสารเคมีในกลุ่มดีเทอร์เจน เช่น SDS วิธีหลังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้ออาหารที่มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำมาก เช่น เลซิตินและผลิตภัณฑ์ที่มีเลซิตินเป็น

ส่วนผสม จึงทำให้ได้รับการยอมรับและใช้เป็นวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ (Pauli และคณะ, 1998)

ปริมาณของดีเอ็นเอในเนื้ออาหารบางชนิด เช่น น้ำมัน มีต่ำมาก ในบางกรณีต่ำเกินกว่าจะสามารถสกัดออกมาได้ (Pauli และคณะ, 1998) ดังนั้นการวิเคราะห์ลักษณะของธรรมชาติของเนื้ออาหารก่อนดำเนินการสกัดดีเอ็นเอจะช่วยให้การวางแผนในการสกัดดีเอ็นเอมีความรัดกุมและเชื่อมโยงไปสู่ความสำเร็จ (Hübner และคณะ, 1999)

จากการสำรวจพบว่ามะละกอและผลิตภัณฑ์ที่สนใจมีเนื้ออาหารที่อยู่ในรูปใกล้เคียงธรรมชาติมากกว่าผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปอื่น ผลิตภัณฑ์หลักที่ส่งออก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปบรรจุกระป๋อง ผลิตภัณฑ์มะละกออบแห้ง เป็นหลักซึ่งเป็นเนื้ออาหารที่ไม่มีความซับซ้อนมากนักแต่อาจมีปัญหาเกี่ยวเนื่องกับปริมาณดีเอ็นเอที่มีคุณภาพในตัวเนื้ออาหารเองทั้งนี้เนื่องจากอาหารเหล่านั้นผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น ความร้อน แรงดัน และรังสีต่างๆ และการปนเปื้อนด้วยโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตและโมเลกุลของสารปรุงแต่งที่ใส่ลงในเนื้ออาหารในระหว่างขั้นตอนการผลิต โมเลกุลเหล่านั้นอาจมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์

การสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับวิธีสกัดดีเอ็นเอทำให้เห็นมิติข้อมูลและแนวทางการดำเนินการ Vollenhofer และคณะ (1999) รายงานถึงปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในกรณีที่มีปริมาณดีเอ็นเออยู่น้อยว่าไม่สามารถนำชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมาใช้ได้ทั้งนี้เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและในตัวอย่างเหล่านั้นแม้การคำนวณปริมาณตัวอย่างเริ่มต้นในอัตราที่สูงขึ้น (scale up) เพื่อชดเชยก็ไม่สามารถทำได้และกลับพบว่าวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมันซึ่งมีต้นทุนต่ำกว่ากลับสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี (Matsuoka และคณะ, 1999) โดยปกติตัวอย่าง 1-2 กรัมของผลิตภัณฑ์จะได้ดีเอ็นเอแปรผันอยู่ในระดับ 30-300 นาโนกรัม ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Hüpfer และคณะ (1997) ใช้วิธี CTAB ในการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวโพดและรายงานความเหมาะสมของวิธีประเมินจากความสามารถในการแยกพอลิแซ็กคาไรด์และความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) อย่างไรก็ดีในถั่วเหลือง Lin และคณะ (2001) กลับพบว่า CTAB ในบางกรณีก็มีข้อจำกัด กล่าวคือ ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพแต่มีปริมาณน้อย ทำนองเดียวกัน Hüpner และคณะ ยังพบว่า CTAB จะตกตะกอนร่วมกับโมเลกุลอื่นที่เป็นตัวยับยั้งได้ Pauli และคณะ (1998) ใช้เรซินสังเคราะห์ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการผลิตหลายขั้นตอนซึ่งเป็นกรณีตัวอย่างที่ดีเอ็นเอในเนื้ออาหารอาจได้รับผลกระทบในด้านคุณภาพและใช้ไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจเลคตินยีนเป็นดัชนี พบว่า วิธีดังกล่าวสามารถใช้เป็นทางเลือกได้เป็นอย่างดี

นอกจากวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแล้วการใช้คอลัมน์ร่วมกันกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอ เช่น DNeasy™ (QIAGEN®), Nucleon® Phytopure (Scotlab GmBH, Germany) เป็นทางเลือกที่นำมาประยุกต์ใช้ด้วยเช่นกัน (Jankiewicz และคณะ,1999) อย่างไรก็ดีสำหรับมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอยังไม่มีผู้ใดได้รายงานถึงวิธีการสกัดดีเอ็นเอแต่อย่างใด

นอกจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแล้วความสำเร็จในการตรวจสอบยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Coyne และคณะ, 2001 ได้ให้ภาพรวมของปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในส่วนปัจจัยที่ใช้ในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอและ annealing โดยเฉพาะเรื่องความเข้มข้นของไอออนของเกลือ การคำนึงถึงคุณสมบัติของดีเอ็นเอแม่แบบโดยเฉพาะ GC content การปรับความเข้มข้นของแมกเนเซียมไอออน การปรับอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม ซึ่งมีผู้ดำเนินการโดยการปรับอุณหภูมิ annealing หลังจาก 10 รอบแรกผ่านไปให้ลดลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ขณะเพิ่มจำนวนรอบหลังๆ (Yap และคณะ, 1991) และมีผู้ปรับลดระยะเวลา annealing สำหรับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดเล็ก (Innis และคณะ, 1990) การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing รอบละเพียงเล็กน้อยในทุกรอบช่วยทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดต่ำกว่า 1000 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มจำนวนในลักษณะที่จำเพาะ (Rychlik และคณะ, 1990) ความเหมาะสมของไพรเมอร์ทั้งในแง่ความยาวและ GC content โดยเพิ่มความระมัดระวังในการจับคู่ผิดระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Ikuta และคณะ, 1987) จากการเปรียบเทียบพบว่า โดยปกติจะเลือกอุณหภูมิในการ annealing ที่ต่ำกว่า ค่า melting temperature (T_m) 5 ^{0}C (Innis และคณะ, 1990)

สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เป็น GMOs (หรือการตรวจรับรองภาวะปลอด GMOs)นั้น การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เช่น การปลอดการปนเปื้อนด้วยตัวยับยั้งต่างๆ คุณภาพของดีเอ็นเอและระดับปริมาณที่เพียงพอและการตรวจความจำเพาะต่อดีเอ็นเอที่เข้าแทรกตัวในแต่ละผลิตภัณฑ์โดยตรวจสอบในส่วนของโปรโมเตอร์ ยีนเป้าหมายและเทอร์มิเนเตอร์ของชุดยีน เช่น ยีนต้านทานยาปราบวัชพืชสำหรับถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสายพันธุ์ต้านทานยาปราบวัชพืช เป็นต้น มีความสำคัญยิ่งและเป็นปัจจัยที่กำหนดความสำเร็จหรือความล้มเหลวของการตรวจสอบ (Lin และคณะ, 2001)

Lipp และคณะ, 1999 ศึกษาความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอในถั่วเหลืองราวด์อัพเรดดี้ที่ต้านทานยาปราบวัชพืชในกลุ่ม glyphosate และได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชุดยีนทั้งโปรโมเตอร์และ *epsps* และระบุปัจจัยสำคัญเกี่ยวกับภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการทำ

ปฏิกิริยาอย่างเหมาะสม ต่อมาในปี 2001 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม พบว่า คู่ไพรเมอร์เฉพาะกับ NOS terminator ให้ผลถูกต้อง 96.3%-100% มีความไว 98.2% ขณะที่คู่ไพรเมอร์ 35S promoter ให้ผลถูกต้องเพียง 93.3%-100% มีความไว 96.1% (Lipp และคณะ, 2001)

ความจำเพาะในการตรวจ GMOs ในมะละกอบนพื้นฐานของการตรวจชุดยีนที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้จากการสำรวจโครงสร้างของชุดยีนที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมแต่ละ event ที่มีรายงานไว้

Tennant และคณะ (1994)ปลูกถ่ายยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสใบจุดวงแหวนในมะละกอสายพันธุ์ HA 5-1 ซึ่งเป็น mild strain และทดสอบความต้านทานกับเชื้อจากที่ต่างๆ 11 สายพันธุ์ พบว่า มีความต้านทานสูงและต่อมาเป็นต้นแบบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่จำหน่ายเป็นการค้า การวิเคราะห์โครงสร้างของยีนเปรียบเทียบกับที่พบในต้นมะละกอที่ดัดแปรพันธุกรรม พบยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม โครงสร้างของ promoter, terminator ,neomycin phosphotransferase II (npt II), *gus* ต่อมาในปี 1999 Wenslaff และคณะ (1999) ผลิตมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสจากพันธุ์ Sunset ผสมพันธุ์เกิดเป็นพันธุ์ SunUp ซึ่งให้ผลผลิตมะละกอที่มีเนื้อสีแดง และเมื่อผสมพันธุ์ SunUp กับพันธุ์ Kapoho Solo ที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองของฮาวายซึ่งต้นมีความแข็งแรงและมีอายุยืน ได้เป็นพันธุ์ UH Rainbow ซึ่งให้ทั้งผลผลิตที่มีเนื้อเป็นสีเหลืองเป็นที่นิยมสำหรับการส่งออกและความสามารถต้านทานต่อไวรัสและเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมชนิดแรกที่มีการผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์อย่างจริงจัง ต่อมาในปี 2001 Chen และคณะ (2001) สร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่มีโครงสร้างของชุดยีนที่ประกอบไปด้วยยีน *replicase* เชื่อมต่อกับพลาสมิด pRok โดยมีส่วนของ CaMV 35S promoter,NOS terminator, neomycin phosphorate transferase เป็นโปรโมเตอร์ เป็นเทอร์มิเนเตอร์และเป็นยีนที่ใช้ในการคัดเลือกในรูปการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ตามลำดับ ในปีเดียวกันนี้ Gonsalves และคณะ (2001) ปรับปรุงพันธุ์มะละกอต่อยอดจากที่ได้ทำวิจัยไว้และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานไวรัสในรูปของการมียีนโปรตีนเปลือกหุ้มเป็นฮอมอไซกัส event HA 5-1(SunUp) และเฮมิไซกัส (Rainbow ที่ผสม SunUp กับ Kapoho Solo)

มะละกอทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า มีโครงสร้างยีนหลัก ประกอบด้วย 35S promoter, coat protein gene และ NOS terminator ขณะที่มียีนที่ใช้ในการคัดเลือก คือ β - glucuronidase มะละกอในกลุ่มดังกล่าวเป็นต้นตอหลักของสายพันธุ์ที่ต่อมากระจายไปสู่ประเทศแคนาดาและบางส่วนของประเทศในกลุ่มละตินอเมริกา สำหรับสายพันธุ์มะละกอดัดแปร

พันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นภายหลังทั้งในออสเตรเลีย ไต้หวัน จีนและแม้แต่ในประเทศไทย ต่างก็ใช้ 35S promoter และยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเป็นหลัก (Yeh และ Gonsalves, 1984)

35S promoter ที่ใช้กันในปัจจุบันแบ่งตามลักษณะของการออกแบบเพื่อการนำไปใช้ประยุกต์เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ การนำส่วนโปรโมเตอร์เต็มไปใช้ในกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมหรือการนำเฉพาะส่วน core promoter ไปพัฒนาต่อในรูปแบบของโปรโมเตอร์ลูกผสมหรือ chimeric promoter จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า ส่วนที่เป็นนิวคลีโอไทด์หลักของโปรโมเตอร์มีความคล้ายกัน (Wolf และคณะ, 2000) และสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจพืชดัดแปรพันธุกรรมทั้งในถั่วเหลืองและข้าวโพดสำหรับในส่วนของโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอนั้น จากการศึกษาโดย Wang และคณะ (1997) เปรียบเทียบสายพันธุ์ที่พบในไต้หวันกับฮาวาย พบลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับจีโนมิกที่คล้ายกัน 83.4% และมีลำดับของกรดอะมิโนในระดับจีโนมิกคล้ายกัน 90.6% ขณะที่ในส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไวรัสในกลุ่ม potyvirus 38%-71% ขณะที่มีความเหมือนในระหว่างสายพันธุ์สูงถึง 90% - 99% ชี้ให้เห็นถึงภาวะการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบอนุรักษ์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นการผสมผสานเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอให้มีความจำเพาะและเหมาะสม การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ใช้ในการตรวจ การปรับภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและการพัฒนาโมเลกุลที่ใช้ร่วมในการตรวจในรูปแบบตัวควบคุมบวกจะช่วยตอบคำถามการตรวจวิเคราะห์ GMOs ในมะละกอได้เป็นอย่างดี

ที่ผ่านมาประเทศไทยถูกจับตามองว่าเป็นประเทศที่มีโอกาสในการผลิตและจำหน่ายมะละกอดัดแปรพันธุกรรม มีความเสี่ยงที่การวิจัยมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่อยู่ในขั้นตอนการดำเนินการเพื่อทดสอบประเมินความสามารถในไร่นาจะเล็ดลอดส่งผลให้เกิดการกระจายตัว ซึ่งในภาพรวมไม่เป็นผลดีต่อภาพลักษณ์การผลิตผลไม้ที่ปลอดภัยเพื่อการส่งออกตามนโยบายของโลก การพัฒนาชุดวิเคราะห์เพื่อตอบคำถามทั้งในส่วนของการนำไปใช้ในการตรวจสอบและประเมินทางไร่นา อาจตรวจสอบเพื่อรับรองผลในทางอุตสาหกรรมอาหารเพื่อส่งออกและโอกาสในการเชื่อมโยงไปสู่การประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบในการรับรองภาวะปลอด GMOs ให้กับตัวสินค้ามะละกอเพื่อการส่งออกได้