การพัฒนาวิธีตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอ

นางสาวปัทมา เสนทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5645-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF THE DETECTION METHOD FOR RECOMBINANT DNA IN PAPAYA AND PRODUCTS THEREOF

MISS PATTAMA SENTHONG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5645-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอ
โดย	นางสาวปัทมา เสนทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัทมา เสนทอง : การพัฒนาวิธีตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอ. (DEVELOPMENT OF THE DETECTION METHOD FOR RECOMBINANT DNA IN PAPAYA AND PRODUCTS THEREOF) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 119 หน้า. ISBN 974-17-5645-3.

พัฒนาวิธีการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอในมะละกอและผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเริ่มจากทดสอบหาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม สำรวจชุดยีนที่เกี่ยวข้องออกแบบไพรเมอร์และปรับภาวะของปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังได้พัฒนาดีเอ็นเอเพื่อใช้อ้างอิงจนสามารถประกอบเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบอาหารในท้องตลาด ในเบื้องต้นพบว่าสำหรับเนื้ออาหารที่เป็นมะละกอสดและทุกเนื้ออาหารที่เป็นมะละกอแปรรูปที่พบในประเทศ วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยเรซินสังเคราะห์มีความเหมาะสมมากกว่าวิธีที่ใช้ cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) การศึกษาโครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องในรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอพบยีนพาเพนมีความเหมาะสมในการออกแบบสร้างไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีนพาเพนในธรรมชาติขนาด 280 นิวคลีโอไทด์ และพบยีนโปรตีนเปลือกหุ้มขนาด 800 นิวคลีโอไทด์ ที่พบทั้งในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่วางจำหน่ายเป็นการค้าและมะละกอที่กำลังอยู่ในระหว่างการวิจัยเป็นแม่แบบในการสร้างไพรเมอร์เป้าหมายในการตรวจโดยพบว่าภาวะเหมาะสมโดยเฉพาะอุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาเป็น 52 ^{0}C 2นาที และความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมที่เหมาะสมเป็น 1.5 µmole ความไวของปฏิกิริยาในการตรวจดีเอ็นเอ(senstivity)ของยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มต่ำสุดอยู่ที่ 1.9635 pg/µl และ 1.7538 pg/µl ความน่าเชื่อถือในรูปการทำซ้ำ(reproducibility) และความจำเพาะ (specificity) อยู่ที่ 99% และ 100% ตามลำดับ สำหรับดีเอ็นเออ้างอิงสังเคราะห์สร้างจากการรวมชิ้นส่วนของยีนพาเพน 35Sโปรโมเตอร์ ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและเทอร์มิเนเตอร์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสร่วมกับการเชื่อมต่อด้วยไลเกส และโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCRII ด้วยหลักการ TA cloning ดีเอ็นเออ้างอิงในรูปพลาสมิดที่ได้มีความไวต่อการตรวจแม้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำเพียง 2.9634 pg/µl และเมื่อนำวิธีที่ได้ไปตรวจสอบอาหารในท้องตลาดจำนวน 3024 ตัวอย่าง สามารถทดสอบยีนพาเพนได้ทั้งหมดและตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์นำเข้า 1 ตัวอย่าง วิธีที่ได้สามารถนำไปเชื่อมโยงเพื่อตรวจรับรองภาวะปลอดจากการดัดแปรพันธุกรรม (GMOs Free)กับมะละกอเพื่อการส่งออกได้

หลักสูตร.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....ปัทมา เสนทอง.....

สาขาวิชา .... เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา .2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372532823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: PCR / PAPAYA / RECONBINANT DNA / NUCLEOTIDES / GMOS

PATTAMA SENTHONG : DEVELOPMENT OF THE DETECTION METHOD FOR RECOMBINANT DNA IN PAPAYA AND PRODUCTS THEREOF. THESIS ADVISOR : PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 119 pp. ISBN 974-17-5645-3.

For DNA extraction from fresh papaya and all texture of papaya processed products, protocol based on synthetic resin was more suitable than that using detergent of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). Further investigation on recombinant cassette of genes revealed the papain gene and its unique domain as an internal gene for 280 nt papain screening and the 800 nt of papaya ring spot virus coat protein gene as source for target recombinant DNA primer design. This covering all the permitted recombinant papaya events and the under developing transgenic papayas. It was found during condition determination that the suitable annealing temperature and magnesium concentration were at 52°C 2 min and 1.5 μmole respectively. The sensitivity for minimum papain and coat protein gene dosage for the test was 1.9635 pg/μl and 1.7538 pg/μl. And the liability based on reproducibility and specificity test was 99% and 100% respectively. For the test, reference positive control DNA was derived from a construction of plasmid DNA having an assemble of papain 35S promoter portion of papaya ring spot virus coat protein gene and terminator via PCR technique cloned into pCRII using TA cloning principle. This reference DNA could be detected even at concentration of 2.9634 pg/μl as low. The application of the method for papaya food testing revealed that among 3024 samples tested, all were papain positive and one as of imported product test positively with recombinant coat protein gene. The method constitutes a basis for assured testing on GMOs free papaya and their products for export.

Program: .....Biotechnology..... Student's signature ...Pattama Senthong.....

Field of study:... Biotechnology..... Advisor's signature .....

Academic year .....2003..... Co-advisor's .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากอาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ และตรวจแก้ไขในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณเกียรติศักดิ์ ตั้งเจริญสุทธิชัย เจ้าของสวนเจริญพีระวัฒน์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบมะละกอในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และน้องสาว ที่ให้ชีวิตและให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่งทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....15
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....23
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....73

รายการอ้างอิง.....80
ภาคผนวก.....87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกลุ่มมะละกอและผลิตภัณฑ์แปรรูป	26
2	โครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม	29
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพาเพนจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ	30
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละคู่สายพันธุ์ของยีนพาเพน	32
5	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พาเพนด้วยการทำ BLAST n	33
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ	34
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละคู่สายพันธุ์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม	40
8	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้มด้วยการทำ BLAST n	42
9	บริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์	42
10	ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำโดยใช้ตัวอย่างมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอ ได้แก่ มะละกออบแห้ง มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต และเนื้อเยื่อมะละกอ	59
11	ภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	60
12	ผลการตรวจมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป ได้แก่ มะละกออบแห้ง มะละกอกระป๋องในน้ำเชื่อม มะละกอในโยเกิร์ต มะละกอจากแปลง และเนื้อเยื่อมะละกอ	71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แคสเสตของยีน (gene cassette) ซึ่งประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย โปรโมเตอร์ ยีนเป้าหมายและเทอร์มิเนเตอร์	8
2	ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบมะละกอสด	28
3	โครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องสำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม	29
4	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพาเพนบริเวณใกล้เคียงกับที่ออกแบบไพรเมอร์	31
5	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มบริเวณใกล้เคียงกับที่ออกแบบไพรเมอร์	36
6	ผลการปรับอุณหภูมิ annealing ของยีนพาเพนเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม	43
7	ผลการปรับอุณหภูมิ annealing ของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม	45
8	ผลการปรับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมไอออนของยีนพาเพนเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม	46
9	ผลการปรับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมไอออนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม	47
10	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จากยีนพาเพนและยีนโปรตีนเปลือกหุ้มด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer	48
11	การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลไม้ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer	50
12	การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer	51
13	การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer	52

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

14 การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลไม้ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 53

15 การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปด้วยคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 54

16 การตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ต่างชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 55

17 ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากมะละกอสดในรูปของใบ (A) และเนื้อเยื่อมะละกอ (B) ด้วยไพรเมอร์พาเพน ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 57

18 ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากมะละกอในรูปของใบสด (A) และเนื้อเยื่อมะละกอ (B) ด้วยยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 58

19 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนของยีนพาเพน (A) 35S promoter (B) ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(C) และเทอร์มิเนเตอร์(D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer 61

20 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนที่เชื่อมต่อกัน 4 ส่วนด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer.....62

21 การตรวจสอบโคลนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้รับชิ้นส่วนของของยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์ จากโคโลนีที่มีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 10 โคโลนี.....63

22 ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากชิ้นส่วนยีนพาเพน(A) ชิ้นส่วน 35S promoter (B) ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม(C) และชิ้นส่วนเทอร์มิเนเตอร์(D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer..... 65

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

23 ผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาจากพลาสมิดดีเอ็นเอในส่วนยีนพาเพน ที่เชื่อมกับ 35S promoter(A) ชิ้นส่วนยีน35S promoter เชื่อมกับยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม (B) ชิ้นส่วนยีนโปรตีนเปลือกหุ้มเชื่อมกับเทอร์มิเนเตอร์ (C) และชิ้นส่วนยีนรวม(D) ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบน อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE 67

24 โครงสร้างของพลาสมิดรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ.....68

25 ผลของผลิตภัณฑ์จากพลาสมิดดีเอ็นเอในทุกส่วน ด้วยหลักการปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer 69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย