229120

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

229120

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.