



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปรัชญาคุณภูมิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร	โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การศึกษาโปรตีนใหม่และโปรตีโอมิกส์ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคไวรัสใบด่างวงแหวน
	Study of Novel Proteins and Proteomics of Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus
นามผู้วิจัย	นางสาวชาลิณี คงสวัสดิ์
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์วิชัย โฆสิตรัตน์, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์ปาริชาติ เบิร์นส, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)
ประธานสาขาวิชา	(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาโปรตีนใหม่และโปรตีโอมิกส์ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม
ต้านทานโรคไวรัสใบด่างวงแหวน

Study of Novel Proteins and Proteomics of Genetically Modified Papaya
Resistant to Papaya Ringspot Virus

โดย

นางสาวชาลินี คงสวัสดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชาลินี คงสวัสดิ์ 2553: การศึกษาโปรตีนใหม่และโปรตีนโอมิคส์ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม
ต้านทานโรคไวรัสใบด่างวงแหวน ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์ชัย โสรัตน์, Ph.D. 188 หน้า

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลักการเทียบเท่า (substantial equivalence) โดยการ
ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจากยีนจำนวน 2 ยีน คือ ยีนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่าง
วงแหวนมะละกอ (PRSV-CP) และ ยีนของโปรตีน neomycin phosphotransferase (NPTII) ที่ถ่ายเข้าสู่มะละกอ
ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์แบกนวล 116/5 รุ่น R₄ ด้วยวิธี Western blot
จากตัวอย่าง ใบอ่อน ใบแก่ ดอก ผลและราก พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase
ที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวคัดเลือกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม โดยตรวจพบโปรตีนนี้ในทุกส่วนของ
พืช และในปริมาณที่มากในส่วนของเนื้อเยื่อใบ แต่ตรวจไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PRSV-CP จากนั้น
ตรวจการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคนิค 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) และ
วิเคราะห์เปรียบเทียบจุดโปรตีนบน 2-D PAGE ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum software จากนั้น นำ
โปรตีนที่แตกต่างมาจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง matrix-assisted laser desorption ionization time-of-
flight mass spectrometer (MALDI-TOF/TOF MS) ผลการศึกษาพบว่า รูปแบบโปรตีนบน 2-D PAGE ของ
เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญ เมื่อพิจารณาจากรูปแบบของโปรตีนโดยวิเคราะห์ด้วยสายตา แต่เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม
ImageMaster 2D Platinum software พบจำนวนจุดของโปรตีนบน 2-D PAGE ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม
กับมะละกอสายพันธุ์เดิมจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะละกอในระยะต้นกล้า (60 วัน) และระยะติดผลแก่ (270
วัน) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 94.46 – 98.72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ได้ต่ำกว่าความเหมือนของจุดโปรตีน
ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างเดียวกันในต่างซ้ำ (replication) ของการทดลอง ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 92.27 – 99.39
เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำจุดของโปรตีนที่แตกต่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์
ลำดับกรดอะมิโน โดยเทคนิค *de novo* sequencing นำข้อมูลไปเปรียบเทียบพบว่า โปรตีนเหล่านี้ไม่เหมือนกับ
โปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ใดๆ ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 ตามมาตรฐานของคณะกรรมการ
โครงการมาตรฐานอาหาร (codex alimentarius commission)

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

Chalinee Kongsawat 2010: Study of Novel Proteins and Proteomics of Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Wichai Kositratana, Ph.D. 188 pages.

The expression pattern of two inserted gene, i.e. papaya ringspot virus coat protein (PRSV-CP) and neomycin phosphotransferase (NPTII) protein in transgenic papayas (Khak Nual 116/5 R₄) resistant to papaya ringspot virus (PRSV) were determined and used as a part of substantial equivalence determination in biosafety assessment. Proteins extracted from seedling leaf, mature leaf, mature flower and mature fruit of papaya cv. Khak Nual were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting. The expression of NPTII protein was only detected in transgenic papaya and mainly in leaf tissue. However, PRSV-CP protein was not detected. Additionally, the protein profile analysis was performed using 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) to compare the difference of protein spot and identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF/TOF MS). No significant difference was observed in the protein pattern between transgenic and non transgenic plants based on image analysis by using the ImageMater 2D Platinum software. The similarity of protein expression pattern of transgenic and non transgenic plants from various tissues at seedling and mature stages ranged from 94.46 to 98.72%. However, this similarity was not lower than the similarity between each replication of the samples which were 92.27 – 99.39%. The protein spots found to be different were further identified by *de novo* sequencing using MALDI-TOF/TOF MS and amino acid sequences obtained were compared to known allergen proteins. No protein could be matched with allergen available in AllergenOnline Database according to CODEX standard.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โฉมรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่
กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชา ดูแลเอาใจใส่ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์อย่างดีตลอดมา
ขอขอบพระคุณ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส และ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล กรรมการที่ปรึกษาที่ช่วยเหลือ
และให้คำปรึกษาต่างๆ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ
รองศาสตราจารย์ ดร.รวิ เสริมฐักดิ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ ดร.บุญญานาถ นาถวงษ์
ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและ
วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการค้นคว้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัย
พืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มะละกอในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อ.ดร.รักษนก โคโต ดร.จุฑาทิพย์ วัชรไชยคุปต์ คุณกษมา ชูสังข์ คุณน้ำทิพย์
พิรณฤทธิ์ คุณสุรชาติพิทย์ กิตติเสนาชัย คุณอรรณพ หิมานันโต คุณจินตนา จันทร์เจริญฤทธิ์ และ
คุณทนง เพ็ญอ้วน รวมทั้ง พี่ เพื่อน น้องๆ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และศูนย์พันธุวิศวกรรม
และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์อย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ ประโยชน์ใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์นี้ ขอมอบให้คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง
รวมทั้งทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก คอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุนการศึกษาและการทำ
วิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ชาลินี คงสวัสดิ์

มีนาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(10)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
ตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	28
ผล	28
วิจารณ์	163
สรุปและข้อเสนอแนะ	170
สรุป	170
ข้อเสนอแนะ	171
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	173
ภาคผนวก	184
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	188

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้ในตัวอย่างของมะละกอแช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R4 และมะละกอแช่กรดสายพันธุ์เดิม 29
2	เปรียบเทียบจำนวนจุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ระหว่างมะละกอแช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม 50
3	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอแช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้า เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT 54
4	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo</i> sequencing ของโปรตีนจากใบมะละกอแช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้าที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก 58
5	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์แช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้า เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT 68
6	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo</i> sequencing ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอแช่กรดเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้าที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก 69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
7	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	75
8	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	78
9	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	84
10	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	87
11	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	95
12	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาคำของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	104
14	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	107
15	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาคำของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	115
16	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	119
17	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาคำของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	129
18	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	135

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	144
20	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	149
21	โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT	155
22	ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค <i>de novo sequencing</i> ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก	158
23	เปรียบเทียบความแปรปรวนของการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในระหว่างซ้ำของ 2D-PAGE ในการทดลอง	167

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พลาสมิด p2CMCP ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ (PRSV) สายพันธุ์เชียงใหม่ และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ <i>nptII</i> ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะละกอสายพันธุ์แขกนวล โดยวิธียิงอนุภาค	18
2	ขั้นตอนการตรวจสอบโปรตีนโอมิกส์ด้วยเทคนิค 2-D PAGE และ MALDI-TOF/TOF MS	27
3	การตรวจแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อใบ ดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วยวิธี silver staining	32
4	การตรวจแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วนรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วยวิธี silver staining	33
5	การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในตัวอย่างใบ ดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วยเทคนิค Western blot	34
6	การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase โดยวิธี Western blot และตรวจสอบความเข้มของแถบสัญญาณด้วยวิธี densitometer ในตัวอย่างใบ ดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม	35
7	การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase โดยวิธี Western blot และตรวจสอบความเข้มของแถบสัญญาณด้วยวิธี densitometer ในตัวอย่างรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม	36
8	รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 จุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	39
10 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	42
11 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	43
12 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	44
13 จุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	45
14 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	จุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	47
16	รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของรากมะละกอดัดแปลง พันธุกรรม และมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	48
17	จุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum	49
18	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ของมะละกอดัดแปลง พันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม	53
19	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม	67
20	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอดัดแปลง พันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม	74
21	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างดอกในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม 94
23	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างดอกในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 103
24	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม 114
25	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 128
26	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างรากในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม 143
27	จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม 154

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2-D PAGE	=	2-dimensional gel polyacrylamide eletrophoresis
A	=	alanine
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
C	=	cysteine
CHAPS	=	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHCA	=	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
D	=	aspartic acid
DHB	=	2,5-dihydrobenzoic acid
DTT	=	dithiothreitol
E	=	glutamic acid
F	=	phenylalanine
G	=	glycine
H	=	histidine
I	=	isoleucine
IPG	=	immobilized pH gradient gel
K	=	lysine
L	=	leucine
M	=	methionine
MALDI-TOF/TOF MS	=	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometer
MOWSE	=	Molecular Weight Search.
MSDB	=	Mass Spectrometry Protein Sequence Database.
N	=	asparagine
NBT	=	nitroblue tetrazolium
NPTII	=	neomycin phosphotransferase
P	=	proline
PCR	=	polymerase chain reaction
PMF	=	peptide mass fingerprint

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PRSV-CP	=	Papaya Ringspot Virus Coat Protein
Q	=	glutamine
R	=	arginine
RNAi	=	RNA interference
S	=	serine
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
T	=	threonine
TFA	=	trifluoroacetic acid
V	=	valine
W	=	tryptophan
Y	=	tyrosine

การศึกษาโปรตีนใหม่และโปรตีโอมิกส์ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรค ไวรัสใบด่างวงแหวน

Study of Novel Proteins and Proteomics of Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus

คำนำ

มะละกอ (*Carica papaya* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย มีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ รับประทานเป็นผลไม้และประกอบอาหาร โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการบริโภคมะละกอดิบเป็นอาหารในชีวิตประจำวัน นอกจากนี้ มะละกอสวยยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการทำผลไม้บรรจุกระป๋องเพื่อการส่งออก (ประพันธ์, 2525) โรคสำคัญที่มักพบในมะละกอ คือ โรคใบด่างวงแหวนที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวน (papaya ringspot virus, PRSV-P) ซึ่งถือเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกมะละกอทั่วโลก ทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา หมู่เกาะแคริบเบียน อินเดีย และประเทศตะวันออก รวมทั้งประเทศไทย (Yeh and Gonsalves, 1984) ทั้งนี้ ได้มีความพยายามที่จะควบคุมโรคด้วยวิธีการต่างๆ หลายวิธี อาทิ การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะนำโรค การขุดรากถอนโคนทำลายต้นเป็นโรค (Namba and Higa, 1977) การใช้วิธี Cross protection หรือการทำวัคซีนพืช (Yeh *et al.*, 1988) แต่ไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จนกระทั่งมีการนำเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวนเป็นอย่างดี (Hautea *et al.*, 1999) ปัจจุบันนักวิจัยในประเทศต่างๆ ทั่วโลกประสบความสำเร็จในการพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานโรคไวรัสใบด่างวงแหวน รวมทั้งประเทศในภูมิภาคอาเซียน เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และไทย (Mackey, 2002)

อย่างไรก็ดี ก่อนนำพืชดัดแปลงพันธุกรรม รวมทั้งมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม มาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้ จะต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety assessment) ก่อนซึ่ง ประกอบด้วย การทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม (Environmental safety assessment) และการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหาร (Food safety assessment) เพื่อให้มั่นใจได้ว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และสุขอนามัยมนุษย์ (Dale *et al.*, 2002) โดยการประเมินความเสี่ยงจะพิจารณาดำเนินการบนพื้นฐาน

เป็นกรณีๆ ไป (case-by-case) และใช้ข้อมูลที่ถูกต้องทางวิทยาศาสตร์และมีความโปร่งใส ตามแนวทางที่พัฒนาขึ้นโดยองค์กรระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000) และมีการทดสอบเป็นแบบทีละขั้นตอน (step-by-step) โดยเริ่มต้นตั้งแต่การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพระดับโรงเรือน การตรวจสอบระดับแปลงทดลองขนาดเล็ก และการตรวจสอบระดับไร่นา (คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพด้านการเกษตร, 2544) การทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อมจะต้องทำการศึกษผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่มีไม่เป้าหมาย (non target organisms) ศักยภาพของยีนที่จะมีผลให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมกลายเป็นวัชพืช (weediness) รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดของยีนจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมไปสู่สิ่งมีชีวิตอื่น (horizontal gene transfer) ทั้งในพืชอื่น สัตว์ และ จุลินทรีย์ในดิน (Barton and Dracup, 2000) และหากเป็นพืชอาหารเพื่อการบริโภคจะต้องมีการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารด้วย ซึ่งจะต้องทำการศึกษาระดับสารโภชนาการ ระดับสารต้านโภชนาการ (anti-nutrient) และระดับการก่อสารพิษ (toxicity) และตรวจสอบโปรตีนใหม่ที่เกิดขึ้น ซึ่งหากมีโปรตีนใหม่ผลผลิตขึ้นจะต้องตรวจสอบความปลอดภัยและการก่อภูมิแพ้ (allergenicity) ของโปรตีนใหม่ด้วย ซึ่งปกติการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารนี้จะใช้หลักการเทียบเท่า (substantial equivalent) กับพืชพันธุ์เดิมเป็นตัวเปรียบเทียบ (counterpart) (Chassy, 2002) ถึงแม้ว่าพืชที่ได้จากการผสมพันธุ์โดยวิธีการดั้งเดิมเอง ก็สามารถที่จะเกิดการชักนำให้ผลิตโปรตีนใหม่ได้ เช่นเดียวกับการถ่ายยีนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Copillo *et al.*, 2004)

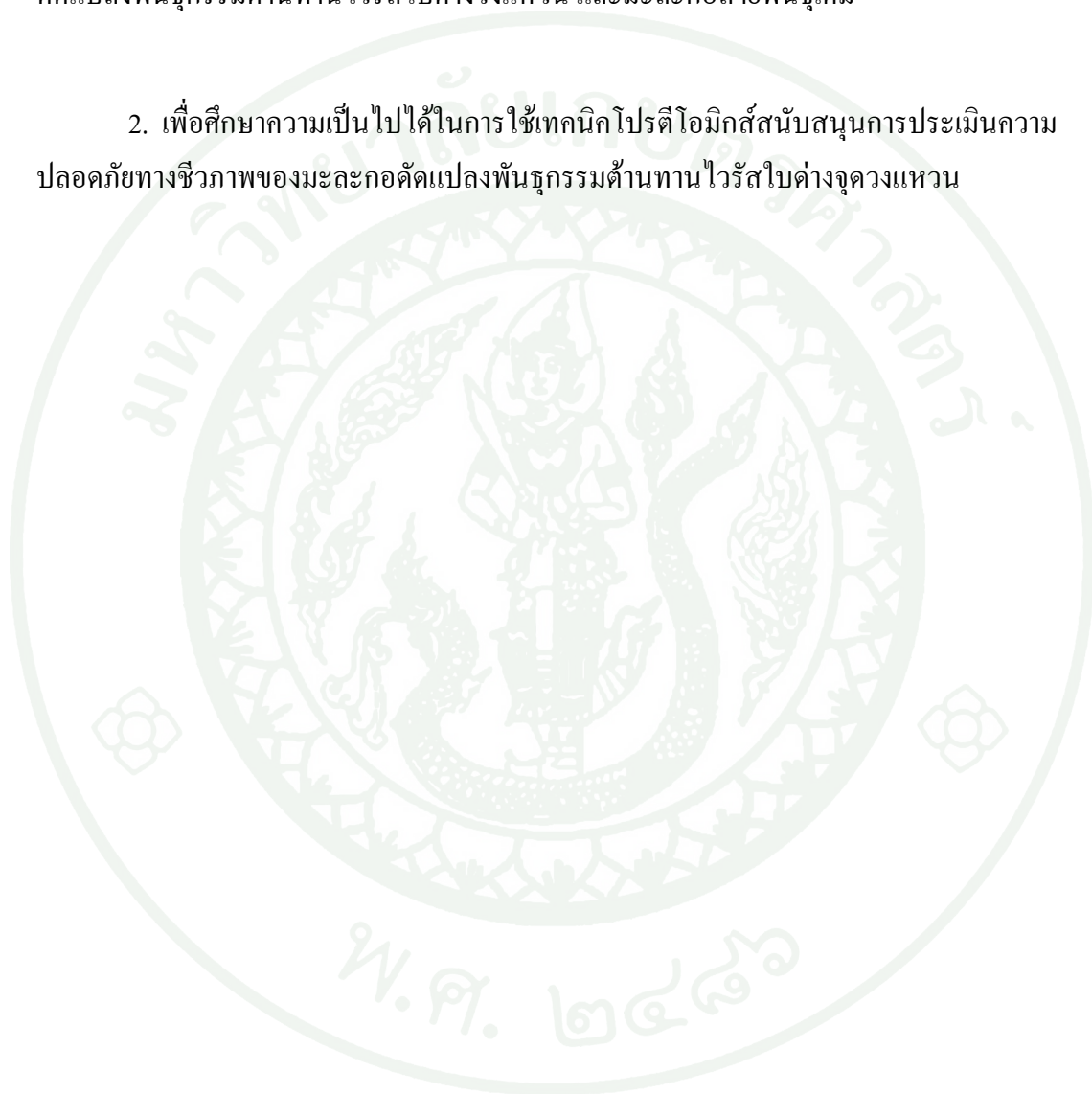
ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากจะใช้เทคนิคพื้นฐานทางอนุชีววิทยา (molecular biology) แล้ว ยังมีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคใหม่เพื่อใช้ในการตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น DNA microarray ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนระดับ mRNA และการศึกษาโปรตีโอมิกส์เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกระดับโปรตีน (Kuiper *et al.*, 2001) โปรตีโอมิกส์เป็นการหาโปรตีนทั้งหมดที่จีโนม (genome) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแสดงออก (express) ณ เวลานั้น (Berkelman and Stenstedt, 1998) โปรตีโอมิกส์ไม่ได้ศึกษาได้เพียงปริมาณหรือคุณภาพของโปรตีนทั้งหมดเท่านั้น แต่ยังสามารถใช้ศึกษาค้นหาลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และโปรตีนกับดีเอ็นเอ ซึ่งลักษณะเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับจีโนมิกส์ (genomics) ด้วย (Westermeyer and Naven, 2002)

ปัจจุบันการศึกษาโปรตีนโอมิกส์โดยใช้ 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) เป็นวิธีการหนึ่งในการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน แล้วจึงวิเคราะห์ชนิดและคุณสมบัติของโปรตีนด้วย mass spectrometer (Twyman, 2004) มีการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ของพืชหลากหลายด้านต่างๆ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนเมื่อพืชถูกกระตุ้นด้วย biotic stress หรือ abiotic stress รวมทั้ง การใช้โปรตีนโอมิกส์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของพืช (Agrawal *et al.*, 2005) Corpillo *et al.* (2004) เริ่มประยุกต์ใช้โปรตีนโอมิกส์เพื่อประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนโอมระหว่างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวและจุดวงแหวนบนผลมะเขือเทศ (tomato spotted wilt virus) กับมะเขือเทศสายพันธุ์เดิมที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการแสดงออกของโปรตีนหลัก (major protein) ในด้านปริมาณและคุณภาพ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบโปรตีนโอมิกส์ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์แขกนวล (พันธุ์เดิม) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ของการใช้โปรตีนโอมิกส์ในการประเมินความปลอดภัย ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนเป็นกรณีตัวอย่าง เพื่อพัฒนาเทคนิคหาแนวทางใหม่ที่สะดวก แม่นยำ และเชื่อถือได้ เพื่อการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากยีนที่สอดแทรกเข้าไปใหม่ในมะละกอแขกนวล
ดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สนับสนุนการประเมินความ
ปลอดภัยทางชีวภาพของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน



การตรวจเอกสาร

1. มะละกอ

มะละกอ (*Carica papaya* Linn.) อยู่ในวงศ์ Caricaceae เป็นไม้ผลเขตร้อนและกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบประเทศอเมริกากลาง บริเวณประเทศเม็กซิโกตอนใต้ และคอ스타ริกา แล้วแพร่กระจายไปยังประเทศแถบร้อนต่างๆ ทั่วโลก มะละกอเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ประเภทไม้เนื้ออ่อน ลำต้นเดี่ยว และมีใบขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นแบบ palmately lobe เจริญเติบโตได้เร็ว ให้ผลผลิตหลังจากการปลูกไปแล้วประมาณ 4 – 8 เดือน มะละกอจะให้ผลผลิตสูงในปีแรกๆ และเมื่อต้นมีอายุมากขึ้นผลผลิตจะลดลง (วัฒนา, 2531) มะละกอเป็นผลไม้ที่คนไทยรู้จักกันแพร่หลายและนิยมกันมานาน เพราะเป็นผลไม้ที่รับประทานได้ทั้งดิบและสุก น้ำยมะละกอยังมีคุณสมบัติในการช่วยย่อยโปรตีนได้เป็นอย่างดี จึงนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมขนสัตว์ เป็นต้น จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของมะละกอสุก พบว่า ประกอบด้วยน้ำ 88 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 10 – 13 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 0.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น ยังอุดมไปด้วยวิตามิน เอ วิตามิน บี1 วิตามิน บี2 และวิตามิน ซี (ประพันธ์, 2525) สำหรับประเทศไทยมีการปลูกมะละกอกันทั่วไป จะมีแหล่งปลูกในจังหวัดราชบุรี นครปฐม สมุทรสงคราม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี จันทบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (วัฒนา, 2531)

2. โรคไวรัสใบด่างวงแหวน

โรคใบด่างวงแหวนมะละกอเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) ซึ่งเป็นไวรัสรูปท่อนยาวคด (flexuous rod shape) ความยาวของอนุภาคประมาณ 780 นาโนเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 นาโนเมตร (Tripathi *et al.*, 2004) แพร่ระบาดโดยเพลี้ยอ่อนหลายชนิด โดยเฉพาะเพลี้ยอ่อนฝ้ายและเพลี้ยอ่อนแดง ต้นมะละกอที่เป็นโรคจะพบความผิดปกติได้ทั้งบนใบ ลำต้น ก้าน และผล อาการโดยทั่วไปคือ ใบมีลักษณะด่างสีเหลืองสลับเขียว เนื้อใบเป็นคลื่นไม่เรียบ (puckering) หรือบิดเบี้ยวรูปร่างผิดปกติ (distortion) บนผลจะมีการเป็นจุดสีเขียวน้ำหรือเป็นขีดเล็กๆ (รัชณี, 2529) โรคใบด่างวงแหวนมะละกอเป็นโรคสำคัญต่อความสูญเสียมะละกอในสวาย เม็กซิโก หมู่เกาะคาริเบียน ทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Persley and Ploetz, 2003) สำหรับประเทศไทยประสบปัญหาการระบาดของ

ของโรคใบด่างวงแหวนมะละกอดังแต่ปี พ.ศ. 2518 โดยเริ่มจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ถวิล, 2519) ในปี พ.ศ. 2546 พบการระบาดของโรคใบด่างวงแหวนในทุกจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและมีความรุนแรงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงของโรคมีผลทำให้ผลผลิตบางปีลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (วิไล, 2525) โรคใบด่างวงแหวนมะละกามีผลต่อปริมาณผลผลิตตลอดจนคุณภาพของผลผลิต วิธีควบคุมโรคทำได้โดยการขุดรากถอนโคน การป้องกันโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงเป็นวัคซีน และการผสมพันธุ์มะละกอให้ทนทานต่อโรค จนถึงปัจจุบันไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากระบบการปลูก และสภาพแวดล้อมของประเทศไทยที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวน ทำให้มีโอกาสเกิดการระบาดของโรคได้ตลอดทั้งปี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2547)

3. พืชดัดแปลงพันธุกรรม

พืชดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified plant) คือ พืชที่ได้รับการดัดแปลงสารพันธุกรรม ทำให้พืชแสดงคุณลักษณะบางอย่างตามการแสดงออกของยีนที่ได้รับการเปลี่ยนแปลง (Conner *et al.*, 2003) การพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม ทำได้โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มีเทคนิคการถ่ายยีนให้เข้าไปอยู่ในโครโมโซมเซลล์ใหม่ได้หลายทาง วิธีที่นิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุดมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีการถ่ายยีนโดยใช้พาหะนำยีนสู่โครโมโซมพืช (vector mediated gene transfer) โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะในการนำ และวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง (direct gene transfer) โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment) (Birch, 1997) ด้วยการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ผนวกกับความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของยีน ทำให้สามารถใช้พันธุวิศวกรรมในการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อแก้ไขปัญหาทางด้านการเกษตรต่างๆ อาทิเช่น การเพิ่มคุณค่าทางอาหาร การต้านทานต่อโรคและแมลง การทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น (Pena, 2004)

พืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิดเริ่มมีการปลูกในเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 และมีปริมาณการเพาะปลูกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเกินกว่าที่คาดไว้ โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงถึงกว่า 74 เท่าตัวจากประเทศต่างๆ ทั่วทุกมุมโลก ในปี ค.ศ. 2008 พื้นที่การปลูกพืชไร้ดัดแปลงพันธุกรรมมีเนื้อที่กว่า 125 ล้านเฮกตาร์ ในจำนวน 25 ประเทศที่ปลูกในเชิงพาณิชย์ ซึ่งปริมาณพื้นที่เพาะปลูก

พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นไม่ได้มีแต่ในเฉพาะประเทศที่มีเทคโนโลยีสูงหรือประเทศพัฒนาแล้วเท่านั้น แต่มีจำนวนประเทศกำลังพัฒนาที่ได้นำเทคโนโลยีนี้มาใช้ถึง 15 ประเทศ และยังคงกันว่าพื้นที่เพาะปลูกพืชไร้ดัดแปลงพันธุกรรมจะยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วต่อไป (James, 2008) จากข้อมูลปี ค.ศ. 2008 พบว่า ประเทศหลักที่มีพื้นที่ปลูกพืชตัดแปลงพันธุกรรมมากกว่า 50,000 เฮกตาร์ มีมากถึง 14 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล อินเดีย แคนาดา จีน ปารากวัย แอฟริกาใต้ อูรุกวัย โบลิเวีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย เม็กซิโก และสเปน โดยมีพื้นที่รวมกันมากถึง 125 ล้านเฮกตาร์ ซึ่งพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกในเชิงพาณิชย์มากที่สุดตามลำดับ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด ฝ้าย และคาโนลา (James, 2008)

4. การผลิตมะละกอด้านทานโรคใบด่างวงแหวนโดยวิธีพันธุวิศวกรรม

ในการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อไวรัส (virus tolerant) ทำได้โดยการถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein – CP) ของไวรัสเข้าไป พืชที่มียีนนี้สามารถต้านทานการเข้าทำลายของไวรัสชนิดนั้นๆ และชนิดใกล้เคียง ตัวอย่างได้แก่ การถ่ายยีน CP ของไวรัสต้นยาสูบ (tobacco mosaic virus – TMV) เข้าไปในต้นยาสูบ ยาสูบที่มียีน CP อยู่จะต้านทานต่อ TMV (Abel *et al.*, 1986) และปัจจุบันได้มีการถ่ายยีนควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสชนิดอื่น เช่น AMV (alfalfa mosaic virus) (Loesch-Fries *et al.*, 1987), PVX (potato virus X) (Hemenway *et al.*, 1988), CMV (cucumber mosaic virus) (Cuozzo *et al.*, 1988) และ CTV (citrus tristaza virus) (Hoekema *et al.*, 1988) เข้าไปในต้นพืช การแสดงออกของยีน CP เหล่านี้ช่วยป้องกันต้นพืชจากการติดเชื้อโรคไวรัสดังกล่าวได้

นอกจากการถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างยีน CP ของไวรัสเข้าไปแล้ว การสร้างพืชต้านทานไวรัสอาจใช้เทคโนโลยี antisense RNA ได้ด้วย โดยการถ่ายยีนของไวรัสที่ต่อกลับทิศเข้าไปในพืช เมื่อเกิดการถอดรหัสจากยีนที่ถ่ายฝากเข้าไป จะได้ RNA ที่เป็นสายคู่สมกับ RNA ที่มาจากการถอดรหัสของไวรัส เมื่อไวรัสเข้าทำลายพืช จะมีการสร้างสารพันธุกรรมแม่แบบ (minus sense RNA) และมีการถอดรหัสเป็น RNA สายบวก และแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) เพื่อการทวีจำนวนของไวรัส แต่ antisense RNA ที่ถอดรหัสมาจากยีนที่ถ่ายเข้าไปในพืช จะมาจับกับ RNA ของไวรัส จึงทำให้ไม่มีการถอดรหัสและแปลรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถทวีจำนวน และไม่แสดงอาการของโรคขึ้น (Hanada, 1994; Kadzimin, 1994)

นักวิทยาศาสตร์ได้ประสบความสำเร็จอย่างสูงในการพัฒนาพืชต้านทานไวรัส โดยใช้ Pathogen-derived resistance ของ Sanford and Johnson (1985) เช่น Abel *et al.* (1986) พัฒนาสายพันธุ์ยาสูบโดยวิธีพันธุวิศวกรรมด้วยยีน CP ของไวรัสใบด่างยาสูบ (TMV) ทำให้ยาสูบต้านทานต่อ TMV ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก และ Fitch *et al.* (1992) ประสบความสำเร็จในการป้องกันกำจัด PRSV-P โดยการสร้างพันธุ์มะละกอที่มียีน CP ของ PRSV-P-HA 5-1 ซึ่งเป็น mutant (Yeh and Gonsalves, 1984) ของสายพันธุ์ PRSV-P-HA เดิมของฮาวาย (Fitch *et al.*, 1992) และสายพันธุ์หนึ่งที่มีความต้านทานต่อไวรัสในสภาพแปลงปลูกอย่างดีเยี่ยม คือ 55-1 ซึ่งต่อมาใช้ชื่อทางการค้าว่า “SunUp” (Lius *et al.*, 1997) นอกจากนั้น Cai *et al.* (1999) ใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic) นำยีน untranslatable CP ของไวรัสสายพันธุ์ฮาวาย (HA-51) เข้ามะละกอพันธุ์ Sunrise ทำให้ต้านทาน PRSV-P อย่างมีประสิทธิภาพสูง Cheng *et al.* (1996) สามารถนำยีน CP ของ PRSV-P เข้า somatic embryo มะละกอ โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นนั้น มีความต้านทานดีมากต่อไวรัสสายพันธุ์ฮาวาย แต่ต้านทานต่ำหรือไม่ต้านทานต่อไวรัสสายพันธุ์จากแหล่งอื่นๆ รวมทั้งสายพันธุ์จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วย (Tennant *et al.*, 1994) เนื่องจากความต้านทานเฉพาะเจาะจงต่อไวรัสที่นำยีน CP มาใช้ในการสร้างมะละกอพันธุ์นี้ จึงมีความจำเป็นต้องสร้างพันธุ์มะละกอที่มีความจำเพาะต่อไวรัสแต่ละแหล่ง ดังนั้น ในเดือนกรกฎาคม 2540 ประเทศไทยโดยกรมวิชาการเกษตรด้วยความช่วยเหลือของมหาวิทยาลัยคอร์เนล ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมขึ้นเป็นครั้งแรก หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองได้นำพืชและเนื้อเยื่อกลับประเทศไทย เพื่อทำการศึกษาคูในโรงเรือนทดลองและคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานต่อ PRSV แล้วนำไปทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมใน 3 แห่ง (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2547) ได้แก่

4.1 สถานีทดลองพืชสวน กรมวิชาการเกษตร จ. ขอนแก่น ดำเนินการทดลองปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในแปลง ในมะละกอ 2 สายพันธุ์ คือ แขนกนวลและแขนคำมีระดับความต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวนประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์

4.2 หน่วยปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรมด้านพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยนักวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับนักวิจัยของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ดำเนินการวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์แขนกนวลในการ

ต้านทานโรคใบด่างวงแหวน โดยการถ่ายพลาสมิด p2CMCP ที่มียีน CP ของไวรัส PRSV สายพันธุ์ เชียงใหม่ ด้วยวิธี microprojectile bombardment (นุชนาถ และคณะ, 2546)

4.3 สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ดำเนินการ ศึกษาวิจัยขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกความต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนของมะละกอตัดแปลง พันธุกรรม (Ruanjan *et al.*, 2007)

5. การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชตัดแปลงพันธุกรรม

เทคโนโลยีการถ่ายยีนสามารถปรับปรุงพืชให้มีลักษณะที่ต้องการอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ การปรับปรุงพันธุ์แบบอื่นไม่สามารถทำได้ แต่ในขณะเดียวกันพืชถ่ายยีนอาจจะทำให้เกิดผล กระทบที่ไม่พึงประสงค์ (Thomas and Fuchs, 2002) แม้พืชตัดแปลงพันธุกรรมจะมีประโยชน์ต่อ สิ่งแวดล้อมและต่อมนุษย์ แต่ปัจจุบันยังมีความกังวลว่าอาจจะมีผลกระทบในทางลบ โดยเฉพาะ อย่างยิ่งผลกระทบในระยะยาว (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2546) ดังนั้น ก่อนนำพืชตัดแปลงพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้ จะต้องผ่านการประเมินความ ปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety assessment) ก่อน ซึ่งจะเป็นการประเมินความเสี่ยงหรือโอกาส ความน่าจะเป็น ที่จะเกิดผลกระทบในแง่ลบ (Wachbroit, 1991) เพื่อจัดระบบการบริหารจัดการที่ เหมาะสม ดังนั้น ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องทำการประเมินในหลายๆ ด้าน (Kaplan and Garrick, 1981) ก่อนการตัดสินใจนำเข้าหรือใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลง พันธุกรรม

5.1 หลักการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (Ryan, 2005)

5.1.1 อยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ (science-based) ต้องมีเหตุผลที่สามารถอธิบาย ได้ด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์

5.1.2 อยู่บนพื้นฐานของผลิตภัณฑ์ จะต้องทำการประเมินที่ตัวผลิตภัณฑ์ มิใช่ที่ กระบวนการพัฒนา แต่อาจนำข้อมูลการพัฒนาเป็นข้อมูลประกอบการประเมินได้

5.1.3 อยู่บนพื้นฐานของการประเมินแบบเป็นกรณีๆ ไป (case-by-case) จะต้องทำการประเมินในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไปแต่ละพันธุ์ไป

5.1.4 อยู่บนพื้นฐานการประเมินเป็นขั้นตอน (step-by-step) จะต้องมีการประเมิน โดยเริ่มจากโรงงานที่ปิดมิดชิดก่อนแล้ว จึงจะทำการประเมินในโรงงานที่ควบคุมบางส่วน และภาคสนามต่อไปได้

5.1.5 อยู่บนพื้นฐานของความเทียบเท่า (substantial equivalence) จะต้องมีการเปรียบเทียบกับพืชปกติที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม หากได้ผลเหมือนกับพืชปกติถือว่ามีความเทียบเท่าไม่มีความแตกต่างไปจากพืชปกติ

5.1.6 อยู่บนพื้นฐานที่สาธารณชนได้มีส่วนร่วม (public participation) จะต้องให้สาธารณชนได้มีส่วนร่วมในการพิจารณาผลการประเมินความเสี่ยงก่อนการตัดสินใจ

5.2 การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม (Thomas and Fuchs, 2002)

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อมของพืชดัดแปลงพันธุกรรม เป็นการจำแนกและประเมินความเสี่ยงในการปลดปล่อยหรือเพาะปลูกพืชเหล่านี้ โดยเปรียบเทียบกับพืชเดิมที่มีประวัติการใช้อย่างปลอดภัย ซึ่งจะต้องมีการประเมินและพิจารณาในประเด็นต่างๆ ดังนี้

5.2.1 ศักยภาพในการเคลื่อนย้ายยีนไปยังพืชที่มีความใกล้ชิด เป็นการประเมินความสามารถในการผสมข้ามพันธุ์กันได้และมีลูกที่สามารถมีชีวิตรอด

5.2.2 ศักยภาพในการเคลื่อนย้ายยีนไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่มีความใกล้ชิด (horizontal gene transfer) เป็นการประเมินความสามารถในการเคลื่อนย้ายยีนที่ไม่ได้เกิดจากการผสมพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่เกิดจากต่างสิ่งมีชีวิตกัน โดยเฉพาะความเป็นไปได้ที่จะเคลื่อนย้ายยีนระหว่างพืชกับแบคทีเรีย

5.2.3 ศักยภาพในกลายพันธุ์พืช (weediness) เป็นการประเมินความสามารถของพืชที่จะคงอยู่ในระบบนิเวศ โดยเฉพาะความสามารถที่จะทดแทนชนิดพันธุ์อื่น

5.2.4 ผลกระทบทางลบในลำดับที่สองหรือผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีใช่เป้าหมาย เป็นการประเมินผลที่จะเกิดขึ้นโดยไม่ได้ตั้งใจ (unintended effect) ของการปลดปล่อยพืชดัดแปลงพันธุกรรมสู่สิ่งแวดล้อม

5.3 การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหาร

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารจะใช้หลักการเทียบเท่า (substantial equivalence) ที่เสนอโดยองค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) (OECD, 1993) ทั้งนี้ หลักการเทียบเท่าจะเป็นหลักการที่ใช้เปรียบเทียบอาหารที่ได้จากจุลินทรีย์และพืชดัดแปลงพันธุกรรมว่ามีความปลอดภัย เทียบเท่ากับอาหารจากจุลินทรีย์หรือพืชเดิมที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ (traditional counterpart) (FAO/WHO, 2000) โดยในการประเมินความปลอดภัยด้านอาหาร จะต้องพิจารณาประเด็นต่างๆ (CODEX, 2003) ดังนี้

5.3.1 ความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดพิษ (toxicity) ของสารที่ถูกแสดงออก (expressed substance) การดัดแปลงพันธุกรรมอาจมีผลต่ออื่นของพืช เป็นผลให้เกิดการยับยั้งเมตาโบลิซึม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอาหาร และสารที่มีแนวโน้มเป็นพิษ (potentially toxic compound) (Twyman, 2004) หากพบมีสารใหม่เกิดขึ้น จะต้องทำการทดสอบทางพิษวิทยา โดยการพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี และหน้าที่ของสารใหม่ที่เกิดขึ้น รวมทั้ง วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่จะนำมาบริโภคได้ แต่หากสารใหม่นั้นเคยมีการบริโภคหรือเป็นสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง อาจไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบด้านพิษวิทยา

5.3.2 ความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดภูมิแพ้ (allergenicity) ของโปรตีน หากพบสารโปรตีนใหม่ที่เกิดจากการสอดแทรกยีน จะต้องได้รับการประเมินความเป็นไปได้ในการก่อภูมิแพ้ ด้วยวิธีการแบบสหวิทยาการ เป็นขั้นตอน และใช้เกณฑ์ในการพิจารณาหลายๆ เกณฑ์ร่วมกัน เนื่องจาก ยังไม่มีหลักเกณฑ์ใดหลักเกณฑ์หนึ่งที่เพียงพอต่อการทำนายการก่อสารภูมิแพ้ในปัจจุบัน

5.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในอาหาร (key components) โดยเฉพาะองค์ประกอบหลักที่พบในอาหาร และต้องทำการเปรียบเทียบกับพืชคู่แข่งเหมือนตามธรรมชาติที่มีการเจริญเติบโตและเก็บเกี่ยวในสภาวะเดียวกัน เพื่อลดปัญหาจากปัจจัยความผันแปรทางธรรมชาติ รวมทั้ง ต้องทำการเปรียบเทียบภายใต้สภาวะแวดล้อมในพื้นที่ต่างๆ ที่คาดว่าจะจะเป็นสภาวะที่มีการนำพืชตัดแปลงพันธุกรรมไปปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวจริงด้วย

5.3.4 สารเมตาโบไลต์ (metabolites) ซึ่งการตัดแปลงพันธุกรรมอาจส่งผลกระทบต่อระดับสารเมตาโบไลต์ในอาหาร จึงควรพิจารณาควรเป็นไปได้ในการสะสมสารเมตาโบไลต์ในปริมาณที่อาจมีผลเสียต่อสุขภาพมนุษย์ และวิเคราะห์ระดับสารเมตาโบไลต์ที่หลงเหลืออยู่ในอาหาร

5.3.5 กระบวนการแปรรูปเพื่อเป็นอาหาร (food processing) เป็นการพิจารณาผลจากกระบวนการแปรรูปอาหาร รวมทั้งการเตรียมในระดับครัวเรือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบในอาหารที่ได้จากพืชตัดแปลงพันธุกรรม

5.3.6 การเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการ (nutritional modification) จะต้องทำการประเมินทั้งในระดับปกติ และระดับสูงสุดของการบริโภค อีกทั้ง ต้องให้ความสำคัญต่อลักษณะเฉพาะทางสรีระวิทยาและความต้องการด้านการครองธาตุ (metabolism) ของกลุ่มประชากรต่างๆ เช่น ทารก เด็ก สตรีมีครรภ์และให้นมบุตร ผู้สูงอายุ และกลุ่มประชากรที่มีโรคเรื้อรังหรือระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ในการประเมินความปลอดภัยด้านอาหาร สิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณา คือ โปรตีนใหม่ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่สอดแทรกเข้าไปใหม่ในพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Delaney *et al.*, 2008) ซึ่งหากมีการสร้างโปรตีนใหม่เกิดขึ้น โปรตีนเหล่านั้นจะต้องได้รับการประเมินศักยภาพในการก่อภูมิแพ้ โดยพิจารณาในประเด็นต่างๆ ได้แก่ แหล่งที่มาของยีนที่แสดงออก ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ ปฏิกิริยาของโปรตีนใหม่กับ IgE antibody จากเซรัมของผู้เป็นภูมิแพ้ และความคงตัวของโปรตีนใหม่น้อย (Taylor, 2002) ทั้งนี้ การตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ทำได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล allergen ต่างๆ เช่น Food Allergy Research and Resource Program (<http://www.farrp.org>) SwissProt (<http://www.expasy.ch>) AllergenOnline Database (<http://allergenonline.org/databasefasta.shtml>) หรือ Allergome (<http://www.allergome.org>)

เป็นต้น (Kleter และ Peijnenburg, 2002) หากมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (sequence homology) กับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ (FAO/WHO, 2001) และมีการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนติดกันมากกว่า 8 ตัว เหมือนกับโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ให้ถือว่ามีโอกาสเป็นสารก่อภูมิแพ้ แต่หากโปรตีนที่แสดงออกจากยีนที่สอดคล้องเข้าไปนั้น ไม่ใช่โปรตีนใหม่ แต่เป็นโปรตีนที่เคยมีการศึกษาและใช้ประโยชน์มาแล้ว รวมถึงเป็นโปรตีนที่มีประวัติด้านความปลอดภัยในการใช้งานเป็นที่ยอมรับแล้ว สามารถใช้ข้อมูลเหล่านั้นเพื่อประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารของพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำการศึกษาอีกครั้ง

อย่างไรก็ดี แม้ว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะมีการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพอย่างเข้มงวดในทุกขั้นตอน แต่ยังคงมีความกังวลถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นโดยไม่ได้คาดหวัง (unintended effect) และผลกระทบในระยะยาว ผสมกับความก้าวหน้าของเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) จึงมีงานวิจัยที่มุ่งพัฒนาวิธีการใหม่เพื่อเปรียบเทียบความปลอดภัยระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมและพืชที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ การเปรียบเทียบจีโนม การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ที่ระดับ mRNA และระดับโปรตีน (Kuiper *et al.*, 2001)

6. โปรตีโอมิกส์ (proteomics)

โปรตีโอมิกส์เป็นการศึกษาโปรตีนทั้งหมด (โปรตีโอม) ที่มีอยู่ในเซลล์ที่จีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตแสดงออก (express) ณ เวลาหนึ่ง (Berkelman and Stenstedt, 1998) การศึกษาโปรตีโอมิกส์แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ การศึกษารูปแบบของโปรตีโอม (profile proteomics) การศึกษาหน้าที่ของโปรตีโอม (function proteomics) และการศึกษาโครงสร้างของโปรตีโอม (structure proteomics) (Figeys, 2003)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากโปรตีโอมิกส์สามารถนำไปใช้ได้อย่างหลากหลาย เมื่อใช้ร่วมกับศาสตร์ด้านอื่นๆ เช่น ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) จีโนมิกส์ (genomics) และ เคมี (chemistry) เป็นต้น (Michaud and Snyder, 2002) โดยเริ่มจากประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาโปรตีโอมิกส์เป็นการศึกษาแบบ multidisciplinary study ในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในยุคแรกเริ่มต้นด้วยประโยชน์ทางการแพทย์ ในการศึกษาหาเป้าหมายยา (drug target) ในการรักษาโรคต่างๆ ในมนุษย์ (Chanda and Caldwell, 2003; Hanash, 2003) เช่น มาเลเรีย และวัณโรค เป็นต้น (Smith, 2003) หรือใช้ในการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ในมนุษย์ เช่น โรคหัวใจ

(Loscalzo, 2003) โรคมะเร็ง (Zheng *et al.*, 2003) โรคเอดส์ (Tang *et al.*, 2002) และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's) (Castegna *et al.*, 2003) เป็นต้น

สำหรับการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ในพืช เริ่มมีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis* ถั่ว อัลฟัลฟา มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ข้าว และข้าวโพด เป็นต้น โดยให้ความสำคัญในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลง และการตอบสนองของการแสดงออกของโปรตีนพืช ต่อปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่มากระตุ้น นอกจากนั้น ยังมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโปรตีนโอมิกส์ในสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะการอยู่ร่วมกัน (symbiosis) และศึกษาโปรตีนโอมิกส์ต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) (Agrawal *et al.*, 2005)

Salekdeh *et al.* (2002) สามารถแยกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งในข้าว (*Oryza sativa* L.) สายพันธุ์ cv CT9993 และ cv IR62266 ได้จำนวน 42 ชนิด จากโปรตีนทั้งหมด 1,000 จุดบนเจล 2-D PAGE โดยในจำนวนนี้มีโปรตีนจำนวน 27 ชนิด ที่มีรูปแบบการตอบสนองแตกต่างกันในระหว่างสองสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม มีเพียงโปรตีนชนิดเดียว คือ chloroplast Cu-Zn superoxide dismutase ที่ทั้งสองสายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความแล้ง

Marques *et al.* (2001) ใช้โปรตีนโอมิกส์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชตระกูล Brassicaceae โดยใช้ Brassica 2 ชนิด ได้แก่ กระหล่ำปลี (cabbage) และมัสตาร์ด (mustards) เปรียบเทียบกับ *Arabidopsis* จาก 2 แหล่ง (ecotype) ได้แก่ Erecta และ Colombia โดยใช้ *B.napus* เป็นตัวเปรียบเทียบ สามารถคำนวณความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และสร้าง phylogenetic tree ได้จากความแตกต่างกันของจุดโปรตีนในพืชแต่ละชนิด

Corpillo *et al.* (2004) เริ่มศึกษาการประยุกต์ใช้โปรตีนโอมิกส์เพื่อประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยทำการศึกษเปรียบเทียบโปรตีนโอมระหว่างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวและจุดวงแหวนบนผลมะเขือเทศ (tomato spotted wilt virus) กับมะเขือเทศสายพันธุ์เดิมที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า โปรตีนหลักจากมะเขือเทศทั้งสองชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางชนิดและปริมาณ

Lehesranta *et al.* (2005) เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) พบจำนวนโปรตีนที่แตกต่างกัน 9 โปรตีน จาก 730 โปรตีนระหว่างมันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรมและมันฝรั่งสายพันธุ์เดิม ทั้งนี้ มีความแตกต่างของโปรตีนระหว่างสายพันธุ์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมกับสายพันธุ์ที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรมไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนของมันฝรั่งที่สายพันธุ์ต่างกัน และปลูกในพื้นที่ต่างกัน

7. การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์

การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ปกติจะทำได้โดยการใช้วิธี 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) ในการแยกโปรตีน ร่วมกับ การใช้ mass spectrometry (MS) เพื่อวิเคราะห์ peptide mass fingerprint (PMF) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Mascot (<http://www.matrixscience.com>) หรือ Mass search (<http://www.cbrg.ethz.ch/server/MassSearch.html>) (Twyman, 2004) เพื่อจำแนกชนิด หน้าที่ และคุณสมบัติของโปรตีน (Gygi *et al.*, 2006)

วิธี 2-D PAGE เป็นการแยกโปรตีนบนแผ่นเจล polyacrylamide ด้วยกระแสไฟฟ้า 2 ระนาบ โดยในระนาบแรกแยกโปรตีนตามความแตกต่างของ isoelectric points (pI) และทำการแยกในระนาบที่สอง โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี 2D-PAGE จะได้จุด (spot) ของโปรตีนบนแผ่นเจล สามารถตรวจเห็นได้ด้วยการย้อมสี (Fuchs *et al.*, 2005) สามารถย้อมสีโปรตีนได้หลายวิธี ได้แก่ Coomassie brilliant blue, silver staining และ fluorescence staining เป็นต้น หลังจากนั้น ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบเจล (image analysis) ที่แยกได้ด้วยวิธีเดียวกัน (Patton, 2002) แล้วเจาะแต่ละจุดของโปรตีนที่ให้ความแตกต่างออกมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้สายเปปไทด์ที่มีขนาดพอเหมาะในการนำไปวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry ต่อไป

mass spectrometry เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์จำแนกชนิดของโปรตีน โดยใช้วิธีการหาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อน นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งมีความไวและความแม่นยำสูงมาก (Lesk, 2005) การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry ชนิด Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF-MS) เป็นตรึงโปรตีนหรือเปปไทด์กับ

ผลึกของ matrix (crystalline matrix) และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีนให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน แล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้า โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) ได้เป็น m/z peak เรียงตัวกัน เรียกว่า peptide mass fingerprint (PMF) (Aebersold and Mann, 2003) ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละเปปไทด์ที่อยู่ในแต่ละโปรตีนตัวอย่างได้ นำไปสู่การค้นหาโดยเทียบกับสายเปปไทด์ในฐานข้อมูล เพื่อระบุชนิดของโปรตีน (Aebersold and Goodlett, 2001) ชนิดโปรตีนที่น่าจะเป็นที่สืบค้นได้ จะรายงานพร้อมค่า Mowse score ซึ่งเป็นค่าคะแนนความเหมือนที่คำนวณได้จากการเปรียบเทียบ m/z peak ของตัวอย่างกับ โปรตีนในฐานข้อมูล และชนิดของโปรตีนที่ค้นหาได้ จะเป็นชนิดเดียวกับโปรตีนที่ทำการศึกษาย่างมีนัยสำคัญสถิติที่ $p < 0.05$ จะต้องมียค่า Mowse score มากกว่า 65 (Butterfield *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ทดลอง

1.1 มะละกอสายพันธุ์แขกนวล

1.2 มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R₄ ซึ่งได้จากการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส Papaya ringspot virus (PRSV-CP) สายพันธุ์เชียงใหม่ (GenBank Accession number: DQ085856) เข้าสู่ somatic embryo ด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิด p2CMCP ที่มี *nptII* gene เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก (ภาพที่ 1) (นุชนาถ และคณะ, 2546) ปลูกมะละกอในถังซีเมนต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร ด้วยดินผสมที่มีส่วนผสมของดิน:ขี้เถ้า:แกลบ:ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 8:4:2:4 ภายใต้สภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (32 Mesh Netted House) กลุ่มวิจัยด้านพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์โปรตีน

2.1 เครื่อง Trans-blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

2.2 เครื่อง densitometer GS-710 (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

2.3 Immobiline DryStrip pH 3-10 NL ขนาด 18 เซนติเมตร (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

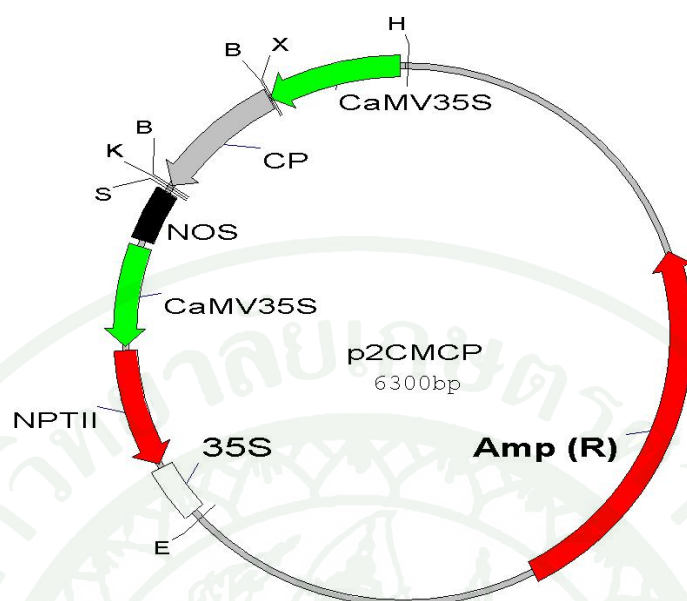
2.4 เครื่อง Ettan IPGphor II (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

2.5 เครื่อง Ettan DALTsix Electrophoresis Unit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

2.6 เครื่อง ImageMaster Scanner (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

2.7 โปรแกรมสำเร็จรูป ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

2.8 เครื่อง Ultraflex III Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF/TOF MS) (Bruker Daltonics, Massachusetts, UK)



ภาพที่ 1 พลาสมิด p2CMCP ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ (PRSV) สายพันธุ์เชียงใหม่ และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ *nptII* ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ มะละกอสายพันธุ์แขกนวล โดยวิธียิงอนุภาค (นุชนาด และคณะ, 2546)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีนบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

3.1 โปรแกรมสำหรับจำแนกชนิดของโปรตีนจาก peptide mass fingerprint

โปรแกรมจาก website [http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)

FORMVER= 2&SEARCH=PMF (ภาคผนวก)

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน ได้แก่ lysis buffer และ 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

4.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bradford (1976)

4.3 สารเคมีที่ใช้ย้อมเจลด้วยวิธีซิลเวอร์ ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Blume *et al.* (1987)

4.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)

4.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค 2-D PAGE ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tonge *et al.* (2001)

วิธีการ

1. การเตรียมต้นกล้ามะละกอและการเก็บตัวอย่าง

1.1 การเตรียมต้นกล้ามะละกอ

เพาะเมล็ดมะละกอคัดแปลงพันธุ์กรรม สายพันธุ์ 116/5 รุ่นที่ R₄ และมะละกอสายพันธุ์แขนงดั่งเดิมที่ไม่ได้รับการคัดแปลงพันธุ์กรรม ในดินผสมที่มี ดิน:ขี้เถ้า:กลบ:ปุ๋ยหมัก:ปุ๋ยมะพร้าว อัตราส่วน 6:4:2:4 จนต้นกล้ามะละกอมีใบจริงประมาณ 5 - 7 ใบ หรืออายุประมาณ 1 - 2

เดือน ทำการปลูกมะละกอในถังซีเมนต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร ประกอบด้วยดินผสม และปุ๋ยสูตรเดิม ภายใต้สภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (32 Mesh Netted House) ทำการรดน้ำวันละ 2 ครั้ง และให้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในช่วงบำรุงต้น และใช้ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ในช่วงเริ่มติดผล จำนวน 2 ครั้งต่อเดือน

1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม เพื่อวิเคราะห์โปรตีน โดยเก็บตัวอย่างมะละกอในระยะต่างๆ ดังนี้

1.2.1 ระยะต้นกล้า (seedling stage) เก็บตัวอย่างใบอ่อน (อายุ 5 วัน) ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ 116/5 และมะละกอพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้าอายุ 60 วัน

1.2.2 ระยะให้ผล เก็บตัวอย่าง ใบอ่อน (อายุ 5 วัน) ดอกตูม (ดอกข้างสมบูรณ์เพศ) ผลแก่ (มีแต้มน้ำ 25 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างเฉพาะเนื้อส่วนที่ใช้รับประทานไม่รวมส่วนเปลือก) และรากแขนงของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ 116/5 และมะละกอพันธุ์เดิม ที่อายุ 270 วัน

2. การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

2.1 การสกัดโปรตีน

นำตัวอย่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ 116/5 และมะละกอพันธุ์เดิมมาสกัดโปรตีนตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Westermeier and Naven (2002) โดยบดตัวอย่างจำนวน 3 กรัม ในโถรงบที่เติมน้ำไตรเจนเหลว สกัดโปรตีนด้วย Lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 2% IPG buffer 3 – 10) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) ปริมาณ 80 ไมโครลิตร มาทำความสะอาดตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้ด้วย 2-D Clean-Up Kit ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)

2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bradford (1976) ดังนี้ คูณสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองโดยทำควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine

serum albumin) โดยเจือจางให้มีปริมาณโปรตีน 0 – 10 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลาย Bradford's (0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% เอธิลแอลกอฮอล์ และ 85% w/v phosphoric acid) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 – 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้จากโปรตีนมาตรฐาน

3. การตรวจสอบโปรตีน PRSV-CP และโปรตีน NPTII ด้วยเทคนิค Western blot

3.1 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่แสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนของใบมะละกอปริมาณ 5 ไมโครกรัม มาแยกโปรตีนใน 15% SDS-PAGE บนเจลขนาด 7 เซนติเมตร ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้กระแสไฟที่ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, 100 โวลต์ 2 ชั่วโมง 30 นาที และ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining ตามวิธีการของ Blum *et al.* (1987) ดังนี้

3.3.1 ตรึงโปรตีนในแผ่นเจลแช่ในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 40 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก (acetic acid) 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.2 ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 30 % เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.3 ล้างด้วยน้ำ deionization จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3.3.4 ทำการ sensitization เจล ด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที

3.3.5 ล้างด้วยน้ำ deionization จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3.3.6 บ่มเจลในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.3.7 ล้างด้วยน้ำ deionization จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที

3.3.8 ล้างเจลด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมฟอร์มาลิน (formalin) 0.05 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าแถบของโปรตีนจะปรากฏบนเจลชัดเจน

3.3.9 ล้างด้วยสารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที เก็บแผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจดูขนาดและปริมาณของโปรตีนที่เคลื่อนที่ในเจลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.2 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

แยกโปรตีนตามขนาดโดย SDS-PAGE ใน 15% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, 100 โวลต์ 2 ชั่วโมง 30 นาที และ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเครื่อง Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cel (Bio-Rad Laboratories, California, USA) กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้น นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีโปรตีนตรึงอยู่ไปแช่ใน TBST buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) ที่เติม 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer เป็นเวลา 3 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ใน TBST buffer ที่มีแอนติซีรัมต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV ชนิด polyclonal ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยพืชสวนฯ พันธุ์สวนกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เจือจาง 1:1,000 และแอนติซีรัมต่อโปรตีน neomycin phosphotransferase (NPTII) ชนิด polyclonal (antibodies-online GmbH, Aachen, Germany) เจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วแช่ใน TBST buffer ที่มี alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-goat IgG (H+L) (Zymed Laboratories, California, USA) เจือจาง 1:10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 10x Nitroblue tetrazolium (NBT) 1 มิลลิลิตร และ 10x 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP) 1 มิลลิลิตร (Zymed Laboratories, California, USA) เจือจางใน sterile water 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยซับสเตรท เมื่อสังเกตเห็นการเกิดสีที่แถบโปรตีนต่างๆ ชัดเจนแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าความเข้มของแถบโปรตีนด้วยเครื่อง densitometer รุ่น BioRad GS-670 (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

4. การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค 2-D PAGE

เทคนิค 2-D PAGE เป็นการนำโปรตีนมาแยกตามความแตกต่างของค่า pI ในการแยก 1st – dimension และแยกตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลบน SDS-PAGE ในการแยก 2nd – dimension (Tonge *et al.*, 2001)

4.1 การแยกโปรตีนในระนาบที่ 1 (1st – dimension)

นำตัวอย่างโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอพันธุ์เดิมที่สกัดได้จากข้อ 2 โดยใช้โปรตีนจำนวน 150 ไมโครกรัม มาทำการแยกระนาบที่ 1 (1st – dimension) โดยวิธี isoelectric focusing (IEF) ตามค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งค่า pI เป็นค่า pH ที่โปรตีนมีประจุรวมเป็นศูนย์ ทำให้โปรตีนไม่เคลื่อนต่อไปในเจลที่มีกระแสไฟฟ้าผ่าน ทั้งนี้ ค่า pI ของโปรตีนแต่ละตัวจะมีค่าเฉพาะตัวในโปรตีนแต่ละชนิด ทำการแยกโดยใช้แผ่นเจลสำเร็จรูป Immobiline™ DryStrip pH 3-10 ชนิด immobilized pH gradient gel (IPG) ขนาด 18 เซนติเมตร ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor II (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) โดยมีวิธีการ ดังนี้

4.1.1 นำแผ่นเจลสำเร็จรูป Immobiline™ DryStrip pH 3-10 ขนาด 18 เซนติเมตร มาทำการแช่เพื่อให้แผ่นเจลคืนสภาพ ด้วยสารละลาย rehydration buffer 150 ไมโครลิตร ในภาชนะ Reswelling tray เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.1.2 ประกอบถาด manifold บนเครื่อง Ettan IPGphor II นำแผ่นเจล Immobiline™ DryStrip ที่คืนสภาพแล้วจากข้อ 3.1.1 วางบนถาด manifold ประกอบ cup loading และอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการใส่ตัวอย่าง

4.1.3 ใส่ตัวอย่างโปรตีนมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่สกัดได้จากข้อ 2 ในปริมาณ 15 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างลงใน loading cup ปิดทับด้วย Dry strip cover fluid

4.1.4 การแยกโปรตีนในระนาบที่ 1 ด้วยความแตกต่างของ isoelectric point โดยใช้สภาวะ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Step and Hold	300 โวลต์	600 Vh.
ขั้นที่ 2	Step and Hold	500 โวลต์	500 Vh.
ขั้นที่ 3	Step and Hold	1,000 โวลต์	1,000 Vh.
ขั้นที่ 4	Step and Hold	8,000 โวลต์	14,500 Vh.
ขั้นที่ 5	Gradient	5,000 โวลต์	20,000 Vh.
ขั้นที่ 6	Step and Hold	500 โวลต์	3,000 Vh.

4.2 การแยกโปรตีนระดับที่ 2 (2nd – dimension) โดยน้ำหนักโมเลกุล

ทำการแยกโปรตีนในระนาบที่ 2 (2nd - dimension) ตามน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก โดยมีวิธีการ ดังนี้

4.2.1 นำแผ่นเจล Immobiline™ DryStrip ที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทำการปรับสภาพ โดยแช่ในสารละลาย equilibration buffer (2 % SDS, 50 mM tris-HCl pH 8.6, 6M urea, 30% (v/v) glycerol, 0.002% bromophenol blue) ที่มี DTT 100 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที

4.2.2 นำ Immobiline™ DryStrip จากข้อ 3.2.1 มาทำการ equilibration อีกครั้งด้วย สารละลาย equilibration buffer ที่เติม iodoacetamide 250 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อแผ่นเจล เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด

4.2.3 เตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 12.5% ความหนา 1.5 มิลลิเมตร ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Berkelman and Stenstedt (1998)

4.2.4 วาง Immobiline™ DryStrip จากข้อ 4.2.2 ลงในช่องระหว่างกระจกบน polyacrylamide gel ปิดทับด้วย agarose gel นำไปแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าตรง (D.C. power supply) ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 15 มิลลิแอมป์ต่อเจล เป็นเวลา 15 นาที และตามด้วย 40 มิลลิแอมป์ต่อเจล เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

4.3 การย้อมสีเจล

นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยวิธี silver staining โดยดัดแปลงจากวิธีของ Blum *et al.* (1987)

ดั่งข้อ 3.1

5. การเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนโอมิกส์

นำแผ่นเจลที่ย้อมโปรตีนด้วยวิธี silver staining ตรวจจุดโปรตีนด้วยเครื่อง ImageMaster Scanner นำภาพที่สแกนได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) โดยการใช้ค่า factor ดังนี้ smooth 2, min area 25 และ saliency 10 (ภาคผนวก) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของจุดโปรตีนในเจลของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอพันธุ์เดิม นำจุดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิม ไประบุชนิดและตรวจสอบคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆ ต่อไป

6. การตรวจสอบคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนที่แตกต่างด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF-MS

6.1 การวิเคราะห์มวลเปปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF-MS

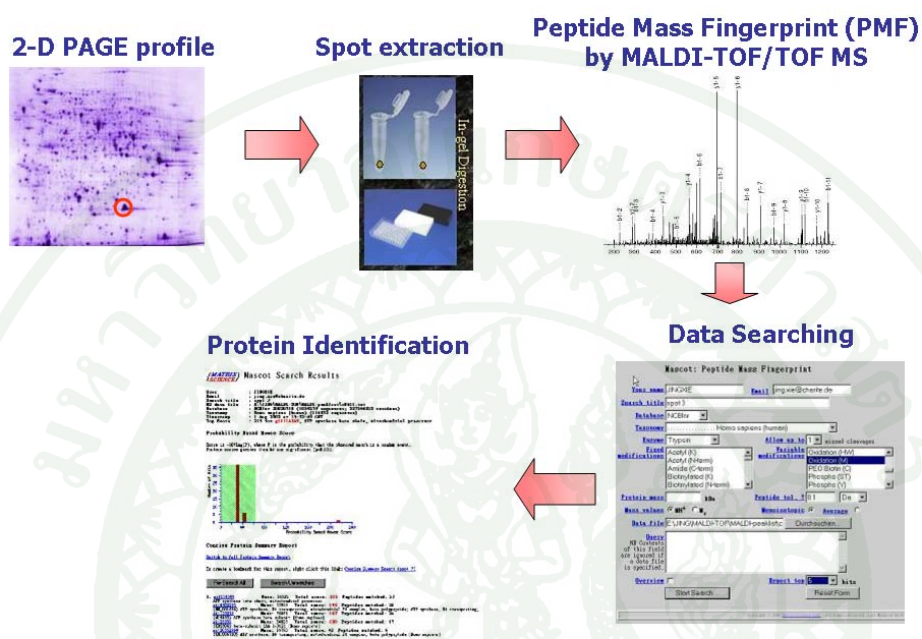
6.1.1 การย่อยโปรตีนภายในก้อนเจล (In-gel digestion) เจาะแต่ละจุดโปรตีนบนแผ่นเจลที่แสดงออกแตกต่างระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอพันธุ์เดิมออกมาทำการล้างสีย้อมด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยแช่ในสาร acetonitrile เป็นเวลา 5 นาที และย่อยพันธะ disulfide ด้วย Dithiothreitol (DTT) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมหมู่อัลคิลที่ปลายกรดอะมิโนซิสเทอีนด้วย Iodoacetamide นาน 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วย่อยแต่ละจุดของโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) 10 นาโนกรัม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น สกัดเปปไทด์ด้วย acetonitrile ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ใน Trifluoroacetic acid (TFA) 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสิ้น 3 ครั้ง

6.1.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์มวลเปปไทด์ (Peptide Mass Fingerprint) ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF ผสมตัวอย่างเปปไทด์ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร กับ α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) หรือ 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB) หยดใส่ MALDI

anchorchip target plate รวมนตัวอย่างแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultraflex III MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Massachusetts, UK) ใช้แสงเลเซอร์ในโตรเจน ขนาดคลื่นแสง 337 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของแต่ละเปปไทด์ ทำให้ได้ peptide mass fingerprint (PMF) นำ PMF เข้าไปค้นหาเปรียบเทียบกับโปรไฟล์ในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT (www.matrixscience.com) เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน (ภาคผนวก) จากนั้น นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ไปตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ทำได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 ของ Food Allergy Research and Resource Program (<http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>) เลือกโปรแกรมตรวจสอบกับโปรตีนหรือเปปไทด์ก่อภูมิแพ้โดยตั้งค่าพิจารณาความเหมือนกับโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีในฐานข้อมูลต้องมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป และต้องมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับโปรตีนหรือเปปไทด์ก่อภูมิแพ้ติดต่อกันมากกว่า 8 ตัว ตามมาตรฐานของ CODEX (Codex, 2003) จึงถือว่ามีความสำคัญ (ภาคผนวก) สรุปขั้นตอนการวิจัยจากข้อ 4 – 6 ดังภาพที่ 2

6.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี *de novo* peptide sequencing

คัดเลือก peak ของ PMF ที่มีค่าความเข้ม (intensity) ของอัตราส่วน mass-to-charge (m/z) สูงสุดสามอันดับแรก มาแตกเป็นอนุพันธ์เล็กๆ ด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry ได้เป็น MS-MS spectra และนำไปค้นหาเปรียบเทียบกับโปรไฟล์ในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT อีกครั้ง จากนั้น วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Flex-analysis (Bruker Daltonics, Massachusetts, UK) จากนั้น นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ไปตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ทำได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 ของ Food Allergy Research and Resource Program (<http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>) เลือกตรวจสอบกับโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ก่อภูมิแพ้ในฐานข้อมูล และใช้ข้อกำหนดให้มีความเหมือนมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป และมีการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนที่เหมือนกับสารก่อภูมิแพ้ติดต่อกันมากกว่า 8 ตัว ตามมาตรฐานของ CODEX



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค 2-D PAGE และ MALDI-TOF/TOF MS

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การสกัดโปรตีนมะละกอ

หลังจากปลูกมะละกอแยกแวนดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R₄ และมะละกอสายพันธุ์แยกแวนดัดแปลงพันธุกรรมเดิม ในโรงเรือนจำนวนอย่างละ 5 ต้น เก็บตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของมะละกอในสองระยะการเจริญเติบโต โดยเก็บใบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอสายพันธุ์เดิม ในระยะต้นกล้าอายุ 60 วัน หลังปลูก และทำการเก็บตัวอย่างใบ ดอกตูม ผลแก่ และราก ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอสายพันธุ์เดิม ในระยะผลแก่ ที่อายุ 270 วัน หลังปลูก นำตัวอย่างส่วนใบในระยะต้นกล้า และใบ ดอก ผล และรากในระยะให้ผล สกัดโปรตีนด้วย Lysis buffer และทำให้บริสุทธิ์ด้วย 2-D Clean-Up Kit พบว่า สารละลายโปรตีนจากส่วนต่างๆ ของมะละกอมีลักษณะเป็นของเหลวใสเหมือนกันในทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นตรวจวัดปริมาณของโปรตีนตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bradford (1976) ของแต่ละตัวอย่าง แล้วจึงทำการรวมตัวอย่างทั้งสามซ้ำของโปรตีนที่สกัดได้ และวัดปริมาณโปรตีนอีกครั้ง พบว่า โปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างใบในระยะให้ผลมีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ใบในระยะต้นกล้า ดอก ผลแก่ และราก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้ในตัวอย่างของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R₄ และมะละกอแขกนวลสายพันธุ์เดิม

ระยะพืช	ส่วนที่เก็บตัวอย่าง	น้ำหนักสดตัวอย่างพืช (กรัม)	ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (total protein) ที่สกัดได้ (มิลลิกรัม)	
			มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม	มะละกอสายพันธุ์เดิม
ระยะต้นกล้า (อายุ 60 วัน)	ใบ	3.0	15.70 ± 1.43	14.28 ± 1.53
ระยะให้ผล (อายุ 270 วัน)	ใบ	3.0	16.40 ± 0.20	16.17 ± 1.09
	ดอก	3.0	15.80 ± 0.56	14.60 ± 0.70
	ผลแก่	3.0	5.84 ± 1.19	4.76 ± 0.80
	ราก	3.0	5.78 ± 0.22	4.90 ± 0.85

2. การตรวจสอบโปรตีน PRSV-CP และโปรตีน NPTII ด้วยเทคนิค Western blot

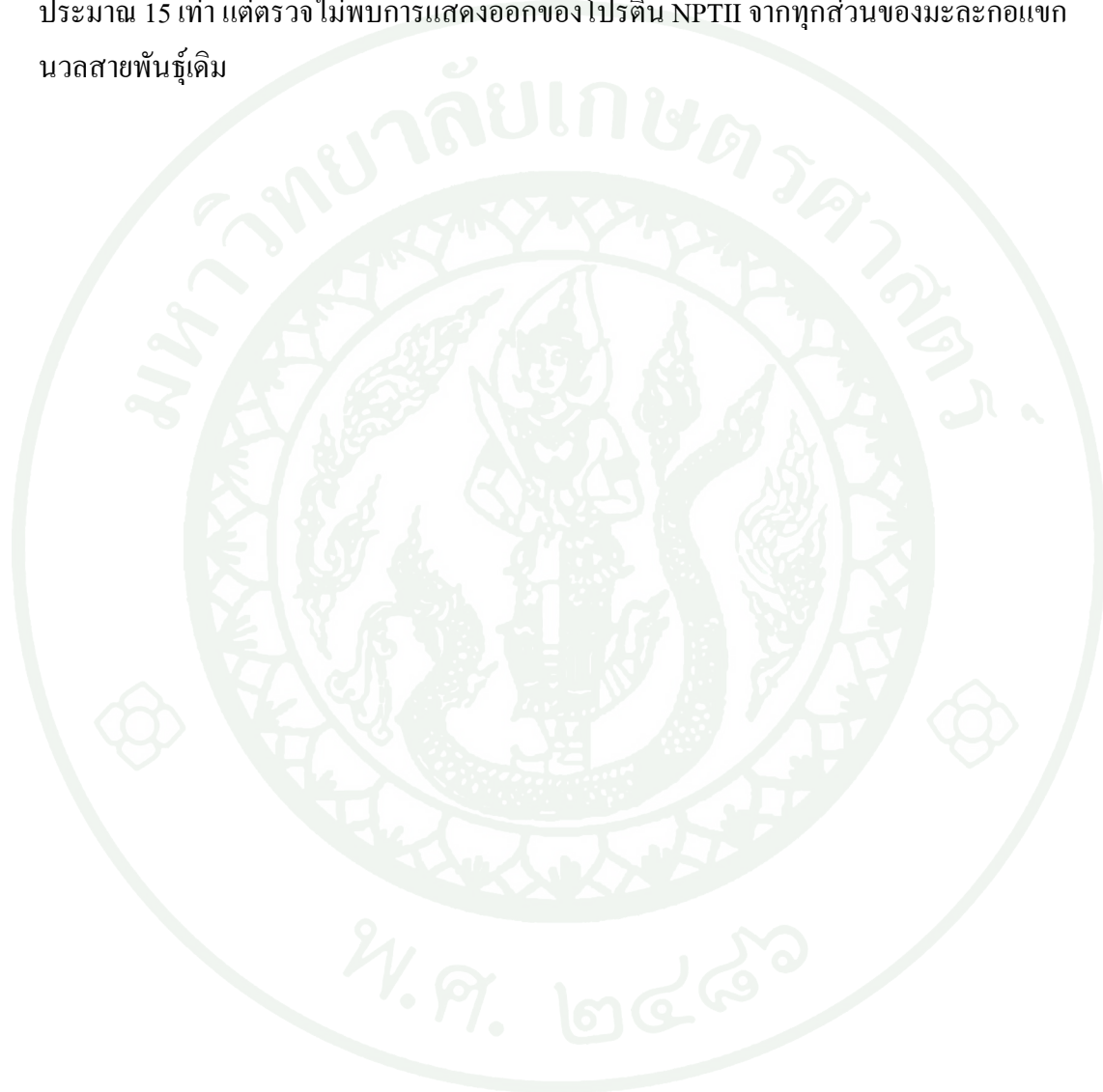
2.1 การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

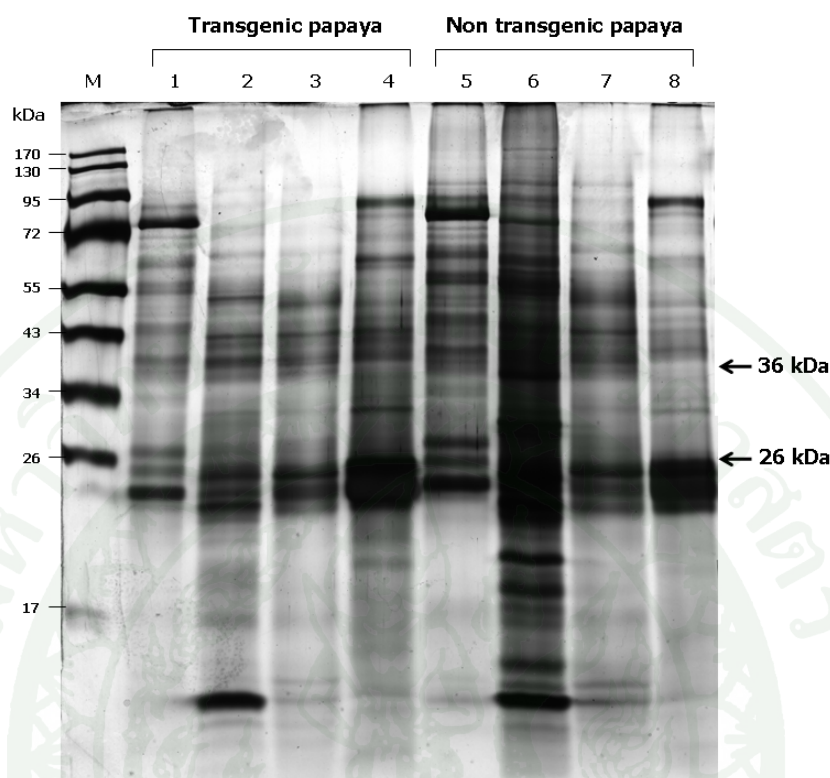
เมื่อปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R₄ และมะละกอสายพันธุ์เดิมภายในสภาวะโรงเรือน เก็บตัวอย่างใบของต้นกล้า อายุ 60 วัน และเก็บตัวอย่างของใบ ดอก ผลแก่ และรากของมะละกออายุ 270 วัน มาตรวจสอบแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE ขนาด 7 เซนติเมตร ตามวิธีของ Laemmli (1970) และย้อมสีด้วยวิธี silver staining ตามวิธีของ Blum *et al.* (1999) พบว่า มีโปรตีนหลายชนิดกระจายตัวทั่วเจล แบบแผนการกระจายตัวของโปรตีนในใบ ดอก ผล และรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมมีความคล้ายคลึงกับมะละกอสายพันธุ์เดิม เมื่อดูด้วยสายตา ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4 ในตัวอย่างของใบ ดอก และผล สามารถตรวจพบโปรตีนขนาดประมาณ 30 – 36 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดมวลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV (Hema และ Prasad, 2004) และพบโปรตีนขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดใกล้เคียงกับขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีน neomycin phosphotransferase (NPTII) (Cucu *et al.*, 2002) ดังภาพที่ 3

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV และโปรตีน NPTII ด้วยวิธี Western blot

การตรวจสอบชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติซีรัมต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เจือจาง 1:1,000 และแอนติซีรัมต่อโปรตีน NPTII (antibodies-online GmbH, Aachen, Germany) เจือจาง 1:10,000 ซึ่งแอนติซีรัมทั้งสองเป็นแอนติบอดีชนิด polyclonal ที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย พบว่าในทุกตัวอย่างของทั้งมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมไม่พบสัญญาณสีม่วงน้ำเงินตรงแถบโปรตีนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในขณะที่ positive control ที่เป็นโปรตีนจากใบมะละกอพันธุ์เดิมที่ติดไวรัสใบด่างวงแหวนพบสัญญาณสีม่วงน้ำเงินตรงแถบโปรตีนจำนวน 1 แถบ ที่ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5) สำหรับการตรวจสอบโปรตีน NPTII พบว่า ในทุกตัวอย่างของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R₄ มีสัญญาณสีม่วงน้ำเงินตรงแถบโปรตีนขนาดประมาณ 26

กิโลดาลตันของโปรตีน NPTII แต่ไม่พบสัญญาณดังกล่าวในตัวอย่างของมะละกอสายพันธุ์เดิม เมื่อตรวจสอบความหนาของแถบโปรตีนที่ปรากฏด้วยเครื่อง densitometer พบสัญญาณการแสดงออกของโปรตีน NPTII หนามากที่สุดในตัวอย่างในระยะต้นกล้า รองลงมา ได้แก่ ในตัวอย่างในระยะให้ผล ผลแก่และดอก ตามลำดับ (ภาพที่ 6 และ 7) โดยในใบมีการแสดงออกมากกว่าในผล ประมาณ 15 เท่า แต่ตรวจไม่พบการแสดงออกของโปรตีน NPTII จากทุกส่วนของมะละกอแขก นวลสายพันธุ์เดิม





ภาพที่ 3 การตรวจแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อใบ ดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วยวิธี silver staining

ช่อง M: Prestained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas)

ช่องที่ 1: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 2: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 3: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

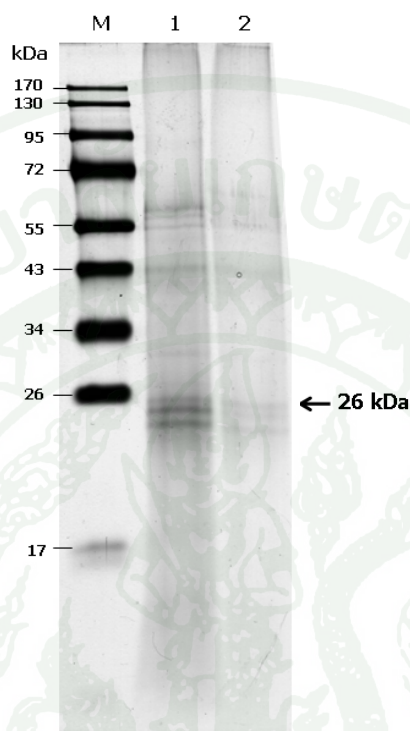
ช่องที่ 4: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 5: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 6: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 7: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 8: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

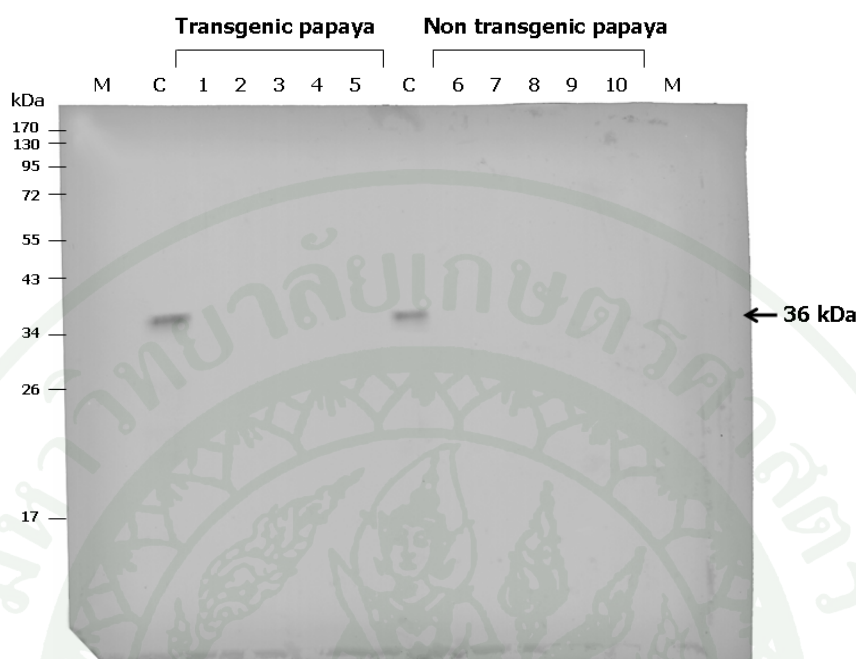


ภาพที่ 4 การตรวจแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อส่วนรากของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วยวิธี silver staining

ช่อง M: Prestained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas)

ช่องที่ 1: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 2: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน



ภาพที่ 5 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในตัวอย่างใบ ดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และ มะละกอสายพันธุ์เดิม ด้วยเทคนิค Western blot

ช่อง M: Prestained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas)

ช่อง C : positive control, โปรตีนจากใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่ติดไวรัสใบด่างวงแหวน

ช่องที่ 1: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 2: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 3: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 4: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 5: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

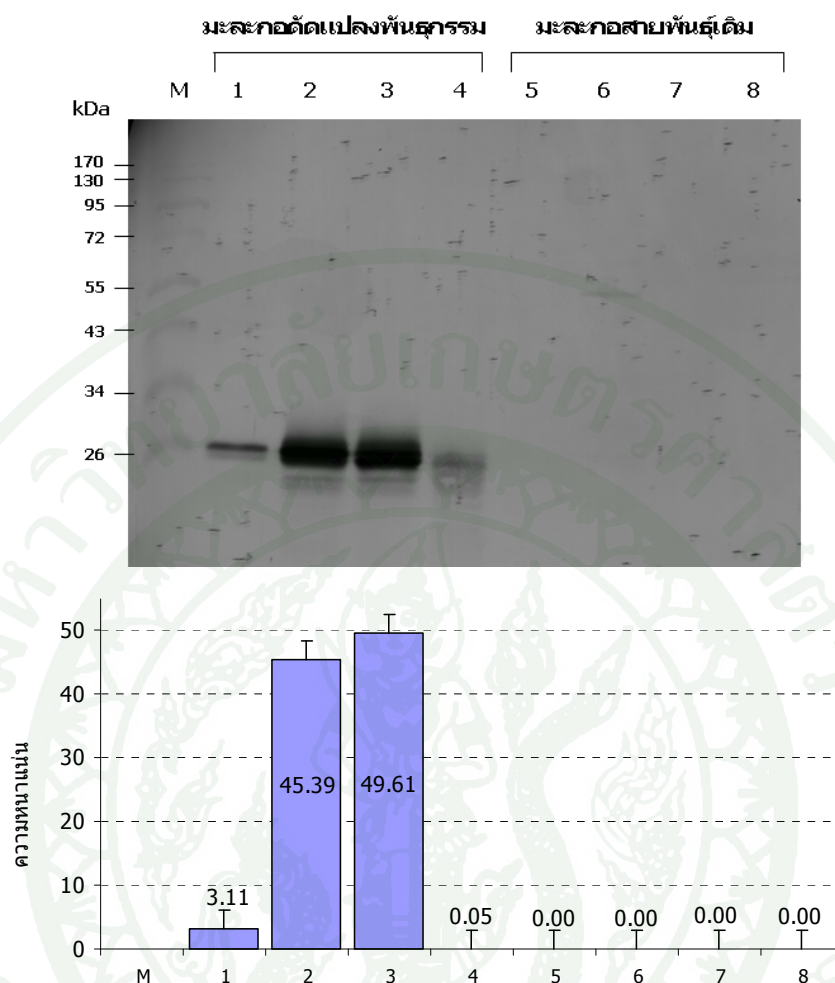
ช่องที่ 6: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 7: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 8: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 9: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 10: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน



ภาพที่ 6 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase โดยวิธี Western blot และตรวจสอบความเข้มของแถบสัญญาณด้วยวิธี densitometer ในตัวอย่างใบดอก และผลแก่ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอสายพันธุ์เดิม

ช่อง M: Prestained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas)

ช่องที่ 1: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 2: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 3: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

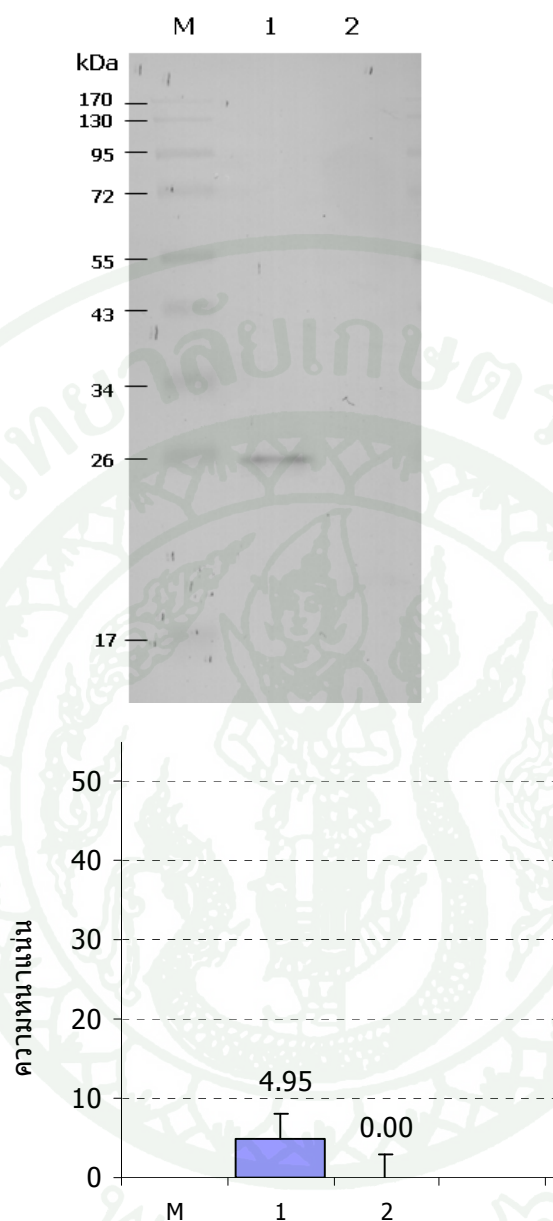
ช่องที่ 4: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 5: โปรตีนที่แยกจากผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 6: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน

ช่องที่ 7: โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน

ช่องที่ 8: โปรตีนที่แยกจากดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล อายุ 270 วัน



ภาพที่ 7 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase โดยวิธี

Western blot และตรวจสอบความเข้มของแถบสัญญาณด้วยวิธี densitometer ในตัวอย่าง
รากของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน และมะละกอ
สายพันธุ์เดิม

ช่อง M: Prestained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas)

ช่องที่ 1: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล

ช่องที่ 2: โปรตีนที่แยกจากรากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล

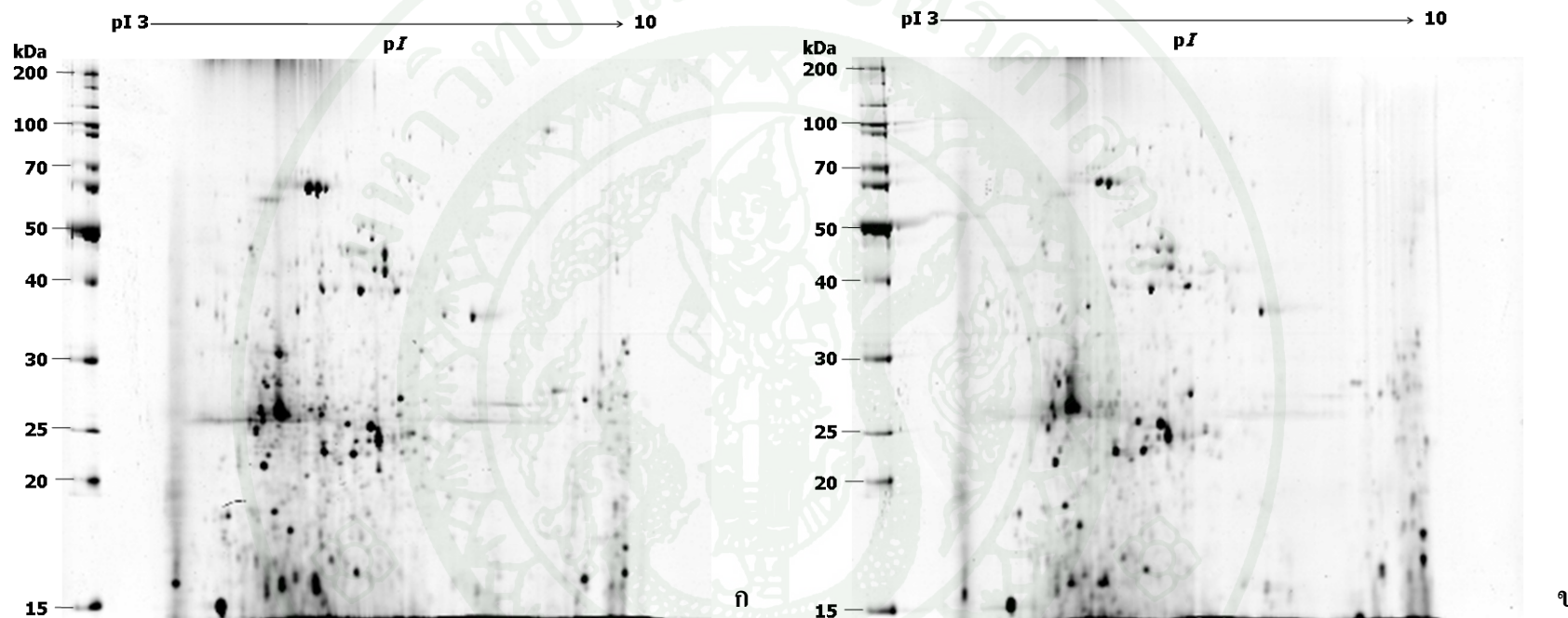
3. การตรวจสอบโปรตีนโอมิกส์ด้วยเทคนิค 2-D PAGE และการเปรียบเทียบความแตกต่าง

ความแตกต่างของโปรตีนโอมิกส์จะสะท้อนการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและเมตาบอลิซึมในฤดูปลูกที่ 2 เมื่อแยกด้วย Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร ย้อมโปรตีนด้วยวิธี silver staining และวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 โดยใช้ค่า factor ดังนี้ smooth 2, min area 25 และ saliency 10 (ภาคผนวก) เปรียบเทียบความแตกต่างของจุดโปรตีนในเจลของเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม โดยคัดเลือกจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างจากการพิจารณาใน 3 ปัจจัย ได้แก่ ค่าทางสถิติของ t-test ค่า histogram และภาพสามมิติของจุดโปรตีน ความแตกต่างระหว่างจุดโปรตีนระหว่างเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม ดังนี้

3.1 ระยะต้นกล้า

3.1.1 ใบ

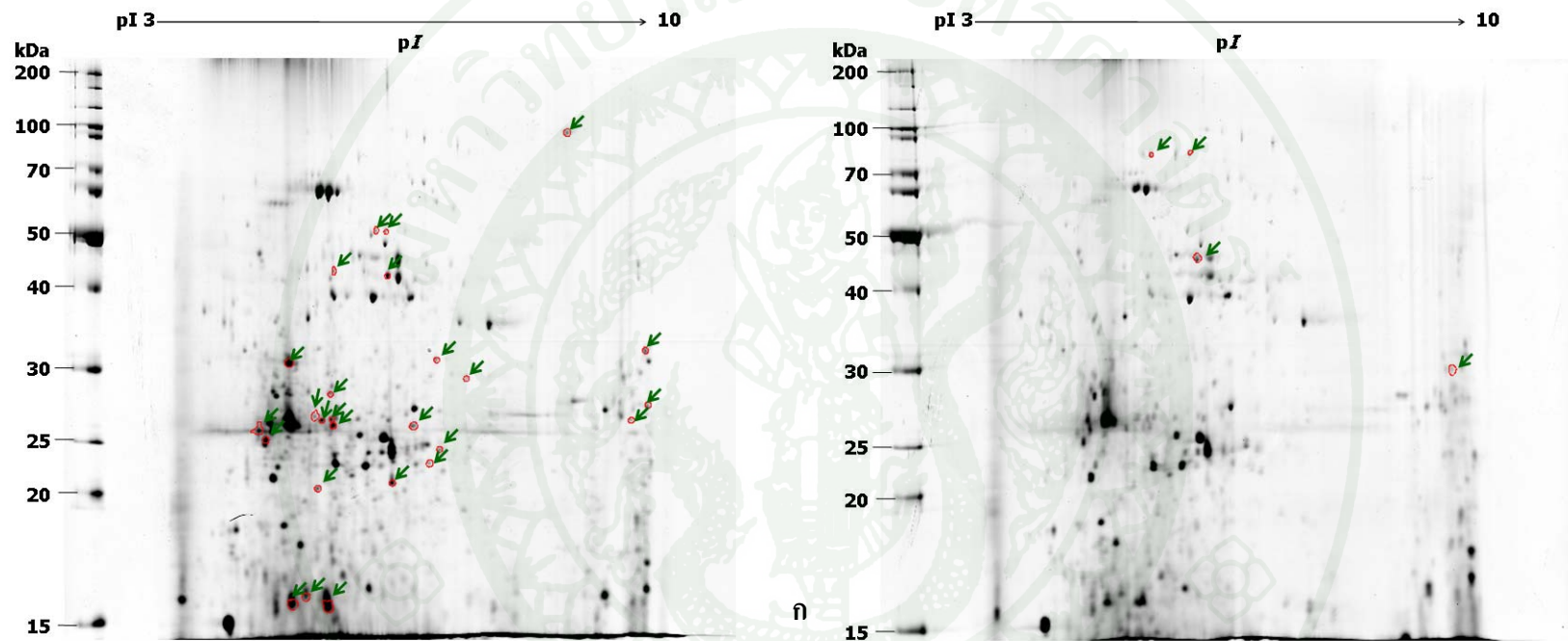
ใบเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึมระยะต้นกล้ามีจำนวนจุดของโปรตีน 340 จุด ส่วนใบเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึมในระยะเดียวกันมีจำนวนจุดของโปรตีน 292 จุด ดังภาพที่ 8 เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) พบว่า มีจุดโปรตีนของเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึมที่เหมือนกับโปรตีนของเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม 94.46 เปอร์เซ็นต์ มีจุดโปรตีนที่พบในเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม แต่ไม่พบในเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม จำนวน 26 จุด (ภาพที่ 9 ก) และมีจุดโปรตีนที่พบในเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม แต่ไม่พบในเมตาบอลิซึมและเมตาบอลิซึม จำนวน 4 จุด (ภาพที่ 9 ข)



ภาพที่ 8 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของไข่มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ข

ภาพที่ 9 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง (ครี) บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของไบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม

3.2 ระยะให้ผล

3.2.1 ใบ

ใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะให้ผลมีจำนวนจุดของโปรตีน 925 จุด ส่วนใบมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะเดียวกันมีจำนวนจุดของโปรตีน 968 จุด ดังภาพที่ 10 เมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) พบว่า มีจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เหมือนกับโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 98.72 เปอร์เซ็นต์ มีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 13 จุด (ภาพที่ 11 ก) และมีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม แต่ไม่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 16 จุดโปรตีนที่แตกต่างทั้งหมดระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิม แสดงในภาพที่ 11 ข

3.2.2 ดอก

ดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะให้ผลมีจำนวนจุดของโปรตีน 945 จุด ส่วนดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมระยะเดียวกันมีจำนวนจุดของโปรตีน 929 จุด ดังภาพที่ 12 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) พบว่า มีจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เหมือนกับโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม 97.24 เปอร์เซ็นต์ มีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 20 จุด (ภาพที่ 13 ก) และมีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม แต่ไม่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 17 จุดโปรตีนที่แตกต่างทั้งหมดระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิม แสดงในภาพที่ 13 ข

3.2.3 ผลแก่

ผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะให้ผลมีจำนวนจุดของโปรตีน 940 จุด ส่วนผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะเดียวกันมีจำนวนจุดของโปรตีน 901 จุด ดังภาพที่ 14 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) พบว่า มีจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เหมือนกับ

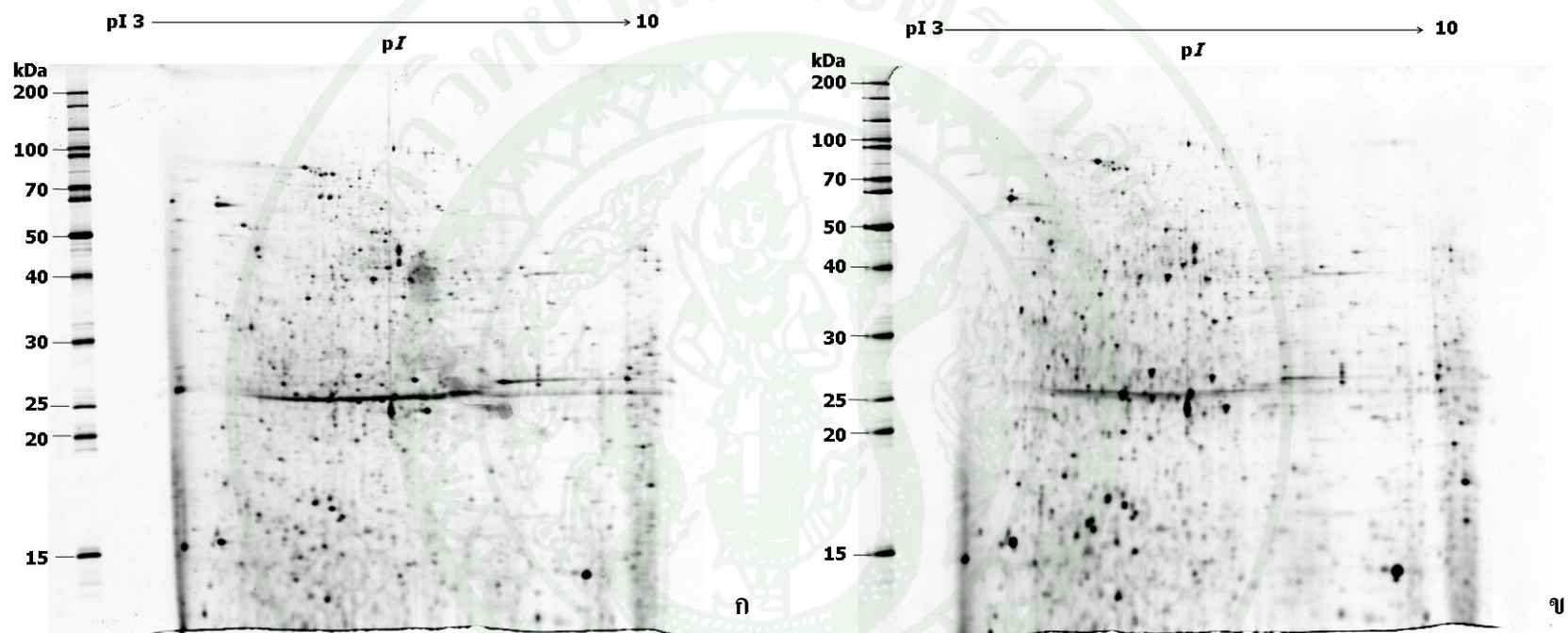
โปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 96.72 เปอร์เซ็นต์ มีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 25 จุด (ภาพที่ 15 ก) และมีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม แต่ไม่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 31 จุดโปรตีนที่แตกต่างทั้งหมดระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิม แสดงในภาพที่ 15 ข

3.2.4 ราก

รากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะให้ผลมีจำนวนจุดของโปรตีน 765 จุด ส่วนรากมะละกอสายพันธุ์เดิมระยะเดียวกันมีจำนวนจุดของโปรตีน 753 จุด ดังภาพที่ 16 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) พบว่า มีจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่เหมือนกับโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 96.46 เปอร์เซ็นต์ มีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม แต่ไม่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 29 จุด (ภาพที่ 17 ก) และมีจุดโปรตีนที่พบในมะละกอสายพันธุ์เดิม แต่ไม่พบในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 11 จุดโปรตีนที่แตกต่างทั้งหมดระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิม แสดงในภาพที่ 17 ข

3.3 สรุปการเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนโอมิกส์ด้วย Gel strip 18 เซนติเมตร

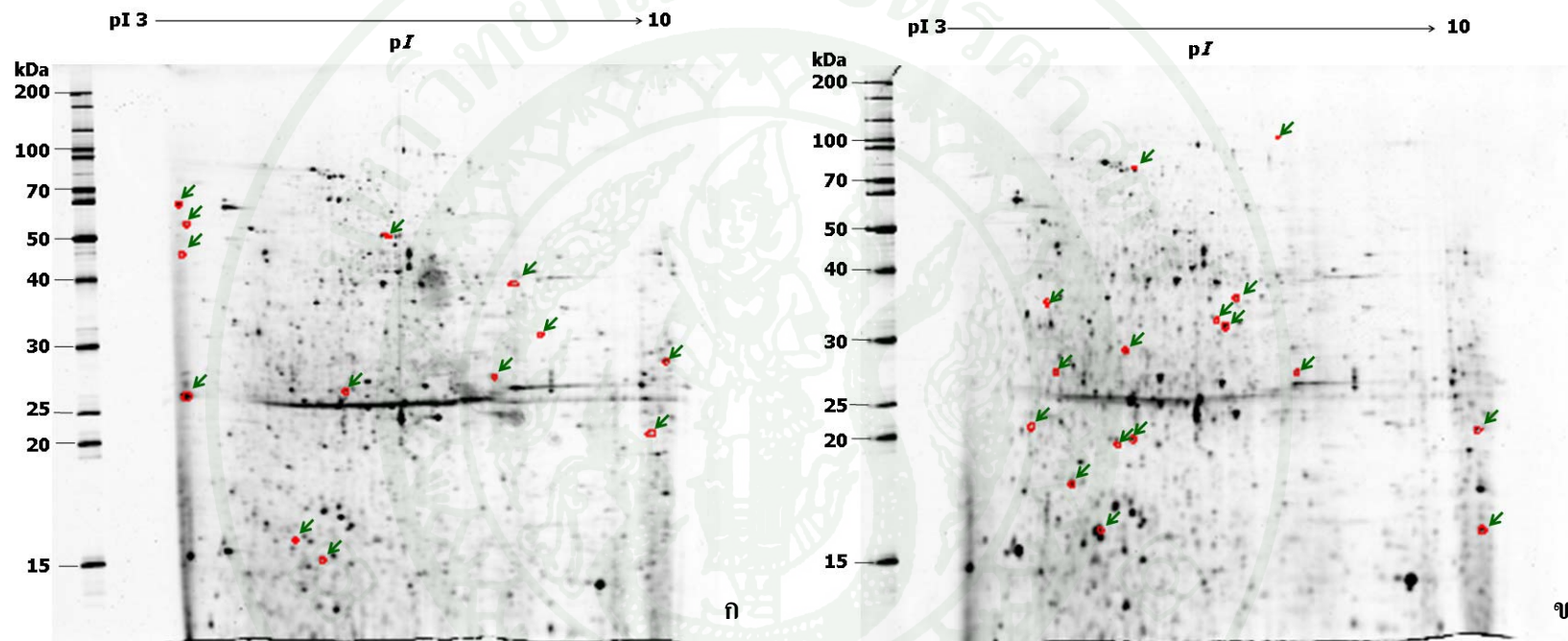
การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนโอมของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมจากส่วนต่างๆ ของต้นมะละกอ ด้วยการแยกโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้สายตา พบว่าไม่แตกต่างในรูปแบบของโปรตีน (protein profile) ของมะละกอทั้งสอง แต่เมื่อวิเคราะห์ผลโดยละเอียด โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5 พบว่ามีความเหมือนกันอยู่ในช่วง 94.46 – 98.72 เปอร์เซ็นต์ โดยพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิมมากที่สุดในส่วนโซนของโปรตีนให้ผล รองลงมาได้แก่ ดอก ผลแก่ ราก และใบในระยะต้นกล้า ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 2



ภาพที่ 10 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

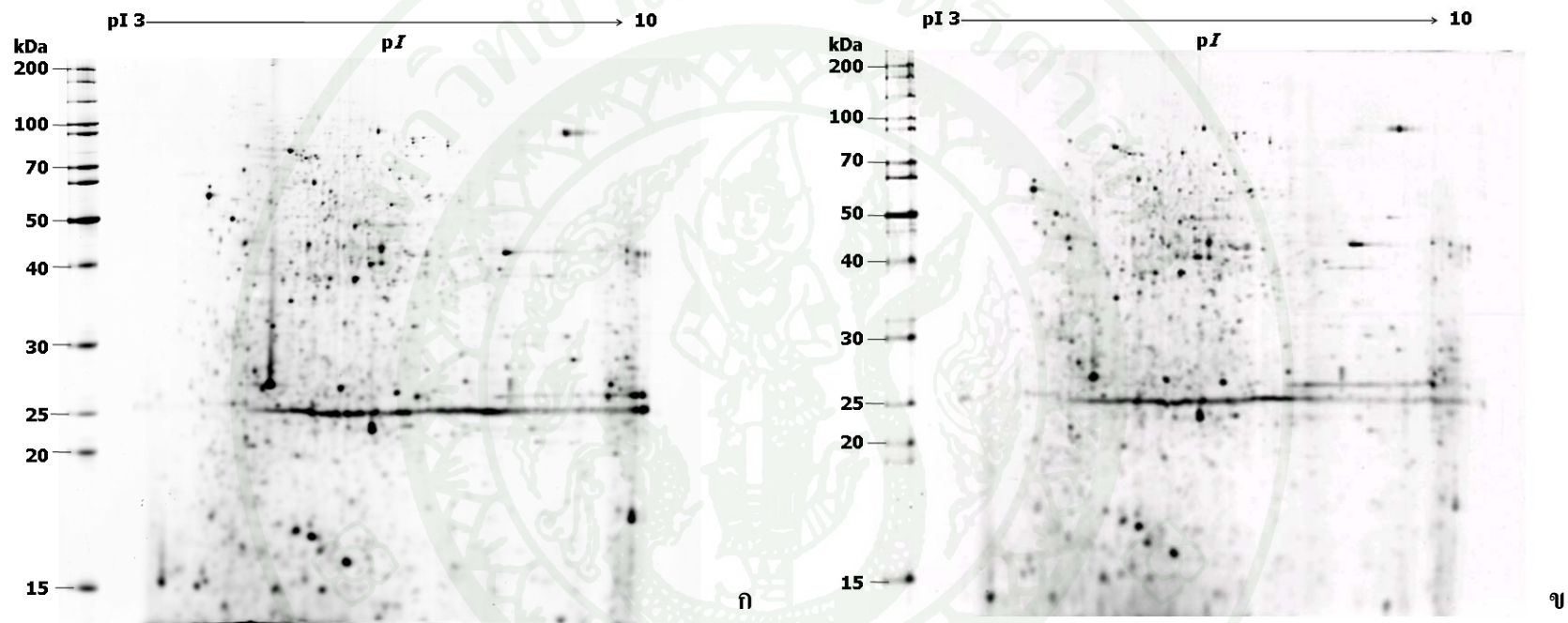
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 11 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง (ครี) บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

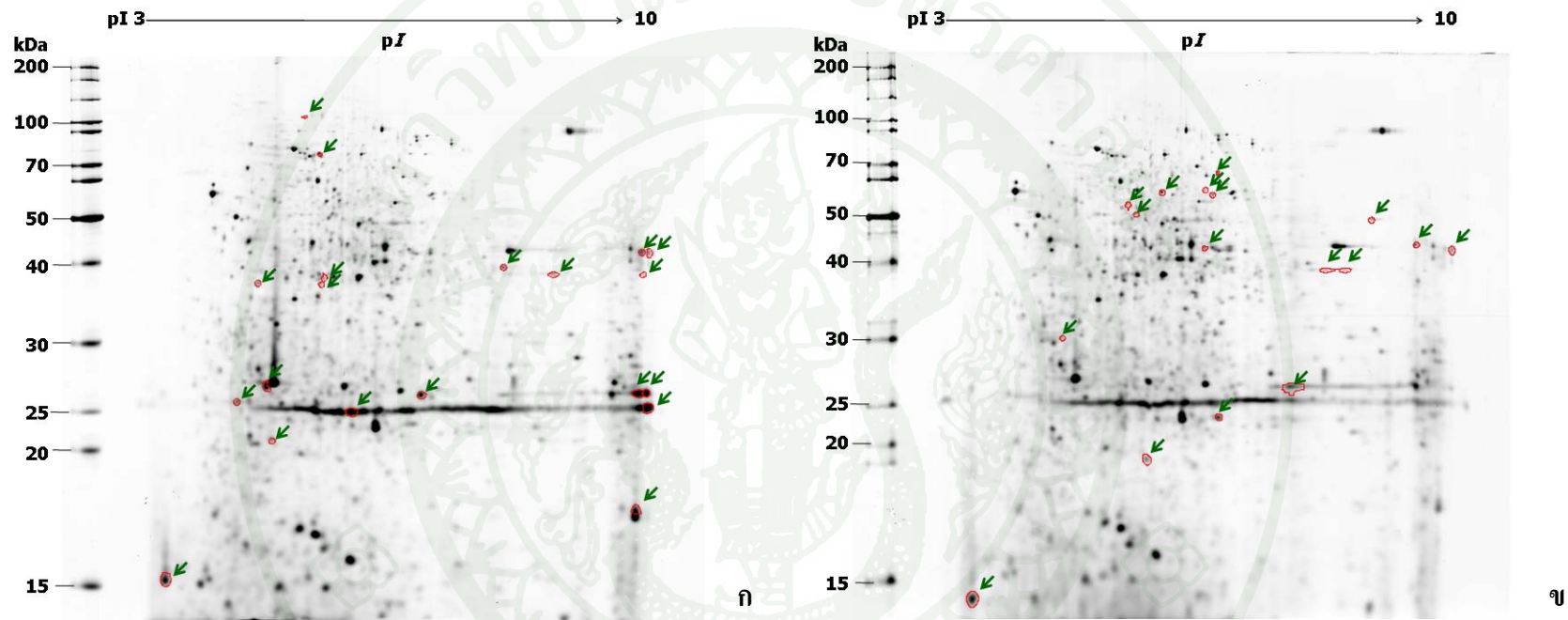
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 12 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของดอกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

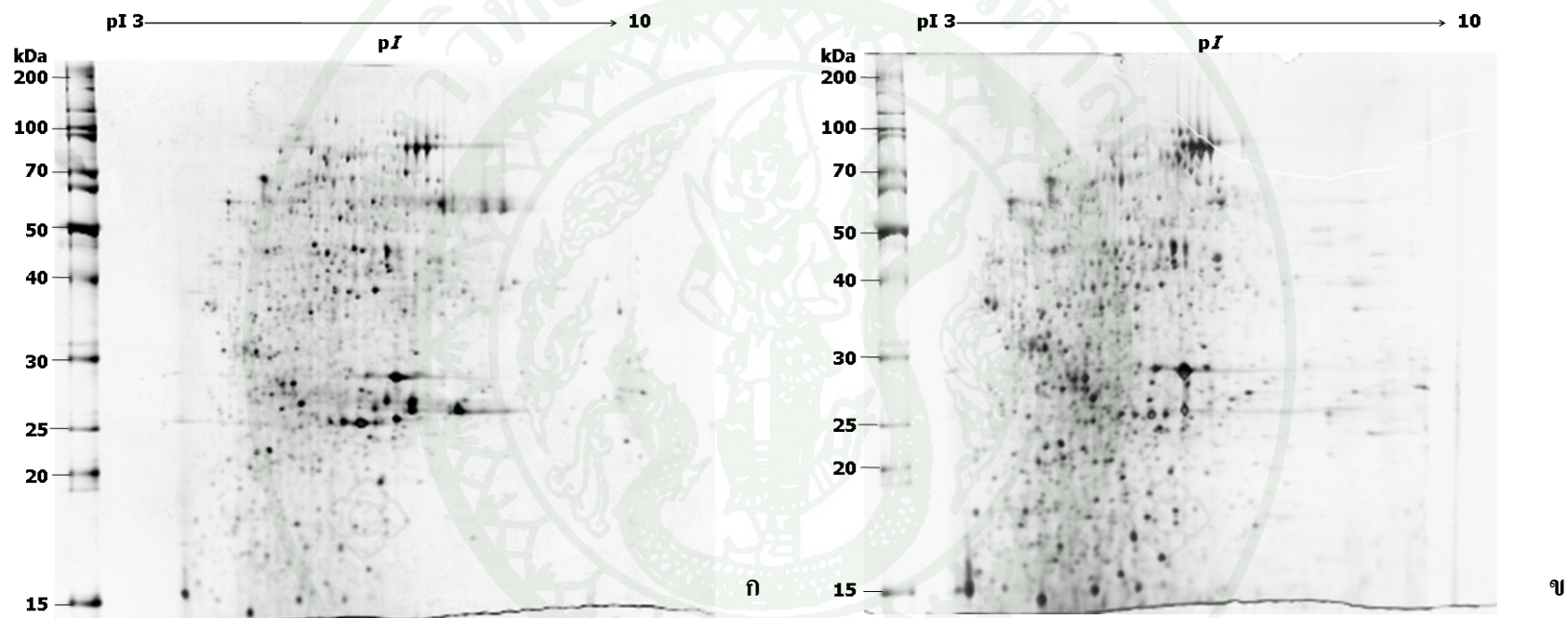
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 13 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง (สรชี้) บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของดอกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

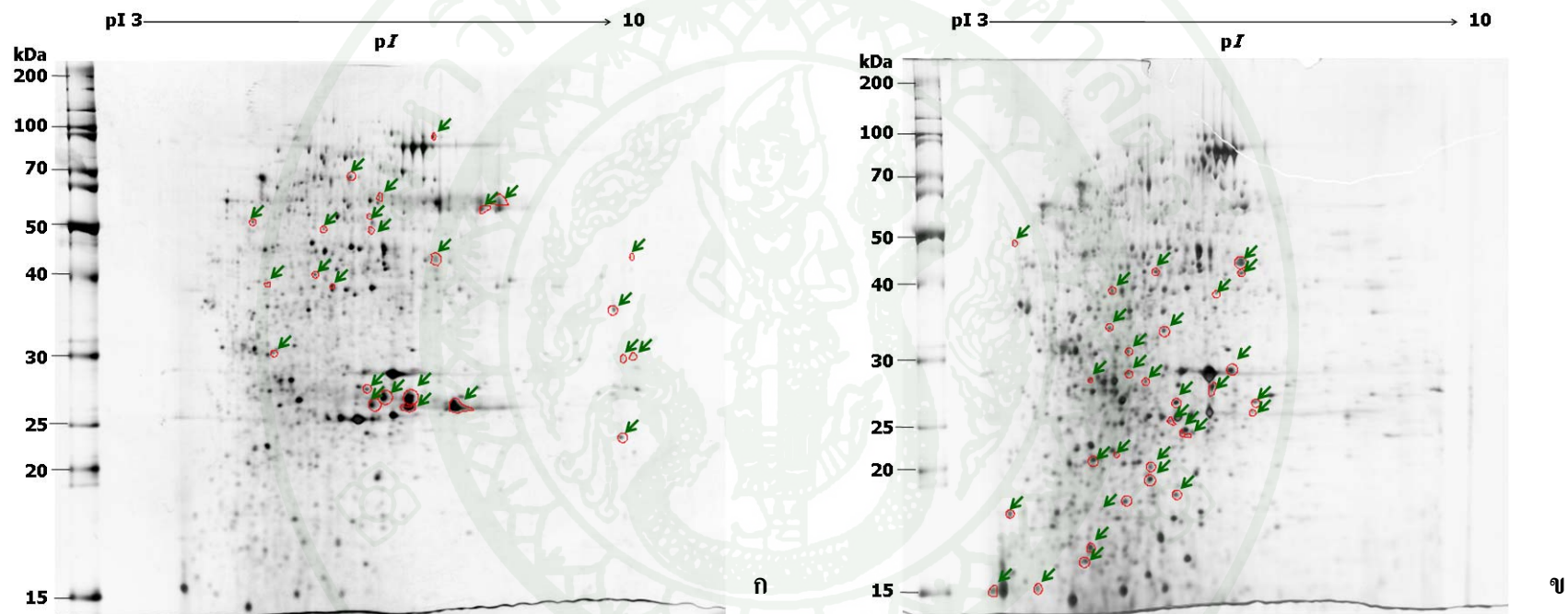
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 14 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

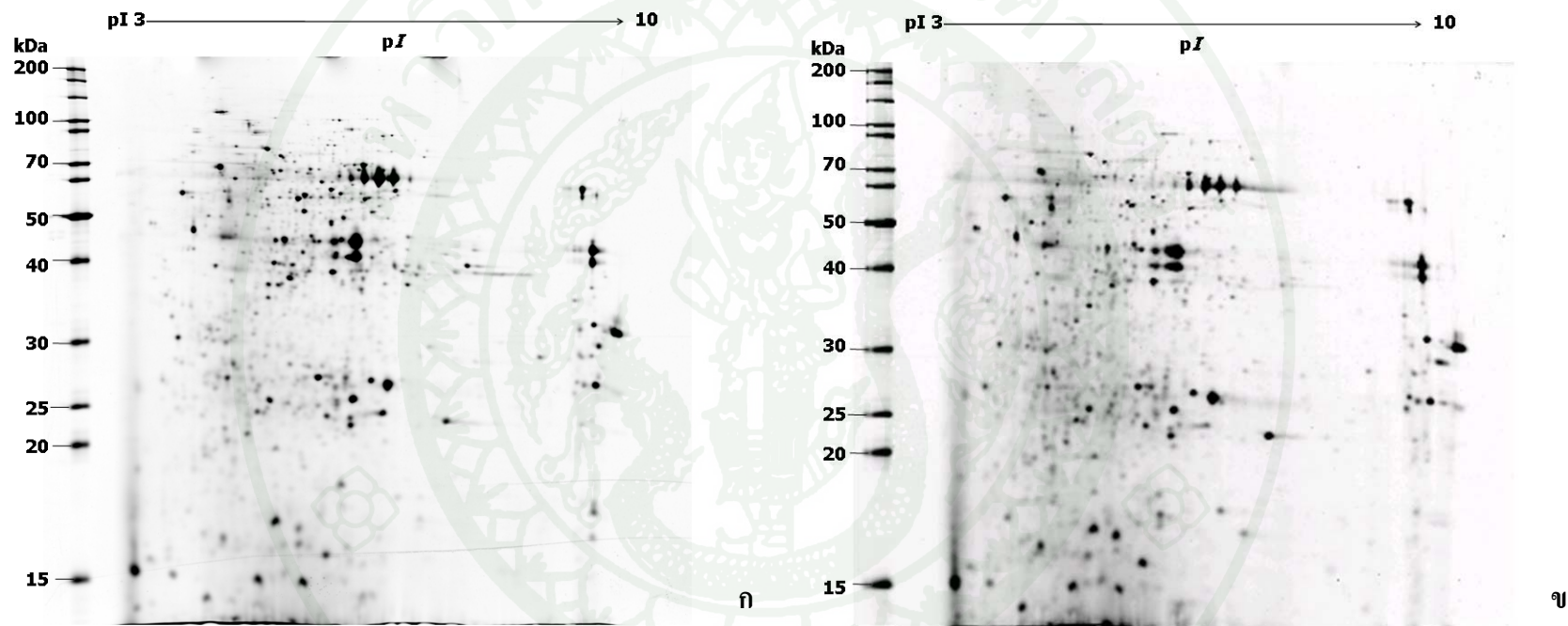
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 15 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง (ศรชี้) บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของผลแก่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

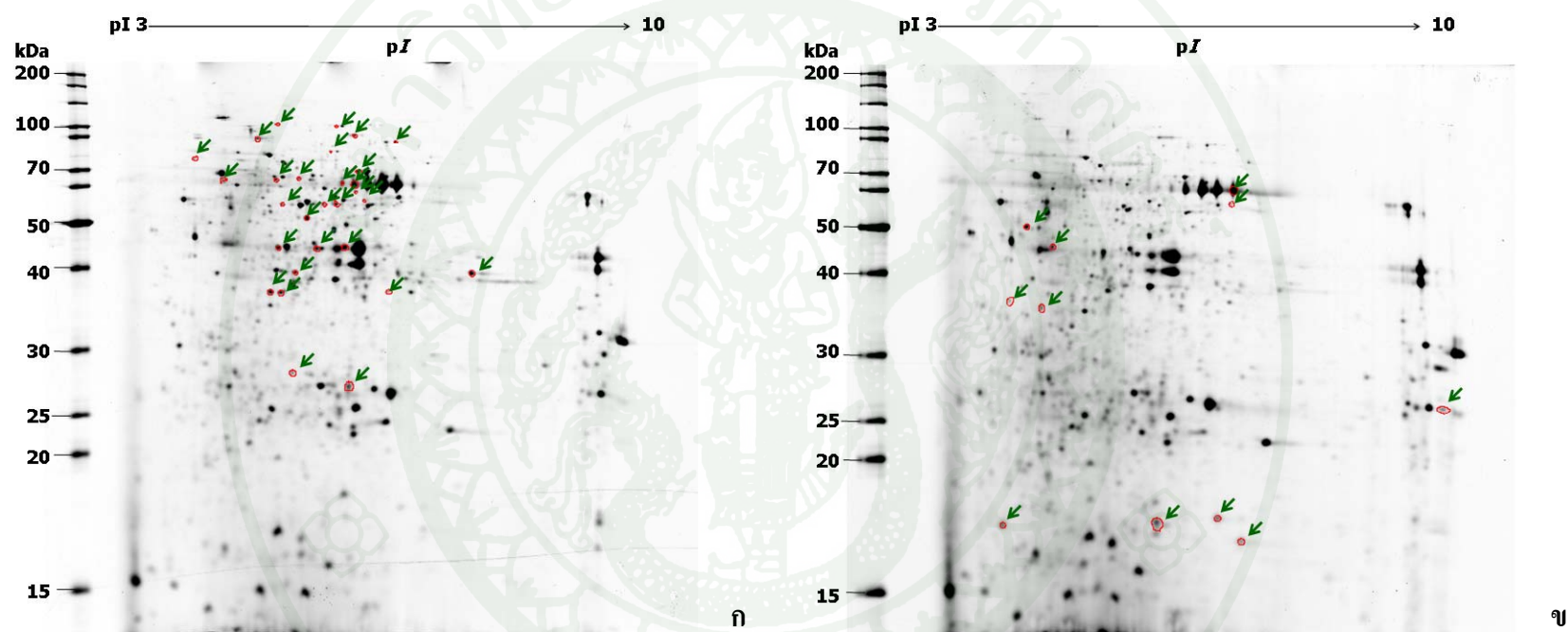
ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 16 รูปแบบของโปรตีนที่แยกด้วยวิธี 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน ก่อนเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 17 จุดของโปรตีนที่แตกต่าง (สรชี้) บน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ระยะให้ผล อายุ 270 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum

ก. มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

ข. มะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนจุดของโปรตีนที่แตกต่างบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอสายพันธุ์เดิม

ระยะของต้น มะละกอ	ชิ้นส่วน ของพืช	จำนวนจุดของโปรตีนที่แตกต่าง (จุดโปรตีน)		ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
		จุดที่พบในมะละกอ ดัดแปลงพันธุกรรมแต่ ไม่พบในมะละกอสาย	จุดที่พบในมะละกอสาย พันธุ์เดิมแต่ไม่พบใน มะละกอดัดแปลง	
		พันธุ์เดิม	พันธุกรรม	
ระยะต้นกล้า	ใบ	26	4	94.46 ± 0.66
ระยะให้ผล	ใบ	13	16	98.72 ± 2.64
	ดอก	20	17	97.24 ± 1.74
	ผลแก่	25	31	96.72 ± 1.06
	ราก	27	11	96.46 ± 2.33

4. การตรวจสอบระบุชนิดของโปรตีนที่แตกต่างบนแผ่นเจล 2D-PAGE ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS

เจาะแต่ละจุดของโปรตีนบนแผ่นเจลที่แตกต่างระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอพันธุ์เดิมมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และวิเคราะห์ด้วย Ultraflex III MALDI TOF/TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Massachusetts, UK) ได้เป็น Peptide Mass Fingerprint (PMF) นำ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) โดยใช้ paprameter ได้แก่ ค่า database ตั้งค่าเป็น MSDB ค่า Taxonomy ตั้งค่าเป็น Viridiplantae (Green Plants) ค่า enzyme ตั้งค่าเป็น trypsin fix modification: carbamidomethyl (C) และค่า variable modification ตั้งค่าเป็น oxidation (M)

4.1 ระยะต้นกล้า

4.1.1 ใบ

ก. ใบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

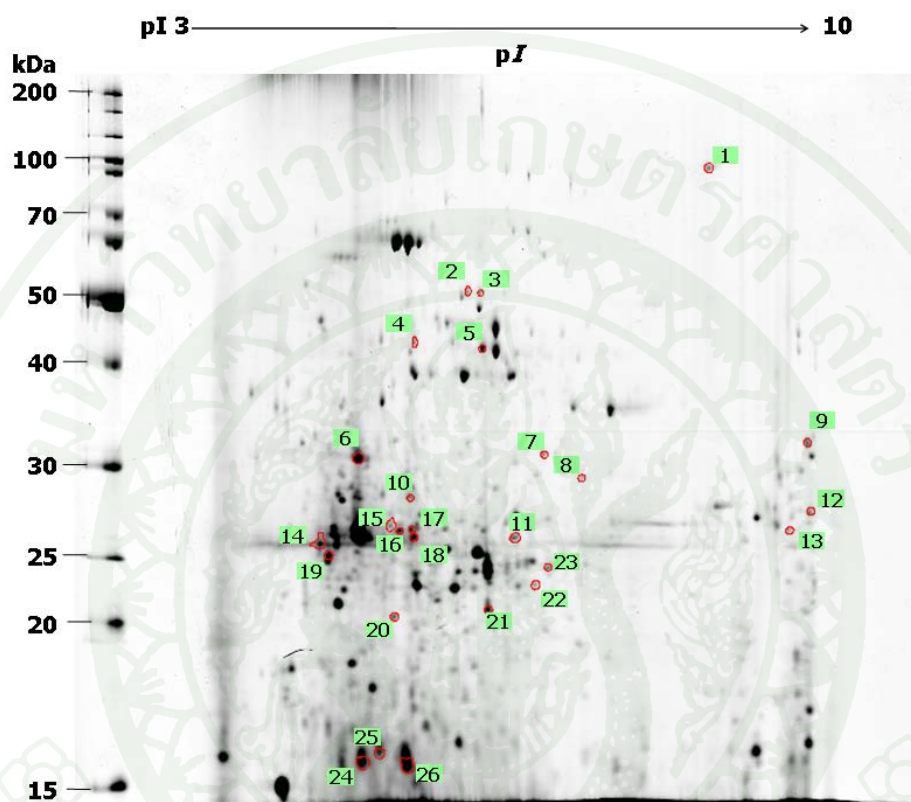
นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะต้นกล้าที่แตกต่างจากใบมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 26 จุด (ภาพที่ 18) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่ามีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 38 – 61 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 3 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 11 (ค่า score 61) โปรตีนจุดที่ 9 (ค่า score 58) โปรตีนจุดที่ 14 (ค่า score 54) โปรตีนจุดที่ 26 (ค่า score 49) และโปรตีนจุดที่ 23 (ค่า score 38) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 4) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรก แสดงดังตารางที่ 4

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 3 และ 4 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับสารก่อภูมิแพ้ในฐานข้อมูลมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนยาวกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

ข. ใบของมะละกอสายพันธุ์เดิม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของใบในระยะต้นกล้าของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 4 จุด (ภาพที่ 19) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 39 - 47 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 5 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 1 (ค่า score 39) โปรตีนจุดที่ 2 (ค่า score 39) โปรตีนจุดที่ 3 (ค่า score 40) และ โปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 47) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 6) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 6

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 5 และ 6 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้



ภาพที่ 18 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างโปรตีนในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 3 โปรตีนที่จำแนกได้ในตัวอย่างใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้า เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	8.50	76	Q94KG3_PHAVU	39	Pto-like kinase OG13 (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	9.19	19
2	6.04	52	Q5GGR4_9GENT	43	Maturase K (Fragment) - <i>Genipa americana</i>	9.76	33
3	9.00	17	Q9SE11_FUNHY	51	Chloroplast-localized small heat shock protein 22 - <i>Funaria hygrometrica</i> (Moss)	7.88	27
4	5.91	47	Q9XFD0_WHEAT	45	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold- responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
5	6.17	44	Q8GV39_9POAL	38	Chloroplast low molecular weight heat shock protein HSP26.2 - <i>Agrostis stolonifera</i> var. palustris	7.85	26

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เลขที่จุดโปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
6	5.05	31	Q8H5S5_ORYSA	41	Hypothetical protein OJ1136_D11.115 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.00	6
7	6.78	31	ABF96084	44	DP000009 NID - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.03	35
8	7.18	30	Q94F60_9POAL	45	Lon protease - <i>Dichanthelium lanuginosum</i>	7.31	97
9	9.96	32	Q6YUT7_ORYSA	58	Putative RPR1 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.55	106
10	5.52	28	JC1481	46	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), cytosolic - potato	6.99	55
11	6.48	26	Q6ZMJ9_ORYSA	61	Putative Vacuolar ATP synthase subunit G 1 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.68	19
12	10.02	27	T48051	45	Shypothetical protein F26K9.50 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.90	47

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
13	9.62	26	Q93YV0_ARATH	48	Putative S-linalool synthase - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.12	102
14	4.68	25	Q6Z6G6_ORYSA	54	N-type ATP pyrophosphatase-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.86	40
15	5.34	26	Q5N9E5_ORYSA	44	Putative immediate-early fungal elicitor protein CMPG1 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.75	42
16	5.38	21	Q1SHU6_MEDTR	45	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.81	4
17	5.54	18	B86191	47	hypothetical protein [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	8.70	36
18	5.54	26	E86427	38	hypothetical protein T4K22.7 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	7.63	57
19	4.76	24	AAT80714	43	AY660566 NID - <i>Huperzia lucidula</i>	9.02	21

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
20	5.38	21	B96495	39	hypothetical protein T8D8.9 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	8.30	49
21	6.23	21	Q9SXN6_TOBAC	45	NtRb1 protein - <i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	8.11	107
22	6.70	22	Q94I67_ORYSA	45	Putative retroelement - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.63	103
23	6.83	24	Q84YF6_SORBI	38	RPT2-like protein - <i>Sorghum bicolor</i> (Sorghum) (<i>Sorghum vulgare</i>)	9.30	70
24	5.09	17	Q53KI6_ORYSA	43	Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.62	54
25	5.25	17	Q2V2Q6_ARATH	45	Protein At4g32720 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	4.82	45
26	5.49	17	Q8LHY7_ORYSA	49	Hypothetical protein P0022B05.113 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.92	18

ตารางที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนในใบมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิม
ระยะต้นกล้าที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
3	1051.5790	Q6ZL82_ORYSA	47	Hypothetical protein OJ1115_C05.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.57	18.5	- TZRTWTCR - TZRMRTCR - TZRRMTCR - TZRWTTCR - ZRTTWTCR
	1794.6860	Q60DS5_ORYSA	52	Hypothetical protein B1140B01.12 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	4.48	9.4	- CATNGWTGDLSGWGLT R - SSTNGWTGDLSGWGLT R - ACTNGWTGDLSGWGLT R - CATNGWWSLSGWGLTR - SSTNGWWSLSGWGLTR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
3 (ต่อ)	2384.0440	Q94JF1_ORYSA	45	Hypothetical protein P0684B02.24-1 (Hypothetical protein P0692C11.5- 1) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	9.82	20.7	- APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHGFR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHTCR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHCTR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHFGR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSHGGFR
9	1050.1260	Q259K3_ORYSA	50	H0402C08.10 protein - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	5.81	20.1	- TCHMWCNR - TCHMWNCR - TCHWMCNR - TCHWMNCR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
9 (ต่อ)	1765.8350	Q1RSZ8_MEDTR	45	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	7.82	5.6	- TTMPWFPGGGGGGGG GCGGR - TTNNWFPGGGGGGGG GCGGR - TTPMWFPGGGGGGGG GCGGR - TTDPWYPGGGGGGGG GCGGR - TTPDWYPGGGGGGGG GCGGR
	1826.9260	Q95CW1_9FILI	52	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment) - <i>Hymenophyllum hirsutum</i>	6.54	48.7	- AGRSCMWPEAZYGSZR - AGRSCMWPEAZYGTNR - AGRSCMWPEAZYGNTR - AGRSCMWPEAZYGZSR - AGRSCMWPEAZYASNR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
11	1082.0930	Q6QVC5_PHAVU	50	Ribonuclease H (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	9.37	5.7	- CCYDNDHGR
	1439.8640	Q49IC5_ZEAMP	46	Teosinte glume architecture 1 (Fragment) - <i>Zea mays</i> subsp. parviglumis (Balsas teosinte)	7.57	15.4	- LYLAAGRYAASGAR - LYLAAGRYAASAGR - LYLAAGRYAASZR - LYLAAGRYAATGGR - LYLAAGRYAATNR
	1567.8070	Q6YVB3_ORYSA	52	Hypothetical protein OSJNBa0005C24.16 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	12.38	17.6	- THNPWWLPGGCGSR - THNPWLWPGGCGSR - THNPLWWPGGCGSR - THPNWWLPGGCGSR - THPNWLWPGGCGSR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
14	1519.6850	HHPM21	52	heat shock protein 21 precursor - garden pea	6.36	26.2	- LFVGGSLRRGSSZR - LFVGGSLRRGSTNR - LFVGGSLRRGSNTR - LFVGGSLRRGSZSR - LFVGGSLRRGCAZR
	1590.7340	Q69L53_ORYSA	49	Hypothetical protein OSJNBa0092O08.17 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	8.53	6.3	- HFCASPYYAMGGMR - HFCASPYYAMGSTR - HFCASPYYAMGTSR - HFCASPYYAMGMGR - HFCASPYYAMAACR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
14 (ต่อ)	2247.1000	Q2R8I5_ORYSA	40	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.41	29.2	- LGHZNLDVHNSMTHLN FNR - LGHZNLHTMSNHVDLN GGFR - LGHZNLHTMSNHVDLN GFGR - LGHZNLHTMSNHVDLN SSSR - LGHZNLHTMSNHVDLN NFR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

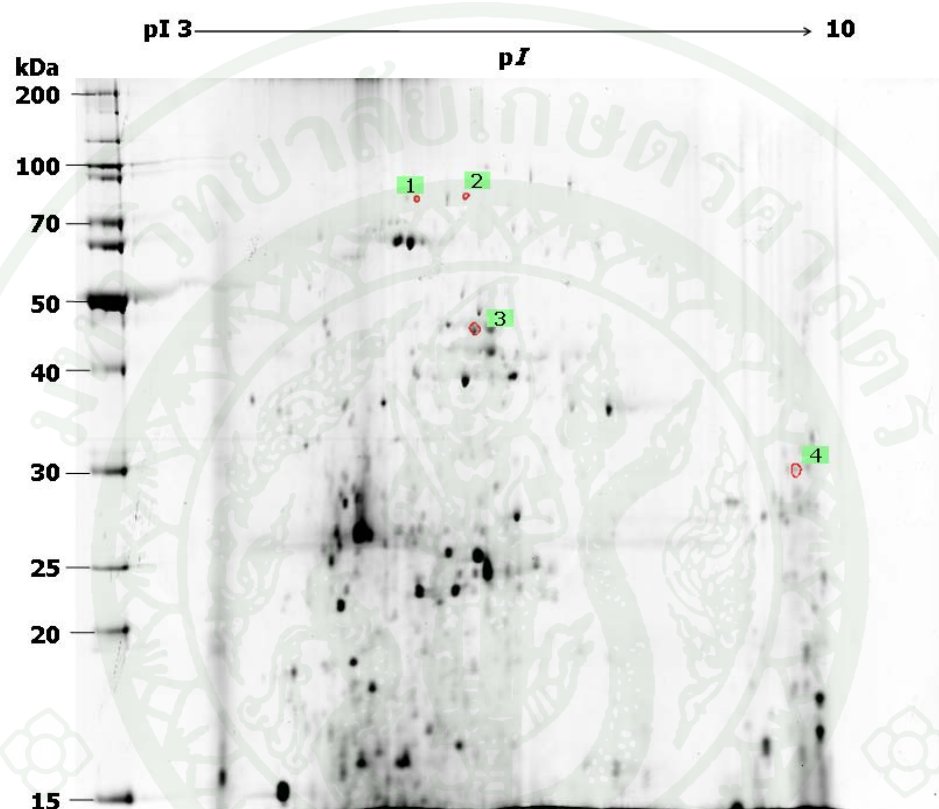
โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
26	1796.7610	Q2TKU1_9DIPS	52	CYCLOIDEA-like (Fragment) - <i>Leycesteria formosa</i>	8.93	12.6	- ZFGGGWGCPNCGWGG GTR - ZFGGGWGCPNCGWGG ASR - ZFGGGWGCPNCGWGA GSR - ZFGGGWGCNPGWGG GTR - ZFGGGWGCNPGWGG ASR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
26 (ต่อ)	1853.7890	Q6YSW5_ORYSA	56	Hypothetical protein B1032F05.8 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.18	20.6	- ZFNAGGTSSLNSGDGA NTR - ZFNAGGTSSLNSGDAG NTR - ZFNAGGTSSLNSGEGG NTR - ZFNAGGTSSLNSADGG NTR - ZFNAGGTSSLNSDGG NTR
	1910.8160	Q9LRN9_ARATH	66	Gb AAC33212.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.10	21.6	- TGCZAEASGCLLTGDNZ - TGCZAEASGCLLTGDNN - TGCZAEASGCLLTGDN - TREECCWLLTGDNZSR - TREECCWLLTGDNNTR

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
26 (ต่อ)	2384.0050	Q6UUM1_ORYSA	48	Hypothetical protein (Fragment) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.54	17.8	- ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHGGR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHGGR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHPMR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHVER - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHLDR



ภาพที่ 19 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างโปรตีนในระยะต้นกล้า อายุ 60 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 5 โปรตีนที่จำแนกได้ในตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้า เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.56	78	Q6Z594_ORYSA	39	Hypothetical protein OSJNBa0005L24.4 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.81	9
2	6.06	79	Q94KG3_PHAVU	39	Pto-like kinase OG13 (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	9.19	19
3	6.15	46	Q653Z8_ORYSA	40	Hypothetical protein OSJNBb0065C04.36 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	4.22	6
4	9.55	30	Q6ZJ08_ORYSA	47	Monodehydroascorbate reductase - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.30	47

ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้ในตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นกล้าที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
1	1320.6020	Q1S010_MEDTR	44	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.08	11043	- CHZDVDPPR - SSPPDVDPPR - ACPPDVDPPR - CAPPDVDPPR - SSPPDVDHGR
	1794.8440	Q8W4L9_ARATH	64	Hypothetical protein At3g17800; MEB5.2 (Hypothetical protein At3g17800) - <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.18	46011	- AYRPPRYLER - AYRPPRYNZR - AYRPPRYZNR - AYRPPRYELR
2	1066.1180	Q69NP5_ORYSA	44	Hypothetical protein OSJNBb0015B15.10 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	9.62	58062	N/A

ตารางที่ 6 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
2 (ต่อ)	1838.8030	Q1EMQ6_PLAMJ	52	Translation elongation factor 1 alpha (Fragment) - <i>Plantago major</i> (Common plantain)	9.40	26997	- PVYSGGSGSHTSAFGS GGAR - PVYSGGSGSHTSAFGS GAGR - PVYSGGSGSHTSAFG S AGGR - PVYSGGSGSHTSAFGS ANR - PVYSGGSGSHTSAFGS NAR
3	1066.0950	Q8L905_ARATH	38	Hypothetical protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.73	11705	N/A

ตารางที่ 6 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
3 (ต่อ)	1794.8330	CAC35406	50	Sequence 1 from Patent WO0118061 - <i>Zea mays</i> (Maize)	9.18	37249	- ARGHGPLSGWSPWCZR - ARGHGPLSGWSPWZCR - ARGHGPLSGWSTZVWR - ARGHGPLSGWSTZERR - ARGHGPLSGWSTZRER
4	1051.7260	Q69QM1_ORYSA	49	Hypothetical protein OSJNBa0024L18.38 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.25	11168	- TZRTWTCR - TZRMRTCR - TZRRMTCR - TZRWTTCR - THFTWTCR
	1475.7620	Q45W87_ARAHY	46	Oleosin 1 - <i>Arachis hypogaea</i> (Peanut)	10.08	14299	- TGGVSWYFNCWR - SAGVSWYFNCWR - ASGVSWYFNCWR - GTGVSWYFNCWR - SGAVSWYFNCWR

4.2 ระยะให้ผล

4.2.1 ใบ

ก. ใบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

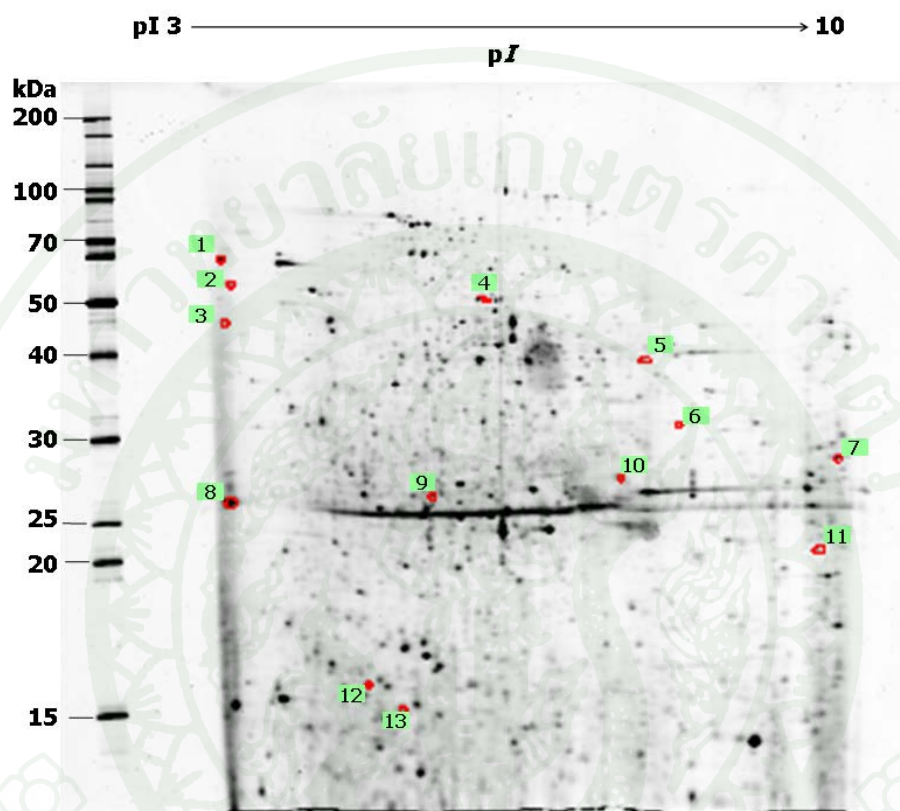
นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมระยะให้ผลที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 13 จุด (ภาพที่ 20) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 38 – 55 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 7 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 2 (ค่า score 61) โปรตีนจุดที่ 8 (ค่า score 55) โปรตีนจุดที่ 10 (ค่า score 46) โปรตีนจุดที่ 1 (ค่า score 44) และโปรตีนจุดที่ 11 (ค่า score 44) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 8) เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 8

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 7 และ 8 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

ข. ใบของมะละกอสายพันธุ์เดิม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของใบมะละกอสายพันธุ์เดิมระยะต้นกล้าที่แตกต่างจากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 16 จุด (ภาพที่ 21) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่ามีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 37 – 55 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 9 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 3 (ค่า score 55) โปรตีนจุดที่ 12 (ค่า score 52) โปรตีนจุดที่ 13 (ค่า score 48) โปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 46) และโปรตีนจุดที่ 8 (ค่า score 46) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 10) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo* sequencing วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 10

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo* sequencing ในตารางที่ 9 และ 10 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซนต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้



ภาพที่ 20 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 7 โปรตีนที่จำแนกได้ในตัวอย่างใบมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	3.5	59	AAZ93621	44	DQ116386 NID - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.49	55
2	3.6	53	Q2V2Q6_ARATH	50	Protein At4g32720 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	4.82	45
3	3.5	454	Q6ZDX1_ORYSA	39	Hypothetical protein P0618H09.24 (Hypothetical protein P0037D09.26) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.18	30
4	6.3	50	Q9XFD0_WHEAT	38	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
5	7.7	38	Q9XFD0_WHEAT	43	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18

ตารางที่ 7 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
6	8.3	32	T04161	43	trypsin inhibitor (Bowman-Birk) - rice	5.06	21
7	9.7	29	Q2HVK8_MEDTR	41	HAD-superfamily hydrolase subfamily IIB - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	5.82	28
8	3.2	27	Q40889_PETHY	55	Putative GTP-binding protein (Fragment) - <i>Petunia hybrida</i> (Petunia)	5.89	10
9	5.7	27	Q20GT6_9LAMI	42	Phosphoenolpyruvate carboxylase (Fragment) - <i>Phryganocydia corymbosa</i>	5.67	7
10	7.5	27	Q6UUB9_ORYSA	46	Putative integrase - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.62	43
11	9.5	22	AAC35538	44	F2P3 NID - <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.96	17
12	5.1	17	Q5VQ12_ORYSA	44	Hypothetical protein P0548D03.24 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.11	10

ตารางที่ 7 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
13	5.2	15	Q6QVD9_PHAVU	44	Ribonuclease H (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	4.69	3

ตารางที่ 8 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo* sequencing ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
1	1051.6810	S72625	49	hypothetical protein 1 - common tobacco transposable element Slide- 124	7.64	24.1	- TZPGTRHVR - AGVVGTRHVR - GAVVGTRHVR - ZVVGTRHVR - HFVTRHVR
	1707.7310	Q2WGD9_SELUN	35	Photosystem I subunit VII (Fragment) - <i>Selaginella</i> <i>uncinata</i> (Blue spikemoss) (Peacock spikemoss)	10.08	8.8	- TNDGYLDZHLYGRR - TNDGYLDZHLYVNR - TNDGYLDZHLYNVR - TNDGYLDZHLRGR - TNDGYLDHZLYGRR
2	905.9150	RROBHM	38	RNA-directed DNA polymerase homolog - evening primrose mitochondrion	6.90	16.8	N/A

ตารางที่ 8 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
2 (ต่อ)	928.6550	Q5VN95_ORYSA	41	Hypothetical protein P0676G08.27 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.92	18.8	- VZDZDAPR - VZDZDPAR - VZDZGPER - VZDZGLLR - VZDZGEPR
8	1479.7972	Q2QM94_ORYSA	45	CCAAT-box transcription factor complex WHAP5, putative, expressed - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	9.12	23.8	N/A

ตารางที่ 8 (ต่อ)

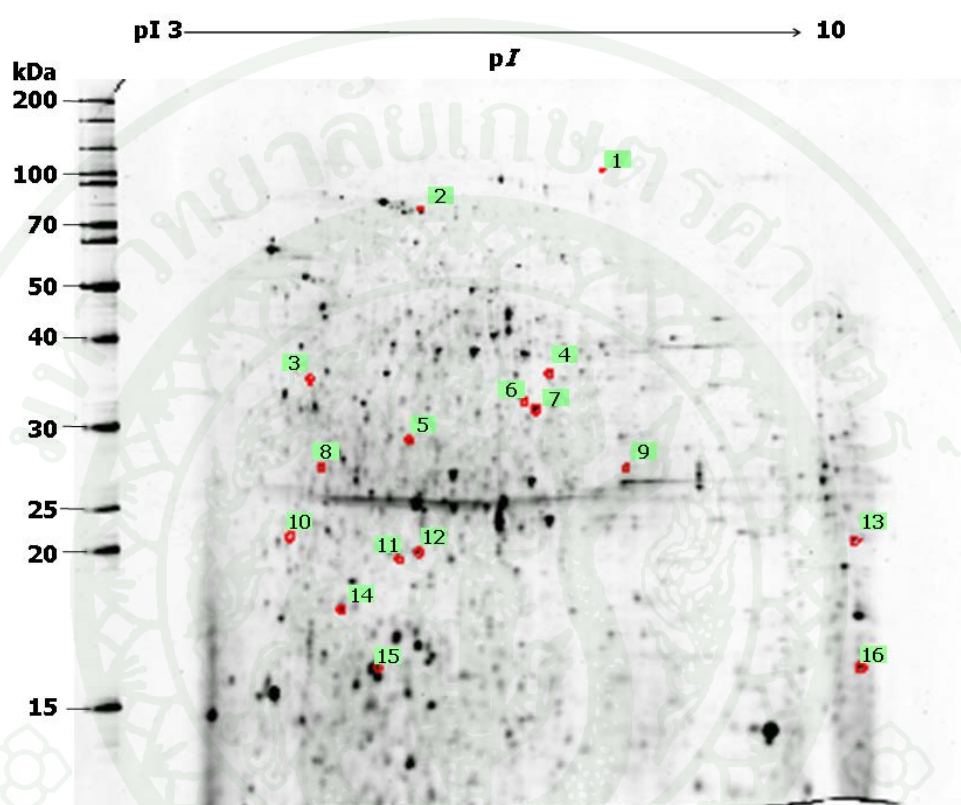
โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
8 (ต่อ)	1567.7451	T02529	44	Probable MYB family transcription factor [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	9.16	42.2	- VPWYYGGGGGGGGG GGGR - VPYWYGGGGGGGGG GGGR - VPYYWGGGGGGGGG GGGRVPWR - RAGGGGGGGGGGGR - VPRWRAGGGGGGGG GGR
10	1794.8020	Q6Z065_ORYSA	41	Putative CCAAT box binding factor/transcription factor Hap2a - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.59	20.7	- TGGHDTNGHR - TGGHDTNPPR - TGGHDTNHGR - TGGHDTPPNR - TGGHDTPNPR

ตารางที่ 8 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
10 (ต่อ)	1937.137	Q6Z065_ORYSA	41	Putative CCAAT box binding factor/transcription factor Hap2a.- <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.59	20.7	- ACTNGGEGTLD SGELN TR - SSTNGGEGTLD SGELN TR - CATNGGEGTLD SGELN TR - ACTNGGEGTLD SWLN TR - SSTNGGZGSZDSWLN TR
11	1051.6810	S72625	49	Hypothetical protein 1 - common tobacco transposable element Slide- 124	7.64	24.1	- CCYLTRHR - RNVLTRHR - NRVLTRHR - TGGHDTNGHR - TGPPDTNGHR

ตารางที่ 8 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
11 (ต่อ)	1707.7310	Q6I548_ORYSA	47	Hypothetical protein OSJNBa0055E23.5 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	9.27	29.5	- SSATVNTDLYYGNCZR - SSATVNTDLYYGNZC RS - SATVNTDEFYGNZCR - SSATVNTDEFYGNZCR - SSATVNTDEYFGNCZR



ภาพที่ 21 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างใบในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิม ที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 9 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	7.29	104	T48051	45	Hypothetical protein F26K9.50 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.90	47
2	5.51	75	Q6EU31_ORYSA	42	Hypothetical protein OJ1123_G04.22 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.55	16
3	4.20	36	Q1SQK8_MEDTR	55	Tetratricopeptide-like helical - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.56	109
4	6.79	34	JC1481	46	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), cytosolic - potato	6.99	55
5	5.10	27	Q5VQ12_ORYSA	43	Hypothetical protein P0548D03.24 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.11	10
6	6.18	31	Q2R4P7_ORYSA	41	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.75	66

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
7	6.28	32	Q1S8Q1_MEDTR	41	PWWP; Regulation of nuclear pre-mRNA protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	8.65	114
8	4.17	27	Q6UUB9_ORYSA	46	Putative integrase - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.62	43
9	7.81	27	Q69UX0_ORYSA	37	Hypothetical protein OJ1230_H04.30 (Hypothetical protein P0577H07.1) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.73	10
10	4.08	22	Q9GFN9_9ROSI	41	Maturase - <i>Kandelia candel</i>	9.55	60
11	5.39	19	Q500V1_ARATH	37	At2g04560 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse- ear cress)	10.10	17
12	5.86	20	Q7XSS1_ORYSA	52	OSJNBa0041A02.11 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.83	48

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
13	9.71	23	Q9XFD0_WHEAT	48	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
14	4.42	16	Q6ZDH4_ORYSA	42	Hypothetical protein P0451G12.7 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	12.63	17
15	9.81	18	Q2A0T5_9LAMI	38	Phytochrome A (Fragment) - <i>Pedicularis foliosa</i>	5.49	68

ตารางที่ 10 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างใบมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
3	1051.7190	Q9SLS1_TOBAC	41	Histone H1 - <i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	10.62	29.5	- TVPANTRHR - TPLGNTRHR - TLPGNTRHR - TVAPNTRHR - TGLPNTRHR
	927.6740	Q3ECM9_ARATH	34	Protein At1g56555 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	8.61	19.6	- WRHALDVLNDLLDLA HAPR - WRHALDVLNDLLDLA HPAR - RWHALDVLNDLLDLA HAPR - RWHALDVLNDLLDLA HPAR - DLNHALDLLDNLVDL AHPAR

ตารางที่ 10 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
4	1051.7270	Q6ZL82_ORYSA	42	Hypothetical protein OJ1115_C05.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.57	18.8	- TZRPSCTCR
							- TZRPCSTCR
							- TZRMRTCR
							- TZRRMTCR
							- TZRWTTCR
	927.6700	Q6ZHP5_ORYSA	34	Hypothetical protein OJ1191_G08.17 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	10.11	18.1	- VZGWNAPR
							- VZGWNPAR
							- VZDZNAPR
							- VZDZNPAR
							- VZDNZPAR
8	1051.7130	Q6ZL82_ORYSA	50	Hypothetical protein OJ1115_C05.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.57	18.8	- TZRPTRHR
							- TZRVRHR
							- TZRTPRHR
							- TGARTPRHR
							- TGARPTRHR

ตารางที่ 10 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
8 (ต่อ)	1334.8830	Q1SAM6_MEDTR	44	Retrotransposon gag protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	5.51	21.0	- SPTTPWPZHGAR - SPTTPWPHZGAR - SPTTPWTNFGAR - SPTTPWTFNGAR - SPTTPWCCRGAR
12	1051.7520	Q9FWJ7_ARATH	44	Mitochondrial heat shock 22kDa protein, putative; 60724-61031 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.18	6.9	- TALMHHWR - TALMHWHR - TALMWHHR - TALHZYYR - TALMHWR

ตารางที่ 10 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
12 (ต่อ)	2691.3460	Q6Z9B3_ORYSA	44	Hypothetical protein P0682A06.2 (Hypothetical protein OJ1449_H02.30) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.48	15.6	- SGWVHVCWWFPGG GGGGVGVARHVR - GSWVHVCWWFPGG GGGGVGVARHVR - SGREHVCWWFPGGG GGGVGVARHVR - GSREHVCWWFPGGG GGGVGVARHVR - SGERHVCWWFPGGG GGGVGVARHVR
13	1051.7180	Q7XM53_ORYSA	45	OSJNBb0018J12.6 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.61	19.4	- TGPGVATCSCR - TGPGVATSCCR - TGPRATCSCR - TGPRATSCCR - TGPRAZYCR

ตารางที่ 10 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
13 (ต่อ)	1794.8070	Q9XEQ0_SORBI	52	Hypothetical protein - <i>Sorghum bicolor</i> (Sorghum) (<i>Sorghum vulgare</i>)	9.32	71.1	- ESMVWGSZLSHMCSGR - DTMVWGSZLSHMCSGR - TDMVWGSZLSHMCSGR - SEMVWGSZLSHMCSGR - ESETWGSZLSHMCSGR - DTETWGSZLSHMCSGR

4.2.2 ดอก

ก. ดอกของมะละกอคัดแปลงพันธุกรรม

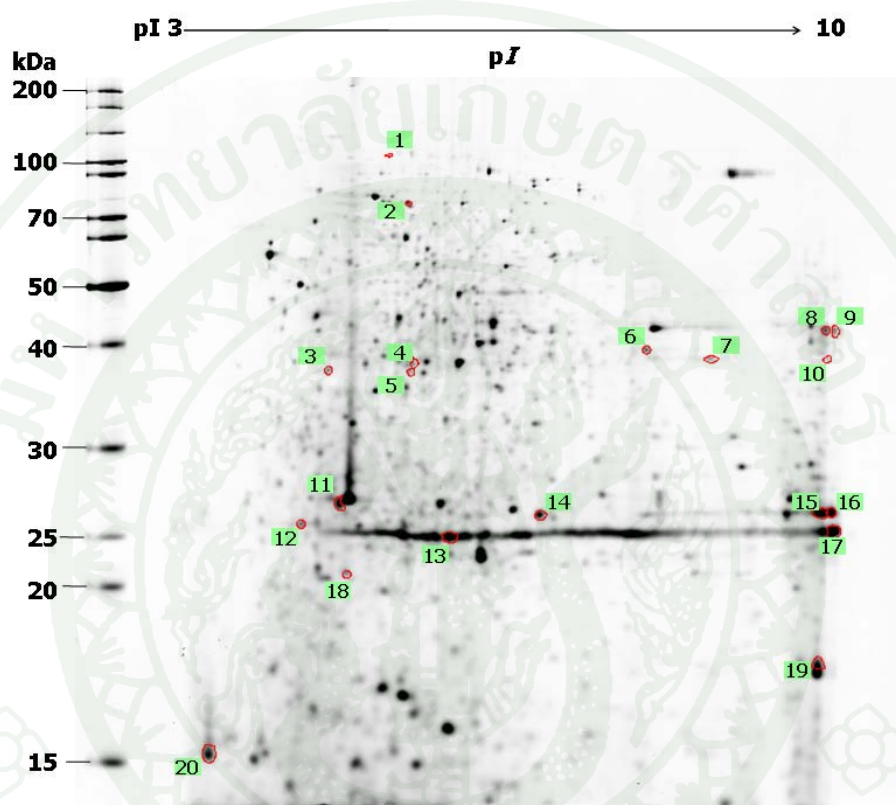
นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของดอกมะละกอคัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากดอกมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 20 จุด (ภาพที่ 22) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 40 – 58 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 11 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 6 (ค่า score 58) โปรตีนจุดที่ 10 (ค่า score 55) โปรตีนจุดที่ 19 (ค่า score 55) โปรตีนจุดที่ 20 (ค่า score 54) และโปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 52) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 12) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo* sequencing วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 12

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo* sequencing ในตารางที่ 11 และ 12 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

ข. ดอกของมะละกอสายพันธุ์เดิม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 17 จุด (ภาพที่ 23) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 38 – 54 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 13 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 2 (ค่า score 54) โปรตีนจุดที่ 3 (ค่า score 52) โปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 51) โปรตีนจุดที่ 17 (ค่า score 51) และโปรตีนจุดที่ 11 (ค่า score 50) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 14) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 14

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 13 และ 14 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้



ภาพที่ 22 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และเชื่อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างดอกในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 11 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.15	100	Q67WN6_ORYSA	44	Hypothetical protein P0017B12.6 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.47	22
2	5.45	76	Q5JLD4_ORYSA	46	NBS-LRR disease resistance protein-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.09	44
3	4.42	37	T10228	44	Hypothetical protein T11I11.60 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	8.90	31
4	5.59	38	B86191	52	Hypothetical protein [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	8.70	37
5	5.57	37	A84862	48	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.75	27

ตารางที่ 11 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
6	8.14	38	Q69TV8_ORYSA	58	Putative galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.66	62
7	8.71	38	Q947C7_TRIMO	47	Putative resistance protein - <i>Triticum monococcum</i> (Einkorn wheat) (Small spelt)	5.73	103
8	9.82	43	Q69XF8_ORYSA	44	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.93	73
9	9.93	43	Q5JLD4_ORYSA	50	NBS-LRR disease resistance protein-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.09	44
10	9.82	38	Q52Z99_DUNSA	55	6-4 photolyase.- <i>Dunaliella salina</i>	9.51	67
11	4.26	27	T10228		hypothetical protein 55 T11I1.60 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	8.90	31

ตารางที่ 11 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
12	4.18	26	Q9CAV4_ARATH	42	Hypothetical protein T9J14.16 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	4.94	17
13	5.92	25	H96601	50	hypothetical protein T6H22.14 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.61	45
14	6.78	27	Q6IMT7_ORYSA		Transposase - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	8.14	68
15	9.83	27	F86178	44	Hypothetical protein [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.61	198
16	9.88	27	O04868_ARATH	49	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.83	41
17	9.88	26	Q67WN6_ORYSA	40	Hypothetical protein P0017B12.6 (Hypothetical protein P0416A11.39) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.47	22
18	4.77	20	D84480		Mutator-like transposase [46 imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.51	80

ตารางที่ 11 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
19	9.71	18	Q1SYW6_MEDTR	55	MIT - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	7.60	31
20	3.77	15	CAD70056	54	Sequence 25 from Patent WO02103001 - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	5.75	42

ตารางที่ 12 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
4	1082.5080.	Q70JS0_WHEAT	34	Putative SKP1 protein - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	4.48	19.0	N/A
	1435.0570	F84420	33	Hypothetical protein At2g01100 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	10.35	29.0	- HFZAHZZR - HFZAZHZR - HFZAZZHR - RZZAFFVR - ZRZAHZZR
	1618.7970	Q338C7_ORYSA	51	Hypothetical protein - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	10.29	6.1	N/A
6	1082.6040	Q94C16_ARATH	36	AT5g50940/K3K7_9 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	4.88	10.2	- TAGHMSLPLR - TAGHMSLLPR - TGAHMSLPLR - TGAHMSLLPR

ตารางที่ 12 (ต่อ)

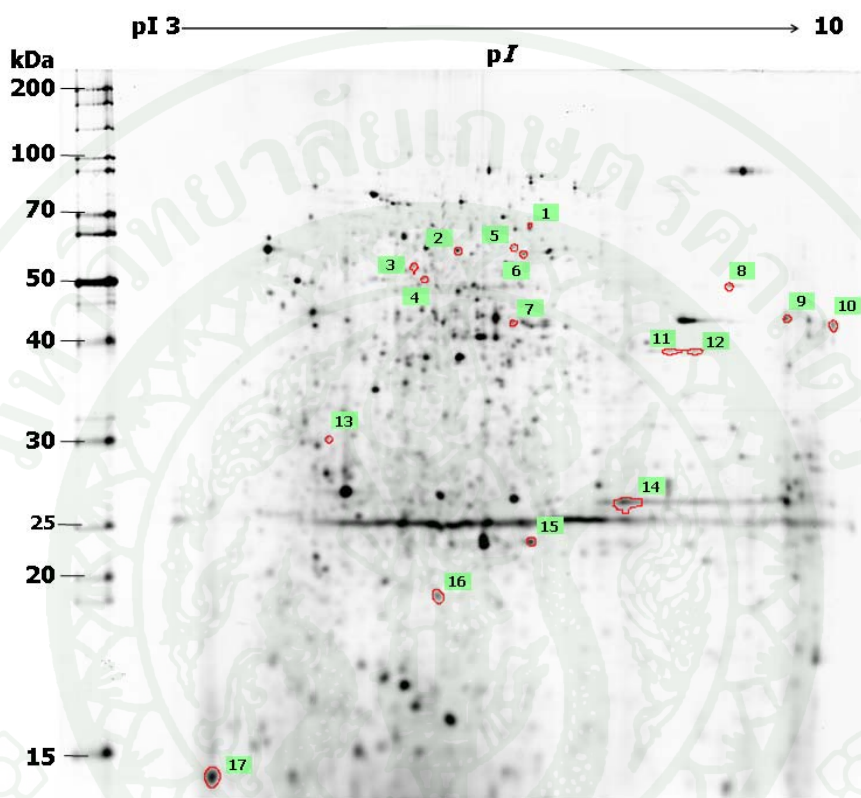
โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
	1434.6250	Q1S0V0_MEDTR	34	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	8.77	6.2	- YZWWELAR - YZWWLEAR - YZWWEPSR - YZWWPESR - YZWWESPR
	1617.6860	Q1T3F2_MEDTR	43	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.32	11.9	- TAEEHVPLR - TAEHVLPR - TAEHEVPLR - TAEHEVLPR - PNVZZYFR
10	1051.4070	Q2HTX9_MEDTR	33	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	9.69	9.9	- TZHNWPLR - TZHNWLPR - TZHHYPLR - TZHHYLPR - TZHYHPLR

ตารางที่ 12 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
10 (ต่อ)	1826.8390	Q2LL21_9CHLO	48	Type I actin (Fragment) - uncultured <i>Trebouxia</i> <i>photobiont</i>	4.53	7.5	- ZFNGNCGSLDSGCPGN TR - ZFNGCNGSLDSGCPGN TR - ZFNGNCGSLDGSCPGN TR - ZFNGCNGSLDGSCPGN TR - ZFNGNCGSLDSGPCGN TR
19	1109.9670	Q5Z9J4_ORYSA	43	Hypothetical protein P0621D05.36 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.16	6.9	- N/A

ตารางที่ 12 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
20	1178.9240	Q1RX64_MEDTR	37	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.70	5.7	- TGGNVHNPZVR
							- TGGNVHNPVZR
							- TNNVHNPZVR
							- TNNVHNPVZR
							- TNNHLTPLLR
	1334.6000	Q1T446_MEDTR	43	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	9.43	7.0	- GZVVWWLYZR
							- GNLVWWLYZR
							- GZVVWLWYZR
							- GNLVWLWYZR
							- GZVVLWWYZR
	1448.5800	AAA82743	36	CMU19481 NID - <i>Citrus maxima</i>	6.90	52.2	- WVTTS CPWTPDR
							- WVTTS CPWTDPR
							- WVTTS CWPTPDR
							- WVTTS CWPTDPR
							- WVTTPWSCTPDR



ภาพที่ 23 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างดอกในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดีดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 13 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายตัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหานิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	6.77	70	Q1SKZ5_MEDTR	44	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	5.74	12
2	5.98	58	Q9FFZ5_ARATH	54	Gb AAF00669.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.73	90
3	5.28	53	Q9FFZ5_ARATH	52	Gb AAF00669.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.73	90
4	5.37	50	Q84QC3_ARATH	51	Putative RAS-related protein ARA-1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.77	29
5	6.49	59	O24317_9MAGN	42	Alcohol dehydrogenase 1A (Fragment) - <i>Paeonia veitchii</i>	5.59	23
6	6.67	57	Q2WE96_ALLSA	46	Unspecific 9/13 divinyl ether synthase - <i>Allium sativum</i> (Garlic)	8.52	53

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
7	6.45	43	Q6K9D7_ORYSA	40	Hypothetical protein OJ1471_E11.23 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.25	23
8	8.81	49	Q9FGG0_ARATH	47	Similarity to unknown protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	7.57	39
9	9.66	44	Q2QR97_ORYSA	38	Hypothetical protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.95	67
10	9.97	43	D84480	45	Mutator-like transposase [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.51	80
11	7.91	39	Q5WMY5_ORYSA	50	Hypothetical protein P0431G05.3 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.28	17
12	8.29	39	T47327	45	Hypothetical protein T12K4.140 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.24	113
13	4.22	30	Q94KQ7_PAEOF	49	Alcohol dehydrogenase 2 (Fragment) - <i>Paeonia officinalis</i> (Common peony)	5.42	23

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
14	7.23	27	G96637	44	Hypothetical protein F11P17.9 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.25	111
15	6.70	24	Q9LGP5_ORYSA	43	Hypothetical protein P0510F03.33 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.95	13
16	5.80	19	D84480	42	Mutator-like transposase [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.51	80
17	3.21	14	Q6EYK1_9CONI	51	Photosystem II subunit H (Fragment) - <i>Cephalotaxus harringtonia</i>	8.26	3

ตารางที่ 14 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างดอกมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
2	1334.7450	Q948G3_ORYSA	42	Hypothetical protein OSJNBa0049O12.11 - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	11.83	4.5	- TNSGGGWWWZR - TNSGGSRWWRZ - TNSGGSWRWZR - TNSGGSWWRZR - TNSGGGWWWGAR
	1434.7830	Q33AV2_ORYSA	48	Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.59	52.4	- TVGGGGGGGGGGFRWR - TVGGGGGGGGGGFWRR - TVGGGGGGGGGGRFWR - TVGGGGGGGGGGRWFR - TVGGGGGGGGGGWFRR
3	1051.5510	Q8LBH6_ARATH	52	Lipoamide dehydrogenase (At3g17240) - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.85	13.7	- RETPVFFR - RETVPFFR - RETAZYZR - RETAYZZR - RETSZFZR

ตารางที่ 14 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
3 (ต่อ)	1334.7710	Q1T5P3_MEDTR	36	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	10.17	26.1	- GLCLZFWGSPAR - GLCLZFWSGPAR - GLCLZWFGSPAR - GLCLZWFSGPAP - LATGWYRSGPAR
4	1035.9020	Q53KL3_ORYSA	50	Hypothetical protein - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	5.84	5.1	- ZGVZVWYR - ZGVZERYR - ZGVZREYR - ZGVZWVYR - ZGVZVYWR
	1036.8990	T08163	39	Malate dehydrogenase (NADP) (EC 1.1.1.82), chloroplast - <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> (fragment)	9.10	19.2	- YZARMLVR - ZYARMLVR - YZAMRLVR - ZYAMRLVR - YZVRFAPR

ตารางที่ 14 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
11	1334.9980	O47411_PANGI	36	Hypothetical protein - <i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng)	9.69	3.0	N/A
	1794.9000	Q5Q0E0_ARATH	55	Hypothetical protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.17	15.7	- CATNGWGSGALSGWG NTR - SSTNGWGSGALSGWG NTR - ACTNGWGSGALSGWG NTR - CATNGWGSLAGSGWG NTR - SSTNGWGSLAGSGWG NTR

ตารางที่ 14 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
11 (ต่อ)	1910.9660	Q75HM1_ORYSA	51	Hypothetical protein OSJNBb0011J16.15 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	9.10	9.4	- CASGAGWGSMLSGW GAGSR - SSSGAGWGSMLSGW GAGSR - ACGAGWGSMLSGW GAGSR - CAGSAGWGSMLSGW GAGSR - SSGSAGWGSMLSGW GAGSR
17	1435.0340	Q2RAM6_ORYSA	45	Ubiquitin-like protein 5, putative, expressed - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	7.82	8.6	N/A

ตารางที่ 14 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
17 (ต่อ)	1449.0610	Q33AJ5_ORYSA	35	Hypothetical protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.18	16.2	- GNLSLPWNVHRR
							- GNLSLPWNVHRH
							- GNLSLPWNHVRR
							- GNLSLPWNHRVR
							- GNLSLPWNRVHR
	1618.2100	Q2PMH6_9ERIC	32	AtpB (Fragment) - <i>Pterostyrax psilophyllus</i>	10.99	2.6	- GGCPMDFYWAMANR
							- GGCPMDFYWAMNA
							R
							- GGCPMDFYWSGGWR
							- GGCPMDFYWSGNER
							- GGCPMDFYWSGENR

4.2.3 ผลแก่

ก. ผลแก่ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

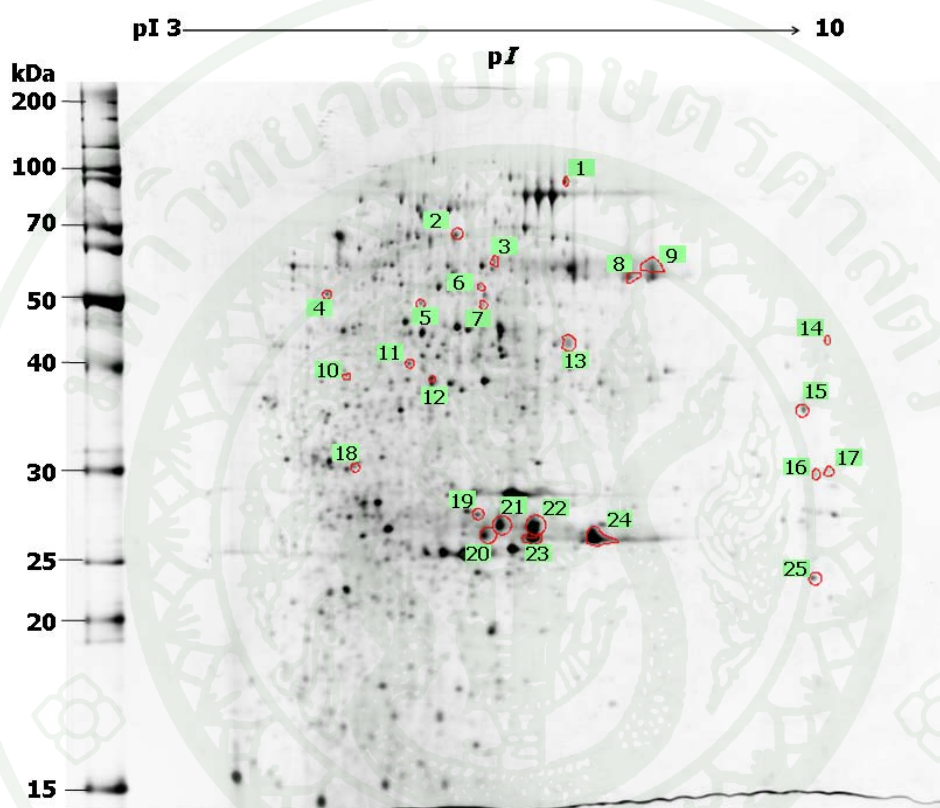
นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของผลแก่มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 25 จุด (ภาพที่ 24) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ค้นหานชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 34 – 58 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 15 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 19 (ค่า score 58) โปรตีนจุดที่ 7 (ค่า score 50) โปรตีนจุดที่ 13 (ค่า score 49) โปรตีนจุดที่ 9 (ค่า score 48) และโปรตีนจุดที่ 8 (ค่า score 47) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหานชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 16) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 16

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 15 และ 16 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

ข. ผลแก้ของมะละกอสายพันธุ์เดิม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของผลแก้มะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 31 จุด มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS (ภาพที่ 25) หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 34 - 64 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 17 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 2 (ค่า score 64) โปรตีนจุดที่ 14 (ค่า score 51) โปรตีนจุดที่ 26 (ค่า score 51) โปรตีนจุดที่ 22 (ค่า score 50) และ โปรตีนจุดที่ 28 (ค่า score 50) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 18) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และ คัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 18

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 17 และ 18 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้



ภาพที่ 24 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 15 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอคัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหานิคของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	6.95	84	Q8MF01_9ASTR	42	Maturase K (Fragment) - <i>Rhodanthe maryonii</i>	9.53	46
2	5.58	65	Q9FLE7_ARATH	42	Dbj BAA95751.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	10.00	32
3	6.09	57	Q7XZW0_ORYSA	37	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
4	4.26	50	Q6K2B9_ORYSA	35	Hypothetical protein OSJNBa0011D16.24 (Hypothetical protein OSJNBa0038I09.36) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.74	22
5	5.11	49	Q1ACM0_CHAVU	44	Magnesium chelatase subunit of protochlorophyllide reductase - <i>Chara vulgaris</i> (Common stonewort)	5.22	40

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เลขที่จุดโปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
6	5.95	52	T07258	43	Cell division protein homolog - <i>Chlorella vulgaris</i> chloroplast	9.44	197
7	5.97	49	Q9FLE7_ARATH	50	Dbj BAA95751.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	10.00	32
8	7.48	59	Q67XP3_ARATH	47	Hypothetical protein At4g28590 (Fragment) - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.29	38
9	7.60	61	Q6K2B9_ORYSA	48	Hypothetical protein OSJNBa0011D16.24 (Hypothetical protein OSJNBa0038I09.36) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.74	22
10	4.54	39	Q9FEP0_9MAGN	46	LYTB-like protein precursor - <i>Adonis palaestina</i>	5.60	52
11	5.02	41	Q9T2Y7_NEPOL	43	Hypothetical protein - <i>Nephroselmis olivacea</i>	10.05	8
12	5.19	38	Q7XZW0_ORYSA	34	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
13	6.82	45	Q1S162_MEDTR	49	F-box protein interaction domain - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	6.81	49
14	9.68	45	Q7XZV9_ORYSA	44	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.31	46
15	9.47	35	BAB10685	47	AB010075 NID - <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.85	44
16	9.58	30	Q6ERL1_ORYSA	42	Hypothetical protein OJ1118_A10.28 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.26	11
17	9.70	30	Q6ZJL1_ORYSA	37	Hypothetical protein OJ1368_G08.7 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.82	8
18	4.52	31	Q7XZV9_ORYSA	36	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.31	46
19	5.74	27	Q9XFD0_WHEAT	58	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
20	6.01	26	Q5K6M3_9ASPA	37	RPS13 - <i>Asparagus</i> sp. Quagliariello 16104	10.54	13
21	6.50	27	Q6K2B9_ORYSA	47	Hypothetical protein OSJNBa0011D16.24 (Hypothetical protein OSJNBa0038I09.36) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.74	22
22	5.96	27	Q32RJ9_ZYGCR	40	Hypothetical chloroplast RF62 - <i>Zygnema circumcarinatum</i> (Green alga)	9.55	49
23	5.95	26	Q8S7H0_ORYSA	41	Hypothetical protein OSJNBa0010I09.28 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.48	50
24	7.02	26	S26876	35	Hypothetical protein 25 (coxIII 5'region) - rice mitochondrion	9.50	22
25	9.55	23	Q9T2Y7_NEPOL	42	Hypothetical protein - <i>Nephroselmis olivacea</i>	10.05	8

ตารางที่ 16 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
7	1050.1260	Q259K3_ORYSA	50	H0402C08.10 protein - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	5.81	20.1	- TCHMWCNR - TCHMWNCR - TCHWMCNR - TCHWMNCR
	1765.8350	Q1RSZ8_MEDTR	45	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	7.82	5.6	- TTMPWFPGGGGGGGG GCGGR - TTNNWFPGGGGGGGG GCGGR - TTPMWFPGGGGGGGG GCGGR - TTDPWYPGGGGGGGG GCGGR - TTPDWYPGGGGGGGG GCGGR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
7 (ต่อ)	1826.9260	Q95CW1_9FILI	52	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment) - <i>Hymenophyllum hirsutum</i>	6.54	48.7	- AGRSCMWPEAZYGSZR - AGRSCMWPEAZYGTNR - AGRSCMWPEAZYGNTR - AGRSCMWPEAZYGZSR - AGRSCMWPEAZYASNR
8	1796.7610	Q2TKU1_9DIPS	52	CYCLOIDEA-like (Fragment) - <i>Leycesteria formosa</i>	8.93	12.6	- ZFGGGWGCPNCGWGG GTR -ZFGGGWGCPNCGWGG ASR - ZFGGGWGCPNCGWGA GSR - ZFGGGWGCNPCGWGG GTR - ZFGGGWGCNPCGWGG ASR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
8 (ต่อ)	1853.7890	Q6YSW5_ORYSA	56	Hypothetical protein B1032F05.8 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.18	20.6	- ZFNAGGTSSLNSGDGA NTR - ZFNAGGTSSLNSGDAG NTR - ZFNAGGTSSLNSGEGG NTR - ZFNAGGTSSLNSADGG NTR - ZFNAGGTSSLNSDGGGA NTR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
8 (ต่อ)	1910.8160	Q9LRN9_ARATH	66	Gb AAC33212.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.10	21.6	- TGCZAEASGCLLTGDN ZSR - TGCZAEASGCLLTGDN NTR - TGCZAEASGCLLTGDN SZR - TREECCWLLTGDNZSR - TREECCWLLTGDNNTR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
8 (ต่อ)	2384.0050	Q6UUM1_ORYSA	48	Hypothetical protein (Fragment) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.54	17.8	- ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHGGR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHGGR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHPMR - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHVER - ACARGLZGGGGGGGG GVWWGCHLDR
9	1051.5790	Q6ZL82_ORYSA	47	Hypothetical protein OJ1115_C05.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.57	18.6	- TZRTWTCR - TZRMRTCR - TZRRMTCR - TZRWTTTCR - ZRTTWTCR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
9 (ต่อ)	1794.6860	Q60DS5_ORYSA	52	Hypothetical protein B1140B01.12 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	4.48	9.4	- CATNGWTGDLSGWGLTF - SSTNGWTGDLSGWGLTR - ACTNGWTGDLSGWGLTF - CATNGWWSLSGWGLTR - SSTNGWWSLSGWGLTR
	2384.0440	Q94JF1_ORYSA	45	Hypothetical protein P0684B02.24-1 (Hypothetical protein P0692C11.5- 1) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.82	20.7	- APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHGFR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHTCR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHCTR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSGHFGR - APRTFGSGGGGGGVW HWGSHGGFR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

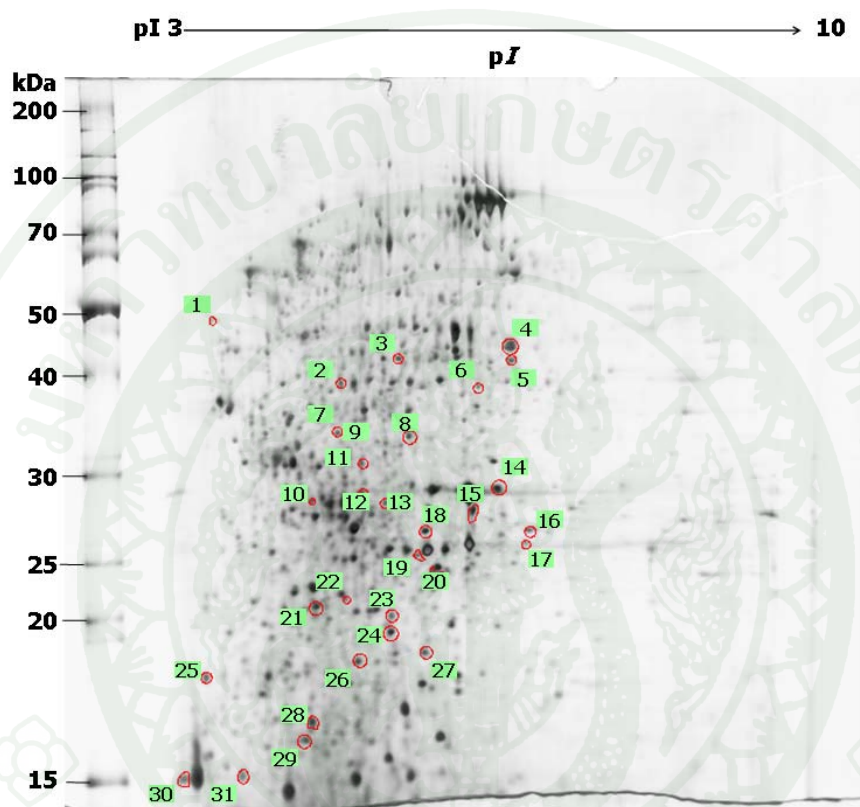
โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
13	1519.6850	HHPM21	52	Heat shock protein 21 precursor - garden pea	6.36	26.2	- LFGGSLRRGSSZR - LFGGSLRRGSTNR - LFGGSLRRGSNTR - LFGGSLRRGSZSR - LFGGSLRRGCAZR
	1590.7340	Q69L53_ORYSA	49	Hypothetical protein OSJNBa0092O08.17 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group).	8.53	6.3	- HFCASPYYAMGGMR - HFCASPYYAMGSTR - HFCASPYYAMGTSR - HFCASPYYAMGMGR - HFCASPYYAMAACR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
13 (ต่อ)	2247.1000	Q2R8I5_ORYSA	40	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	5.41	29.2	- LGHZNLDVHNSMTHLN FNR - LGHZNLHTMSNHVDL NGGFR - LGHZNLHTMSNHVDL NGFGR - LGHZNLHTMSNHVDLN SSSR - LGHZNLHTMSNHVDLN NFR
19	1082.0930	Q6QVC5_PHAVU	50	Ribonuclease H (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	9.37	5.6	- CCYDNDHGR

ตารางที่ 16 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
19 (ต่อ)	1439.8640	Q49IC5_ZEAMP	46	Teosinte glume architecture 1 (Fragment) - <i>Zea mays</i> subsp. parviglumis (Balsas teosinte)	7.57	15.4	- LYLAAGRYAASGAR - LYLAAGRYAASAGR - LYLAAGRYAASZR - LYLAAGRYAATGGR - LYLAAGRYAATNR
	1567.8070	Q6YVB3_ORYSA	52	Hypothetical protein OSJNBa0005C24.16 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	12.38	17.6	- THNPWWLPGGCGSR - THNPWLWPGGCGSR - THNPLWWPGGCGSR - THPNWWLPGGCGSR - THPNWLWPGGCGSR



ภาพที่ 25 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 17 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่มะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายคัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหาลำดับของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	3.94	49	Q53LU0_ORYSA	42	RWP-RK domain, putative - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.35	71
2	4.79	38	Q9XFD0_WHEAT	64	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold- responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
3	5.21	42	Q9XFD0_WHEAT	44	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold- responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
4	6.80	44	Q5N766_ORYSA	42	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase- like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	8.73	16

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
5	6.81	42	Q9XFD0_WHEAT	41	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
6	6.28	37	Q1SKK1_MEDTR	39	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, N-terminal - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	8.69	64
7	4.77	33	Q7XZW0_ORYSA	46	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
8	5.68	34	Q8L8R9_ARATH	36	MFP1 attachment factor 1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	4.47	17
9	5.23	32	Q7XX72_ORYSA	41	OSJNBb0115I21.8 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.58	100

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
10	4.64	27	Q5WMN9_ORYSA	44	Hypothetical protein OSJNBa0053E01.16 (Hypothetical protein OJ1116_F05.13) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.41	67
11	5.12	32	Q5N7R8_ORYSA	35	Myosin heavy chain-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.45	50
12	5.11	26	Q1S8Q1_MEDTR	48	PWWP; Regulation of nuclear pre-mRNA protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	8.65	114
13	5.82	27	Q5N766_ORYSA	49	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase- like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	8.73	17
14	6.21	28	Q8S6U6_ORYSA	51	Putative transposase (Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub- class) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group).	8.87	58

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
15	6.14	27	Q5N766_ORYSA	45	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.73	17
16	6.95	25	Q7XZV9_ORYSA	44	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.31	46
17	6.95	27	Q5N766_ORYSA	37	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.73	17
18	5.71	26	S29970	46	Desiccation-related protein (clone PCC27-45) - <i>Craterostigma plantagineum</i>	5.90	16
19	5.84	25	Q6Y2H6_MUSBA	37	ORFIII-like polypeptide (Fragment) - <i>Musa balbisiana</i> (Banana)	9.11	21

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เลขที่จุดโปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
20	6.06	23	Q9XFD0_WHEAT	45	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
21	4.68	22	T07853	48	Probable fructose-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) (clone pFBPB) - rape	5.31	37
22	5.00	21	Q7XZW0_ORYSA	50	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
23	5.36	20	Q657D6_ORYSA	37	Nematode responsive protein-like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.40	43
24	5.36	21	Q56Y41_ARATH	40	Hypothetical protein At1g29240 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.70	65
25	3.75	18	Q5WQY1_9ASPA	40	Maturase K (Fragment) - <i>Neocogniauxia hexaptera</i>	9.76	53
26	5.38	19	BAB01450	51	AP000604 NID - <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.22	54

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
27	6.20	19	Q69RP0_ORYSA	49	Hypothetical protein OSJNBb0055I24.112 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	12.35	19
28	4.73	17	Q7XZW0_ORYSA	50	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
29	4.62	16	Q7XZV9_ORYSA	47	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.31	46
30	3.03	15	Q7XZW0_ORYSA	50	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
31	3.93	15	Q5N766_ORYSA	49	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase- like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group).	8.73	17

ตารางที่ 18 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างผลแก่ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
2	1034.3030	ABF96199	40	DP000009 NID - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.14	15.6	- GHZCFTWR - GHZCTFWR - CPZPRDYR - TVZPRDYR - VTZPRDYR
	1277.3140	Q5JL90_ORYSA	42	Hypothetical protein OSJNBa0047D12.33 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.22	9.4	- PZECNZYCHR - PZECNZYHCR - PZECNHWAHR - PZECNHWHAR - PZECNYZCHR - PZECNYZHCR

ตารางที่ 18 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
14	1050.2720	Q8L905_ARATH	37	Hypothetical protein - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	9.73	11.7	- NPDCMWER - PNDCMWER - NPCDMWER - PNCDMWER - NPDCMEWR
	1066.2520	Q53KL3_ORYSA	45	Hypothetical protein - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	5.84	5.1	N/A
	1082.2210.	Q9LTW7_ARATH	50	Zinc finger protein-like - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	8.25	36.2	- TFLZTZRVR - TFLZTRZVR - TFLZTRZVR - TFLZTRZZVR - FTLZTZRVR - FTLZTRZVR

ตารางที่ 18 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
22	1082.0930	Q6QVC5_PHAVU	50	Ribonuclease H (Fragment) - <i>Phaseolus vulgaris</i> (Kidney bean) (French bean)	9.37	5.6	- CCYDNDHGR
	1439.8640	Q49IC5_ZEAMP	46	Teosinte glume architecture 1 (Fragment) - <i>Zea mays</i> subsp. parviglumis (Balsas teosinte)	7.57	15.4	- LYLAAGRYAASGAR - LYLAAGRYAASAGR - LYLAAGRYAASZR - LYLAAGRYAATGGR - LYLAAGRYAATNR
	1567.8070	Q6YVB3_ORYSA	52	Hypothetical protein OSJNBa0005C24.16 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	12.38	17.6	- THNPWWLPGGCGSR - THNPWLWPGGCGSR - THNPLWWPGGCGS R - THPNWWLPGGCGSR - THPNWLWPGGCGSR

ตารางที่ 18 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
26	1051.7290	Q6ZL82_ORYSA	43	Hypothetical protein OJ1115_C05.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.57	18.8	- TZRLYSZR - TZRYLSZR - TGARYLSZR - TGARLYSZR - TZRZHLLR
	1066.1010	Q2QVB0_ORYSA	42	Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	4.95	22.6	N/A

ตารางที่ 18 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
26 (ต่อ)	1791.8120	Q2HS32_MEDTR	55	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	7.85	7.2	- CAMPWWGGGGGGG GEAR - SSMPWWGGGGGGG GEAR - ACMPWWGGGGGGG GEAR - CAEVWWGGGGGGG GEAR - SSEVWWGGGGGGG GEAR
28	1050.1640	Q5QNF1_ORYSA	45	Hypothetical protein P0665D10.11 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.42	12.3	- TFDCDFYR - TFDCDYFR - TFCDDFYR - TFCDDYFR - TFDCMMYR

ตารางที่ 18 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
28 (ต่อ)	1066.1410.	Q1S6P2_MEDTR	40	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	9.30	23.8	N/A
	1277.1620	Q8W415_TOBAC	42	CIG1 - <i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	7.57	55.1	N/A

4.2.4 ราก

ก. รากของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากรากมะละกอสายพันธุ์เดิม จำนวน 27 จุด (ภาพที่ 26) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยนำ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 38 – 52 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 19 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 50) โปรตีนจุดที่ 14 (ค่า score 50) โปรตีนจุดที่ 1 (ค่า score 49) โปรตีนจุดที่ 5 (ค่า score 48) และโปรตีนจุดที่ 10 (ค่า score 45) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีนยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 20) เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo* sequencing วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 20

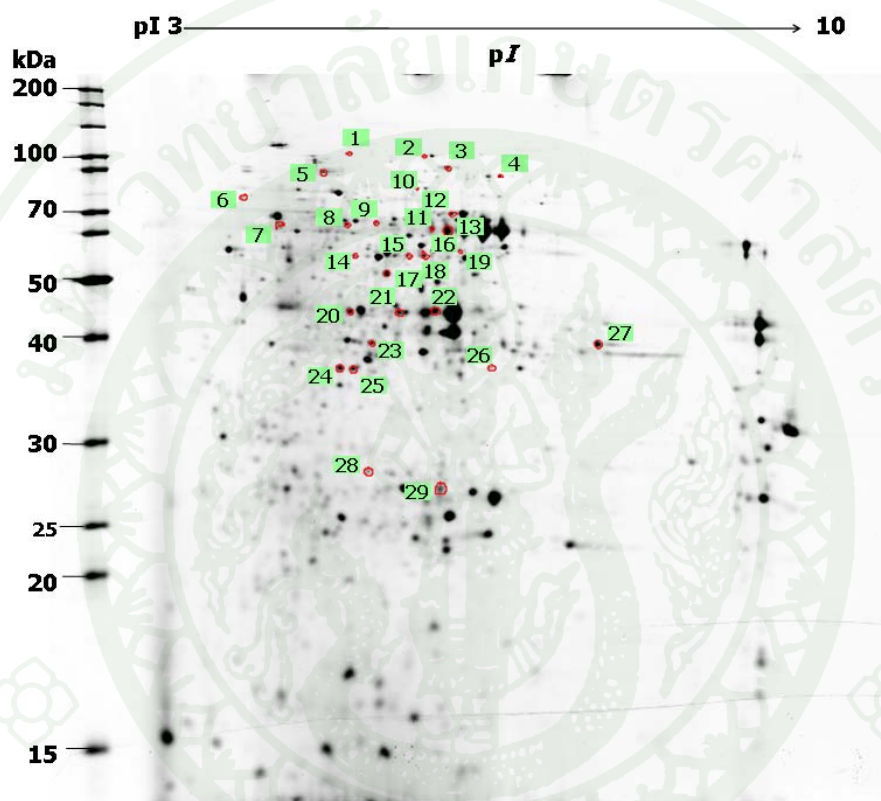
นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo* sequencing ในตารางที่ 19 และ 20 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซนต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

ข. รากของมะละกอสายพันธุ์เดิม

นำจุดโปรตีนจาก 2-D PAGE ของรากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 11 จุด (ภาพที่ 27) มาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน

ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS หลังจากนั้น วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างโดยเทคนิค PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า มีค่า MOWSE score อยู่ระหว่าง 40 - 50 โดยไม่มีโปรตีนใดมีค่า MOWSE score มากกว่า 65 ดังตารางที่ 21 จากนั้น คัดเลือกโปรตีนที่มีค่า MOWSE score มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ โปรตีนจุดที่ 11 (ค่า score 50) โปรตีนจุดที่ 4 (ค่า score 48) โปรตีนจุดที่ 6 (ค่า score 46) โปรตีนจุดที่ 10 (ค่า score 45) และโปรตีนจุดที่ 1 (ค่า score 43) วิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry โดยนำ m/z peak ที่มีค่ามากที่สุดสามอันดับแรกของแต่ละโปรตีน มาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งด้วย MS เพื่อให้ได้ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า ทุกโปรตีน ยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับ ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก (ตารางที่ 22) เมื่อนำมา วิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo sequencing* วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบ ต่างๆ และคัดเลือกรูปแบบการเรียงตัวที่วิเคราะห์ได้ห้าอันดับแรกแสดงดังตารางที่ 22

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดย โปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย เทคนิค *de novo sequencing* ในตารางที่ 21 และ 22 มาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรด อะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไป ตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูล ที่ สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรด อะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้



ภาพที่ 26 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างรากในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรม ที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอสายพันธุ์เดิม

ตารางที่ 19 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหานิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.00	100	Q27TU3_9LAMI	49	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
2	5.85	95	S41909	41	hypothetical protein phyD region pseudogene - <i>Arabidopsis thaliana</i>	4.65	1
3	6.23	84	Q1SRF3_MEDTR	43	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	10.79	11
4	6.61	78	Q27U09_9LAMI	50	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cumana</i>	8.49	17
5	4.72	83	Q27U09_9LAMI	48	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cumana</i>	8.49	17
6	4.18	74	Q27TU3_9LAMI	40	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17

ตารางที่ 19 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
7	4.41	66	Q27TU3_9LAMI	43	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
8	5.04	64	Q27TU3_9LAMI	43	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
9	5.18	65	Q27TU3_9LAMI	43	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
10	5.59	74	S52024	45	GTP-binding protein bra - rape	6.00	24
11	5.48	65	Q27TZ1_9LAMI	38	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cernua</i>	8.00	17
12	5.96	69	Q2QMK5_ORYSA	42	Leucine Rich Repeat family protein, expressed - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	8.54	62
13	6.20	69	Q27TU3_9LAMI	46	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17

ตารางที่ 19 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
14	5.02	55	B84870	50	Probable molybdopterin synthase large subunit [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	5.76	22
15	5.33	54	Q850L7_ORYSA	39	Putative TNP2 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.40	125
16	5.75	55	Q7XZW0_ORYSA	45	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.12	42
17	5.51	50	Q7XZV9_ORYSA	42	Hypothetical protein OSJNBb0094O03.10 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.31	46
18	6.10	50	Q27TU3_9LAMI	52	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
19	6.15	52	Q27U09_9LAMI	46	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cumana</i>	8.49	17
20	5.02	45	Q27TU3_9LAMI	48	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17

ตารางที่ 19 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
21	5.41	43	CAA93121	45	HLHOLLIGN NID - <i>Holcus lanatus</i>	5.65	27
22	5.75	43	Q27TZ1_9LAMI	43	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cernua</i>	8.00	17
23	5.26	37	Q9SGP9_ARATH	42	F3M18.5 (Hypothetical protein) (At1g28510/F3M18_5) - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress).	9.58	19
24	4.73	37	Q6YXH5_ORYSA	42	Putative ZF-HD homeobox protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.01	30
25	5.05	37	Q27TU3_9LAMI	42	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17
26	6.31	37	Q6YXH5_ORYSA	39	Putative ZF-HD homeobox protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	7.01	30
27	7.54	39	Q27TU3_9LAMI	42	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha crenata</i>	9.04	17

ตารางที่ 19 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
28	5.1	28	Q27U09_9LAMI	39	Reverse transcriptase (Fragment) - <i>Orobancha cernua</i> var. <i>cumana</i> .	8.49	17
29	6.0	26	Q850L7_ORYSA	45	Putative TNP2 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.40	124

ตารางที่ 20 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างจากมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะให้ผลที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
1	1046.0290	Q8LR65_ORYSA	37	RING zinc finger protein – like - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.34	34.4	- TTVPWEYR - TTVPWYER - TTVWPEYR - TTVWPYER - TLSPWEYR
	1051.6230	Q1SXH4_MEDTR	35	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	10.19	11.8	- NATGAALYWPDR - NATGAALYWVLR - NATGAALYWLVR - NATGAALYWDPR - NATGAALWYPDR

ตารางที่ 20 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
1 (ต่อ)	1151.5770	Q1SZ89_MEDTR	33	WRKY DNA-binding domain, putative - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	7.67	29.1	- TNNHZWTAMSCR - TNNHZWTAMCSR - TNNHZWTVCSR - TNNHZWTVCCSR - TNNHZWTTTSCR
4	1042.8810	Q3EBH8_ARATH	34	Protein At2g42540 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.62	13.4	N/A
	1151.9900	Q6Z541_ORYSA	39	Putative zinc finger protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.17	22.9	N/A
	1335.2010	Q7FAY5_ORYSA	45	OSJNBa0015K02.20 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.85	21.7	N/A

ตารางที่ 20 (ต่อ)

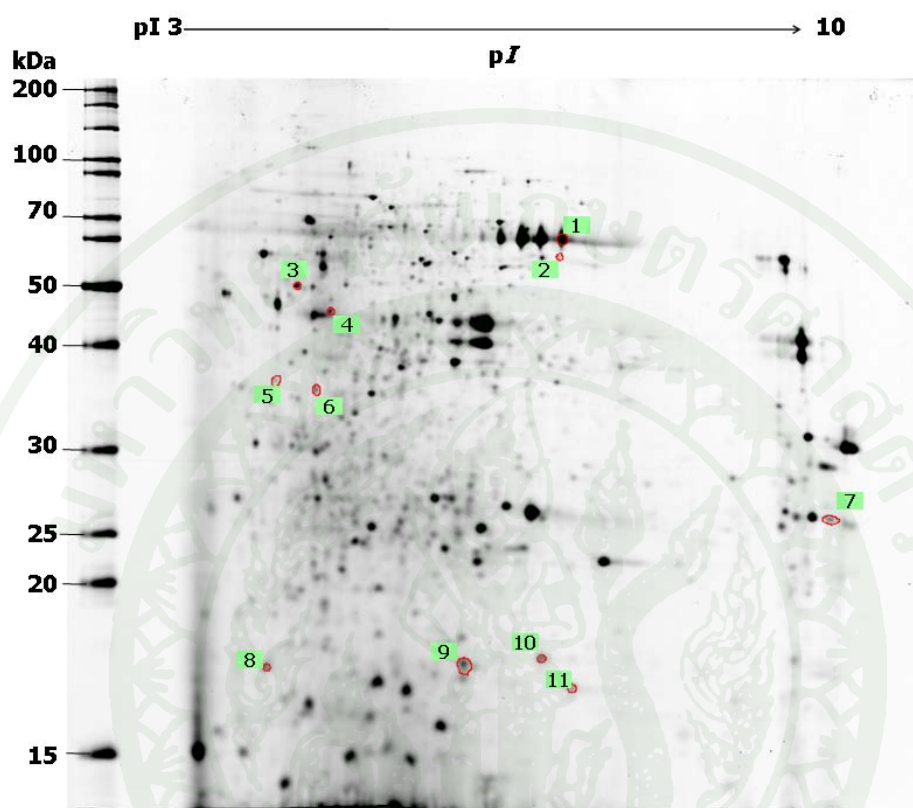
โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
5	1133.7440	Q8W2E2_SOYBN	42	Putative resistance gene analog (Fragment) - <i>Glycine</i> <i>max</i> (Soybean)	8.81	19.1	N/A
	1256.8850	Q2R3S0_ORYSA	41	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.24	16.5	N/A
	1528.0020	Q5Z4M4_ORYSA	57	Putative ribosomal protein L15 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.76	20.1	N/A
10	1617.4840	CAC43683	40	Sequence 97 from Patent WO0144476 (Fragment) - <i>Physcomitrella patens</i> (Moss)	5.48	11.7	N/A

ตารางที่ 20 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
10 (ต่อ)	1810.0030	Q6WIX2_9SOLA	49	S1 self-incompatibility locus-linked pollen G211 protein - <i>Petunia inflata</i>	8.84	28.7	N/A
	1825.9860	Q85Y44_9MYRT	45	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment) - <i>Olinia vanguerioides</i>	6.07	6.2	N/A
14	1051.8120	Q3EBH8_ARATH	36	Protein At2g42540 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.62	13.4	N/A
	1151.9080	Q2R8T2_ORYSA	35	BZIP transcription factor family protein, expressed - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	9.37	40.2	N/A

ตารางที่ 20 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
14 (ต่อ)	1335.1590	Q9FRC0_ORYSA	44	Putative cytochrome P450- related protein, 3'-partial (Fragment) - <i>Oryza sativa</i> (Rice)	9.45	20.9	N/A



ภาพที่ 27 จุดโปรตีนบน 2-D PAGE เมื่อใช้ Gel strip ขนาด 18 เซนติเมตร และย้อมด้วยวิธี silver staining ของตัวอย่างผลแก่ในระยะให้ผล อายุ 270 วัน ของมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากจุดโปรตีนของมะละกอคัดแปลงพันธุกรรม

ตารางที่ 21 โปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอสายตัดแปลงพันธุกรรมในระยะให้ผล เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF/TOF MS และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค PMF ผ่านการค้นหานี้ของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE		ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)				
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	6.81	65	Q1SRF3_MEDTR	43	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	10.79	11
2	6.81	63	Q9XFD0_WHEAT	42	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold- responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
3	3.98	50	Q5N766_ORYSA	43	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase- like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar- group)	8.73	17
4	4.18	46	Q9XFD0_WHEAT	48	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold- responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18

ตารางที่ 21 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
5	3.81	37	Q5N766_ORYSA	42	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.73	17
6	4.18	36	A96680	46	hypothetical protein F5I14.5 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.22	26
7	9.79	27	Q5N766_ORYSA	42	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.73	17
8	3.56	18	Q9XFD0_WHEAT	40	ABA-inducible protein WRAB1 (Cold-responsive LEA/RAB-related COR protein) - <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	8.63	18
9	5.41	18	Q5N766_ORYSA	40	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.73	17

ตารางที่ 21 (ต่อ)

เลขที่จุด โปรตีน	ค่าจาก 2-D PAGE			ค่าจากการค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF)			
	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
10	6.47	18	Q850L7_ORYSA	45	Putative TNP2 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	8.40	125
11	6.80	17	Q1SYH9_MEDTR	50	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	5.78	18

ตารางที่ 22 ลำดับกรดอะมิโนเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค *de novo sequencing* ของโปรตีนที่จำแนกได้จากตัวอย่างรากมะละกอสายพันธุ์เดิมที่แตกต่างจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่มีค่า MOWSE score สูงที่สุดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PMF 5 อันดับแรก

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
1	1051.8710	Q1SU18_MEDTR	43	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	4.94	16.3	N/A
	1335.0180	Q84ZA9_ORYSA	42	Hypothetical protein P0705A05.115 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	10.23	8.3	N/A
	1826.9320	Q93XW9_ARATH	64	Hypothetical protein At1g50570; F17J6.9 (Hypothetical protein At1g50570) - <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> (Mouse-ear cress)	6.03	34.0	N/A

ตารางที่ 22 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
4	1151.8010	Q9AU99_AETGR	37	Chalcone synthase (Fragment) - <i>Aethionema grandiflora</i> (Persian stone- cress)	5.80	1.4	N/A
	1335.0120	Q1RXV8_MEDTR	42	Hypothetical protein - <i>Medicago truncatula</i> (Barrel medic)	4.85	12.7	N/A
	1449.0780	Q2A9S8_BRAOL	40	Hypothetical protein - <i>Brassica oleracea</i> (Wild cabbage)	10.69	11.3	N/A
6	1334.7960	Q7FAY5_ORYSA	40	OSJNBa0015K02.20 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.85	21.7	N/A

ตารางที่ 22 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
6 (ต่อ)	1448.8630	Q9FKK8_ARATH	46	<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MUA2 - <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> (Mouse-ear cress)	5.37	5.7	N/A
	1617.9960	Q5NAU8_ORYSA	39	Hypothetical protein P0462H08.22 (Hypothetical protein P0462H08.19) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	11.20	14.8	N/A
10	1007.6170	Q5MCR1_VOLCA	43	Chloroplast-specific ribosome-associated protein - <i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	10.03	25.0	N/A
	1106.1080	Q94LS0_ORYSA	37	Hypothetical protein OSJNBb0011A08.19 - <i>Oryza</i> <i>sativa</i> (japonica cultivar- group)	11.80	11.8	N/A

ตารางที่ 22 (ต่อ)

โปรตีน เลขที่	m/z	accession no.	MOWSE score	Protein match	pI	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลำดับกรดอะมิโน
10 (ต่อ)	1151.7610	T03709	40	Reverse transcriptase homolog - rice retrotransposon Tos7 (fragment)	9.05	9.3	N/A
11	1106.1080	Q8LHQ0_ORYSA	41	Hypothetical protein OJ1008_F01.17 - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	12.27	24.5	N/A
	1334.9730	Q7FAY5_ORYSA	41	OSJNBa0015K02.20 protein - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	6.85	21.7	N/A
	1449.0930	Q8H8L2_ORYSA	37	Putative Tam1 transposon protein TNP2 (Transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class) - <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	4.47	15.4	N/A

4.3 สรุปผลการจำแนกชนิดของโปรตีนที่แตกต่างด้วยเครื่อง MALDI -TOF/TOF MS

จากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยใช้เครื่อง MALDI -TOF/TOF MS ได้ผลลัพธ์เป็น Peptide Mass Fingerprint (PMF) นำ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า โปรตีนที่ค้นหาทั้งหมดนั้น ยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนว่าเป็นโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล อีกทั้ง ชนิดของโปรตีนที่คำนวณนั้นยังไม่พบเป็นโปรตีนของมะละกอ อย่างไรก็ดี เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่จำแนกได้ทั้งหมดมาตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ (allergen) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

เมื่อคัดเลือก m/z peak ของ PMF ที่มี intensity สูงสุดสามอันดับแรก มาแตกเป็นอนุพันธ์เล็กๆ ด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry เมื่อนำไปค้นหาเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนในฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT อีกครั้ง พบว่า ยังมีค่า MOWSE score ไม่ถึงข้อมูล 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่ได้ไม่ตรงกับค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ PMF ในครั้งแรก เมื่อนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค *de novo* sequencing ด้วยการนำ m/z peak ที่มี intensity สูงสุดสามอันดับแรกของ MS-MS spectra วิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ด้วยโปรแกรม Flex-analysis (Bruker Daltonics, Massachusetts, UK) และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ทุกลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์จากเทคนิค *de novo* sequencing ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

จึงสรุปได้ว่า รูปแบบของโปรตีนบน 2-D PAGE จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์เขกนวล 116/5 รุ่น R_4 และมะละกอสายพันธุ์เดิมมีรูปแบบที่สอดคล้องกัน และจุดของโปรตีนส่วนใหญ่มีความเหมือนกัน มีเพียงบางจุดของโปรตีนที่มีความแตกต่าง แต่โปรตีนเหล่านั้นไม่เป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้

วิจารณ์

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV (PRSV-CP) ที่เกิดจากยีนที่สอดแทรก (insert) เข้าไปใหม่ในโครโมโซมของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แแกนวล 116/5 รุ่น R₄ ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติซีรัมต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV ชนิด polyclonal เตรียมจากกระต่าย ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในขณะที่ตัวอย่างที่เป็น positive control ที่ได้จากใบมะละกอฟื้นธุ์เดิมที่ติดไวรัส ตรวจพบการแสดงออกเป็นโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 – 36 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ที่รายงานโดย Hema และ Prasad (2004) แสดงว่าเทคนิค Western blot ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ได้ แต่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แแกนวล 116/5 รุ่น R₄ ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในทุกส่วนของต้น ทั้งใบอ่อน ใบแก่ ดอก ผล และราก

ทั้งนี้ มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานโรคใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R₄ ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ Phironrit *et al.* (2009) รายงานการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน PRSV-CP โดยวิธี Southern blot พบว่า มะละกอมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส PRSV และพบว่ามียีน PRSV-CP สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมของมะละกอ นอกจากนั้น Chowpongpan *et al.* (2002) รายงานว่า โดยวิธี Northern blot ไม่พบสาย mRNA ที่มีขนาดเต็มสาย (full length mRNA) แต่พบ small interference RNA (siRNA) ขนาดเล็กประมาณ 21 – 24 เบส และเมื่อทำการตรวจสอบ mRNA ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RT-PCR สามารถตรวจพบ mRNA ที่มีขนาดเต็มสายได้ (Warin *et al.*, 2007) จากการศึกษาทั้งหมดแสดงว่า ยีนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV มีการสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชแล้ว และยังสามารถแสดงออกที่ระบบ mRNA ได้ แต่ตรวจไม่พบการแสดงออกเป็นโปรตีน อันเป็นผลมาจากกลไก post-transcriptional gene silencing หรือ RNA interference (RNAi) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนจากดีเอ็นเอเป็น mRNA แต่ไม่เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน อันเนื่องมาจาก mRNA ถูกย่อยสลายเป็น RNA ขนาดเล็ก 21 – 24 เบส (Baulcombe *et al.*, 1986) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Nomura *et al.* (2004) ที่ทำการทดลองการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มไวรัส Turnip mosaic virus (TuMV) ใน *Arabidopsis thaliana* พบว่า *A. thaliana* ที่ได้รับการถ่ายยีน

TuMV-CP gene เมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของดีเอ็นเอในพืชด้วยวิธี Southern blot สามารถตรวจพบยีน TuMV-CP แต่เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มไวรัส ด้วยวิธี Western blot กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจพบการเกิด small interference RNA (siRNA) ด้วยวิธี Northern blot พบ siRNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ TuMV-CP gene เป็นผลมาจากกลไก RNAi เช่นเดียวกัน

ดังนั้น การตรวจไม่พบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRAV อาจมีสาเหตุมาจากกลไก RNAi ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจไม่พบการแสดงออกยังสามารถเกิดจากสาเหตุอื่น ได้แก่ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ที่มีเกิดการย่อยสลาย (protein degradation) หรือโปรตีนมีปริมาณที่ต่ำกว่า 0.5 ไมโครกรัมซึ่งต่ำกว่าพิสัยความไว (sensitivity) ของเทคนิค Western blot ปกติจะสามารถตรวจจับได้ (Hames, 2002)

ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nptII* ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แยกแวน 116/5 รุ่น R₄ สามารถตรวจพบโปรตีนนี้ในทุกส่วนของพืช ดัดแปลงพันธุกรรม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kositratana *et al.* (2007) ซึ่งพบว่า มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แยกแวน 116/5 รุ่น R₄ มีการสอดแทรกยีน *nptII* ในโครโมโซมโดยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน พบว่า โปรตีน NPTII มีการแสดงออกมากที่สุดเนื้อเยื่อของส่วนใบ รองลงมา ได้แก่ ในราก ผล และดอก ตามลำดับ

อนึ่ง ในกระบวนการสร้างมะละกอแยกแวนดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แยกแวน 116/5 รุ่น R₄ ใช้ CaMV 35S เป็นโปรโมเตอร์ (นุชนาถ และคณะ, 2546) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ชนิด constitutive promoter ซึ่งยีนที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ชนิดนี้จะสามารถแสดงออกในทุกส่วนของพืช และตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีสิ่งใดมากระตุ้น (Chen *et al.*, 1988) แต่มีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่พบว่า CaMV 35S มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน และไม่ได้แสดงออกตลอดเวลา ดังเช่นงานวิจัยของ Sunilkumar *et al.* (2002) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Green fluorescence protein (*GFP*) ที่ถูกควบคุมการทำงานด้วยโปรโมเตอร์ CaMV 35S ในฝ้าย โดยพบว่า ในระยะแรกของกระบวนการพัฒนาเอมบริโอ ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออก แต่จะเริ่มพบการแสดงออกเมื่อเอมบริโอมีการพัฒนาของ hypocotyl และ cotyledon

แล้ว ส่วนในระยะพัฒนาของฝ้ายเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วพบว่า มีการแสดงออกได้ในอวัยวะทุกส่วน แต่มีระดับการแสดงออกไม่เท่ากัน และนอกจากนี้ยังมีอีกหลายการทดลองในทำนองเดียวกันที่ใช้พืชต่างชนิด แต่ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน เช่นการทดลองใน ยาสูบ (Williamson *et al.*, 1989) ถั่วเหลือง (Yang and Christou, 1990) และข้าว (Terada and Shimamoto, 1990) เป็นต้น ทำให้มีการเสนอแนวคิดว่า โปรโมเตอร์ชนิด constitutive promoters ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมในทุกส่วนของพืช และตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีสิ่งใดกระตุ้น (Chen *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตาม CaMV 35S อาจมีการแสดงออกไม่เท่ากันหรือแสดงออกเฉพาะในบางส่วนของพืช (Benfey and Chua, 1989) โดยพบตัวอย่างในการทดลองในยาสูบ (Williamson *et al.*, 1989) ถั่วเหลือง (Yang and Christou, 1990) และข้าว (Terada and Shimamoto, 1990) เป็นต้น และเป็นไปได้ว่าเกิดปรากฏการณ์นี้ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานไวรัสวงแหวนสายพันธุ์แขนวล 116/5 รุ่น R₄

สำหรับวิธี Western blot เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบโปรตีนเป้าหมาย โดยหากพบการแสดงออกของโปรตีนจากยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป จะต้องนำมาพิจารณาถึงความปลอดภัยของโปรตีนชนิดนั้น สำหรับโปรตีน NPTII ที่พบแสดงออกในการวิจัยครั้งนี้ มีการศึกษาข้อมูลโดยสำนักงานความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority, 2007) และได้รับรองให้เป็นยีนต้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ โดยจะพบยีนนี้ในแบคทีเรียที่อยู่ในดินทั่วไป และสารปฏิชีวนะชนิดนี้ไม่ได้มีการใช้รักษาโรคของมนุษย์อย่างแพร่หลายเหมือนในอดีตแล้ว จึงมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและการบริโภค

จากนั้นศึกษาทางโปรตีโอมิกส์เพิ่มเติม โดยใช้เทคนิค 2-D PAGE หากความแตกต่างของโปรตีนระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม แล้ววิเคราะห์ระบุชนิดของโปรตีนที่แตกต่างด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS พบความแตกต่างของจุดโปรตีนระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมอยู่ในช่วง 1.28 - 5.54 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ ความแตกต่างของโปรตีนในการทดลองอาจเกิดจากสาเหตุ ดังนี้

1. ความแปรปรวนระหว่างเจลต่อเจลในการแยกโปรตีนในระนาบที่ 2 เนื่องจาก วิธีการตรวจสอบมีความไวในการตรวจสอบโปรตีนสูง (ระดับนาโนกรัม) เมื่อย้อมด้วย silver staining ดังนั้น การทำซ้ำ (replication) ของตัวอย่างจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเป็นมาตรฐานควบคุม

กรรมวิธี ดังเช่นในการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนระหว่างซ้ำในแต่ละกรรมวิธี (treatment) ของการทดลอง พบว่า มีค่าความแตกต่างที่ใกล้เคียง กับค่าความแตกต่างระหว่างโปรตีนของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ดังตารางที่ 23 ดังนั้นความแตกต่างของโปรตีนระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิมไม่ได้สูงไปกว่าค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความแปรปรวนระหว่างซ้ำของการทดลองโดยเทคนิค 2-D

PAGE

2. โปรตีโอมิกส์เป็นการศึกษาโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ที่จีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตแสดงออก (express) ณ เวลาหนึ่ง ดังนั้น การเก็บตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบจะต้องมีอายุเท่ากันทั้งต้นพืชและชิ้นส่วนของพืช และอยู่ในระยะการเจริญเติบโต (developmental stage) เดียวกัน จากการทดลองพบว่า 2-D PAGE ของใบมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้ากับใบมะละกอในระยะให้ผล มีรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 8 และ 9)

3. ความแตกต่างของสายพันธุ์เป็นปัจจัยสำคัญของรูปแบบโปรตีนที่แตกต่าง จากการทดลองของ Lehesranta *et al.* (2005) เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) พบว่า มันฝรั่งสายพันธุ์ที่ต่างกัน และปลูกในพื้นที่ที่ต่างกัน จะมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของโปรตีนสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มันฝรั่งที่ดัดแปลงพันธุกรรมกับสายพันธุ์ที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม ที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเพียง 1.28 เปอร์เซ็นต์

4. สภาพการปลูกพืช จากรายงานของ Carpillo *et al.* (2004) เปรียบเทียบโปรตีโอมิกส์ระหว่างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมและมะเขือเทศสายพันธุ์เดิม โดยปลูกพืชในสภาพห้องควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ไม่พบความแตกต่างของโปรตีนทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ในขณะที่ Lehesranta *et al.* (2005) รายงานว่า รูปแบบโปรตีนของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ที่ปลูกแปลงที่พื้นที่ต่างกัน จะพบความแตกต่างของโปรตีนสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอพันธุ์เดิมที่ปลูกในสภาพโรงเรือนตาข่ายภายใต้สภาพอากาศธรรมชาติ โดยไม่ได้ควบคุมสภาพแวดล้อมภายในโรงเรือน ดังนั้น สภาพอากาศและอุณหภูมิสามารถส่งผลต่อความแตกต่างของจุดโปรตีนบน 2-D PAGE ได้

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบความแปรปรวนของการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์ในระหว่างซ้ำของ
2D-PAGE ในการทดลอง

ระยะของต้น มะละกอ	ชิ้นส่วน ของพืช	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)		
		ระหว่างซ้ำของ มะละกอคัดแปลง พันธุกรรม (n = 3)	ระหว่างซ้ำของ มะละกอสายพันธุ์ เดิม (n = 3)	มะละกอคัดแปลง พันธุกรรมและ มะละกอสายพันธุ์เดิม
ระยะต้นกล้า (อายุ 60 วัน)	ใบ	92.27 ± 1.00	92.54 ± 2.29	94.46 ± 0.6
ระยะให้ผล (อายุ 270 วัน)	ใบ	97.21 ± 2.69	97.54 ± 2.66	98.72 ± 2.64
	ดอก	99.39 ± 2.94	97.26 ± 0.42	97.24 ± 1.74
	ผลแก่	95.16 ± 1.78	96.65 ± 1.02	96.72 ± 1.06
	ราก	95.58 ± 0.75	95.74 ± 2.81	96.46 ± 2.33

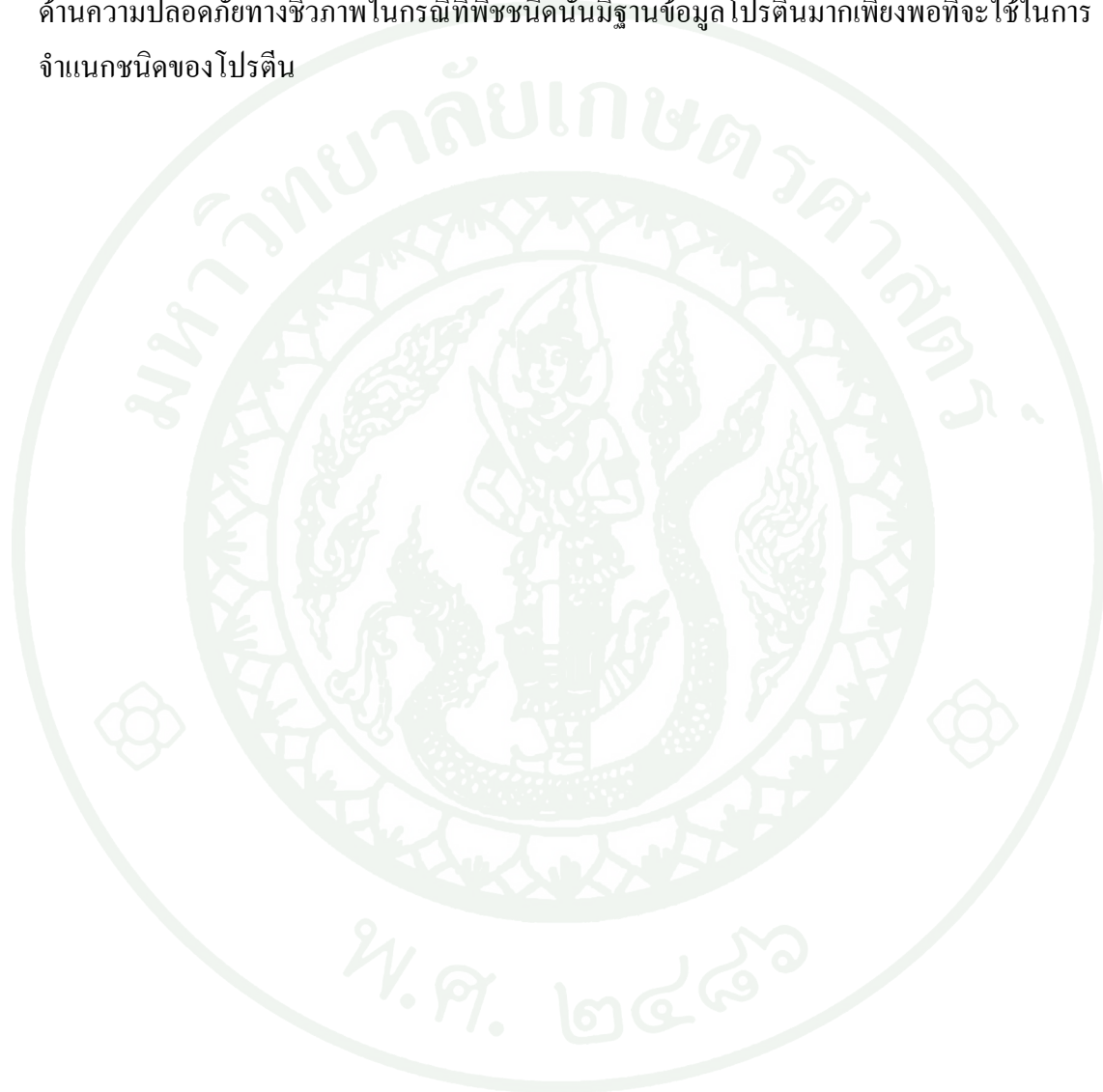
ดังนั้น เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของโปรตีนบนเจล 2-D PAGE ระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมมีค่าสูงกว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของมะละกอสายพันธุ์เดิมเมื่อเทียบกับค่ากับ base lines ของความแปรปรวนระหว่างซ้ำของกรรมวิธีเดียวกัน ระยะและอายุของพืชที่นำมาทดสอบ ความแตกต่างของสายพันธุ์ และ/หรือสภาพแวดล้อมของการปลูกพืชที่นำมาแยกสกัดโปรตีน

ในส่วนการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค MALDI-TOF/TOF MS เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน และวิเคราะห์การเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* พบว่า ในทุกตัวอย่างโปรตีนไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูล มากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่ตรวจพบ ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ตรงกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้ติดกันมากกว่า 8 ตัว

อนึ่ง การใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการเป็นเครื่องมือสนับสนุนการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ จะเหมาะกับพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีฐานข้อมูลโปรตีนมากเพียงพอในการค้นหาเพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน เช่น ข้าวโพด ข้าว หรือถั่วเหลือง เป็นต้น หรือพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรตีนใหม่หรือโปรตีนเฉพาะที่ต้องการศึกษา แต่สำหรับในกรณีของมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมนั้น โปรตีโอมิกส์อาจจะยังไม่ใช่เทคนิคที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ เนื่องจาก ยังมีข้อจำกัดของความแปรปรวนที่เกิดจากเทคนิค 2-D PAGE และฐานข้อมูลโปรตีนของมะละกอที่จะใช้ในการเปรียบเทียบ

ทั้งนี้ หากพิจารณาถึงความแตกต่างของจุดโปรตีนที่เกิดขึ้นในมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม พบว่า ในแง่เชิงปริมาณ (quantitative) แล้ว เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างจำนวนจุดของโปรตีนระหว่างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอสายพันธุ์เดิมพบว่า ความแตกต่างที่พบเทียบเท่ากับระดับความแตกต่างของโปรตีนที่เกิดขึ้นระหว่างซ้ำของการทดลองในกรรมวิธีเดียวกัน หรือนัยหนึ่งคือ ไม่มีความแตกต่างของโปรตีนในมะละกอทั้งสองชนิด สำหรับในแง่ของคุณภาพ (qualitative) นั้น เนื่องจาก ข้อจำกัดของฐานข้อมูล (database) โปรตีนของมะละกอ จึงยังไม่สามารถเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพว่า โปรตีนที่แตกต่างแต่ละจุดเป็นโปรตีนชนิดใด แม้ว่าจากงานวิจัยนี้จะได้วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน โดยเทคนิค *de novo sequencing* แล้ว และจากการทดลองนี้ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ พบว่า ไม่มีแนวโน้มที่จะเป็นโปรตีนดังกล่าว

ซึ่งการใช้เทคนิคโปรตีนโอมิกส์โดย 2-D PAGE สามารถใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนจากการทดลองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพได้ในภาพรวมเชิงปริมาณเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีน (protein profile) ด้วยตา (visual base) สำหรับในเชิงคุณภาพการใช้เทคนิค 2-D PAGE และจำแนกชนิดของโปรตีนด้วย MALDI-TOF MS สามารถเป็นเครื่องมือสนับสนุนการทดลองด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในกรณีที่พืชชนิดนั้นมีฐานข้อมูลโปรตีนมากเพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดของโปรตีน



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

โปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างใบในระยะให้ผลจะมีความเข้มข้นของโปรตีนมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ดอก ราก และผลแก่ ตามลำดับ การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (PRSV-CP) และโปรตีน neomycin phosphotransferase ที่เกิดจากยีนที่สอดแทรก (insert) เข้าไปใหม่ในโครโมโซมของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แฮกนวล 116/5 รุ่น R₄ ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV (PRSV-CP) สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nptII* ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แฮกนวล 116/5 รุ่น R₄ พบว่า มีการสอดแทรกของยีน *nptII* ที่สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ได้ และเมื่อนำมาตรวจหาโปรตีน neomycin phosphotransferase ด้วยวิธี Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน neomycin phosphotransferase สามารถตรวจพบโปรตีนนี้ในทุกส่วนของพืช ดัดแปลงพันธุกรรม โดยพบแสดงออกมากที่สุดในส่วนใบ รองลงมา ได้แก่ ราก ผล และดอก

รูปแบบโปรตีนบนเจล 2-D PAGE ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิม ในตัวอย่างใบในระยะต้นกล้า และตัวอย่างของใบ ดอก ผลแก่ และรากในระยะให้ผล โดยมีจุดของโปรตีนหลักๆ ที่เหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้โปรแกรม ImageMaster 2D Plantinam เวอร์ชัน 5 พบว่า จุดโปรตีนของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอสายพันธุ์เดิมในระยะต้นกล้าและผลแก่ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 94.46 – 98.72 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความแตกต่างของจุดโปรตีนไม่ได้มากไปกว่าค่าความแปรปรวนของเทคนิค 2-D PAGE ในการวิเคราะห์ตัวอย่างในกรรมวิธีเดียวกันของแต่ละซ้ำที่อยู่ในช่วง 0.61 – 7.73 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่พบว่า แตกต่างจาก 2D-PAGE โดยใช้เครื่อง MALDI-TOF/TOF MS ได้เป็น Peptide Mass Fingerprint (PMF) นำ PMF ไปค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม MASCOT ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนที่มีค่าความเชื่อมั่นที่สูง

($p > 0.05$) เนื่องจาก ข้อจำกัดของฐานข้อมูลโปรตีนของมะละกอ เมื่อนำมาวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry แล้วหาชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT อีกครั้ง ยังคงไม่สามารถจำแนกชนิดโปรตีนที่ให้ค่าความเชื่อถือ เนื่องจากค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้ง ค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่วิเคราะห์ผลได้ ยังมีค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของโปรตีนที่แตกต่างไปจากการวิเคราะห์ด้วย PMF ในเบื้องต้น

นำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล MSDB โดยโปรแกรม MASCOT และรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในรูปแบบต่างๆ ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *de novo sequencing* ตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ในฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 พบว่า ในทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมด ไม่พบการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนตรงกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลที่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ และทุกโปรตีนที่นำไปตรวจสอบทั้งหมดพบว่า ไม่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวนมากกว่า 8 กรดอะมิโน ที่เชื่อมต่อกันที่เหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีนก่อภูมิแพ้

การใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์เพื่อสนับสนุนการทดลองความปลอดภัยทางชีวภาพ เหมาะกับพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีฐานข้อมูลโปรตีนมากเพียงพอ เช่น ข้าวโพด ข้าว หรือถั่วเหลือง เป็นต้น หรือพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีโปรตีนใหม่หรือโปรตีนเฉพาะที่ต้องการศึกษา แต่สำหรับในกรณีของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมนั้น ปัจจุบันยังมีข้อจำกัดของความแปรปรวนจากปัจจัยต่างๆ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค 2-D PAGE และฐานข้อมูลโปรตีนที่ยังมีไม่มากพอที่จะใช้ในการเปรียบเทียบ จำเป็นต้องใช้ฐานข้อมูลโปรตีนของพืชชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกับมะละกอเทียบเคียง หากในอนาคตมีการพัฒนาฐานข้อมูลโปรตีนมะละกอมากขึ้น โปรตีโอมิกส์จะเป็นเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อสนับสนุนการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากข้อจำกัดของฐานข้อมูลโปรตีนมะละกอ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์และจำแนกชนิดของโปรตีนในเชิงคุณภาพได้ ดังนั้น ควรมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของโปรตีนมะละกอ และจัดทำเป็นฐานข้อมูล ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ และการประยุกต์ใช้ด้านอื่นๆ ด้วย เช่น การปรับปรุงพันธุ์มะละกอ

2. เทคนิคการศึกษาโปรตีนโดยใช้ 2-D PAGE และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย MALDI-TOF MS ยังมีข้อจำกัดของเทคนิคในเรื่องของ reproducibility โดยเฉพาะความแปรผันที่เกิดขึ้นได้จากการย้อมสีของจุดโปรตีนในแผ่นเจลที่ไม่คงที่ในแต่ละเจล ซึ่งปัจจุบันเริ่มมีการใช้เทคนิคทางเลือกอื่น ได้แก่ การใช้ Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS) เพื่อลดความผันแปรจากการย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพด้านการเกษตร. 2551. **คู่มือการขออนุญาตนำเข้าและศึกษาทดลองพืชตัดแปลงพันธุกรรม**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพพาง, อัญญา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โฆสิตรัตน และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ด้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ, น. 539-546. ในรายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 14. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประพันธ์ นันระไชย. 2525. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ, น. 183. ในการประชุมสัมมนาการเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มะละกอ ครั้งที่ 1. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ท่าพระ, ขอนแก่น.

ถวิล ศรีสมชัย. 2519. รายงานโรคใบด่างของมะละกอ, น. 24. ในการประชุมทางวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 15. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน, กรุงเทพฯ.

รัชณี นิมมานพัชรินทร์. 2529. การเตรียมไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์ เชื้อมู่วิทยา และโครงสร้างอนุภาคของไวรัสโรคจุดวงแหวนของมะละกอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัฒนา สวรรยาธิปติ. 2531. การปลูกมะละกอ. ศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิไล ปราสาทศรี, อาทิตย์ ฟุ้งเกียรติไพบุลย์ และเกษม ชมภิญชประภา. 2525. การศึกษาเบื้องต้นโรคใบด่างมะละกอในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขอนแก่น, กรมวิชาการเกษตร, ขอนแก่น.

ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2546. การวิจัยพัฒนามะกอกดัดแปลงพันธุกรรมของประเทศไทย, น. 1-10. ในการสัมมนาเรื่อง การวิจัย พัฒนา และทดสอบความปลอดภัยมะกอกดัดแปลงพันธุกรรมในประเทศไทย. วันที่ 23 สิงหาคม 2547, ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

_____. 2547. รายงานพิเศษเรื่องสถานภาพและข้อเสนอแนะเชิงนโยบายเกี่ยวกับการวิจัยและพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรมในประเทศไทย.

Abel , P.P., R.S. Nelson, N. Hoffman, S.G. Roger, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science** 232: 738 – 743.

Aebersold, R. and D.R. Goodlett. 2001. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.** 101: 269-295.

Aebersold, R. and M. Mann. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 422: 198–207.

Agrawal, G.K., M. Yonekur, Y. Iwahashi, H. Iwahashi and R. Rakwal. 2005. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. **J. Chromatogr.** 815: 137–145.

Barton, J.E. and M. Dracup, 2000. Genetically modified crops and the environment. **Agro. J.** 92: 797-803.

Baulcombe, D.C., G.R. Saunders, M.W. Bevan, M.A. Mayo and B.D. Harrison. 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. **Nature** 321: 446–449.

Benfey, P.N. and N.H. Chua. 1989. Regulated genes in transgenic plants. **Science** 244: 174–181.

- Berkelman, T. and T. Stenstedt. 1998. **2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principles and Methods**. Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: Problem and strategies for practical application. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 297-326.
- Blum, H., H. Beier and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8: 93-99.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Butterfield, D.A., F. Poon, D. Clair, J.N. Keller, W.M. Pierce, J.B. Klein and W.R. Markesbery. 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: Insights into the development of Alzheimer's disease. **Neurobio. Dis.** 22: 223 – 232.
- Cai, W., C. Gonsalves, P. Tennant, G. Fermin, M. Souza, N. Satindu, F.J. Jan, H.Y. Zhu and D. Gonsalves. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In vitro Cell Develop. Biol. Plant** 35: 61-69.
- Castegna, A., V. Thongboonkerd, J.B. Klein, B. Lynn, W.R. Markesbery and D.A. Butterfield. 2003. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. **J. Neuro. Chem.** 85: 1394-1401.
- Chanda, S.K. and J.S. Caldwell. 2003. Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era. **Drug Discov. Today** 8: 168-174.
- Chassy, B.M. 2002. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **J. Amer. Coll. Nutri.** 21: 166S-173S.

- Chenl, Z.L., N.S. Pan and R.N. Beachy. 1998. A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter. **EMBO J.** 2: 297-302.
- Cheng, Y.H., J. Yang and S.D. Yeh. 1996. Efficient transformation papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissue with carborundum. **Plant Cell Rep.** 16: 127–132.
- Chowpongpan, S., N. Warin, A. Bhunchoth, K. Romayanon, R. Rodaree, W. Kositratana and S. Attathom. 2002. Thai transgenic papaya protects PRSV infection to different geographical isolates, pp. 131. *In* **The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease**. The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.
- CODEX. 2003. **Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants**. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- Conner, A.J, T.R. Glare and J. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the Environment: Part II Overview of ecological risk assessment. **Plant J.** 33: 19–46.
- Corpillo, D., G. Gardini, A. M. Vaira, M. Basso, S. Aime, G. P. Accotto and M. Fasano. 2004. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. **Proteomics** 4: 193–200.
- Cucu, N., G. Negoianu-tenea and L. Gavrilă. 2002. Genetically modified medicinal plants II. Transfer and expression of a marker kanamycine resistance gene in *Atropa belladonna* plants. **Roumanian Biotechnol. Letter** 7:869–874.
- Cuozzo, M., K.M. O'Connell, W. Kaniewski, R. Fang, N. Chua and N.E Tumer. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. **Bio/Technology** 6: 549–557.

Dale, P.J., B. Clarke and E.M.G. Fontes. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. **Nat. Biotechnol.** 20: 567–574.

Delaney B., J.D. Astwood, H. Cunney, R.E. Conn, C. Herouet-Guicheney, S. Macintosh, L.S. Meyer, L. Privalle, Y. Gao and J. Mattsson. 2008. Levine and ILSI international food biotechnology committee task force on protein safety, evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food Chem. Toxicol.** 46: 71 – 97.

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. **Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the Safe Use of the *nptII* Antibiotic Resistance Marker Gene in Genetically Modified Plants.** European Food Safety Authority. Available Source: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775641.htm, December, 2009.

FAO/WHO. 2000. **Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plants Origin.** Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Available Source: <http://www.who.int/fsf/GMfood/index.htm>, December, 2009.

_____. 2001. **Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods.** Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Available Source: <http://www.who.int/fsf/GMfood/index.htm>, December, 2009.

Figeys D. 2003. Proteomics in 2002: a year of technical development and wide-ranging application. **Anal. Chem.** 75: 2891–2905.

Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistance papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Bio/Technology** 10: 1466–1472.

- Fuchs, D., I. Winkelmann, I.T. Johnson, E. Mariman, U. Wenzel and H. Daniel. 2005. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications. **Bri. J. Nutri.** 94: 302–314.
- Gygi, S.P., G.L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon and R. Aebersold. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 9390–9395.
- Hanada, K. 1994. Breeding of virus resistance varieties using transgenic plants, pp. 32-39. Application of the new technology to agriculture. *In the 9th Asian Agricultural Symposium*. Kumamoto, Japan.
- Hanash, S. 2003. Disease proteomics. **Nature** 422: 226-232.
- Heautea, R., Y.H. Chan, S. Attathom and A.F. Kratting. 1999. **The Papaya Biotechnology Network of Sounthest Asia: Biosafety Consideration and Papaya Background Information**. ISAAA Brief No. 11-1999. The International Service for Acquisition of Agri-biotech Application (ISAAA), New York, USA.
- Hema M.V. and D.T. Prasad. 2004. Comparison of the coat protein of a south Indian of PRSV with other strains from different geographical locations. **J. Plant Pathol.** 86: 35-42.
- Hames, B.D. 2002. Gel electrophoresis of protein. Oxford University Press. New York. 545pp.
- Hemenway , C., R.X. Fang, W.K. Kaniewski, N. Chua and N.E. Tumer. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus x coat protein or its antisense RNA. **EMBO J.** 7: 1273–1280.
- Hoekema, A., M.J. Huisman, L. Molendijk, P.J. Van den Elzen and B.J.C. Cornelissen. 1998. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus x. **Bio/Technology** 7: 273–278.

- James, C. 2008. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, 2008**. ISAAA Briefs No. 39. The International Service for Acquisition of Agri-biotech Application (ISAAA), New York, USA.
- Kadzimin, S.B. 1994. Development of virus resistance in orchids through genetic engineering, pp. 19-23. *In the 9th Asian Agricultural Symposium*. Kumamoto, Japan.
- Kleter, G.A. and C.M. Peijnenburg. 2002. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE-binding linear epitopes of allergens. **BMC Structural Bio**. 2: 1-11.
- Kositratana, K., N. Phironrit., N. Warin, A. Bhunchoth, W. Suasa-ard, B. Phuangrat, S. Chanprame, S. Wasee and P. Burns. 2007. Biosafety of transgenic papaya: from the point of scientific data, pp. 245. *In BioAsia2007*. Bangkok, Thailand.
- Kuiper, H.A., G.A. Kleter, H.P.J.M Noteborn and E.J. Kok. 2001. Assessment of the food safety issue related to genetically modified foods. **Plant J**. 27: 503–506.
- Lehesranta, S.J., H.V. Davies, L.V. Shepherd, N. Nunan, J.W. McNicol, S. Auriola, K.M. Koistinen, S. Suomalainen, H.I. Kokko and S.O. Karenlampi. 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, Landraces, and genetically modified lines. **Plant Physio**. 138: 1690 – 1699.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680 – 685.
- Lesk, A.M. 2005. **Introduction of Bioinformatics**. Oxford University Press Inc., New York, USA.

- Lius, S., R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.L. Slightom, J.C. Sanford and D. Gonsalves. 1997. Pathogen-derived resistance provide papaya with effecton against papaya ringspot virus. **Mol. Breeding** 3: 161–168.
- Loesch-Fries, L.S., D. Merlo, T. Zinnen, L. Burhop, K. Hill, K. Krahk, N. Jarvis, S. Nelson and E. Halk. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA4 in transgenic plants confers virus resistance. **EMBO J.** 6: 1845–1851.
- Loscalzo, J. 2003. Proteomics in cardiovascular biology and medicine. **Circulations** 108: 380-383.
- Mackey, M. 2002. The application of biotechnology to nutrition: an overview. **J. Am. Col. Nutri.** 21: 157–160.
- Marques, K., B. Sarazin, L. Chane-Favre, M. Zivy and H. Thiellemen. 2001. Comparative proteomics to establish genetic relationships in the Brassicaceae family. **Proteomics** 1: 1457-1462.
- Michaud, G.A and M. Snyder. 2002. Proteomics approaches for the global analysis of proteins. **Biotechniques** 33: 1308-1316.
- Namba, R and S.Y. Higa. 1977. Retention of the inoculativity of the papaya mosaic virus by the green peach aphid. **Proc. Hawaii Entomol. Soc.** 22: 491-494.
- Nomaru., K., K. Ohshima, T. Anai, H. Uekusa and N.Kita. 2004. RNA silencing of the introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers broad-spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. **Phytopathol.** 94: 730–736.
- OECD. 1993. **Safety Evaluation of Food Derived by Modern Biotechnology: Concept and Principle**. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- Patton W.F. 2002. Detection technologies in proteome analysis. **J . Chromatogr.** 771: 3–31.
- Pena, L. 2004. **Transgenic Plants: Method and Protocol**. Human Press Inc., New Jersey, USA.
- Persley, V. and R.C. Ploetz. 2003. Diseases of papaya, pp. 373-412. *In* R.C. Ploetz, ed. **Diseases of Tropical Fruit Crops**. CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts.
- Phironrit., N., B. Phuangrat, P. Burns and W. Kositratana. 2009. Biosafety assessment of papaya ringspot virus (PRSV) resistance transgenic papaya using morphological and agronomical characters under screen house conditions, p. 238. *In the Agricultural Biotechnology International Conference (ABIC2009)*, Bangkok, Thailand.
- Ruanjan, P., S. Kertbundit and M. Juricek. 2007. Post-transcriptional gene silencing is involved in resistance of transgenic papayas to papaya ringspot virus. **Biologia Plantarum** 51: 517-520.
- Ryan A.H. 2005. Conceptualizing risk assessment methodology for genetically modified organisms. **Environ. Biosafety Res.** 4 : 67–70.
- Salekdeh, G.H., J. Siopongco, L.J. Wade, B. Ghareyazie and J. Bennett. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics** 2: 1131-1145.
- Sanford, J.C. and S.A. Johnson. 1985. The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite own genome. **J. Theory Biol.** 113: 395–405.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2000. **Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity**: text and annexes. Montreal: Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Available Source:
<http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf>, December, 2009.

- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin. Microbiol. Rev.** 16: 493-496.
- Sunilkumar, G., L. Mohr, E. Lopata-Finch, C. Emani and K.S. Rathore. 2002. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. **Plant Mol. Bio.** 50: 463-474.
- Tang, H, T. Peng and F. Wong-Staal. 2002. Novel technologies for studying virus-host interaction and discovering new drug targets for HCV and HIV. **Curr. Opin. Pharmacol.** 2: 541-547.
- Taylor, S.L. 2002. Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. **Ann. Rev. Pharm. Toxicol.** 42: 99 - 112.
- Tennant, P.F., C. Gonsalves, K.S. Ling, M. Fitch, R. Manshardt, J.L. Slightom and D. Gonsalves. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. **Phytopathol.** 84 : 1370-1377.
- Terada, R. and K. Shimamoto. 1990. Expression of CaMV 35SGUS gene in transgenic rice plants. **Mol. Gen. Genet.** 220: 389-392.
- Thomas, J.A. and R.L. Fuchs. 2002. **Biotechnology and Safety Assessment.** Academic press Publishing, California, USA.
- Tonge, R., J. Shaw, B. Middleton, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Young, F. Pognan, E. Hawkins, I. Currien and M. Davison. 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. **Proteomics** 1: 377-396.

Tripathi, S., H.J. Bau, L.F. Chen and S.D. Yeh. 2004. The ability of papaya ringspot virus strains overcoming the transgenic resistance of papaya conferred by the coat protein gene is not correlated with higher degree of sequence divergence from the transgene. **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 871-882.

Twyman, R.M. 2004. **Principle of Proteomics**. Bios Scientific Publisher, York, U.K.

Warin, N., N. Phironrit, A. Bhunchoth, P. Burns, S. Chanprame and W. Kositratana. 2007. Determination of transcapsidation effects in genetically modified papaya contain the coat protein gene of PRSV-P superinfected with PRSV-W, p. 389. *In* **BioAsia2007**, Bangkok, Thailand.

Westermeyer, R. and Naven, T. 2002. **Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VHC, Little Chalfont, UK.

Williamson, J.D., M.E. Hirsch-Wyncott, B.A. Larkins and S.B. Gelvin. 1989. Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. **Plant Physiol.** 90: 1570–1576.

Yang, N.S. and P. Christou. 1990. Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. **Dev. Genet.** 11: 289–293.

Yeh, S.D. and D. Gonsalves. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. **Phytopathol.** 74: 1086–1091.

Yeh, S.D., D. Gonsalves, H.L. Wang, R. Namba and R.J. Chui. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. **Plant Dis.** 72: 375–380.

Zheng, P.P., T.M. Luider, R. Peiters, C.J. Avezaat, M.J. van den Bent, P.A. Sillevius and J.M. 2003. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with primary brain tumors. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 62: 855-862.



ความหมายค่า parameter ในการตรวจจับจุดของโปรตีนโดยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 5

smooth คือ ค่าความสามารถในการแยกจุดที่ซ้อนทับกัน หากค่า parameter ของ smooth สูง ความสามารถในการแยกจุดซ้อนทับจะน้อย

saliency คือ ปัจจัยที่แยกจุดของโปรตีนออกจากจุดที่ไม่ใช่โปรตีน โดยอาศัยค่าความเข้มของจุด หากตั้งค่า parameter ในส่วนนี้มาก จุดที่มีความเข้มน้อยจะไม่สามารถ detect ได้

min area คือ ค่าพื้นที่ของจุดที่น้อยที่สุดที่คาดว่าจะเป็จุดของโปรตีน เพื่อใช้เป็นคัดแยกจุดของโปรตีนที่แท้จริง ออกจากจุดส่วนเกินที่ไม่ใช่โปรตีน

วิธีการค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูล MASCOT

1. ข้อมูลที่อ่านได้จากเครื่อง MALDI-TOF MS

m/z	time	Intens.	SN	Quality Fac.	Res.	Area	Rel. Intens.
85.2205	14528.88	23.66858	6.716077	208.0827729	3958.443	0.622197	1.17E-03
85.32386	14537.54	42.21593	12.11399	649.6266827	4636.051	0.860088	2.10E-03
85.4299	14546.43	72.24818	20.65425	2246.558444	4481.767	1.593252	3.59E-03
683.411	40696.58	163.513	6.194658	370.1779786	1101.301	176.518	8.12E-03
689.3084	40870.65	178.3603	6.676621	614.6399805	1101.574	180.9287	8.85E-03
842.3922	45153.16	650.9551	20.85532	519.0845927	3017.702	342.6112	3.23E-02
845.0163	45223.01	4788.778	153.5848	17009.0321	9640.099	784.2959	0.237726446
847.0453	45276.94	715.2236	22.86574	406.0852222	9678.603	129.2138	3.55E-02
855.0138	45488.12	467.7497	14.88222	420.6831733	6893.947	117.613	2.32E-02
856.4914	45527.18	308.098	9.774833	615.5567483	7060.06	65.57041	1.53E-02
861.0453	45647.32	13004.84	410.8035	65642.715	8153.859	2554.014	0.645591322
864.4676	45737.4	913.8366	29.16182	1802.446661	7574.608	185.5705	4.54E-02
867.0636	45805.61	600.6887	19.12872	514.5086818	7401.088	144.2321	2.98E-02
868.5354	45844.23	450.92	14.19133	1002.210936	7596.95	89.95171	2.24E-02
870.5213	45896.3	386.8563	12.20709	750.7846318	8123.322	72.42629	1.92E-02
872.213	45940.61	212.9111	6.792922	41.32138986	5582.359	65.64937	1.06E-02
877.0325	46066.6	5742.214	182.7113	36740.46137	8627.533	1090.685	0.2850573
883.0475	46223.35	633.6849	20.09245	420.1377466	6708.4	171.485	0.031457639
885.0225	46274.71	1014.865	31.80619	2268.827351	7918.776	225.9129	5.04E-02
887.0184	46326.54	500.8892	15.99613	163.6494156	6560.102	135.5397	2.49E-02
889.0003	46377.96	193.9789	6.196158	141.6631016	1539.352	232.901	9.63E-03
889.8534	46400.08	433.4926	13.80191	893.1109311	10112.96	70.60407	2.15E-02
893.0016	46481.59	850.8848	27.07761	1315.578414	7287.455	212.8748	4.22E-02
899.0372	46637.48	209.8812	6.700735	44.43525549	5527.376	68.91452	1.04E-02
900.9989	46688.03	475.0173	15.17041	377.2308706	7864.071	114.2921	2.36E-02
905.6782	46808.39	10760.16	342.1174	98062.54354	8794.296	2052.227	0.534160031
917.2691	47105.2	320.4473	10.10031	209.4834606	8208.142	64.18824	0.015907775
927.6604	47369.69	20144.07	633.2079	142066.3716	8638.928	4080.494	1
943.6407	47773.57	2570.383	81.80125	64996.36698	9103.168	496.2152	0.127599999

2. นำ ค้นหาชนิดของโปรตีนในฐานข้อมูลของ MASCOT จากเว็บไซต์

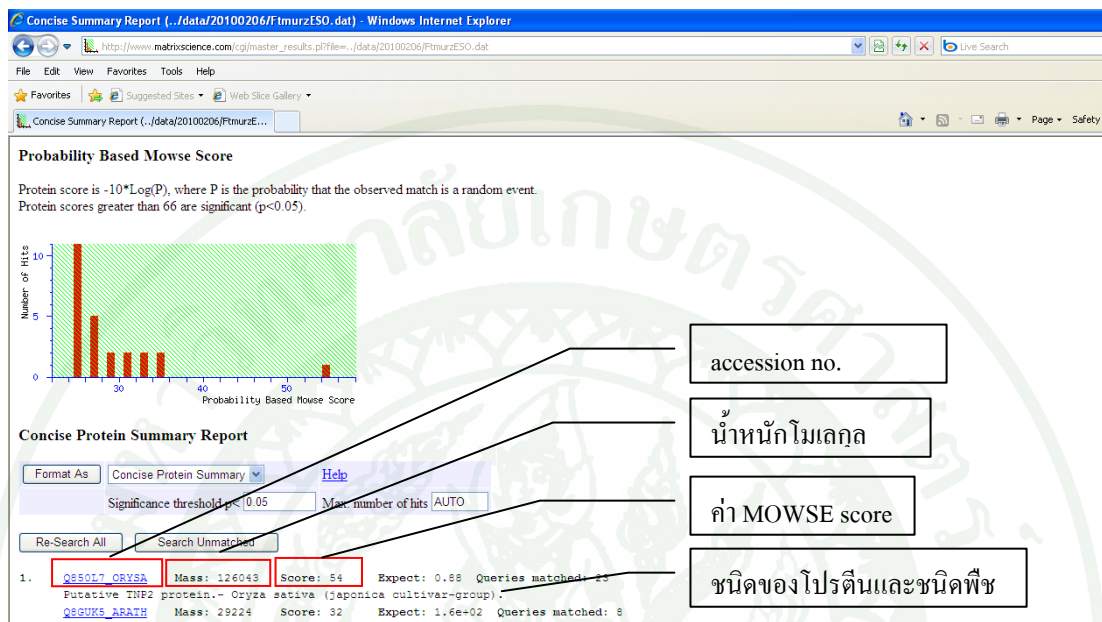
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl โดยใช้ paparameter ได้แก่ ค่า database ตั้งค่าเป็น MSDB ค่า Taxonomy ตั้งค่าเป็น Viridiplantae (Green Plants) ค่า enzyme ตั้งค่าเป็น trypsin 1

mixed cleavage ค่า fix modification: carbamidomethyl (C) ค่า variable modification: oxidation (M) ค่า Mass value: MH^+ Monoisotopic และค่า Peptide Mass Tolerance : ± 1.2 Da

3. นำค่า m/z จากข้อมูลทีอ่านได้จากเครื่อง MALDI-TOF MS ในข้อ 1 ใส่ในช่อง query ของโปรแกรม MASCOT เลือก Start Search เพื่อประมวลผล

	A	B	C	D
1	Spectrum: F6_GM_ROOT_FF111_ChCA10_FF111			
2				
3	m/z	time	intensity	SN
4	65.2248	1.8	21	26.07563
5	65.2284	1.8	7	46
6	65.4290	1.8	6	42
7	683.3711	40.95	4	197.8174
8	689.279	40.9	7	172.5196
9	845.0275	45.3	31	4306
10	847.0536	46.2	7	162.9592
11	854.1994	45.6	58	208.6018
12	855.0197	45.4	28	313.7663
13	861.0549	45.9	27	11451.89
14	867.0741	45.8	60	559.9034
15	868.5358	45.8	4	24
16	877.0392	46.3	77	5127.654
17	883.068	46.3	30	42
18	883.469	46.2	3	31
19	885.0286	46.2	486	934.889
20	887.0277	46.3	6	79
21	889.0359	46.3	88	336.1894
22	889.8547	46.4	0	111
23	893.0115	46.4	185	889.672
24	901.0111	46.8	0	34
25	905.9849	46.8	56	8750.761
26	917.0807	47.1	6	45
27	927.6229	47.3	0	01
28	935.2667	47.5	2	36
29	943.6512	47.7	83	1805.367
30	1050.132	50.0	71	263
31	1066.101	50.4	18	262.2485
32	1072.118	50.0	44	272.009
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				

4. ชนิดของโปรตีนและค่าต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้จากฐานข้อมูลของ MASCOT เลือก accession no. เพื่อแสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่คำนวณได้



5. ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่คำนวณได้ ไปไปตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับ allergen ที่ก่อภูมิแพ้ทำได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล AllergenOnline เวอร์ชัน 10.0 ของ Food Allergy Research and Resource Program (<http://www.allergenonline.org>) เลือกโหมด Sliding 80mer Window เพื่อตรวจสอบความเหมือนกับสารก่อภูมิแพ้ที่มีในฐานข้อมูลต้องมากกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป และมีการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนติดที่เหมือนกันกับโปรตีนหรือเปปไทด์ก่อภูมิแพ้ติดต่อกันมากกว่า 8 ตัว ตามมาตรฐานของ CODEX คลิก submit เพื่อแสดงผลการค้นห



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชาลินี คงสวัสดิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 มิถุนายน 2517
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วท.ม. (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิเคราะห์นโยบายและแผน
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลคะแนนระดับมหบัณฑิตยอดเยี่ยม สาขาพันธุศาสตร์ประจำปี 2542 สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย และ มูลนิธิศาสตราจารย์แถบ นีละนิธิ
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ