# การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจคัดกรองยีนดัดแปรพันธุกรรมในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค Duplex Real-time PCR

ณัฐพล เลี้ยงเพ็ชร* พลิศา มหาชัย

**บทคัดย่อ**

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจคัดกรองยีนดัดแปรพันธุกรรมในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยเทคนิค Duplex Real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator โดยการพัฒนา probe ให้สามารถตรวจวิเคราะห์พร้อมกันได้ 2 ยีนต่อ reaction ทำการติดฉลากสีที่แตกต่างกันในด้าน 5’ region ของแต่ละยีนเป็นสี FAM และ HEX ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าปริมาณต่ำสุดในการตรวจ เท่ากับ 0.01 % GM (v/v) โดยมีค่า $C_t$ อยู่ที่ 39.98 ± 0.81 และ 39.99 ± 0.83 ตามลำดับ วิธีนี้มีความจำเพาะ ไม่พบการ cross-reactivity กับวัตถุดิบอาหารสัตว์ และตัวอย่าง blank sample ที่ Free GMO มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าประสิทธิภาพเท่ากันอยู่ที่ 100% ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR คือ 20 ng/reaction นอกจากนี้ได้ทำการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และNOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง จำนวน 40 ตัวอย่าง พบตัวอย่างทดสอบที่มียีนดัดแปรพันธุกรรมในวัตถุดิบเป็นส่วนประกอบ จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 57.50% จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า วิธีการตรวจคัดกรองยีนดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค Duplex Real-time PCR มีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของยีนดัดแปรพันธุกรรมในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ :** ยีนดัดแปรพันธุกรรม อาหารสัตว์ อาหารสัตว์เลี้ยง Duplex Real-time PCR

**เลขทะเบียนวิชาการ: 69(2)-0304-011**

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ 91 หมู่ 4 ถนนติวานนท์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

* ผู้รับผิดชอบ, e-mail: liangpetch.nat@gmail.com

# Method development and validation for screening of GMO in feed and pet food using Duplex Real-time PCR technique

Nattapol Liangpetch* Palisa Mahachai

**Abstract**

A Duplex Real-time PCR method was developed and validated for the screening of GMO in animal feed and pet food. This assay concurrently targets the CaMV 35S promoter and NOS terminator by developing a probe capable of simultaneous analysis of two genes per reaction. Distinct color labels, FAM and HEX, were attached to the 5' region of each gene. Validation of the method demonstrated that a limit of detection (LOD) for the CaMV 35S promoter and NOS terminator genes was established at 0.01% GM (v/v), with $C_t$ values of 39.98 ± 0.81 and 39.99 ± 0.83, respectively. This method demonstrated specificity, with no cross-reactivity observed with animal feed ingredients or blank samples free of GMO. The sensitivity, specificity, and efficiency were all 100%. The minimum concentration of template DNA required for Duplex Real-time PCR was 20 ng/ reaction. Furthermore, an analysis was conducted on 40 samples of animal feed and pet food to detect the presence of the CaMV 35S promoter and NOS terminator genes. The results indicated that 23 samples, representing 57.50%, contained genetically modified genes as components of the tested samples. Based on these findings, it can be concluded that Duplex Real-time PCR is a suitable and efficient tool for detecting GMO contamination in animal feed and pet food.

**Keywords**: GMO, animal feed, pet food, Duplex Real-time PCR

**Registered No.** : **69(2)-0304-011**

Bureau of Quality Control of Livestock Products, 91 Moo 4, Tiwanon road, Bang kadi, Mueang, Pathumthani 12000

* Corresponding author, e-mail: liangpetch.nat@gmail.com

# บทนำ

จีเอ็มโอ (GMO – Genetically Modified Organism) หมายถึง พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่มีการเปลี่ยนสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) โดยใช้เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนดีเอ็นเอโดยเฉพาะ ซึ่งรวมถึงการถ่ายโอนดีเอ็นเอเฉพาะจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปยังอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง มักเรียกกระบวนการนี้ว่าการตัดแต่งพันธุกรรม (FDA, 2024)

ในปัจจุบันมีประเทศที่อนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมเชิงการค้าแล้วกว่า 46 ประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา เป็นต้น เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 32 ชนิดพันธุ์ 577 events (ISAAA, 2024) ซึ่งพืชดัดแปรพันธุกรรมที่นิยมปลูกมากที่สุด ได้แก่ ข้าวโพด ฝ้าย มันฝรั่ง คาโนลา และถั่วเหลือง โดยประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่อนุญาตให้นำเข้าเพื่อใช้ประโยชน์แต่ไม่อนุญาตให้ปลูก (ขนิษฐา, 2563) สำหรับประเทศไทยนั้นการนำเข้าถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมนั้นต้องได้รับการประเมินและอนุญาตให้มีการนำเข้าเฉพาะสายพันธุ์ที่ผ่านการประเมินแล้วเท่านั้น (ฐิติรัตน์ และคณะ, 2565)

ในปี พ.ศ. 2567 ที่ผ่านมา ประเทศไทยส่งออกอาหารสัตว์สู่ประเทศคู่ค้ากว่า 42 ประเทศ เช่น จีน กัมพูชา ลาว เวียดนาม และญี่ปุ่น เป็นต้น มีปริมาณการส่งออก 363,468.26 ตัน คิดเป็นมูลค่า 15,221.86 ล้านบาท นอกจากนี้ประเทศไทยยังส่งออกอาหารสัตว์เลี้ยงสู่ประเทศคู่ค้า 88 ประเทศทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย เป็นต้น มีปริมาณการส่งออก 899,561.17 ตัน มีมูลค่าสูงถึง 103,785.00 ล้านบาท (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568) ซึ่งประเทศไทยจัดเป็นผู้ผลิตและส่งออกอาหารสัตว์เลี้ยงรายใหญ่อันดับที่ 4 ของโลก (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2568) จากความวิตกกังวลของผู้บริโภคในเรื่องวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชและสัตว์ที่ได้รับการตัดแต่งยีน โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปมาจากถั่วเหลืองและข้าวโพดได้ทวีความรุนแรงมากขึ้น แม้ว่าการพัฒนายีนนั้นมีประโยชน์ต่อทางการเกษตร เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนต้านทานวัชพืช (กุลนรี และคณะ, 2547) ซึ่งประเทศไทยมีอัตราผลผลิตของถั่วเหลืองและข้าวโพดน้อยกว่าปริมาณความต้องการภายในประเทศ อีกทั้งถั่วเหลืองและข้าวโพดเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง จึงมีความจำเป็นในการนำเข้าถั่วเหลืองและข้าวโพดจากประเทศบราซิล สหรัฐอเมริกา และอาร์เจนตินา (ฐิติรัตน์ และคณะ, 2565) ซึ่งประเทศเหล่านี้เป็นผู้ส่งออกถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมรายใหญ่ของโลก จากความกังวลดังกล่าวนี้นำไปสู่การออกข้อกำหนดทางชีวภาพเกี่ยวกับวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีพืชดัดแปรพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบ ยกตัวอย่างเช่น ประเทศรัสเซีย ได้ออกประกาศห้ามนำเข้าอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่มี GMO (Eurofins, 2023) เป็นส่วนประกอบ ในปี พ.ศ.2567 ที่ผ่านมา ประเทศรัสเซียได้มีการนำเข้าอาหารสัตว์เลี้ยงจากประเทศไทยปริมาณ 1,202.53 ตัน จากปีก่อนหน้าที่มีการนำเข้าอาหารสัตว์เลี้ยงถึง 3,341.79 ตัน ลดลงถึง 64% (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568)

กลุ่มสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มนำเข้าอาหารสัตว์เลี้ยงจากประเทศไทย เช่น ประเทศอิตาลี เยอรมัน เบลเยี่ยม และฝรั่งเศส เป็นต้น โดยในปี พ.ศ. 2567 มูลค่าการส่งออกอาหารสัตว์เลี้ยงสู่ประเทศต่าง ๆ มีมูลค่าสูงถึง 16,069.84 ล้านบาท (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและ

สหกรณ์, 2568) ทางสหภาพยุโรปได้ออกข้อบังคับ EC No. 1829/2003 และ EC No. 1830/2003 กำหนดให้สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์ต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยก่อนได้รับการอนุมัติ และต้องติดฉลากในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ GMO มากกว่า 0.9 % w/w ขึ้นไป และห้ามพบพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ได้รับการอนุมัติในผลิตภัณฑ์ทุกประเภท (0% w/w) (European Commission, 2003a, 2003b)

ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศคู่ค้ารายใหญ่ของไทย ในปี พ.ศ. 2567 ได้มีการนำเข้าอาหารสัตว์เลี้ยงคิดเป็นมูลค่า 13,547.05 ล้านบาท และอาหารสัตว์มูลค่า 846.94 ล้านบาท (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568) โดยประเทศญี่ปุ่นได้ดำเนินการแก้ไขระเบียบการติดฉลากอาหารและอาหารสัตว์ดัดแปรพันธุกรรม โดยให้ใช้คำว่า “free from GMO” บนฉลากผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีวัตถุดิบเป็น GMO หรือมีส่วนประกอบเป็น GMO น้อยกว่า 5% (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2562)

ประเทศบราซิล เป็นผู้นำเข้าอาหารสัตว์เลี้ยงจากประเทศไทย คิดเป็นมูลค่า 192.62 ล้านบาท (กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2568) ได้กำหนดให้มีการระบุคำว่า “GMO” ในฉลากบนผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์ที่มีส่วนประกอบของ GMO มากกว่า 1% (Borges *et al*., 2018)

ส่วนข้อกำหนดที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทยนั้นมีเพียงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 432) พ.ศ. 2565 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง การแสดงฉลากอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม โดยกำหนดให้อาหารที่ได้จากเทคนิคการดัดแปรพันธุกรรมเป็นอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย เว้นแต่ผ่านการประเมินความปลอดภัยตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด รวมทั้งกำหนดให้อาหารที่มี GMO ทุกชนิดในปริมาณ 5 % ขึ้นไป ต้องระบุข้อความว่า “ดัดแปรพันธุกรรม” ไว้ที่ฉลากตามเกณฑ์ที่กำหนด และแสดงสัญลักษณ์เป็นรูปสามเหลี่ยมพื้นสีเหลือง ตัวอักษรสีดำ โดยมีข้อความว่า “GMO” ซึ่งยังไม่ครอบคลุมถึงอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง

แม้ว่ายังไม่พบรายงานผลกระทบจากมาตรการ GMO ของประเทศคู่ค้าต่อผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงของประเทศไทยอย่างชัดเจน แต่มาตรการดังกล่าวนี้อาจเป็นอุปสรรคทางการค้าต่อผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงของประเทศไทยในอนาคตได้ ซึ่งประเทศไทยยังไม่มีห้องปฏิบัติการใดที่สามารถตรวจคัดกรอง GMO ในขอบข่ายผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการตรวจคัดกรอง GMO ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ภายใต้กิจกรรมรับรองส่งออก เพื่อเพิ่มความมั่นใจแก่ประเทศคู่ค้าในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงเพื่อการส่งออก โดยศึกษาวิธีการตรวจคัดกรองยีนดัดแปรพันธุกรรม พบว่าวิธีที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่ การตรวจสอบจากโปรตีนด้วยวิธี ELISA (Enzymes Linked Immunosorbent Assay) การตรวจสอบจากดีเอ็นเอด้วยวิธี LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) และการตรวจสอบจากดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR โดยมีการศึกษาวิจัยยีนดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Nguyen *et al*. (2008) ได้ทำการตรวจหาพืชดัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์จากประเทศมาเลเซียและเวียดนามด้วยเทคนิค PCR และตรวจยืนยันด้วยเทคนิค DNA sequencing พบยีน 35S promoter และ NOS terminator ในผลิตภัณฑ์ 20 ตัวอย่างจากทั้งหมด 24 ตัวอย่าง

ปิยรัตน์ และคณะ (2563) ได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมเชิงคุณภาพในยีน CaMV 35S promoter, NOS terminator และ ยีนอ้างอิงข้าวโพด (high mobility group; hmg) ด้วยวิธี Triplex Real-time PCR พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่เหมาะสมในการทดสอบอยู่ที่ 50 – 200 ng ขีดจำกัดในการตรวจของวิธีนี้อยู่ที่ 0.001 – 0.01 % ซึ่งวิธี Triplex Real-time PCR สามารถตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพดเชิงคุณภาพได้

Vujica *et al*. (2023) ได้ทำการตรวจคัดกรองยีนดัดแปรพันธุกรรมในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์ที่ขายในประเทศบอสเนียและเฮอร์เซโกวินา เนื่องจากกฎหมายในประเทศบอสเนียและเฮอร์เซโกวินาอนุญาตให้ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบในอาหารและอาหารสัตว์ไม่เกิน 0.9 % จึงได้ทำการสุ่มตรวจข้าวโพด ข้าว ถั่วเหลือง และอาหารสัตว์ ด้วยเทคนิค PCR ผลการตรวจแสดงให้เห็นว่าไม่พบยีนดัดแปรพันธุกรรม (P35S/CaMV, TNOS/ *A. tumefaciens* และ P34S/FMV) ในผลิตภัณฑ์อาหาร แต่พบยีนดัดแปรพันธุกรรม (P35S/CaMV, TNOS/ *A. tumefaciens* และ P34S/FMV) ในทุกตัวอย่างอาหารสัตว์ที่สุ่มตรวจ ผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรตรวจสอบอาหารสัตว์ที่พบยีนดัดแปรพันธุกรรมอย่างต่อเนื่อง ว่าผู้ผลิตอาหารสัตว์เหล่านี้ได้ขึ้นทะเบียนและติดฉลากว่าเป็นผลิตภัณฑ์ GMO ด้วยหรือไม่

Mazrooei and Alreshidi (2024) ได้ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารและอาหารสัตว์จำนวน 31 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าว ในตลาดท้องถิ่นของประเทศคูเวต ทำการตรวจคัดกรองหาสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (GMO) โดยทำการวิเคราะห์หา P35S และ TNOS ด้วยเทคนิค PCR แบบเชิงคุณภาพ ผลการศึกษาพบว่ามีลำดับชิ้นยีน GMO ในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้าวโพดจำนวน 6 ใน 21 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง พบ 1 ใน 5 ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้าวพบ 2 ใน 5 ผลิตภัณฑ์ และยังพบข้าวโพด GMO ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์เป็นครั้งแรกอีกด้วย

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้ยีน CaMV 35S promoter และ/หรือยีน NOS terminator ในพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับอนุญาตทางการค้าทั่วโลกมากกว่า 90% ทำหน้าที่เป็นสวิตซ์เปิด – ปิดยีนควบคุมการแสดงออกของยีนดัดแปรพันธุกรรม (Stefanova *et al*., 2025) จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจคัดกรอง GMO ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับ โดยผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิค Duplex Real-time PCR โดยการพัฒนาการติด fluorescent dye ที่ probe ให้สามารถตรวจวิเคราะห์พร้อมกันได้ 2 ยีนต่อ reaction ทำการติดฉลากสีที่แตกต่างกันในด้าน 5’ region ซึ่งดัดแปลงมาจาก ISO 21569:2005 /Amd.1:2013 เนื่องจาก Real-time PCR เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจติดตามขั้นตอนการ amplification ของดีเอ็นเอในสภาพจริง และสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่าง ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว ไม่มีขั้นตอน post analysis เหมือนเทคนิค PCR (Artika *et al*., 2022) และการ

ทำ Duplex เป็นการตรวจวิเคราะห์ 2 ยีนในเวลาเดียวกันโดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะสำหรับการตรวจของแต่ละยีน โดยติดฉลากสีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน สามารถทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียว ทำให้สามารถลดขั้นตอนในการวิเคราะห์ ลดต้นทุนค่าสารเคมี วัสดุวิทยาศาสตร์ และย่นระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ลงเมื่อเทียบกับวิธี Singleplex Real-time PCR (ปิยรัตน์ และคณะ, 2561) และในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจคัดกรอง GMO ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง รวมทั้งตรวจคัดกรอง GMO ในตัวอย่างทดสอบส่งเข้าตรวจในกลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 LightCycler®480 II Real-time PCR (Roche, Germany)
1.2 Balance (Metler Toledo, Switzerland)
1.3 Centrifuge (Eppendorf, Germany)
1.4 PCR-Cabinet (Gelman, Singapore)
1.5 Heating block (Miulab, China)
1.6 Piston pipette ขนาด 1-10, 10-100, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

### 2. สารเคมี

2.1 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany)
2.2 Probe and primers specific to CaMV 35S promoter (Biolegio, The Netherlands)
2.3 Probe and primers specific to NOS terminator (Biolegio, The Netherlands)
2.4 Reference material code ERM-BF410gk (IRMM, Belgium)
2.5 Reference material non-GMO code TRM-S-1005 (TRM, Thailand)
2.6 Isopropanol, molecular grade (Sigma Aldrich, Germany)
2.7 Distilled water, PCR grade (Apsalagen, Thailand)
2.8 LightCycler®480 Probes master (Roche, Germany)

### 3. ตัวอย่างที่ศึกษา

3.1 ชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารสัตว์เลี้ยง และวัตถุดิบที่นำมาพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี

ใช้ตัวอย่างทดสอบอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่ส่งมาตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ ณ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และผ่านการตรวจสอบว่า Free GMO โดยวิธีของ ISO 21569:2005/Amd.1:2013 จำนวน 8 ชนิด รวม 80 ตัวอย่าง และตัวอย่างวัตถุดิบที่พบได้ทั่วไปในท้องตลาดและมีสัญลักษณ์ Free GMO จำนวน 2 ชนิด รวม 6 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 86 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากต่างแหล่งกัน จำแนกได้ ดังนี้

3.1.1 อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับแมว) จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.2 อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับสุนัข) จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.3 อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับแมว) จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.4 อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับสุนัข) จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.5 อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.6 อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับเป็ด จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.7 อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.8 อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสุกร จำนวน 10 ตัวอย่าง

3.1.9 วัตถุดิบถั่วเหลือง จำนวน 3 ตัวอย่าง

3.1.10 วัตถุดิบข้าวโพด จำนวน 3 ตัวอย่าง

3.2 ชนิดตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่ใช้ในการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR

ใช้ตัวอย่างทดสอบที่ส่งตรวจวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ณ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในระหว่างปีงบประมาณ 2568 ชนิดตัวอย่างตามข้อ 3.1.1 - 3.1.8 ชนิดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง

3.3 ตัวอย่างควบคุมคุณภาพวิธีทดสอบ

3.3.1 ควบคุมผลการทดสอบด้วย Positive control

ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ซึ่งต้องพบค่า $C_t$ (cycle threshold) ในทุกรอบของการทดสอบ

3.3.2 ควบคุมผลการทดสอบด้วย Negative control

ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง TRM-S-1005 (non-GMO) ซึ่งต้องไม่พบค่า $C_t$ ในทุกรอบของการทดสอบ

**4. วิธีการทดลอง**

4.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ดำเนินตามวิธีการที่กำหนดในคู่มือน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 2023) มีรายละเอียด ดังนี้

4.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ 25 มิลลิกรัม ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในตัวอย่าง และเติม proteinase K ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปบ่มในเครื่อง heating block ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.1.2 เติม binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติม isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้

เข้ากันโดยใช้ vortex ของเหลวในหลอดจะแยกเป็นส่วนใสอยู่ด้านบน และตะกอนที่อยู่ด้านล่างของหลอด

4.1.3 ดูดของเหลวส่วนใสถ่ายลงในหลอด filter ที่วางบนหลอด collection แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง

4.1.4 เติม inhibitor removal ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด filter ไปใส่ในหลอด collection ใหม่

4.1.5 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง)

4.1.6 เทของเหลวในหลอด collection ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อทันทีที่ 14,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นย้ายหลอด filter ใส่ในหลอด collection ใหม่

4.1.7 เติม elution buffer (ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดของเหลวที่ได้ในหลอด collection (ตัวอย่างดีเอ็นเอ) ลงใน microcentrifuge tube (เก็บที่อุณหภูมิ -15 ถึง -25 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งใช้งาน

4.2 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator

เตรียมน้ำยาทดสอบปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR เพื่อใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรต่อ reaction เมื่อรวมกับ DNA extract เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ดัง**ตารางที่ 1**

**ตารางที่ 1** ปริมาตรของน้ำยาทดสอบ ที่ใช้ในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator (Waiblinger *et al*., 2008)

| Reagent | Concentration | Volume / reaction (µl) |
|---|---|---|
| Probes master (2X) | 2X | 12.5 |
| 35S Forward primer | 2 µM | 1.25 |
| 35S Reverse primer | 2 µM | 1.25 |
| 35S probe | 2 µM | 1.25 |
| NOS Forward primer | 20 µM | 1.25 |
| NOS Reverse primer | 20 µM | 1.25 |
| NOS probe | 4 µM | 1.25 |
| DNA extract | - | 5 |
| Total reaction volume | - | 25 |

4.3 การตั้งค่าสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Duplex Real-time PCR

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากขั้นตอนในข้อที่ 4.1 มาทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วยวิธี Duplex Real-time PCR (CaMV 35S promoter / NOS terminator) ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 II โดยกำหนดค่าอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการวิเคราะห์ โดยอ้างอิงจาก ปิยรัตน์ และคณะ (2563) ดัง**ตารางที่ 2**

**ตารางที่ 2** การตั้งค่าสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Duplex Real-time PCR

| Programs | Temperature (°C) | Hold (hh:mm:ss) |
|---|---|---|
| Initial-denaturation | 95 | 00:10:00 |
| Amplification (Analysis mode: Quantification) | 95 | 00:00:05 |
| (45 cycles) | 60 | 00:01:00 |
| Cooling (Analysis mode: None) | 40 | 00:00:30 |

4.4 การพัฒนาการติดฉลากสี probe ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เพื่อทำ Duplex probe

งานวิจัยครั้งนี้ใช้ probe ที่จำเพาะยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator อ้างอิงจาก ISO 21569:2005/Amd.1:2013 ซึ่งมีลักษณะเป็น singleplex ติดสี FAM ที่ตำแหน่ง 5’ region เหมือนกัน ดังนั้นการพัฒนาการติดสี probe เพื่อทำ Duplex probe โดยให้ยีน CaMV 35S promoter ยังคงติดสี FAM ที่ตำแหน่ง 5’ region เหมือนเดิม ส่วนยีน NOS terminator จะติด fluorescent dye สีอื่น โดยพิจารณาจากค่า excitation และค่า emission ของ fluorescent dye ที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็น Duplex probe สำหรับการตรวจหาด้วยวิธี Duplex Real-time PCR หลังจากนั้นนำ probe ที่พัฒนาโดยการติดสี เพื่อใช้เป็น Duplex probe มาทดสอบกับวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk (positive control) และวัสดุอ้างอิงรับรอง TRM-S-1005 (non-GMO) (negative control) ตามขั้นตอนในข้อ 4.1 – 4.3 พิจารณาจากพบค่า $C_t$ ของทั้งสองยีนในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk และต้องไม่พบค่า $C_t$ ของทั้งสองยีนในวัสดุอ้างอิงรับรอง TRM-S-1005 (non-GMO)

4.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

4.5.1 ขั้นตอนของวิธีทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น (Pre-Limit of Detection; Pre-LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1.1 – 3.1.8 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 จากนั้นนำวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2 (Roundup Ready Soy Bean) ที่มียีนดัดแปรพันธุกรรมทั้งยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator อยู่ 10% GM ใส่ลงในตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้ ให้มีระดับการปนเปื้อนยีนดัดแปรพันธุกรรม อยู่ที่ 1%, 0.1%, 0.01% และ 0.001% GM (v/v) ตามลำดับ มาทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR โดยใช้ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในข้อที่ 4.2 และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามข้อที่ 4.3 โดยพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบค่า $C_t$ ของทั้งสองยีน

4.5.2 ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

นำตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1.1 – 3.1.8 ชนิดละ 10 ตัวอย่าง มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 จากนั้นนำวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ใส่ลงในตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้ ให้มีระดับการปนเปื้อนต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 4.5.1 มาทดสอบหาปริมาณต่ำสุด โดยใช้ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในข้อที่ 4.2 ในสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามข้อที่ 4.3 และหาค่า cut-off ของการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator

4.5.3 ขั้นตอนการทดสอบหาความจำเพาะ

นำตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.1 ชนิดละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 เพื่อใช้เป็น blank sample สำหรับการทดสอบหาความจำเพาะโดยใช้ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในข้อที่ 4.2 และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามข้อที่ 4.3

4.5.4 การประเมินสมรรถนะ

คำนวณหาค่า ความไวของวิธีทดสอบ (Sensitivity) ความจำเพาะของวิธีทดสอบ (Specificity) และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (Efficiency) (Silva and Ellison, 2021)

1) ความไวของวิธีทดสอบ

หาค่าความไวของวิธีทดสอบ หรือ อัตราผลบวกจริง (true positive rate) ใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณต่ำสุด ของการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ในข้อที่ 4.5.2 โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{Sensitivity, SS (True Positive Rate, TP)} = [tp / (tp + fn)] \times 100\%$$

เมื่อ

*tp* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง

*fn* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม

2) ความจำเพาะของวิธีทดสอบ

หาค่าความจำเพาะของวิธีทดสอบ หรือ อัตราผลลบจริง (true negative rate) ใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบหาความจำเพาะในข้อที่ 4.5.3 โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{Specificity, SP (True Negative Rate, TN)} = [tn / (tn + fp)] \times 100\%$$

เมื่อ

*tn* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง

*fp* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม

3) ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ

การหาค่าประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ ใช้ผลการทดสอบที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.5.2 – 4.5.3 มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{Efficiency (E)} = [(tp + tn) / (p + n)] \times 100\%$$

เมื่อ

*tn* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง

*tp* คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง

p คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวก (*tp* + *fp*)

n คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลลบ (*tn* + *fn*)

4.6 ขั้นตอนการทดสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (amplification range)

ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 จากนั้นปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 50, 100, 150 และ 200 ng/reaction ตามลำดับ แล้วนำมาทดสอบโดยใช้ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในข้อที่ 4.2 และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามข้อที่ 4.3 ทำการทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง พิจารณาจากค่า $C_t$ โดยใช้สถิติ F-test

4.7 การตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR

นำตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในข้อที่ 3.2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 4.1 แล้วนำมาตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator โดยใช้ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในข้อที่ 4.2 และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบตามข้อที่ 4.3

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การพัฒนาการติดฉลากสี probe ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เพื่อทำ Duplex probe

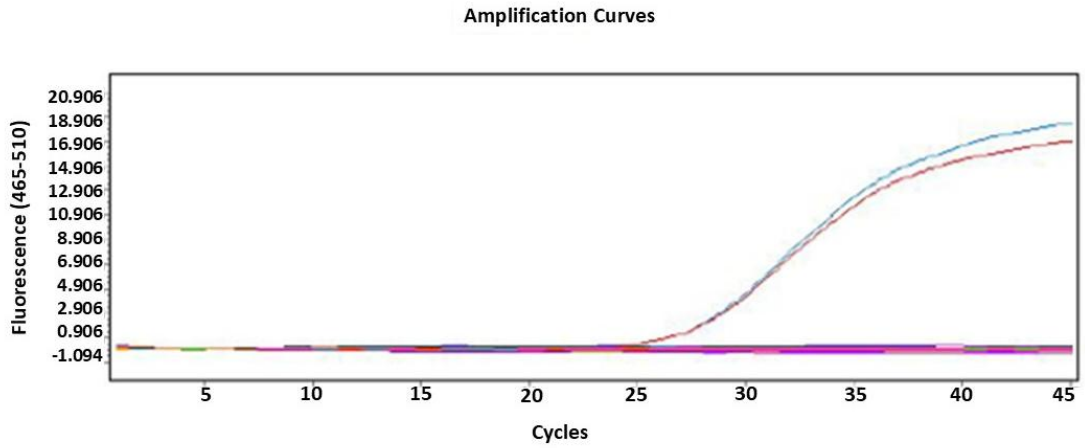
ลำดับ sequence ของ primer และ probe ที่จำเพาะต่อยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ดัดแปลงจาก ISO 21569:2005 /Amd.1:2013 ทำการติดฉลากสี probe ที่ด้าน 5’ region โดยให้ probe สำหรับ CaMV 35S promoter ติดฉลากสี FAM และพัฒนาการติดฉลากสี probe สำหรับ NOS terminator เป็น fluorescent dye สีอื่นทดแทนสี FAM เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์ทั้งสองยีนเป้าหมายได้ใน reaction เดียวกัน ทั้งนี้ fluorescent dye มีหลากหลายสี ขึ้นกับคุณสมบัติของเครื่อง Real-time PCR ในแต่ละยี่ห้อที่สามารถตรวจจับสัญญาณจาก fluorescent dye ชนิดใดได้บ้าง ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Eugster *et al*. (2014) ได้ทำการติดสี FAM ที่ probe สำหรับ CaMV 35S promoter และเลือกติดสี ROX ที่ probe สำหรับ NOS terminator โดยสี ROX มีค่า excitation เท่ากับ 585 nm และค่า emission เท่ากับ 610 nm หรืองานวิจัยของ Oliveira *et al*. (2016) ที่เลือกติดสี VIC ที่ probe สำหรับ NOS terminator มีค่า excitation เท่ากับ 526 nm และค่า emission เท่ากับ 543 nm สำหรับงานวิจัยนี้ fluorescent dye ที่เลือกใช้ติด probe NOS terminator คือสี HEX ดัง**ตารางที่ 3** เนื่องจากสี FAM และสี HEX มีค่า excitation และค่า emission แตกต่างกัน โดยค่า excitation และค่า emission ของสี FAM เท่ากับ 465 nm และ 510 nm และ สี HEX เท่ากับ 533 nm และ 580 nm (Roche, 2024) ซึ่งสี HEX มีค่า

excitation และค่า emission ใกล้เคียงกับสี VIC ทำให้สี VIC และ สี HEX สามารถใช้ทดแทนกันได้ จากค่า emission signal ของ fluorescent dye ที่ความยาวคลื่นแสงแตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของ PCR product ได้ (Lee *et al*., 2013)

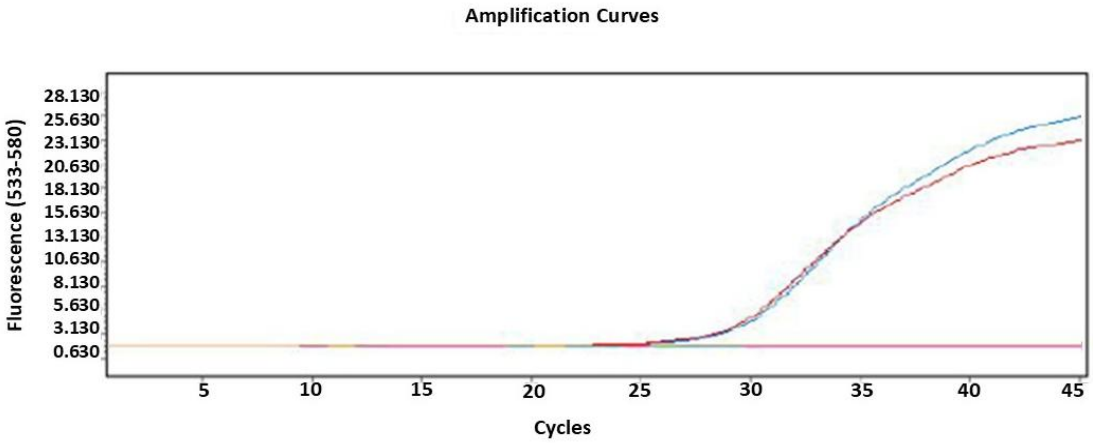
**ตารางที่ 3** primer และ probe ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator

| Target | Primer/Probe | Sequence (5'→ 3') |
|---|---|---|
| CaMV 35S promoter | Forward primer | GCCTCTGCCGACAGTGGT |
| | Reverse primer | AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC |
| | Probe | (FAM)-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-(BHQ1) |
| NOS terminator | Forward primer | CATGTAATGCATGACGTTATTTATG |
| | Reverse primer | TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT |
| | Probe | (HEX)-ATGGGTTTTTATGATTAGAG TCCCGCAA -(BHQ1) |

เมื่อนำ Duplex probe ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator มาทดสอบกับวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ที่มียีนดัดแปรพันธุกรรมอยู่ 10 % GM และวัสดุอ้างอิงรับรอง TRM-S-1005 (non-GMO) ผลทดสอบพบว่า พบค่า $C_t$ ทั้งสองยีนและกราฟมีลักษณะเป็น S-curve ดัง**ภาพที่ 1-2** ในตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk และไม่พบค่า $C_t$ ของทั้งสองยีนในวัสดุอ้างอิงรับรอง TRM-S-1005 (non-GMO) แสดงว่าการพัฒนาการติดสี probe โดยให้ยีน CaMV 35S promoter ติดฉลากสี FAM และให้ยีน NOS terminator ติดสี HEX นั้นมีความเหมาะสมสามารถใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีได้




**ภาพที่ 1** แสดง Amplification curve ของยีน CaMV 35S promoter ในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk




**ภาพที่ 2** แสดง Amplification curve ของยีน NOS terminator ในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk

**2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี**

2.1 วิธีทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น (Pre-Limit of Detection; Pre-LOD)

วิธีทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นในตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ระดับ %GM เท่ากับ 1%, 0.1%, 0.01% และ 0.001% GM (v/v) ตามลำดับ โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk มาผสมลงในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง เนื่องจากวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk มีส่วนประกอบเป็นถั่วเหลืองตัดแต่งพันธุกรรม ชนิด GTS 40-3-2 event (Roundup Ready) ที่มียีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เป็นส่วนประกอบ (ERM, 2008) ซึ่งถั่วเหลืองตัดแต่งพันธุกรรมชนิด GTS 40-3-2 event เป็นการดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ยีนที่สร้างเอนไซม์ CP4EPSP จากเชื้อ *Agrobacterium* sp. strain CP4 แล้วตัดต่อยีนลงในถั่วเหลืองเพื่อให้ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมชนิดนี้ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดไกลโฟเซต โดยมียีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ทำหน้าที่เป็นสวิตช์เปิด-ปิดยีนที่สร้างเอนไซม์ CP4EPSP ในถั่วเหลือง (Funke *et al*., 2006) ทำการแปลผลโดยดูจากปริมาณ %GM ต่ำที่สุด ที่สามารถตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในทุกตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ทั้ง 2 ยีนที่ระดับ %GM ตั้งแต่ 1% - 0.01% GM (v/v) และตรวจไม่พบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ที่ระดับ 0.001% GM (v/v) ดังนั้นวิธีทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้นที่สามารถตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง อยู่ที่ระดับเดียวกันคือ 0.01% GM (v/v) ซึ่งใกล้เคียงกับการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างทดสอบประเภทอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Soga *et al*. (2022) ซึ่งได้พัฒนาวิธีตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารและอาหารสัตว์ แบบ singleplex โดยใช้ SYBR green ทดแทน probe พบว่า สามารถตรวจคัดกรองได้ที่ 0.1% GM และงานวิจัยของ Park *et al*. (2021) ได้พัฒนาวิธีตรวจคัดกรองถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยเครื่อง Real-time PCR พบว่า

สามารถตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ได้ที่ระดับ 0.01% ถึง 0.05% GM (v/v)

2.2 การทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD)

การทดสอบหาปริมาณต่ำสุดของการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่ 0.01% GM (v/v) ซึ่งได้จากวิธีทดสอบหาปริมาณต่ำสุดเบื้องต้น จากผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงทั้ง 80 ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดเดียวกันที่ 0.01% GM (v/v) ตรวจพบค่า $C_t$ ของ positive control ในทุกรอบการทดสอบ และไม่พบค่า $C_t$ ของ negative control ในทุกรอบการทดสอบ ค่า $C_t$ สูงสุดของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในทุกชนิดตัวอย่างอยู่ที่ 39.98 และ 39.99 ตามลำดับ ซึ่งค่า $C_t$ สูงสุดหาได้จาก ค่า $C_t$ ในชนิดตัวอย่างเดียวกันที่มีค่ามากที่สุด โดยพิจารณาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในแต่ละชนิดตัวอย่างต้องมีค่าไม่เกิน 5% ซึ่งส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานนี้คำนวณได้จาก ค่า $C_t$ ในตัวอย่างทดสอบชนิดเดียวกัน โดยทุกตัวอย่างทดสอบพบค่า $C_t$ ไม่เกิน 40 cycles ของสภาวะที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาจำนวน 45 cycles โดยโปรแกรมการทำงานของเครื่อง LightCycler® 480 II ที่ใช้ในการทดสอบ จะไม่คำนวณค่า $C_t$ ใน 5 cycles สุดท้ายของจำนวน cycles ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจาก ค่า $C_t$ ที่ได้มีค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) สูงกว่าค่าความไม่แน่นอนของค่า $C_t$ ใน cycles อื่นๆ (Roche, 2008) และมีค่า ±3SD ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เท่ากับ ±0.81 และ ±0.83 ตามลำดับ ดังนั้นค่า cut-off ของค่า $C_t$ ในการรายงานผลทดสอบว่า “พบ” สำหรับการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ต้องมีค่า $C_t$ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 39.98±0.81 และ 39.99±0.83 ตามลำดับ ภายใน 45 cycles เนื่องจากค่า $C_t$ ในตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอาจมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ระยะเวลาการเก็บรักษาดีเอ็นเอ ปริมาณ inhibitor ในตัวอย่างทดสอบ เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่งผลต่อค่า $C_t$ ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบการทดสอบ ดังนั้นการประมาณค่า cut-off เพื่อการรายงานผลการทดสอบ จึงหาได้จากการประมาณค่า $C_t$ มากสุดที่มีโอกาสเป็นไปได้จากตัวอย่างทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดหลาย ๆ ซ้ำรวมกัน ดัง**ตารางที่ 4**

**ตารางที่ 4** ผลการทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.01% GM (v/v)

| ตัวอย่างทดสอบ | ผลทดสอบ Limit of Detection (LOD) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | CaMV 35S promoter | | NOS terminator | |
| | Max $C_t$ | SD | Max $C_t$ | SD |
| อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับแมว) (n = 10) | 39.96 | 0.25 | 39.98 | 0.29 |
| อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับสุนัข) (n = 10) | 39.95 | 0.31 | 39.94 | 0.28 |
| อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับแมว) (n = 10) | 39.98 | 0.27 | 39.88 | 0.23 |
| อาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับสุนัข) (n = 10) | 39.93 | 0.24 | 39.91 | 0.25 |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ (n = 10) | 39.95 | 0.25 | 39.99 | 0.31 |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับเป็ด (n = 10) | 39.94 | 0.32 | 39.89 | 0.30 |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค (n = 10) | 39.88 | 0.21 | 39.83 | 0.28 |
| อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสุกร (n = 10) | 39.97 | 0.28 | 39.95 | 0.29 |
| **Total (n = 80)** | **39.98** | **0.27** | **39.99** | **0.28** |
| **3SD (n = 80)** | **0.81** | | **0.83** | |
| **Cut-off (Max $C_t$ ± 3SD)** | **39.98 ± 0.81** | | **39.99 ± 0.83** | |
| Positive control (ERM-BF410gk) | 30.86 | 0.34 | 30.94 | 0.21 |
| Negative control (non-GMO TRM-S-1005) | - | - | - | - |

2.3 การทดสอบหาความจำเพาะ

จากผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Duplex Real-time PCR ในตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารสัตว์เลี้ยงและวัตถุดิบจากพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวโพด ซึ่งเป็น Free GMO (blank sample) จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างที่ทดสอบความจำเพาะไม่พบค่า $C_t$ แสดงว่าการพัฒนาโดยการเลือกติด fluorescent dye ที่ probe ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เป็น Duplex Real-time PCR นี้ มีความจำเพาะต่อยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ไม่พบ cross-reactivity ในตัวอย่าง blank sample ซึ่งได้แก่ อาหารสัตว์ อาหารสัตว์เลี้ยง และวัตถุดิบจากพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวโพด ซึ่งเป็น Free GMO

2.4 การประเมินสมรรถนะ

จากผลทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) ของการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงที่ 0.01% GM (v/v) ในข้อที่ 3 ได้ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ที่ระดับ 0.01% GM (v/v) ทั้ง 80 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลบวกจริง (*tp* = 80) และไม่พบผลลบปลอม (*fn* = 0) และจากผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี Duplex Real-time PCR ในตัวอย่างอาหารสัตว์ อาหารสัตว์เลี้ยงและวัตถุดิบจากพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวโพด ซึ่งเป็น Free GMO จำนวน 30 ตัวอย่าง ไม่พบการ cross-reactivity ในตัวอย่าง blank sample (ผลลบจริง, *tn* = 30) และไม่พบผลบวกปลอม (*fp* = 0) ดังนั้นความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ สำหรับการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S

promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง มีค่าเท่ากันอยู่ที่ 100% ดัง**ตารางที่ 5**

**ตารางที่ 5** ผลการประเมินสมรรถนะของวิธี Duplex Real-time PCR

| | **จำนวนผลการทดสอบที่ตรวจพบ** | |
|---|---|---|
| | **CaMV 35S promoter** | **NOS terminator** |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจริง (*tp*) | 80 | 80 |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม (*fp*) | 0 | 0 |
| **จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด (*tp* + *fp*)** | **80** | **80** |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบจริง (*tn*) | 30 | 30 |
| จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม (*fn*) | 0 | 0 |
| **จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมด (*tn* + *fn*)** | **30** | **30** |
| **ความไว (Sensitivity)** [*tp* / (*tp* + *fn*)] x 100% | **100 %** | **100 %** |
| **ความจำเพาะ (Specificity)** [tn / (tn + fp)] x 100% | **100 %** | **100 %** |
| **ประสิทธิภาพ (Efficiency)** [(*tp* + *tn*) / (p + n)] x 100% | **100 %** | **100 %** |

**3. การทดสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (amplification range)**

ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 10, 20, 50, 100, 150 และ 200 ng/reaction ตามลำดับ นำมาทดสอบด้วยวิธี Duplex Real-time PCR พบว่า ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ที่แตกต่างกันส่งผลให้ค่า $C_t$ ที่ได้ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator แตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 10 ng/reaction ให้ค่า $C_t$ มากที่สุดของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator เท่ากับ 31.41±0.23 และ 31.83±0.33 ตามลำดับ และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่า $C_t$ ที่ได้จากความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 20, 50, 100, 150 และ 200 ng/reaction โดยใช้สถิติ F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดัง**ตารางที่ 6** เนื่องจากการปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk นั้นเป็นการลดปริมาณทั้ง reference copies ของถั่วเหลือง non-GMO และ target copies ของ ถั่วเหลือง GMO ในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk แม้ว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบจะแตกต่างกันตั้งแต่ 20 - 200 ng/reaction แต่สัดส่วน target copies ของ ถั่วเหลือง GMO ต่อ reference copies ของถั่วเหลือง non-GMO ในวัสดุอ้างอิงรับรอง ERM-BF410gk ยังคงเป็น 10 % GM เช่นเดิม สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปิยรัตน์ และคณะ (2563) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณความ

เข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Real-time PCR โดยการเตรียมดีเอ็นเอของข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งมียีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator อยู่ในโครงสร้างยีนดัดแปรพันธุกรรม จากวัสดุอ้างอิง MON89034 และ NK603 ให้มีระดับการปนเปื้อนที่ 1% และมีระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆตั้งแต่ 50 – 200 ng/reaction พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ 100 – 200 ng/reaction ในวัสดุอ้างอิง MON89034 และNK603 ที่ 1 % GM มีค่า Cp ของยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ไม่แตกต่างกันอยู่ที่ประมาณ Cp = 33 และ Cp = 35 ของทั้งสองยีน ตามลำดับ โดย Cp (Crossing point) หมายถึง จำนวนรอบที่ค่าการเรืองแสงเกิดขึ้นภายในปฏิกิริยาข้ามเกณฑ์การเรืองแสง ซึ่งเป็นค่าเดียวกับค่า $C_t$ (Cycle threshold) (Nassiri *et al*., 2018)

ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงด้วยปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (amplification range) คือ 20 – 200 ng/reaction และปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ใช้ในการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator คือ 20 ng/reaction สอดคล้องกับงานวิจัยของ Turkec *et al*. (2014) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR นั้น ค่า $C_t$ จะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อย จะมีค่า $C_t$ สูง แต่ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากจะมีค่า $C_t$ ต่ำ แต่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทำปฏิกิริยา แต่เป็นจำนวนของ copy number ในดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้น ถึงแม้ความเข้มข้นจะน้อยแต่ถ้ามี copy number ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องตรวจสอบตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไปก็จะเกิดปฏิกิริยา Real-time PCR ได้ตามทฤษฎี (Ellison *et al*., 2006)

**ตารางที่ 6** การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา Duplex Real-time PCR ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง

| Event | ความเข้มข้นเริ่มต้น (ng/reaction) | ค่า $C_t$ จากการตรวจสอบยีน | |
|---|---|---|---|
| | | CaMV 35S promoter | NOS terminator |
| ERM-BF410gk (GTS 40-3-2 event, Roundup Ready) 10 % GM | 10 | 31.41±0.23[a] | 31.83±0.33[a] |
| | 20 | 30.81±0.26[b] | 30.86±0.29[b] |
| | 50 | 30.61±0.32[b] | 30.60±0.31[b] |
| | 100 | 30.50±0.33[b] | 30.47±0.30[b] |
| | 150 | 30.43±0.18[b] | 30.35±0.28[b] |
| | 200 | 30.36±0.21[b] | 30.23±0.22[b] |

หมายเหตุ อักษรที่ตามหลังในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

a, b หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**4. การตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR**

จากการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ที่ส่งตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ณ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในปีงบประมาณ 2568 จำนวนทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 57.50 % **ดังตารางที่ 7** หากผู้ประกอบการผลิตอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย มีความประสงค์ต้องการส่งออกอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงสู่ประเทศคู่ค้าปลายทาง ควรศึกษาระเบียบและข้อบังคับของประเทศคู่ค้าปลายทาง รวมถึงหลักเกณฑ์ในการแสดงฉลาก GMO บนผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงให้ถูกต้อง

ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียกตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และยีน NOS terminator ซึ่งได้แก่ ขนมแมวเลีย อาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขและแมวชนิดซองบรรจุ และชนิดกระป๋อง พบว่าตัวอย่างดังกล่าวมีข้อมูลวัตถุดิบดัดแปรพันธุกรรมแสดงอยู่บนฉลาก เช่น แป้งมันสำปะหลังดัดแปร หรือ แป้งมันฝรั่งดัดแปร เพื่อเพิ่มรสชาติหรือเพิ่มความข้นหนืดในอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก ส่วนตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ดสำหรับสุนัขและแมวนั้น เป็นตัวอย่างที่ได้รับโดยไม่มีฉลากผลิตภัณฑ์ ทำให้ไม่ทราบถึงข้อมูลพืชดัดแปรพันธุกรรมที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์เลี้ยงสำหรับสุนัขและแมว

นอกจากนี้ตรวจพบยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์สำหรับไก่ เป็ด โค และสุกร จำนวน 3 (60%), 1 (20%), 2 (40%) และ 3 (60%) ตัวอย่าง ตามลำดับ ดัง**ตารางที่ 7** เนื่องจากวัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าว ข้าวสาลี กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน เป็นต้น โดยกากถั่วเหลืองเป็นของเหลือในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งประเทศไทยมีอัตราผลผลิตของถั่วเหลืองและข้าวโพดน้อยกว่าปริมาณความต้องการภายในประเทศ อีกทั้งข้าวโพดและถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง จึงมีความจำเป็นในการนำเข้าถั่วเหลืองและข้าวโพดจากประเทศบราซิล สหรัฐอเมริกา และอาร์เจนตินา (ฐิติรัตน์ และคณะ, 2565) ซึ่งประเทศเหล่านี้เป็นผู้ส่งออกถั่วเหลืองและข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมรายใหญ่ของโลก

**ตารางที่ 7** ผลการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR

| ตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง | Duplex Real-time PCR | |
|---|---|---|---|
| | | CaMV 35S promoter (พบ/ตรวจ) | CaMV 35S promoter (พบ/ตรวจ) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับแมว) | 5 | 100% (5/5) | 100% (5/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเปียก (สำหรับสุนัข) | 5 | 80% (4/5) | 80% (4/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับแมว) | 5 | 60% (3/5) | 60% (3/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์เลี้ยงชนิดเม็ด (สำหรับสุนัข) | 5 | 40% (2/5) | 40% (2/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ | 5 | 60% (3/5) | 60% (3/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับเป็ด | 5 | 20% (1/5) | 20% (1/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับโค | 5 | 40% (2/5) | 40% (5/5) |
| ตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับสุกร | 5 | 60% (3/5) | 60% (3/5) |
| **รวม** | 40 | **57.50% (23/40)** | **57.50% (23/40)** |
| positive control (ERM-BF410gk) | 2 | 100% (2/2) | 100% (2/2) |
| negative control (non-GMO TRM-S-1005) | 2 | 0% (2/2) | 0% (2/2) |

**สรุปผลการทดลอง**

การใช้ probe ที่ติดฉลากสีที่แตกต่างกันในด้าน 5’ region ของยีน CaMV 35S promoter เป็นสี FAM และของยีน NOS terminator เป็นสี HEX สามารถนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี Duplex Real-time PCR ได้ ผลการตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR พบว่ามีระดับ % GM ต่ำสุด (Limit of Detection, LOD) เท่ากันอยู่ที่ระดับ 0.01% GM (v/v) และมีค่า $C_t$ เท่ากับ 39.98 ± 0.81 และ 39.99 ± 0.83 ตามลำดับ โดยวิธีดังกล่าวนี้มีความจำเพาะ ไม่พบการ cross-reactivity กับวัตถุดิบอาหารสัตว์ และตัวอย่าง blank sample ที่ Free GMO ผลทดสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่ามีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าประสิทธิภาพเท่ากันอยู่ที่ 100% ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 20 ng/reaction เมื่อทำการตรวจคัดกรองในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงจำนวน 40 ตัวอย่าง มีจำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 57.50 % ที่ตรวจพบ GMO ดังนั้นวิธี Duplex Real-time PCR นี้เหมาะสำหรับนำมาใช้การตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยงได้

**ข้อเสนอแนะ**

ควรนำวิธีการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของของวิธีตรวจคัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ NOS terminator ในตัวอย่างอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง ด้วยวิธี Duplex Real-time PCR นี้ มาประยุกต์ใช้ในการหายีนดัดแปรพันธุกรรมชนิดเฉพาะเจาะจง ในลักษณะเชิงปริมาณ เช่น ยีนที่ทำหน้าที่ต้านทานยากำจัดวัชพืช ได้แก่ ยีน cp4epsps และ ยีน pat / bar ยีนต้านทานแมลง

ได้แก่ ยีน cry1Ab ยีน cry1Ac และ ยีน cry3Bb1 เป็นต้น ในถั่วเหลืองและข้าวโพด ซึ่งวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิดนี้ นิยมใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์และอาหารสัตว์เลี้ยง

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณ น.สพ.อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และนางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

**เอกสารอ้างอิง**

กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2562. ญี่ปุ่นแก้ไขระเบียบการติดฉลากอาหารดัดแปรพันธุกรรม. แหล่งที่มา: https://www.dft.go.th/th-th/NewsList/News-DFT/Description-News-DFT/ArticleId/13881/13881. [4 เมษายน 2568]

กระทรวงสาธารณสุข. 2565. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 432) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง การแสดงฉลากอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม 7 มิถุนายน 2565. ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 139 ตอนพิเศษ 127ง, น. 14-16.

กองควบคุมอาหารและยาสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2568. สถิตินำเข้า - ส่งออกอาหารสัตว์. รายงานอัจฉริยะ นำเข้า – ส่งออกอาหารสัตว์. แหล่งที่มา: https://afvc.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-afvc/services-afvc. [15 กรกฎาคม 2568]

กุลนรี เพชรรงค์, วราภรณ์ ชะอุ่ม และลักขณา ง่วนดา. 2547. การแพร่กระจายของชิ้น DNA CaMV 35S, NOS และยีน EPSPS ในเต้าหู้จากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. จ.ปทุมธานี. 58 หน้า.

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2563. พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม. 50 โครงการวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. น. 1-7.

ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ, สุธานันทน์ นาคประนม, พงศกร สรรค์วิทยากุล, ศิริพร เสนดำ, ปิยนุช ศรชัย, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2565. การตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมด้วย Tetraplex Real-time PCR เพื่อรับรองการนำเข้าสินค้าเกษตร. วารสารแก่นเกษตร. 50 (5): 1353-1372.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ปิยนุช ศรชัย, ฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ และพงศกร สรรค์วิทยากุล. 2561. การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-Time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ตามมาตรฐาน ISO/IEC17025. วารสารวิชาการเกษตร. 36(3): 316-331.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, พงศกร สรรค์วิทยากุล, ปิยนุช ศรชัย และฐิติรัตน์ อัศวมงคลศิริ. 2563. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์คัดกรองยีน CaMV 35S promoter และ Nos terminator ข้าวโพดดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี multiplex Real-time PCR. 50 โครงการวิจัย

พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. น. 137-159.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2568. แนวโน้มอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เลี้ยงไทย. Industry Analysis and Outlook. 23: 1-5.

Artika, I.M., Dewi, Y.P., Nainggolan, I.M., Siregar, J.E. and Antonjaya, U. 2022. Real-time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*. 13 (2387): 1-21.

Borges, B.J.P., Arantes, O.M.N., Fernandes, A.A.R. Broach, J.R. and Fernandes, P.M.B. 2018. Genetically modified labeling policies: moving forward or backward?. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 6 (181): 1-10.

Ellison, S.L.R., English, C.A., Burns, M.J. and Keer, J.T. 2006. Routes to improving the reliability of low-level DNA analysis using real-time PCR. BMC Biotechnology. 11 pp.

ERM. 2008. Certification report – certification of reference materials of soya seed powder with different mass fractions of genetically modified Roundup Ready soya. European reference materials (ERM). [Online]. Available: https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC4 7 5 2 5 / 1 1 3 - 2008_as%20published.pdf. Accessed January 18, 2025.

Eugster, A., Murmann, P., Kaenzig, A. and Breitenmoser A. 2014. Development and balidation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV tetraplex Real-time PCR Screening method to detect regulatory genes of genetically modified orgaminsms in food. *Food Analysis*. 68(10): 701-704.

Eurofins. 2023. GMO regulations in the Russian Federation require specific test scopes. [Online]. Available: https://www.eurofins.de/food-analysis/food-news/food-testing-news/gmo-regulations-in-the-russian-federation/. Accessed April 4, 2025.

European Commission. 2003a. regulation (EC) no. 1829/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. pp. 1-23.

European Commission. 2003b. regulation (EC) no. 1830/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. pp. 24-28.

FDA. 2024. Agricultural biotechnology. the U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Online]. Available: https://www.fda.gov/food/consumers/agricultural-biotechnology. Accessed June 20, 2025.

Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M. and Schönbrunn, E. 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of roundup ready crops. PNAS. 103(35): 13010-13015.

ISAAA. 2024. Gm approval database. International service for the acquisition of agribiotech application (ISAAA). [Online]. Available: http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/. Accessed April 1, 2025.

ISO 21569: 2005/ Amd. 1: 2013. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods - amendment 1. 1st edition. The International Organization for Standardization. Switzerland. 87 pp.

Lee, M.A., Squirrell, D.L., Lesile D.L. and Brown, T. 2013. Homogenous fluorescent chemistries for Real-time PCR, pp. 1-36. Saunder, N. A. and Lee, M. A. ed. Real-time PCR advanced Technologies and applications. Caister Academic Press. Norflox, United Kingdom.

Mazrooei, S.S.A. and Alreshidi, D.R. 2024. pcr-screening of genetically modified organisms in food and feed products sold in Kuwait's market. *Kuwait Journal of Science*. 51: 1-5.

Nassiri, M., Torshizi, M.E., Ghovvati, S. and Doosti, M. 2018. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico apprpach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics*. 45(2): 306-319.

Nguyen, T.C.T., Son, R., Raha, A.R., Lai, O.M. and Wong, C.M.V.L. 2008. Detection of genetically modified organisms (GMO) using molecular techniques in food and feed samples from Malaysia and Vietnam. *International Food Research Journal*. 15: 155-166.

Oliveira, C.A.M., Kommers, C.M., Lehmann, F.K.M., Fonseca, A.S.K., Ikuta, N. and Lunge, V.R. 2016. Detection of genetically modified maize in processed products, dry grains, and corn ears intended for fresh consumption in South Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 15(4): 1-10.

Park, S.B., Kim, J.Y., Lee D.G., Kim, J.H., Shin, M.K. and Kim, H.Y. 2021. Development of a Systematic qPCR Array for Screening GM Soybeans. *Foods*, 10(610): 1-11.

Roche. 2008. LightCycler® 480 instrument operator's manual. 3rd eds. Roche Diagnostics. Germany. P. 17.

Roche. 2023. High pure PCR template preparation kit. 28th eds. Roche Diagnostics. Germany. 16 pages.

Roche. 2024. LightCycler® 480 Detection Formats [Onine]. Available: https://lifescience.roche.com/global/en/article-listing/article/lightcycler-480-detection-formats.html. Accessed May 8, 2025.

Soga, K., Nakamura, K., Egi, T., Narushima, J., Narushima, J., Yoshiba, S., Kitshine, M., Mano, J., Kitta, K., Takabatake, M., Shibata, N. and Kondo, K. 2022. Development and validation of a new robust detection method for low-content DNA using Cq-based Real-time PCR with optimized standard plasmids as a control sample. *Analytical Chemistry*. 94(41): 14475-14483.

Silva, R. B. and Ellison, S. L. R. (Eds). 2021. *Eurachem/CITAC Guide*; Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. pp. 7-9.

Stefanova, P., Brazkova, M. and Angelova, G. 2025. PCR screening of feed products for the detection of genetically modified soybean. FoSET 2024. 6 pp.

Turkec, A., Kazan, H., Karacanli, B. and Lucas, S.J. 2014. DNA extraction technique compared for accurate detection of genetically modified organism (GMOs) in maize food and fee products. *J Food Sci Technol*. 52(8): 5164-5171.

Vujica, K., Sesar, A. and Primorac J. 2023. detection of GMO in samples of food and animal feed sold in Bosnia and Herzegovina (bih) market. p. 141-145. In: 58th Croatian & 18th International Symposium on Agriculture 11-17 February 2023. Dubrovnik, Croatia.

Waiblinger, H.U., Ernst, B., Anderson, A. and Pietsch, K. 2008. Validation and collaborative study of a P35S and TNOS Duplex Real-time PCR screening method to detect genetically modified organism in food product. *Eur Food Res Technol*. 226: 1221-1228.