

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

การตรวจรับรองอาหารให้เป็นไปตามบทบัญญัติทางศาสนา นอกจากต้องการวิธีปฏิบัติที่แม่นยำ สะดวกและรวดเร็วแล้ว ยังต้องสามารถใช้ตรวจอาหารได้หลายชนิด โดยปกติอาหารแต่ละชนิดจะมีเนื้ออาหารแตกต่างกัน เนื่องจากมีองค์ประกอบในสัดส่วนที่ต่างกัน การทดลองได้จัดแบ่งอาหารตามข้อมูลขององค์ประกอบทางเคมีเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีโปรตีนสูง กลุ่มที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง และกลุ่มที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่สูง

การทดลองได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารตัวอย่างแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 2-3 ตัวอย่าง และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบตามวิธีของ AOAC (1984) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหาร	ปริมาณสารอาหาร (%)*		
	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน
ปลาทูน่ากระป๋องในน้ำมัน	26.21	0	8.93
ซูปรัก่อน	25.16	2.84	5.17
ขนมปังเวเฟอร์	0.89	72.62	26.04
บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป	9.19	82.31	7.11
เยลลี่เจลาติน	4.09	88.25	0
ชีสโกแลต	6.98	48.14	30.23
มายองเนส	1.10	4.20	44.05

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

จากตารางพบว่า ในกลุ่มอาหารที่มีโปรตีนสูงจะพบสัดส่วนโปรตีนสูงถึง มากกว่า 25% และพบว่าในกลุ่มนี้ยังมีปริมาณไขมันปะปนอยู่ด้วย ในอาหารกลุ่มที่มีคาร์โบไฮเดรต พบปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 72.62 ในขนมปังเวเฟอร์ร้อยละ 82.31 ในบะหมี่กึ่งสำเร็จ และร้อยละ 88.25 ในเยลลี่เจลาติน และจะพบว่าขนมปังเวเฟอร์มีสัดส่วนของไขมันสูงถึงร้อยละ

26.04 สำหรับอาหารในกลุ่มสุดท้ายซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่สูง พบว่าในซีอิ๊วโกแลตมีไขมันร้อยละ 30.23 แต่ก็มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 48.14 ด้วย ในขณะที่มายองเนสมีปริมาณไขมันสูงร้อยละ 44.05

ผลการวิเคราะห์ที่ได้ปริมาณสารอาหารสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (กองโภชนาการ, 2530; Osborne and Voogt, 1978; The United States department of agriculture [USDA], 2001) เนื่องจากอาหารในแต่ละกลุ่มมีคุณลักษณะเฉพาะ และคุณลักษณะบางประการมีผลโดยตรงต่อการแยกสกัด DNA จากตัวอย่าง อาหารในกลุ่มที่มีโปรตีนสูง มีโอกาสที่ DNA ที่แยกสกัดได้จะปะปนได้ด้วยโมเลกุลที่เป็นตัวยับยั้งหรือโปรตีนโมเลกุลเล็กที่มีผลต่อการนำ DNA ไปประยุกต์ใช้ อาหารกลุ่มที่มีไขมันสูงจะสกัด DNA จากตัวอย่างอาหารได้ยาก และอาหารกลุ่มที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เหลืออยู่ภายหลังจากกระบวนการสกัด DNA จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์โพลิเมอเรส (Rossen *et al.*, 1992)

ดังนั้น ในการทดสอบจึงแบ่งตัวอย่างอาหารเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เนื้อสุกร กลุ่มที่ 2 ปลาทูน่ากระป๋องในน้ำมันและซูปก้อนซึ่งมีโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 25 กลุ่มที่ 3 ขนมปังเวเฟอร์ บะหมี่กึ่งสำเร็จรูปและเยลลี่เจลาติน มีคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าร้อยละ 50 และกลุ่มที่ 4 ซีอิ๊วโกแลตและมายองเนส มีไขมันสูงกว่าร้อยละ 30

4.2 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับตัวอย่างอาหารแต่ละชนิด

การทดลองสกัด DNA จากตัวอย่างอาหารโดยใช้วิธีในการสกัด DNA แตกต่างกัน 4 วิธีคือ การสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน การสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB การสกัด DNA ด้วยวิธี urea และการสกัด DNA โดยใช้ชุด kit สำเร็จรูป โดยประเมินผลจากปริมาณ DNA ที่สกัดได้และความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสง (OD) และสัดส่วนของค่า OD ที่ 260 nm / ค่า OD ที่ 280 nm ตามลำดับ และการสกัด DNA จากเนื้อสุกรโดยใช้วิธีต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากเนื้อสุกรที่สกัด DNA ด้วยวิธีต่าง ๆ

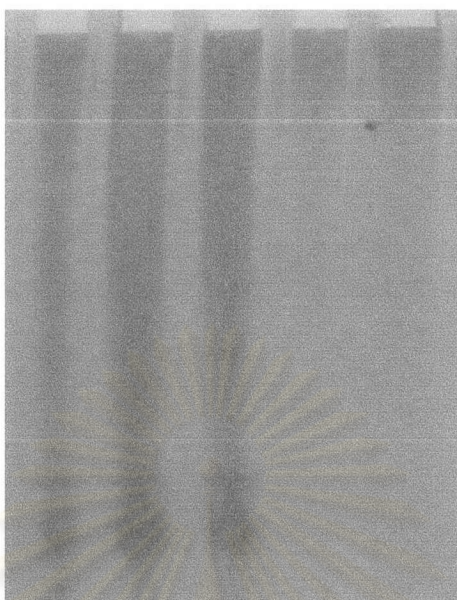
วิธีสกัด DNA	ความยาวคลื่น (nm)				OD ₂₆₀	[DNA]*
	230	260	280	320	OD ₂₈₀	(µg/µl)
วิธีมาตรฐาน	0.576	0.352	0.202	0.317	1.74	7.05
CTAB	0.261	0.186	0.137	0.00373	1.36	3.72
Urea	0.275	0.299	0.131	0.134	1.53	5.99
kit	0.221	0.117	0.0677	0.0883	1.72	2.34

*ค่าจากการคำนวณ (Davis *et al.*, 1994) คูณที่ 3 ประกอบ

จากตารางพบว่า วิธีมาตรฐานมีความเหมาะสมในการสกัด DNA จากเนื้อสุกรมากกว่าวิธีอื่น โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ 260 nm 0.352 โดยที่สัดส่วนของค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ มีค่า 1.74 สอดคล้องกับผลของการสกัด DNA ด้วยชุดสำเร็จรูป

การที่ DNA ที่สกัดด้วยวิธีมาตรฐานให้ DNA ในปริมาณที่สูงกว่าวิธีอื่น โดยให้ DNA เข้มข้น 7.05 µg/µl (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับผลการทำ Urea-PAGE (รูปที่ 4) ซึ่งปรากฏแถบ DNA เข้มเป็นบริเวณยาวแสดงว่ามีปริมาณ DNA อยู่สูงและสอดคล้องกับรายงานถึงประสิทธิภาพการสกัด DNA ด้วยวิธีนี้โดย (Sambrook *et al.*, 1989) ทั้งนี้เพราะในขั้นตอนการสกัด เอนไซม์ proteinase K จะย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในเนื้ออาหารทำให้ DNA สามารถแยกออกจากเนื้ออาหารได้โดยง่าย นอกจากนี้ proteinase K ยังมีผลต่อเอนไซม์ nuclease ทำให้เอนไซม์ nuclease ไม่สามารถย่อยสลาย DNA ได้ (Burden and Whitney, 1995) และจากอัตราส่วนของ OD₂₆₀/OD₂₈₀ มีค่า 1.74 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1.8 กว่า DNA ที่สกัดจากวิธีอื่น แสดงว่า DNA ที่ได้มีความบริสุทธิ์กว่าวิธีอื่น (ยกเว้นการใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป) แต่ก็ยังมีการปนเปื้อนของโปรตีนบ้างเล็กน้อย เนื่องจากการสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน ใช้เอนไซม์ proteinase K ย่อยสลายโปรตีน (Sambrook *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นการกำจัดโปรตีนออกไปส่วนหนึ่ง DNA ที่ได้จึงบริสุทธิ์ขึ้น ส่วนการสกัด DNA จากสุกรด้วย CTAB และ urea ให้ DNA ปริมาณมากแต่ไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ ต่ำกว่า 1.8 มาก แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนมากกว่าการสกัดด้วยวิธีมาตรฐาน (Burden and Whitney, 1995) ไม่เหมาะสมจะนำมาใช้สกัด DNA จากเนื้อสุกร เนื่องจากการทำปฏิกิริยา PCR ต้องการ DNA ต้นแบบที่บริสุทธิ์ มีการปนเปื้อนของสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาน้อยที่สุด เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากที่สุด

1 2 3 4 5



รูปที่ 4 แถบ DNA ที่สกัดจากเนื้อสุกรด้วยวิธีต่าง ๆ (แถวที่ 1 วิธี CTAB, แถวที่ 2 วิธีมาตรฐาน, แถวที่ 3 วิธี Urea, แถวที่ 4 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป และแถวที่ 5 ชุดควบคุมที่ไม่มี DNA)

S C U K S C U K S C U K



รูปที่ 5 แถบ DNA ของตัวอย่างอาหารจากแต่ละกลุ่มที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

(S = วิธีมาตรฐาน, C = วิธี CTAB, U = วิธี Urea และ K = ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป; แถวที่ 1-4 DNA ปลาทูน่ากระป๋อง, แถวที่ 5-8 DNA เส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป และแถวที่ 9-12 DNA มายองเนส)

สำหรับอาหารกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโปรตีนสูงเช่นเดียวกับในเนื้อสุกร พบว่าการสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งใช้เอนไซม์ proteinase K ย่อยสลายโปรตีนก่อนการสกัด DNA ออกมา ทำให้มีการปนเปื้อนของโปรตีนมากับ DNA น้อย DNA ที่สกัดได้จึงบริสุทธิ์โดยใน DNA จากปลาทูน่าบรรจุกระป๋องและซูบก้อนให้ค่า OD_{260}/OD_{280} เป็น 1.75 และ 1.79 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ใกล้เคียง 1.8 ซึ่งเป็นค่าของ DNA บริสุทธิ์ ส่วนการสกัด DNA ด้วย CTAB จากผลในตารางที่ 3 และรูปที่ 5 พบว่าให้ DNA ปริมาณใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานแต่จากอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} มีค่าต่ำมาก แสดงว่า DNA ที่สกัดได้ไม่บริสุทธิ์ มีการปนเปื้อนของโปรตีน แต่ไม่มีการปนเปื้อนของ RNA เพราะการสกัด DNA ด้วย CTAB ใช้เอนไซม์ RNase ย่อยสลาย RNA การสกัดด้วย Urea นั้น ได้ DNA น้อยกว่าสองวิธีแรกและ OD_{260}/OD_{280} ในทั้งสองตัวอย่างมีค่าสูง ใกล้เคียง 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA (Sambrook *et al.*, 1989) DNA ที่สกัดได้จึงไม่บริสุทธิ์

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 2 (โปรตีนสูงกว่าร้อยละ 25)

ตัวอย่าง	วิธีสกัด*	ความยาวคลื่น (nm)				$\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$	[DNA]** ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
		230	260	280	320		
1 ปลาทูน่า บรรจุ กระป๋อง	1	0.356	0.369	0.211	0.0791	1.75	7.39
	2	0.405	0.390	0.296	0.197	1.32	7.01
	3	0.207	0.022	0.113	0.00151	1.92	4.36
	4	0.037	0.0996	0.056	0.0264	1.77	1.99
2 ซูบก้อน	1	0.187	0.167	0.0934	0.00058	1.79	3.35
	2	0.297	0.150	0.122	0.0891	1.23	3.01
	3	0.177	0.114	0.0558	0.0108	2.05	2.29

* วิธีสกัด : 1 = วิธีมาตรฐาน, 2 = CTAB, 3 = Urea, 4 = ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป

** ค่าจากการคำนวณ คูบที่ 3 ประกอบ

ในตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่สูง พบว่าการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB จะให้ DNA ปริมาณสูงกว่า DNA ที่สกัดด้วยวิธีอื่น สอดคล้องกันทั้งผลจากการคำนวณในตารางที่ 4 และจากรูปที่ 3 ซึ่งปรากฏแถบ DNA เป็นบริเวณยาวและเข้มกว่าวิธีอื่น และจากค่า OD_{260}/OD_{280} (ตารางที่ 4) DNA ที่ได้ก็มีความบริสุทธิ์กว่าวิธีอื่น ๆ ด้วย เนื่องจากในสภาวะที่ความเข้มข้นเกลือสูงนั้น CTAB ซึ่งเป็น cationic detergent จะจับกับ

โมเลกุลโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตขนาดใหญ่ตกตะกอนออกจากสารละลาย (Sambrook and Russell, 2001) ทำให้ได้ DNA ที่บริสุทธิ์ขึ้น ส่วนการสกัดด้วย urea แม้จะได้ปริมาณ DNA ใกล้เคียงกันแต่ DNA ไม่บริสุทธิ์ และสำหรับการสกัดด้วยวิธีมาตรฐานนั้น DNA ที่ได้ไม่บริสุทธิ์มีการปนเปื้อนของโปรตีน โดยเฉพาะใน DNA ที่สกัดจากเส้นบะหมี่ถึงสำเร็จรูปค่า OD_{260}/OD_{280} เป็น 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA ด้วย

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 3 (คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าร้อยละ 50)

ตัวอย่าง	วิธีสกัด*	ความยาวคลื่น (nm)				OD_{260}	[DNA]** ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
		230	260	280	320	OD_{280}	
1 เส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป	1	0.187	0.271	0.135	0.0310	2.00	5.42
	2	0.302	0.389	0.215	0.0217	1.79	7.74
	3	0.0854	0.332	0.235	0.0337	1.15	6.63
	4	0.239	0.147	0.082	0.0562	1.79	2.93
2 เวเฟอร์	1	0.300	0.180	0.123	0.0109	1.46	3.59
	2	0.223	0.292	0.169	0.0880	1.73	5.85
	3	0.574	0.140	0.110	0.0762	1.28	2.80
3 กุ้งเจลาติน	1	0.486	0.335	0.322	0.291	1.04	6.70
	2	0.338	0.565	0.331	0.0234	1.70	7.30
	3	0.254	0.0860	0.0506	0.0164	1.70	1.72
4 เยลลี่เจลาติน	1	0.396	0.178	0.1726	0.175	1.03	3.55
	2	0.212	0.213	0.119	0.197	1.78	4.25
	3	0.222	0.192	0.101	0.0873	1.90	3.84

*วิธีสกัด : 1 = วิธีมาตรฐาน, 2 = CTAB, 3 = Urea, 4 = ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป

** ค่าจากการคำนวณ คูบที่ 3 ประกอบ

สำหรับอาหารกลุ่มที่ 4 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยไขมันสูง การสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐานและ CTAB จะให้ DNA ปริมาณน้อยกว่าการสกัดด้วย urea (ตารางที่ 5) และจากค่า OD_{260}/OD_{280} ซึ่งมีค่าอยู่นอกช่วง 1.6-1.8 แสดงว่า DNA ที่สกัดได้มีการปนเปื้อนจากสารอื่น ๆ จึงไม่บริสุทธิ์ สำหรับการสกัดอาหารกลุ่มนี้ด้วย urea พบว่าได้ DNA ปริมาณสูงและมีความบริสุทธิ์กว่าสองวิธีข้างต้นด้วย เนื่องจากในสภาวะที่มี urea ไขมันจะแยกออกจากเนื้ออาหารได้ดีขึ้น

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 4 (ไขมันสูงกว่าร้อยละ 30)

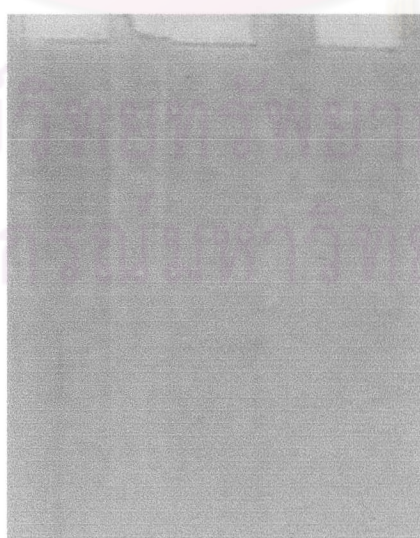
ตัวอย่าง	วิธีสกัด*	ความยาวคลื่น (nm)				$\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$	[DNA]** ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
		230	260	280	320		
1 มายองเนส	1	0.193	0.0237	0.107	0.00174	2.21	4.75
	2	0.128	0.0921	0.0474	0.00431	1.94	1.84
	3	0.186	0.318	0.195	0.0454	1.74	6.35
	4	0.113	0.0949	0.0544	0.00226	1.75	1.90
2 ซีอิ๊วโกแลต	1	0.753	0.173	0.137	0.101	1.15	3.45
	2	0.161	0.0980	0.0744	0.00249	1.32	1.96
	3	0.393	0.339	0.197	0.0630	1.72	6.78

*วิธีสกัด : 1 = วิธีมาตรฐาน, 2 = CTAB, 3 = Urea, 4 = ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป

** ค่าจากคำนวณ คูบที่ 3 ประกอบ

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า อาหารแต่ละกลุ่มมีวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมกับอาหารนั้นแตกต่างกันดังได้กล่าวมาแล้ว โดยจะเห็นว่าการสกัด DNA โดยชุดสกัด DNA สำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัยนี้แม้จะให้ DNA ที่บริสุทธิ์ (รูปที่ 6) แต่เนื่องจากวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง จึงให้ความสนใจในการสกัด DNA ด้วย 3 วิธีแรกมากกว่า

1 2 3



รูปที่ 6 แถบ DNA ของตัวอย่างอาหารที่สกัดด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (แถวที่ 1 DNA จากปลาทูนากะป๋อง, แถวที่ 2 เส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป และแถวที่ 3 มายองเนส)

2) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเทคนิค PCR

spike พลาสมิด pBIC 35 ลงในตัวอย่างอาหารแล้วทำปฏิกิริยา PCR ปรากฏว่าทุกตัวอย่างเกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของพลาสมิด (ไม่ได้แสดงผล) แสดงว่า DNA ที่สกัดได้ทั้งหมดมีการปนเปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR อยู่หรือไม่หรือไม่มีเลย

4.3 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบสปีชีส์ของเนื้อสัตว์จากดีเอ็นเอเชิงคุณภาพ

4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสปีชีส์สัตว์นั้นได้มีผู้ออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากหลายแหล่ง เช่น mitochondrial cytochrome *b* gene (Meyer *et al.*, 1995; Matsunaga *et al.*, 1999; Wolf, Rentsch and Hübner, 1999), satellite (Guoli *et al.*, 1999), ribosomal RNA (Carrera *et al.*, 1999; Borgo *et al.*, 1996) แม้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากแหล่งดังกล่าวนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA/RNA ได้ในสัตว์หลาย ๆ สปีชีส์ แต่เมื่อทำปฏิกิริยา PCR แล้วจะต้องนำผลผลิตที่ได้มาแยกด้วยเอนไซม์อีกครั้งหนึ่งแล้วตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ จึงจะทราบว่าเป็นสัตว์สปีชีส์ใด ซึ่งค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานาน นอกจากนี้ แม้ว่าจะมีผู้นำเทคนิค multiplex PCR มาใช้ในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ แต่การออกแบบไพรเมอร์มีความซับซ้อนมากกว่า และมักพบปัญหาการทำปฏิกิริยาระหว่างไพรเมอร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสุกรด้วยเทคนิค PCR มาตรฐานเพียงขั้นตอนเดียว โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน growth hormone (Meyer *et al.*, 1994)

ในขั้นต้นได้สืบค้นข้อมูล (DNA sequences) จาก DNA data bank ซึ่งรวบรวม DNA sequence ของสัตว์ พืชและจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีผู้วิจัยไว้ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ของยีน growth hormone gene ของสุกร จากข้อมูลทั้งหมด growth hormone gene ของสุกร 30 ข้อมูล แล้วนำมาตรวจสอบ homology กับ growth hormone gene ของสัตว์ชนิดอื่น (วัว 13 ข้อมูล, ควาย 1 ข้อมูล, ไก่ 12 ข้อมูล, กวาง 1 ข้อมูล, สุนัข 2 ข้อมูล, เป็น 1 ข้อมูล, ปลา 15 ข้อมูล, แพะ 4 ข้อมูล, คน 15 ข้อมูล, นกกระจอกเทศ 1 ข้อมูล, นกพิราบ 1 ข้อมูล, นกกระทา 1 ข้อมูล, กระจ่าง 1 ข้อมูล, เต่า 1 ข้อมูล และแกะ 14 ข้อมูล) แต่ไม่พบส่วนของ DNA สุกรที่เฉพาะเจาะจง (unique) ไม่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสุกรได้ จึงพิจารณาการออกแบบไพรเมอร์จากยีนกล้ามเนื้อของสุกร (skeletal muscle genes) ตามที่ Davoli และคณะ (1999) ได้ศึกษาไว้ทั้งหมด

72 โคลน ประกอบด้วย nuclear gene 53 โคลน mitochondrial genes 4 โคลน uncharacterized ESTs 24 โคลน และมี 2 โคลนที่ไม่ homology กับสปีชีส์อื่น ๆ เนื่องจากโคลนเหล่านี้มีความจำเพาะต่อเซลล์ที่พบในกล้ามเนื้อของสุกร ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบเนื้อสัตว์ ดังนั้นจึงเลือกออกแบบไพรเมอร์จาก 3 โคลนที่แตกต่างและไม่มีความสัมพันธ์ใด ๆ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในระบบข้อมูลทั้งหมด ซึ่งได้แก่ Z98771, Z98802, และ Z98813 โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ (ตารางที่ 6) สอดคล้องตามเงื่อนไขที่รายงานในบทที่ 2

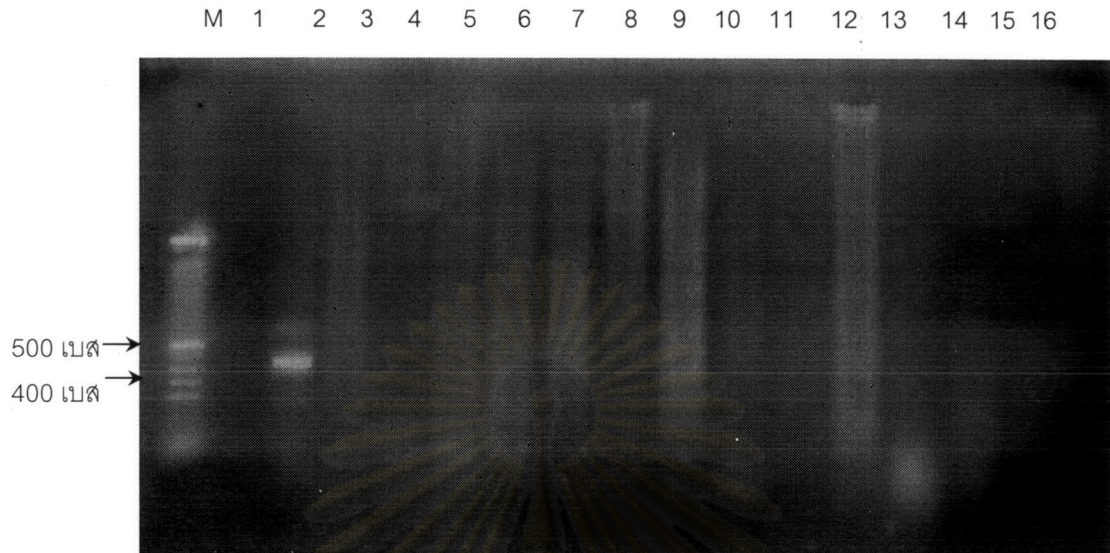
ตารางที่ 6 คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนกล้ามเนื้อของสุกร

ไพรเมอร์	Accession Number	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (forward และ reverse primer ตามลำดับ)	Annealing temperature	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR
771	Z98771	5'-taaccaggacattcggctgtac-3' 5'-aaccttatagacagctaaaagg-3'	44°C	212 bp
802	Z98802	5'-cacgtgcgagagcctcaaggacacc-3' 5'-ggccacggcctccatggccttcgcac-3'	55°C	359 bp
813	Z98813	5'-ctattgatacaatattgtgcaggc-3' 5'-cattcatgatattccatcactgagg-3'	45°C	450 bp

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ข้างต้นมาทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA สุกร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากสุกรได้จากคู่ไพรเมอร์ 813 ในขณะที่ไพรเมอร์ 771 และ 802 ไม่เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA อาจเกิดจากไพรเมอร์ 802 ออกแบบจาก phosphoglycerate mutase ซึ่งเป็น nuclear gene จำนวนชุดของ genome DNA ซึ่งเป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยา PCR มีอยู่น้อยกว่า mitochondrial gene ถึง 10,000 เท่า (Wolf *et al.*, 1999) การตรวจสอบจึงทำได้ยากกว่า ส่วนไพรเมอร์ 771 ออกแบบจากโคลน Z98771 ซึ่งไม่ homology กับ cDNA สปีชีส์อื่น ๆ แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มขึ้นส่วน DNA ของสุกรได้ เนื่องจากส่วนของ DNA ต้นแบบอาจอยู่ในบริเวณที่ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับได้ และเหตุผลที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ การออกแบบไพรเมอร์นี้ออกแบบจาก mRNA แต่ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ใช้ DNA เป็นต้นแบบ ซึ่งอาจจะไม่เหมือนกัน 100% ไพรเมอร์จึงไม่สามารถจับกับ DNA ต้นแบบได้

เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ 813 มาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับ DNA ของสุกรและสัตว์อีก 14 ชนิด ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ผลดังรูปที่ 7 ปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 450 เบส (ตรงกับที่คำนวณไว้จากการออกแบบไพรเมอร์) เฉพาะในสุกรเท่านั้นแต่ไม่ปรากฏในสัตว์ชนิด

อื่น ๆ แสดงว่า คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงกับสุกรแต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่ทำการวิจัย จึงเลือกไพรเมอร์นี้ในการทำ PCR ตรวจหา DNA สุกรต่อไป



รูปที่ 7 ชิ้นส่วน DNA จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 381 กับ DNA จากเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ เปรียบเทียบกับสุกร

(M = Marker 100 base, 1 = ไม่มี DNA, 2 = สุกร และ 3-16 คือ วัว, แกะ, ไก่, กุ้ง, กิ้ง, ปลาแซลมอน, ปลาเก๋า, ปลานิล, ปลากะพง, ปลาทับทิม, หอยแมลงภู่, หอยเชลล์, หอยลาย และ หอยแครง ตามลำดับ)

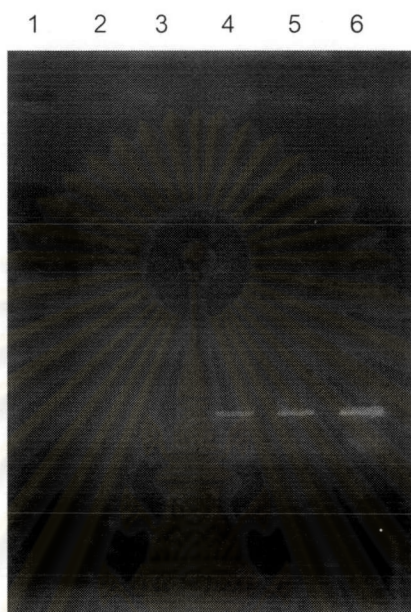
4.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากรูปที่ 7 ในสุกร (แถวที่ 2) ปรากฏแถบ DNA จากปฏิกิริยา PCR 2 แถบ แต่ไม่ชัดเจนจึงปรับสภาวะในการปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อ DNA แม่แบบ โดยปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ annealing temperature

1) ความเข้มข้นของ $MgCl_2$

เมื่อนำ DNA สุกรมาทำปฏิกิริยา PCR ที่ annealing temperature $45^{\circ}C$ โดยใช้ $MgCl_2$ ระดับต่าง ๆ กัน พบว่า ในสภาวะที่ไม่มี $MgCl_2$ จะไม่เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA สุกร (รูปที่ 8) เนื่องจากในสภาวะที่ไม่มี Mg^{2+} เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ไม่ทำงาน เมื่อมี $MgCl_2$ 0.5 μ l (0.42 mM) และ 1 μ l (0.83 mM) ไม่มีแถบ DNA แสดงว่าไม่เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ $MgCl_2$ เป็น 1.5 μ l (1.25 mM) จะปรากฏแถบ DNA และเมื่อเพิ่ม $MgCl_2$ เป็น 2 μ l (1.66 mM) แถบ DNA ชัดเจนขึ้น และชัดเจนที่สุดเมื่อปริมาณ $MgCl_2$ เป็น 2.5 μ l (2.08 mM)

แสดงว่าความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ในงานวิจัยนี้คือ 2.08 mM (2.5 μ l / ปฏิกิริยา 30 μ l) เนื่องจากปริมาณ Mg^{2+} มีผลต่อการจับกันของไพรเมอร์กับ DNA ต้นแบบ, ความจำเพาะของผลิตภัณฑ์จากแม่พิมพ์ และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) โดยในสถานะที่มี Mg^{2+} น้อยเกินไปจะลดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (วัชรีย์ อัดถทิพพหลคุณ และมนตรี อัดถทิพพหลคุณ, 2536)

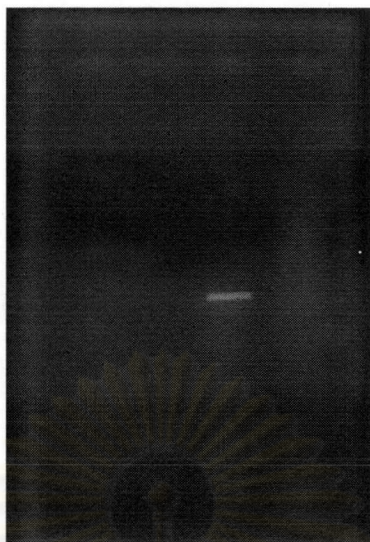


รูปที่ 8 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณ $MgCl_2$ จาก 0-2.08 mM (แถวที่ 1 = $MgCl_2$ 0 ml, 2 = 0.5 ml (0.42 mM), 3 = 1.0 ml (0.83 mM), 4 = 1.5 ml (1.25 mM), 5 = 2.0 ml (1.66 mM), 6 = 2.5 ml (2.08 mM))

2) Annealing temperature

จากการทดลองแปร annealing temperature เป็น 4 ค่าคือ 40, 43, 45 และ 47°C พบว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 43°C ไม่มีแถบ DNA แสดงว่าไม่เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA เมื่อเพิ่ม annealing temperature เป็น 45°C ปรากฏแถบ DNA ค่อนข้างชัดเจน 1 แถบ (รูปที่ 9) แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 47°C ปรากฏ DNA smear ไม่ปรากฏแถบ DNA ที่ชัดเจนที่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้น annealing temperature ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วน DNA ของสุกรด้วยไพรเมอร์ 381 คือ 45°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่า melting temperature (47-48°C) ของไพรเมอร์ 2-3°C ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA ต้นแบบได้ดีกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ แต่ที่อุณหภูมิ 40, 43 และ 47°C อุณหภูมิไม่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ที่จะจับ DNA ต้นแบบจึงไม่เกิดการเพิ่มขึ้นส่วน DNA ในปฏิกิริยา PCR

1 2 3 4



รูปที่ 9 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปร annealing temperature เป็น 40, 43, 45 และ 47°C ตามลำดับ

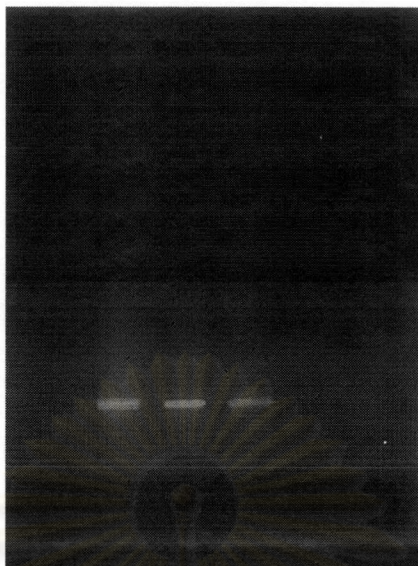
4.3.3 ทดสอบ sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

ตรวจสอบ sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันความน่าเชื่อถือและความสามารถที่จะนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบอาหาร โดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

4.3.3.1 ปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้

การตรวจสอบปริมาณ DNA สุกรน้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้มีความสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์ sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ จากการคำนวณความเข้มข้น DNA สุกรที่สกัดได้จากวิธีมาตรฐานคือ 7.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ซึ่งเมื่อนำมาเจือจาง 5-1,000 เท่า แล้วทำ PCR ที่ annealing temperature 45 °C และปริมาณ MgCl_2 2.08 mM พบว่าในสถานะที่ใช้ DNA สุกรต้นแบบที่ไม่เจือจางในการทำปฏิกิริยา PCR จะให้ปริมาณผลผลิต PCR มากที่สุด เห็นแถบ DNA ได้ชัดเจน (รูปที่ 10) แต่เมื่อเจือจาง DNA ลงเหลือ 1.41 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และ 705 $\text{ng}/\mu\text{l}$ แถบ DNA จางลงจนเมื่อเจือจาง DNA สุกรลง 100 เท่า (70.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$) ไม่สามารถตรวจสอบได้เลย แสดงว่าปริมาณ DNA สุกรน้อยที่สุดในตัวอย่างที่เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบได้คือ 705 ng สูงกว่าเทคนิคของ Matsunaga และคณะ (1999) ที่สามารถตรวจสอบได้ถึง 0.25 ng โดย multiplex PCR บน mitochondrial cytochrome *b*

1 2 3 4 5 6

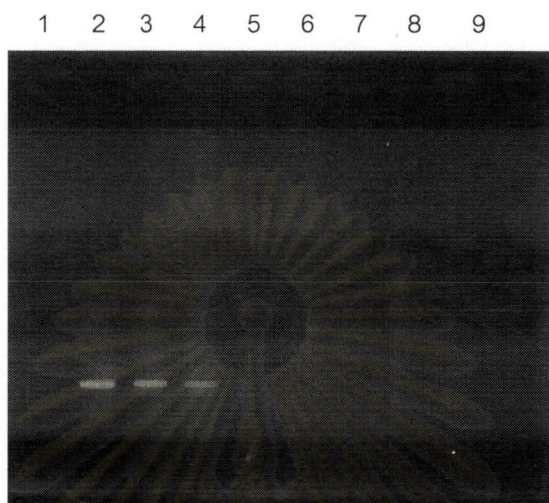


รูปที่ 10 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปร DNA สุกกรที่ใช้เป็น DNA ต้นแบบเป็น 4 ระดับ (แถวที่ 1 = ไม่มี DNA, 2 = DNA สุกกรเข้มข้น (7.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3-6 = DNA สุกกร เจือจาง 5 (1.41 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 10 (705 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 100 (70.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$) และ 1000 (7.05 $\text{ng}/\mu\text{l}$) เท่า ตามลำดับ)

4.3.3.2 ปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ในตัวอย่างเนื้อผสม

การตรวจสอบปริมาณเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อผสม (ไก่, วัว, กุ้ง และปลา) บอก sensitivity และข้อจำกัดในการตรวจสอบโดยเทคนิคนี้ จากผลการทดลองในรูปที่ 11 พบว่าในตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรในเนื้อผสม อยู่ร้อยละ 1, 5 และ 10 เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ แต่ในระดับต่ำกว่าร้อยละ 1 ไม่สามารถตรวจสอบได้ แสดงว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ในระดับร้อยละ 1 ซึ่งมี sensitivity สูงกว่าเทคนิคของ Meyer และคณะ (1994) ซึ่งสามารถตรวจการปนเปื้อนของสุกรในเนื้อวัวโดยเทคนิค PCR-RFLP ได้เพียงร้อยละ 2 โดยใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าและไม่ยุ่งยาก แต่ก็ยังต่ำกว่าเทคนิคของ Winter \emptyset , Thomsen, and Davies (1990) ที่สามารถตรวจสอบเนื้อสุกรในเนื้อวัวได้ถึงร้อยละ 0.5 โดยเทคนิค DNA hybridization ซึ่งตรวจสอบได้ละเอียดกว่าแต่กระบวนการตรวจสอบค่อนข้างยุ่งยาก เสียเวลา และต่ำกว่าเทคนิคของ Calvo, Zaragoza และ Osta (2001) ที่สามารถตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อวัวได้ถึงร้อยละ 0.005 โดยเทคนิค PCR เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในเนื้อผสม ซึ่งอาจจะมีสารยับยั้ง

ปฏิกิริยา PCR อื่น ๆ ในตัวอย่างจึงมี sensitivity ต่ำกว่างานวิจัยที่กล่าวมาข้าง การปรับปรุง sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้อาจทำได้โดยการปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR เช่น ความเข้มข้นของไพรเมอร์และ DNA ต้นแบบ หรือจำนวนรอบปฏิกิริยา

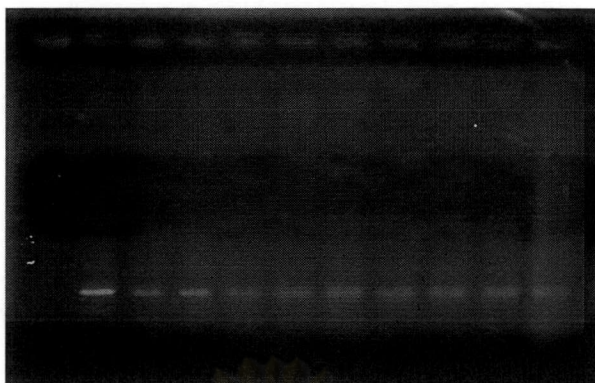


รูปที่ 11 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณเนื้อสุกรในเนื้อผสมเป็น 0-100% (แถวที่ 1 = ไม่มี DNA, 2-9 = เนื้อสุกร 100, 10, 5.0, 1.0, 0.50, 0.25, 0.10 และ 0% ตามลำดับ)

3) spike DNA สุกรลงในตัวอย่างอาหาร แล้วตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิคข้างต้น

เมื่อ spike DNA สุกร (705 ng/ μ l) 1 μ l ลงในอาหารตัวอย่าง 300 มิลลิกรัม แล้วสกัด DNA จากตัวอย่างตามวิธีที่สรุปได้ในข้อ 4.2 จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 12 ซึ่งปรากฏแถบ DNA ระดับเดียวกับ DNA จากสุกรในทุกตัวอย่าง แสดงว่า เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรได้ในอาหารทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารได้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

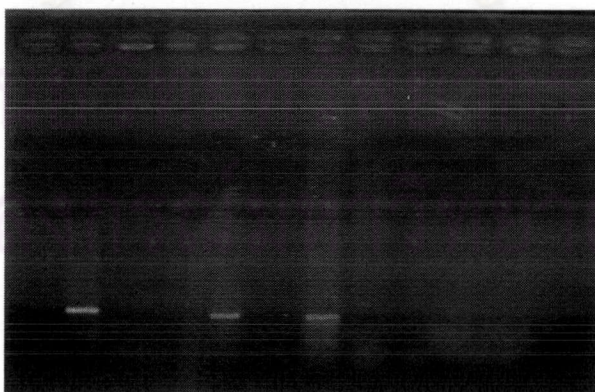


รูปที่ 12 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR เมื่อ spike DNA สุกกรลงในอาหารชนิดต่าง ๆ (แถวที่ 1 = ไม่มี DNA, 2 = DNA สุกกร, 3 = ปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง, 4 = ซุปก้อน, 5 = เส้นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป, 6 = วุ้นเจลาติน, 7 = เวเฟอร์, 8 = เยลลี่เจลาติน, 9 = ช็อกโกแลต, 10 = มายองเนส และ 11 = ลูกชิ้น)

4.4 สํารวจและทดสอบอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสุกกรเป็นจำนวนไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างอาหารมาตรวจวิเคราะห์ห้องคํประกอบทางเคมีเพื่อหาวิธีสกัด DNA ที่เหมาะสมกับอาหารแต่ละชนิด จากนั้นจึงสกัด DNA ด้วยเทคนิคในข้อ 4.3.2 โดยขนมจีบ ก๊วยปลา ไส้กรอกไก่ ลูกชิ้นปลา ลูกชิ้นกุ้ง และซอสปรุงรส เป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงกว่า 25% จึงสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน ครีมเทียมเป็นอาหารไขมันสูงกว่า 30% จึงสกัด DNA ด้วย urea ส่วนไอศกรีมและแป้งแพนเค้กผสมเสร็จ มีคาร์โบไฮเดรตสูงกว่า 50% จึงสกัด DNA ด้วย CTAB

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



รูปที่ 13 แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR ในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนจากสุกกร (แถวที่ 1 = ไม่มี DNA, 2 = DNA สุกกร, 3 = ก๊วยปลา, 4 = ซอสปรุงรส, 5 = ขนมจีบ, 6 = ลูกชิ้นปลา, 7 = ไส้กรอกไก่, 8 = ลูกชิ้นกุ้ง, 9 = ครีมเทียม, 10 = ไอศกรีม, 11 = แป้งแพนเค้กผสมเสร็จ, 12 = โยเกิร์ต)

เมื่อนำ DNA ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่พัฒนาขึ้นพบว่า ปรากฏแถบ DNA ระดับเดียวกับในสุกร 2 ตัวอย่าง คือ ขนمجีบและไส้กรอกไก่ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของสุกรในอาหาร 2 ชนิดนี้ แต่ตัวอย่างอื่น ๆ ตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนของสุกร แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนของสุกรหรือมีน้อยมากจนตรวจสอบไม่พบ หรือ DNA สุกรที่ปนเปื้อนในตัวอย่างเกิดการสลายตัวจาก กระบวนการแปรรูปอาหาร (ตารางที่ 7) เช่น การให้ความร้อนเป็นเวลานาน, ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์, เกิดไฮโดรไลซิสของ DNA ที่ pH ต่ำ

ตารางที่ 7 ขนาด DNA ของเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ (Ebbehøj and Thomsen, 1991; Allmann, Candrian and Lüthy, 1992)

ตัวอย่าง	กระบวนการ	ขนาด DNA (bp)*
เนื้อสัตว์	เนื้อสด	30,000
	80°C, 10 นาที	30,000
	100°C, 10 นาที	1,100
	120°C, 30 นาที	300
แป้ง	-	high molecular weight
ขนมปัง	-	< 300

* ค่าโดยประมาณ

นอกจากกระบวนการแปรรูปแล้ว ลักษณะของผลิตภัณฑ์จากสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารก็มีความสำคัญต่อการตรวจสอบ เช่นในไอศกรีม โยเกิร์ตและแป้งแพนเค้กผสมเสร็จ ซึ่งมีการใช้เจลาตินเป็นองค์ประกอบ แต่เทคนิคที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากในกระบวนการผลิตเจลาตินผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน DNA จึงเกิดการสลายตัวไปจนไม่สามารถตรวจสอบได้