การตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ

นางสาวนทินี พงษ์พรรภก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0718-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE

Miss Natinee Pongpanluk

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2001
ISBN 974-17-0718-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ
โดย	นางสาวนทินี พงษ์พรรภก
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)	อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นทินี พงษ์พรรภก : การตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ (DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ; 45 หน้า. ISBN 974-17-0718-5

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอบนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหาร สนองตอบต่อความต้องการของผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไม่รับประทานเนื้อสุกร โดยสกัดดีเอ็นเอจากอาหาร แล้วนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอสุกรที่อาจปนเปื้อน จากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis การทดลองได้แยกทดสอบอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เนื้อสุกร กลุ่มที่ 2 อาหารที่มีโปรตีน ≥ 25% กลุ่มที่ 3 อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต ≥ 50% และกลุ่มที่ 4 อาหารที่มีไขมัน ≥ 30% โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ วิธีมาตรฐาน, วิธีสกัดด้วย CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), วิธีสกัดด้วย Urea และวิธีสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen™ พบว่า วิธีที่เหมาะสมกับอาหารกลุ่มที่ 1 และ 2 คือวิธีมาตรฐาน วิธีที่เหมาะสมสำหรับอาหารกลุ่มที่ 3 คือ การสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB และการสกัดดีเอ็นเอด้วย Urea เหมาะกับอาหารกลุ่มที่ 4 การสกัดดีเอ็นเอด้วย kit สำเร็จรูป แม้จะให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่า แต่ค่าใช้จ่ายสูง สำหรับการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารนั้น ได้จากการออกแบบหาไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ DNA clone ที่พบเฉพาะในสุกรเท่านั้น โดยการสืบค้นข้อมูลใน DNA data bank เพื่อตรวจหาโคลนที่เฉพาะเจาะจงของสุกรจาก growth hormone gene แต่ไม่พบ ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จึงออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่พบแสดงออกในกล้ามเนื้อของสุกร 3 clone (Z98771, Z98802 และ Z98813) เมื่อนำมาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสุกรโดย PCR พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากโคลน Z98813 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 450 นิวคลีโอไทด์ คู่ไพรเมอร์นี้ไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์อื่นยกเว้นเนื้อสุกร โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR คือ annealing temperature 45°C และ $MgCl_2$ 2.08 mM เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบ DNA สุกรปนเปื้อนได้น้อยที่สุด 705 ng และตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ถึงร้อยละ 1 และเมื่อนำมาตรวจสอบในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสุกร พบว่าสามารถตรวจสอบได้

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4172315823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : PCR / PORK

NATINEE PONGPANLUK : DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 45 pp. ISBN 974-17-0718-5

DNA determination technique based on DNA amplification with Polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect the swine contaminated in foods for consumers that can not to consume swine and swine products. The technique begins with the extraction of DNA from food materials, amplification of swine DNA fragments that may be contaminated in foods and evaluation of the results by gel electrophoresis. The food materials were divided into 4 groups : 1. pork 2. foods containing protein $\geq$ 25% 3. foods containing carbohydrate $\geq$ 50% and 4. foods containing lipid $\geq$ 30%. DNA was then extracted with 4 methods : Standard method, CTAB method, Urea method and extract with Qiagen™ kit. The results showed that the standard method was suitable for the first and second group of food materials. CTAB method could be used for the third group and Urea method was used for the fourth group because with presence of urea, lipid could be clarified apart. Qiagen™ kit extraction resulted in pure DNA but too high in cost consumption. Determination of swine DNA fragments that contaminated in food began with primer design for swine specific DNA clone only. By querying DNA sequences from DNA data bank for swine growth hormone genes and skeletal muscle genes (Z98802, Z98771, and Z98813) several paired-primers were designed. The test on DNA amplification revealed that primer 813 was only primer enable to amplification swine DNA product specifically and yielded DNA products of 450 nucleotide bases. This paired-primer do not specific with DNA from other species except swine. And when determined in contaminated samples, swine DNA can be detected with PCR condition of annealing temperature 45°C and $MgCl_2$ 2.08 mM. And at least 705 ng of swine DNA and 1% of swine contaminated in mixed animal fresh were detected by this technique. This technique could be applied to detect swine contaminated in other foods.

Department.....Food technology..... Student's signature...Natinee Pongpanluk.....

Field of study.....Food technology.....Advisor's signature...Romanee Sanguandeekul.....

Academic year.....2001.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความเมตตาของอัลลอฮฺ ซุบฮานะฮูวะตะอาลา และด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ซอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดเวลาของการทำวิจัย

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ รวมทั้งครอบครัวและญาติพี่น้องของผู้เขียนที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลืออย่างสุดความสามารถ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูปภาพ..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วารสารปริทัศน์..... 2

3 วิธีทดลอง..... 11

4 ผลการทดลอง..... 21

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 37

รายการอ้างอิง..... 39

ภาคผนวก..... 44

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่างอาหาร.....	21
2	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากเนื้อสุกรที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ.....	23
3	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 2 (โปรตีนสูงกว่า 25%).....	25
4	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 3 (คาร์โบไฮเดรตสูงกว่า 50%).....	26
5	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 4 (ไขมันสูงกว่า 30%).....	27
6	คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนกล้ามเนื้อของสุกร.....	29
7	ขนาด DNA ของเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ	36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
1	ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction).....	6
2	ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นแบบ 2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	7
3	กราฟมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของ DNA.....	18
4	แถบ DNA ที่สกัดจากเนื้อสุกรด้วยวิธีต่าง ๆ.....	24
5	แถบ DNA ของตัวอย่างอาหารจากแต่ละกลุ่มที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ.....	24
6	แถบ DNA ของตัวอย่างอาหารที่สกัดด้วย kit สำเร็จรูป.....	27
7	ชิ้นส่วน DNA จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 381 กับ DNA จากเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ เปรียบเทียบกับสุกร.....	30
8	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณ $MgCl_2$ จาก 0-2.08 mM...	31
9	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปร annealing temperature เป็น 40, 43, 45 และ 47°C ตามลำดับ.....	32
10	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณ DNA สุกรที่ใช้เป็น DNA ต้นแบบเป็น 4 ระดับ.....	33
11	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณเนื้อสุกรในเนื้อผสมเป็นร้อยละ 0-100.....	34
12	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR เมื่อ spike DNA สุกรลงในอาหารต่าง ๆ ...	35
13	แถบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR ในตัวอย่างอาหารที่คาดว่ามีการปนเปื้อนจากสุกร.....	35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CTAB	=	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	gram
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR-RFLP	=	polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism
pmol	=	picomole
RNase	=	ribonuclease
Taq	=	*Thermus aquaticus* DNA polymerase
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TE	=	Tris-EDTA
U	=	unit(s)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย