ยีนเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าบนพื้นฐานของลำดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืช

นายวรุณ สุวรรณกิตติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ELECTROCHEMICAL GENESENSOR BASED ON DNA SEQUENCES FOR THE DETECTION OF ALLERGENIC FOODS OF PLANT ORIGIN

Mr. Waroon Suwankitti

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511154

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ยีนเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าบนพื้นฐานของลำดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืช
โดย	นายวรุณ สุวรรณกิตติ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหารคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญหลง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรุณ สุวรรณกิตติ : ยีนเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าบนพื้นฐานของลำดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืช. (ELECTROCHEMICAL GENE SENSOR BASED ON DNA SEQUENCES FOR THE DETECTION OF ALLERGENIC FOODS OF PLANT ORIGIN) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก :ผศ. ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ 79 หน้า.

ปฏิกิริยาภูมิแพ้อาหารเกิดกับอาหารหลายชนิดโดยมีธัญพืชบางชนิด เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่บังคับให้แสดงฉลากตามกฎระเบียบของประเทศในเครือสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ และเนื่องจากการแสดงฉลากช่วยให้ผู้บริโภคสามารถหลีกเลี่ยงอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้ การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์จึงมีความสำคัญเพื่อให้สามารถตรวจติดตามให้เป็นไปตามบทบัญญัติของกฎหมายได้พัฒนาวิธีการอย่างง่ายและรวดเร็วในการตรวจการปนของโมเลกุลภูมิแพ้ในอาหารจาก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และบัคหวีต บนพื้นฐานของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการเพิ่มอุณหภูมิด้วยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับการใช้ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัด ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจวิเคราะห์สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับยีน *Ara* h1 *Lectin Acc1* and *2S* albumin ในถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 263 222 195 และ 207 นิวคลีโอไทด์ และปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวได้ขนาดดีเอ็นเอเป็นขั้นบันไดที่มีขนาดเป็นจำนวนเท่าของขนาดชิ้นดีเอ็นเอเริ่มจาก 195-263 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแสดงผลด้วยค่า anodic current peak มีค่าในช่วง 2.0 ถึง 0.5 μA วิธีการตรวจดังกล่าวมีความไว LOD ระดับ 0.005% ของการปนด้วยวัตถุดิบที่มียีนภูมิแพ้และไม่ทำปฏิกิริยากับธัญพืชอื่นและที่สำคัญเป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจการปนของโมเลกุลวัตถุ ดิบธัญพืชที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ให้รวดเร็วขึ้น และการประยุกต์เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์ในการตรวจสอบอาหารในท้องตลาด ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกันตามวัตถุประสงค์โดยสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้เป็นส่วนประกอบตามที่แสดงไว้ที่ฉลากข้างผลิตภัณฑ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา .... พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา .2551.....

4772600123 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: Food Allergen/Allergenic Detection / PCR/Food detection

WAROON SUWANKITTI : ELECTROCHEMICAL GENE SENSOR BASED ON DNA SEQUENCES FOR THE DETECTION OF ALLERGENIC FOODS OF PLANT ORIGIN

THESIS PRINCIPAL ADVISOR :ASST. PROF. PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 79 pp.

The majority of allergic reactions to dietary components were caused by a large number of foods. Among them, cereals including peanut, soybean, wheat and buckwheat have been addressed in allergen labeling legislation EU, Japan Australia and New Zealand. Since labeling help consumers identify whether or not a food contains an ingredient that they had to avoid, the development of analytical methods for allergen detection was necessary for monitoring the implementation of such guidelines.A simple and rapid method for detection is developed to simple and rapid detection of allergen in peanut, soybean, wheat and buckwheat is developed based on either Polymerase Chain Reaction and isothermal DNA amplification. By employing DNA amplification with set of primers targeting the *Ara h*1, *Lectin*, *Acc1* and *2S* albumin gene of peanut, soybean wheat and buckwheat respectively, amplification products ranking in size of 263, 222, 195, 207 nucleotides respectively and that of isothermal DNA amplification product with DNA ladder of more than multiple of DNA fragment 195-263nt size range.When electrochemical assay were carried out, results showed anodic current peak varies in between 2.0 to 0.5 μA, The sensitivity, with a detection were obtain limit at 0.005% of allergenic ingredients contaminate. No cross-reactivities was observed from the samples of other related cereals. The method constitute a basic for a rapid and simple test of major cereal allergen trace. This application combined loop isothermal DNA amplification with biosensor for identified 10 kinds of allergenic food ingredients from markets, the results showed targets DNA were detected conformed to allergen labeling on product.

Department : .....Botany..... Student' signature : .....

Field of study : .....Genetics.....Principal Advisor's signature : .....

Academic year : .....2008.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ขอุ่มพฤกษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและดูแลเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้วิชาความรู้ กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง ประธานคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณโครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ งบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ ในภาควิชา และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมาชิกห้องปฏิบัติการแพลนท์ทรานสเจนิกและไบโอเซนเซอร์เทคโนโลยี ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้าย กราบขอบพระคุณ คุณแม่สคราญ สุวรรณกิตติ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจทุกๆด้าน ในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขออุทิศให้กับคุณพ่อศาสตราจารย์วิรุฬห์ สุวรรณกิตติ ผู้เป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยมีวันนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญภาพ.....ฌ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....8

3. ขอบเขตการวิจัย.....8

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....8

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....19

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....19

2. วิธีการดำเนินการวิจัย.....21

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....24

1. การศึกษาและรวบรวมข้อมูลของยีนเป้าหมายเพื่อออกแบบไพรเมอร์.....25

2.การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....29

3.การตรวจสอบด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อุณหภูมิระนาบเดียว.....40

4.การตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้ด้วยไบโอเซนเซอร์.....50

5.การตรวจสอบอาหารในท้องตลาดด้วยเงื่อนไขการทดลองที่พัฒนาขึ้น.....53

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....55

รายการอ้างอิง.....59

ภาคผนวก.....64

ภาคผนวก ก.....64

ภาคผนวก ข.....68

ภาคผนวก ค.....71

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงชนิดของวัตถุดิบที่ควบคุมให้มีการแสดงฉลากในแต่ละประเทศ	11
2	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ara h* 1 *Lectin* *Acc*1 *2S Albumin* ของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ที่ใช้อ้างอิง	24
3	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer และ reverse primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือ พีซีอาร์	25
4	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ ของปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว	26
5	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Ara h1* ของถั่วลิสง	27
6	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Lectin* ของถั่วเหลือง	27
7	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Acc1* ของข้าวสาลี	28
8	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *2S albumin* ของบัคหวีต	28
9	ผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ด้วยวิธีพีซีอาร์	39
10	แสดงผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ โดยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว	50
11	ผลการวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR และ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูป ด้วยอุณหภูมิเดียว	52
12	ผลการตรวจสอบอาหารจากท้องตลาดโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูป ด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์	53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

รูปภาพที่ 1 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบถั่วลิสงถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีตด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิส 29

รูปภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของถั่วลิสงด้วยวิธีพีซีอาร์.....31

รูปภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของถั่วเหลืองด้วยวิธีพีซีอาร์.....32

รูปภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของบัคหวีตด้วยวิธีพีซีอาร์.....33

รูปภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของข้าวสาลีด้วยวิธีพีซีอาร์.....34

รูปภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของถั่วลิสงด้วยวิธีพีซีอาร์.....35

รูปภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของถั่วเหลืองด้วยวิธีพีซีอาร์.....36

รูปภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของบัคหวีตด้วยวิธีพีซีอาร์.....37

รูปภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของถั่วลิสงด้วยวิธีพีซีอาร์.....38

รูปภาพที่ 10 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบถั่วลิสงถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีตด้วยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยวและเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิส 40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

รูปภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของถั่วลิสง
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....42
รูปภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของถั่วเหลือง
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี.....43
รูปภาพที่13 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของบัคหวีต
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....44
รูปภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)ของข้าวสาลี
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....45
รูปภาพที่ 15ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของถั่วลิสง
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....46
รูปภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของถั่วเหลือง
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....47
รูปภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของบัคหวีต
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....48
รูปภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบความไว (sensitivity)ของข้าวสาลี
ด้วยวิธี การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว.....49
รูปภาพที่ 19 กราฟการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak.....51
รูปภาพที่ 20 กราฟแสดงสัดส่วนของน้ำนมถั่วเหลืองที่ตรวจพบการปนของถั่วลิสง
จาก 37 เขตทั่วกรุงเทพมหานคร.....54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่1
บทนำ

ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

ปัจจุบันประชากรทั่วโลก ร้อยละ 2 ในผู้ใหญ่ และร้อยละ 5 ในเด็ก เป็นโรคภูมิแพ้อาหารบางชนิดโดยมีผู้เข้ารับการรักษาประมาณ 30,000 คนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากภูมิแพ้อาหาร 150 คน ต่อปี ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้อาหารได้ ดังนั้นผู้ป่วยจะต้องระวังและหลีกเลี่ยงอาหารที่มีส่วนประกอบของอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้นั้นเอง จากการตรวจสอบตลาดของ US FDA พบว่า อาหารหลายชนิดมีการติดฉลากแสดงส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ไม่ครบถ้วน เช่น ไม่ระบุส่วนประกอบของอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ เช่น ถั่วลิสง หรือ ไข่ ทำให้ผู้บริโภคที่เป็นโรคภูมิแพ้อาหารประสบปัญหาไม่สามารถเลือกซื้อสินค้าได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากขาดความครบถ้วนของข้อมูลในฉลาก (ชิสา วิบูลย์ชาติ และคณะ, 2551) ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันหลายประเทศรวมถึง EU จึงได้ออกกฎหมายบังคับให้แสดงฉลากส่วนประกอบที่เสี่ยงต่อการเกิดภูมิแพ้บนฉลากอาหาร โดยอาหารที่มีการแปรรูปและมีส่วนประกอบของอาหารที่เป็นอาหารก่อภูมิแพ้ทั้งหมดจะต้องติดฉลากระบุส่วนประกอบดังกล่าวให้ชัดเจน (Taylor, 2000)

ภูมิแพ้อาหาร หมายถึง ปฏิกิริยาการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีต่อโมเลกุลหรือสารบางชนิดที่อยู่ในอาหารที่บริโภคเข้าไป โดยเมื่อรับประทานอาหาร ร่างกายจะมีกระบวนการย่อยอาหารให้กลายเป็นสารโมเลกุลเดี่ยวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆต่อไปแต่ในบางกรณี ร่างกายเกิดความผิดปกติขึ้นโดยไม่สามารถย่อยอาหารให้กลายเป็นโมเลกุลเดี่ยวได้ จะทำให้เกิดการตกค้างของสารที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งส่วนหนึ่งของโมเลกุลที่ย่อยไปสมบูรณ์นี้จะกลายเป็นโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้ (antigen) โดยจะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้าง แอนติบอดี้ โดยเริ่มต้นจาก T cell จะจับตัวกับสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นให้ B cell สร้างแอนติบอดี้ ที่ชื่อว่า IgE ขึ้น IgE นี้ไปเกาะกับ mast cell และ basophill ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อจดจำ สิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาและเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมจากการรับประทานอาหารที่ก่อให้ เกิดภูมิแพ้ครั้งต่อไปสารก่อภูมิแพ้ครั้งหลังนี้จะจับตัวกับแอนติบอดี้ที่อยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวและเกิดปฏิกิริยาทำลายโดย mast cell และ basophill สลายตัวทำให้มีการปลดปล่อยสารที่ชื่อว่า histamine ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทำให้เส้นเลือดฝอยขยายตัว ทำให้เกิดการบวมแดง คัน ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว เกิดการหายใจ

ติดขัด ในผู้ป่วยที่มีการแพ้รุนแรงจะทำให้ชีพจรเต้นเร็ว ความดันโลหิตต่ำและเกิดการช็อคได้ เรียกอาการที่เกิดขึ้นนี้ว่า anaphylaxis (Kim, 2008)

สำหรับประเทศในเครือสหภาพยุโรปในปัจจุบัน ปัญหาภูมิแพ้อาหารเพิ่มมากขึ้นในหลายประเทศ ดังนั้น EU จึงได้ออกระเบียบ DIRECTIVE 2007/68/EC (The Commission of the European Communities, 2007) เพื่อรักษาสิทธิและป้องกันผู้บริโภคโดยรักษาระดับความปลอดภัยในอาหาร โดยให้มีการแสดงฉลาก องค์ประกอบของอาหารที่เกี่ยวข้องกับสารก่อภูมิแพ้ให้ชัดเจน บังคับใช้ตั้งแต่ 31 พฤษภาคม 2551 โดยมีรายการดังนี้

1. ธัญพืชที่มีส่วนประกอบของ gluten
2. สัตว์ทะเลในกลุ่ม crustacia
3. ไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่
4. ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา
5. นมและผลิตภัณฑ์จากนม
6. ถั่วในกลุ่ม tree nut
7. ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง
8. งาและผลิตภัณฑ์จากงา
9. ขึ้นฉ่าย(cellery)
10. มัสตาร์ด
11. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟด์

สำหรับในประเทศญี่ปุ่นพบปัญหาภูมิแพ้อาหารจำพวก ไข่ นม ข้าวสาลี บัคหวีตและถั่วลิสง เป็นหลักโดยมีการบังคับให้แสดงฉลากกับอาหารที่มีองค์ประกอบของสารก่อภูมิแพ้ให้ชัดเจน

ในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ การสำรวจโดย AAI ในปี 2003 พบว่าส่วนใหญ่ชาวออสเตรเลียและนิวซีแลนด์เป็นภูมิแพ้อาหาร จะแพ้ถั่วลิสงถึงร้อยละ 88 รองมาเป็นการแพ้ tree nuts และไข่ตามลำดับดังนั้นหากสรุปปัญหาภูมิแพ้อาหารจากพืชจะพบว่ามีพืช 7 ชนิดที่ก่อให้เกิดปัญหาได้

วิธีการตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ได้ในปัจจุบันได้แก่ skin prick test ซึ่งเป็นการทดสอบสารก่อภูมิแพ้โดยตรง โดยการหยดหรือฉีดสารก่อภูมิแพ้ที่สกัดได้ลงบนบริเวณแล้วสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยตรง เช่นการตอบสนองต่อผิวหนังในรูปการบวมแดงหรือเป็นผื่นขึ้น ที่ตำแหน่งสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ (Kim, 2006) ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำ แต่วิธีดังกล่าวยังเป็นวิธีที่มีความเสี่ยงเนื่องจากการทดสอบโดยตรงต่อตัวบุคคล อีกทั้งยังไม่เหมาะสม

กับการตรวจสอบการปนของวัตถุดิบดังกล่าวในอาหาร เนื่องจากอาหารบางชนิดผ่านกระบวนการแปรรูปและบางชนิดมีส่วนประกอบของวัตถุดิบที่มากกว่า 2 ชนิด จึงทำให้วิธีนี้ไม่สามารถระบุได้ว่าในอาหารมีส่วนประกอบใด

อีกวิธีคือ enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่อยู่บนพื้นฐานทางเซรั่มวิทยาอาศัยการตรวจสอบโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดภูมิแพ้ขึ้นในร่างกาย โดยใช้หลักการจับตัวของ แอนติบอดี้ที่ร่างกายสร้างขึ้นกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ แสดงผลด้วยแอนติบอดี้ที่ติดฉลาก แล้ววัดปริมาณสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง colorimeter หรือ spectrometer (microplate reader) ซึ่งวัดค่าของสีที่เกิดขึ้น (Holzhauser *et al*, Germany) วิธีดังกล่าวนี้มีข้อดีคือ มีความจำเพาะและมีความไวสูง แต่ก็ยังไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน เพราะอาหารที่ผ่านกระบวนการ โมเลกุลโปรตีนจะเสียสภาพ (denature) และยังสามารถเกิด cross-reaction ระหว่างแอนติบอดี้กับโปรตีนอื่นๆที่พบในอาหาร ส่งผลต่อความถูกต้องแม่นยำของการตรวจได้

ด้วยข้อจำกัดในการตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ในอาหารที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชดังที่กล่าวมา จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เทคนิคสมัยใหม่จึงมุ่งเน้นไปที่การตรวจสอบโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีเสถียรภาพสูง คงอยู่ได้แม้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปในระดับหนึ่งได้โดยหลักการจะใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เลส(PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณของยีนที่ต้องการตรวจสอบ (Schmidt *et al*, 2005; Koyano *et al*, 2006; Matsuo *et al*, 2005; Viquez *et al*, 2003) ดังนั้นจึงมีความแม่นยำในการตรวจสอบสูงและสามารถตรวจสอบอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้ แต่อย่างไรก็ดีวิธีดังกล่าวยังต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและเครื่องมือที่มีราคาแพงรวมทั้งใช้เวลาในการตรวจสอบค่อนข้างมาก

ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็น real-time PCR โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งส่งตรวจได้และวัดปริมาณ ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน และ real-time PCR ยังทำในระบบปิดทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อน (ทั้งจากกระบวนการ PCR และ gel electrophoresis) ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการทำ PCR ได้ เพราะว่า real-time PCR เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตของ PCR ในแต่ละรอบโดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ไปพร้อมกับทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้พร้อมกัน ดังนั้นเครื่องมือที่ใช้สำหรับกระบวนการ Real-Time PCR นี้ จึงต้องมีคุณสมบัติเป็นทั้งเครื่อง thermal cycler และ optical

detector หรือเป็นเครื่องมือระบบ fluorescence detection thermal cycler โดยเครื่องมือนี้จะใช้สารเรืองแสงประเภท fluorochrome ซึ่งใช้เป็นโพรบเข้าติดฉลากกับดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ไพรเมอร์เริ่มเข้าทำการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสารเรืองแสงนี้จะเข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่เท่านั้น ข้อดีหลักของ real-time PCR คือสามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง มีระดับความไวที่สูงมาก ถึง 10^{10} เท่า แต่ข้อจำกัดของ real-time PCR การเริ่มต้นต้องการบุคคลากรที่มีความชำนาญและการสนับสนุนดูแล เครื่องมือและสารเคมีมีราคาสูงมาก (Vanguilder *et al.*, 2008)

สำหรับสารก่อภูมิแพ้ที่มาจากพืช พบว่า พืชหลัก เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต เป็นวัตถุดิบหลักที่สำคัญการเข้าใจถึงกลไกและรูปแบบการก่อภูมิแพ้จะช่วยให้การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบทำได้ดีขึ้น

ถั่วลิสง (peanut) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogae* อยู่ใน family *Fabaceae* มีชื่อภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันตามแต่ละประเทศ ถั่วลิสงมีถิ่นกำเนิดในเขตอเมริกาใต้ เม็กซิโกและอเมริกากลาง เป็นพืชล้มลุกเมื่อโตเต็มที่มีความสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร มีใบเรียงตัวแบบตรงข้ามแบบ pinnate 4 ใบ หลังจากดอกได้รับการผสมจะพัฒนาเป็นฝักมีขนาดประมาณ 3-7 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ด 3-4 เมล็ด (Putnam *et al*, 1991)

ทั่วโลกมีการนำเอาถั่วลิสงมาผลิตเป็นอาหารหลายชนิด ทั้งแปรรูปและไม่แปรรูป รวมทั้งใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารต่างๆเพื่อเพิ่มรสชาติให้ดียิ่งขึ้น องค์ประกอบของสารอาหารในถั่วลิสงส่วนใหญ่เป็นโปรตีนและแป้ง และยังมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด เช่น niacine

ในปัจจุบันรายงานจำนวนผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ถั่วลิสงมีอัตราเพิ่มสูงขึ้น ในกรณีรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต โดยองค์ประกอบที่เป็นสาเหตุของการแพ้ได้แก่โปรตีน *Ara h1* และ *Ara h2* (David *et al.*, 2003)

ถั่วเหลือง (soybean) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *glycine max* อยู่ใน family *Fabaceae* มีถิ่นกำเนิดในเขตเอเชียตะวันออก สามารถปลูกได้ในสภาพพื้นที่หลากหลาย ลำต้น ใบและฝักมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ภายในฝักจะมีเมล็ดอยู่ 2-4 เมล็ด ถั่วเหลืองจัดเป็นอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงมากถึงร้อยละ 40 ของน้ำหนักแห้ง เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูงจึงทำให้นิยมนำถั่วเหลืองมาประกอบอาหารได้หลายชนิด (เอกสารวิชาการ, 2551)

ในปัจจุบันมีรายงานพบผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ถั่วเหลืองประมาณ 9% ในเด็ก ซึ่งพบว่ามีการแพ้ทั้งถั่วเหลือพันธุ์พื้นเมืองและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม องค์ประกอบที่ทำให้เกิดการแพ้ได้แก่

โปรตีน papaine-like protease (Schmidt *et al.*, 2005) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานผู้เสียชีวิตจากการแพ้ถั่วเหลือง

ข้าวสาลี (wheat) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Triticum aestivum* อยู่ใน family *Poaceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตตะวันออกกลาง ซึ่งมีการปลูกอย่างกว้างขวาง ข้าวสาลีจัดอยู่ในอันดับที่ 2 ของพืชที่นำมาทำเป็นอาหารเสริมรองจากข้าวโพด โดยอาหารและเครื่องดื่มที่แปรรูปมาจากข้าวสาลีนั้นมีหลายชนิด เช่น เบียร์ วอดก้า หรือแป้งข้าวสาลี น้ำมัน เป็นต้น (Bonjean *et al*, 2001) จากรายงานพบผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้ข้าวสาลีอยู่ประมาณ 1% ของประชากร โดยมีสาเหตุจากโปรตีนในกลุ่ม gliadin และ gluten

บัคหวีต(buckwheat) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Fagopyrum esculentum* อยู่ใน family *Polygonaceae* มีถิ่นกำเนิดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ในปัจจุบันประเทศที่มีการปลูกบัคหวีตมากที่สุดคือสหรัฐอเมริกาลำต้นโตเต็มที่สูง 40-42 เซนติเมตร เมล็ดรูปร่างคล้ายเมล็ดทานตะวันเปลือกนอกแข็ง เนื้อในอ่อนนุ่ม (Ohnishi *et al*, 1996)

เป็นพืชที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการผลิตเส้นหมี่ชนิดพิเศษ บัคหวีตมีองค์ประกอบของโปรตีนอยู่ ร้อยละ 7.8 ไขมันร้อยละ 1.5 เส้นใยร้อยละ 0.7 ของน้ำหนักแห้ง และมีสารประกอบสำคัญคือ กลูเตน(gluten) ที่ใช้ทำแบะแซ ในประเทศญี่ปุ่นนิยมนำบัคหวีตมาผสมกับแป้งข้าวสาลีเพื่อทำเส้นบะหมี่ญี่ปุ่นหรือที่รู้จักกันในชื่อ โซบะ ซึ่งจะมีความเหนียวนุ่มและกรุบกรอบกว่าเส้นบะหมี่ที่ทำจากแป้งข้าวสาลีล้วนๆ อีกทั้งเปลือกของบัคหวีตยังสามารถนำไปทำเป็นส่วนประกอบของไส้หมอนได้ จึงทำให้ในประเทศญี่ปุ่นมีอัตราการบริโภคบัคหวีตสูงที่สุด จากรายงานพบว่ามีผู้ป่วยโรคภูมิแพ้บัคหวีตซึ่งเป็นส่วนประกอบของหมอนและเป็นวัตถุดิบในการผลิตเส้นโซบะ โดยสาเหตุมาจากโปรตีนในกลุ่ม 2S Albumin

เทคนิคการตรวจองค์ประกอบวัตถุดิบอาหารที่ก่อให้เกิดโรคบนพื้นฐานการตรวจดีเอ็นเอที่สำคัญได้แก่ PCR โดยหลักการตรวจวิเคราะห์มุ่งเน้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์จำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ที่อาศัยเอนไซม์โพลีเมอร์เลสที่มี *Taq* DNA Polymerase เป็นหลัก หากในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอาหารที่มีดีเอ็นเอของพืชเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด ปะปนก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นของชิ้นยีนเป้าหมายได้

Stephan and Vieths, 2004 ได้ พัฒนาเทคนิค PCR และ sandwitch ELISA ในการทดสอบการปนในระดับเล็กน้อยของถั่วลิสงในอาหารแปรรูป เทคนิคดังกล่าวมุ่งเน้นการตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Ara h2* โดยใช้ขนาดของแอมปลิคอนเพียง 86 นิวคลีโอไทด์ ด้วยระบบดังกล่าวสามารถตรวจสอบการปนในระดับ 10 ppm ได้ การตรวจสอบคู่ขนานกับเทคนิค

ELISA ทำให้สามารถเปรียบเทียบศักยภาพที่เด่นกว่าของเทคนิค PCR อย่างไรก็ดีเนื่องจากระบบการตรวจวิเคราะห์อยู่บนพื้นฐานการตรวจด้วย real-time PCR จึงทำให้การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง

สำหรับวิธีการตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้จากถั่วเหลือง นิยมนำวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองด้วยยีน *Lectin* ซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบยีน internal gene ในถั่วเหลือง (Tengel *et al.*, 2001) ระบบการตรวจดังกล่าวแม่นยำและเชื่อถือได้ อย่างไรก็ดี Yamakawa *et al.*, 2007 ได้เสนอทางเลือกในการใช้ยีนอื่น เช่น *Bd 30K* *Kunitz trypsin* inhibitor *beta-1,3-glucanase* *cytosolic glutamine syntase* *GB-D-II* gene ซึ่งเป็น proteinase inhibitor *vspA* gene *Bowman-Birk protease* inhibitor *SIRE-1* และ satellite *STR 120-A* โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน *SIRE-1* มีความเหมาะสมที่สุดและสามารถตรวจสอบการปนได้ถึงระดับ 0.001 เปอร์เซนต์

สำหรับการตรวจการปนข้าวสาลี Iida *et al*, (2005) ได้เสนอคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ *Waxy-D1* ยีนของข้าวสาลี ซึ่งจำเพาะต่อ *T. aestivum* แต่ไม่จำเพาะต่อ *T. durum L.*ในทางปฏิบัติโมเลกุลภูมิแพ้จากพืชในกลุ่มข้าวสาลีจะหมายถึงข้าวสาลีทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นวิธีนี้ยังคงมีข้อจำกัดแม้ว่าจะมีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในระดับ 15 copy ต่อ test

ในการตรวจการปนของบัคหวีตเพื่อให้สอดคล้องกับระเบียบปฏิบัติของรัฐบาลญี่ปุ่น Hirao *et ak*, (2005) ได้ทดลองรูปแบบการปนของบัคหวีต ด้วยเทคนิค PCR โดยเน้นการเพิ่มปริมาณไปที่ ITS-1ของ 5.8S rRNA แม้ว่าจะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างจำเพาะและมีความไวของปฏิกิริยาต่อระดับ การปน 0.5% แต่การวางระบบบนยีน 5.8S มีความเสี่ยงในการเพิ่มปริมาณอย่างไม่จำเพาะโดยเฉพาะในเนื้ออาหารที่มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนมากได้

ด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้นจะพบว่าระบบ PCR ที่พัฒนาขึ้นยังไม่เป็นมาตรฐานในรูปแบบเดียวกัน นอกจากนี้การพึ่งระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ยังมีข้อจำกัดทำให้ต้องพึ่งพาเครื่องมือและอุปกรณ์ปฏิบัติการ พึ่งพาห้องปฏิบัติการ และที่สำคัญไม่สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในภาคสนามได้ การพัฒนาโดยเสริมรูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นระบบใหม่ๆจึงมีความสำคัญมาก

นอกจากนี้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบจำเป็นต้องหารูปแบบการตัดสินผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและแม่นยำ ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีส่งผลให้การพัฒนาระบบการตรวจสอบด้วยระบบใหม่ เช่น ไบโอเซ็นเซอร์ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, (2549) กล่าวว่า ไบโอเซ็นเซอร์ (biosensor) หรือ ยีนเซ็นเซอร์ (genesensor) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการนำเอาความรู้ทางด้านฟิสิกส์มาเป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ โดยอาศัยคุณสมบัติของการตรวจจับสัญญาณโดยมีตัวรับสัญญาณ (receptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ซึ่งจะสามารถแปลงสัญญาณทางฟิสิกส์ไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า ค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า และการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของแสง ได้แก่ การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสี สัญญาณดังกล่าวสามารถตรวจวัดพร้อมกับแสดงค่าที่ได้จากการตรวจวัดให้ออกมาในรูปแบบของตัวเลขที่สอดคล้องกับปริมาณสัญญาณจริงที่ได้รับ

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์อาศัยหลักการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า โดยมีอิเลคโทรด (electrode) จะเป็นตัวตรวจวัดความต่างศักย์และการไหลของกระแสไฟฟ้าที่อยู่ในระบบของสารละลาย แล้ววัดค่าความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปในวงจร การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์จะอยู่บนพื้นฐานของหลักการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ โดยยึดหลักความจำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุลของสี ซึ่งโมเลกุลของสีจะมีคุณสมบัติเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอ เรียกว่า DNA binder ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็น intercalater เป็นกลุ่มของโมเลกุลสีที่มีการแทรกตัวอยู่ระหว่างสายดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromide methylene blue propidium iodide และอีกกลุ่มหนึ่งก็คือ minor groove binder เป็นกลุ่มที่สามารถจับกับโครงสร้างดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) ในบริเวณที่เป็น minor groove ของดีเอ็นเอ สารที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ DAPI distamycine nuclear yellow และ Hoechst 33258 ซึ่งที่ผ่านมาการรายงานการศึกษา พบว่าโมเลกุลของ Hoechst 33258 มีช่วงการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์กว้างที่สุดและใช้ค่ากระแสเริ่มต้นต่ำที่สุด จึงเป็นโมเลกุลที่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอ เพื่อการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2549)

การจับตัวของดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 ซึ่งโมเลกุล Hoechst 33258 นี้จะกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันของดีเอ็นเอ เมื่อมีโมเลกุลดีเอ็นเออยู่น้อยอิเลคตรอนจากโมเลกุล Hoechst 33258 จะจับตัวกับโมเลกุลดีเอ็นเอได้น้อยทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระมาก เมื่อตรวจวัดจะได้ค่าของกระแสไฟฟ้าที่สูง ซึ่งในทางตรงข้ามกันกับโมเลกุลที่มีดีเอ็นเอมากการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 มาก ทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระในโมเลกุล Hoechst 33258 อยู่น้อย ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าก็จะลดลง ดังนั้นตัวแปลงสัญญาณจะแปลงค่าการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นให้ปรากฏในรูปของตัวเลข แล้วนำตัวเลข

ที่อ่านค่าได้มาสร้างเป็นกราฟพร้อมหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งความสัมพันธ์นี้ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงความความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดกับค่าสูงสุดของกระแสไฟฟ้าจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Chaumpluk *et al*., 2006)

วิทยานิพนธ์นี้มุ่งพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนของอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชทั้ง 4 ชนิดโดยการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจด้วยไบโอเซ็นเซอร์เพื่อช่วยให้การวิเคราะห์ทำได้ง่ายและรวดเร็วด้วยการนำหลักการทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับสัญญาณโดยมีตัวรับสัญญาณ ในรูปการจับตัวของ DNA binder ที่จำเพาะและตัวแปลงสัญญาณ ซึ่งมีความสามารถที่จะแปลงสัญญาณทางไฟฟ้าให้กลายเป็นตัวเลขได้ ทำให้สามารถตรวจวัดการปนของดีเอ็นเอที่มีอยู่ในอาหาร โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบและควบคุมการปนของอาหารเพื่อให้สอดคล้องกับหลักการ point of careในอนาคตได้ (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2551)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจบนพื้นฐานของยีนเซนเซอร์ทางไฟฟ้าเคมีบนพื้นฐานของลำดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืช

ขอบเขตของการวิจัย

สังเคราะห์ไพรเมอร์โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนก่อการแพ้ใน ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต พร้อมทั้งนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดให้อยู่ในรูป FASTA Format ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Blastn โคลนยีนและตรวจสอบโคลนที่ได้ พัฒนาวิธีการตรวจสอบโดยอาศัยการประยุกต์วิธีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ปนอยู่และการตรวจสอบโดยการวัดด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เทคนิคอย่างง่ายที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์อาหารนอกสถานที่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบและให้การรับรองการปนด้วยโมเลกุลภูมิแพ้ในระหว่างการผลิตใช้กับอุตสาหกรรมอาหารของประเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภูมิแพ้จากอาหารพบประมาณ ร้อยละ 2-5 ของประชากร พบในผู้ใหญ่ ประมาณ 2% (1 ใน 50) และในเด็ก ประมาณ 5% (1 ใน 20) ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบประชากรประมาณ 11 ล้านคน มีภาวะภูมิแพ้อาหารโดยมากกว่า6 ล้านคน แพ้ปลา กุ้งและอาหารทะเล มากกว่า3 ล้านคน แพ้ถั่วลิสง โดยมีผู้เป็นโรคภูมิแพ้อาหารเฉลี่ย 30,000 คน/ปี และเสียชีวิตสูงถึง 150 คน/ปี

การศึกษาในปัจจุบันพบว่าอาหารหลายร้อยชนิดเป็นสาเหตุของภูมิแพ้ แต่ส่วนใหญ่ของภาวะภูมิแพ้ มักเกิดจากอาหาร 8 กลุ่ม ได้แก่ นม ไข่ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ถั่วจาก tree nuts ปลาและหอยเชลล์ (ชิสา วิบูลย์ชาติ และคณะ, 2551)

เมื่อร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ (antigen) สารก่อภูมิแพ้นั้นจะกระตุ้นให้ T-cell เข้าจับตัว ซึ่งการจับตัวจะไปกระตุ้นให้ B-cell สร้างภูมิคุ้มกันในรูป IgE ภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นนี้จะไปจับตัวบนผิวของ mast cells เมื่อร่างกายได้รับภูมิแพ้ซ้ำอีกครั้ง IgE บนผิวของ mast cells จะจับกับโมเลกุลของอาหารและพยายามทำลายโมเลกุลของอาหารที่ย่อยไม่สมบูรณ์ทิ้งไป การทำลาย mast cells ส่งผลให้เกิดอาการภูมิแพ้ขึ้น (Kim, 2008)

หนทางที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวได้แก่การหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (Hefle *et al*, 2007)

ดังนั้นในปัจจุบันหลายประเทศจึงให้ความสนใจในเรื่องของการแสดงฉลากระบุวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับสารก่อภูมิแพ้ให้ชัดเจนโดยต้องระบุในฉลากว่าอาหารนั้นมีส่วนผสมของสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้หรือไม่ เพื่อให้ผู้บริโภคสามารถหลีกเลี่ยงอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้ ในทางปฏิบัติผู้ผลิตต้องทราบว่าอาหารนั้น มีส่วนประกอบอะไรบ้าง ครอบคลุมทุกส่วนประกอบทั้งส่วนประกอบหลักและส่วนประกอบรอง เช่น additive, flavor, color, processing aid ถ้ามีก็ต้องระบุว่ามีโดยไม่กำหนดปริมาณขั้นต่ำของสารนั้น

สหรัฐอเมริกา ได้ออกระเบียบว่าด้วยเรื่องการแสดงฉลาก ครอบคลุมวัตถุดิบที่ก่อให้เกิดการแพ้ในรูปผลิตภัณฑ์สินค้า 8 ชนิด ได้แก่ นม ไข่ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ถั่ว tree nuts ปลาและหอยเชลล์ มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 มกราคม 2549 โดยให้ระบุชื่อชนิดของผลิตภัณฑ์หลังคำว่า "contains" food allergen + common names พิมพ์ต่อกัน ขนาดตัวอักษรเท่ากัน หากเป็นอาหารจำพวกถั่วให้ระบุ specific type สัตว์น้ำ ระบุ species โดยมีข้อยกเว้นเฉพาะ highly refined oil เช่น น้ำมันถั่วเหลือง ไม่ต้องติดฉลากและรัฐมนตรีสามารถประกาศข้อบังคับเพิ่มเติมได้และผู้ร้องขอต้องรับผิดชอบ

ค่าใช้จ่ายในการพิสูจน์ว่า ส่วนประกอบของอาหารนั้น มีหรือไม่มีองค์ประกอบของวัตถุดิบดังกล่าว (เบญจมาศ สืบเนียม, 2008)

สหภาพยุโรป (EU) ได้ปรับปรุงระเบียบการติดฉลากอาหาร โดยได้มีการประกาศเพิ่มเติม (Regulation 2007/68/EC)เกี่ยวกับ เรื่องการติดฉลากอาหารก่อภูมิแพ้ เมื่อ พฤศจิกายน 2550 โดยมีรายละเอียดว่าผู้ผลิตอาหารจะต้องแสดงฉลากภายใน 31 พฤษภาคม 2551 โดยอาหารก่อภูมิแพ้ 12 ชนิด ที่ต้องติดฉลาก ได้แก่ ธัญพืชที่มี gluten (เช่น ข้าวสาลี, ไวน์, บาร์เลย์) สัตว์น้ำ สัตว์น้ำมีเปลือก นม (รวมทั้ง lactose) ถั่วลิสง ถั่วชนิดต่างๆ (tree nuts) ไข่ ถั่วเหลือง คื่นช่าย มัสตาร์ด เมล็ดงา สารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และซัลไฟต์ (ความเข้มข้นเกินกว่า 10ppm) พืชใน umbelliferae family (เช่น แครอท เซเลรี่ พาร์สลีย์) ลักษณะการแสดงฉลากต้องมีถ้อยคำเครื่องหมายการค้า รูป สัญลักษณ์ใดๆ ที่ปรากฏในสินค้า หีบห่อ เอกสาร โดยใช้คำว่า contain+ชื่ออาหารภูมิแพ้ (The Commission of the European Communities, 2007)

สำหรับประเทศญี่ปุ่น รัฐบาลญี่ปุ่นเริ่มให้ความสนใจ เรื่องภูมิแพ้อาหาร และได้จัดตั้งคณะกรรมการควบคุมกำกับดูแลเรื่องภูมิแพ้อาหาร เนื่องจากปัญหาดังกล่าวทวีความรุนแรงมากขึ้น และในปี 2545 กระทรวงแรงงานสาธารณสุขและสวัสดิการของ ญี่ปุ่น ได้ออกข้อกำหนดการบังคับใช้การติดฉลากอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้จำแนกได้เป็น 2 กรณี ได้แก่ อาหารก่อภูมิแพ้ (บังคับติดฉลาก) โดยประกอบด้วยอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี โซบะ (buckwheat) ไข่ นม และถั่วลิสง ถ้าไม่ติดฉลากถือว่า มีความผิด ตามกฎหมายสุขลักษณะของอาหาร และมีอาหารชนิดอื่นที่แนะนำว่าอาจก่อให้เกิดภูมิแพ้ ในกลุ่มหลังประกอบด้วยอาหาร 19 ชนิด ได้แก่ หอยเป๋าฮื้อ ปลาหมึก ไข่ปลาแซลมอน กุ้ง ส้ม ปู กีวี พีช แอปเปิ้ล เนื้อวัว ถั่ว tree nuts ปลาแซลมอน ปลาทู ถั่วเหลือง เนื้อไก่ เนื้อหมู เห็ดญี่ปุ่น แยมเจลลาติน โดยให้มีการตรวจสอบและปรับปรุงทุกๆ 2 ปี (ชิสา วิบูลย์ชาติ และคณะ, 2551)

ในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ การควบคุมกำกับดูแลเน้นการให้ข้อมูลเรื่องอาหารก่อภูมิแพ้แก่ผู้บริโภคเพื่อหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่ก่อให้เกิดการแพ้การควบคุมกำกับดูแลนี้ดำเนินการในรูปรหัส (code) มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2545

จากระเบียบควบคุมการแสดงฉลากในกลุ่มประเทศดังกล่าว พบว่าจะมีวัตถุดิบ 8 ชนิด ที่อยู่ระเบียบบังคับของทุกประเทศ ได้แก่ ไข่ นม ถั่วลิสง ธัญพืชที่มี gluten ถั่ว tree nut กุ้ง ปู ปลา ถั่วเหลือง โดยในประเทศญี่ปุ่น ระบุให้แสดงฉลากของ บัคหวีต ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของเส้นโซบะ และในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์จะควบคุมพืชในกลุ่ม งา และ สารประกอบซัลไฟต์

จากข้อมูลทั้งหมดจะเห็นว่า EU ออกระเบียบการแสดงฉลากครอบคลุมชนิดของวัตถุดิบได้มากที่สุด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของวัตถุดิบที่ควบคุมให้มีการแสดงฉลากในแต่ละประเทศ

Codex	สหภาพยุโรป	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์	ญี่ปุ่น
ธัญพืชชนิดต่างๆ	ธัญพืชชนิดต่างๆ	ธัญพืชชนิดต่างๆ	ธัญพืชชนิดต่างๆ	ข้าวสาลี
สัตว์ทะเลที่มีเปลือก	สัตว์ทะเลที่มีเปลือก	สัตว์ทะเลที่มีเปลือก	สัตว์ทะเลที่มีเปลือก	-
หุ้ม(Crustaceans)	หุ้ม(Crustaceans)	หุ้ม(Crustaceans)	หุ้ม(Crustaceans)	
ปลา	ปลา	ปลา	ปลา	-
-	ไข่	ไข่	ไข่	ไข่
ถั่วลิสง	ถั่วลิสง	ถั่วลิสง	ถั่วลิสง	ถั่วลิสง
ถั่วชนิดต่างๆ(Tree	ถั่วชนิดต่างๆ(Tree	ถั่วชนิดต่างๆ(Tree	ถั่วชนิดต่างๆ(Tree	-
Nuts)	Nuts)	Nuts)	Nuts)	
ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	-
นม	นม	นม	นม	นม
-	ผักคื่นช่าย	-	-	-
-	มัสตาร์ด	-	-	-
-	เมล็ดงา	-	-	-
ซัลเฟอไดออกไซด์	ซัลเฟอไดออกไซด์		ซัลเฟอไดออกไซด์	
และซัลไฟต์ (ความ	และซัลไฟต์ (ความ	-	และซัลไฟต์ (ความ	-
เข้มข้นเกิน 10 ppm)	เข้มข้นเกิน 10 ppm)		เข้มข้นเกิน 10 ppm)	
-	-	-	-	โซบะ
***ทั้งนี้รวมถึง	***ทั้งนี้รวมถึง	***ทั้งนี้รวมถึง	***ทั้งนี้รวมถึง	***ทั้งนี้รวมถึง
ผลิตภัณฑ์ของ	ผลิตภัณฑ์ของ	ผลิตภัณฑ์ของ	ผลิตภัณฑ์ของ	ผลิตภัณฑ์ของ
อาหารเหล่านี้ด้วย	อาหารเหล่านี้ด้วย	อาหารเหล่านี้ด้วย	อาหารเหล่านี้ด้วย	อาหารเหล่านี้ด้วย

(สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย 2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการตรวจการปนของวัตถุดิบอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ที่ใช้ในปัจจุบันมีรายงานอยู่ทั้งสิ้น 3 วิธี (Hefle *et al.*, 2007) ได้แก่

1. วิธีการตรวจสอบการปนของวัตถุดิบโดยการทดสอบการตอบสนองทางผิวหนัง (Skin prick test : SPT) การทดสอบโดยวิธีนี้ทำโดยการหยดตัวอย่างที่คาดว่าจะเป็นสารก่อภูมิแพ้ลงบน ผิวหนัง แล้วใช้เข็มสะกิดเบาๆ ผ่านหยดสารให้ถูกชั้นหนังกำพร้าโดยไม่ให้มีเลือดออกหลังจากนั้นจึงเช็ดออก รออ่านผล 15 นาที ถ้าร่างกายตอบสนองโดยการแพ้ก็จะเกิดปฏิกิริยาเป็นตุ่มนูนแดงที่ผิวหนังตรงบริเวณตำแหน่งที่ทดสอบ ในปัจจุบันมีอุปกรณ์ที่นำมาใช้แทนการใช้เข็มสะกิดเป็นแท่งพลาสติกปลายแหลม (duotip) ปลายเป็นง่ามคล้ายส้อม ใช้จุ่มน้ำยาที่จะทดสอบแล้วนำมาสะกิดที่ผิวหนังของผู้รับการตรวจ โดยไม่ต้องหยดน้ำยาลงบนผิวหนังก่อน ทำให้สะดวกในการทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเด็กเพราะเด็กจะให้ความร่วมมือมากกว่า

วิธีการทดสอบ skin prick test นี้เป็นที่ยอมรับและแนะนำให้ใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก แต่มีข้อเสียคือ มีความเสี่ยงต่อผู้ทดสอบสูงเนื่องจากเป็นการทดสอบการตอบสนองโดยตรงทางร่างกายโดยตรง จำเป็นต้องใช้บุคคลากรทางการแพทย์และจำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการร่วมในการทดสอบ (Kim *et al.*, 2008)

2. วิธีตรวจสอบทางเซรั่มวิทยา (immuno assay) เป็นวิธีการตรวจสอบโมเลกุลโปรตีนที่เป็นสารกระตุ้นให้เกิดภูมิแพ้โดยอาศัยปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน ในทางปฏิบัติวิธีที่นิยมใช้อยู่บนหลักการ ELISA โดยใช้การจับตัวของแอนติเจนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้กับแอนติบอดี้ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อแอนติเจน แอนติบอดี้ส่วนใหญ่จะติดฉลากด้วยเอนไซม์หรือสารเรืองแสงไว้แล้ว เมื่อทำปฏิกิริยาจึงจะเกิดสีขึ้นและสามารถวัดปริมาณของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเครื่อง microplate reader โดยค่าที่แสดงจะแปรผันตรงกับปริมาณของโปรตีนที่เป็นแอนติเจน ผลที่ได้มีความแม่นยำสูงเพราะอาศัยแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ แต่มีข้อเสียคือ แอนติบอดี้ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อแอนติเจนและติดฉลากด้วยเอนไซม์หรือสารเรืองแสงนั้นทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก และวิธีการตรวจสอบด้วยกระบวนการทางเซรั่มวิทยานี้ไม่สามารถตรวจสอบในอาหารที่ผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนได้เนื่องจากโปรตีนจะเสียสภาพ (denature) และต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงรวมทั้งใช้เวลาในการตรวจสอบนานและต้องอาศัยห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบ (Holzhauser *et al.*, 2002, Liquin, 2005)

ด้วยความที่อาหารส่วนใหญ่เป็นอาหารแปรรูป ดังนั้นวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสมจะต้องสนองตอบและต่อยอดวิธีการตรวจในปัจจุบันให้ง่ายและรวดเร็ว

จากรายงานการศึกษาพบว่าการตรวจสอบวัตถุดิบอาหารโดยตรงไปยังโมเลกุลดีเอ็นเอน่าที่จะเป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่า เนื่องจากโมเลกุลดีเอ็นเอนั้นมีเสถียรภาพดีกว่าโมเลกุลอื่นๆที่พบในอาหาร แม้ในอาหารที่ผ่านการแปรรูปก็ยังคงสามารถตรวจสอบได้ด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอ ในพืชหลายชนิด การตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์สามารถทำได้โดยอาศัยลักษณะเฉพาะของนิวคลีโอไทด์ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณ 5.8S rDNA วิธีการตรวจเริ่มจากการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยไพรเมอร์จำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (PCR) ที่อาศัยหลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันได้โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอนหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

ขั้นแรก denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ จากสายดีเอ็นเอสายคู่ให้กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยในขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-30 เบส (oligonucleotide primers) และมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนนี้ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ลดต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์ (โดยทั่วไปจะต่ำกว่า Tm 1 – 2 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะอยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส ลำดับเบสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นต่อจากไพรเมอร์ จะถูกกำหนดโดยลำดับเบสบริเวณปลายของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ไพรเมอร์จะถูกเติมให้มีความเข้มข้นสูงกว่าดีเอ็นเอต้นแบบมาก ดังนั้นการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ จึงมีโอกาสเกิดขึ้นมากกว่าการ จับคู่กลับ (renature) ของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นสายเดี่ยวด้วยกันเอง

ขั้นที่สาม extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72-75 องศาเซลเซียส เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด

จากขั้นตอนที่ 1-3 นับเป็นจำนวน 1 รอบ และได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นแบบทวีคูณ เมื่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายรอบก็จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อีกมากมาย และถ้าทำกระบวนการนี้ 20 รอบ ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า และด้วยหลักการเดียวกัน การตรวจสอบ

การปนของพืชดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณของยีนของโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ในพืชดังกล่าว (Schmidt *et al.*, 2005; Koyano *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2005; Viquez *et al.*, 2003)

ที่ผ่านมาพบรายงานการตรวจสอบอาหารที่ทำจากพืชที่มีโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยอาศัยบริเวณจำเพาะต่อพืชดังกล่าว เช่น 5.8S rDNA internal transcribe spacer region(ITS) (Hirao *et al.*, 2004) ควบคู่กันกับบริเวณของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้โดยตรง *Ara h*1 (Olga *et al.*, 2003) ของถั่วลิสง 2S albumin ของบัคหวีต (Wang *et al.*, 2006) เป็นต้น

ในปฏิกิริยาภูมิแพ้ ถั่วลิสงจัดเป็นวัตถุดิบที่มีผู้แพ้ที่แสดงอาการมากและความถี่สูงกว่าโมเลกุลอื่น การตรวจสอบโปรตีนพบว่ามีโปรตีน 7 ชนิด ได้แก่ *Ara h1 Ara h2 Ara h3* และ *Ara h4* 2 ชนิดหลังเป็น glycinin โปรตีน นอกจากนี้ยังพบ *Ara h5* ที่เป็น profiling (Kleber-Janke *et al.*, 1999) โดยมักพบถั่วลิสงในอาหารจำพวก cereal ไอซ์ครีม แป้งถั่วลิสง ฯลฯ

Stephan, *et al*, (2004) ได้ตีพิมพ์วิธีการตรวจการปนของถั่วลิสงด้วยเทคนิค real time PCR โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณยีน *Ara h2* โดยสามารถตรวจสอบได้แม้พบการปนเพียง 2 ppm นอกจากรายงานดังกล่าวยังพบการวางจำหน่ายของชุดสำเร็จรูปในการตรวจถั่วลิสงด้วยดีเอ็นเอ แต่ก็ไม่มีรายละเอียดในรูปแบบและเป้าหมายของยีนที่ใช้ตรวจ การพัฒนารูปแบบการตรวจที่อยู่บนพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์ ปกติจึงมีความสำคัญ

สำหรับในถั่วเหลือง โมเลกุลภูมิแพ้หลักได้แก่ Gly m Bd 30kDa (P34) glycinin acidic chain และ alpha และ *beta-1,3-glucanase* (Helm *et al.*, 2000)

ถั่วเหลืองจัดเป็นวัตถุดิบอาหารที่ใช้แพร่หลายและเกี่ยวข้องกับอาหารมากกว่า 3000 ชนิด มักปนกับผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ อาหารสำหรับเด็ก ไส้กรอก เนื้อและผลิตภัณฑ์แปรรูปและในอาหารทางเอเชีย เช่น เต้าหู้ นอกจากนี้ยังพบการใช้ถั่วเหลืองในรูป soy lecithin และ soy oil

การตรวจการปนของถั่วเหลืองโดยเทคนิคพีซีอาร์ เริ่มพัฒนาขึ้นโดย Meyer *et al.* (1996) ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบถั่วเหลืองไม่น้องกว่า 10 วิธี ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของยีน lectin (Poms *et al.*, 2001) วิธีที่กล่าวมามักให้ความไวในการตรวจในระดับ 0.0001 – 0.01% ขึ้นกับชนิดของเนื้ออาหารที่เกี่ยวข้อง อย่างไรก็ดีวิธีการตรวจการปนของถั่วเหลืองก็มีข้อจำกัดของเทคนิค โดยเฉพาะการที่ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการและตรวจผลที่ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน

ในธัญพืชโดยเฉพาะข้าวสาลี พบว่าส่วนใหญ่โมเลกุลที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้นั้นจะปรากฏในส่วนของ gluten ทั้งในกลุ่ม glutenin และ gliadin (Hashimoto *et al*, 2008) gliadin ก็มีหลายกลุ่มย่อย

การตรวจดีเอ็นเอจึงมีบทบาทสำคัญ ในปัจจุบันการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนของข้าวสาลีมีอยู่น้อย โดยที่พบเป็นการตรวจสอบทางอ้อม กล่าวคือเป็นการตรวจสอบยีนภายในเน้นการใช้ *Waxy-D*, ยีนซึ่งเฉพาะเจาะจงกับข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.)

โดยปกติยีนจำเพาะต่อข้าวสาลี ได้แก่ *Ta SUT CbpII Lr1* และ wheat *GSS* ยีน ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบยีนเหล่านี้จะทำปฏิกิริยาทั้งกับ *T.aestivum* และ *T.duran* ขณะที่ *Waxy-D* ยีน จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ *T.aestivum* เท่านั้น (Iida *et al.*, 2005) โดยปกติยีน *Wx-A1* B1 และ D1 จะอยู่เป็น single copy แต่จะมีครบทั้ง 3 ชุด (triplicate) ตามจีโนมของข้าวสาลี ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นจำเพาะต่อ *wax-D1* ยีน ตอบสนองต่อข้าวสาลีทุกสายพันธุ์ แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอจากข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต ถั่วเหลือง บัคหวีต ข้าว ข้าวโพด และงา ดังนั้น การพัฒนาระบบจะยังพบว่าสามารถสร้างรูปแบบการตรวจสอบที่เป็นทางเลือกได้อีก

ทำนองเดียวกัน การตรวจสอบการปนของบัคหวีตในอาหาร พบว่ามีความสำคัญในอาหารเอเชียตะวันออกที่มักพบการใช้วัตถุดิบปนใน เค้ก แพนเค้ก เครบและส่วนผสมในแป้งสาลี

บัคหวีตมีชนิดพันธุ์ที่สำคัญ คือ *Fagopyrum homotropicum* และ *F.cymosum* ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า และ *F.esculentum* และ *F.tataricum* ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูก อย่างไรก็ดี ทั้งหมดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมาก (Yasui *et al.*, 1998) และทั้งหมดต่างสังเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ตัวเดียวกัน ได้แก่ 2S Albumin protein Hirao *et al*, 2005 ได้พัฒนาเทคนิคให้สามารถตรวจสอบการปนของบัคหวีตบนพื้นฐานการตรวจสอบที่ 5.8S ITS (inter transcribed spacer) พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบบัคหวีตได้ครบทั้ง 27 ตัวอย่าง ด้วยความไวในระดับ 1 ppm อย่างไรก็ดี การตรวจโดยใช้ ITS มีความเสี่ยงที่จะให้ผลการวิเคราะห์ไม่เฉพาะเจาะจงในกรณีที่เนื้ออาหารมีความซับซ้อน ประกอบด้วยวัตถุดิบหลายอย่างที่อาจมีผลต่อความจำเพาะของปฏิกิริยา การพัฒนารูปแบบการตรวจรูปแบบใหม่จึงมีความสำคัญ

แม้เทคนิคพีซีอาร์จะมีข้อดีในแง่ความแม่นยำ ความไวของปฏิกิริยาและความน่าเชื่อถือที่สูงกว่าเทคนิค ELISA แต่การจำแนกการปนของโมเลกุลภูมิแพ้ด้วยพีซีอาร์ จำเป็นต้องตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเฉพาะซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้การตรวจสอบยังไม่สามารถทำได้นอกห้องปฏิบัติการ จึงเป็นอุปสรรคในการประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตามหลักการ point of care

ด้วยข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวมาทั้งหมดซึ่งไม่เหมาะสมต่อการใช้ในการตรวจโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้ในอาหาร ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, (2008) ได้นำวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว (isothermal amplification) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้ วิธีการ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว อยู่หลักการ strand displacement synthesis โดยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และอาศัยไพร์เมอร์ 4 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ได้แก่ F3 B3 FIP (forward inner primer) BIP (backward inner primer) dNTP Betaine และบัฟเฟอร์

ไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยาได้แก่ F3 และ B3 (เหมือน forward และ reverse ใน PCR) และ FIP ได้แก่ 5'-F1c F2c-3' และ BIP ได้แก่ 5'-B1c B2-3' ความเข้มข้นลดหลั่นกันลงมาโดย FIP และ BIP จะเข้มข้นน้อยกว่า F3และ B3 อยู่ 8-10 เท่า แต่ละบริเวณที่นำมาออกแบบมีค่า Tm เป็น F1c/B1c = 64-66°C F2/B2 = 59-61°C F3/B3 = 59-61°C

กลไกของปฏิกิริยาเริ่มจากด้าน forward เริ่มจาก 65°C FIP จับกับแม่แบบปลาย 3' ของ F2 จะสังเคราะห์ต่อไปจนสุดสายดีเอ็นเอ ระหว่างนั้น F3 จะจับกับดีเอ็นเอแม่แบบพร้อมกับเกิดการสังเคราะห์แบบ strand displacement ผลดังกล่าวทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายข้าง 5' จะขดตัวมาจับกับ F1 เกิด loop ที่ปลาย ทำนองเดียวกันที่ปลาย backward ไพรเมอร์ BIP จะทำปฏิกิริยา ต่อด้วย B3 จนกระทั่งได้โมเลกุลที่เป็นหัวใจของปฏิกิริยา เป็นรูป dumb-bell ในทำนองเดียวกัน จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์ในขั้นที่สอง กับโมเลกุล bumb-bell โดยไพรเมอร์ FIP และ BIP จนได้โมเลกุลเป็นรูป zig-zag ของดีเอ็นเอมากมาย เมื่อนำไปแยกบนเจลอะกาโรสจะเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่เป็นขั้นบันไดมากมาย และเนื่องจากบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียวตลอดทั้งกระบวนการ คือ 60-65° C จึงทำให้ไม่ต้องอาศัยเครื่อง PCR และไม่ต้องพึ่งพาห้องปฏิบัติการ จึงทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในภาคสนาม โดยผลที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงสูงเนื่องจากใช้ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ ไม่มี non-specific เหมือน PCR สามารถตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็วภายใน 30-60 นาที ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยากและผลที่ได้มีประสิทธิภาพและที่สำคัญคือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่า PCR 10-100 เท่าขึ้นไปและยังมีวิธีที่สามารถตรวจผลได้ด้วยตาเปล่า

ในการพัฒนาวิธีการตรวจที่รวดเร็ว สะดวกและแม่นยำนอกจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว การสร้างระบบตรวจวินิจฉัยผลก็มีความสำคัญ แนวทางหนึ่ง ได้แก่การนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่ช่วยให้การตรวจวิเคราะห์ดำเนินการได้อย่างสะดวก รวดเร็วมาประยุกต์ใช้

Biosensor เป็นอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยนำหลักการทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสัญญาณโดยใช้ตัวรับสัญญาณ (receptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ซึ่งจะสามารถแปลงสัญญาณทางไฟฟ้าเช่น ค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้ารวมถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของแสง เช่น การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งสัญญาณเหล่านี้สามารถตรวจวัดและเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปตัวเลขที่สอดคล้องกับปริมาณสัญญาณจริง (ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ)

การวัดด้วยไบโอเซนเซอร์บนการวัดทางแสงอาศัยหลักการ resonance หรือการสั่นสะเทือนของอนุภาคอิเลคตรอน ของอนุภาคทองคำ เมื่อได้รับแสงเป็นตัวกระตุ้น เมื่อมีโมเลกุลของดีเอ็นเอมาจับตัวกันบนแผ่นทองคำทำให้การสั่นสะเทือนของโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสงทำให้แสงสะท้องและหักเหด้วยแนวระนาบและความยาวคลื่นที่เปลี่ยนแปลงไป เรียกปราฏการ์นี้ว่า plasmon ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่เปลี่ยนไปได้ ก็จะตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอได้ (Chaumpluk *et al*, 2006)

การวัดด้วยไบโอเซนเซอร์บนหลักการวัดทางไฟฟ้าเคมี โดยใช้อิเลคโทรด (electrode) เล็กๆ ตรวจวัดความต่างศักย์และการไหลของกระแสไฟฟ้าในระบบที่เป็นสารละลาย จะสามารถทำได้โดยมีเงื่อนไขว่าจะต้องกระตุ้นระบบและสะสมหรือส่งต่ออิเลคตรอนผ่านพื้นผิวของอิเลคโทรด แล้ววัดค่าความต่างศักย์หรือกระแสที่เปลี่ยนแปลงไปในวงจร ซึ่งภายในสารละลายดีเอ็นเอจะไม่สามารถตรวจสอบสัญญาณอันเนื่องมากจากดีเอ็นเอความเข้มข้นใดๆได้เด่นชัดนัก จึงจำเป็นต้องใช้โมเลกุลเคมีที่เป็น DNA binder จับตัวกับดีเอ็นเอเพื่อช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณ

DNA binder มีอยู่ 2 กลุ่มคือ intercalator ที่จะแทรกตัวระหว่างสายดีเอ็นเอเช่น ethidium bromide methylene blue propidium iodide ส่วนในกลุ่มที่ 2 คือ minor groove binder ซึ่งสามารถจับตัวกับโครงสร้างดีเอ็นเอที่เป็น double helix ในส่วน minor groove สารในกลุ่มนี้คือ DAPI และ Hoechst 33258 ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมา Hoechst 33258 จะมีช่วงการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์กว้างที่สุดและใช้ค่ากระแสเริ่มต้นต่ำสุด (Chaumpluk *et al*, 2006) จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็น DNA binder เพื่อตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า

โมเลกุล Hoechst 33258 สามารถจับกับดีเอ็นเอและกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการรวมตัว ในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอหรือมีดีเอ็นเออยู่น้อยประจุอิเลคตรอนอิสระจาก Hoechst 33258 ในระบบที่ไม่ได้จับตัวกับดีเอ็นเอจะมีอยู่มาก เมื่อตรวจวัดจะได้ค่ากระแสที่สูงขณะที่เมื่อมีดีเอ็นเอมาก การจับตัวกับโมเลกุลของ Hoechst 33258 กับดีเอ็นเอมีมากขึ้น ทำให้ประจุอิเลคตรอนอิสระในระบบจาก Hoechst 33258 ลดลง ค่าการเปลี่ยนแปลงกระแสก็จะลดลง ตัวแปลงสัญญาณ (transducer) จะแปลงค่าการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเหล่านี้ออกมาเป็นตัวเลขเพื่อสร้างกราฟ ซึ่งจะพบว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของดเอ็นเอกับค่าสูงสุดของกระแส (anodic peak) จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Chaumpluk *et al*, 2006)

พัฒนาการทางไบโอเซนเซอร์บนพื้นฐานการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า ได้รับการพัฒนาขึ้นให้สามารถตรวจวัดสัญญาณดีเอ็นเอโดยอาศัยความจำเพาะระหว่างดีเอ็นเอกับโมเลกุลของสีและเปลี่ยนสัญญาณนั้นไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าผ่านลงบนพื้นผิวที่ต้องการวัดซึ่งก็คืออิเลคโทรด

(Chaumpluk *et al*, 2006) ซึ่งสามารถประยุกต์หลักการเดียวกันโดยใช้โมเลกุล Hoechst 33258 เป็นตัวกระตุ้นสัญญาณเฉพาะของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจวัดการปนของวัตถุดิบที่อาจมีการปนของ bovine species (Chaumpluk *et al*, 2006) ดังนั้นด้วยหลักการเดียวกันจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจดีเอ็นเอของยีนที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 ตัวอย่างถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต จากตลาดนัดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร้านซุปเปอร์มาร์เกตและตลาดสดสามย่าน

3.1.2 ตัวอย่างธัญพืชต่างชนิด ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เม็ดมะม่วงหิมพานต์ จากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร

3.1.3 อาหารและผลิตภัณฑ์ที่มี ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี หรือบัคหวีตเป็นองค์ประกอบโดยระบุในฉลากข้างผลิตภัณฑ์จาห้างสรรพสินค้าและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน

3.1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน

เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)

เครื่องเจลแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Mupid Advance Co., LTD, Japan)

เครื่องส่องดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต UV (Ultra Lum Electronic Dual Light™ Transilluminator, USA)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (พีซีอาร์) (BIO RAD Gene Cycler™, USA)

เครื่องชั่งไฟฟ้า Libror EL-120HA(Shimadzu, Japan)

ตู้เขี่ยเชื้อ Augusta Safty Cabinet (Lio Lab Co,.Ltd, Thailand)

ไมโครเวฟ (Sharp EMS) (Sharp Co, Ltd, Japan)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ -20 (Sanyo, Japan)

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Axygen, India)

ทิปขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Axygen, India)

ไมโครปิเปต (Gibson, France)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและสังเคราะห์โครงสร้างของยีน

แอลกอฮอล์ 95 % (Merck, Germany)

อะกาโรส (Promega, USA)

แอมโมเนียมอะซีเตต (Sigma Co., USA)

โบรโมฟีนอลบลู (Phamacia, USA)

ไดโซเดียม เอทิลีนไดอะไมน์ เตตราซิติก เอซิด : EDTA(Merck, Germany)

เอทิเดียมโบรไมด์ (Gibco BRL)

กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)

ฟีนอล (Sigma Co., USA)

คลอโรฟอร์ม (Merck, Germany)

ไอโสเอมิล แอลกอฮอลล์ (Merck, Germany)

โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)

โซเดียม โดเดซิลซิลซัลเฟต (Merck, Germany)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany, Germany)

100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์ (New England Biolabs, USA)

ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน(Sigma, USA)

เอนไซม์

- RNaseA (Sigma, USA)
- T4 DNA ligase(Promega, USA)
- *Taq* DNA polymerase(Promega, USA)
- Bst DNA polymerase
- Hoechst 33258

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต

การสกัดดีเอ็นเอจากถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีตโดยใช้วิธีมาตรฐาน CTAB (Meyer *et al*, 1999) เป็นหลักในการสกัดโดยใช้ปริมาณตัวอย่างอย่างละ 300 มิลลิกรัม

3.2.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากธัญพืชชนิดต่าง ๆและผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต เป็นองค์ประกอบ

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากธัญพืชชนิดต่างๆโดยใช้วิธีมาตรฐาน CTAB (Meyer *et al*, 1999) เป็นหลักในการสกัดโดยใช้ปริมาณตัวอย่างอย่างละ 300 มิลลิกรัม

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์อาหารที่มีถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต เป็นองค์ประกอบโดยใช้วิธีมาตรฐาน Promega's Resin ตามวิธีที่ระบุในคู่มือการใช้สารเคมี (Promega, USA) โดยใช้ปริมาณตัวอย่างอย่างละ 300 มิลลิกรัม

3.2.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

ออกแบบและสังเคราะห์ primer เน้นการทดสอบบนพื้นฐานของข้อมูลของยีน *Ara h1* ในถั่วลิสง *Lectin* ในถั่วเหลือง Acc1 ในข้าวสาลีและ 2S Albumin ในบัคหวีต เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏในฐานข้อมูล DNA databank (Gen Bank) (Benson *et al*, 2004) การออกแบบไพรเมอร์คำนวณภายใต้สมการมาตรฐานของโปรแกรม primer 3 และโปรแกรม Primer Explorer

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้ เปรียบเทียบกับการทำ local alignment กับข้อมูลในฐานข้อมูลดีเอ็นเอ ตรวจสอบไพรเมอร์ที่ได้ให้มีความจำเพาะเจาะจง ไพรเมอร์ทั้งหมดสั่งสังเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

3.2.4 การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีตและผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุดิบดังกล่าวเป็นองค์ประกอบด้วยวิธีพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 ไปเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จำเพาะด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (Promega, USA)โดยคู่ไพรเมอร์ forward และ reverse ทำปฏิกิริยาโดยมีรายละเอียดดังนี้บ่มปฏิกิริยาให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 1 นาที anealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นบ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า ใน TAE เจลที่มีวุ้นอะกาโรสอยู่ 1-1.5 %

3.2.5 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อสร้างโมเลกุลอ้างอิง

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้ มาเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pCR IV™ ด้วยหลักการ TA-cloning ตามวิธีการในคู่มือการทำงาน (Invitrogen, USA) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al*, 1989) แบคทีเรียที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว (LB broth) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแข็ง ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชม.เลือกแบคทีเรียที่พบการแทรกตัวของดีเอ็นเออยู่ในพลาสมิดบนจานเลี้ยงเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว (LB broth) ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิดด้วยวิธี small scale (Sambrook *et al*, 1982) พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้า และตรวจสอบดูแถบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการย้อม ethidium bromide ดูแถบพลาสมิดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อยืนยันผล

3.2.6 การตรวจสอบการปนของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีตและธัญพืชอื่นๆด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว

นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP ที่ออกแบบไว้ข้างต้น ผสมปฏิกิริยาตามที่ระบุไว้ใน Notomi *et al*, 2000 และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า

3.2.7 การประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบทั้งวิธีพีซีอาร์ และ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว

1.การตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ตามข้างต้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีตและธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เม็ดมะม่วงหิมพานต์ (Hirao *et al*, 2005) โดยใช้เงื่อนไขการเพิ่มปริมาณตามข้อ 3.2.4 และ 3.2.6 นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีการแยกด้วยสนามไฟฟ้าและย้อมด้วย ethidium bromide

2.การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยแปรผันความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต จากมากไปน้อยต่างกันระดับละ 10 เท่า 10 ระดับ โดยใช้เงื่อนไขการเพิ่มปริมาณตามข้อ 3.2.4 และ 3.2.5 นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีการแยกด้วยสนามไฟฟ้าและย้อมด้วย ethidium bromide

3.การตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำ (reproducibility) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ตามข้างต้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต ตัวอย่างละ 50 ซ้ำ โดยใช้เงื่อนไขการเพิ่มปริมาณตามข้อ 3.2.4 และ 3.2.6 นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีการแยกด้วยสนามไฟฟ้าและย้อมด้วย ethidium bromideและบันทึกค่าคะแนนในตาราง

3.2.7 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเทคนิคพีซีอาร์และวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวโดยใช้ไบโอเซนเซอร์

นำผลิตภัณฑ์จากเทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวมาตรวจสอบด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ ตามวิธีที่รายงานใน Chaumpluk *et al*, 2006 โดยผสมผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ 20 µl เข้ากับ DNA binder Hoechst 33258 เข้มข้น 100 µM ด้วยสัดส่วน 1 : 1 จากนั้นนำสารผสมที่ได้ไปหยดลงบน DNA sensor (BioDevice, Japan) โดยใช้อิเลคโทรดแบบสกรีนพรินท์ที่มีพื้นที่ผิว 2.64 mm^2 วัดสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นโดยวิธี Linear Sweep Voltammetry (LSV)

บันทึกผลค่า anodic current peak ที่ได้ เปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุมลบและตัวควบคุมบวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาและรวบรวมข้อมูลของยีนเป้าหมายของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ตามลำดับ เพื่อออกแบบไพรเมอร์

ผลการศึกษาและรวบรวมข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลภูมิแพ้และวัตถุดิบอาหารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ พบว่าได้ยีน *Ara h 1 Lectin Acc1 2S Albumin* ของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ตามลำดับยีน *Ara h1* และ *2S albumin* เป็นยีนสังเคราะห์โมเลกุลภูมิแพ้โดยตรง ขณะที่ *Acc1* และ *Lectin* เป็นยีน internal gene ที่พบเฉพาะในพืชเป้าหมายในปริมาณมาก จึงนำมาใช้เป็นยีนเป้าหมาย รายละเอียดของข้อมูลยีนดังกล่าวเป็นดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ara h 1 Lectin Acc1 2S Albumin* ของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ที่ใช้อ้างอิง

หมายเลข	รายละเอียด	ขนาด (นิวคลีโอไทด์)
AB440237	*Arachis hypogaea* gene for major allergen *Ara h1*	1845
DQ235094	*Glycine max lectin* mRNA sequence	624
Z23038	*T.aestivum ACCase* mRNA	1641
DQ304682	*Fagopyrum esculentum* 16 kDa allergen mRNA	635

จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เมื่อนำมาจัดเรียงให้อยู่ในรูป FASTA format สามารถออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer 3 ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา พีซีอาร์ ข้อมูลละ 2 ไพรเมอร์ และ เมื่อใช้ Primer Explorer V4 (Eiken, Japan) สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิควิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว ได้ ข้อมูลละ 4 ไพรเมอร์ คือ F3 B3 FIP BIP ไพรเมอร์ forward และ reverse ไพรเมอร์ นำมาใช้ร่วมกับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer และ reverse primer ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือ พีซีอาร์

Fragment	Primer	Nt	ขนาด amplicon
Ara h1	forward: 5'-GAGACAACCAAGAGAAGATTGGAG-3'	24	263
	reverse: 5'-GTGATTCTGGAGATTCTGAAACTG-3'	24	
Lectin	forward: 5'-GCCGAAGCAACCAAACATGA-3'	20	222
	reverse: 5'-TGT CAG GGG CAT AGA AGG T-3'	19	
Acc1	forward: 5'-CCAGTCTATTCGCCATGGTC-3'	20	195
	reverse: 5'- TGCCATTCCATTGTTCGCA-3'	19	
2S Albumin	forward: 5'- ACGTGACAAGAGGAGAAGGA -3'	20	207
	reverse: 5'- ACACCGAAGTCCTACCGG -3'	18	

ไพรเมอร์ดังกล่าวให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เสถียร มีขนาดทางทฤษฎี 263 222 195 และ 207 นิวคลีโอไทด์ สำหรับถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบพบว่าขนาดดีเอ็นเอดังกล่าวยังอยู่ในช่วง 195-263 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำนองเดียวกันผลการวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์สามารถตรวจสอบการปนของพืชทั้ง 4 ชนิดด้วยโปรแกรม Primer explorer 4 เป็นดังตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ได้เป็นไพรเมอร์มาตรฐาน ที่จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ได้แก่ F3 B3 กับ F1C F2 และ B1C B2 โดยไพรเมอร์ชุดหลังเรียกว่า forward inner primer และ backward inner primer ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นถึงขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ต่ำที่สุดที่ 195 ถึง 263 นิวคลีโอไทด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ ของปฏิกิริยาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว

Fragment	Primer
Ara h1	F3: 5'-GAGACTACCAAGAGAAGATAGGAG-3'
	B3: 5'-GTGATTCTGGAGATTCTGAAACTG-3'
	FIP:5'-CCTGGTGTTCCGCACTCTTGTTTCATCAGCAGGCACGGAA-3'
	BIP:5'-TTCTACTTCGCGTCAAGGCGGTGTCAAAGCTCTGCAGGACC-3'
Lectin	F3: 5'-GCGGAAGCAACCAAACATCA-3'
	B3: 5'-TCTCAGGGGCATAGAAGCT-3'
	FIP:5'-TGGCGTGCCGTTTTCGTCAAAGAAGACGCTATTGTCACCT-3'
	BIP: 5'-GCCCTGTACTCCACCCCCATTTGAAGGAAGCGGGGAAG-3'
Acc1	F3: 5'-CGAGTCTATTCGCCATCGTC-3'
	B3: 5'- TCCCATTCCATTGTTCCCA-3'
	FIP:5'-TACGAGCCCCTGGGTTCTTCGCCCAAAGGAGCGCACATC-3'
	BIP:5'-GCCATGCTTCGCTGTCTAAGGTGAATTGGTGTTTTGGCGCC-3'
2S Albumin	F3: 5'- AGGTGACAAGAGGAGAACGA -3'
	B3: 5'- AGACCGAAGTCCTACCCG -3'
	FIP:5'- TGTGCTCGCTGCACGTTGTCGAGTCCAGGTTGTTGGACAC -3'
	BIP:5'- CCCAGTGGTGGTGAAGGCAGCGGACTGGTTATGGCCTTAT -3'

การตรวจสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์ต่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้โดยการตรวจสอบเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยหลักการ local alignment โดยใช้โปรแกรม Blastn (Stephen, *et al*. 1997)

เมื่อนำเอาโดเมนในส่วนของ F3 และ B3 ของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและ บัคหวีตซึ่งเป็น forward และ reverse ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มาทำการตรวจสอบความจำเพาะของยีนด้วยการทำ Blastn ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Ara h1* ของถั่วลิสง

Definitions	Score(bits)	Identities	E value
Forward			
Arachis hypogaea main allergen *Ara h1* mRNA	48.1	100%	4e-04
Pig DNA sequence from clone CH242-280N7 on chromosome 17	38.2	79%	0.4
Reverse			
Arachis hypogaea main allergen *Ara h1* mRNA	48.1	100%	4e-04
Mus musculus BAC clone RP23-385D11 from chromosome 14	40.1	83%	0.1

ไพรเมอร์ *Ara h1* ให้ความจำเพาะสูงสุดที่ค่า expected value เท่ากับ 4×10^{-4} โดยให้ความจำเพาะต่อ *Ara h 1* ขณะที่ไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอในระดับถัดไป ซึ่งได้แก่ porcine DNA sequence ขณะที่ไพรเมอร์ต่อยีน lectin ของถั่วเหลือง ให้ความจำเพาะต่ำกว่า 4×10^{-2} และ 1×10^{-1}

ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ข้าว และลิง *Pan troglodytes* (ตารางที่ 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Lectin* ของถั่วเหลือง

Definitions	Score(bits)	Identities	E value
Forward			
Soybean *lectin (Le1)* gene	40.1	100%	0.041
PREDICTED: Pan troglodytes hypothetical protein LOC740148	34.2	85%	2.5
Reverse			
Soybean *lectin* (Le1) gene	38.2	100%	0.16
Oryza sativa chromosome 10 BAC OSJNBa0041L14 genomic sequence	34.2	89%	2.5

สำหรับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Acc1* และยีน *2S albumin* ให้ผลการค้นหา local alignment เป็นดังตารางที่ 7 และ 8 ผลการทดสอบให้ค่าความจำเพาะเจาะจงในรูป E value ในระดับ 1.6×10^{-1} และ 4.1×10^{-2}

ตารางที่ 7 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *Acc1* ของข้าวสาลี

Definitions	Score(bits)	Identities	E value
Forward			
Triticum aestivum clone BAC 611K20 plastid acetyl-CoA carboxylase	38.2	100%	0.16
Triticum turgidum subsp. durum clone BAC 1836I21 hypothetical protein and plastid acetyl-CoA carboxylase (Acc-1) genes	38.2	100%	0.16
Reverse			
Triticum aestivum clone BAC 122F14 plastid acetyl-CoA carboxylase (Acc-1) gene	38.2	100%	0.16
Triticum aestivum clone BAC 198E19 plastid acetyl-CoA carboxylase *(Acc-1)* gene	38.2	100%	0.16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน *2S albumin* ของบัคหวีต

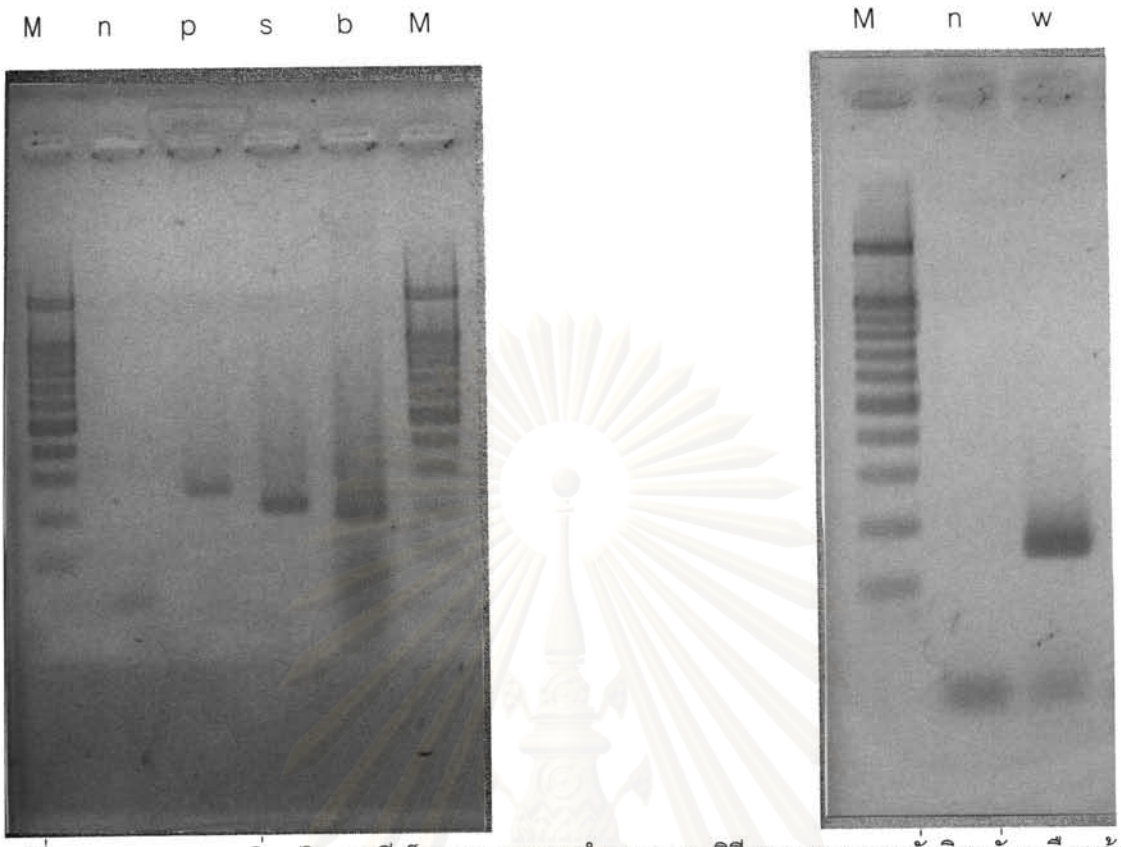
Definitions	Score(bits)	Identities	E value
Forward			
Fagopyrum esculetum allergenic protein mRNA	40.1	100%	0.041
Magnaporthe grisea 70-15 hypothetical protein (MGG_03622)	36.2	90%	0.64
Reverse			
Fagopyrum esculetum allergenic protein mRNA	40.1	100%	0.041
Chrysochromulina cymbium partial 23S rRNA gene, strain UIO 137	32.2	88%	10

การที่ค่าการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอของ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ในลำดับเป้าหมายลำดับต้น มีค่า Identities 100% และ มีค่า E value $4x10^{4}$ $4.1x10^{-2}$ $1.6x10^{-1}$ $4.1x10^{-2}$ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันระหว่างข้อมูลลำดับที่หนึ่งและลำดับที่สองมาก แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชเป้าหมายโดยจะไม่เกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อพืชชนิดอื่น

4.2 การตรวจสอบถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 263 222 195 207 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ สอดคล้องกับขนาดคาดหวังทางทฤษฎีของยีน *Ara h1 Lecin Acc1* และ *2S albumin* ของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ผลที่ได้มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียงแถบเดียวไม่พบแถบ ดีเอ็นเออื่นที่เป็น non specific ดังรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



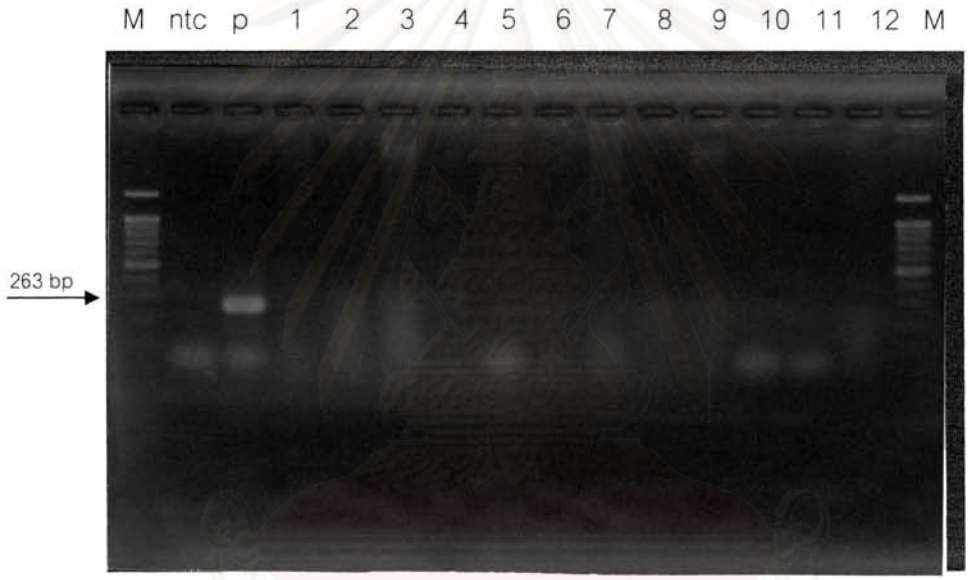
รูปที่ 1 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบถั่วลิสงถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ด้วยไพรเมอร์ F3 B3 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิส ใน 2.0% agarose ในสารละลาย 1x TAE buffer

ช่อง M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์
ช่อง n	ชุดควบคุมลบ
ช่อง p	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงด้วยเทคนิค PCR
ช่อง s	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค PCR
ช่อง w	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีด้วยเทคนิค PCR
ช่อง b	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตด้วยเทคนิค PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.1การประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบของวิธีพีซีอาร์

4.2.1.1 **การตรวจสอบความจำเพาะ**(specificity) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีตมาทดสอบกับดีเอ็นเอที่ได้จากธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ พบแถบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอปรากฏที่ชุดควบคุมบวกที่มีขนาดประมาณ 263 222 195 และ207 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันกับตัวอย่างอื่นๆแต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า คู่ไพรเมอร์ที่ ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างพืชเป้าหมาย และไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา cross reactivity กับชนิดอาหารอื่นที่ทดลอง ดังรูปที่ 2 ถึง 5



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) ด้วยเทคนิค PCRโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน *Ara h1* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย 1x TAE buffer

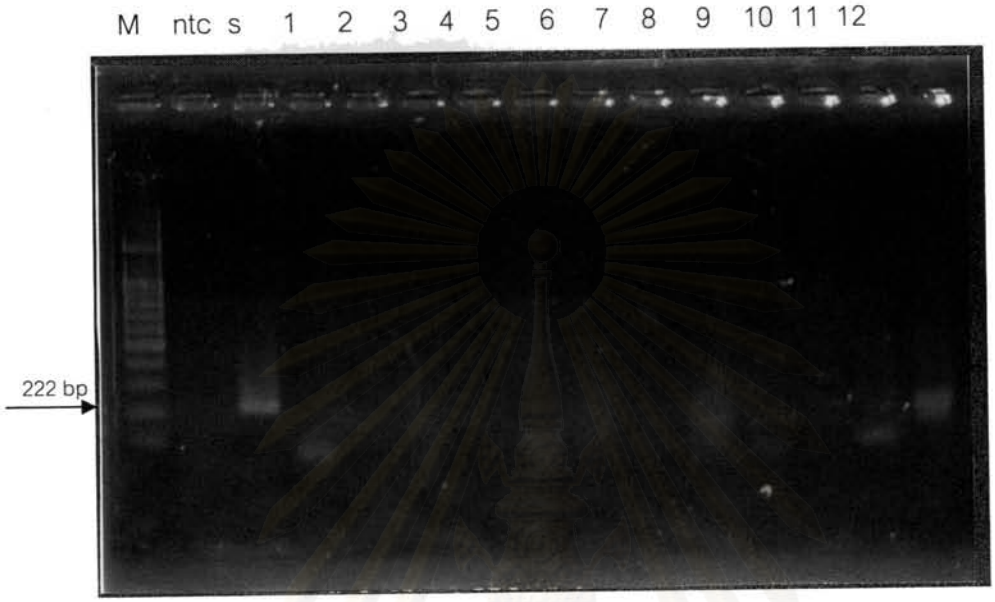
ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง ntc ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่อง p ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงด้วยเทคนิค PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่อง 1-12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน *Lectin* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย

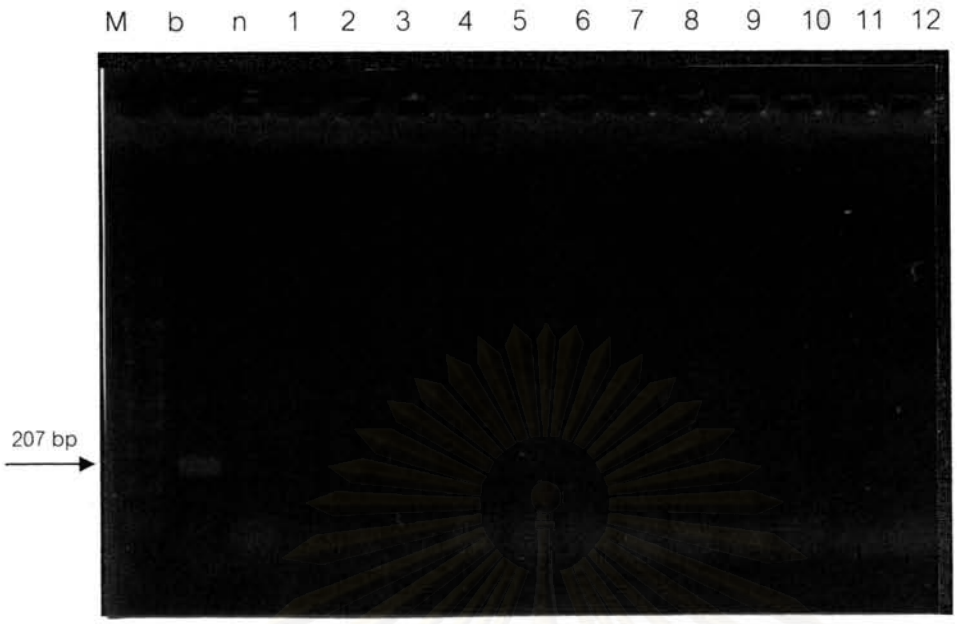
ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง ntc ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่อง s ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองด้วยเทคนิค PCR

ช่อง 1-12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน 2S albumin เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย

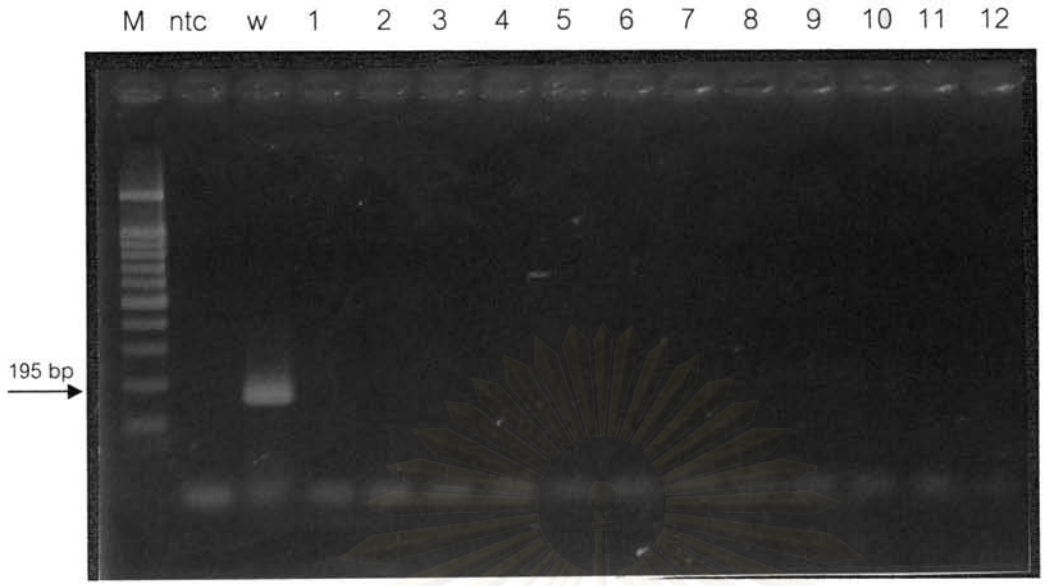
ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง n ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่อง b ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตด้วยเทคนิค PCR

ช่อง 1-12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน *Acc1* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง ntc ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่อง w ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีด้วยเทคนิค PCR

ช่อง 1-12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ข้าวเจ้า ข้าวโพด งาดำ เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.1.2 **การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา** (sensitivity) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบข้างต้น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และบัคหวีต ที่แปรผันความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่างกัน 10 เท่าทั้งสิ้น 15 ระดับ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จนถึงระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 0.005% ดังรูปที่ 6 ถึง 9

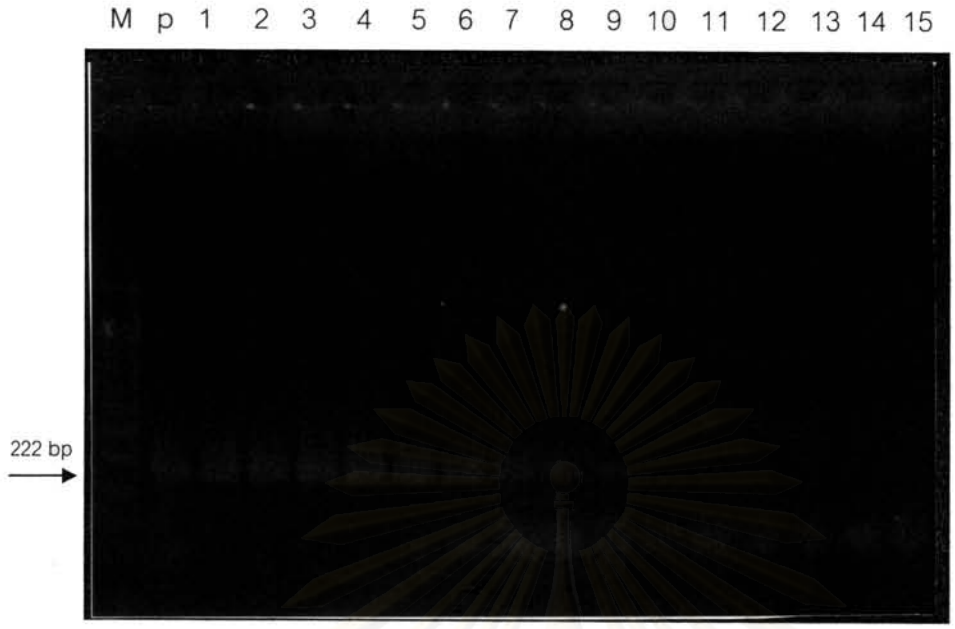
ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังกล่าวจัดเป็นข้อจำกัดในการตรวจสอบที่เรียกว่า limit of detection (LOD) สำหรับการตรวจการปนของวัตถุดิบที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแปรรูป

รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงที่ความเข้มข้นต่างกัน 15 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง p ชุดควบคุมบวก

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงด้วยวิธี PCR ที่ระดับความเข้มข้น 50% ถึง 0.000001%



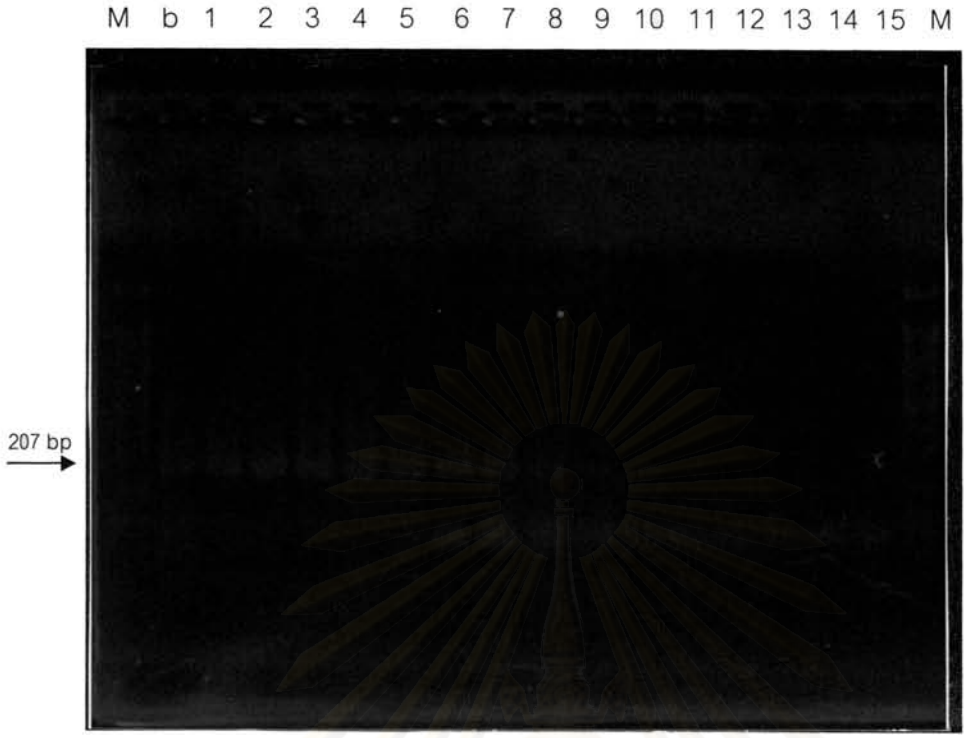
รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างกัน 15 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง p ชุดควบคุมบวก

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองด้วยวิธี PCR ที่ระดับความเข้มข้น 50% ถึง 0.000001%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



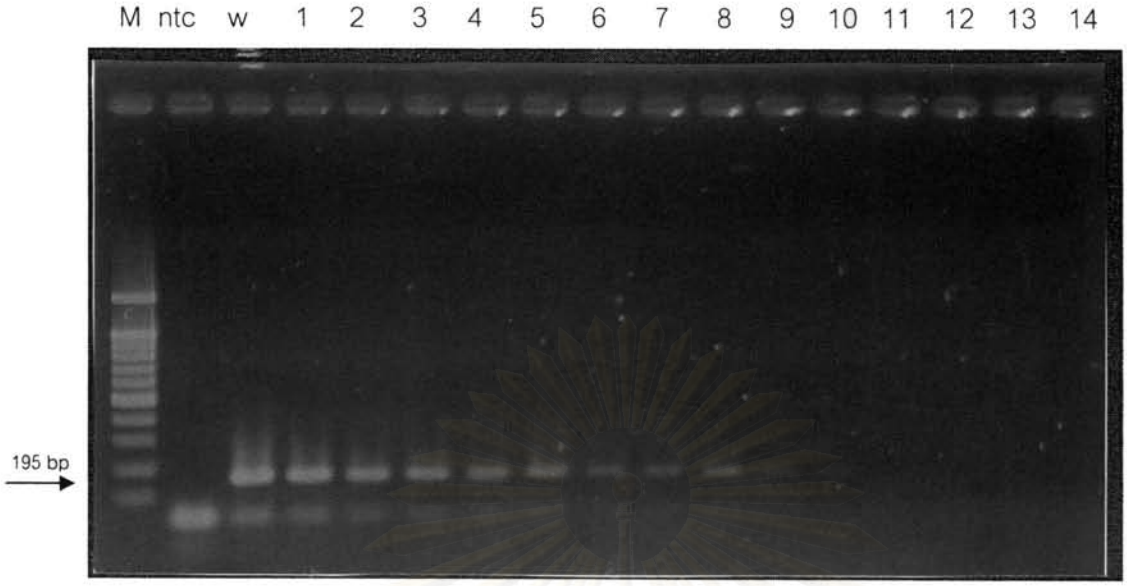
รูปที่ 8 แสดงผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีดที่ความเข้มข้นต่างกัน 15 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย TAE

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง b ชุดควบคุมบวก

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีดด้วยวิธี PCRที่ระดับความเข้มข้น 50% ถึง 0.000001%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างกัน 15 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 2.0% agarose ในสารละลาย TAE

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง ntc ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ช่อง w ชุดควบคุมบวก

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีด้วยวิธี PCR ที่ระดับความเข้มข้น 50% ถึง 0.000001%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2.3 **การตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ** โดยการทำการทดลองซ้ำ 50 ซ้ำกับตัวอย่าง ที่สนใจจากการสุ่มซึ่งประกอบไปด้วย ตัวอย่างจากชุดควบคุมบวก ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก รวมกัน 45 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ให้ผลลบ 5 ตัวอย่าง ในรูปแบบ blind test พบว่าผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 9 สามารถตรวจสอบผลการทำซ้ำของตัวอย่างทั้งในส่วนที่ให้ผลบวกและตัวอย่างที่เป็นลบ ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการทำซ้ำได้ถึง 100%

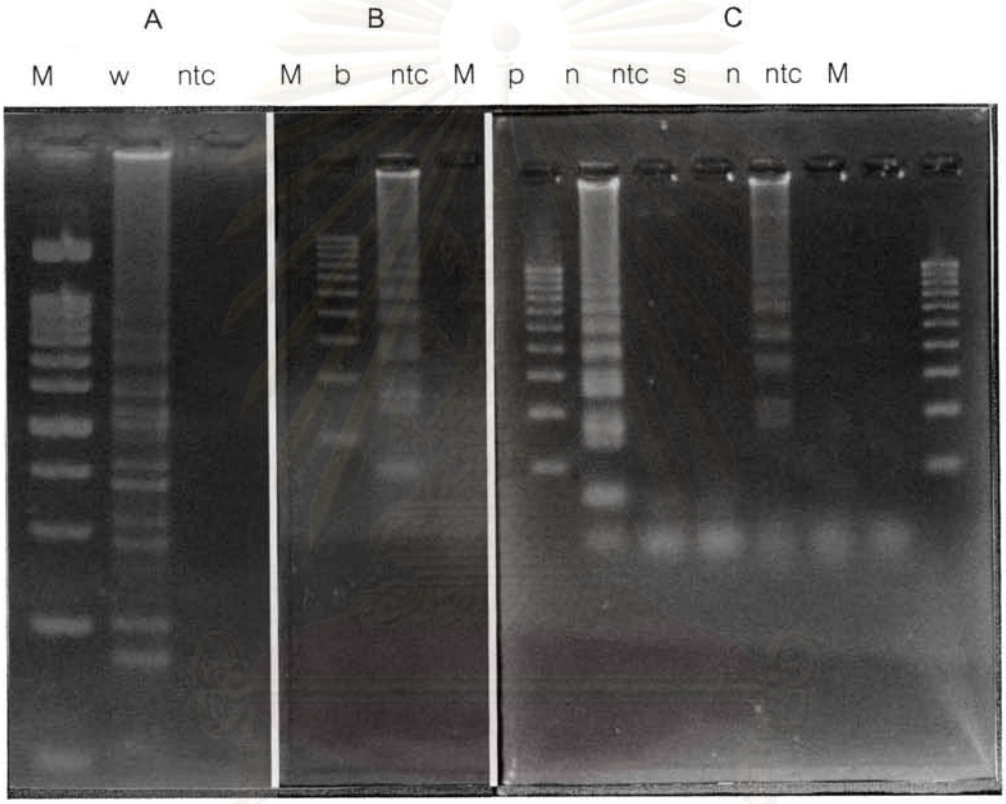
ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ด้วยวิธีพีซีอาร์

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน	ตัวอย่างบวก	ตัวอย่างลบ	ตัวอย่างทั้งหมด	ผลความเบี่ยงเบน		ความแม่นยำของการทดสอบ
Ara h1	45	5	50	45/45	5/5	100%
Lectin	45	5	50	45/45	5/5	100%
Acc1	45	5	50	45/45	5/5	100%
2S albumin	45	5	50	45/45	5/5	100%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การพัฒนาการตรวจสอบถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีตด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดอุณหภูมิระนาบเดียวยว

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ 6 บริเวณ ของยีนได้แก่ยีน *Ara h1 Lectin Acc1* และ *2S albumin* ด้วยเทคนิคอุณหภูมิระนาบเดียว พบว่าไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP ทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ Bst DNA polymerase ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นขั้นบันไดที่มีลักษณะจำเพาะที่มีขนาดเท่ากับผลคูณของผลิตภัณฑ์ที่เล็กที่สุดไปเรื่อยๆ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลี (A) และบัคหวีต (B) ถั่วลิสง และถั่วเหลือง (C) ด้วยเทคนิคการใช้อุณหภูมิระนาบเดี่ยว โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP ร่วมกับเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลค-โทรโฟลิซิส ใน 3.0% agarose ในสารละลาย 1x TAE buffer

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง n ชุดควบคุมลบ

ช่อง ntc	ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ
ช่อง w	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีด้วยเทคนิค วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว
ช่อง b	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตด้วยเทคนิควิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว
ช่อง p	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงด้วยเทคนิควิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว
ช่อง s	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองด้วยเทคนิควิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว

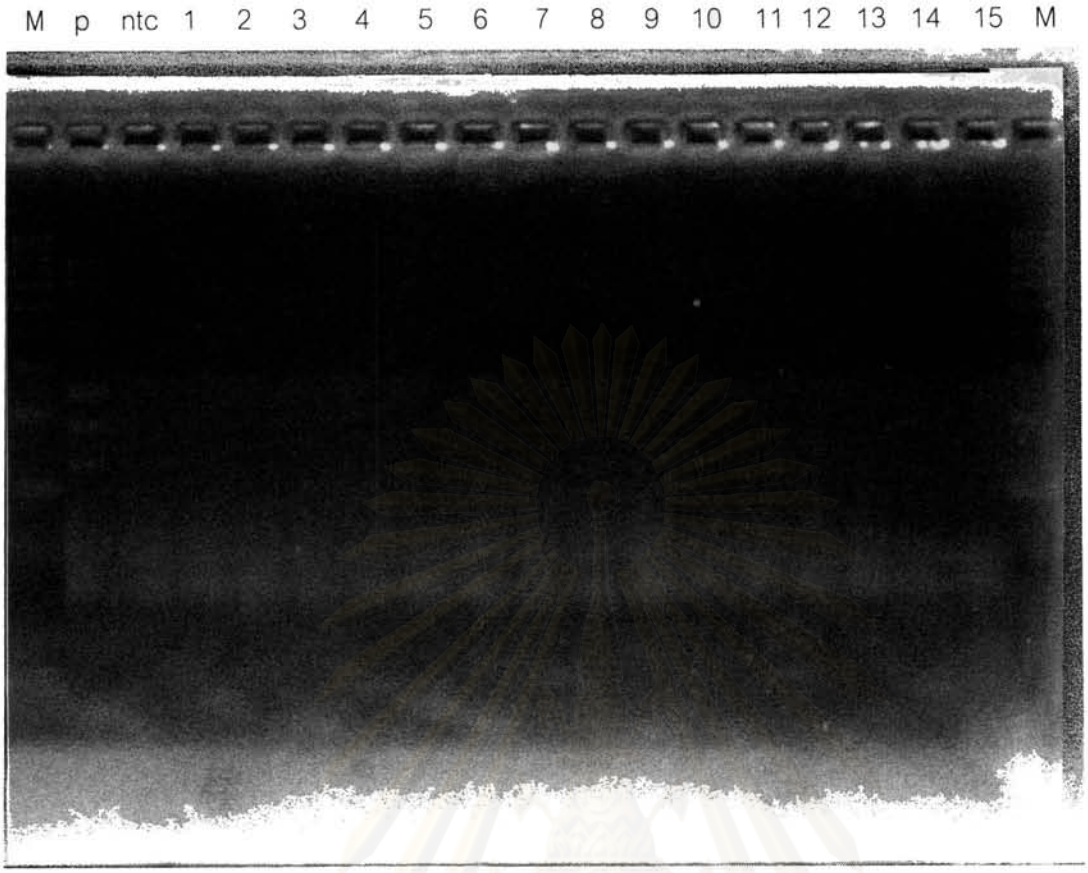
แถบดีเอ็นเอที่ได้ มีขนาดเป็นผลคูณของดีเอ็นอขนาด 263 222 195 และ 207 นิวคลีโอไทด์ ในแต่ละระบบเริ่มจาก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และบัคหวีต ตามลำดับ ไม่พบรูปแบบของดีเอ็นเอในลักษณะที่ให้แถบในรูปแบบสเมียร์ที่แสดงความไม่จำเพาะเจาะจง ที่มีขนาดต่ำกว่า 2000 นิวคลีโอไทด์ใดๆ จึงจัดว่าไพรเมอร์ที่ได้ให้ปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ

ในการทดลอง เวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลดลงจากที่ใช้ในพีซีอาร์ 2-3 ชั่วโมง เหลือเพียง 1 ชั่วโมง และสามารถใช้ heat block ร่วมกับการหยด mineral oil ลงในหลอดทดลองก่อนบ่มปฏิกิริยาแทนการใช้เครื่อง Thermocycler ได้

4.3.1 การประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบของวิธีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว

4.3.1.1 การตรวจสอบความจำเพาะ(specificity)

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาของแต่ละรูปแบบ การตรวจสอบเมื่อใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP ที่ใช้เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต มาทดสอบกับดีเอ็นเอจากธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เม็ดมะม่วงหิมพานต์ พบแถบดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะที่ชุดควบคุมบวก แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอปรากฏกับตัวอย่างอื่นๆซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอย่างพืชเป้าหมาย ดังรูปที่ 11-14



รูปที่ 11 การตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงและธัญพืชต่างๆด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย TAE

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

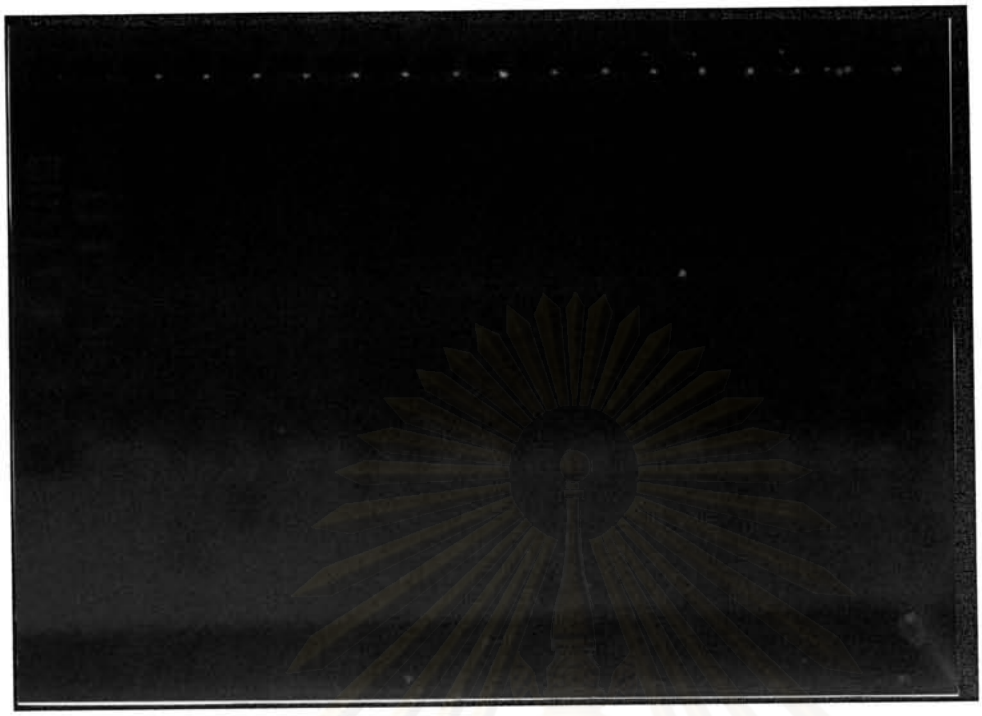
ช่อง p = ถั่วลิสง

ช่อง ntc = non template control

ช่อง1-15 = ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M s ntc 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 m



รูปที่ 12 การตรวจสอบความจำเพาะ(specificity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองและธัญพืชต่างๆด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย TAE

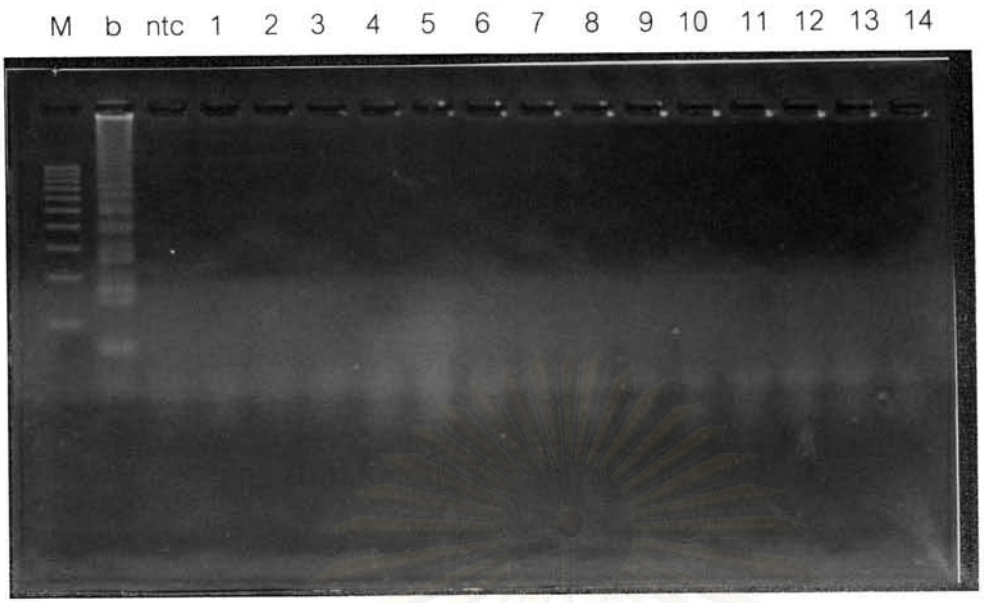
ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง s = ถั่วเหลือง

ช่อง ntc = non template control

ช่อง1-15 = ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตและธัญพืชต่างๆด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดี่ยว ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย TAE

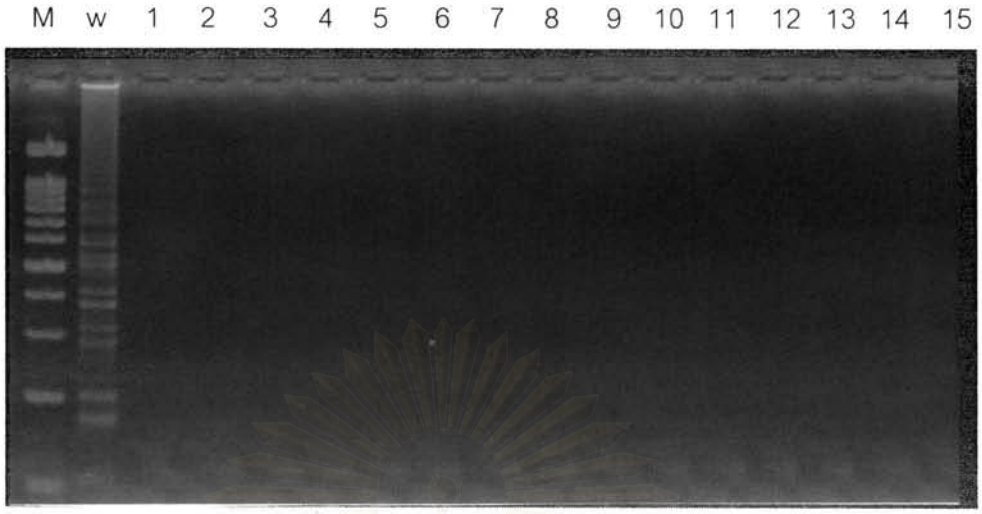
ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง b = บัคหวีต

ช่อง ntc = non template control

ช่อง1-15 = ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 การตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีและธัญพืชต่างๆด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย TAE

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง w = ข้าวสาลี

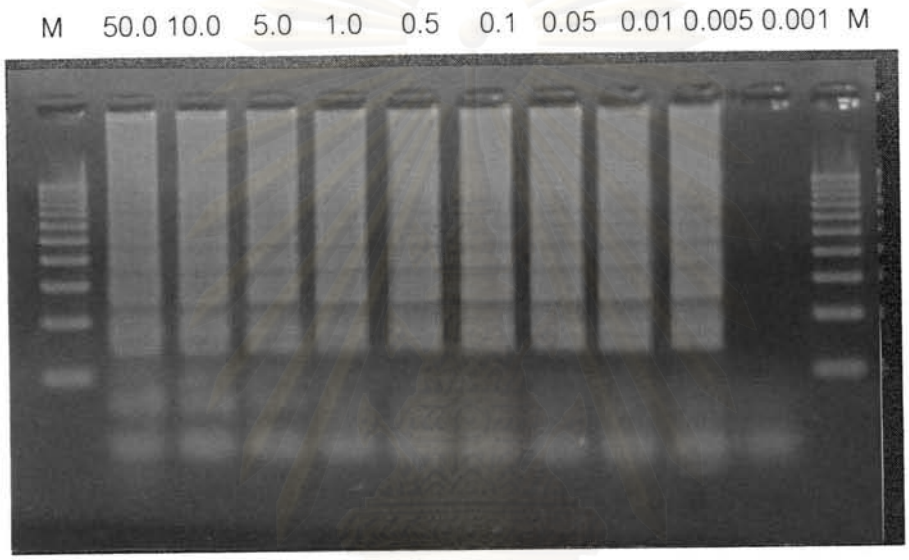
ช่อง ntc = non template control

ช่อง1-15 = ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ลูกเดือย งา เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฟักทอง ลูกบัว พริกไทย ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วลันเตา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.1.2 **การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา** (sensitivity)

ความไวของปฏิกิริยาได้จากการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอความเข้มข้นต่างกัน จากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุด เพื่อหาขีดจำกัดในการตรวจสอบหรือ limit of detection จากการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี บัคหวีต มาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอแม่แบบที่เจือจางดีเอ็นเอลง 15 ระดับ ระดับละ 10 เท่า ครอบคลุมความเข้มข้น 50% ถึง 0.001% พบว่าวิธีการตรวจสอบสอบด้วยปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวสามารถตรวจสอบได้ถึงระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 0.005% ดังรูปที่ 15 ถึง 18

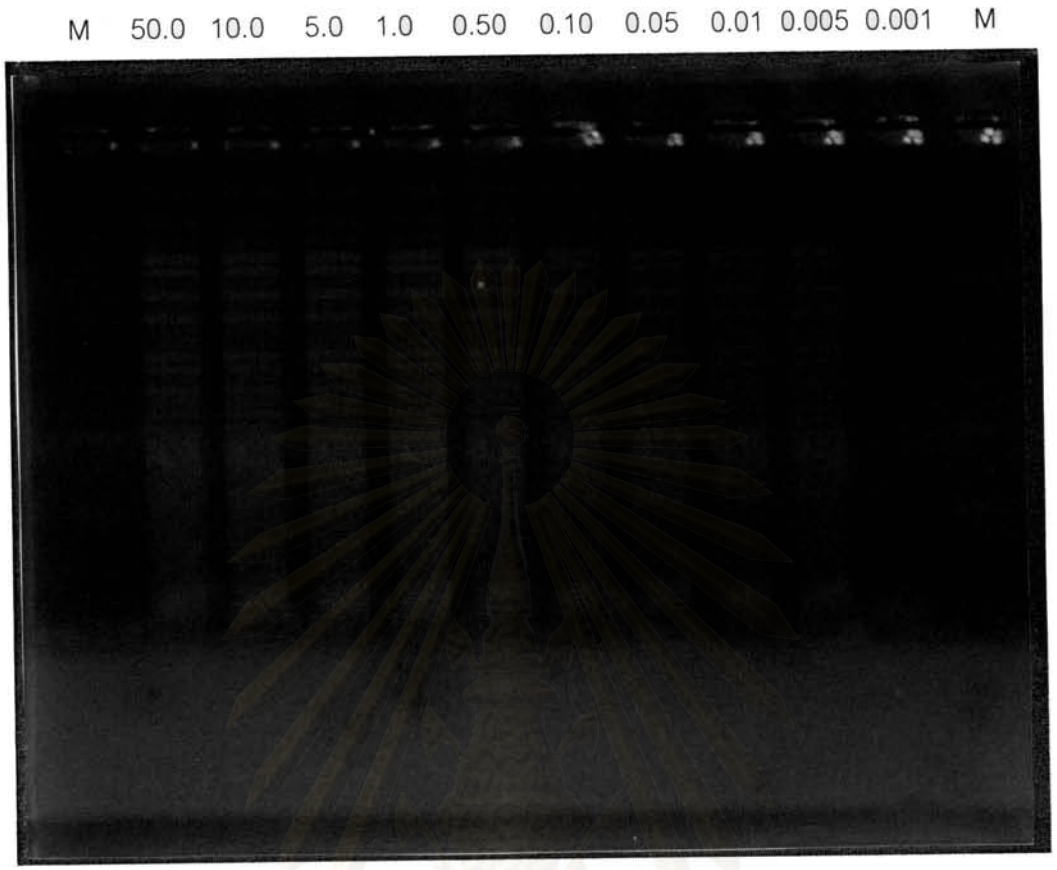


รูปที่ 15 การตรวจสอบไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงที่ความเข้มข้นต่างกัน 10 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง 1-10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

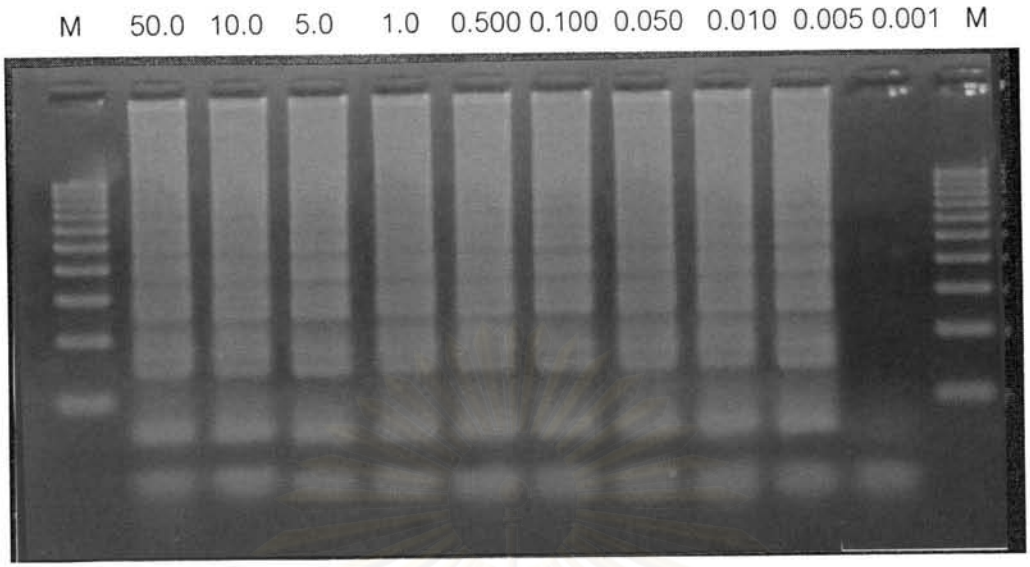


รูปที่ 16 การตรวจสอบไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์ F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างกัน 10 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

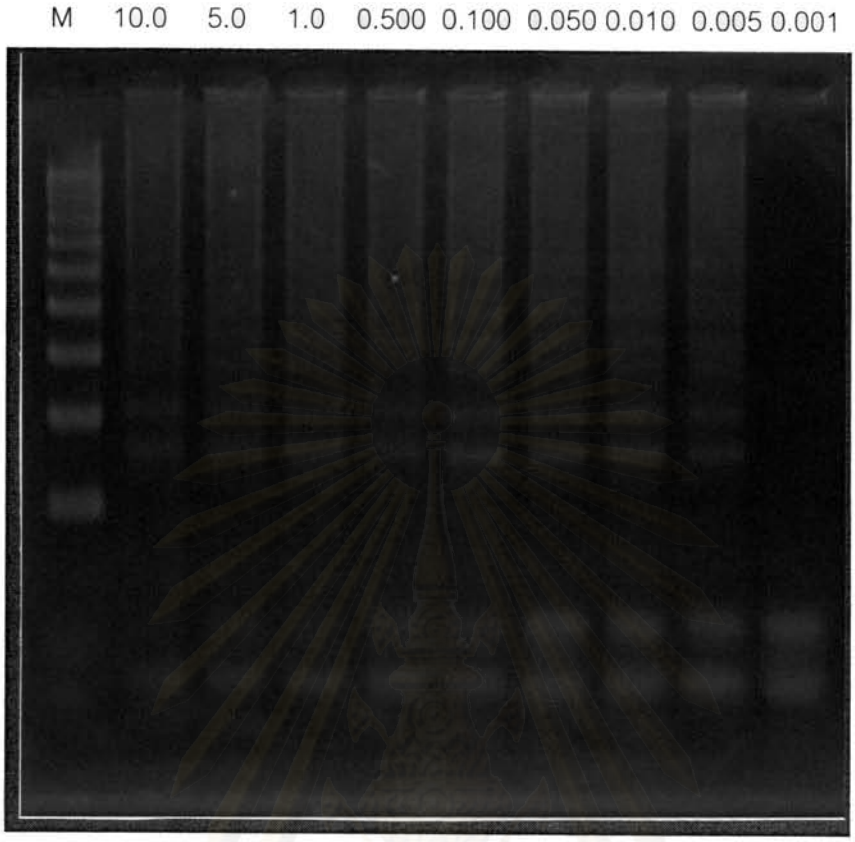


รูปที่ 17 การตรวจสอบไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตที่ความเข้มข้นต่างกัน 10 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัคหวีตด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 การตรวจสอบไวของปฏิกิริยา (sensitivity) โดยใช้ไพรเมอร์F3 B3 FIP BIP เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีที่ความเข้มข้นต่างกัน 10 ระดับ ระดับละ 10 เท่าและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟลิซิสใน 3.0% agarose ในสารละลาย

ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์

ช่อง 1-15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวสาลีด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดี่ยว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.1.3 การตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ

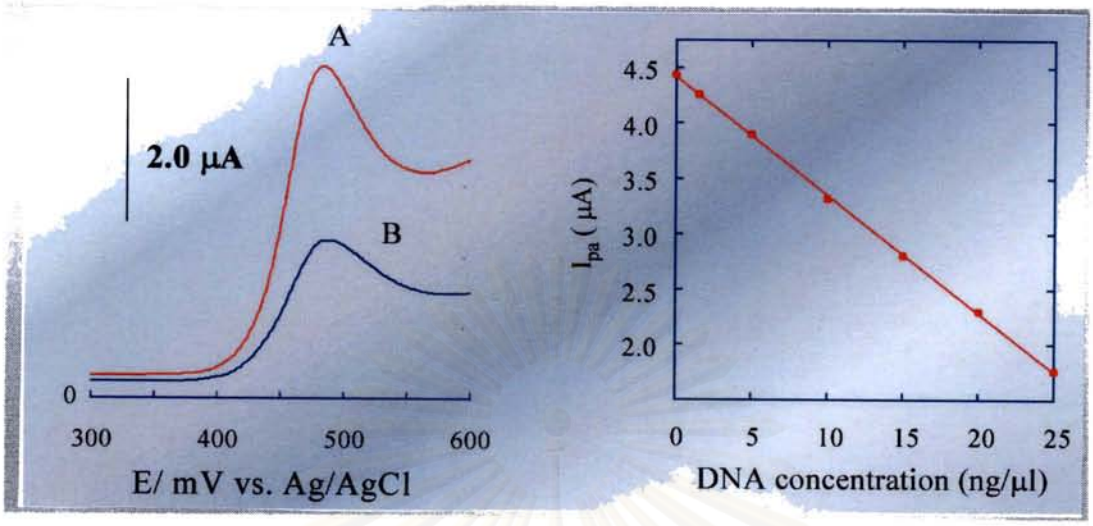
การตรวจสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยาซ้ำของระบบการตรวจสอบการปนของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และบัคหวีต โดยการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเป็นบวก 40 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เป็นลบ 10 ตัวอย่าง พบว่าสามารถระบุผลการทดลองสอดคล้องกับรูปแบบชนิดอาหาร และผลของการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดี่ยว ให้ผลการทดสอบเป็น 100% reproducibility เช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ โดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดี่ยว

คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน	ตัวอย่างบวก	ตัวอย่างลบ	ตัวอย่างทั้งหมด	ผลความเบี่ยงเบน		ความแม่นยำของการทดสอบ
Ara h1	45	5	50	45/45	5/5	100%
Lectin	45	5	50	45/45	5/5	100%
Acc1	45	5	50	45/45	5/5	100%
2S Albumin	45	5	50	45/45	5/5	100%

4.4 การตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้ด้วยไบโอเซนเซอร์

การตรวจสอบโมเลกุลบนพื้นฐานของหลักการทางไบโอเซ็นเซอร์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดี่ยว กับสาร minor groove binder Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ช่วยแปลงสัญญาณดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถตรวจสอบวัดการเปลี่ยนแปลงของอิเลคตรอนอิสระได้ สัญญาณที่เกิดจากการตรวจพบดีเอ็นเอของโมเลกุลภูมิแพ้ภายหลังเพิ่มปริมาณเมื่อจับตัวกับ Hoechst 33258 จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงค่าทางกระแสไฟฟ้ารูป anodic current peak ซึ่งเป็นค่าสูงสุดของกระแส ผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าในรูป voltammetrogram มีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอเป็นดังรูปที่ 19



จากรูปที่ 19 พบว่า กราฟการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาก ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak ต่ำ แต่ในทางกลับกันถ้าดีเอ็นเอมีน้อย ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าสูงขึ้น

จากการทดลองพบว่า ค่า anodic current peak ที่ได้ภายหลังการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค พีซีอาร์และ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว มาตรวจสอบพบว่าผลการตรวจสอบค่าการเปลี่ยนแปลงทางกระแส เมื่อวัดด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ อยู่ในช่วง 1.0 ถึง 2.13 µA ขณะที่ผลการวัดด้วยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 2.0 µA พบการลดลงมากของค่า anodic current peak สอดคล้องกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่พบ

การตรวจวัดกับพืชที่มีโมเลกุลภูมิแพ้ทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 5 ซ้ำ จะได้ค่า anodic current peak ในชุดทดลองที่ปริมาณดีเอ็นเอได้จากการเพิ่มโดยปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว ดังตารางที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลการวัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR และ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว

ชื่อยีน	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)		
		negative control	PCR	วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว
Ara h1	1A	2.11	1.33	0.89
	2A	1.91	1.41	0.82
	3A	2.12	1.30	0.96
	4A	2.00	1.29	0.88
	5A	1.96	1.33	0.97
Lectin	1B	2.05	1.04	0.55
	2B	1.98	0.99	0.50
	3B	1.89	1.10	0.52
	4B	2.21	1.01	0.50
	5B	2.00	0.94	0.60
Acc1	1C	2.02	1.19	0.74
	2C	2.00	1.00	0.67
	3C	2.12	1.21	0.82
	4C	2.00	1.19	0.77
	5C	1.95	1.11	0.79
2S albumin	1D	2.13	1.45	1.02
	2D	2.00	1.35	1.10
	3D	2.00	1.55	0.97
	4D	1.96	1.40	0.99
	5D	2.14	1.43	0.92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การตรวจสอบอาหารในท้องตลาดด้วยเงื่อนไขการทดลองที่พัฒนาขึ้น

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่แสดงฉลากระบุว่ามีส่วนประกอบของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ได้แก่ แป้งสาลี รำข้าวสาลี เส้นโซบะ ข้าวก้องถั่วเหลือง ถั่วเหลืองอบแห้ง เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง ถั่วลิสงอบกรอบ ถั่วลิสงคั่ว น้ำนมถั่วเหลือง น้ำเต้าหู้ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ดำเนินการตรวจสอบด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาตามที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์ ผลที่ได้ดังตารางที่ 12

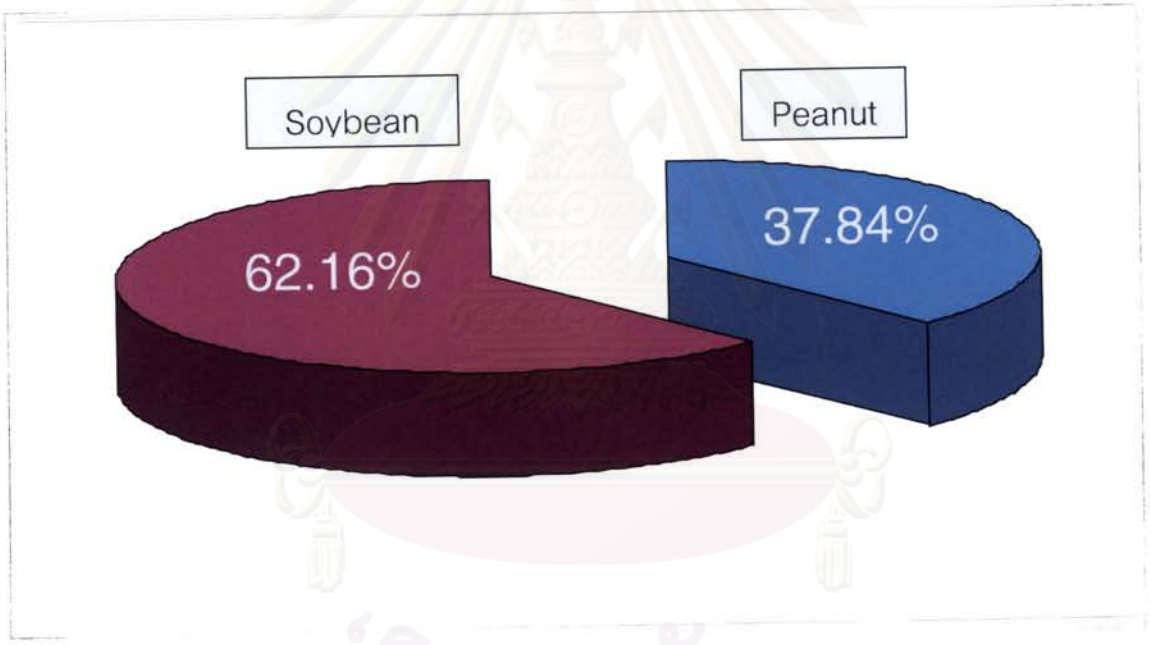
ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบอาหารจากท้องตลาดโดยใช้เทคนิค วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ชุดควบคุมลบ	ถั่วลิสง	ถั่วเหลือง	ข้าวสาลี	บัคหวีต
แป้งสาลี	1A	1.99	1.98	1.99	0.55	1.96
	2A	2.00	1.96	2.01	0.64	2.00
รำข้าวสาลี	1B	2.01	1.99	2.00	0.63	2.00
	2B	2.00	2.01	1.96	0.57	2.03
เส้นโซบะ	1C	2.00	2.02	1.97	2.01	0.76
	2C	1.97	2.00	2.01	1.99	0.75
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	2.01	2.00	0.77	2.01	2.00
	2D	1.99	2.00	0.65	2.00	1.97
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	2.01	2.01	0.53	1.99	2.01
	2E	1.98	1.96	0.69	2.00	2.00
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	2.00	1.99	0.87	1.03	2.00
	2F	2.01	2.01	0.77	0.94	2.01
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	1.99	0.68	2.01	2.00	2.00
	2G	2.00	0.50	2.00	2.00	1.96
ถั่วลิสงคั่ว	1H	2.01	0.66	2.00	2.01	1.99

	2H	1.99	0.56	1.99	1.93	2.00
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	1.98	1.98	0.79	1.99	2.00
	2I	2.01	2.00	0.66	2.01	2.02
น้ำเต้าหู้	1J	2.00	0.69	0.52	2.01	2.01
	2J	2.02	0.54	0.59	2.00	1.98

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำเต้าหู้จากตลาดสด 37 เขตทั่วกรุงเทพมหานคร เขตละ 2 ซ้ำ และดำเนินการตรวจสอบด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาตามที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์ ผลที่ได้พบว่ามีปริมาณการปนของถั่วลิสงคิดเป็น 37.84 % จากตัวอย่างทั้งหมด

ดังรูป 20



รูปที่ 20 กราฟแสดงสัดส่วนของน้ำนมถั่วเหลืองที่ตรวจพบการปนของถั่วลิสงจาก 37 เขตทั่วกรุงเทพมหานคร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบัน หลายประเทศได้ให้ความสำคัญในเรื่องการแสดงฉลากระบุวัตถุดิบที่เป็นพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ รายการที่หลักจัดอยู่ในกลุ่มที่ต้องแสดงฉลากได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง นม ไข่ ปลา ปู tree nuts ข้าวสาลี (U.S. Food and Drugs, 2001., The Commission of the European Communities, 2007.) ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง และข้าวสาลีมาใช้ในการตรวจเพราะเป็นพืชหลักที่มีปรากฏในระเบียบบังคับให้แสดงฉลากของทุกประเทศ ส่วนบัคหวีตเป็นพืชที่ระบุให้แสดงฉลากในประเทศญี่ปุ่น (Ministry of Health, 2001) เพราะเป็นส่วนประกอบของเส้นโซบะและแป้งสาลี ซึ่งใช้ประกอบอาหารหลายชนิด เช่นคุกกี้ และอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

จากรายงานการศึกษา (Hirao, 2005) ได้ดำเนินการตรวจสอบอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ โดยทำการตรวจสอบพืชในกลุ่ม *Fagopyrum* หรือบัคหวีต ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ *ITS-1* กับ *ITS-2* และ Yamakawa *et al*, (2007) ได้ใช้วิธีพีซีอาร์ตรวจสอบอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบโดยใช้ยีนที่จำเพาะต่อบริเวณ ITS-1 ของถั่วเหลือง Iida *et al*, (2005) ได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณยีน *Waxy-D1* และ Stephan, (2004) ได้ใช้วิธี real-time PCR ตรวจสอบพืชเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ *Ara h2* โดยแบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วนคือผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบมีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ โดยได้ทำการทดลองกับพืชต่างชนิดได้แก่ ข้าวไรน์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด ข้าวเจ้า งา ถั่วเขียว ฮาเซลนัต อัลมอนด์และวอลล์นัต ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่ออกให้ให้จำเพาะต่อยีน *2S Albumin*ซึ่งเกี่ยวข้องกับสารก่อภูมิแพ้ของบัคหวีต ยีน *Acc1* ของข้าวสาลี *Ara h1* ของถั่วลิสงและ *Letin* ของถั่วเหลือง ผลการทดลองที่ได้ไม่พบการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบกับพืชในกลุ่มที่ทำการทดลองเดียวกัน (cross reactivity) และไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของธัญพืชชนิดอื่น (non specific) และในส่วนของการทดสอบความไวของปฏิกิริยา ได้ผลการทดลองมีค่า LOD อยู่ที่ 0.005%

จากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการนำเอาเทคนิคไบโอเซนเซอร์มาใช้กับการตรวจหาโมเลกุลดีเอ็นเอของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้มาก่อน แต่เทคนิคไบโอเซนเซอร์ก็ไม่ใช่เทคนิคที่

พัฒนาขึ้นใหม่เนื่องจากรายงานของ Chaumpluk *et al*, (2005) ได้นำเอาการใช้เทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์มาประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบดีเอ็นเอของเนื้อวัวในอาหารสัตว์ซึ่งผลที่ได้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจให้ง่ายและรวดเร็วและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ของงานวิจัยนี้พบว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ร่วมกับวิธีการตรวจด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวนั้นสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบได้มากกว่าการประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์เพียงอย่างเดียว โดยผลการทดลองที่ได้นั้นมีระดับความจำเพาะเจาะจงและความไวของปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน แต่ต้นทุนค่าใช้จ่ายจากวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวยังมีราคาที่ต่ำกว่าวิธีพีซีอาร์ด้วย ซึ่งทำให้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบตรวจสอบอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชในภาคสนามเป็นอย่างดี

5.1 ระบบการตรวจสอบการปนของถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีตที่มีโมเลกุลภูมิแพ้ด้วยวิธีเทคนิค PCR และ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว

จากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ara h1 lectin Acc1 2S Albumin* ในถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีตตามลำดับ ผลการตรวจสอบทางทฤษฎีโดยใช้โปรแกรม blastn (Stephen *et al*, 1997) มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมายในพืชทั้ง 4 ชนิดซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในเชิงปฏิบัติ ซึ่งพบว่าในระบบการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมายโดยไม่ทำปฏิกิริยากับพืชกลุ่มอื่น (cross reaction) ไม่มีผลิตภัณฑ์ที่เป็น non-specific และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.005% ดังนั้นจึงเห็นว่าวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR นี้มีระดับความไวของปฏิกิริยาและความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบได้ในอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้ว ซึ่งต่างจากวิธี ELISA ซึ่งไม่สามารถทำได้ในอาหารแปรรูป(U. S. Food and Drug Administration, 2001) อย่างไรก็ดีเทคนิค PCR นี้ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 ชั่วโมงในการทำปฏิกิริยา ต้องใช้เครื่อง Thermocycler ซึ่งมีราคาแพงและยังต้องอาศัยห้องปฏิบัติการ จึงทำให้ไม่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบได้ในภาคสนาม (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2551) จึงได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้ของพืชทั้ง 4 ชนิด โดย วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว ที่มีผลสอดคล้องทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติเช่นเดียวกับ PCR คือไม่เกิด cross reactivity ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ non-specific และมีระดับความไวของปฏิกิริยาที่ 0.005% เช่นเดียวกัน แต่เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว นั้นได้เปรียบเทคนิค PCR ในเรื่องของประสิทธิภาพเนื่องจากเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วย

อุณหภูมิเดียว ใช้เวลาเพียง 40-60 นาที ในการทำปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยามีปริมาณมากกว่าเทคนิค PCR อยู่ถึง 10^3-10^7 เท่า และเนื่องจากเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยอุณหภูมิระนาบเดียว ที่ 63-65 องศาเซลเซียส จึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง Thermocycle ที่มีราคาแพง โดยสามารถประยุกต์ใช้ heat block ร่วมกับการหยด mineral oil

5.2 การประยุกต์ใช้ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจสอบการปนของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ทั้ง 4 ชนิด

โดยปกติการแสดงผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว จะอาศัยหลักการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) และย้อมเจลด้วย ethidium bromide เพื่อดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ซึ่งจะใช้เวลาโดยรวม 30-40 นาที ดังนั้นจึงพัฒนาวิธีการใช้ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดผล ซึ่งการตรวจสอบด้วยเซนเซอร์นั้นสามารถทำได้ทันทีหลังจากได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR หรือ วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว โดยการผสมกับ Hoechst 33258 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม DNA miner groove binder (Choi *et al*, 2004) ซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 10 วินาทีก็จะทราบผล โดยการตรวจสอบโมเลกุลภูมิแพ้จากพืชทั้ง4 ชนิดนั้นไม่สนใจในเรื่องของปริมาณ ดีเอ็นเอที่พบ แต่สนใจว่ามีการปนเปื้อนของวัตถุดิบดังกล่าวหรือไม่เท่านั้น ดังนั้นการประยุกต์ใช้ ไบโอเซนเซอร์ในการตรวจพืชที่มีโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้ดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาในการตรวจสอบ ลงเหลือเพียง 1-2 ชั่วโมง

5.3 การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว ร่วมกับไบโอเซนเซอร์ในการตรวจอาหารที่มีวัตถุดิบเป็นพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ทั้ง 4 ชนิด

จากการตรวจสอบอาหารที่ระบุว่ามีส่วนประกอบจากพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เงื่อนไขการทดลองที่สร้างขึ้น ผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน โดยสามารถตรวจพบโมเลกุลดีเอ็นเอพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นส่วนประกอบ ตรงตามฉลากที่แสดงไว้ข้างผลิตภัณฑ์ ยกเว้นกรณีของน้ำเต้าหู้ซึ่งไม่มีการแสดงฉลากระบุส่วนประกอบที่แน่ชัด ผลการตรวจพบว่ามีการตรวจพบการปนของถั่วลิสง จากการสอบถามข้อมูลจากคนขายน้ำเต้าหู้ พบว่าผู้ผลิตน้ำเต้าหู้หลายรายมีการผสมถั่วลิงสงลงไปในน้ำเต้าหู้เพื่อให้มีกลิ่นหอมและเพิ่มรสชาติให้กลมกล่อมขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง น้ำเต้าหู้จาก 37 เขตและพบว่ามีการปนของถั่วลิสง 37.84% จากตัวอย่างทั้งหมด

ด้วยเหตุนี้จึงนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียว มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการใช้ไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจสอบพืชที่มีโมเลกุลของสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งจะช่วยให้การตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและง่ายเพราะสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบลงเหลือ 30-60 นาที ก็สามารถทราบผลได้ทันทีและเครื่องมือที่ใช้สามารถเคลื่อนที่ไปได้ง่ายทำให้สามารถตรวจสอบภาคสนามได้ ซึ่งตอบสนองต่อหลักการ point of care test ได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถพัฒนาระบบการตรวจอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ด้วยวิธีพีซีอาร์ มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชเป้ามายและมี LOD ที่ 0.005% โดยใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง
2. การพัฒนาระบบการตรวจอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ที่มีแหล่งกำเนิดจากถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลีและบัคหวีต ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูปด้วยอุณหภูมิเดียวพบว่ามีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชเป้ามายและมี LOD ที่ 0.005% และใช้เวลา 60 นาที และไม่ต้องใช้เครื่อง thermocycler
3. การประยุกต์ใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ร่วมกับวิธีการตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 วิธี พบว่าสามารถลดเวลาในการแสดงผลลงได้ 30-40 นาที
4. การตรวจสอบอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชที่มีสารก่อภูมิแพ้จากท้องตลาดด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น พบว่าสามารถตรวจพบส่วนประกอบของพืชก่อภูมิแพ้ได้ตรงตามที่ระบุไว้ในฉลากข้างผลิตภัณฑ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เบญจมาศ สืบเนียม. การติดฉลากอาหารก่อภูมิแพ้.2008 [Online]. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
แหล่งที่มา :http://www.acfs.go.th/km/food_allergen_us.php [2008, June 21].

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2549. ไบโอเซนเซอร์กับการตรวจวิเคราะห์อาหารด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอ. ใน สัมมนาเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการเสริมศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหาร, หน้า1-7. หน่วยปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2551. ดีเอ็นเอกับ point of care test ในอุตสาหกรรมอาหาร. ในสัมมนาเชิงปฏิบัติการดีเอ็นเอกับ point of care test ในอุตสาหกรรมอาหาร, โครงการนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย

ชิสา วิบูลย์ชาติ., ตุ๊กตา บุญมี., ฉวีวรรณ จินดาธรรม., วราวรรณ พันธ์คง., วัชรพันธ์ จันอนุกาญจน์., นิรันดร์ เหลาพนัสสัก. Food Allergy and Food Allergen [Online]. สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย
แหล่งที่มา :http://www.fostat.org/intro.php [2008, June 21]

เอกสารวิชาการ. ถั่วเหลือง. กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่, สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. กรมพัฒนาที่ดิน, 2551.(อัดสำเนา)

ภาษาอังกฤษ

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Wheeler, D.L. GenBank:update[Online].Available from:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank 2004.

Bonjean, A.P., and W.J. Angus. a history of wheat breeding. The World Wheat Book, 1131. Paris: Lavoisier Publ., 2001

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y., and Tamiya, E. Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feedstuff. Science and Technology of Advance Materials (2006) : 263-269.

Choi, Y.S., Lee, K.S., and Park, D.H. Gene detection using Hoechst 33258 on a bioship. Current Applied Physics (2006): (6)777-780

David, T. Resolution of peanut allergy Patients have not been proved to grow out of peanut allergy. BMJ (1998) : 1317-1324.

Food Allergy and Food Allergen. สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย 2008.

Kim, J.S. Food allergy: diagnosis, treatment, prognosis, and prevention. Pediatr Allergy Immunol (2008) : 546-551.

Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., Miyamoto, F. Detection of wheat as an allergenic substance in food by a nested PCR method. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. (2008): 23-30.

Hefle, L.S., Furlong, J.T., Niemann, L., Lemon-Mule, H., Sicherer, S., and Taylor, L.S. Comsumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. American Academy of Allergy, Asthema & Immunology (2007) : 171-176.

Helm R, Cockrell G, Herman E, Burks A, Sampson H, Bannon G. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. Int Arch Allergy Immunol (2000) : 29-37.

Hirao, T., Imai, S., Sawada, H., Shiomi, N., Hachimura, S., and Kato, H. PCR Method for Detecting Trace Amounts of Buckwheat (*Fagopyrum spp*) in food. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (2005) : 724-731.

Holzhauser, T., Wangorsch, A., and Vieths, S. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of allergenic foods. Detecting allergen in foods (2000) : 125-143.

Iida, M., Yamashiro, S., Yamakawa, H., Hayakawa, K., Kuribara, H., Kodama, T., Furui, S., Akiyama, H., Maitani, T., and Hino, A. Development of Taxon-Specific Sequences of Common Wheat for the Detection of Genetically Moddified Wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2005) : 6294-6300.

Koyano, S., Takagi, K., Teshima, R., and Sawada, J. Molecular cloning of cDNA recombinant protein expression and characterization of a buckwheat 16kDA major allergen. International Archives of Allergy and Immunology (2006) : 73-81.

Lequin, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clinical Chemistry (2005): 2415-2418.

Matsuo, H., Koyano, K., and Morita, E. Molecular cloning recombinant expression and

IgE-binding epitope exercise-induce anaphylaxis. Formerly *European Journal of Biochemistry* (2005) : 4431-4438.

Meyer, R., Chardonnens, F., Hubner, P., and Luthy, J. Polmerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products . Z Lebensm Unters Forsch (1996) : 339-344.

Ministry of Health, Labour and Welfare [2007], Labelling of foods containing allergens: http;//www/mhlw.go.jp/English/topics/qa/allergies/al2/html [2007, August 13]

Murray, M. G., and Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res (1980): 4321–4325.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research (2000): e63

Olga, M.V., Koffi, K.N., and Hortense, W.D. Structure and organization of genomic clone of a major peanut allergen gene, *Ara h 1*. Molecular Immunology (2003) : 565-571.

Ohnishi, O., Matsuoka, Y. Search for the wild ancestor of buckwheat II. Taxonomy of *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on morphology, isozymes and cpDNA variability. Genes and Genetic Systems (1996): 383–390.

Poms, R.E., Klein, C.L., and Anklam, E. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Additives and Contaminants (2004) : 1-31.

Putnam, D.H., Oplinger, E.S., Teynor, T.M., Oelke, E.A., Kelling, K.A., and Doll, J.D. Peanuts. Alternative Field Crops Manaul (1991): 1-12.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor. NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

Kim, S.H., Hyun, M.K., Young, M.Y., Seung, H.K., Dong, H.N., Hae, S.P., Sang, R.R., and Bou, O.L. Evaluating the Allergic Risk of Genetically Modified Soybean. Yonsei Medical Journal (2006) : 505-512.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kleber-Janke, T., Crameri, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., Becker, W.M. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *International* Archives of *Allergy* and *Immunology*. (1999): 265-274.

Schmidt, M.A., Hymowitz, T., Joseph, L.M., and Herman, E.M. Evaluation of glycine germplasm for nulls of the immunodominant allergen P34/Gly m Bd 30K. International Archives of Allergy and Immunology (2005) : 65-72.

Stephan, O., Vieths, S. Development of a Real-time PCR and Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allernic Trace Amounts of Peanut(*Arachis hypogae*) in Processed Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2004) : 3754-3760.

Stephen, F., Altschul., Thomas, L., Madden., Alejandro, A., Schäffer., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and David J.), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. (1997): 3389-3402.

Taylor, S. The nature of food allergy. Detecting allergen in food (2000) : 2-20.

Tengel, C., Schubler, P., Setzke, E., Balles, J., and Sprenger, H.M. PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maiz in Raw and Highly Processed Foodstuffs. Product Application Focus (2001) : 426-429.

The Commission of The European Communities. Commission Directive 2007/68/EC. Official Journal of The European Union (2007) : 11-14.

U. S. Food and Drug Administration. Food Allergen Partnership.Center for Food Safety and Applied Nutrition (2001): 1-20

Vanguilder, HD., Vrana, K.E., and Freeman, W. Twenty-five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis. Biotechniques (2008) : 619-626.

Viquez, O.M., Konan, K.N., and Dodo, H.W.. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. Molecular Immunology (2003) : 565-571.

Wang, Z.H., Gao, L., Zhang, Z., Yuan, J.M., Wang, H.W., Zhang, L., and Zhu, L. Induction of apoptosis by Buckwheat Trypsin Inhibitor in Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells. Biol. Pharm. Bull (2007) : 783-786.

Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Moriyama, T., Urisu, A., and Maitani, T. Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods by the Polymerase Chain Reaction. Biosci. Biotechnol Biochem (2007) : 269-272.

Yasui, Y., Onishi, O. Phylogenetic relationships among *Fagopyrum* species revealed by the nucleotide sequences of the ITS region of the nuclear rRNA gene . Genes Genet Syst (1998) : 201-210.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารเคมี

Phenol (water Sat) (TE Sat) (Tris pH)

Distil Phenol 500 ml

8-Hydroxyquinolinol 0.6 g

DW 300 ml

Use Tris. HCl non adj. For Tris non adjust

TE

Tris.HCl pH adjusted

In equal volume

Phenol: Chloroform (Phenochor)

Phenol 1000 ml

Chloroform 960 ml

Isomyl alcohol 40ml

8-Hydroxyquinoline 2 g

β-(or 2) Mercaptoethanal 4 ml

1 M Tris.HCl non adj pH 600 ml

0.5 M EDTA Stock

EDTA 186.1 g

DW up to 800 ml

Adj pH to 8.0 (by NaOH~ 20 g)

Autoclave

TE Stock (10x TE Stock)

1 M Tris. HCl pH 8.0 (100x) 5 ml

0.5 M EDTA Stock (500x) 1 ml

DW up to 500 ml

Autoclave

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10x TE Stock

1 M Tris. HCl pH 8.0 (100x)	5 ml
0.5 M EDTA Stock (500x)	1 ml
DW up to	50 ml
Autoclave	

RNase Stock (1000x)

Ribonuclease A R5000 Type II A(pfs) SIGMA 100 mg

Add 5 ml of

10mM Tris.HCl pH 7.5

15 mM NaCl

adj. Volume to 10 ml

autoclave at 100° C, 15 min

Rnase TE

10x TE Stock 1 ml

1000x Rnase Stock 10 ไมโครลิตร

Lysozyme buffer

working

50 mM Tris. HCl pH 8.0

50 mM Sucrose (342.342. MW)

10 mM EDTA

1 M Tris.HCl pH 8.0 50 ml

Sucros 17.1 g

0.5 M EDTA Stack 20 ml

without autoclave

3 M CH_3 COOK pH 4.8 (for ALK neutralize)

CH_3 COOK (5 Mj stock)	254.4 g in 600 ml
CH_3 COOK (cd. 002-12)	115 ml
H_2O	285 ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 M CH_3 COONa pH 5.2

Sodium acetate. 3 H_2O 408.2 g/800 ml

And Adj pH to 5.2 by Acetic acid

Adj volume to 1 lite with DW

Autoclave

Ethidium bromide Stock (20 mg/ml)

EtBr 1 g stock use at :

Add DW up to 100 ml

Store in dark bottle; RTM

50x TAE

Tris	121 g
Acetic acid	28.5 ml
EDTA	9.3 g/500 ml

70เปอร์เซ็นต์ Ethanol

absolute ethanol	70 ml
DW up to	100 ml

10เปอร์เซ็นต์ SDS Stock (DNA)

SDS	10 g
DW up to	100 ml

SOB medium

Bacto trypton	2.0 g
Bacto yeast extract	0.5 g
5 M NaCl Solution	200 ไมโครลิตร
2 M KCl	125 ไมโครลิตร
add DW	99 ml

autoclave

add 2M $MgCl_2$ solution 0.5 ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SOC medium (100 ml)

SOB medium	100 ml
1 M glucose	20 ml

5 M NaCl (500 ml)

NaCl	146.1 g
H_2O to	500 ml
Autoclave	

Tris-buffer (1.0 M Tris. HCl, pH 7.5)

Tris	60.7 g
H_2O to	500 ml
Adjust pH 7.5	

LB broth (1000 ml)

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Add H_2O to	1000 ml
Adjust pH 7.5	

CTAB extraction buffer

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	4 g
1 M Tris-HCl,PH 8.0	20 ml
0.5 M EDTA	8 ml
5 M NaCl	56 ml

Adjust water up to 200 ml *** CTAB can not autoclave

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วย wizard Resin

1. นำชิ้นส่วนของตัวอย่าง 200-250 มิลลิกรัมลงในโกร่ง
2. บดให้ละเอียด แล้วใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 300 มิลลิกรัม
3. เติม extraction buffer 1 มิลลิลิตร และ guanidine HCl 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. เติม proteinase K 40 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72° C 3 ชั่วโมง
6. ตั้งทิ้งให้เย็น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที
7. ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
8. เติม wizard rasin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
9. ใส่สารละลายทั้งหมดลงใน กระบอกเข็มฉีดยาที่ต่อกับ column ให้สารละลายผ่าน column จนหมด
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 2 นาทีเพื่อขจัดของเหลวทิ้ง
11. เติม 80% propanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างcolumn 3 ครั้ง
12. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 2 นาทีเพื่อขจัดของเหลวทิ้ง
13. เติม DW ที่มีอุณหภูมิ 72 ° C 100 ไมโครลิตร ลงใน column เพื่อละลายดีเอ็นเอออกจาก column ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
14. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 2 นาที เก็บของเหลวที่ได้แล้วเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

1. เลี้ยงแบคทีเรียในขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเซลเซียส เป็นเวลานาน 12-24 ชั่วโมง
2. ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียทิ้งไป
3. ใส่สารละลาย Lysosyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์กระจายโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex)
4. เติมสารละลาย alkaline (2NaOH, 10เปอร์เซ็นต์ SDS, DW; เตรียมก่อนใช้) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
5. เติมสารละลายโปแตสเซียมอะซีเตต ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็ง 15 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดมาด้วย
7. เติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม (1:1) ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยการ vortex
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่
9. เติม propanal ลงไป 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ปิดฝาให้แน่น ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 15 นาที แล้วเท propanal ทิ้งไป ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออกมา
11. เติมเอธานอล 70เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไป
12. ทำให้ตะกอนแห้งโดยเครื่อง dry เป็นเวลา10-15 นาที สังเกตตะกอนแห้งจะใสขึ้นกว่าเดิม
13. ละลายตะกอนใน TE-Rnase buffer 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ตู้ incubate 37 องศาเซลเซียส

    เซลเซียส นาน 5 นาที และนำพลาสมิดส่วนหนึ่งไปเช็คผลด้วย gel electropheresis ที่เหลือเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเลคโทรโฟเรซิส (TAE และ TBE) 100 ไมโครลิตร
3. หลอมอะกาโรสโดยการอุ่นให้ร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาครึ่งหนึ่งของถาดรันเจล เสียบหวีลงไปในตำแหน่ง เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอและปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเลคโทรโฟเรซีส เติมบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอประมาณ 2-5 ไมโครลิตร (ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอ) ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเลคโทรฟอเรซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที
8. นำเจลมาย้อมด้วยสารเรืองแสง (เอธิเดียมโบรไมด์) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ขั้นนี้ระวังอย่าให้สารสัมผัสกับผิวหนังหรือส่วนของร่างกาย ควรสวมถุงมือ เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)
9. นำเจลมาล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำเปล่า
10. นำเจลที่ล้างเอธิเดียมโบรไมด์แล้วไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต
11. ถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องดิจิตอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงค่าเฉลี่ย anodic current ที่วัดด้วยไบโอเซนเซอร์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Negative control						
ชื่อยีน	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
Ara h1	1A	2.11	2.12	2.10	2.11	0.01
	2A	1.91	1.89	1.93	1.91	0.02
	3A	2.12	2.10	2.14	2.12	0.02
	4A	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02
	5A	1.96	1.99	1.93	1.96	0.03
Lectin	1B	2.05	2.00	2.10	2.05	0.05
	2B	1.98	1.97	1.99	1.98	0.01
	3B	1.89	1.85	1.93	1.89	0.04
	4B	2.21	2.20	2.22	2.21	0.01
	5B	2.00	2.10	1.90	2.00	0.10
Acc1	1C	2.02	2.00	1.98	2.00	0.02
	2C	2.00	2.08	1.92	2.00	0.08
	3C	2.12	2.11	2.13	2.12	0.01
	4C	2.00	1.97	2.03	2.00	0.03
	5C	1.95	1.97	1.93	1.95	0.02
2S albumin	1D	2.13	2.1	2.16	2.13	0.03
	2D	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
	3D	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02
	4D	1.96	1.96	1.96	1.96	0.00
	5D	2.14	2.13	2.15	2.14	0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PCR						
ชื่อยีน	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
Ara h1	1A	1.33	1.32	1.34	1.33	0.01
	2A	1.41	1.39	1.43	1.41	0.02
	3A	1.30	1.27	1.33	1.30	0.03
	4A	1.29	1.33	1.25	1.29	0.04
	5A	1.33	1.30	1.36	1.33	0.03
Lectin	1B	1.04	1.00	1.08	1.04	0.04
	2B	0.99	1.00	0.98	0.99	0.01
	3B	1.10	1.11	1.09	1.10	0.01
	4B	1.01	1.00	1.02	1.01	0.01
	5B	0.94	0.99	0.89	0.94	0.05
Acc1	1C	1.19	1.18	1.20	1.19	0.01
	2C	1.00	1.02	0.98	1.00	0.02
	3C	1.21	1.22	1.2	1.21	0.01
	4C	1.19	1.22	1.16	1.19	0.03
	5C	1.11	1.10	1.12	1.11	0.01
2S albumin	1D	1.45	1.48	1.42	1.45	0.03
	2D	1.35	1.30	1.40	1.35	0.05
	3D	1.55	1.55	1.55	1.55	0.00
	4D	1.40	1.49	1.31	1.40	0.09
	5D	1.43	1.42	1.44	1.43	0.01

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Loop isothermal DNA amplfication						
ชื่อยีน	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
Ara h1	1A	0.89	0.87	0.91	0.89	0.02
	2A	0.82	0.8	0.84	0.82	0.02
	3A	0.96	0.99	0.93	0.96	0.03
	4A	0.88	0.88	0.88	0.88	0.00
	5A	0.97	0.96	0.98	0.97	0.01
Lectin	1B	0.55	0.51	0.59	0.55	0.04
	2B	0.50	0.53	0.47	0.50	0.03
	3B	0.52	0.50	0.54	0.52	0.02
	4B	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00
	5B	0.60	0.56	0.64	0.60	0.04
Acc1	1C	0.74	0.70	0.78	0.74	0.04
	2C	0.67	0.68	0.66	0.67	0.01
	3C	0.82	0.80	0.84	0.82	0.02
	4C	0.77	0.70	0.84	0.77	0.07
	5C	0.79	0.81	0.77	0.79	0.02
2S albumin	1D	1.02	1.00	1.04	1.02	0.02
	2D	1.10	1.00	1.20	1.10	0.10
	3D	0.97	1.00	0.94	0.97	0.03
	4D	0.99	1.00	0.98	0.99	0.01
	5D	0.92	0.90	0.94	0.92	0.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดควบคุมลบ

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
แป้งสาลี	1A	1.99	1.97	2.01	1.99	0.02
	2A	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02
รำข้าวสาลี	1B	2.01	2.02	2.00	2.01	0.01
	2B	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00
เส้นโซบะ	1C	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
	2C	1.97	1.99	1.95	1.97	0.02
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	2.01	2.00	2.02	2.01	0.01
	2D	1.99	2.00	1.98	1.99	0.01
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	2.01	2.03	1.99	2.01	0.02
	2E	1.98	1.96	2.00	1.98	0.02
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	2.00	1.97	2.03	2.00	0.03
	2F	2.01	2.02	2.00	2.01	0.01
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	1.99	2.00	1.98	1.99	0.01
	2G	2.00	2.05	1.95	2.00	0.05
ถั่วลิสงคั่ว	1H	2.01	1.96	2.06	2.01	0.05
	2H	1.99	1.98	2.00	1.99	0.01
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	1.98	1.95	2.01	1.98	0.03
	2I	2.01	2.00	1.99	2.00	0.01
น้ำเต้าหู้	1J	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
	2J	2.02	2.00	2.04	2.02	0.02

ถั่วลิสง

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
แป้งสาลี	1A	1.98	2.00	1.96	1.98	0.02
	2A	1.96	2.02	1.90	1.96	0.06
รำข้าวสาลี	1B	1.99	1.95	2.03	1.99	0.04
	2B	2.01	2.00	2.02	2.01	0.01
เส้นโซบะ	1C	2.02	2.00	2.04	2.02	0.02
	2C	2.00	1.95	2.05	2.00	0.05
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02
	2D	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	2.01	1.97	2.05	2.01	0.04
	2E	1.96	2.00	1.92	1.96	0.04
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	1.99	1.95	2.03	1.99	0.04
	2F	2.01	2.06	1.96	2.01	0.05
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	0.68	0.65	0.71	0.68	0.03
	2G	0.50	0.49	0.51	0.50	0.01
ถั่วลิสงคั่ว	1H	0.66	0.6	0.72	0.66	0.06
	2H	0.56	0.55	0.57	0.56	0.01
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	1.98	1.96	2.00	1.98	0.02
	2I	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
น้ำเต้าหู้	1J	0.69	0.66	0.72	0.69	0.03
	2J	0.54	0.53	0.55	0.54	0.01

ถั่วเหลือง

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
แป้งสาลี	1A	1.99	1.96	2.02	1.99	0.03
	2A	2.01	2.00	2.02	2.01	0.01
รำข้าวสาลี	1B	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02
	2B	1.96	2.00	1.92	1.96	0.04
เส้นโซบะ	1C	1.97	1.98	1.99	1.98	0.01
	2C	2.01	2.00	2.02	2.01	0.01
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	0.77	0.70	0.84	0.77	0.07
	2D	0.65	0.63	0.67	0.65	0.02
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	0.53	0.50	0.56	0.53	0.03
	2E	0.69	0.67	0.71	0.69	0.02
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	0.87	0.88	0.89	0.88	0.01
	2F	0.77	0.70	0.84	0.77	0.07
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	2.01	2.00	2.02	2.01	0.01
	2G	2.00	1.96	2.04	2.00	0.04
ถั่วลิสงคั่ว	1H	2	1.98	2.02	2	0.02
	2H	1.99	1.94	2.04	1.99	0.05
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	0.79	0.77	0.81	0.79	0.02
	2I	0.66	0.60	0.72	0.66	0.06
น้ำเต้าหู้	1J	0.52	0.50	0.54	0.52	0.02
	2J	0.59	0.57	0.61	0.59	0.02

ข้าวสาลี

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
แป้งสาลี	1A	0.55	0.52	0.58	0.55	0.03
	2A	0.64	0.60	0.68	0.64	0.04
รำข้าวสาลี	1B	0.63	0.61	0.65	0.63	0.02
	2B	0.57	0.54	0.60	0.57	0.03
เส้นโซบะ	1C	2.01	2.02	2.00	2.01	0.01
	2C	1.99	2.01	1.97	1.99	0.02
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	2.01	1.98	2.04	2.01	0.03
	2D	2.00	1.90	2.10	2.00	0.10
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	1.99	2.01	1.97	1.99	0.02
	2E	2.00	1.99	2.01	2.00	0.01
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	1.03	1.00	1.06	1.03	0.03
	2F	0.94	0.90	0.98	0.94	0.04
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	2.00	2.03	1.97	2.00	0.03
	2G	2.00	1.95	2.05	2.00	0.05
ถั่วลิสงคั่ว	1H	2.01	2.08	1.94	2.01	0.07
	2H	1.93	1.86	2.00	1.93	0.07
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	1.99	1.93	2.05	1.99	0.06
	2I	2.01	1.97	2.05	2.01	0.04
น้ำเต้าหู้	1J	2.01	1.99	2.03	2.01	0.02
	2J	2.00	1.98	2.02	2.00	0.02

บัคหวีต

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ตัวอย่างที่	Anodic current peak (μA)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average	SD
แป้งสาลี	1A	1.96	1.95	1.97	1.96	0.01
	2A	2	2.02	1.98	2	0.02
รำข้าวสาลี	1B	2	2.01	1.99	2	0.01
	2B	2.03	2.06	2	2.03	0.03
เส้นโซบะ	1C	0.76	0.68	0.84	0.76	0.08
	2C	0.75	0.73	0.77	0.75	0.02
ข้าวก้องถั่วเหลือง	1D	2	2.04	1.96	2	0.04
	2D	1.97	1.97	1.97	1.97	0.00
ถั่วเหลืองอบแห้ง	1E	2.01	2.03	1.99	2.01	0.02
	2E	2	2.01	1.99	2	0.01
เครื่องดื่มธัญพืชแบบผง	1F	2	2.02	1.98	2	0.02
	2F	2.01	1.96	2.06	2.01	0.05
ถั่วลิสงอบกรอบ	1G	2	1.95	2.05	2	0.05
	2G	1.96	1.92	2	1.96	0.04
ถั่วลิสงคั่ว	1H	1.99	1.97	2.01	1.99	0.02
	2H	2	2.01	1.99	2	0.01
น้ำนมถั่วเหลือง	1I	2	2.02	1.98	2	0.02
	2I	2.02	2.05	1.99	2.02	0.03
น้ำเต้าหู้	1J	2.01	1.96	2.06	2.01	0.05
	2J	1.99	1.98	2	1.99	0.01

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวรุณ สุวรรณกิตติ เกิดวันที่ 13 สิงหาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2551

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย