บทที่ 3
วิธีทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ (Suvatti, 1976; คีรี กออนันตกุลและคณะ, 2543; สุรินทร์มัจฉาชีพ และ สมสุข มัจฉาชีพ, 2539)

หมู (*Sus scrofa)*

วัว *(Bos taurus)*

แพะ *(Capra hircus)*

แกะ *(Ovis aries)*

ไก่ *(Gallus gallus)*

กุ้ง *(Penaeus merguiensis)*

กั้ง *(Squilla sp.)*

หอยเชลล์ (*Amusium pleuronectes* (Linne))

หอยแครง *(Anadara granosa)*

หอยนางรม (*Saccostrea forskalii*)

หอยแมลงภู่ (*Perma viridis*)

หอยลาย (*Paphia undulata*)

หอยหวาน *(Paphia sp.)*

ปลาสลาด *(Notopterus notopterus)*

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ปลาแซลมอน (*Salmo mykiss*)

ปลาเก๋า *(Cromileptes altivelis)*

ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)*

ปลาทับทิม (*Oreochromic niloticus*)

ตัวอย่างอาหารแปรรูปได้แก่

ทูน่าสเต็กในน้ำมันพืช

ซุปก้อน

วุ้นเจลาตินสำเร็จรูป

บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เยลลี่เจลาติน

ช็อกโกแลต

มายองเนส

ซอสปรุงรส

แพนเค้กมิกซ์

ไอศกรีม

โยเกิร์ต

ซอสหอยนางรม

ครีมเทียม

ขนมจีบ

3.2 อุปกรณ์

โกร่งบดยา

เทอร์โมมิเตอร์ 0-100°C

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น EL-120HA, Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเหวี่ยง รุ่น Mikro 12-24, Hettich zentrifugen

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง, รุ่น GENESYS 5, Milton Roy, USA

อิเล็คโตรฟอเรซิส รุ่น J005321 บริษัท Toyobo ประเทศญี่ปุ่น

UV illuminator ประเทศไทย

Hot plate รุ่น 02313 บริษัท Boekel scientific

Automatic micropipette P10, P20, P200, P1000, Gibson

Centrifugal evaporizer รุ่น CVE-100, Eyela

Vortex รุ่น Vortex-genie II, Scientific industries, USA

Thermal cycler รุ่น Gene Cycler, Bio-Rad, USA

3.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

Sulfuric acid, Merck, Germany

Selenium reagent mixture (catalyst)

Sodium hydroxide, Merck, Germany

Hydrochloric acid, Merck, Germany

Petroleum ether, Merck, Germany

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

Ammonium persulfate, USB, American International Plc., England

Bromophenol blue, Merck, Germany

Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), Merck, Germany

Chloroform, Merck, Germany

Ethanol, absolute, Merck, Germany

Ethidium bromide, Merck, Germany

Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), Fluka Chemica, Biochemica, Switzerland

Formaldehyde, Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy

Formamide, Merck, Germany

8-Hydroxy-quinoline (8-hydroxy-1-azanopthalene), Sigma Chemical Company, USA

Iso-amyl alcohol, Merck, Germany

Isopropanol, Merch, Germany

β-Mercaptoethanol, Sigma Chemical Company, USA

Mineral oil, Aldrich Chemical Company, Inc., Germany

Methyl alcohol, Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy

N,N'-Methylene-bis-acrylamide, USB, American International Plc., England

Nitric acid, Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italy

Phenol, Merck, Germany

Silver nitrate, BDH Laboratory, England

Sodium chloride, BDH Chemicals Ltd., England

Sodium acetate, Merck, Germany

Tris-Hydroxymethy-aminomethane, Serva, Feinbiochemica GmbH&Co., France

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), USB American International Co., England

Urea, Merck, Germany

ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy plant mini kit, Qiagen

Proteinase K, Merck, Germany

Rnase, Merck, Germany

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

dNTP (100mM), Promega Co., USA

Magnesium chloride (25 mM), Promega Co., USA

Taq DNA polymerase (5 U/μl), Promega Co., USA.

10X *Taq* DNA polymerase storage buffer, Promega Co., USA

ไพรเมอร์ (ลำดับเบส 5'→ 3')

ไพรเมอร์จากยีน Z98771

TAACCAGGACATTGCCGTGTAC

AACCTTATAGACAGCTAAAAGG

ไพรเมอร์จากยีน Z98802

CACGTGCGAGAGCCTCAAGGACACC

GGCCACGGCCTCCATGGCCTTTCGCAC

ไพรเมอร์จากยีน Z9813

CTATTGATACAATATGGTGCAGGC

CATTCATGATATTCCATCACTGAGG

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

ตรวจสอบข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหาร (ความชื้น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต) เพื่อจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยตรวจสอบจากหนังสือตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530) จากนั้นเลือกตัวอย่างอาหารมากลุ่มละ 2-3 ชนิดเพื่อมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ตามวิธี AOAC (1984) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับข้อมูลที่ได้ในตอนต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับตัวอย่างอาหารแต่ละชนิด

ใช้ตัวอย่างอาหารจากเนื้ออาหาร (food matrices) ที่ต่างกัน 4 กลุ่ม ได้แก่ เนื้อสุกร, อาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 25, อาหารที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าร้อยละ 50 และอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงกว่าร้อยละ 30

3.4.2.1 ทดลองสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารทั้ง 3 กลุ่มโดยวิธีต่าง ๆ ได้แก่

1) วิธีสกัดดีเอ็นเอมาตรฐาน (Sambrook *et al.*, 1989)

ชั่งตัวอย่าง 300 มิลลิกรัม (หรือ 300 มิลลิลิตร) ในหลอด จากนั้นเติมเอ็นไซม์ Proteinase K 20 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์สำหรับสกัด DNA (NaCl, EDTA, SDS) 600 ไมโครลิตร บดตัวอย่างในหลอดให้เซลล์แตก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวใสชั้นบน ตกตะกอนโปรตีนโมเลกุลใหญ่ด้วยฟีนอล 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงแล้วเก็บของเหลวใสชั้นบนมาตกตะกอนโปรตีนโมเลกุลเล็กโดยทำให้เสียสภาพด้วย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ (อัตราส่วน 25:24:1) ปริมาตรเท่ากับของเหลว หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 5 นาที โปรตีนจะแยกออกจากสารละลาย DNA โดยตกตะกอนอยู่ระหว่างชั้นฟีนอลคลอโรฟอร์มและสารละลาย DNA จากนั้นกำจัดฟีนอลที่เหลืออยู่ด้วย คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1) เก็บของเหลวใสชั้นบน แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล-โซเดียมอะซีเตต ที่ –20 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที ถึง 1 ชั่วโมง (ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอ) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-15 นาที เก็บตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% อบตะกอนให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที ละลายตะกอนใน TE 30 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2) วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB (Sambrook *et al.*, 1989)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างตามวิธีพื้นฐานของประเทศเยอรมัน

<u>ขั้นที่ 1</u>

ชั่งตัวอย่าง 300 มิลลิกรัม (หรือ 300 มิลลิลิตร) ใส่ในโฮโมจิไนเซอร์เติมบัฟเฟอร์ CTAB (50 mM CTAB, 10 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) 600 ไมโครลิตร บดรวมกันแล้วดูดของเหลวใส่ในหลอด นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกำจัดฟีนอลที่เหลืออยู่ด้วย คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ (24:1) เก็บของเหลวใสชั้นบน ตกตะกอน nucleic acid ที่อุณหภูมิห้องด้วยไอโซโพรพานอลปริมาตรเท่า

กับของเหลวในหลอด ทิ้งให้ตกตะกอนประมาณ 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวออก เก็บตะกอนไว้ นำมาล้างด้วยเอธานอล 70% หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอธานอลออก แล้วนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที ละลายตะกอนใน TE 30 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2

ย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ RNase 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดด้วยบัฟเฟอร์ CTAB 200 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที เก็บของเหลวชั้นบน ตกตะกอน DNA ด้วยไอโซโพรพานอล 200 ไมโครลิตร จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ละลายตะกอน DNA ที่ได้ใน TE 30 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3) **วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วย Urea** (Shure, Wessler, and Fedoroff,1983)

ชั่งตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม (หรือ 100 ไมโครลิตร) ในหลอด เติมบัฟเฟอร์สกัด (7 M Urea, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% sarkosyl) 500 ไมโครลิตร ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร และทรายเล็กน้อย บดให้เซลล์แตก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที เก็บของเหลวใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล-โซเดียมอะซีเตต ที่ –20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-15 นาที เก็บตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% อบตะกอนให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (หรือละลายตะกอนใน TE 30 ไมโครลิตร ก่อนเก็บ)

4) **วิธีสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ kit สำเร็จรูป** (DNeasy Plant mini kit, QIAGEN™)

ชั่งตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม (หรือ 100 ไมโครลิตร) ในหลอด บดจนเป็นผง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ AP1 400 ไมโครลิตร และเอนไซม์ RNase A stock 4 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมบัฟเฟอร์ AP2 130 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นใส่ใน QIA shredder column หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายสารละลายทั้งหมดใส่หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AP3 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และเอธานอล 99.5% เท่ากับปริมาตรของสารละลาย ผสมให้เข้ากันเบา ๆ จากนั้นนำทั้งมาใส่ใน Spin column หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์มาใส่ในหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที แยกของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออก หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 2 นาที เพื่อให้คอลัมน์

แห้ง แล้วจึงนำคอลัมน์มาใส่หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น 65 องศาเซลเซียส 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.4.2.2 **วัดปริมาณและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละวิธี**

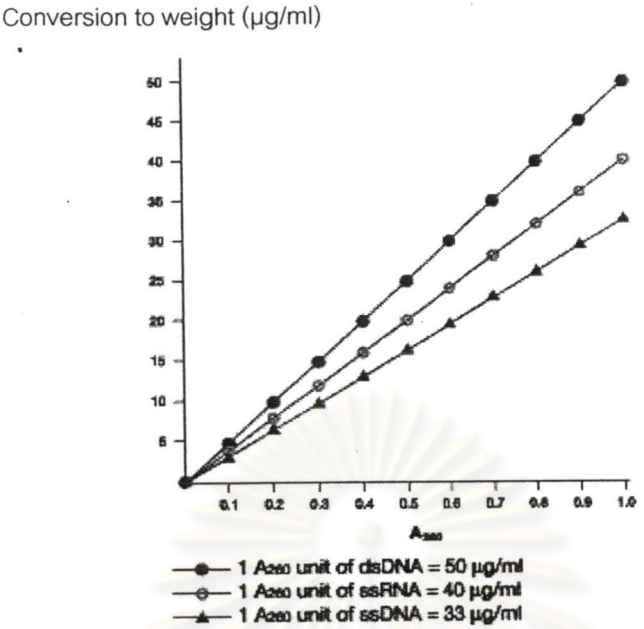
นำ DNA ที่สกัดได้ทั้งหมดมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณที่สกัดได้ โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

1) **วัดค่าการดูดกลืนแสง**

นำ DNA ที่ละลายใน TE มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 400 เท่า แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260, 280 และ 320 นาโนเมตร ตามลำดับ จากนั้นคำนวณอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตรเพื่อทำนายการปนเปื้อนของโปรตีน ซึ่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ควรจะมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.6-1.8 ถ้าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล แต่ถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA และคำนวณปริมาณและความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกจาก (Davis, Kuehl, and Battey, 1994)

$$\text{ความเข้มข้น DNA } (\mu g/\mu l) = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm} \times \text{dilution factor (ในที่นี้คือ 400)}}{20}$$

ความเข้มข้นของ DNA เทียบจาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm มีค่าเป็น 1 แสดงว่ามี double-strand DNA เข้มข้น 50 µg/ml (รูปที่ 3) ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 nm แสดงการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต, เปปไทด์, ฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติก และที่ 320 nm เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารปนเปื้อน เช่น คาร์โบไฮเดรต ในตัวอย่างบริสุทธิ์มีค่านี้เป็นศูนย์ (Sambrook *et al.*, 1989)



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของ DNA

(ที่มา : http://www.brinkmann.com/support_practical-spectro.asp)

2) Gel electrophoresis (8% Urea-PAGE) (Sambrook *et al.*, 1989)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วย Urea-PAGE โดยนำ DNA ที่สกัดได้จาก 4 วิธีมาแยกขนาดโดยเทคนิค Gel electrophoresis บน 8% Urea-PAGE (Acrylamide8%T 5%C) แล้วตรวจสอบผลด้วยการย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วยเทคนิค silver stain (Berry and Samuel, 1982; De Moreno, Smith, and Smith, 1985) โดยนำแผ่นเจลมา fix ในสารละลาย 40% Methanol 10 นาที สารละลาย 160 mM HNO_3 5 นาที น้ำกลั่น 5 นาที ย้อมด้วย 12 mM $AgNO_3$ 20 นาที และทำปฏิกริยาให้โลหะอยู่ในรูปผลึกที่มองเห็นได้ด้วย developer solution (280 mM Na_2CO_3, 40% formaldehyde) หยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (100 mM Citric acid) และล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 5 นาที

3) ทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากผลการยับยั้งเอ็นไซม์โพลีเมอเรสผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณโดยใช้ปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 4วิธีด้วยปฏิกิริยาPCR โดยใช้ พลาสมิด pBIC 35 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับ 35S promoter ของ pBIC 35 ในการทำปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบโดยใช้สารละลายดีเอ็นเอจากตัวอย่างและพลาสมิด อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา 20ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 2mM $MgCl_2$, 100 µM each of dNTP, 10 pmole primers และ 1 U *Taq* DNA polymerase โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Denature	94°C	1 นาที
Annealing	55°C	2 นาที
Extension	73°C	3 วินาที

จากนั้นวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 2% agarose gel ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูผลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.4.3 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบสุกรจากดีเอ็นเอเชิงคุณภาพ

3.4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์โดยการสืบค้นลำดับเบสของสุกรที่ไม่ซ้ำและไม่เหมือนกับลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตชนิดใด จาก DNA databank โดยตรวจสอบ homology ของ DNA สุกรเปรียบเทียบกับสัตว์อื่น ๆ ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แล้วจะนำไปทำ BLAST search จากนั้นสกัด DNA จากเนื้อสุกรและเนื้อสัตว์ชนิดอื่น 15-20 ชนิด โดยวิธีมาตรฐาน แล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เพื่อตรวจสอบผล

3.4.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยา PCR แต่ละปฏิกิริยามีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน แต่ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ปริมาณ Mg^{2+} และ annealing temperature ในขั้นตอนนี้จึงปรับปัจจัยทั้งสองประการ เพื่อให้ได้ผลิตผล PCR มากที่สุดและจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน

3.4.3.2.1 Annealing temperature แปรอุณหภูมิเป็น 4 ค่าคือ 40, 43, 45 และ 47°C

3.4.3.2.2 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ แปรเป็น 5 ระดับคือ 0, 0.42, 0.83, 1.25, 1.66 และ 2.08 mM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3.3 **ทดสอบ sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น**

3.4.3.3.1 ปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ โดยเจือจาง DNA จากสุกรที่สกัดได้เป็น 4 ระดับ คือ 5, 10, 100 และ 1,000 เท่า ของความเข้มข้นเริ่มต้นที่คำนวณได้ในข้อ 3.4.2.2

3.4.3.3.2 ปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรน้อยที่สุดที่ตรวจสอบได้ในตัวอย่างเนื้อผสมหลาย ๆ ชนิด โดยแปรปริมาณสุกรในตัวอย่างเป็น 6 ระดับคือ 0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 5.0 และ 10.0%

3.4.3.3.3 spike DNA สุกรลงในตัวอย่างอาหาร 10-15 ชนิด แล้วตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิคข้างต้น

3.4.4 สำรวจและทดสอบอาหารที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสุกรที่วางจำหน่ายในท้องตลาด เป็นจำนวนไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างอาหารในท้องตลาดที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสุกร เช่น ขนมจีบ ลูกชิ้นปลา ลูกชิ้นกุ้ง โยเกิร์ต แป้งเค้กผสมเสร็จ ทอดมัน มันฝรั่งทอดกรอบ เป็นต้น ตรวจสอบองค์ประกอบในตัวอย่างจากฉลากหรือวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น แล้วจัดเข้ากลุ่มอาหาร 4 กลุ่มที่จัดไว้ในข้อ 3.4.1 สกัด DNA ด้วยวิธีที่เหมาะสมของอาหารแต่ละกลุ่มจากการศึกษาในข้อ 3.4.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นในข้อ 3.4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย