สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนเพื่อการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

# DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF RAW MEAT SPECIES IN MEAT PRODUCTS

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์

TAPANA KHEMMANIPITPON

TN.
ร312ก
2551

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....87867
วัน,เดือน,ปี.....19...มี.ค...2552

b.....120 ฉบับ
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2551

KMITL-2008-AG-M-031-024

# DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF RAW MEAT SPECIES IN MEAT PRODUCTS

TAPANA KHEMMANIPITPON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADGRABANG

2008

KMITL-2008-AG-M-031-024

COPYRIGHT 2008

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADGRABANG

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนเพื่อการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ |
| **นักศึกษา** | นายฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ |
| **รหัสประจำตัว** | 48065407 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | สัตวศาสตร์ |
| **พ.ศ.** | 2551 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** | รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล |

# บทคัดย่อ


การแยกสปีชีส์สัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นสิ่งสำคัญในการตรวจสอบการปลอมปน และปกป้องผู้บริโภคจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ระบุ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนสำหรับจำแนกสปีชีส์สัตว์ในตัวอย่างเนื้อผสม และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สัตว์สี่สปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ โค กระบือ สุกร และไก่ โดยทำการผสมตัวอย่างเนื้อสองชนิดที่ระดับ $10^{-4}$-$10^{2}$ เปอร์เซ็นต์ในน้ำหนักรวม 100 กรัม และสามชนิดตัวอย่างละ 30 กรัม โดยนำตัวอย่างเนื้อผสมไปผ่านความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส 20 นาที 116 องศาเซลเซียส 30 นาที และ116 องศาเซลเซียส 60 นาที และทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จากห้างสรรพสินค้าจำนวน 31 ตัวอย่าง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 12S ribosomal RNA (rRNA) โดยไพรเมอร์เส้น forward ออกแบบจากบริเวณที่ทั้งสี่สปีชีส์มีลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือนกัน ส่วนเส้น reverse ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์ ได้ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 180 280 420 และ670 คู่เบส สำหรับ โค ไก่ กระบือ และสุกรตามลำดับ ทำการแยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า ความไวในการตรวจจับดีเอ็นเอพบที่ระดับ 0.1 นาโนกรัม ของดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ ความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อสัตว์ผสมจะลดลงเมื่อตัวอย่างเนื้อผสมผ่านความร้อน และกระบวนการปรุงสุกที่นานขึ้น ในการทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า พบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จำนวน 20 ตัวอย่าง จาก 31 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ระบุไว้บนฉลากสินค้า เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนที่ออกแบบในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้โดยสามารถจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์สี่ชนิดได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Development of Multiplex PCR Technique for Identification of Raw Meat Species in Meat Products |
| **Student** | Mr.Tapana Khemmanipitpon |
| **Student ID.** | 48065407 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Animal Science |
| **Year** | 2008 |
| **Thesis Advisor** | Dr. Kanya Jirajaroenrat |
| **Thesis Co-advisor** | Assoc. Prof. Dr. Jutarat Sethakul |

# ABSTRACT

Identification of animal species in meat products is important to detect adulteration and to preserve the consumers from the presence of doubtful raw materials. The purpose of this study is to develop the multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of the animal species in mixed meat samples and meat products. The animal species of interest include bovine, buffalo, porcine and chicken. Two-type or three-type meat samples were mixed to make 100 gram with gradient ratios from 0.0001 to 100%. The samples were heat at 82°C for 20 min, at 116°C for 30 min and at 116°C for 60 min. Thirty-one meat products were purchased from supermarket. The multiplex PCR was performed using a forward primer designed on a conserved DNA sequence of mitochondrial 12S ribosomal RNA gene (rRNA) and 4 species specific reverse primers designed to the four animal species. The length of expected amplicons is 180, 280, 420 and 670 bp for bovine, chicken, buffalo and porcine, respectively. The different sizes of the amplicons separated by agarose gel electrophoresis allowed clear species identification. Detection limit of the DNA sample were 0.1 ng for all species. Sensitivity of the PCR detection decreased responding to heat treatment and cooking longevity. For the analysis of commercial meat products, the result showed 20 out of 31 samples were mislabelled. The multiplex PCR method developed in this study is useful for routine analysis of meat species identification. By this method the four meats could be identified at the same time.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และคณาจารย์ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่างๆ และให้กำลังใจในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับคุณแม่อาภรณ์ และคุณพ่อสมศักดิ์ ที่ให้การสนับสนุนเป็นกำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ต่อไป

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....VIII
สารบัญภาพ.....IX
รายการคำย่อ.....XI
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....2
1.3 สถานที่ดำเนินการ.....2
1.4 ขั้นตอนการศึกษา.....2
1.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 เนื้อสัตว์.....4
2.1.1 เนื้อแดง.....4
2.1.2 เนื้อสัตว์ปีก.....4
2.1.3 เนื้อสัตว์น้ำ.....4
2.1.4 เนื้อสัตว์ป่า.....4
2.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์.....4
2.2.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนาดเดิม.....5
2.2.2 การลดขนาด.....5
2.3 ผลของความร้อนในขบวนการแปรรูปต่อคุณภาพดีเอ็นเอและโปรตีน.....6
2.3.1 ดีเอ็นเอ.....6
2.3.2 โปรตีน.....6
2.4 ยีนที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์.....7

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


2.4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอ.....7

2.4.2 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ.....10

2.5 เทคนิคการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์.....13

2.5.1 เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีน.....13

2.5.2 เทคนิคการจับดีเอ็นเอด้วยโพรบที่จำเพาะ.....14

2.5.3 เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....14

2.6 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....15

2.6.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....15

2.6.2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....15

2.6.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....16

2.6.4 จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....20

2.6.5 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต.....20

2.7 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกสปีชีส์.....21

2.7.1 PCR-RAPD.....21

2.7.2 PCR-RFLP.....21

2.7.3 Species specific PCR.....23

2.7.4 Sequencing.....25

2.7.5 Quantitative PCR หรือ Real-time PCR.....26

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....28

3.1 ตัวอย่างทดลอง.....28

3.1.1 ตัวอย่างเลือดสัตว์.....28

3.1.2 ตัวอย่างเนื้อสัตว์.....28

3.1.3 การให้ความร้อนแก่ตัวอย่างเนื้อสัตว์.....28

3.1.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.....28

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์.....30

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์.....30

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์.....30
3.2.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์.....30
3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.....31
3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.31
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.31
3.3.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.....31
3.4 การเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....32
3.5 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย gel eletrophoresis.....33
3.5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....33
3.5.2 สารเคมี.....33
3.5.3 วิธีการเตรียม 1 % อะกาโรสเจล.....34
3.5.4 การรันเจลวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis.....34
3.6 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์.....34
3.7 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยลูกโซ่พีซีอาร์.....34

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....35
4.1 การออกแบบไพรเมอร์.....35
4.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์.....36
4.3 การทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอ.....37
4.3.1 ดีเอ็นเอสุกร.....37
4.3.2 ดีเอ็นเอกระบือ.....37
4.3.3 ดีเอ็นเอไก่.....38
4.3.4 ดีเอ็นเอโค.....38
4.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบผสมที่สัดส่วนต่างๆ.....39
4.4.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่.....39
4.4.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค.....40
4.4.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ.....40
4.5 การทดสอบการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อผสมที่ผ่านความร้อนสภาวะต่างๆ.....41
4.5.1 อุณหภูมิ 82 °C 20 นาที.....41

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.2 อุณหภูมิ 116 °C 30 นาที....43
4.5.3 อุณหภูมิ 116 °C 60 นาที....45
4.6 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ....47
4.6.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือ....47
4.6.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อไก่....48
4.7 การวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป....48

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง....53
5.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์....53
5.2 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอ....54
5.3 การทดสอบการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบและเนื้อผสมที่ผ่านความร้อนสภาวะต่างๆ....54
5.4 การวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป....56

บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ....57
6.1 สรุปผลการทดลอง....57
6.2 ข้อเสนอแนะ....58

บรรณานุกรม....59

ภาคผนวก ก การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 12SrRNA ของสัตว์....65
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี....69
ภาคผนวก ค ขบวนการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูป....71

ประวัติผู้เขียน....77

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นกับจำนวนรอบที่ควรใช้ในการทำพีซีอาร์.....20

3.1 สัดส่วนในการผสมเนื้อสัตว์.....29

4.1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบยีน 12S rRNA.....35

4.1 ผลการวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.....50

ข1 ส่วนประกอบของ Buffer A .....69

ข2 ส่วนประกอบของ Buffer B .....69

ข3 ส่วนประกอบของ 10XTBE buffer.....70

ข4 ส่วนประกอบของ 6X Loading buffer.....70

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในเซลล์สัตว์ .....10
2.2 ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction).....17
3.1 ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ.....33
4.1 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ .....36
4.2 ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอสุกร.....37
4.3 ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอกระบือ.....37
4.4 ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอไก่.....38
4.5 ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอโค .....38
4.6 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบสุกรผสมไก่.....39
4.7 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบสุกรผสมโค.....40
4.8 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบโคผสมกระบือ.....40
4.9 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82 °C 20 นาที เนื้อสุกรผสมไก่.....41
4.10 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82 °C 20 นาที เนื้อสุกรผสมโค.....42
4.11 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82 °C 20 นาที เนื้อโคผสมกระบือ.....42
4.12 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 30 นาที เนื้อสุกรผสมไก่.....43
4.13 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 30 นาที เนื้อสุกรผสมโค.....44
4.14 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 30 นาที เนื้อโคผสมกระบือ.....44
4.15 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 60 นาที เนื้อสุกรผสมไก่.....45
4.16 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 60 นาที เนื้อสุกรผสม.....46

# สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.17 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116 °C 60 นาที เนื้อโคผสมกระบือ.....46

4.18 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิดได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือ.....47

4.19 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิดได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อไก่.....48

4.20 ผลการวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป.....49

ง1.1 การเตรียมเนื้อบดและเครื่องเทศ.....72

ง1.2 การผสมเครื่องเทศก่อนสับผสม.....72

ง1.3 การสับผสมและการผสมเครื่องเทศด้วยมือ.....73

ง1.4 การบรรจุเนื้อบดลงเครื่องและการอัดไส้กรอก.....73

ง1.5 ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหลังขึ้นรูป.....73

ง2.1 บดเนื้อและเครื่องเทศที่อุณหภูมิเนื้อไม่เกิน 10°C.....74

ง2.2 บรรจุเนื้อที่ทำการบดผสมแล้วในเครื่องขึ้นรูป.....75

ง2.3 ต้มลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 60 และ 80°C.....75

ง3.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ซาลามี่.....76

# รายการคำย่อ

| | |
|---|---|
| bp | (base pair) คู่เบส |
| CE | Conventional Eletrophoresis |
| Cyt *b* | Cytochrome b gene |
| D-loop | displacement loop |
| DNA | (Deoxyribonucleic acid) กรดนิวคลีอิกชนิดหนึ่ง มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็นเกลียวคู่คล้ายบันไดเวียน เป็นสารพันธุกรรมมีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| g | (gram) กรัม |
| IEF | Isoelectric Focusing |
| kg | (kilogram) กิโลกรัม |
| M | (Molar) โมล่าร์ |
| mM | (millimolar) มิลลิโมล่าร์ |
| mg | (milligram) มิลลิกรัม |
| ml | (millilitre) มิลลิลิตร |
| mt DNA | Mitochondrial DNA |
| ng | (nanogram) นาโนกรัม |
| nt | (nucleotide) หน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วยเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ น้ำตาลที่มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 5 อะตอม และหมู่ฟอสเฟตอีกหนึ่งหมู่ |
| PCR | (Polymerase Chain Reaction) ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ |
| rpm | (revolutions per minute) รอบต่อนาที |
| rRNA | (Ribosomal RNA) อาร์เอ็นเอชนิดหนึ่ง เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไรโบโซม |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| % | (percent) เปอร์เซ็นต์ |
| µl | (microlitre) ไมโครลิตร |
| µg | (microgram) ไมโครกรัม |
| µM | (micromolar) ไมโครโมล่าร์ |
| °C | (degree Celsius) องศาเซลเซียส |
| °F | องศาฟาเรนไฮต์ ฟาเรนไฮต์ คือชนิดสเกลค่าวัดอุณหภูมิชนิดหนึ่ง โดยที่ค่าสเกลฟาเรนไฮต์นี้ มีจุดเยือกแข็งอยู่ที่ 32 องศา โดยปกติจะเขียนว่า 32°F และมีจุดเดือดที่ 212 องศา |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การบริโภคอาหารเป็นปัจจัยหลักในการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นอาหารที่ทำมาจากพืชหรือเนื้อสัตว์ล้วนแล้วแต่มีความสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์ต้องบริโภคอาหารประเภทเนื้อสัตว์เพื่อต้องการโปรตีน และสารอาหารต่างๆ ไปใช้ในการเจริญเติบโต และเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกาย อาหารจำพวกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่ผลิตมาจาก เนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อไก่ และเนื้อกระบือ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเหล่านั้นไม่มีการระบุส่วนประกอบของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ไว้บนฉลากสินค้าหรือมีการระบุเอาไว้แต่ไม่ตรงตามวัตถุดิบที่นำมาใช้ทั้งที่เจตนา และไม่ได้เจตนา ผู้บริโภคจะไม่สามารถทราบได้ว่าผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ซื้อมานั้นมีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ตามที่ระบุจริงหรือไม่โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอก และรสชาติของผลิตภัณฑ์

ในการรับรองมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจะมีเพียงการตรวจสอบชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่นำมาผลิตในขั้นตอนก่อนการผลิต และระหว่างกระบวนการผลิตภายในโรงงานเท่านั้น แต่ยังไม่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่พร้อมออกจากโรงงานเพื่อการจำหน่าย ดังนั้นถ้าเราสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้ว่ามีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ชนิดใดประกอบอยู่บ้างก็จะเป็นการยืนยันในมาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเพิ่มมากขึ้น วิธีที่มีความไว และใช้เวลาน้อยในการตรวจคือการตรวจในระดับดีเอ็นเอ โดยการตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์ ซึ่งเป็นวิธีที่แม่นยำเพราะดีเอ็นเอมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าโปรตีนเมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปวิธีต่างๆ (Momcilovic and Avraham. 2000) โดยวิธีที่นำมาศึกษาคือเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อน (Multiplex PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของสัตว์หลายชนิดที่ผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยสามารถจำแนกดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อออกแบบชุดไพรเมอร์เชิงซ้อนสำหรับการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์

1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อน

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนในการจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์

1.2.4 เพื่อจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ในเนื้อสัตว์ผสมก่อนปรุงสุก หลังปรุงสุก และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

## 1.3 สถานที่ดำเนินการ

1.3.1 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 1.4 ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ขั้นตอน

1.4.1 ศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการออกแบบชุดไพรเมอร์ในการจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์

1.4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ

1.4.2.1 อุณหภูมิในการทำงานของชุดไพรเมอร์

1.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการจำแนกดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ

1.4.3.1 ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่ชุดไพรเมอร์สามารถตรวจจับได้

1.4.4 ศึกษาความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ

1.4.4.1 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ผสมก่อนปรุงสุก และหลังปรุงสุก

1.4.4.2 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

## 1.5 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ใช้เวลาในการดำเนินการวิจัย และสรุปผลเป็นระยะเวลา 12 เดือน

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ชุดไพรเมอร์เชิงซ้อนสำหรับจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ซึ่งสามารถแยกดีเอ็นเอของสัตว์สี่สปีชีส์คือ สุกร โค กระบือ และไก่ ได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว

1.6.2 ทราบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนในการจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ ว่ามีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์ โดยสัตว์แต่ละสปีชีส์ไม่จับข้ามสปีชีส์ซึ่งกันและกัน และความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอต่ำสุดว่าสามารถตรวจจับได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่าใด

1.6.3 ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อนจำแนกชนิดของวัตถุดิบเนื้อสัตว์ในเนื้อสัตว์ผสมก่อนปรุงสุก หลังปรุงสุก และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้งานในห้องปฏิบัติการได้จริงทันที

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ หมายถึง เนื้อเยื่อจากสัตว์ซึ่งสามารถนำมาบริโภคเป็นอาหารได้ รวมถึงผลิตภัณฑ์หรือการแปรรูปในรูปแบบต่างๆ ที่ใช้เนื้อเยื่อเหล่านี้ เนื้อเยื่อจากสัตว์เกือบทุกชนิดจึงอยู่ในความหมายนี้ โดยส่วนใหญ่มนุษย์ได้เนื้อจากสัตว์เลี้ยงรวมทั้งสัตว์น้ำ ดังนั้นเพื่อให้การแบ่งแยกเนื้อสัตว์เห็นได้ชัด จึงแบ่งเป็น 4 ประเภทคือ

**2.1.1 เนื้อแดง (red meat)** หมายถึง เนื้อเยื่อที่ได้จากโค กระบือ สุกร แพะ แกะ ม้า ลา อูฐ และกระต่าย จัดเป็นแหล่งที่ให้เนื้อส่วนใหญ่ที่สุดแต่ก็จำกัดการบริโภคในแต่ละประเทศ

**2.1.2 เนื้อสัตว์ปีก (poultry meat)** หมายถึง เนื้อเยื่อจากสัตว์ปีกที่มนุษย์เลี้ยงไว้ ได้แก่ ไก่ เป็ด ห่าน ไก่งวง เป็นต้น

**2.1.3 เนื้อสัตว์น้ำ (sea foods)** หมายถึง เนื้อเยื่อที่ได้จากสัตว์ที่อาศัยในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ ปลา นอกจากนี้ยังรวมถึง กุ้ง ปู หอย และสัตว์น้ำอื่นๆ

**2.1.4 เนื้อสัตว์ป่า (game meat)** หมายถึง เนื้อจากสัตว์ป่าทุกชนิดที่มนุษย์ล่าขึ้นมาเพื่อการบริโภค และเกมกีฬา

องค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อสัตว์ คือ ปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และวิตามิน ทั้งหมดนี้พบว่าในเนื้อสัตว์มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากที่สุด ซึ่งมีประมาณ 70-80% ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ มีอัตราส่วนหรือสัดส่วนลดลงตามลำดับซึ่งปริมาณขององค์ประกอบนี้แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ ชนิดของสัตว์ อายุ ชนิดของกล้ามเนื้อแต่ละส่วน เพศ ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม อาหาร และลักษณะของเนื้อ (สัญชัย จตุรสิทธา. 2547)

## 2.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

สัญชัย จตุรสิทธา. (2547) กล่าวว่า เนื้อแปรรูป (processed meat) หมายถึง เนื้อที่คุณสมบัติเดิมของเนื้อสดได้ถูกแปรเปลี่ยนไปโดยการใช้วิธีการใดวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีร่วมกัน ได้แก่ การบด การสับละเอียด (chopping) การเติมเพิ่มรส (seasoning) การแปลงสี และการใช้ความร้อน เป็นต้น สามารถจัดกลุ่มเนื้อแปรรูปได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ผลิตภัณฑ์ลดขนาด (comminuted products) และผลิตภัณฑ์ขนาดเดิม (noncomminuted products)

**2.2.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนาดเดิม (noncomminuted products)** ได้แก่ แฮม เบคอน แคนนาเดียนเบคอน และคอร์นบีฟ ซึ่งจะเห็นได้ว่า โครงสร้างสุดท้ายของเนื้อจะยังคงรูป และมีโครงสร้างเหมือนเนื้อสดธรรมดา ส่วนที่แตกต่างกันคือการเติมส่วนประกอบอื่นๆ แล้วทำให้สุกตามกรรมวิธีของผลิตภัณฑ์นั้นๆ

**2.2.2 การลดขนาด (comminution)** หมายถึง การที่ขนาดชิ้นส่วนของเนื้อสด ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการทำผลิตภัณฑ์เนื้อสดถูกลดขนาดให้เล็กย่อยลงกว่าเดิม เพื่อว่าผลิตภัณฑ์นั้นๆ จะประกอบกันขึ้นมาจากเนื้อชิ้นเล็กๆ รวมตัวกันเป็นรูปร่างอีกแบบหนึ่งตามธรรมชาติของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ได้แก่ไส้กรอกชนิดต่างๆ (sausage) สามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามลักษณะโครงสร้างภายในและการลดขนาดชิ้นส่วนของเนื้อ ได้แก่ กลุ่มบดละเอียดอิมัลชัน (emulsion) และกลุ่มบดหยาบ (coarse ground)

หน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ กองส่งเสริมการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้แบ่งชนิดของผลิตภัณฑ์เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. ผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนรูปร่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อิมัลชัน (emulsion) ได้แก่ ไส้กรอกชนิดต่างๆ เนื้อสด โดยวัตถุดิบในการทำต้องมีการสับละเอียดและปั่นนวดผสมเข้ากันกับน้ำและไขมัน ถ้าเป็นผลิตภัณฑ์จากปลาควรมีอุณหภูมิต่ำกว่า 1°C อิมัลชันเป็นการที่น้ำและไขมันรวมตัวเป็นอณูเล็ก (fat droplet) โดยเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant ที่เป็นสาร polar) หรือที่เรียกว่า Emulsifying agent ลักษณะของ emulsion ที่ดีต้องมีเนื้อนุ่มและเหนียว อุณหภูมิที่ดีในการสับผสม ประมาณ 14°C ถ้าสูงกว่า 15°C โปรตีนจะถูกทำลาย (protein denature) ไม่อุ้มรับไขมัน texture ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะร่วนยุ่ย
2. ผลิตภัณฑ์ที่ไม่เปลี่ยนรูปร่าง ได้แก่ ham และ cooked ham วัตถุดิบเนื้อจะใช้เนื้อทั้งก้อน โดยฉีดน้ำเกลือและเครื่องปรุงเข้าไป แล้วนวดก้อนเนื้ออัด block ต้มให้สุก การนวดจะทำให้โปรตีนที่ละลายออกมาในน้ำแทรกในผิวก้อนเนื้อแต่ละก้อน
3. Bacon และ Back bacon โดย bacon ทำจากเนื้อสุกรบริเวณ belly และ back bacon ทำจากเนื้อสุกรล้วนบริเวณเนื้อสันนอก (Longissimus dorsi) เป็น raw product ที่ฉีดน้ำเกลือ และนำไป chilling 24 ชั่วโมง
4. Fermented product ได้แก่ ผลิตภัณฑ์แหนม หรือ ซาลามี่ เนื้อหมักของต่างประเทศ หมักให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid) โดยเติมวัตถุดิบแหล่งคาร์โบไฮเดรตเพื่อเป็นอาหารให้จุลินทรีย์และเปลี่ยนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก (ภาคผนวก ค)

## 2.3 ผลของความร้อนในขบวนการแปรรูปต่อคุณภาพดีเอ็นเอและโปรตีน

### 2.3.1 ดีเอ็นเอ

Momcilovic and Avraham. (2000) กล่าวว่า ความร้อนมีผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ 2 ส่วนดังนี้

2.3.1.1 ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่กลายเป็นสายเดี่ยว โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ โดยอุณหภูมิในการแยกอยู่ที่ 60-100°C ขึ้นอยู่กับ เปอร์เซ็นต์ GC ความยาว และโครงสร้างของดีเอ็นเอนั้นๆ

2.3.1.2 อุณหภูมิและความดันที่สูงไปทำลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้ดีเอ็นเอแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ

Arslan *et al.* (2005) ทดสอบผลของความร้อนจากขบวนการปรุงอาหารต่อดีเอ็นเอของเนื้อโคด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยมีผลผลิตขนาด 271 คู่เบส ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอได้จากเนื้อที่ผ่านขบวนการต่างๆดังต่อไปนี้ ต้มที่อุณหภูมิ 97.5°C 230 นาที นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (1.07 bar) 120°C 90 นาที ย่างที่อุณหภูมิ 200°C 150 นาที ทอดที่อุณหภูมิ 173°C 45 นาที แต่ไม่สามารถตรวจจับดีเอ็นเอจากการทอดที่อุณหภูมิ 190°C 80 นาที เนื่องจากเนื้อไหม้เกรียมจนแห้งทำให้ดีเอ็นเอแตกหักไปมากจนไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ได้

### 2.3.2 โปรตีน

เมื่อค่อยๆให้ความร้อนแก่โปรตีน โครงสร้างของโปรตีนจะค่อยๆ คลายออก (unfold) ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละโปรตีน และมักมีค่าต่ำกว่า 100°C (สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ 2547)

Momcilovic and Avraham. (2000) กล่าวว่า ความร้อนมีผลต่อโครงสร้างโปรตีน 4 ส่วนดังนี้

2.3.2.1 ความร้อนไปทำลายพันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างแบบทุติยภูมิ และตติยภูมิทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไป

2.3.2.2 ความร้อนและความดันสูงทำให้พันธะโคเวเลนต์ระหว่างกรดอะมิโนแตกออกโปรตีนย่อยเป็นสายโพลีเปปไทด์สายสั้นๆ

2.3.2.3 พันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนถูกทำลายด้วยสารกลุ่มไทออล (thiol group) ทำให้เกิดความเสียหายของสายโพลิเปปไทด์ของโปรตีน

2.3.2.4 เกิด Maillard reaction โดย อมรรัตน์ จงสวัสดิ์วรกุล (2545) กล่าวว่า Maillard reaction (MR) เป็นปรากฏการณ์ทางเคมีที่ทำให้เกิด nonenzymatic browning โดยที่ reducing sugar เช่น glucose หรือ fructose ทำปฏิกิริยากับ amino acid และเกิดสารประกอบ glucose-amine

compound ที่มีคุณสมบัติเป็นสารสีน้ำตาล ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตอาหารซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพทางโภชนาการ ซึ่งทำให้สูญเสียสารอาหารบางชนิดไปและอาจทำให้เกิดกลิ่นหรือรสชาติเปลี่ยนไป สิ่งที่สำคัญมากคือทำให้สูญเสียน้ำตาล และกรดอะมิโนในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

นอกจากความร้อนยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้ เช่น สภาพความเป็นกรด-เบส ซึ่งจะเปลี่ยนสภาพการแตกตัวของหมู่โซ่ข้างของกรดอะมิโน ส่งผลให้การกระจายของประจุบนโปรตีนและพันธะไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไป สารซักฟอก (detergen) บางชนิดสามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้ โดยใช้ส่วนที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกเข้าทำปฏิสัมพันธ์กับส่วนไฮโดรโฟบิกของโปรตีน และทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้ในที่สุด สารประเภทเคโอโทรพิก (chaotropic agent) เช่น ยูเรีย (urea) และไอออนกวานิดิเนียม (guanidinium ion) ช่วยทำให้สารไม่มีขั้วละลายในน้ำได้ดีขึ้น จึงสามารถทำลายโครงสร้างธรรมชาติของโปรตีน และมักใช้เป็นสารช่วยละลายโปรตีนในการทดลองบางประเภท (สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ 2547)

## 2.4 ยีนที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์

### 2.4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอ

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. (2545) กล่าวว่าจีโนมของยูคาริโอทประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะ ซึ่งพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม เรียกว่า single copy หรือ unique sequence ดีเอ็นเอในส่วนนี้โดยแท้จริงอาจมีมากกว่า 1 ชุดก็ได้ แต่มีจำนวนไม่มากนัก (low copy) และดีเอ็นเออีกส่วนหนึ่งที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะ ซึ่งพบส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือนหรือคล้ายคลึงกันได้หลายซ้ำ โดยในบางชุดอาจพบได้ถึง 1 ล้านซ้ำ เรียกว่า repetitive DNA หรือ repeated sequence ดีเอ็นเอส่วนที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะและตำแหน่งของการกระจายตัว

2.4.1.1 กลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม (Localized repeated sequence) ดีเอ็นเอในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นชุดที่มีจำนวนซ้ำสูงมากและชุดซ้ำแต่ละซ้ำเรียงต่อกันอยู่ในทิศทางเดียวกันตลอด (tandemly repeat) ปริมาณดีเอ็นเอกลุ่มนี้ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีมากกว่า 50% ของดีเอ็นเอในจีโนม ดีเอ็นเอกลุ่มนี้ได้แก่

1) แซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ (satellite DNA) พบครั้งแรกจากการนำดีเอ็นเอของยูคาริโอทมาปั่นเหวี่ยงโดย cesium chloride density gradient centrifugation พบว่าได้แถบดีเอ็นเอหลักอยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งและได้แถบดีเอ็นเออีกหนึ่งหรือ 2-3 แถบที่ชัดเจนแยกออกจากแถบหลัก จึงเรียกว่าแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ตำแหน่งของแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมักอยู่ที่เดียวกับเฮเทอโรโครมาติน และพบอยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์และเทโลเมียร์ แต่ก็มาบางส่วนที่พบอยู่บริเวณส่วนกลางของโครโมโซม แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์มีลำดับเบสค่อนข้างเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด ส่วนที่อยู่ที่บริเวณอื่นจะแตกต่างกันไป มีขนาดประมาณ 20-200 คู่เบส โดยอาจพบชุดซ้ำยาวต่อกันถึงหนึ่งแสนคู่เบส ในคนพบว่ามีแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออย่างน้อย 10 แบบ แต่ละแบบมี

ประมาณ 0.5-1.0% ของดีเอ็นเอในจีโนมโดย Verkaar *et al.* (2001) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคและกระบือ โดยออกแบบไพรเมอร์จากแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยสามารถแยกเนื้อโคออกจากเนื้อกระบือได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ นอกจากนั้นยังสามารถแยกโค taurine cattle (*Bos Taurus*), zebu (*Bos indicus*), banteng (*Bos javanicus*), gaur and gayal (*Bos gaurua*), yak (*Bos grunniens*), bison (*Bison bison*), wisent (*Bison bonasus*) ออกจากกันได้

2) มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (minisatellite DNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีหลายชุดซ้ำขนาดสั้นกว่าแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ขนาดของแต่ละชุดยาวประมาณ 15-100 คู่เบส ในจีโนมของคนพบมินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณเทโลเมียร์ (telomere) หรือใกล้ๆกับเทโลเมียร์และพบกระจายอยู่ทุกโครโมโซม จำนวนชุดซ้ำที่พบแตกต่างกันมาก เรียกว่า variable number of tandem repeat (VNTR) ซึ่งเป็นที่มาในการใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในคนและสิ่งมีชีวิตอื่นโดยวิธีไฮบริไดเซชันโดย Ma and Lambert. (1997) ใช้มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในการแยกนก black robin และ tomtit ออกจากกันเนื่องจากนกสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก โดยสามารถแยกนกทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ต่อมา Miller *et al.* (2003) ใช้มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในการตรวจหาวงศ์ตระกูลและบรรพบุรุษของนกแก้ว kakapo (*Strigops habroptilus*) จากการทดลองพบว่า kakapo มีอัตราการผสมเลือดชิดที่สูงมาก

3) ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบลำดับเบส $(dA.dT)_n$ มากถึงประมาณ 0.3% ของดีเอ็นเอในจีโนม ชุดซ้ำ 2 คู่เบส (dinucleotide) ก็พบมาก เช่น ในคนพบ $(dCA.dTG)_n$ มากถึงประมาณ 0.5% ของดีเอ็นเอในจีโนม ที่พบมากรองลงมาคือ ชุดซ้ำ $(dCT.dAG)_n$ พบทุกๆ 50 กิโลเบสโดยประมาณ รวมกันแล้วมีมากถึงประมาณ 0.2% ของดีเอ็นเอในจีโนม ชุดซ้ำที่เป็น 3 หรือ 4 คู่เบสก็พบได้เช่นเดียวกันแต่พบได้น้อยกว่า เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ปัจจุบันใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอกันมากในการศึกษาแผนที่ของจีโนมและแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยที่ผ่านมาได้มีการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโค (Ciampolini *et al.* 1995, Moazami-Goudarzi *et al.* 1997, Martin-Burriel *et al.* 1999, Kim *et al.* 2002, Maudet *et al.* 2002, Mateus *et al.* 2004, Cervini *et al.* 2006, Armstrong *et al.* 2006, Brenneman *et al.* 2007) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแมว (Menotti-Raymond *et al.* 1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุนัข (Zajc and Sampson. 1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้า (Shiue *et al.* 1999) และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกวาง (Poetsch *et al.* 2000)

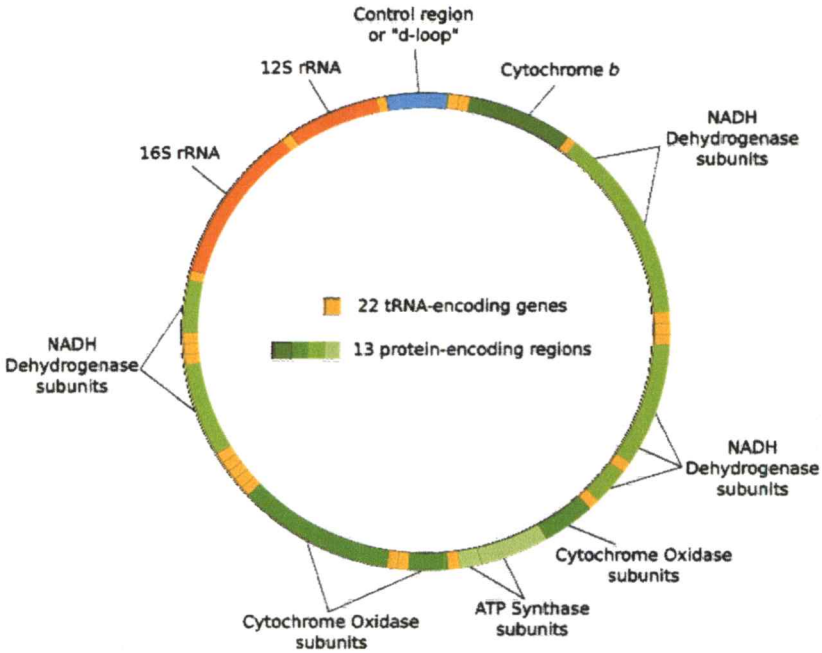
ในประเทศไทย กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ โคขาวลำพูน โคลาน โคอีสาน และโคชน ซึ่งเลี้ยงในสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์ของกรมปศุสัตว์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 30 โลไซ จากผลการศึกษาพบว่า โคขาวลำพูนแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด และโคอีสานแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด เนื่องจากแผนการผสมพันธุ์และวัตถุประสงค์การคัดเลือกพันธุ์ โคที่มีความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือโคชนและโคลาน

2.4.1.2 กลุ่มที่กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (Dispersed repeated sequence) ดีเอ็นเอกลุ่มนี้มีจำนวนซ้ำมากและพบกระจายอยู่ทั่วไป อาจจะอยู่ในส่วนของอินทรอน (intron) อยู่ใกล้กับยีนอยู่ระหว่างยีนหรืออยู่ใกล้ในส่วนที่ไม่ใช่ยีนก็ได้ ดีเอ็นเอกลุ่มนี้มีลักษณะเคลื่อนที่ได้ (transposable element) โดยมีการสร้างโมเลกุลใหม่และเคลื่อนที่ไปอยู่บนตำแหน่งอื่นบนโครโมโซม

1) เบสซ้ำกระจายแบบสั้น (short inspread repeats) เป็นเบสซ้ำกระจายแบบสั้น มีขนาดประมาณ 130-300 เบส พบอยู่ในจีโนมในลักษณะที่อยู่เดี่ยวๆ แต่มีหลายพันชุดในจีโนม SINEs ในสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันประมาณ 80% แต่ในสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์กันจะเหมือนกันประมาณ 50% ตัวอย่างของ SINEs ที่รู้จักและมีการศึกษาอย่างกว้างขวางได้แก่ เบสซ้ำในกลุ่มอะลู (Alu family) ซึ่งมีหน่วยซ้ำขนาดประมาณ 300 เบส ภายในบริเวณซ้ำจะมีลำดับจำเพาะของเอนไซม์ *Alu*I ในแต่ละคนจะมีเบสซ้ำในกลุ่มอะลูที่คล้ายกันแต่ไม่เหมือนกัน โดยเฉลี่ยคนเราจะมีลำดับเบสแกนของเบสซ้ำในกลุ่มอะลูต่างกันประมาณ 14% โดยความแตกต่างที่พบมักเกิดจากการแทนที่ของเบสเพียงตัวเดียว (Single base substitution) (วิชัย บุญแสง และคณะ 2545) โดย Calvo *et al.* (2001) ทำการหาปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุว่าทำจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร พบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.005% ในเนื้อสุกรผสมเนื้อโคที่ผ่านความร้อน 120°C 30 นาที และพบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อบด (pates) และแฮมเบอร์เกอร์ Tajima *et al.* (2002) ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยฐานข้อมูลของท่อนยีนซ้ำท่อนสั้น (SINE) ที่จำเพาะต่อสัตว์เคี้ยวเอื้องและสุกร พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงและสามารถใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง และสุกร ได้ที่ระดับ 0.01%

2) เบสซ้ำกระจายแบบยาว (long inspread repeats) เป็นเบสซ้ำกระจายแบบยาว (LINEs) มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป พบประมาณ 1-2% ในจีโนม ตัวอย่างได้แก่ เบสซ้ำในกลุ่มแอลวัน (L1) หรือเบสซ้ำในกลุ่มเคพีเอนวัน (*Kpn*I family) ซึ่งมีขนาด 7 กิโลเบส และพบกระจายอยู่กว่า 5,000 แห่งในจีโนมมนุษย์ (วิชัย บุญแสง และคณะ 2545) โดย Tajima *et al.* (2002) ทำการออกแบบไพรเมอร์จากฐานข้อมูลของท่อนยีนซ้ำท่อนยาว (LINEs) ที่จำเพาะต่อไก่ พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงและสามารถใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบจากไก่ได้ที่ระดับ 0.01%

2.4.1.3 Actin gene ยูคาริโอตทุกสปีชีส์ต้องมี actin เป็นองค์ประกอบ (Altman. 1998) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี actin อยู่ด้วยกัน 3 class คือ alpha beta และgamma ประมาณได้ว่าใน Actin gene มีนิวคลิโอไทด์อยู่สามบริเวณคือ 100 นิวคลีโอไทด์เป็น5'UTR ตามด้วยส่วนที่แปรรหัสเป็นโปรตีนอีกประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์และส่วนท้ายอีก 200 นิวคลีโอไทด์เป็น 3'UTR (Garner. 2007) โดยเราสามารถหาความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้จาก actin gene (Altman. 1998) โดย Bellis *et al.* (2003) ได้ใช้ actin gene ในการแยกสปีชีส์สัตว์โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีน beta actin เพื่อนำไปใช้ในการแยกสปีชีส์สัตว์ 10 ชนิด ได้แก่ แพะ โค แกะ เสือ ม้า แมว ไก่ สุนัข สุกร และมนุษย์ พบว่าได้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์จากดีเอ็นเอสุกรที่ 248 คู่เบส ในขณะที่อีก 9 ชนิดได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 289 คู่เบสเท่ากันทั้งหมด




**ภาพที่ 2.1** ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในเซลล์สัตว์ (Mitochondrial DNA. 2008)

### 2.4.2 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียแตกต่างกัน เช่นดีเอ็นเอสัตว์มีขนาดเล็กเฉลี่ยความยาวตั้งแต่ประมาณ 15,000-20,000 คู่เบส ส่วนคนมีประมาณ 16,596 คู่เบส ส่วนใหญ่ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลม (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียนี้สามารถใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอในกรณีที่ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ถูกย่อยสลายไปเกือบหมดจนไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสมาตรวจได้ เพราะในหนึ่งเซลล์จะมีไมโทคอนเดรียที่มีดีเอ็นเออยู่

มากมายหลายพันชุดขณะที่ในนิวเคลียสของเซลล์จะมีดีเอ็นเออยู่เพียง 2 ชุด (วิชัย บุญแสง และคณะ 2545) ซึ่งบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์ได้แก่

2.4.2.1 Ribosomal RNA (rRNA) ไรโบโซมของยูคาริโอตมีขนาด 80S (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ $4.5x10^6$ ดาลตัน) ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 60S ที่มีโปรตีนประมาณ 49 ชนิด กับ rRNA ขนาด 28S, 5.8S และ5S ส่วนหน่วยย่อยขนาดเล็ก 40S มีประมาณ 33 โปรตีนกับ rRNA ขนาด 18S (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) อาร์เอ็นเอไรโบโซมถูกถอดรหัสจากโครโมโซมเป็นสายรหัสอาร์เอ็นเอไรโบโซมขั้นต้น และถูกตัดแบ่งภายในนิวคลีโอลัส (nucleolus) ของนิวเคลียส จนได้เป็นอาร์เอ็นเอไรโบโซมที่สมบูรณ์ (สุกัญญา สุนทรส. 2547) โดยส่วนที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์คือ 12S rRNA และ 16S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะและความหลากหลายสูง โดย Meyer *et al.* (2002) ทำการแยกเนื้อ สุกร โค แพะ แกะ ไก่ ไก่งวง และลิง ในอาหาร โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ 12S rRNA ขณะที่ Bellagamba *et al.* (2003) ออกแบบไพรเมอร์จากยีนส่วน 12S rRNA ของ โค แกะ แพะ สุกร และไก่ เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่นำมาประกอบเป็นวัตถุดิบในอาหารปลาหลังการทำไร้เชื้อที่ 130°C เวลา 40 นาที ความไวของการตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ที่ 0.125 ถึง 0.5% อย่างไรก็ตามเมื่อนำไพรเมอร์มารวมกันในปฏิกิริยาเดียว ขนาดชิ้นส่วนของพีซีอาร์ที่ได้ไม่สามารถจำแนกดีเอ็นเอของโค แกะ และแพะออกจากกันได้ Bottero *et al.* (2003) ได้ออกแบบไพรเมอร์จากยีนส่วน 16S rRNA ที่จำเพาะต่อ โค สุกร แพะ แกะ ม้า กระต่าย ไก่ ปลาเทราท์ และปลาซาดีน โดยสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อและเลือดสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 134.4 ถึง 141.9°C และความดันที่ 3.03 ถึง 4.03 บาร์ เป็นเวลา 24 นาทีได้ Rodriguez *et al.* (2004) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 12S rRNA ของสุกร โค แกะ และแพะ โดยได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด จากการทดลองพบว่า ความสามารถในการตรวจจับอยู่ที่ 1% ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่ผสมอยู่ Rodriguez *et al.* (2005) ทำการแยกเนื้อสุกรออกจากเนื้อผสม โดยผสมเนื้อสุกรในเนื้อโค 3 ระดับ คือ 0.5, 1, 5% น้ำหนักรวม 100 g นำไปผ่านความร้อน 121°C 20 นาที โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ 12S rRNA ของสุกร แล้วตรวจหาดีเอ็นเอด้วย TaqMan probe พบว่าสามารถแยกเนื้อสุกร 0.5 – 5% ที่ผสมในเนื้อโคได้

2.4.2.2 D-loop หรือ displacement loop ลำดับเบสภายใน D-loop มีความจำเพาะและมีความหลากหลายสูง มักใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Larizza. 2002) โดยหากเป็นสัตว์ที่สืบเชื้อสายมาจากสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับเบสบริเวณ D-loop ตรงกัน ในทางตรงกันข้ามหากไม่ใช่เชื้อสายเดียวกันลำดับเบสบริเวณ D-loop จะต่างกัน Murray *et al* (1995) ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีนจากส่วน D-loop โดยสามารถแยกสปีชีส์สัตว์ได้ 15 สปีชีส์ Montiel-Sosa *et al.* (2000) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน D-loop ของสุกร โดยสามารถ

## 2.5 เทคนิคการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์

### 2.5.1 เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีน

2.5.1.1 Immunological methods อาศัยการจับกันแบบจำเพาะของ antibody และ antigen วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถแยกโปรตีนจำนวนน้อยระดับ ng/ml แต่ไม่สามารถใช้กับเนื้อที่ผ่านความร้อนได้ เพราะความร้อนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในโปรตีน ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 วิธีย่อยดังนี้

1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้เทคนิคการติดฉลาก antigen ด้วยเอนไซม์ (antigen – enzyme conjugated) หรือการติดฉลาก antibody ด้วยเอนไซม์ (antibody – enzyme conjugated) เป็นสารทำปฏิกิริยา ตัวอย่าง Sandwich ELISA (direct methods ) เคลือบ solid phase ด้วย antibody เติม antigen ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในปริมาณคงที่พร้อมกับ antigen มาตรฐานหรือในตัวอย่างตรวจ ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาในภาวะที่เหมาะสม จะเกิดปฏิกิริยาของ antigen ที่ติดฉลาก และไม่ติดฉลากแย่งจับกับ antibody บน solid phase จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมซับเสตรท วัดผลการเปลี่ยนแปลงของซับเสตรท (กฤษณา จรรยาพูน 2548) โดยสามารถแยกเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 5 species ( โค แกะ ม้า กวาง และสุกร ) ที่ให้ความร้อน 100°C 15 นาที แต่ไม่สามารถแยก ไก่ ไก่งวง เป็ด ทั้งเนื้อสุกและดิบที่ระดับ 0.5% ได้ (Hsieh *et al.* 1998)

2) Biosensors อาศัยหลักการจับของ receptor ของโมเลกุล (antibody) และtoxin หรือ protein จำเพาะ โดยสามารถวิเคราะห์อาหารทั่วไปได้แต่ไม่สามารถวิเคราะห์อาหารสัตว์ได้ โดยสามารถตรวจได้ในระดับ 10 ng/ml โดยขึ้นกับ antigen หรือ antibody ที่ใช้ วิธีนี้ค่อนข้างแพง และตรวจได้ครั้งละหนึ่งตัวอย่างเท่านั้นจึงไม่นิยม (Momcilovic and Avraham. 2000)

2.5.1.2 Electrophoretic method เป็นการแยกโมเลกุลโดยอาศัยกระแสไฟฟ้า โดยสามารถแบ่งเป็น 3 วิธีย่อยดังนี้

1) sodium dodecyl sulfate-polyacryl–amide gel electrophoresis (SDS–PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีน และหามวลโมเลกุลของโปรตีน SDS เป็นสารซักฟอกแอนไอออนนิก (an ionic detergent ) ที่มีประจุลบสามารถจับกับสาย polypeptide ด้วยอัตราส่วนคงที่ คือ SDS 1.4 g/สายโซ่พอลิเพปไทด์ 1 g SDS – polypeptide complex นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเพปไทด์เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาว ทำให้การเคลื่อนที่ของสายโซ่พอลิเพปไทด์ขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายโซ่ พอลิเพปไทด์ และจากการย้อมสี ทำให้ทราบจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายโซ่พอลิเพปไทด์ใน native protein (อาภัสสรา ชมิดท์ 2537) โดย SDS–PAGE สามารถแยก species จากเนื้อดิบ และสุก (60 และ 85°C) ได้ (Piñeiro *et al.* 1999)

2) Conventional Eletrophoresis (CE) ใช้ Capillay tube พร้อมกับ กระแสไฟฟ้าสูง ในการแยก species จาก protein ในเนื้อแต่ไม่สามารถแยกเนื้อที่ผ่านความร้อนได้ แต่สามารถแยกหลายตัวอย่างที่รวมกันพร้อมกันได้

3) Western immunoblotting เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัย SDS–PAGE โดย antigen จะถูกส่งผ่านไปยังเยื่อ membrane ที่มี antibody อยู่ ส่วนใหญ่ใช้ในการวิเคราะห์อาหารและ toxin จากแบคทีเรีย

4) Isoelectric Focusing (IEF) เป็น Electrophoretic protein method อีกวิธีหนึ่ง แต่ใช้อย่างกว้างขวางในการแยก species ของปลา แต่ก็สามารถแยก Myoglobin ในเนื้อโคได้ในระดับ 0.01 mg/ml

จากข้อจำกัดต่างๆของโครงสร้างของโปรตีนเมื่อผ่านความร้อนทำให้การตรวจวิเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการปรุงสุกไม่ให้ผลการตรวจที่ดีนัก เนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีน (Momcilovic and Avraham. 2000) ปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอแทนเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่มีความแม่นยำ และความไวในการตรวจตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (Meyer and Candrian. 1996)

**2.5.2 เทคนิคการจับดีเอ็นเอด้วยโพรบที่จำเพาะ (Hybridrization)**

การจำแนกชนิดของสัตว์โดยใช้เทคนิคการจับดีเอ็นเอด้วยโพรบที่จำเพาะ ได้มีการพัฒนาเป็น Dot-bot hybridization โดย Chikuni *et al.* (1990) ซึ่งเป็นโพรบที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของ ไก่ สุกร แกะ แพะ และโค การตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ผสมในอาหารหลังผ่านการทำให้สุกที่ 80 100 และ120°C เป็นเวลา 30 นาที เทคนิคนี้สามารถตรวจการปลอมปนของเนื้อสัตว์อื่นที่ระดับต่ำสุดถึง 0.1 mg ต่อมา Hunt *et al.* (1997) ใช้เทคนิค Slot – blot hybridization แยกเนื้อผสมของ กระต่าย แกะ สุกร โค และแพะ ด้วย oligonucleotide probe โดยสามารถแยกเนื้อผสมดิบ สุกและอาหารสัตว์กระป๋องในปริมาณน้อยกว่า 2.5% อย่างไรก็ตามจากการทดลองข้างต้นพบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาข้ามสปีชีส์ เนื่องจากจีโนมของสัตว์แต่ละสปีชีส์มีความใกล้เคียงกันมาก นอกจากนั้นการจับด้วยโพรบยังต้องอาศัยขั้นตอน หลายขั้นตอน ต้องมีการปรับสภาวะที่เหมาะสมของการจับของโพรบ อาจต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีเพื่อเพิ่มความไวของการอ่านผล และใช้เวลานานในการทดสอบ วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมและไม่มีการพัฒนาต่อถึงขั้นการนำไปใช้งาน

**2.5.3 เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์(Polymerase Chain Reaction)**

การเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อยให้มีจำนวนมากในเวลาอันสั้น เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยส่วนของดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวน คือ ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบมากถึง 2,500

โมเลกุลในเซลล์ (Momcilovic and Avraham. 2000) นอกจากนี้เทคนิคพีซีอาร์ยังสามารถใช้ตรวจสอบยีนอื่นๆที่พบมากในเซลล์ เช่น ยีนซ้ำแบบท่อนสั้น (short interspersed repetitive element, SINE) และยีนซ้ำแบบท่อนยาว (long interspersed repetitive element, LINE) ซึ่งพบมากถึง 120,000 ซ้ำหรือ 0.2-0.3% ของจีโนมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Jurka *et al.* 1995)

## 2.6 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ( Polymerase Chain Reaction ) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดการทดลอง ดังนั้น เทคนิคนี้จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplication วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในสิ่งส่งตรวจ

### 2.6.1 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

จริยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) กล่าวว่า โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอสายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะเบสคู่สม (complementary) แต่ละสายจับเข้าคู่กัน ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับได้กับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอ็นไซม์พวกดีเอ็นเอ polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลิโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP, dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ ก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นดังนั้น ถ้าทำเช่นนี้หลายๆรอบ ก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นได้ ดังนั้น ในการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ต้องอาศัยส่วนประกอบต่างๆดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphase (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ

### 2.6.2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

จริยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) กล่าวว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1) ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ (double stand ) แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95°C
2) ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60°C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณดับเบสคู่สม คือ เป็นลำดับเบสนิวคลิโอไทด์ที่จับคู่ได้กับนิวคลิโอไทด์สายเดิม

3) ขั้นตอน primer extension (synthesize) เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยต้องอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75°C (ภาพที่ 2.2)

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ ดังนั้น เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของพีซีอาร์ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ ถ้าทำพีซีอาร์ไป 20 รอบ ก็จะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น $2^{21}$ สาย ดังนั้น ถ้าทำพีซีอาร์จำนวน n รอบ ผลที่ได้ตามทฤษฎีจะเท่ากับประมาณ $2^{n+1}$ เมื่อประสิทธิภาพการผลิต 100% แต่โดยทั่วไปมักจะทำพีซีอาร์ประมาณ 30 รอบ ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นจำนวนถึงหนึ่งพันล้านเท่าของจำนวนดีเอ็นเอตั้งต้น

### 2.6.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ จริยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) แนะนำว่าควรใช้ส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาดังนี้

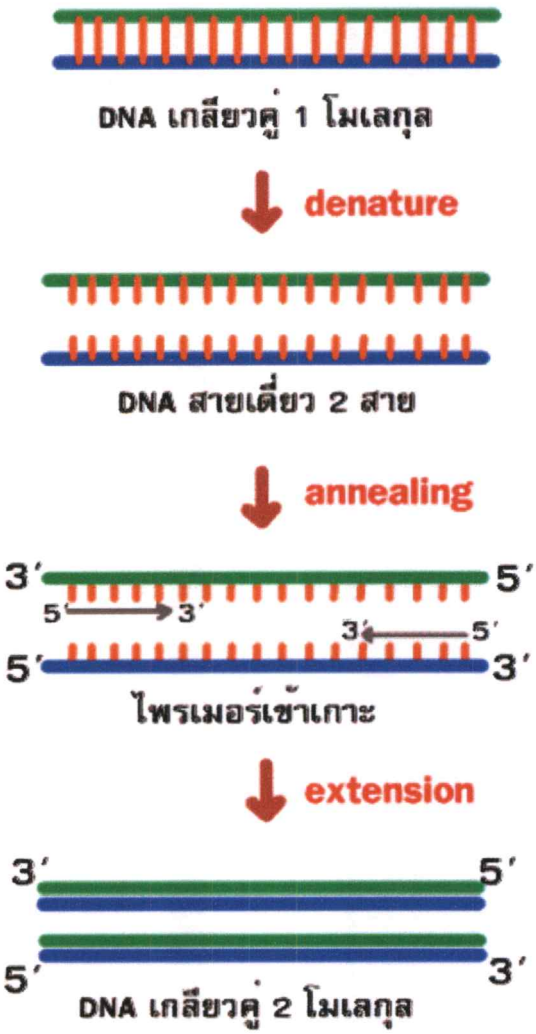
1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template)

ดีเอ็นเอต้นแบบหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) สามารถใช้ในลักษณะของดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือหรือสายคู่ก็ได้ โดยการจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นและอยู่ในรูปปลายปิด (linear DNA) จะมีประสิทธิภาพดีกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวและอยู่ในรูป circular DNA เพราะง่ายต่อการ denature และต่อการที่ไพรเมอร์จะเข้าจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจงลง

จำนวนดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้สามารถใช้ในปริมาณน้อยมาก แต่ก็ขึ้นกับจำนวน copy number ของยีน ที่จะเพิ่มจำนวนด้วย ถ้ามีจำนวน copy number มากในยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน ก็ย่อมใช้ดีเอ็นเอต้นแบบน้อยกว่ายีนที่มี single copy number เช่นในบางครั้งมีดีเอ็นเอเพียง 0.01 พิโครกรัม ของดีเอ็นเอต้นแบบก็สามารถเพิ่มเป็น 100 ng เมื่อนำพีซีอาร์ไปแล้ว 40 รอบ หรือถ้ายีนนั้นมีดีเอ็นเอที่ต้องการเป็น single copy number เช่น ถ้าต้องการเพิ่มจำนวน genomic DNA ของมนุษย์ในยีนที่เป็น single copy number อาจต้องใช้ปริมาณ genomic DNA ถึง 50 ng เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ 1 μg เมื่อทำพีซีอาร์ไปแล้ว 25–35 รอบ แต่ถ้ายีนนั้นมี copy number มากๆเช่น mitochondria DNA sequence จะสามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบน้อยกว่านี้ ดังนั้น จะเห็นว่าปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบจะแปรเปลี่ยนไปขึ้นกับชนิดของดีเอ็นเอ และจำนวนชุดของลำดับเบสเป้าหมาย หรือดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้น โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่พอเหมาะเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม เช่น ตั้งแต่ 10 ng ถึง 0.001 ng เป็นต้น

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง






**ภาพที่ 2.2** ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

2) นิวคลิโอไทด์ตั้งต้น (primer)

การเลือกออกแบบไพรเมอร์ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหากับไพรเมอร์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนั้น จึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ควรมีลักษณะดังนี้

1. ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลิโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้ เช่น จำนวน 17 นิวคลิโอไทด์ อาจยาวเพียงพอสำหรับ mammalian genomic DNA ซึ่ง มีลำดับเบสจำเพาะแห่งเดียว (unique sequence) โดยใช้หลักคำนวณคือ $4^{17}=1.7\text{x}10^{10}$ bp ซึ่งสามารถครอบคลุมความยาวของ mammalian DNA

87867

2. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ (random base distribution) ไม่ควรใช้ลำดับเบสที่เรียงตัวไม่ปกติ (unusual sequence) และพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurine หรือ polypyrimidine หรือเรียงตัวของเบสซ้ำๆกัน

3. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี G+C contend อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี G+C contend สูงเกินไป

4. ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบนั่นก็คือ ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

5. หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี second structure คือต้องไม่จับกับลำดับเบสของตนเอง (self complementary) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิด hairpin และเกิดที่ปลาย 3'end ของไพรเมอร์

6. ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง เพื่อป้องกันการ anneal กันเองกับไพรเมอร์อีกสายหนึ่ง (cross complementary) โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องไม่มี 3'overlap ในคู่ ไพรเมอร์เพื่อช่วยลดการเกิด "primer dimer"

7. ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-80°C

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้มีตั้งแต่ 0.1-1 μM แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย เช่น ลำดับเบสของไพรเมอร์ ความซับซ้อนของลำดับเบสในตัวอย่างดีเอ็นเอ และจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีในดีเอ็นเอตั้งต้น เป็นต้น

3) Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นำยมใช้กันมากที่สุดคือ *Taq* DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อว่า *Thermus aquaticus* (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูง คือ 70-85°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72°C แต่ก็ขาดคุณสมบัติ 3'ไป5' exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ทำให้เกิดการผ่าเหล่าขึ้นได้ อัตราเร่งสูงสุดในการนำนิวคลิโอไทด์เชื่อมต่อในสายดีเอ็นเอเท่ากับ 60 โมเลกุลต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 70°C หรือโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2,000-4,000 โมเลกุลต่อ 1 นาที ที่ 70-80°C มีอายุครึ่ง (half-life) 2 ชั่วโมง 10 นาที ที่อุณหภูมิ 92.5°C และ 40 นาทีที่ 95°C หรือน้อยกว่า 6 นาทีที่ 97.5°C *Taq* DNA polymerase มีความผิดพลาดในการนำเอาเบสที่ไม่ใช่คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอที่กำลังสร้างเท่ากับ $10^{-5}$ error/base และผิดพลาดเนื่องจากอ่านรหัสคร่อม codon (framshift mutation) ทำให้เกิดการผ่าเหล่าเท่ากับ $10^{-6}$ error/base ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ต่อ 100 ไมโครลิตรของปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ความ

เข้มข้นที่ใช้ก็ขึ้นกับปริมาณ และลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ รวมถึงส่วนประกอบอื่นๆ ด้วย เช่น pH , dNTPs และส่วนประกอบในบัฟเฟอร์

4) Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

ความเข้มข้นของ dNTPs ( dATP, dCTP, dGTP, และdTTP ) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 μM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs รวม (4 ชนิด) จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μM ซึ่งเพียงพอสำหรับการสร้างดีเอ็นเอได้ประมาณ 20-26 μg ต่อ 100 μl ของปฏิกิริยา ดังนั้น ควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTP ที่ต่ำที่สุดที่เพียงพอสำหรับความยาว และส่วนประกอบของดีเอ็นเอ และควรปรับ pH ให้เป็นกลางประมาณ 7

5) บัฟเฟอร์ (Buffer)

บัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCl, $MgCl_2$, และ gelatin เป็นต้น ความเข้มข้นและภาวะเหมาะสมของส่วนประกอบในบัฟเฟอร์ในการทำพีซีอาร์มีดังนี้

1. ความเข้มข้นของ magnesium ion ($Mg^{2+}$)

*Taq* DNA polymerase ต้องการ magnesium ion ช่วยเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดยทำหน้าที่เป็น co-factor $Mg^{2+}$ มีผลต่อความถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) ต่อการ anneal ของไพรเมอร์ความจำเพาะของดีเอ็นเอที่ได้และปริมาณดีเอ็นเอเป็นต้น ถ้าใช้ความเข้มข้นของ dNTPs สูง ก็ต้องปรับให้ปริมาณความเข้มข้นของ $Mg^{2+}$ สูงขึ้นด้วย เพราะ $Mg^{2+}$ ส่วนหนึ่งต้องใช้ bind กับ dNTPs ดังนั้นถ้า dNTPs มากก็จะจับกับ $Mg^{2+}$ มาก ทำให้เกลือ $Mg^{2+}$ อิสระที่จะใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไม่พอ

2. pH

pH ที่เหมาะสมสำหรับ *Taq* DNA polymerase ทำงาน คือ ที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72°C แต่ปกติ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25°C เนื่องจาก pH ของ Tris buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72°C จะได้ pH ประมาณ 7.3 นั่นเอง

3. Detergents

*Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic protein) และมีแนวโน้มที่มักตกตะกอนในของเหลว การใส่ non-ionic detergent เช่น Triton x-100, NP-40 หรือ Tween 20 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01% จะช่วยในการรักษาหรือการคงสภาพของเอนไซม์และช่วยให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เป็นไปได้ดี

4. เกลือ

พบว่า KCl ถ้ามีมากกว่า 50 mM จะยับยั้งปฏิกิริยาของ *Taq* DNA polymerase เกลือฟอสเฟต ควรหลีกเลี่ยงเนื่องจากจะเกิดการตกตะกอนเป็น $Mg_3(PO_4)_2$ ที่อุณหภูมิสูงๆ การใช้แอมโนเนียมซัลเฟตที่ 10-20 mM มีผลให้ได้ผลผลิตที่ไม่จำเพาะเพิ่มมากขึ้น

**2.6.4 จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (cycle number)**

จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้น ถ้าใช้จำนวนรอบมากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้พีซีอาร์ที่ผิดพลาดก็มากขึ้นตาม แต่ถ้าใช้จำนวนน้อยรอบเกินไปผลผลิตก็น้อยลงด้วย ดังนั้น ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นกับจำนวนรอบที่ควรใช้แสดงในตารางที่ 2.1 กรณีที่ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยควรเพิ่มจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาให้มากขึ้น

**ตารางที่ 2.1** แสดงปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นกับจำนวนรอบที่ควรใช้ในการทำพีซีอาร์

| จำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้น (โมเลกุล) | จำนวนรอบที่ใช้ |
|---|---|
| $3 \times 10^5$ | 25-30 |
| $1.5 \times 10^4$ | 30-35 |
| $1 \times 10^3$ | 35-40 |
| 50 | 40-50 |

**2.6.5 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต (PCR product)**

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี โดย จริยา ชมวารินทร์ และคณะ (2540) กล่าวว่า วิธีที่นิยมใช้ทั่วไปคือ

1) Gel electrophoresis นำผลผลิตพีซีอาร์ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน เช่น lamda Hind III digestion จากนั้นย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ผลผลิตพีซีอาร์ที่ดีควรให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนและตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดชิ้นเล็กมากๆ และแถบชิ้นไม่ชัดเจนอาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimer ก็ได้

2) Nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจาก gel ไม่ชัดเจนสามารถนำพีซีอาร์ที่ได้มาตรึงกับแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือ ไนลอน (nylon) แล้วมาทำ Southern blotting, dot หรือ slot blotting โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วจึงนำไปดูผล hybridization

3) Direct sequencing ในกรณีต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิตพีซีอาร์ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double standed PCR product) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single standed PCR product) วิธีที่นิยมในการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์สายเดี่ยวคือ Asymmetric amplification

## 2.7 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกสปีชีส์

### 2.7.1 PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA)

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน (2540) กล่าวว่า เทคนิค PCR-RAPD เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยอาศัยการจับแบบสุ่มของ ไพรเมอร์หลายๆคู่เนื่องจากสัตว์แต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทำให้ไพรเมอร์แต่ละเส้นเข้าจับในตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ของสัตว์แต่ละสปีชีส์จะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะในแต่ละสัตว์ ข้อดีของวิธีคือ ทำได้ง่าย ได้ผลอย่างรวดเร็ว ตลอดจนเราไม่จำเป็นต้องทราบ sequence ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน และไม่จำเป็นต้องเอา PCR-product มาตัดด้วยเอนไซม์อีก สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วย electrophoresis ได้เลย ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ความไวในการตรวจหา (sensitivity) และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และการแยกด้วย electrophoresis อาจจะไม่แน่นอน แปรผันตามการทดลองแต่ละครั้ง หรือแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การแปรผลเป็นไปได้ยาก โดย Martinez and Yman (1999) ใช้เทคนิคนี้จำแนกสปีชีส์ของสัตว์ต่างๆ ได้แก่ โค ม้า พ่อ ลา กระบือ กวาง กวางเรนเดียร์ สุกร แกะ แพะ จิงโจ้ และนกกระจอกเทศ เพื่อใช้เป็นมาตราฐานเปรียบเทียบในการตรวจสอบส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปคือ storfe (เนื้อโคสไลด์แช่แข็ง) ซาลามีสุกร เนื้อสุกรต้มบรรจุกระป๋อง และ Lammerull (เนื้อแกะ) พบว่าสามารถตรวจส่วนประกอบเนื้อได้ตรงตามที่ระบุในผลิตภัณฑ์ทุกชนิด แต่ไม่ตรงตามที่ระบุอยู่หนึ่งชนิดคือ เนื้อสไลด์แช่แข็งที่ทำมาจากเนื้อโค Saez *et al.* (2003) เปรียบเทียบเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ arbitrarily primed PCR (AP-PCR, Selected pimers) ในการแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ผสมโดยทั้งสองวิธีต่างกันที่ PCR – RAPD มีไพรเมอร์ยาว 10 คู่เบส ส่วน AP-PCR มีไพรเมอร์ยาวมากกว่า 18 คู่เบส ทั้งสองวิธีสามารถแยกสัตว์ได้ 5 สปีชีส์ คือ สุกร โค แกะ ไก่ และไก่งวง แต่ AP-PCR ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

### 2.7.2 PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค PCR-RFLP เป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) กล่าวว่า RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนของ

ดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามากวิธีที่ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

โดยได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์จากตัวอย่างเลือดสัตว์คือ Murray *et al.* (1995) ได้ใช้เทคนิค PCR–RFLP โดยเพิ่มจำนวนยีนส่วน D-loop region ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์ ซึ่งสามารถแยกสปีชีส์ของสัตว์ได้ 15 สปีชีส์ได้แก่ กวางมูส (*Alces alces*), กวางคาลิบู (*Rangifer tarandus*), พ่อ (*Odocoileus hemionus hemionus*), กวางหางดำ (*O.h. columbianus*), กวางหางขาว (*O. virginianus*), กวางวาปิติ (*Cervus elaphus*), กวางแอนเทโลป (*Antilocapra americana*), แกะภูเขา (*Ovis canadensis*), แกะหิน (*O. dalli*), แกะพื้นเมือง (*O. aries*), แกะmoulflon (*O. musimon*), เลียงผา (*Oreamnos americanus*), แพะพื้นเมือง (*Capra hircus*), โคพื้นเมืองยุโรป (*Bos taurus*) และวัวไบซัน (*Bison bison*) ได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการแยกสปีชีส์สัตว์จากสิ่งส่งตรวจโดย Zehner *et al.* (1998) ได้ออกแบบการทดลองเพื่อจำแนกสปีย์สัตว์จากสิ่งส่งตรวจ เช่น เนื้อจากกระเพาะ น้ำจากกระเพาะ และกระดูก ในทางอาชญวิทยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน cytochrome b gene บนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 981 คู่เบส จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I และ *Nco* I สัตว์บางชนิดให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์เหมือนกัน จึงต้องนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยการหาลำดับเบส (sequencing analysis)

ในด้านการวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบการปลอมปนของวัตถุดิบอาหารสัตว์โดย Tartaglia *et al.* (1998) ทำการตรวจสอบการปลอมปนของวัตถุดิบที่มาจากโค (meat and bonemeal , MBM) ในอาหารสัตว์เป็นครั้งแรก โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของโคโดยคลอบคลุมส่วนของ ATPase หน่วยย่อยที่ 8 และบางส่วนของหน่วยย่อยที่ 6 ในดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn* II และ *Ssp* I โดยสามารถตรวจพบ MBM ได้ที่

ปริมาณเพียง 0.125% ในอาหารสัตว์ ต่อมา Wang *et al.* (2004) ทำการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารสุนัขและอาหารแมวในประเทศไต้หวัน โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนส่วน cytochrome b ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย ขนาด 359 คู่เบส แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I หรือ *Mbo* I จากการตรวจสอบอาหารสุนัขที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์จำนวน 8 ตัวอย่างสินค้า พบมีส่วนประกอบของเนื้อโค สุกร แพะ และไก่ ชนิดใดชนิดหนึ่งผสมอยู่ ขณะที่ในอาหารแมวที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์พบว่ามีเนื้อไก่เป็นส่วนประกอบจำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างสินค้า 8 ตัวอย่าง

นอกจากนี้วิธี PCR-RFLP ยังสามารถใช้ในการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์ในอาหารได้โดย Montiel-Sosa *et al.* (2000) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน D-loop ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย ของสุกร ขนาด 531 คู่เบส สามารถใช้ตรวจสอบการผสมเนื้อและไขมันสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารปรุงสุกได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเนื้อหมูป่าได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II ต่อมา Meyer *et al.* (2002) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้แยกเนื้อ สุกร โค แพะ แกะ ไก่ ไก่งวง และลิง ออกจากอาหาร โดยออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย บริเวณ 12s rRNA และ cytochome b แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Hinf* I, *Taq* I, *Rsa* I, *Mbo* I จากนั้นแยกด้วยโพรบที่จำเพาะ ทำให้สามารถแยกเนื้อสัตว์แต่ละชนิดดังกล่าวข้างต้นได้ ในด้านอาหารฮาลาลได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจแยกเนื้อสุกรออกจากอาหารฮาลาลเช่นกันโดย Aida *et al.* (2005) ทำการแยกเนื้อและไขมันสุกรออกจากอาหารฮาลาล โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียส่วน cytochrome b ที่จำเพาะต่อสุกรแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa* II ทำให้สามารถแยกเนื้อและไขมันสุกรออกจากเนื้อแกะ เนื้อโค และเนื้อไก่ ในอาหารฮาลาลได้

**2.7.3 Species specific PCR**

เป็นวิธีการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอในหลายๆบริเวณของดีเอ็นเอต้นแบบไปพร้อมกันในหลอดทดสอบเดียวกัน ทั้งนี้อาจจะใช้ไพรเมอร์คู่เดียวหรือหลายคู่ แต่จะต้องมีอุณหภูมิในการทำงานเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเมื่อนำมาตรวจดูด้วย gel electrophoresis ประโยชน์ของวิธีนี้คือ ทำให้สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอได้หลายบริเวณพร้อมกัน ข้อเสียของเทคนิคคือ มีความยุ่งยากในการออกแบบไพรเมอร์หลายคู่เพื่อใช้ร่วมกันในระบบสภาวะเดียวกัน มีความยากในการปรับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์หลายๆคู่ โดยไม่เกิด competitive inhibition และไม่มี nonspecific band โดยได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจสอบแยกสปีชีส์จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆคือ Matsunaga *et al.* (1999) ทำการแยกเนื้อสัตว์ 6 สปีชีส์ โดยออกแบบไพรเมอร์จากจากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียส่วน cytochrome b โดยผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 157, 227, 274, 331, 398 และ439 bp สำหรับ โค สุกร ไก่ แกะ แพะ และม้า ตามลำดับ จากนั้นนำเนื้อไปผ่านความร้อนที่

100 และ120°C เป็นเวลา 30 นาที จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ทั้ง 6 สปีชีส์ได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.25 ng และไม่สามารถตรวจดีเอ็นของม้าได้หลังจากผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 120°C จากนั้นได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการแยกสปีชีส์สัตว์จากผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ต่างๆโดย Calvo *et al.* (2001) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุว่าทำจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร มีขนาด 161 bp โดยทดสอบกับเนื้อผสมที่ผ่านความร้อน 50, 80 และ120°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.005% ในเนื้อสุกรผสมเนื้อโคที่ผ่านความร้อน 120°C 30 นาที และพบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อบด (pates) และแฮมเบอร์เกอร์ จากนั้น Di Pinto *et al.* (2004) ใช้เทคนิค Duplex PCR ในการทดสอบการปลอมปนของเนื้อสุกรในไส้กรอกที่ระบุว่าทำมาจากเนื้อม้าโดยทำการออกแบบ ไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย บริเวณ cytochrome b ผลการทดสอบพบไส้กรอกที่มีเนื้อสุกรผสมอยู่ 6 ตัวอย่างและไม่พบเนื้อม้าในผลิตภัณฑ์ 1 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

เทคนิค Species specific PCR สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบแยกสปีชีส์สัตว์จากอาหารสัตว์ได้เช่นเดียวกันโดย Tajima *et al.* (2002) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยอาศัยฐานข้อมูลของท่อนยีนซ้ำทั้งชนิดท่อนสั้น (SINE) และท่อนยาว (LINE) ได้แก่ Art2 SINE จำเพาะต่อสัตว์เคี้ยวเอื้อง PRE-1 SINE จำเพาะต่อสุกร และ CR1 LINE จำเพาะต่อไก่ พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงและสามารถใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร และไก่ที่ระดับ 0.01% ต่อมา Bellagamba *et al.* (2003) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนส่วน 12S rRNA ของ ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียของ โค แกะ แพะ สุกร และไก่ เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่นำมาประกอบเป็นวัตถุดิบในอาหารปลาหลังการทำไร้เชื้อที่ 130°C เวลา 40 นาที ความไวของการตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ที่ 0.125 ถึง 0.5% อย่างไรก็ตามเมื่อนำไพรเมอร์มารวมกันในปฏิกิริยาเดียว ขนาดชิ้นส่วนของพีซีอาร์ที่ได้ไม่สามารถจำแนกดีเอ็นเอของโค แกะ และแพะออกจากกันได้ และDalmasso *et al.* (2003) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกสปีชีส์ของสัตว์ในอาหารสัตว์โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก ปลา และสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ได้ โดยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์โดยออกแบบจากดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย บริเวณ 12S rRNA , tRNA Val และ 16S rRNA ได้ผลิตภัณฑ์ยาว 104-106 คู่เบส สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง 183 คู่เบสสำหรับสัตว์ปีก 220-230 คู่เบส สำหรับปลา และ 290 คู่เบส สำหรับสุกร ตามลำดับ โดยสามารถแยกเนื้อปลาได้ในระดับการปนเปื้อน 0.004% และแยกเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก และสุกร ได้ในระดับการปนเปื้อน 0.002%

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคนี้ในการแยกสปีชีส์สัตว์จากเนื้อสัตว์ และเนื้อสัตว์ป่าโดย Rajapasksha *et al.* (2002) ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกเนื้อกวางชนิดต่างๆซึ่งเป็นสัตว์สงวนในประเทศศรีลังกา โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เพิ่มจำนวนยีนบริเวณ cytochrome b ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 450 คู่เบส ขณะที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเนื้อวัว กระบือ แกะ แพะ สุนัข และสุกรมีขนาด 649 คู่เบส ต่อมา Rodriguez *et al.* (2004) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 12S rRNA gene ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียของ สุกร โค แกะ และแพะ โดยสัตว์แต่ละสปีชีส์ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด จากการทดลองพบว่า ความสามารถในการตรวจจับอยู่ที่ 1% ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่ผสมอยู่ จากนั้น จารุณี และคณะ (2548) ใช้เทคนิคนี้ในการแยกดีเอ็นเอของสุกรจากเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ โดยออกแบบไพรเมอร์จาก mtDNA ของสุกร ให้มีขนาด 531 คู่เบส โดยสามารถตรวจจับดีเอ็นเอจากเนื้อสุกรที่ผ่านความร้อน 121°C 15 นาที ได้ และสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรจากเนื้อสุกรที่ผสมเนื้อไก่ที่ระดับต่ำถึง 0.5%

**2.7.4 Sequencing**

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นเทคนิคที่สำคัญเนื่องจากทำให้เราทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยได้มีการพัฒนามาเป็นเครื่อง automated DNA sequencing ใช้เทคนิค cycle sequencing ซึ่งอาศัยหลักการของพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จากนั้นใช้การติดฉลากสารเรืองแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆกันสำหรับเบส 4 ตัว คือ A, C, G และT วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencing โดยข้อมูลความเข้มข้นของสารเรืองแสงถูกส่งไปให้เครื่องคอมพิวเตอร์วิเคราะห์แล้วรายงานเป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยสัตว์แต่ละชนิดจะมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ต่างกัน โดยได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์จากผลิตภัณฑ์เนื้อและเลือดสัตว์ได้แก่ Bottero *et al.* (2003) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 16S rRNA gene บนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีขนาดระหว่าง 234 และ 265 คู่เบส หลังจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ชิ้นส่วนพีซีอาร์ที่ได้ถูกนำไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความแตกต่างของสัตว์แต่ละสปีชีส์ จากการทดลองพบว่าสามารถแยกสปีชีส์ของ โค สุกร แพะ แกะ ม้า กระต่าย ไก่ ปลาเทราท์ และปลาซาดีน โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์มีความไวถึง 0.0625% และสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อและเลือดสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 134.4 ถึง 141.9°C และความดันที่ 3.03 ถึง 4.03 บาร์ เป็นเวลา 24 นาที ได้

**2.7.5 Quantitative PCR หรือ Real-time PCR**

Real-time PCR เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตของพีซาอาร์ในแต่ละรอบโดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ไปพร้อมกับทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้พร้อมกันทำให้ทราบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถติดตามผลได้ในขณะเกิดขึ้นจริง โดยไม่ต้องมีขั้นตอนหลังพีซีอาร์และมีความจำเพาะสูงที่สุด ไวที่สุด ข้อด้อยของเทคนิคนี้คือ ต้องใช้ความชำนาญในการใช้เครื่องมือ และเครื่องมือมีราคาสูง โดยที่ผ่านมาได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์จากเนื้อสัตว์ผสมและเนื้อสัตว์ผสมที่ผ่านความร้อนที่ระดับต่างๆโดย Dooley *et al.* (2004) ใช้เทคนิคนี้ โดยใช้ TaqMan probe 2 ชนิดคือ ชนิดที่จำเพาะต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (โค แกะ และสุกร) และชนิดที่จำเพาะต่อสัตว์ปีก (ไก่ และไก่งวง) โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ cytochrome b gene บนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย พบว่าสามารถแยก เนื้อโค แกะ และไก่งวง จากเนื้อผสมที่ปริมาณต่ำกว่า 0.1% ได้ ต่อมา Rodriguez *et al.* (2005) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกเนื้อสุกรออกจากเนื้อผสม โดยผสมเนื้อสุกรในเนื้อโค 3 ระดับ คือ 0.5, 1, 5% น้ำหนักรวม 100 กรัม นำไปผ่านความร้อน 121°C 20 นาที โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ 12S rRNA ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียของสุกร แล้วตรวจหาดีเอ็นเอด้วย TaqMan probe พบว่าสามารถแยกเนื้อสุกร 0.5 – 5% ที่ผสมในเนื้อโคได้ และ Tasara *et al.* (2005) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกส่วนประกอบของ เจลาติน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อโค โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโค บริเวณ ATPase subunit gene ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้ในการแยกส่วนประกอบของโคออกจาก เจลาติน โดยสามารถแยกได้ที่การปนเปื้อนของเนื้อโคที่ระดับ 0.1 – 0.001%

ในส่วนของอาหารที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ก็ได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการแยกสปีชีส์เช่นเดียวกันโดย Lopez – Andreo *et al.* (2005) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์จากตัวอย่างเนื้อและอาหารที่จำหน่ายตามท้องตลาดได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะ ไก่ ไก่งวง และนกกระจอกเทศ โดยใช้ TaqMan probe ชนิด minor groove binding (MGB) probe โดยออกแบบไพรเมอร์จาก cytochrome b บนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย โดยสามารถแยกเนื้อ สุกร ไก่และไก่งวง ที่ระดับการผสมมากกว่า 1% และโค แกะ ที่ระดับการผสมมากกว่า 5% โดยมีความแม่นยำถึง 90%

จากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมา เทคนิคที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ยังมีข้อจำกัดในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์บางชนิด รวมทั้งข้อจำกัดของเทคนิคการทำเอง เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น PCR-RFLP ต้องอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ซึ่งอาจต้องมีการทดลองใช้เอนไซม์หลายชนิดจนกว่าจะเกิดความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ การเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลิอิคบางตัวในสัตว์สปีชีส์เดียวกันในจุดที่มีผลต่อการตัดเอนไซม์ อาจทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคอื่น เช่น RAPD-PCR ซึ่งมีความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ แต่ในบางครั้งอาจให้จำนวนแถบยีนซึ่ง

แตกต่างจากความเป็นจริงเนื่องจากสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในแต่ละห้องปฏิบัติการอาจมีความแตกต่าง ทำให้โอกาสจับของไพรเมอร์แต่ละคู่ซึ่งไม่มีความจำเพาะเจาะจงมีความคลาดเคลื่อนได้ จากข้อจำกัดดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการออกแบบไพรเมอร์เป็นส่วนที่สำคัญในการแสดงความจำเพาะเจาะจงของสัตว์แต่ละสปีชีส์

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

### 3.1.1 ตัวอย่างเลือดสัตว์

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ ได้แก่ โคพันธุ์บราห์มัน โคกำแพงแสน ไก่พื้นเมือง กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และสุกรป่า เก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ในหลอดทดลองที่มี EDTA โดยใช้ EDTA 10 mg ต่อเลือด 1 ml

### 3.1.2 ตัวอย่างเนื้อสัตว์

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อกระบือ และเนื้อไก่ ผสมเนื้อสัตว์ในสัดส่วนต่างๆกัน โดยทำการผสมเนื้อสัตว์สองชนิด ได้แก่ สุกรและโค สุกรและไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% และทำการผสมเนื้อสัตว์สามชนิด ได้แก่ สุกร โค และกระบือ สุกร โค และไก่ ที่สัดส่วนเนื้อสัตว์ชนิดละ 30 g (ตารางที่ 3.1) ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer: BRAUN Multiquick)

### 3.1.3 การให้ความร้อนแก่ตัวอย่างเนื้อสัตว์

นำตัวอย่างส่วนผสมเนื้อสัตว์ในข้อ 3.1.2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน และทำการปรุงสุกด้วยความร้อนดังต่อไปนี้

1) เก็บเป็นเนื้อสดที่อุณหภูมิ -20°C
2) นำไปให้ความร้อนด้วย water bath (Memmert WB-14) ที่อุณหภูมิ 82°C 20 นาที
3) นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Tomy ES315) ที่ 116°C 30 นาที
4) นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Tomy ES315) ที่ 116°C 60 นาที

### 3.1.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจากห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 31 ตัวอย่างได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกจำนวน 7 ตัวอย่าง ซาลามี่ 2 ตัวอย่าง ลูกชิ้น 8 ตัวอย่าง หมูยอ 4 ตัวอย่าง แหนม 5 ตัวอย่าง แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 5 ตัวอย่าง

จากนั้นทำการสุ่มเก็บชิ้นตัวอย่างประมาณ 50 mg ในหลอด 1.5 ml จำนวน 5 บริเวณ จากผลิตภัณฑ์แต่ละตัวอย่าง โดยเก็บชิ้นตัวอย่างที่ -20°C

**ตารางที่ 3.1** สัดส่วนในการผสมเนื้อสัตว์

| ชนิดเนื้อผสม | เปอร์เซ็นต์เนื้อสัตว์ผสม | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $10^{-4}$ | $10^{-3}$ | $10^{-2}$ | $10^{-1}$ | 0 | 1 | 5 | 10 | 25 | | 50 | 75 | 90 | 99 | 100 |
| สุกร+ไก่(กรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
| สุกร | 0.0001 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 0 | 1 | 5 | 10 | 25 | - | 50 | 75 | 90 | 99 | 100 |
| ไก่ | 99.9999 | 99.999 | 99.99 | 99.9 | 100 | 99 | 95 | 90 | 75 | - | 50 | 25 | 10 | 1 | 0 |
| สุกร+โค(กรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
| สุกร | 0.0001 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 0 | 1 | 5 | 10 | 25 | - | 50 | 75 | 90 | 99 | 100 |
| โค | 99.9999 | 99.999 | 99.99 | 99.9 | 100 | 99 | 95 | 90 | 75 | - | 50 | 25 | 10 | 1 | 0 |
| โค+กระบือ(กรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
| โค | - | - | - | - | 0 | 1 | 5 | 10 | 25 | - | 50 | 75 | 90 | 99 | 100 |
| กระบือ | - | - | - | - | 100 | 99 | 95 | 90 | 75 | - | 50 | 25 | 10 | 1 | 0 |
| สุกร+โค+ไก่(กรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
| สุกร | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |
| โค | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |
| ไก่ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |
| สุกร+โค+กระบือ(กรัม) | | | | | | | | | | | | | | | |
| สุกร | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |
| โค | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |
| กระบือ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 30 g | - | - | - | - | - |

ข้อมูลผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ทำการบันทึกได้แก่

1) ประเภทของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ลูกชิ้น และไส้กรอก เป็นต้น
2) ส่วนประกอบตามที่ระบุไว้ที่บรรจุภัณฑ์
3) บริษัทผู้ผลิต (ไม่แสดงไว้ในผลการทดลอง)

## 3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์

### 3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์

1) หลอดใส่สารขนาด 1.5 ml (Microcentrifuge tube 1.5 ml)
2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Spectrafuge, Biofuge pico, SORVALL)
3) Dry Bath (Block™: Labnet)
4) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 *pro*)
5) ตู้บ่ม 20°C (Mirage)
6) ไมโครปิเปต (Gilson)
7) เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2)
8) ตู้แช่แข็ง (Sanyo)
9) เครื่องชั่งอิเล็คโทรนิค (Satorius)
10) เครื่องปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter: CG842 Schott)
11) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave: ES315, MEDITOP)

### 3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์

1) Buffer A (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.75% Triton x-100)
2) Buffer B (20 mM Tris-HCl, 4 mM $Na_2EDTA$, 100 mM NaCl)
3) 20 mg/ml Proteinase K (Vivantis)
4) 5.3M NaCl
5) Isopropanol
6) 70% Ethanol
7) 10% SDS

### 3.2.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจากวิธีของ Helms (1990) โดยนำเลือดสัตว์ 150 µl ผสม Buffer A 150 µl และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 300 µl นำส่วนผสมแช่ในน้ำแข็งนาน 3 นาที ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนน้ำ และเก็บส่วนตะกอน ทำซ้ำขั้นตอนที่กล่าวมาอีกหนึ่งครั้ง ละลายตะกอนด้วย Buffer B 300 µl และ10 % SDS 30 µl ผสมด้วยเครื่องผสมสารนาน 30 วินาที เติม 20 mg/ml proteinase K 5 µl ให้ความร้อนด้วยเครื่อง Dry Bath ที่ 65 °C นาน 5 นาที เติม 5.3 M NaCl 200 µl ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 2 นาที เก็บส่วนน้ำใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl (1 เท่าของปริมาณน้ำที่เก็บได้) เก็บที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5-10 นาที ทิ้งส่วนน้ำ (เก็บตะกอน) เติม 70% Ethanol 500 µl พลิกกลับไปกลับมาให้เข้ากัน ปั่นที่ 13,000 rpm

นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ รอให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 µl นำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยเจือจางดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1 ต่อ 100 (น้ำ 297 µl และดีเอ็นเอ 3 µl) เก็บดีเอ็นเอที่เหลือที่ -20°C

## 3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

### 3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

1) หลอดใส่สารขนาด 1.5 ml
2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Spectrafuge, Biofuge pico SORVALL)
3) Dry Bath (Block™: Labnet)
4) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 *pro*)
5) ตู้แช่ 20°C (Mirage)
6) ไมโครปิเปต (Gilson)
7) เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2)
8) เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (Shaking Incubator: Vision)
9) เครื่องชั่งอิเล็คโทรนิค (Satorius)
10) ตู้แช่แข็ง (Sanyo)
11) Spectrophotometer (Ultrospec 1100 pro)
12) เครื่องปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (CG842 Schott)

### 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

1) Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 400 mM NaCl)
2) 20 mg/ml Proteinase K (Vivantis)
3) 5.3M NaCl
4) Isopropanol
5) 70% Ethanol

### 3.3.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

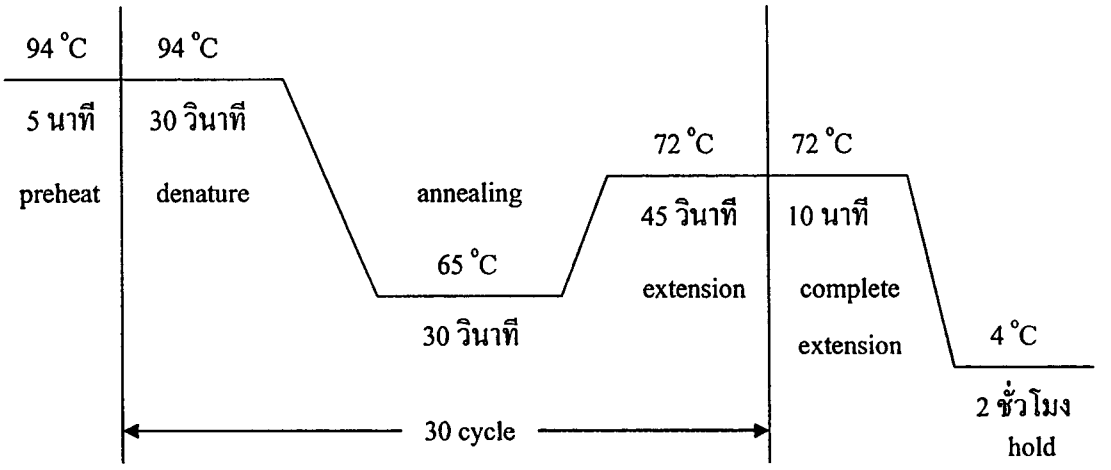
การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Long-Cheng (2006) ตัวอย่างเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป 50 mg ผสม Lysis buffer 500 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เติม 20 mg/ml proteinase K 15 µl นำไปเข้าเครื่อง Shaking Incubator ที่ 55°C 200 rpm นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เติม 5.3 M NaCl 190 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 15 วินาที จากนั้นปั่นที่ 13,000 rpm นาน 10-15 นาที เก็บส่วนน้ำใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม Isopropanol 600 µl (1 เท่าของ

ปริมาณน้ำที่เก็บได้) เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 20-30 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง (เก็บตะกอน) ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 500 µl พลิกกลับไปกลับมาให้เข้ากัน ปั่นที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง รอให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 µl นำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1 ต่อ 100 (น้ำ 297 µl และดีเอ็นเอ 3 µl) เก็บดีเอ็นเอที่เหลือที่ -20°C

### 3.4 การเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100-300 ng, 0.4mM dNTPmix, 1.5mM $MgCl_2$, 1XAmpliBuffer A (50mM KCl, 10M Tris-HCl(pH 9.1), 0.01% Triton™X-100), ชุดไพรเมอร์เชิงซ้อน (0.4 µM 12S-F 0.1 µM 12S SS-R 0.1 µM 12S BB-R 0.1 µM 12S GG 0.1 µM 12S BT-R) และ1 unit ของ Taq DNA polymerase (Vivantis) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (T personal: Biometra) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (preheat) จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ จำนวน 30 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denature) จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 65°C นาน 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับตัวอย่างเหมาะสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72°C นาน 45 วินาที เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวอย่างเหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (extension) เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C นาน 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มีลำดับเบสที่สมบูรณ์ (complete extension) และเก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4°C (hold) ถือเป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เสร็จสมบูรณ์ (ภาพที่ 3.1)

หลังจากที่เครื่องพีซีอาร์ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามที่กำหนด จากนั้นเก็บผลผลิตที่ได้ที่ -20°C เพื่อเป็นการเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย Gel eletrophoresis




**ภาพที่ 3.1** ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ

## 3.5 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis

### 3.5.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องชั่งอิเล็คโทรนิค (Satorius)
2) ขวดรูปชมพู่
3) ฟอยด์ชั่งสาร
4) ไมโครเวฟ (SHARP รุ่นR236)
5) ช้อนตักสาร
6) เครื่องเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (GelMate 2000, TOYOBO)
7) ไมโครปิเปต (Gilson)
8) แผ่นพาราฟิน

### 3.5.2 สารเคมี

1) อะกาโรสเจล (SeaKem)
2) 10X TBE buffer, pH 8.3 (Tris base 107.80 g, Boric acid 55 g, disodium EDTA 7.44 g)
3) Gel loading buffer [6X Gel loading (1 ml) + Ethidium bromide (1 หยด)]
4) standard DNA 100 bp DNA ladder (Vivantis)

### 3.5.3 วิธีการเตรียม 1% อะกาโรสเจล

ชั่งอะกาโรสเจล 2 g เติม 1X TBE buffer ให้ครบ 200 ml นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ให้เจลละลายจนใส จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจล แข็งตัว ถอด comb ออก จากนั้นนำไปใส่ใน electrophoresis chamber

### 3.5.4 การรันเจลวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis

วางแผ่นเจลลงบน electrophoresis chamber เท 1X TBE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นผสม Gel loading buffer 2 µl กับผลผลิตพีซีอาร์ 10 µl บนแผ่นพาราฟิน ดูดสารทั้งหมดใส่ลงในหลุมเจลตามที่ได้กำหนดไว้ โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder (Vivantis) ขนาด 100 bp เป็นแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องถ่ายรูปเจ (SynGene, UK)

## 3.6 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด โคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่พื้นเมือง กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และสุกรป่า ตามขั้นตอนที่ 3.3 หลังจากวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทำการเจือจางดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ตามขั้นตอนที่ 3.5 โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng และชุดไพรเมอร์เชิงซ้อน (0.4 µM mt12S-F, 0.1 µM SS12S-R4, 0.1 µM BBmt12S-R2, 0.1 µM GGmt12S-R และ 0.1 µM BTmt12S-R) เมื่อเพิ่มดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เสร็จทำการวิเคราะห์ผลการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.6

## 3.7 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

นำดีเอ็นเอจากเลือด โค ไก่ กระบือ และสุกร จากขั้นตอนที่ 3.7 มาทำการเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับ $10^{-5}$-$10^{2}$ ng/µl จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ตามขั้นตอนที่ 3.5 โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับความเข้มข้น $10^{-5}$-$10^{2}$ ng/µl ของสัตว์แต่ละชนิดกับชุดไพรเมอร์เชิงซ้อน (0.4 µM mt12S-F, 0.1 µM SS12S-R4, 0.1 µM BBmt12S-R2, 0.1 µM GGmt12S-R และ 0.1 µM BTmt12S-R) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองตามขั้นตอนที่ 3.6

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์จากส่วนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย โดยทำการเปรียบเทียบนิวคลิโอไทด์บริเวณ 12S rRNA, 16S rRNA, D-loop และ Cytochrome b ของสัตว์ชนิดต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ สุกร (AY574048) โค (V00654) กระบือ (AY702618) แพะ (AF533441) แกะ (AF010406) และไก่ (AP003323) จากนั้นเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW ใน BioEdit version 7.0.8 (Hall. 1997) (ภาคผนวก ก.) พบว่าลำดับเบสจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA, D-loop และ Cytochrome b มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ทั้ง 4 สปีชีส์คือ สุกร โค กระบือ และไก่ ที่มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์จึงทำได้ยากเนื่องจาก ไพรเมอร์ของสัตว์แต่ละ สปีชีส์อาจมีการจับข้ามสปีชีส์ซึ่งกันและกัน นอกจากนั้นถ้าขนาดของ ไพรเมอร์มีความยาวต่างกันไม่มากพอจะเป็นการยากในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ทำให้มีโอกาสในการแปรผลผิดพลาดสูง ในขณะที่บริเวณ 12S rRNA ของสัตว์ทั้ง 4 สปีชีส์ มีบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันมากกว่าใน 3 บริเวณที่กล่าวข้างต้น จึงทำการออกแบบไพรเมอร์จาก ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ 12S rRNA โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อสัตว์ 4 สปีชีส์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์เส้น Forward จากบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในสัตว์ทั้ง 4 สปีชีส์ แต่ในเส้น Revert จะออกแบบให้สัตว์แต่ละสปีชีส์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยสัตว์แต่ละสปีชีส์ไม่จับข้ามสปีชีส์ซึ่งกันและกัน โดยไพรเมอร์ของแต่ละสปีชีส์มีความยาวต่างกันอย่างน้อย 100 bp เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผล นอกจากนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบต้องสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิเดียวกันทั้งหมด

**ตารางที่ 4.1** ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบยีน 12S rRNA

| ชื่อไพรเมอร์ | ความจำเพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ | ค่า Tm | ค่า %GC | ความยาว (nt) | บริษัทผู้สังเคราะ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| mt12S-F | ไพรเมอร์รวม | 5' – GTG CCA GCC ACC GCG GTC ATA – 3' | 77* | 66 | 21 | Invitroge |
| BTmt12S-R | โค | 5' – TCT ATA GTG CGT CGG CTA TTG TAG– 3' | 72* | 45 | 24 | Invitroge |
| GGmt12S-R | ไก่ | 5' – AGC GTT TGT GCT CGT AGT TCT CA– 3' | 72* | 47 | 23 | Invitroge |
| BBmt12S-R2 | กระบือ | 5' – CGT TGT GAT TGC GCT TAC TTT TGT A– 3' | 61 | 40 | 25 | Operon |
| SS12S-R4 | สุกร | 5' – GTC TCT TCT TGC ATG GTT GTG TAA TTG– 3' | 63 | 40 | 27 | Operon |

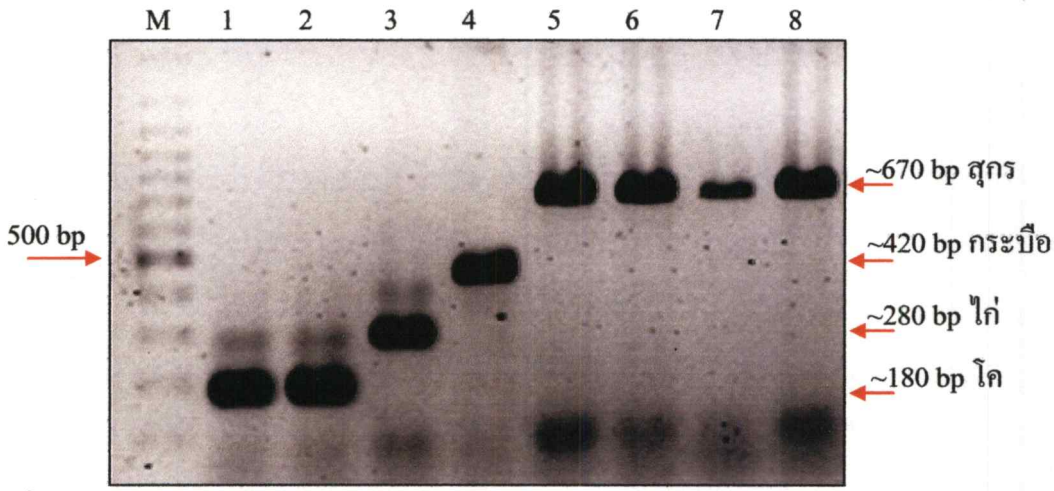
* ที่ความเข้มข้นของเกลือ 1M $Na^+$

ผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังจากการจำแนกสปีชีส์ได้แก่

| | | |
|---|---|---|
| ความยาวดีเอ็นเอผลผลิตของโค | = | ~180 bp |
| ความยาวดีเอ็นเอผลผลิตของไก่ | = | ~280 bp |
| ความยาวดีเอ็นเอผลผลิตของกระบือ | = | ~420 bp |
| ความยาวดีเอ็นเอผลผลิตของสุกร | = | ~670 bp |

## 4.2 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอจากเลือด โคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่ กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และสุกรป่า ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.1



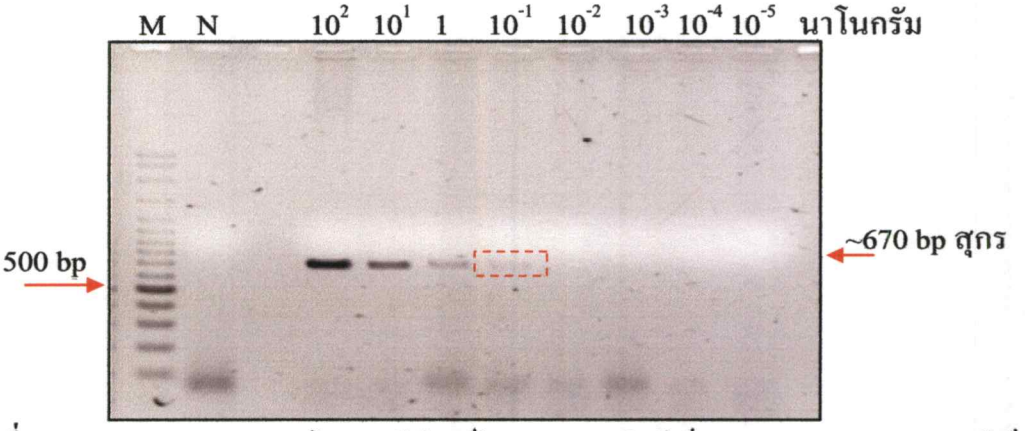

**ภาพที่ 4.1** ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder ผลผลิตพีซีอาร์ของโคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่ กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และ สุกรป่า แสดงในแถบที่ 1–8 ตามลำดับ

จากการทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดโค แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดไก่ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 420 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดกระบือ และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 670 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดสุกร แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของโค ไก่ กระบือ และสุกรเท่านั้น

## 4.3 การทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอ

เพื่อทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือดของสุกร โค กระบือ และไก่ โดยเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ระดับ $10^{-5}$-$10^{2}$ ng ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.2-4.5

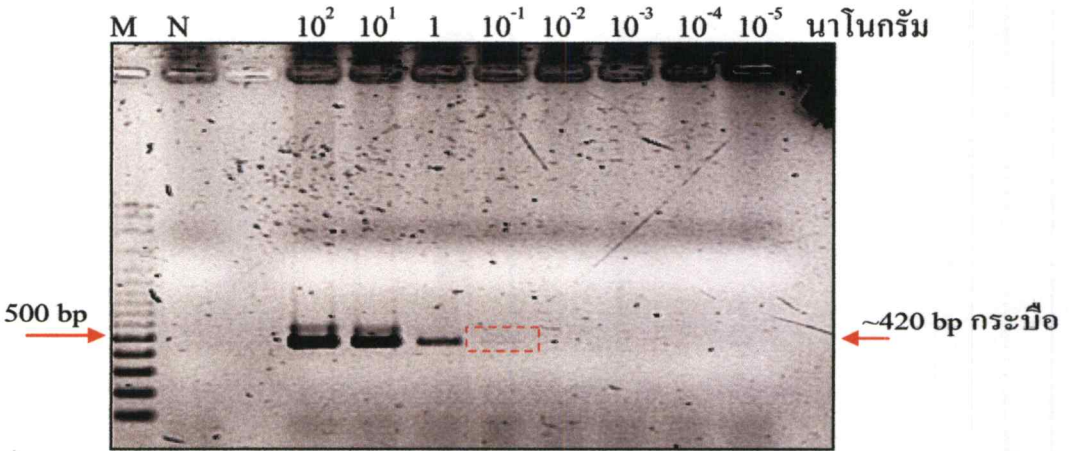
### 4.2.1 ดีเอ็นเอสุกร




**ภาพที่ 4.2** ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอสุกร แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลอง แถบดีเอ็นเอปรากฏที่ $10^{-1}$-$10^{2}$ ng แสดงว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรอยู่ที่ระดับ 0.1 ng คือถ้ามีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ในตัวอย่างตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ng จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่บริเวณ 670 bp

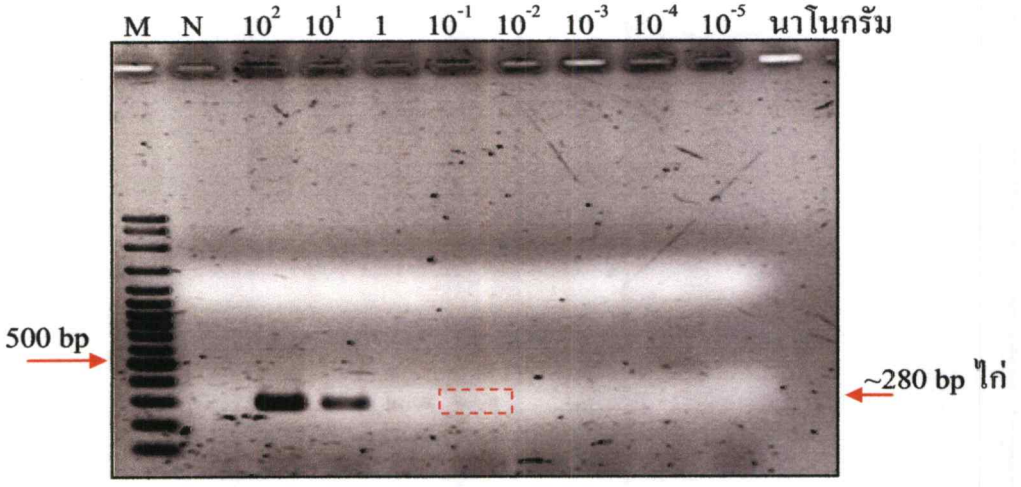
### 4.2.2 ดีเอ็นเอกระบือ




**ภาพที่ 4.3** ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอกระบือ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลอง แถบดีเอ็นเอปรากฏที่ $10^{-1}$-$10^{2}$ ng แสดงว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของกระบืออยู่ที่ระดับ 0.1 ng คือถ้ามีดีเอ็นเอของกระบืออยู่ในตัวอย่างตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ng จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่บริเวณ 420 bp

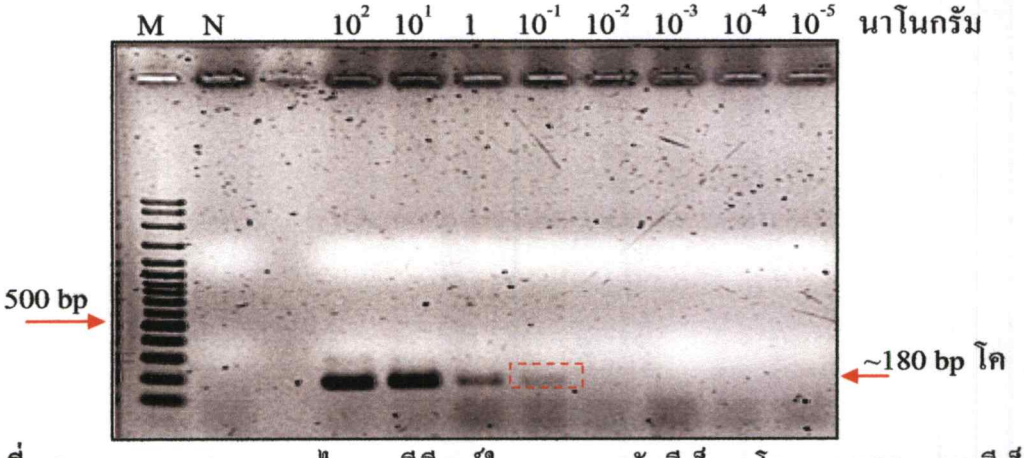
### 4.2.3 ดีเอ็นเอไก่




**ภาพที่ 4.4** ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอไก่ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลอง แถบดีเอ็นเอปรากฏที่ $10^{-1}$-$10^{2}$ ng แสดงว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของไก่อยู่ที่ 0.1 ng คือถ้ามีดีเอ็นเอของไก่อยู่ในตัวอย่างตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ng จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่บริเวณ 280 bp

### 4.2.4 ดีเอ็นเอโค



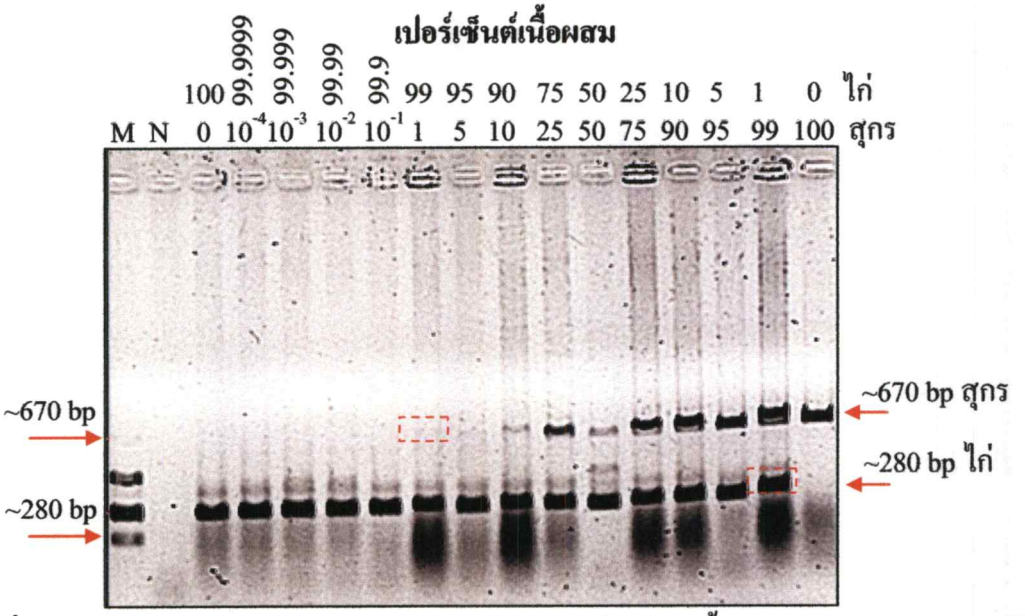

**ภาพที่ 4.5** ผลการทดสอบความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอโค แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลอง แถบดีเอ็นเอปรากฏที่ $10^{-1}$-$10^{2}$ ng แสดงว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของโคอยู่ที่ 0.1 ng คือถ้ามีดีเอ็นเอของโคอยู่ในตัวอย่างตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ng จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่บริเวณ 180 bp

## 4.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบผสมก่อนปรุงสุกที่สัดส่วนต่างๆ

เพื่อทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเนื้อผสม ได้แก่ สุกร และโค สุกรและไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% เนื้อสุกร โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด(Homogenizer) โดยใช้ DNA template 300 ng ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.6-4.8

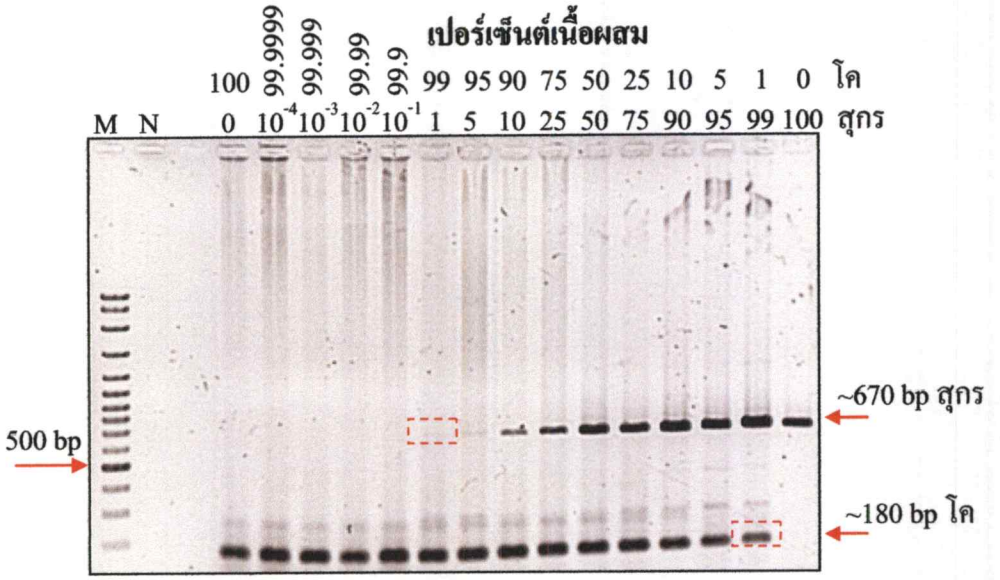
### 4.3.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่




**ภาพที่ 4.6** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบสุกรผสมไก่ แถบ M แทนแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสุกร กระบือ ไก่และโค แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อไก่ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของไก่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อไก่ต่ำสุด 3 ng

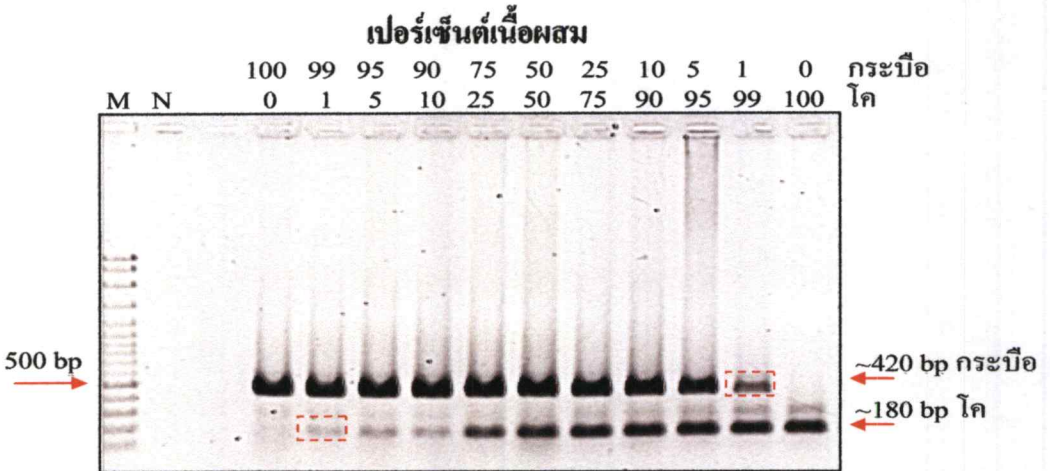
### 4.3.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค




**ภาพที่ 4.7** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบสุกรผสมโค แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อโคได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng

### 4.3.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ




**ภาพที่ 4.8** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบโคผสมกระบือ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

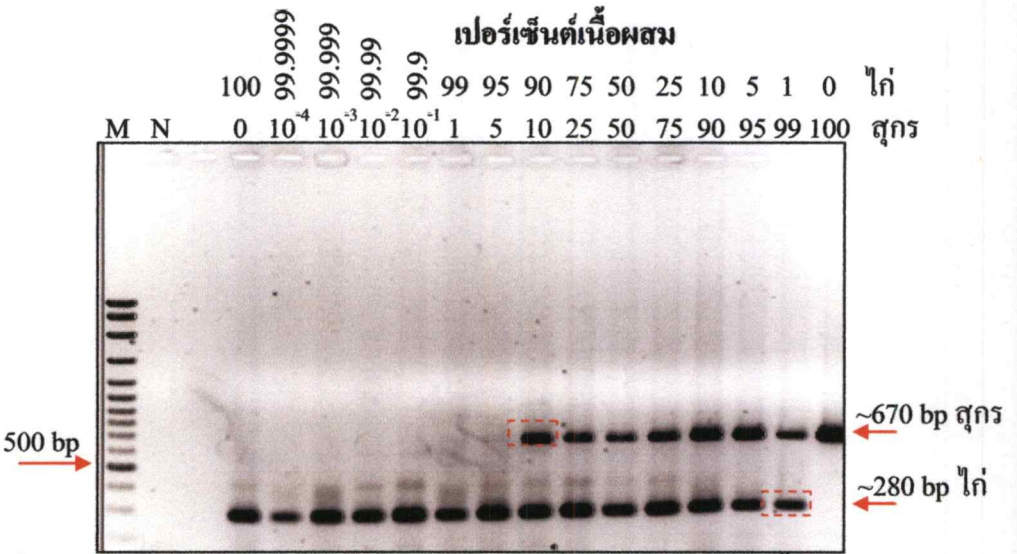
จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อกระบือ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของกระบืออยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อโคผสมเนื้อกระบือได้ที่ระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อกระบือต่ำสุด 3 ng

## 4.5 การทดสอบการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อผสมที่ผ่านความร้อนสภาวะต่างๆ

### 4.4.1 อุณหภูมิ 82°C 20 นาที

เพื่อทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเนื้อผสม ได้แก่ สุกรและโค สุกรและไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% เนื้อสุกร โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด(Homogenizer) จากนั้นนำไปต้มด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที โดยใช้ DNA template 300 ng ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.9-4.11

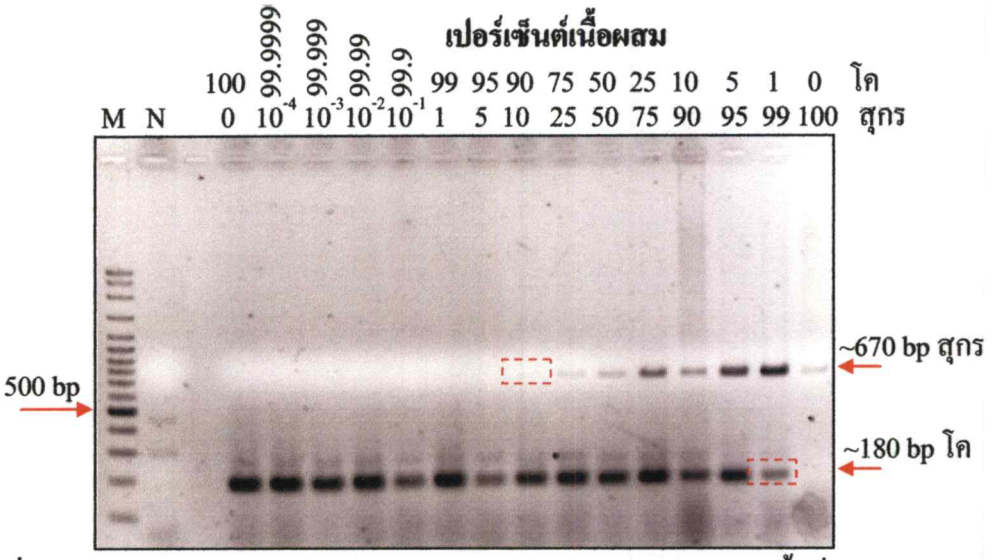
#### 4.4.1.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่




**ภาพที่ 4.9** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที เนื้อสุกรผสมไก่ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 10% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 30 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อไก่ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของไก่อยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 30 ng และระดับเนื้อไก่ต่ำสุด 3 ng

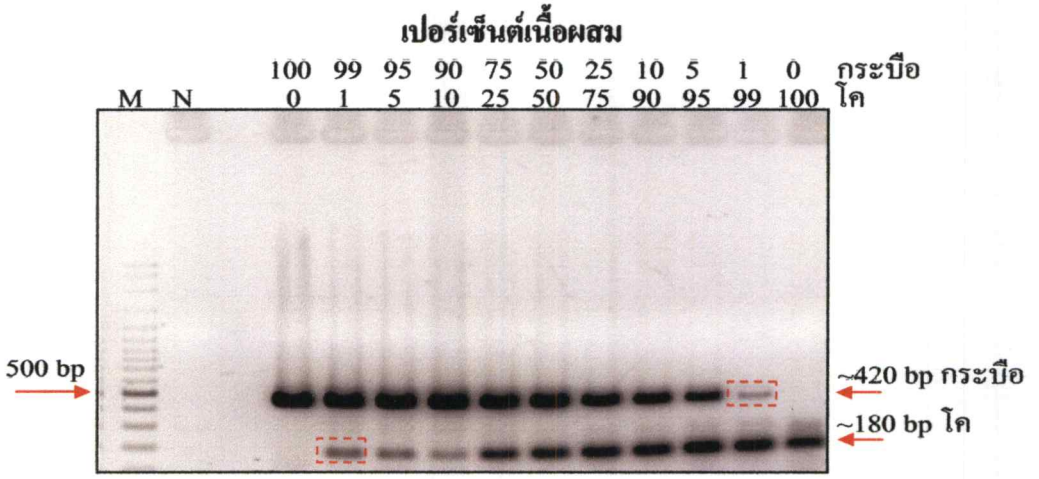
#### 4.4.1.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค




**ภาพที่ 4.10** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที เนื้อสุกรผสมโค แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 10% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 30 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อโคได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 30 ng และระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng

#### 4.4.1.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ



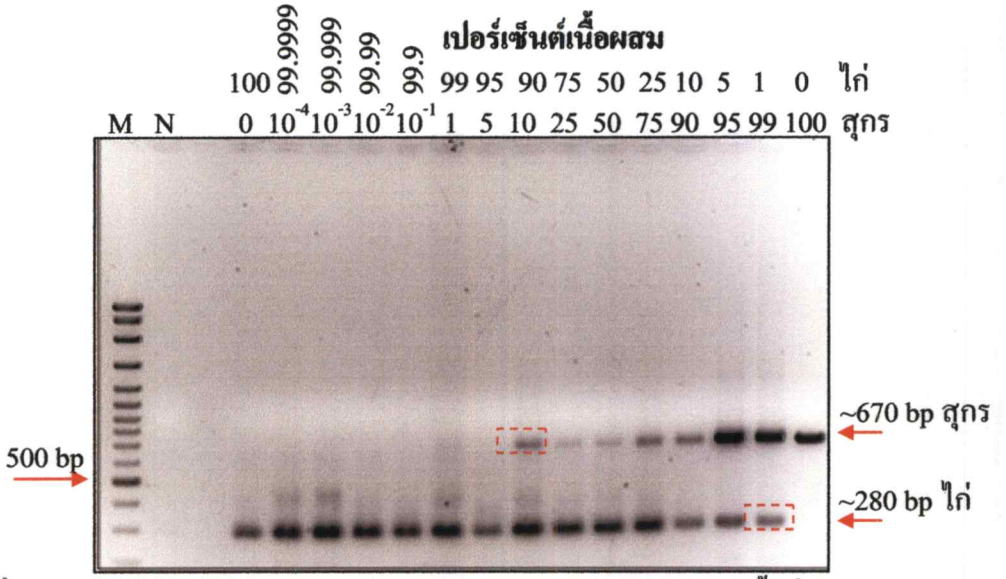

**ภาพที่ 4.11** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที เนื้อโคผสมกระบือ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อกระบือ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของกระบืออยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อโคผสมเนื้อกระบือได้ที่ระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อกระบือต่ำสุด 3 ng

### 4.4.2 อุณหภูมิ 116 °C 30 นาที

เพื่อทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเนื้อผสม ได้แก่ สุกร และโค สุกรและไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% เนื้อสุกร โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด(Homogenizer) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 30 นาที โดยใช้ DNA template 300 ng ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.12-4.14

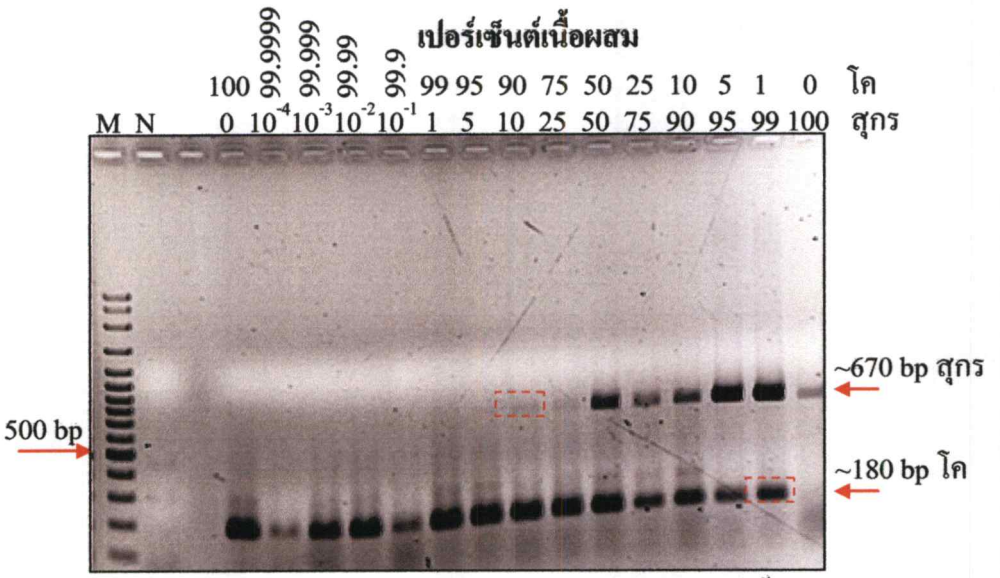
#### 4.4.2.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่




**ภาพที่ 4.12** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 30 นาที เนื้อสุกรผสมไก่ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 10% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 30 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อไก่ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของไก่อยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 30 ng และระดับเนื้อไก่ต่ำสุด 3 ng

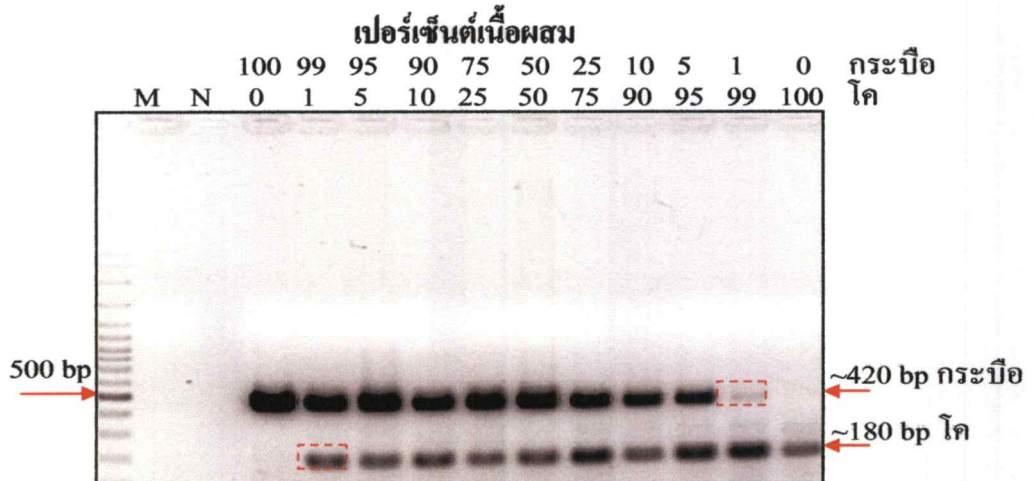
### 4.4.2.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค




**ภาพที่ 4.13** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 30 นาที เนื้อสุกรผสมโค แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 10% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 30 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อโคได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 30 ng และระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng

### 4.4.2.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ



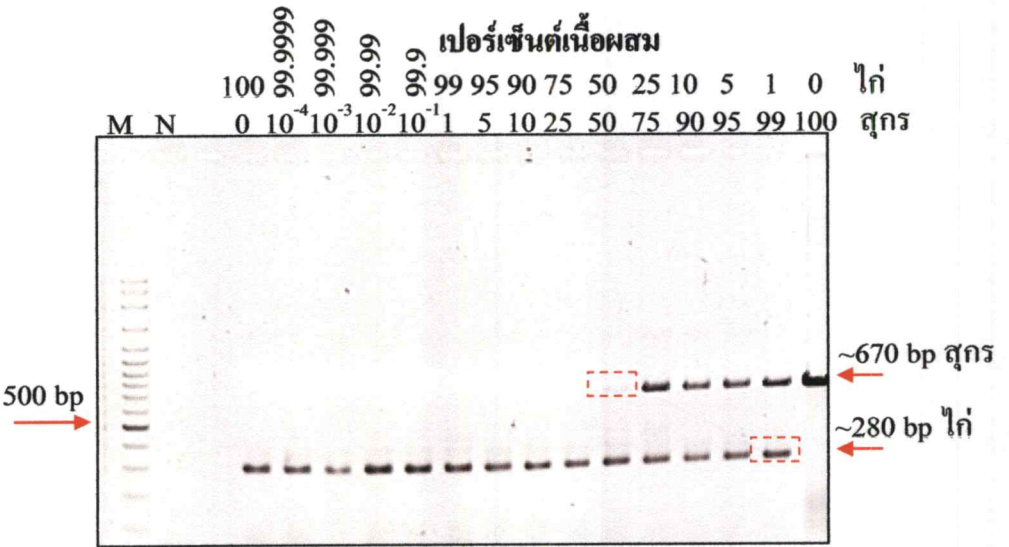

**ภาพที่ 4.14** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 30 นาที เนื้อโคผสมกระบือ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อกระบือ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของกระบืออยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อโคผสมเนื้อกระบือได้ที่ระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อกระบือต่ำสุด 3 ng

### 4.4.3 อุณหภูมิ 116 °C 60 นาที

เพื่อทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอ ของเนื้อผสม ได้แก่ สุกรและโค สุกรและไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% เนื้อสุกร โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด(Homogenizer) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาที โดยใช้ DNA template 300 ng ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.15-4.17

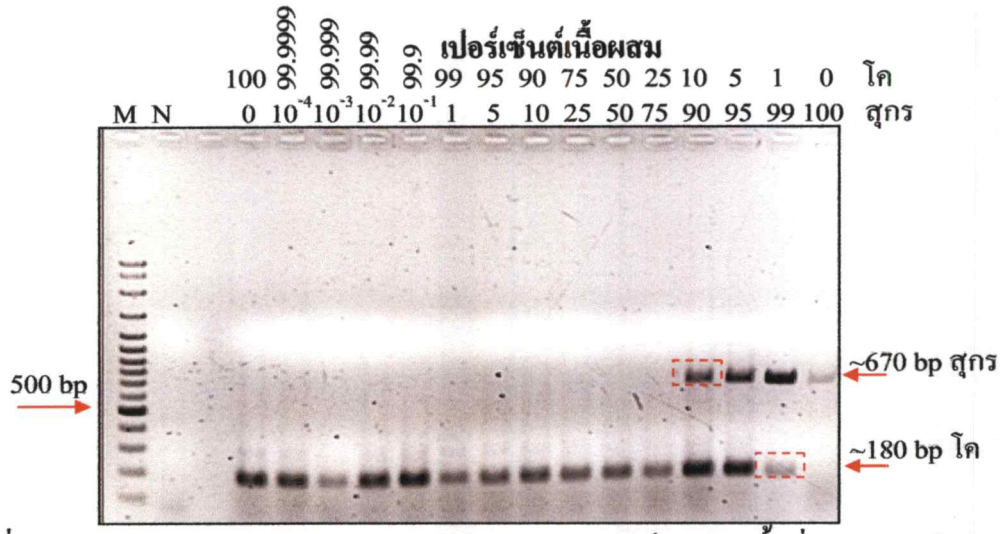
#### 4.4.3.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่




**ภาพที่ 4.15** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 60 นาที เนื้อสุกรผสมไก่ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 50% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 150 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อไก่ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของไก่อยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 150 ng และระดับเนื้อไก่ต่ำสุด 3 ng

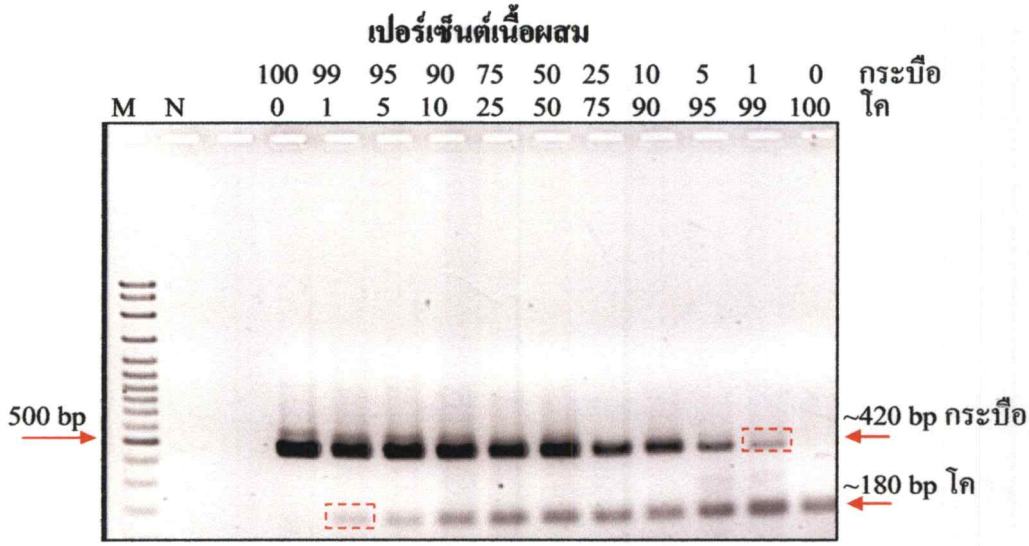
### 4.4.3.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค




**ภาพที่ 4.16** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 60 นาที เนื้อสุกรผสมโค แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อสุกร 90% ซึ่งมีดีเอ็นเอของสุกรอยู่ 270 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อโคได้ที่ระดับเนื้อสุกรต่ำสุด 270 ng และระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng

### 4.4.3.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ



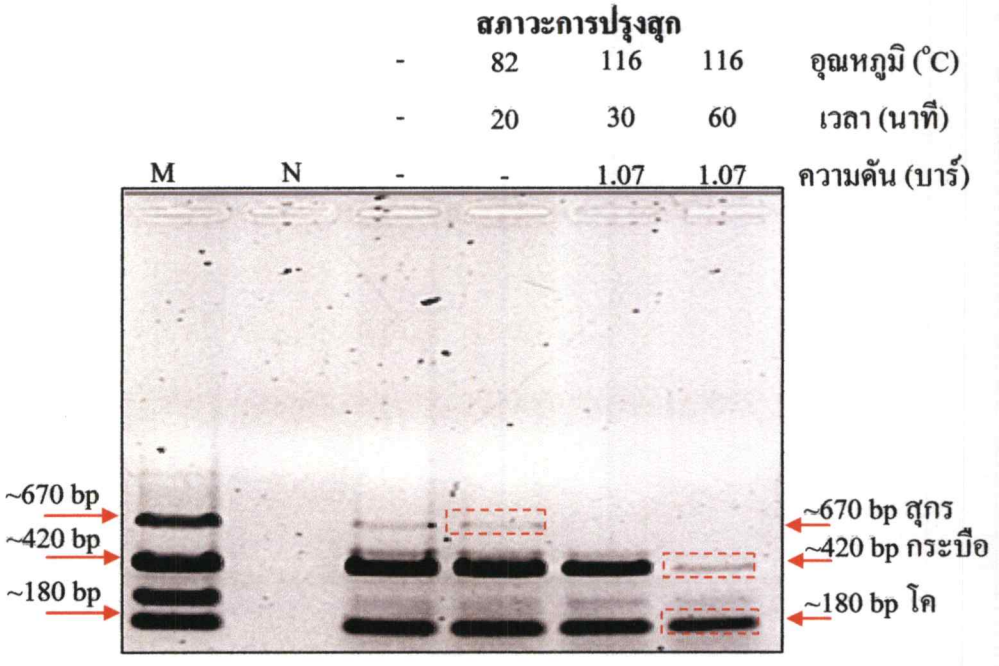

**ภาพที่ 4.17** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อที่ผ่านความร้อน 116°C 60 นาที เนื้อโคผสมกระบือ แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อโค 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของโคอยู่ 3 ng และพบแถบดีเอ็นเอปรากฏระดับต่ำสุดที่เนื้อกระบือ 1% ซึ่งมีดีเอ็นเอของกระบืออยู่ 3 ng แสดงว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อโคผสมเนื้อกระบือได้ที่ระดับเนื้อโคต่ำสุด 3 ng และระดับเนื้อกระบือต่ำสุด 3 ng

## 4.6 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ

เพื่อทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเนื้อผสม ได้แก่ สุกร โค และกระบือ สุกร โคและไก่ ที่สัดส่วน 30% ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด(Homogenizer) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วย water bath ที่ 82°C 20 นาที และให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ ที่ 116°C 30 และ60 นาที และเนื้อผสมที่ไม่ผ่านความร้อน ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.18-4.19

### 4.5.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือ

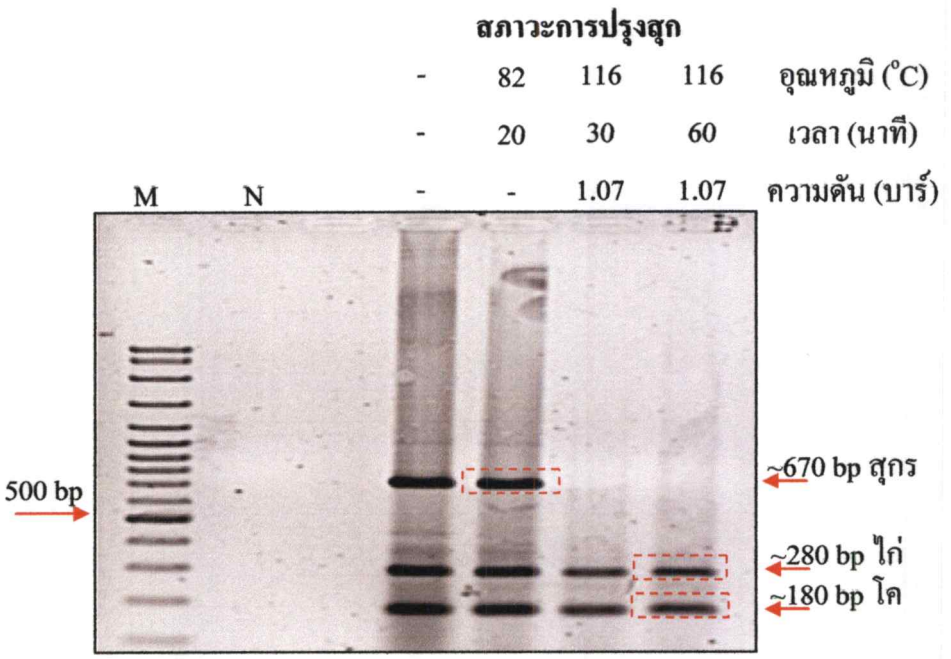



**ภาพที่ 4.18** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิด แถบ M แทนแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสุกร กระบือ ไก่และโค แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรเมื่อผสมกับเนื้อโค และเนื้อกระบือได้จากเนื้อสด และเนื้อที่ผ่านความ

ร้อน 82°C 20 นาที เท่านั้น ส่วนดีเอ็นเอของเนื้อโค และกระบือ ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบได้ที่เนื้อสด เนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที 116°C 30 นาที และ116°C 60 นาที แสดงว่าความร้อนสูงสุดที่ระดับ 116°C 60 นาที ไม่มีผลต่อการทำงานของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโคและกระบือ แต่ลดการทำงานของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสุกร

### 4.5.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อไก่



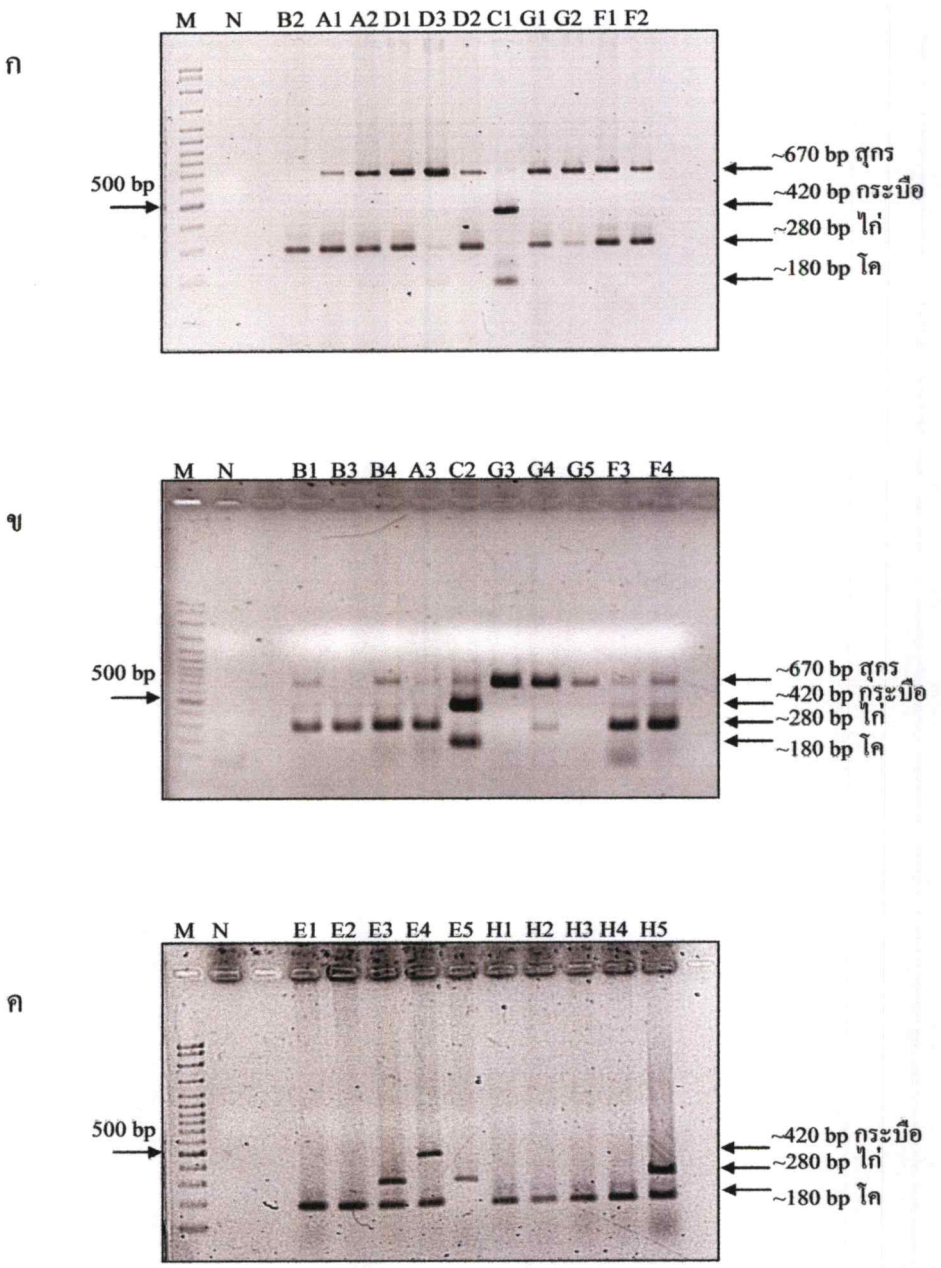

**ภาพที่ 4.19** ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอโดยผสมเนื้อสัตว์สามชนิดแถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder แถบ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

จากการทดลองพบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อสุกรเมื่อผสมกับเนื้อโค และเนื้อไก่ได้จากเนื้อสด และเนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที เท่านั้น ส่วนดีเอ็นเอของเนื้อโค และไก่ ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจพบได้ที่เนื้อสด เนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที 116°C 30 นาที และ116°C 60 นาที แสดงว่าความร้อนสูงสุดที่ระดับ 116°C 60 นาที ไม่มีผลต่อการทำงานของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไก่และโค แต่ลดการทำงานของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสุกร

## 4.7 การวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

เพื่อทดสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 31 ตัวอย่าง โดยทดสอบกับชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่นำมาทดสอบได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประเภท

ไส้กรอก จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ไส้กรอกหมู 3 ตัวอย่าง ไส้กรอกไก่ 4 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทซาลามี่ 2 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทลูกชิ้น จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ลูกชิ้นหมู 3 ตัวอย่าง ลูกชิ้นเนื้อโค 5 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทหมูยอ 4 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทแหนม 5 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ประเภทแฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 5 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองตามภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.1




**ภาพที่ 4.20** ผลการวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ไส้กรอกไก่B2 ไส้กรอกหมูA1 A2 ลูกชิ้นหมูD1-D3 ซาลามี่C1 แหนมG1 G2 หมูยอF1 F2 (ก) ไส้กรอกB1 B3 B4 ไส้กรอกหมูA3 ซาลามี่C2 แหนม G3-G5 หมูยอF3 F4 (ข) และลูกชิ้นเนื้อโคE1-E5 แฮมเบอร์เกอร์H1-H5 (ค) แถบ M แทนดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100-bp DNA Ladder และ N แทน negative control (ไม่มีดีเอ็นเอ)

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

| ประเภทของผลิตภัณฑ์ | เนื้อสัตว์ที่ระบุบนฉลากสินค้า | สุกร | ไก่ | โค | กระบือ | ความเที่ยงตรงของสินค้า | สัดส่วนความเที่ยงตรง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอก:* | | | | | | | |
| *ไส้กรอกหมู* (A) | | | | | | | 0/3 |
| ไส้กรอกหมูคอกเทล 1 | เนื้อสัตว์ | + | + | - | - | X | |
| ไส้กรอกหมู 2 | เนื้อหมู | + | + | - | - | X | |
| ไส้กรอกหมู 3 | ไม่ระบุ | + | + | - | - | X | |
| *ไส้กรอกไก่* (B) | | | | | | | 2/4 |
| ไส้กรอกไก่คอกเทล 1 | เนื้อสัตว์ | + | + | - | - | X | |
| ไส้กรอกซีสไก่ 2 | เนื้อสัตว์ | - | + | - | - | ✓ | |
| ไส้กรอกไก่ 3 | ไม่ระบุ | - | + | - | - | ✓ | |
| ไส้กรอกซีสไก่ 4 | ไม่ระบุ | + | + | - | - | X | |
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทซาลามี่:* (C) | | | | | | | 0/2 |
| ซาลามี่ 1 | เนื้อวัว เนื้อหมู มันหมู | + | - | + | + | X | |
| ซาลามี่ 2 | เนื้อวัว เนื้อหมู มันหมู | + | - | + | + | X | |
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทลูกชิ้น:* | | | | | | | |
| *ลูกชิ้นเนื้อหมู* (D) | | | | | | | 1/3 |
| ลูกชิ้นเอ็นหมู 1 | เนื้อสัตว์ | + | + | - | - | X | |
| ลูกชิ้นเอ็นหมู 2 | เนื้อหมู เอ็นหมู | + | + | - | - | X | |
| ลูกชิ้นหมู 3 | เนื้อหมู | + | - | - | - | ✓ | |
| *ลูกชิ้นเนื้อโค* (E) | | | | | | | 2/5 |
| ลูกชิ้นเนื้อ 1 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| ลูกชิ้นเนื้อ 2 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| ลูกชิ้นเนื้อ 3 | ไม่ระบุ | - | + | + | - | X | |
| ลูกชิ้นเนื้อ 4 | ไม่ระบุ | - | - | + | + | X | |
| ลูกชิ้นเนื้อ 5 | ไม่ระบุ | - | + | - | - | X | |
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทหมูยอ:* (F) | | | | | | | 0/4 |
| หมูยอ 1 | เนื้อหมู มันหมู | + | + | - | - | X | |
| หมูยอ 2 | เนื้อหมู มันหมู | + | + | - | - | X | |
| หมูยอ 3 | เนื้อหมู มันหมู | + | + | - | - | X | |
| หมูยอ 4 | เนื้อหมู | + | + | - | - | X | |
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทแหนม:* (G) | | | | | | | 2/5 |
| หมูแหนม 1 | เนื้อหมู หนังหมู | + | + | - | - | X | |
| แหนมตุ้ม 2 | ไม่ระบุ | + | + | - | - | X | |
| แหนม 3 | เนื้อหมู หนังหมู | + | - | - | - | ✓ | |
| แหนม 4 | เนื้อหมู หนังหมู | + | + | - | - | X | |
| แหนม 5 | เนื้อหมู หนังหมู หูหมู | + | - | - | - | ✓ | |

**ตารางที่ 4.2** ผลการวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป (ต่อ)

| ประเภทของผลิตภัณฑ์ | เนื้อสัตว์ที่ระบุบนฉลากสินค้า | สุกร | ไก่ | โค | กระบือ | ความเที่ยงตรงของสินค้า | สัดส่วนความเที่ยงตรง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *- ผลิตภัณฑ์ประเภทแฮมเบอร์เกอร์:* (H) | | | | | | | 4/5 |
| แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 1 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 2 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 3 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 4 | ไม่ระบุ | - | - | + | - | ✓ | |
| แฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 5 | ไม่ระบุ | - | + | + | - | X | |

\+ : พบแถบดีเอ็นเอ

\- : ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

X : พบดีเอ็นเอสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ

✓ : พบดีเอ็นเอสัตว์ตรงตามที่ฉลากระบุ

เมื่อนำตัวอย่างไส้กรอกหมู จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ A1 A2 และ A3 มาตรวจจำแนกสปีชีส์ พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp และ 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร และไก่ ตามลำดับ จะสังเกตได้ว่าไส้กรอกหมูทั้ง 3 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ นอกจากนี้ตัวอย่าง A3 ไม่มีการระบุส่วนประกอบบนฉลากสินค้า

ตัวอย่างไส้กรอกไก่ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ B1 B2 B3 และB4 พบว่า ไส้กรอกไก่ B1 และ B4 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp และ 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร และไก่ ตามลำดับ ขณะที่ B2 และ B3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของไก่อย่างเดียว จะสังเกตได้ว่าไส้กรอกไก่ 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 4 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ นอกจากนี้ไส้กรอก B3 และ B4 ไม่มีการระบุส่วนประกอบบนฉลากสินค้า

ตัวอย่างซาลามี่ จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ C1 และ C2 พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp 420 bp และ 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร กระบือ และไก่ ตามลำดับ จะสังเกตได้ว่าซาลามีทั้ง 2 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ

ตัวอย่างลูกชิ้นเนื้อหมู 3 ตัวอย่าง ได้แก่ D1 D2 และ D3 พบว่า ลูกชิ้นเนื้อหมู D1 และ D2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp และ 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร และไก่ ตามลำดับ ขณะที่ D3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกรอย่างเดียว จะสังเกตได้ว่าลูกชิ้นเนื้อหมู 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 3 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ

ตัวอย่างลูกชิ้นเนื้อโค จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ E1-E5 พบว่า ลูกชิ้นเนื้อโค E3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 280 bp และ 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของไก่ และโค ตามลำดับ ลูกชิ้นเนื้อโค E4 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 420 bp และ 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของกระบือ และโค ตามลำดับ ลูกชิ้นเนื้อโค E5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของไก่อย่างเดียว ขณะที่ลูกชิ้นเนื้อโค E1 และ E2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของโคอย่างเดียว จะสังเกตได้ว่าลูกชิ้นเนื้อโค 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ นอกจากนี้ลูกชิ้นเนื้อโคทั้ง 5 ตัวอย่าง ไม่มีการระบุส่วนประกอบบนฉลากสินค้า

ตัวอย่างหมูยอ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F1 F2 F3 และ F4 พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp และ 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร และไก่ ตามลำดับ จะสังเกตได้ว่าหมูยอทั้ง 4 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ

ตัวอย่างแหนม จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ G1-G5 พบว่า แหนม G1 G2 และ G4 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp และ 280 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกร และไก่ ตามลำดับ ขณะที่ G3 และ G5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของสุกรอย่างเดียว จะสังเกตได้ว่าแหนม 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ นอกจากนี้ตัวอย่าง G2 ไม่มีการระบุส่วนประกอบบนฉลากสินค้า

ตัวอย่างแฮมเบอร์เกอร์ จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ H1-H5 พบว่า แฮมเบอร์เกอร์ H5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 280 bp และ 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของไก่ และโค ตามลำดับ ขณะที่ H1 H2 H3 และ H4 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 180 bp ซึ่งระบุได้ว่ามีส่วนประกอบจากดีเอ็นเอของโคอย่างเดียว จะสังเกตได้ว่าแฮมเบอร์เกอร์ 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ นอกจากนี้ตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ไม่มีการระบุส่วนประกอบบนฉลากสินค้า

โดยจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวน 31 ตัวอย่าง พบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวน 20 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบดีเอ็นเอของสัตว์อื่นที่ไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลากสินค้า โดยตรวจพบดีเอ็นเอของไก่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ระบุว่าผลิตมาจากเนื้อสุกรหรือเนื้อโคถึง 15 ตัวอย่าง

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

จากการทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณยีน 12S rRNA ที่จำเพาะต่อสัตว์สี่สปีชีส์คือ สุกร กระบือ ไก่ และโค กับดีเอ็นเอจากเลือดโคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่พื้นเมือง กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และหมูป่า พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดโค แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดไก่ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 420 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดกระบือ และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 670 bp เฉพาะดีเอ็นเอจากเลือดสุกร แสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของโค ไก่ กระบือ และสุกร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Tajima *et al.* (2002) ที่ออกแบบชุดไพรเมอร์จากยีน PRE-1 SINE, Art2 SINE และCR1 LINE แยกสัตว์ได้สามกลุ่มส์คือ สุกร สัตว์สี่กระเพาะ และไก่ ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 181, 179 และ201 bp ตามลำดับ และ Bellagamba *et al.* (2003) ออกแบบชุดไพรเมอร์จากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณยีน 12S rRNA แยกสัตว์ได้สามกลุ่มคือ สุกร สัตว์สี่กระเพาะ และไก่ โดยได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 186, 231 และ256 bp ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของสัตว์แต่ละสปีชีส์ที่รายงานโดย Tajima *et al.* (2002) และ Bellagamba *et al.* (2003) มีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ใกล้กันมากจะทำให้มีโอกาสในการแปลผลผิดพลาดสูง แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ที่มีความแตกต่างของขนาดผลผลิตพีซีอาร์ตั้งแต่ 100 bp ขึ้นไป ดังนั้นเมื่อผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จะเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นชัดเจน ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ง่าย และมีโอกาสผิดพลาดน้อยกว่า

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของชุดไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ(annealing temperature) อยู่ที่ 65°C และเมื่อแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า แถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แยกกันในแต่ละสปีชีส์อย่างชัดเจน ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น แสดงว่าสารเคมีและองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความเหมาะสม

## 5.2 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอ

จากการทดสอบความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือดของสุกร โค กระบือ และไก่ โดยเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ระดับ $10^{-5}$-$10^{2}$ ng พบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏที่ $10^{-1}$-$10^{2}$ ng ในสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ แสดงว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์อยู่ที่ระดับ 0.1 ng คือถ้ามีดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์อยู่ในตัวอย่างตรวจมากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 ng จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่บริเวณ 670, 420, 280 และ180 bp ซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์ของ สุกร กระบือ ไก่ และโค ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ Matsunaga *et al.* (1999) ที่ทำการแยกเนื้อสัตว์ 6 สปีชีส์ ได้แก่ โค สุกร ไก่ แกะ แพะ และม้า โดยผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 157, 227, 274, 331, 398 และ439 bp ตามลำดับ พบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ทั้ง 6 สปีชีส์ได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.25 ng ทำให้เห็นได้ว่าไพรเมอร์ชุดที่ออกแบบในการทดลองครั้งนี้มีความไวในการตรวจจับดีเอ็นเอดีกว่าวิธีการตรวจของ Matsunaga *et al.* (1999)

## 5.3 การทดสอบการตรวจจับดีเอ็นเอในเนื้อดิบและเนื้อผสมที่ผ่านความร้อนสภาวะต่างๆ

จากการทดสอบความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเนื้อผสม 2 ชนิดได้แก่ สุกร และโค สุกร และไก่ ที่สัดส่วน $10^{-4}$, $10^{-3}$, $10^{-2}$, $10^{-1}$, 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ100% เนื้อสุกร โคและกระบือ ที่สัดส่วน 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95, 99 และ 100% จากนั้นนำไปผ่านขบวนการให้ความร้อนที่ระดับต่างๆ คือ ให้ความร้อนด้วย water bath ที่ 82°C 20 นาที และให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ ที่ 116°C 30 และ60 นาที และเนื้อผสมที่ไม่ผ่านความร้อน โดยความร้อนที่ใช้เป็นความร้อนที่สูงกว่าความร้อนในขบวนการแปรรูปเนื้อสัตว์โดยทั่วไป ซึ่งจะอยู่ที่ประมาณ 75-80°C (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และคณะ 2549) จากผลการทดสอบพบว่าตรวจพบเนื้อโค กระบือ และไก่ ที่ระดับการผสมต่ำสุดที่ 1% ซึ่งสอดคล้องกับ Rodriguez *et al.* (2004) ที่ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 12S rRNA ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียของ สุกร โค แกะ และแพะ โดยสัตว์แต่ละสปีชีส์ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด และความสามารถในการตรวจจับอยู่ที่ 1% ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่ผสมอยู่

ในส่วนของเนื้อสุกรพบว่าตรวจพบได้ที่ระดับการผสมต่ำสุดที่ 1, 10, 10 และ90% จากเนื้อดิบ เนื้อที่ผ่านความร้อนที่ 82°C 20 นาที 116°C 30 และ60 นาที ตามลำดับ ซึ่งการผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรจากชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความสามารถในการตรวจจับลดลงเมื่อเนื้อสัตว์ผสมมีการผ่านความร้อนและเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากความร้อนโดย Momcilovic and Avraham. (2000) กล่าวว่า อุณหภูมิที่สูงทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่กลายเป็น

สายเดี่ยว โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ นอกจากนั้นอุณหภูมิและความดันที่สูงจะไปทำลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้ดีเอ็นเอแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ ด้วยเหตุนี้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกรจากการทดลองนี้มีความยาวมากที่สุดคือประมาณ 670 bp ทำให้เมื่อทำการเพิ่มปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์มีความสามารถในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้น้อยลงเนื่องจากดีเอ็นเอต้นแบบบางส่วนเริ่มแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ

จากการทดสอบชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบกับเนื้อผสม 3 ชนิดได้แก่ สุกร โค และกระบือ สุกร โคและไก่ ที่สัดส่วนชนิดละ 30% จากนั้นนำไปผ่านขบวนการให้ความร้อนที่ระดับต่างๆ คือ ให้ความร้อนด้วย water bath ที่ 82°C 20 นาที และให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำที่ 116°C 30 และ60 นาที และเนื้อผสมที่ไม่ผ่านความร้อน พบว่า ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของกระบือ ไก่ และโค ได้ในทุกขบวนการให้ความร้อน แต่ในส่วนของดีเอ็นเอสุกรชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่สามารถตรวจจับดีเอ็นเอจากเนื้อผสมที่ผ่านความร้อน 116°C 30 และ60 นาที ได้ เนื่องจากอุณหภูมิและความดันที่สูงจะไปทำลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้ดีเอ็นเอแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ (Momcilovic and Avraham. 2000) และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Arslan *et al.* (2005) ที่ทำการทดสอบผลของความร้อนจากขบวนการปรุงอาหารต่อดีเอ็นเอของเนื้อโคด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยมีผลผลิตขนาด 271 คู่เบส ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอได้จากเนื้อที่ผ่านขบวนการ ต้มที่อุณหภูมิ 97.5°C 230 นาที นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ(1.07 bar) 120°C 90 นาที ได้ เห็นได้ว่าจากการทดลองของ Arslan *et al.* (2005) นั้นสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของโคได้ที่ระดับเนื้อที่ผ่านความร้อนสูงกว่า และเวลาที่นานกว่า แต่ถ้าเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ของโคจากการทดลองนี้ซึ่งมีขนาด 180 bp ซึ่งมีขนาดที่เล็กกว่า ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถตรวจจับดีเอ็นเอที่ผ่านอุณหภูมิและเวลาที่มากกว่าได้

ต่างจาก Calvo *et al.* (2001) ซึ่งการหาปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุว่าทำจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ 161 bp พบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.005% ในเนื้อที่ผ่านความร้อน 120°C 30 นาที ทำให้เห็นได้ว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกรของ Calvo *et al.* (2001) ดีกว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกรของการทดลองครั้งนี้ในด้านของขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่เล็กกว่าดังนั้นจึงสามารถจับดีเอ็นเอที่ผ่านอุณหภูมิและเวลาที่มากกว่าได้ แต่ในการทดลองครั้งนี้สามารถแยกสปีชีส์สัตว์สี่ชนิดได้ในการทำงานครั้งเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับ Calvo *et al.* (2001) ที่ทำการแยกดีเอ็นเอของสุกรอย่างเดียว ซึ่งในบางครั้งเมื่อนำไพรเมอร์มารวมกันจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสปีชีส์ลดลง (Bellagamba *et al.* 2003)

## 5.4 การวิเคราะห์สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

จากการทดสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 31 ตัวอย่าง โดยทดสอบกับชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่นำมาทดสอบได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอก จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ไส้กรอกหมู 3 ตัวอย่าง ไส้กรอกไก่ 4 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทซาลามี่ 2 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทลูกชิ้น จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ลูกชิ้นหมู 3 ตัวอย่าง ลูกชิ้นเนื้อโค 5 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทหมูยอ 4 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ประเภทแหนม 5 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ประเภทแฮมเบอร์เกอร์เนื้อ 5 ตัวอย่าง โดยจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวน 31 ตัวอย่าง พบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวน 20 ตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอของสัตว์อื่นที่ไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลากสินค้า โดยตรวจพบดีเอ็นเอของไก่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ระบุว่าผลิตมาจากเนื้อสุกรหรือเนื้อโคถึง 15 ตัวอย่าง โดยที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปมากมาย โดยในทุกงานวิจัยพบว่ามีผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปอย่างน้อยหนึ่งตัวอย่างที่มีส่วนประกอบไม่ตรงตามที่ฉลากระบุ (Martinez and Yman. 1999, Calvo *et al.* 2001, Wang *et al.* 2004, Di Pinto *et al.* 2004) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการตรวจแยกสปีชีส์สัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป งานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จำแนกชนิดของเนื้อสัตว์หลักสี่ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป คือ สุกร โค กระบือ และไก่ ทำให้เห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปไม่ได้มีส่วนประกอบเนื้อสัตว์ตรงตามที่ระบุในฉลากเสมอไป

อย่างไรก็ตามความสามารถของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ผ่านกระบวนการผลิตรูปแบบอื่นๆ ซึ่งอาจมีการทำลายดีเอ็นเอในระหว่างขั้นตอนการผลิต เช่น การย่าง การอบ การทอด การปิ้ง การนึ่ง รวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป และผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ ยังจะต้องทำการศึกษาในลำดับต่อไป

# บทที่ 6
# สรุปและข้อเสนอแนะ

## 6.1 สรุปผลการทดลอง

ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (annealing) ที่ 65°C เพราะหลังจากผ่านขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์ 4 สปีชีส์สามารถทำงานได้พร้อมกันโดยได้แถบดีเอ็นของสุกร กระบือ ไก่ และโค ที่ประมาณ 670, 420, 280 และ180 bp ตามลำดับ โดยไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น

ความสามารถในการตรวจจับดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่าความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์อยู่ที่ระดับ 0.1 ng

เมื่อทดสอบชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ กับเนื้อผสมชนิด และอุณหภูมิต่างๆพบว่า เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 1% ในเนื้อสด ส่วนเนื้อผ่านความร้อน 82°C 20 นาที และ116°C 30 นาที สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 10% และที่ความร้อน 116°C 60 นาที ตรวจพบดีเอ็นเอสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 50% ในส่วนของดีเอ็นเอจากเนื้อไก่สามารถตรวจพบได้ที่ระดับเนื้อไก่ 1% ทั้งในเนื้อสดและเนื้อที่ผ่านความร้อนระดับต่างๆ

เนื้อสุกรผสมเนื้อโค สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 1% ในเนื้อสด ส่วนเนื้อผ่านความร้อน 82°C 20 นาที และ116°C 30 นาทีสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 10% และที่ความร้อน 116°C 60 นาที ตรวจพบดีเอ็นเอสุกรได้ที่ระดับเนื้อสุกร 90% ส่วนของดีเอ็นเอจากเนื้อโคสามารถตรวจพบได้ที่ระดับเนื้อโค 1% ทั้งในเนื้อสด และเนื้อที่ผ่านความร้อนระดับต่างๆ

เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของโคได้ที่ระดับเนื้อโค 1% และตรวจพบดีเอ็นเอของกระบือได้ที่ระดับเนื้อกระบือ 1% ทั้งในเนื้อสดและเนื้อที่ผ่านความร้อนระดับต่างๆ

เนื้อผสมสามชนิดคือ สุกร โค และกระบือ สุกร โคและไก่ ที่สัดส่วน 30 g ในเนื้อผสมที่ไม่ผ่านความร้อน ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที 116°C 30 และ 60 นาที พบว่าสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้ที่เนื้อสดและเนื้อที่ผ่านความร้อน 82°C 20 นาที เท่านั้น ส่วนเนื้อโค กระบือ และไก่ สามารถตรวจจับดีเอ็นเอได้ในเนื้อที่ผ่านขบวนการให้ความร้อนทั้งหมด

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำนวน 31 ตัวอย่าง มีถึง 20 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบดีเอ็นเอของสัตว์อื่นที่ไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลากสินค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจพบดีเอ็นเอของไก่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ระบุว่าผลิตมาจากเนื้อสุกรหรือเนื้อโคถึง 15 ตัวอย่าง ทั้งนี้บนฉลากสินค้าบางตัวอย่างมีการหลีกเลี่ยงการบอกส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์โดยระบุแต่เพียงว่าผลิตจากเนื้อสัตว์โดยไม่บ่งบอกว่าเนื้อสัตว์ชนิดใดหรือบางครั้งไม่พบการระบุส่วนประกอบ

## 6.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1.การออกแบบไพรเมอร์ที่มีผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความยาวน้อยกว่าจะสามารถจับกับดีเอ็นเอสายสั้นๆได้มากกว่า ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกร มีขนาดประมาณ 670 bp ทำให้เมื่อนำไปทดสอบกับดีเอ็นเอที่ผ่านความร้อนและความดันสูง ดีเอ็นเอถูกทำให้แตกหักไปมาก ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสุกรจึงทำงานได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่มีขนาดเล็กกว่า จึงควรออกแบบไพรเมอร์ของสุกรให้มีความยาวน้อยกว่านี้

2.ทำการทดสอบชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบกับดีเอ็นเอจากสัตว์สปีชีส์อื่นๆให้มากกว่านี้ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่จับข้ามสปีชีส์กับดีเอ็นเอของสัตว์อื่น

3.การทดลองนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์สี่สปีชีส์คือ สุกร โค กระบือ และไก่ โดยสามารถทำการแยกดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ที่ผสมอยู่ภายในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เพียงครั้งเดียว จึงทำให้ง่ายต่อการทำงาน ประหยัดเวลา และมีความแม่นยำในการตรวจสอบสูง โดยสามารถนำไปใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการ

4.จากการทดลองนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อโดยใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งสามารถแปรผลได้ละเอียดและมีความแม่นยำมากกว่า รวมทั้งสามารถคำนวณกลับหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่ตรวจพบได้อีกด้วย

5.สามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปได้ในอนาคต โดยการลดเวลาและขั้นตอนในการปฏิบัติงานลงเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่เร็วที่สุด ซึ่งจะง่ายต่อการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ต้องการทราบวัตถุดิบเนื้อที่นำมาเป็นส่วนประกอบ

# บรรณานุกรม


กฤษณา จรรยาพูน. 2548. **พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน.** ขอนแก่น : แอนนาออฟเซต.

กัลยา บุญญานุวัตร, สมมาตร สุวรรณมาโจ และวินิจ คำสังข์. 2548. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์.** รายงานผลงานวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และการจัดการฟาร์ม ประจำปี 2548. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์.

ปรีดา เลิศวัชระสารกุล, นิกร ทองทิพย์, สุปราณี บุญโนนแต้, วรวิทย์ วัชชวัลคุ, สิทธิเดช มหาสาวังกุล, ทวีโภค อังควาณิช, และ ศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช. 2546. "ความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมในส่วนยีน cytochrome b ของช้างไทย." **วิทยาสารกำแพงแสน.** 1(1) : 33-39.

จารุณี มหารัตน์, เอื้อมนัส อินทรผาด และพจชนาถ จันทรัศมี. 2548. "พัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอหมูจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์." ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27(5) : 993-1002.

จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, วิระพงศ์ ลุลิตานนท์ และ วิเศษ นามวาท. 2540. **PCR Technology and Applications.** ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2549. **เอกสารการฝึกอบรม"ผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากเนื้อสุกร ครั้งที่ 3".** คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์.** กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2545. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.** กรุงเทพฯ. สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2547. **การจัดการเนื้อสัตว์.** โรงพิมพ์มิ่งเมือง. เชียงใหม่.

สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ. 2547. **ชีวโมเลกุล.** กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, วิระพงศ์ ลุลิตานนท์ และ วิเศษ นามวาท. 2540. **PCR Technology and Applications.** ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ.** กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรรัตน์ จงสวัสดิ์วรกูล และลัดดา เหมาะสุวรรณ. "Evidence-based Maillard reaction: focusing on parenteral nutrition." **วารสารโภชนบำบัด.** 13(1) : 3-11.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส.** กรุงเทพฯ : สหมิตรออฟเซท.

Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R. and Son, R. 2005. "Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication." **Meat Sci.** 69(1) : 47-52.

Altmann, S.M., 1998. **The Actin-Myosin-Syatem.** [Online].Available : http://www.embl-heidelberg.de/CellBiophys/LocalProbes/motorproteins/myosin.html.

Arslan, A., Irfan, I.O. and Calicioglu, M. 2006. "Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique." **Meat Sci.** 72 : 326-330.

Armstrong, E., Postiglioni, A., Martinez, A., Rincon, G. and Vega-Pla, J. L. 2006. "Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*)." **Genet. Mol. Biol.** 29 : 267-272.

Bellagamba, F., Valfre, F., Panseri, S. and Moretti, V.M. 2003. "Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal." **J. Food Prot.** 66(4) : 682-685.

Bellis, C., Ashton, K.J., Freney, L., Blair, B. and Griffiths, L.R., 2003. "A molecular genetic approach for forensic animal species identification." **J. Forensic Sci.** 134 : 99-108.

Bottero, MT., Dalmasso, I.A., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Goria, M. and Civera, T. 2003. "Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds." **J. Food Prot.** 66(12) : 2307-2312.

Brenneman, R.A., Chase Jr, C.C., Olson, T.A., Riley, D.G. and Coleman, S.W. 2007. "Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds." **Anim. Genet.** 38 : 50-53.

Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P. 2001. "Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate." **J. Agr. Food Chem.** 50(19) : 5265-5267.

Cervini, M., Henrique-Silva, F., Mortari Norma. and Matheucci E. 2006. "Genetic variabillity of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazillion Nellore cattle (*Bos indicus*)." **Genet. Mol. Biol.** 29 : 486-490.

Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T. and Kato, S. 1990. "Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay." **Meat Sci.** 27(2) : 119-128

Ciampolini, R., Moazami-Goudarzi, K., Vaiman, D., Dillmnn, C., Mazzanti, E., Foulley, J., Leveziel, H. and Cianci, D. 1995. "Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds." **J. Anim. Sci.** 73 : 3259-3268.

Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., vera, T., Rosati, S. and Bottero, M.T. 2003. "A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs." **Mol. Cell Probe.** 18(2) : 81-87.

Di Pinto, A., Forte, V.T., Conversano, M.C. and Tantillo, G.M. 2004. "Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources." **Food Control.** 16(5) : 391-394.

Dooley, J.J., Paine, K.E. Garrett, S.D. and Brown, H.M. 2004. "Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays." **Meat Sci.** 68(3) : 431-438.

Garner, E.C., Campbell, C.S., Weibel, D.B. and Dyche Mullins, R. 2007. "Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog." **Science.** 315 : 1270-1274.

Hall, T. 1997. **BioEdit.** [Online].Available : http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html.

Helms, C. 1990 **Salting out Procedure for Human DNA extraction.** [Online].Available : http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/dna/dna2.html.

Hsieh, Y.H., Sheu, C. and Bridgman, C. 1998. "Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats." **J. Food Prot.** 61 : 476-481.

Hunt, D.J., Parkes, H.C. and Lumley, L.D. 1997. "Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes." **Food Chem.** 60(3) : 437-442.

Jurka, J., Ietkiewicz, Z.E. and Labuda, D. 1995. "Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era." **Nucleic Acids Res.** 23(1) : 170-175.

Kim, K. S., Yeo, J. S. and Choi, C. B. 2002. "Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data." **Anim. Genet.** 33 : 201-204.

Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A., Sbisa, E. and Saccone, C. 2002. "Lineage specificity of the evolutionary dynamicsof the mtDNA D-Loop Region in rodent." **J. Mol. Evol.** 54(2) : 145-155.

Long-Cheng, L. 2006. **Simplified DNA Extraction from Cell or Tissue.** [Online]. Available : http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/1157.html.

Lopez-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Isabel Prieto, M. and Puyet, A. 2005. "Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction." **Anal. Biochem.** 339(1) : 73-83.

Ma, W. and Lambert, D. 1997. "Minisatellite DNA markers reveal hybridization between the endangered black robin and tomtit." **Electrophoresis.** 18 : 1682-1687.

Martinez, I. and Yman, I.M. 1999. "Identification in meat products by RAPD analysis." **Food Res. Int.** 31(6-7) : 459-466.

Martin-Burriel, I., Garcia-Muro, E. and Zaragoza, P. 1999. "Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites." **Anim. Genet.** 30 : 177-182.

Mateus, J. C., Penedo, M. C. T., Alves, V. C., Ramos, M. and Rangel-Figueiredo, T. 2004. "Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle reeds using microsatellites." **Anim.Genet.** 35 : 106-113.

Matsunaga, T.K., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shitaba, K., Yamada, J. and Shinmura, Y. 1999. "A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay." **Meat Sci.** 51 : 143-148.

Maudet, C., Luikart, G. and Taberlet, P. 2002. "Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis." **J. Anim. Sci.** 80 : 942-950.

Menotti-Raymond , M., David, V.A., Lyons, L.A., Schaffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton, M.K. and O'Brien, S.J. 1999. "A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (Felis catus)." **Genomics.** 57 : 9-23.

Meyer, R. and Candrian, U. 1996. "PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components." **Lebenson. Wiss. Technol.** 29(1-2) : 1-9.

Meyer, R., Candrian, U. and Luthy, J. 2002. "Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction." **J. AOAC Int.** 77(3) : 617-622.

Miller, H.C., Lambert, D.M., Millar, C.D., Robertson, B.C. and Minot, E.O. 2003. "Minisatellite DNA profiling detects lineages and parentage in the endangered kakapo (*Strigops habroptilus*) despite low microsatellite DNA variation." **Conserv. Genet.** 4 : 265-274.

**Mitochondrial DNA.** 2006. [Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Image: Mitochondrial_DNA_en.svg

Moazami-Goudarzi, K., Laloë, D., Furet, J. P. and Grosclaude, F. 1997. "Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites." **Anim. Genet.** 28 : 338-345.

Momcilovic, D. and Avraham, R. 2000. "Detection ad Analysis of Animal Materials in Food and Feed." **J. Food Protect.** 63(11) : 1602-1609.

Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncales, P., Lopez-Perez, M.J. and Perez-Martos, A. 2000. "Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA." **J. Agr. Food Chem.** 48(7) : 2829-2832.

Murray, B.W., McClymont, R.A. and Strobeck, C. 1995. "Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR – amplified mitochondrial DNA." **J. Forensic Sci.** 40(6) : 943-951.

Poetsch, M., Seefeldt, S., Maschke, M. and Lignitz, E. 2001. "Analysis of mocrosatellite polymorphism in red deer, roe deer and fallow deer-possible employment in forensic applications." **J. Forensic Sci.** 116 : 1-8.

Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., Pérez-Martín, R.I., Martínez, I., Jacobsen, T., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Etienne, M., Jerome, M., Craig, A., Mackie, I.M. and Jessen, F. 1999. "Development of a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis reference method for the analysis and identification of fish species in raw and heat-processed samples: a collaborative study." **Electrophoresis.** 20 : 1425-1432.

Rajapaksha W.R., Thilakaratne I.D., Chandrasiri A.D. and Niroshan T.D. 2002. "Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meat of Sri Lanka." **J. Vet. Med. B.** 49(7) : 322-324.

Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Asensio, L., Hernandez, P.E. and Martin, R. 2004. "PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures." **J. Food Prot.** 67(1) : 172-177.

Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Hernandez, P.E. and Martin, R. 2005. "TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures." **Meat Sci.** 70 : 113-120.

Saez, R., Sanz, Y. and Toldrá, F. 2003. "PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products." **Meat Sci.**. 66(3) : 659-665.

Shiue, Y.L., Bicket, L.A., Caetano, A.R., Millon, L.V., Clark, R.S., Eggleston, M.L., Michelmore, R., Bailey, E., Guerin, G., Godard, S., Mickelson, J.R., Valberg, S.J., Murray, J.D. and Bowling, A.T. 1999. "A synteny map of the horse genome comprise of 240 mocrosatellite and RAPD marker." **Anim. Genet.** 30 : 1-9.

Tajima, K., Enishi, O., Amari, M., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Kurihara, M., Yanai, S., Matsui, H., Yasue, H., Mitsuhashi, T., Kawashima, T. and Matsumoto, M. 2002. "PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements." **Biosci. Biotech. Bioch.** 66(10) : 2247-2250.

Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G. and Battaglia, P.A. 1998. "Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine derived materials." **J. Food Prot.** 61(5) : 513-518.

Tasara, T., Schumacher, S. and Stephan, R. 2005. "Conventional and real-time PCR-based approaches for molecular detection and quantitation of bovine species material in edible gelatin." **J. Food. Prot.** 68(11) : 2420-2426.

Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K. and Lenstra, J.A. 2002. "Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA." **Meat Sci.** 60 : 365-369.

Wang, H.C., Lee, S.H., Chang, T.J. and Wong, M.L. 2004. "Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) technique." **J. Vet. Med. Sci.** 66(7) : 855-859.

Zajc, I. and Sampson, J. 1999. "Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure breed dogs." **J. Hered.** 90 : 104-107.

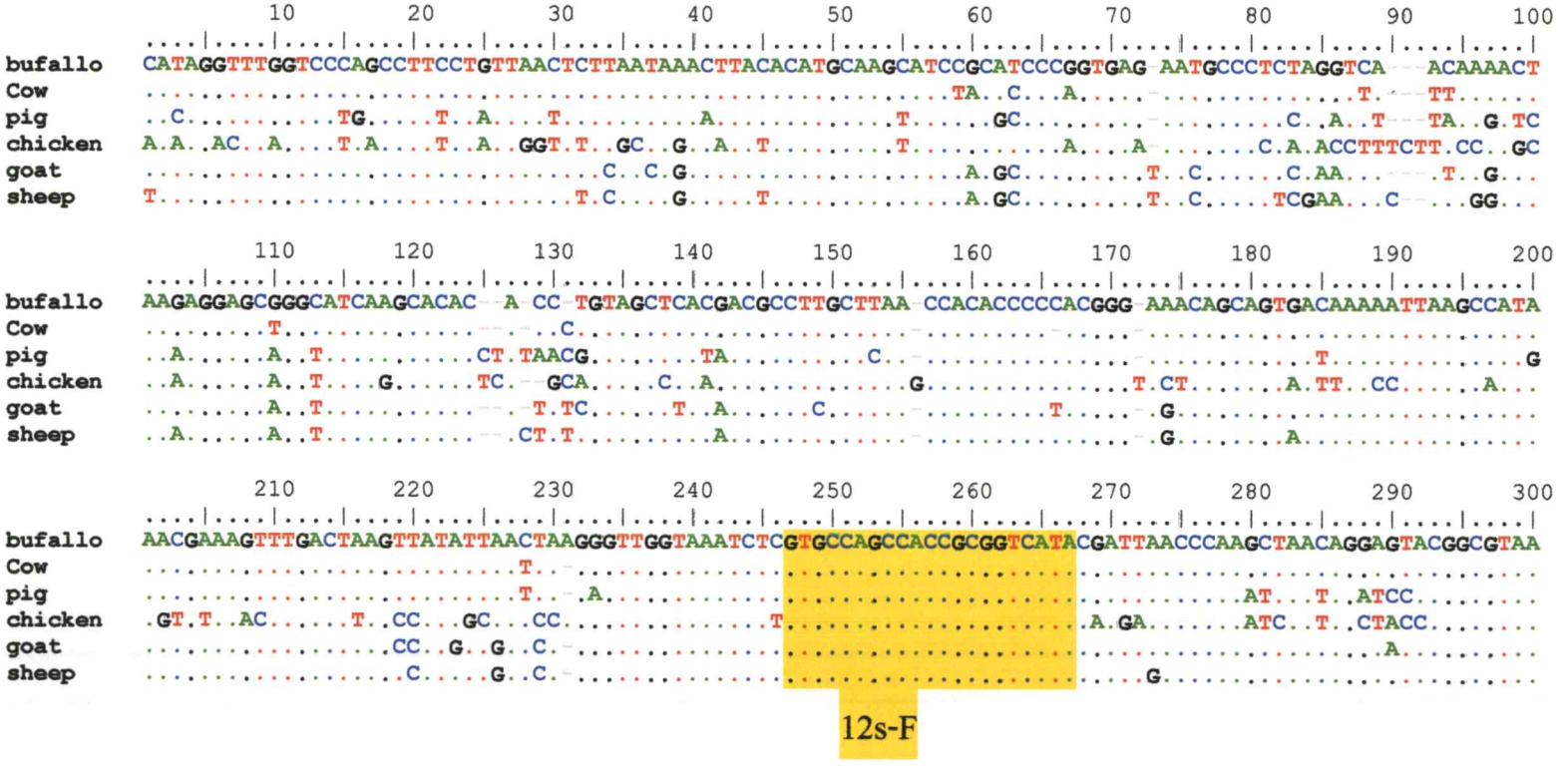
Zehner, R., Zimmermann, S. and Mebs, D. 1998. "RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man : methodology and forensic application." **J. Legal Int.** 111(6) : 323-327.

# ภาคผนวก

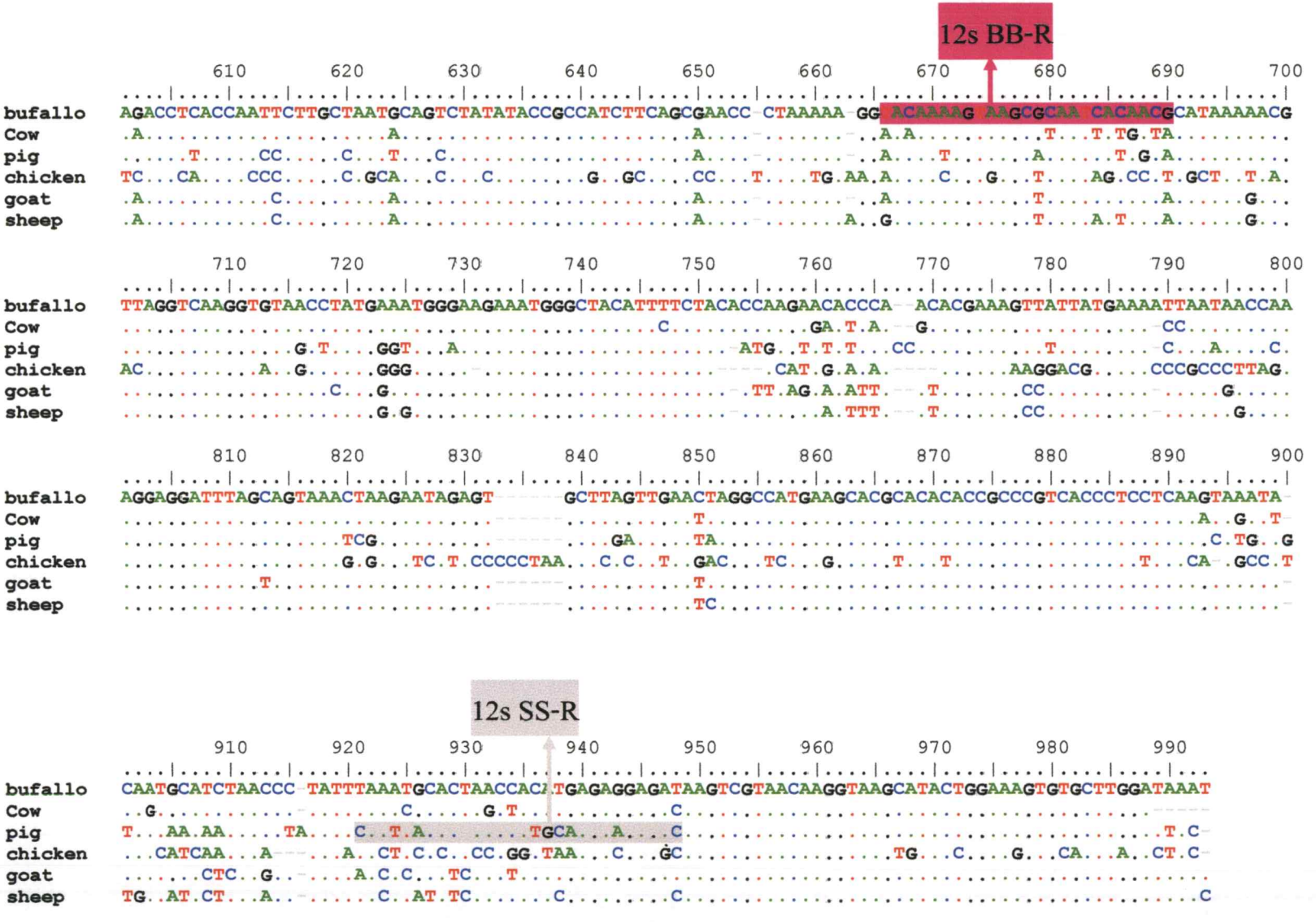
# ภาคผนวก ก

## การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 12SrRNA ของสัตว์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 12S rRNA ของ สุกร (AY574048), โค (V00654), กระบือ (AY702618), แพะ (AF533441), แกะ (AF010406) และไก่ (AP003323) ด้วยโปรแกรม ClustalW ใน Bio Edit (version 7.0.8)



12s BT-R
12s GG-R
bufallo
Cow
pig
chicken
goat
sheep


12s BB-R
12s SS-R
bufallo
Cow
pig
chicken
goat
sheep

# ภาคผนวก ข

## การเตรียมสารเคมี

**1. การเตรียม Buffer A ปริมาตร 200 ml**

1.1 เตรียมสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดในตารางภาคผนวกที่ ข1

1.2 เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

1.3 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

1.4 เติม 0.75% Triton x-100 ปริมาณ 1.5 ml

1.5 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 7.6

1.6 เก็บที่อุณหภูมิ 20°C

**ตารางผนวกที่ ข1** ส่วนประกอบของ Buffer A

| สาร | ปริมาณ | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|---|---|
| Sucrose | 21.9072 g | 0.32 M |
| Tris-HCl | 0.2422 g | 10 mM |
| $MgCl_2$ | 0.2033 g | 5 mM |

**2. การเตรียม Buffer B ปริมาตร 200 ml**

2.1 เตรียมสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดในตารางภาคผนวกที่ ข2

2.2 เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

2.3 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 7.4

2.4 เก็บที่อุณหภูมิ 20°C

**ตารางผนวกที่ ข2** ส่วนประกอบของ Buffer B

| สาร | ปริมาณ | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|---|---|
| Tris-HCl | 0.4845 g | 20 M |
| $N_2EDTA$ | 0.2977 g | 4 mM |
| NaCl | 1.1688 g | 100 mM |

**3.10XTBE buffer ปริมาตร 1,000 ml**

3.1 เตรียมสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดในตารางภาคผนวกที่ ข3

3.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml

3.3 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 8.3

3.4 เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

**ตารางผนวกที่ ข3** ส่วนประกอบของ 10XTBE buffer

| สาร | ปริมาณ |
|---|---|
| Tris-base | 107.80 g |
| Borric acid | 55 g |
| $N_2$EDTA | 7.44 g |

**4. 6X Loading buffer ปริมาตร 10 ml**

4.1 เตรียมสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนดในตารางภาคผนวกที่ ข4

4.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml

4.3 เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4°C

4.4 ผสม ethydium bromide (10 mg/ml) 1หยด

**ตารางผนวกที่ ข4** ส่วนประกอบของ 6X Loading buffer

| สาร | ปริมาณ | ความเข้มข้นสุดท้าย |
|---|---|---|
| Bromophenol blue | 2.5 g | 25% |
| Xylene cyanol | 2.5 g | 25% |
| Glycerol | 3 ml | 30% |

**5. Agarose gel ความเข้มข้น 1%**

5.1 Agarose gel 1 g

5.2 เติม 1x TBE buffer ปริมาตร 100 ml

5.3 ต้มในไมโครเวฟ จนเดือด

5.4 รอจนเย็นลง จากนั้นเทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้

# ภาคผนวก ค

## ขบวนการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูป

### 1. ขบวนการผลิตไส้กรอก

**สูตรในการทำไส้กรอก**

| | |
|---|---|
| เนื้อโคบด | 60% |
| เนื้อสุกรบด | 10% |
| มันสุกร (แข็ง) บด | 30% |
| โปรตีนถั่วเหลือง หรือโพรแมกซ์ | 3% |
| เครื่องเทศ เช่น เทศเวียนนา, พริกไทย, กระเทียม ฯลฯ | 0.5-10% |
| เกลือ | 2% |
| ผงเพรก | 0.375% |
| แอกคอร์ท | 0.3-0.5% |
| เวจามีน | 0.5% |
| เอนดูริท 685 (ไม่จำเป็น) | 2% |
| น้ำแข็งบด | 40% |
| รีกัลป์เบส 2567 | 0.5-1.0% |

ข้อควรระวัง

เนื้อสุกร เนื้อโค และมันสุกรจะต้องเย็นจัด 5°C (ประมาณ 40°F) เมื่อเทใส่กะทะตีเนื้อถึงแม้ในขณะที่บดก็ควรรักษาอุณหภูมิให้เย็นเสมอและใบมีดของกะทะตีเนื้อจะต้องคมมากเช่นกัน ถึงจะได้ไส้กรอกที่ดี

วิธีทำ

เทเนื้อโคและสุกรลงในกะทะตีเนื้อเป็นอันดับแรกแล้วใส่น้ำแข็งเพียงครึ่งหนึ่งของที่เตรียมไว้ เดินเครื่องพร้อมกับใส่ผงเพรก แอกคอร์ท เวจามีน เอนดูริท เกลือ เครื่องเทศ รอสักครู่จึงใส่โปรตีนถั่วเหลือง หรือโพรแมกซ์ เมื่อเดินเครื่องได้ 5 นาที ให้ใส่น้ำแข็งล้วนที่เหลือตามด้วยมันสุกรบด แล้วเปิดเครื่องต่ออีก 2-3 นาที ควรใช้เวลาทั้งหมดไม่เกิน 10-12 นาที เมื่อเสร็จแล้ว ต้องสังเกตว่าอุณหภูมิของเนื้อที่ตีแล้ว ไม่ควรเกิน 13°C ถ้าเกินกว่านี้แสดงว่าแช่เนื้อมาไม่เย็นพอ และหรือกะทะตีเนื้อไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอจะทำให้ไส้กรอกจับตัวกัน ไม่เด้งกรอบ และเก็บได้ไม่นาน

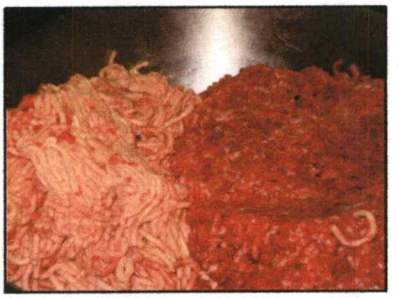
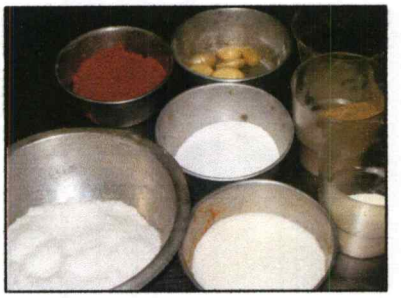
วิธีการอัดไส้กรอก

การอัดไส้กรอกในขณะที่เนื้อกำลังเย็น เมื่ออัดและผูกเป็นข้อๆ เรียบร้อยแล้ว แขวนผึ่งเอาไว้ ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนเข้าเตาอบรมควัน

วิธีการอบรมควัน

เปิดเตาอบให้มีอุณหภูมิภายใน 50°C (ประมาณ 122°F) แล้วแขวนไส้กรอกเข้าเตาให้เป็นระเบียบ ระวังอย่าให้ผิวของไส้กรอกสัมผัสกัน อบอุณหภูมินี้เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่ต้องรมควัน ในช่วงเวลาต่อจากนี้ให้รมควันได้โดยใช้แกลบ หรือชานอ้อยแห้งจุดให้มีควัน พร้อมกับเร่งไฟให้ความร้อนในเตาสูงขึ้นถึง 80°C (ประมาณ 176°F) ใช้เวลาทั้งหมด 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าไส้กรอกสุก 80% โดยสังเกตได้ง่ายๆ คือ ใช้นิ้วบีบดู ถ้ายังรู้สึกนิ่มหรือเละอยู่ ก็แสดงว่ายังไม่สุก แต่ถ้าบีบดูแล้วรู้สึกแข็ง ตึงดี ก็แสดงว่าสุกแล้ว

รีบนำออกจากเตา แล้วแช่ลงในน้ำร้อนจัด 87°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเย็นธรรมดาทันทีจนผิวสะอาด ผึ่งจนแห้งก็นำออกจำหน่าย หรือบรรจุไส้

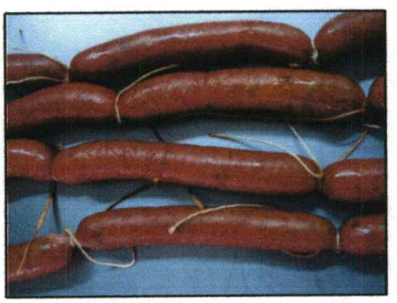
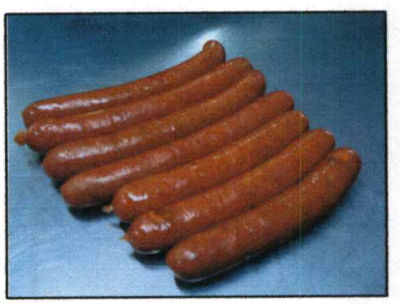



**ภาพผนวกที่ ง1.1** การเตรียมเนื้อบดและเครื่องเทศในการทำไส้กรอก

**ภาพผนวกที่ ง1.2** การผสมเครื่องเทศก่อนสับผสม

**ภาพผนวกที่ ง1.3** การสับผสมและการผสมเครื่องเทศด้วยมือ

**ภาพผนวกที่ ง1.4** การบรรจุเนื้อบดลงเครื่องและการอัดไส้กรอก

**ภาพผนวกที่ ง1.5** ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหลังขึ้นรูป

**2. ขบวนการผลิตลูกชิ้น**

**ลูกชิ้นทรงเครื่องและลูกชิ้นเอ็น**

สูตรลูกชิ้นทรงเครื่อง

| | |
|---|---|
| Batter ของลูกชิ้นอิมัลชัน | 1 kg |
| เห็ดหูหนูสด | 100 g |
| คื่นฉ่าย | 20 g |

สูตรลูกชิ้นเอ็น

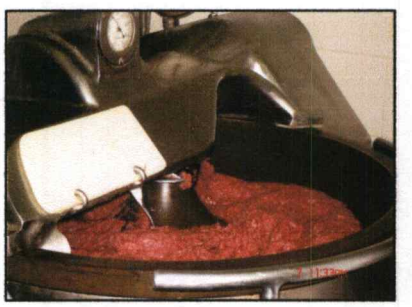
| | |
|---|---|
| Batter ของลูกชิ้นอิมัลชัน | 1 kg |
| หนังหมูต้ม | 150 g |

วัสดุอุปกรณ์

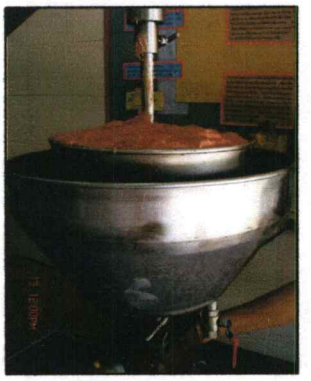
อ่างผสม, เตาพร้อมหม้อต้มน้ำ, อ่างน้ำ

ขั้นตอนการทำ

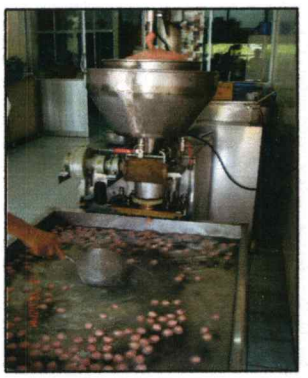
ผสม Batter กับส่วนผสมตามสูตร จนส่วนผสมเหนียวและเนียน จากนั้นปั้นลูกชิ้นเป็นลูก และต้มในหม้อน้ำร้อนบนเตาที่ 1 ที่อุณหภูมิ 60°C ต้มจนลูกชิ้นเปลี่ยนสี ในน้ำร้อนต้องผสมเกลือเล็กน้อย ต้มลูกชิ้นในหม้อน้ำร้อนบนเตาที่ 2 ที่อุณหภูมิ 80°C ต้มให้สุกสังเกตโดยการบีบ ถ้าลูกชิ้นสุกจะแข็ง นำลูกชิ้นที่ต้มสุกมาลดอุณหภูมิในน้ำผสมน้ำแข็ง (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และคณะ 2549)

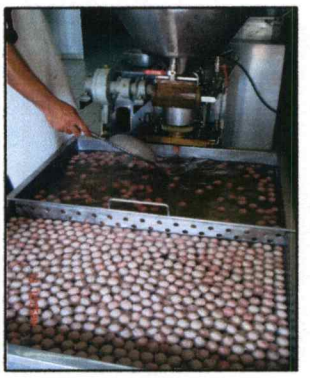


**ภาพผนวกที่ ง2.1** บดเนื้อและเครื่องเทศที่อุณหภูมิเนื้อไม่เกิน 10°C



**ภาพผนวกที่ ง2.2** บรรจุเนื้อที่ทำการบดผสมแล้วในเครื่องขึ้นรูป





**ภาพผนวกที่ ง2.3** ต้มลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 60 และ 80°C

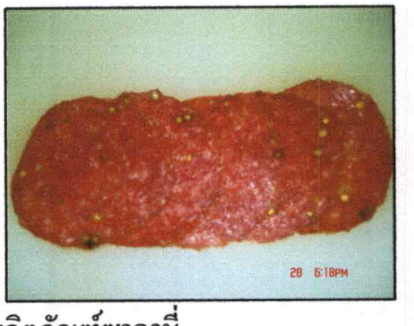
**3. ขบวนการผลิตแหนม**

**แหนม**

| | |
|---|---|
| เนื้อสุกรไม่ติดมัน, หนังสุกร | 1,000 g |
| ผงทำแหนม | 75 g |
| ผงเพรก | 3 g |
| พริก, กระเทียมสับ | พอสมควร |

(ผงทำแหนมราคา กิโลกรัมละ 120 บาท ผงเพรกราคา กิโลกรัมละ 22 บาท)

4. ซาลามี่



**ภาพผนวกที่ ง3.1** ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ซาลามี่

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นายฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ |
| วัน เดือน ปีเกิด | 5 ธันวาคม 2525 ที่ชลบุรี |
| ที่อยู่ | 122/2 หมู่ 10 ซอยเจริญโชคดี 25 ตำบลหมอนนาง อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี 20140 โทร 0-8683-30363 |
| ประวัติการศึกษา | 2547 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก<br>2551 สำเร็จการศึกษาปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ผลงานวิจัย | |
| มกราคม 2551 | ตีพิมพ์งานวิจัยเรื่อง “การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน” ในวารสารวิทยาศาสตร์มข. ปีที่ 36 ฉบับที่ 2 หน้า 121-128. |
| มีนาคม 2551 | ตีพิมพ์งานวิจัยเรื่อง “การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อน” ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา<br>- รางวัลนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายดีเด่น กลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ |