รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบและสุก

Development of Multiplex PCR for Identification of Animal Species in Raw and Cooked Meat Mixtures

โดย

ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
นายฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์
รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล
(ที่ปรึกษาโครงการ)

ปีงบประมาณ พ.ศ.2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบและสุก

Development of Multiplex PCR for Identification of Animal Species in Raw and Cooked Meat Mixtures

โดย

ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

นายฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์

รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล

(ที่ปรึกษาโครงการ)

11981532

ปีงบประมาณ พ.ศ.2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ผ่านขั้นตอนการตีบดและทำให้สุกด้วยความร้อนจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มมาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์แปรรูป งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบโดยทำการออกแบบชุดไพรเมอร์รวมที่จำเพาะต่อยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสุกร กระบือ ไก่ และโค และให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดจำเพาะต่อสปีชีส์ คือ 670, 430, 280 และ180 bp ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะและความไวของชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ พบว่า ชุดไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยไม่เกิดการจับข้ามสปีชีส์ และความไวในการตรวจพบดีเอ็นเออยู่ที่ 0.1 นาโนกรัม ขณะที่ปริมาณเนื้อสัตว์ขั้นต่ำในการจำแนกสปีชีส์ของส่วนผสมเนื้อสัตว์อยู่ที่ 1% ของน้ำหนักรวม ทั้งในเนื้อดิบและเนื้อที่ทำให้สุกด้วยความร้อนและอุณหภูมิที่แตกต่าง ได้แก่ ที่ 82°C นาน 20 นาที, ที่ 116°C นาน 30 นาที และ ที่ 116°C นาน 60 นาที อย่างไรก็ตามความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและกระบือลดลงกว่าของไก่และโคเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการทำให้เนื้อสุก จะเห็นได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบในการทดลองครั้งนี้สามารถใช้ในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกร กระบือ ไก่ และโค ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ได้ทั้งในเนื้อดิบและเนื้อสุก การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบสปีชีส์ของสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคและยกระดับคุณภาพมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้

คำสำคัญ: การจำแนก, เทคนิคพีซีอาร์, สปีชีส์ของสัตว์, ส่วนผสมเนื้อสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Identification of animal species in meat mixture after homogenization and heated cooking is a preliminary research to improve meat product standard. This research used polymerase chain reaction (PCR) technique for meat species identification using a set of designed primers specific to 12S rRNA mitochondrial DNA of pig, buffalo, chicken and cow. The specific product sizes were 670, 430, 280 and 180 bp respectively. After investigation of the species specificity and DNA detection sensitivity of the primer set, the results showed that the primer set was able to amplify the target genes without cross-species binding with a sensitivity of the DNA detection at 0.1 nanogram. The threshold of detection of a species in a meat mixture by multiplex PCR was 1%wt of the mix, either raw or after cooking at various temperatures and times: 82°C for 20 minutes, 116°C for 30 minutes and 116°C for 60 minutes. However, ability to identify the DNA of pig and buffalo was lower than that of chicken and cow when the temperature and time of cooking increased. The results indicated that the multiplex PCR designed here could identify the DNA of pig, buffalo, chicken and cow in both raw and cooked meat mixtures. Development of a more efficient multiplex PCR technique for identification of animal species in meat products would be beneficial for consumers and raise the processed meat product quality standard.

Keywords: Identification; Polymerase chain reaction (PCR); Animal species; Meat mixture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณจากเงินรายได้ของคณะเทคโนโลยีการเกษตรประจำปีพ.ศ. 2549 และงานวิจัยฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และ โครงการผลิตบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
คำนิยม	iii
สารบัญ	iv
สารบัญภาพ	v
อักษรย่อ	vii
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	9
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผล	29
ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	36
ประวัติผู้วิจัย	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบจากยีน mtDNA 12s-rRNA	11
2. ความจำเพาะของชุดไพรเมอร์รวม	13
3. ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอสุกร	14
4. ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอกระบือ	15
5. ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอไก่	15
6. ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอโค	16
7. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อดิบ	17
8. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อดิบ	18
9. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือในเนื้อดิบ	18
10. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82 °C นาน 20 นาที	20
11. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82 °C นาน 20 นาที	20
12. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อโคผสมเนื้อกระบือในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82 °C นาน 20 นาที	21
13. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 30 นาที	22
14. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อสุกรผสมเนื้อโคในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 30 นาที	23
15. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อโคผสมเนื้อกระบือในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 30 นาที	23
16. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 60 นาที	25
17. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อสุกรผสมเนื้อโคในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 60 นาที	25
18. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อโคผสมเนื้อกระบือในเนื้อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 60 นาที	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

19. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกร โค และกระบือในเนื้อดิบและทำให้สุก 27

20. ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกร โค และไก่ในเนื้อดิบและทำให้สุก 28

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

อักษรย่อ	ภาษาอังกฤษ	ภาษาไทย
°C	degree Celsius	องศาเซลเซียส
bp	base pair	คู่เบส
DNA	deoxyribonucleic acid	กรดนิวคลิอิก
M	molar	โมลาร์
mM	millimolar	มิลลิโมลาร์
mg	milligram	มิลลิกรัม
ml	milliliter	มิลลิลิตร
mtDNA	mitochondrial DNA	ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
ng	nanogram	นาโนกรัม
nt	nucleotide	นิวคลิโอไทด์
RNA	ribonucleic acid	กรดไรโบนิวคลิอิก
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	กรดไรโบนิวคลิอิกในไรโบโซม
rpm	round per minute	รอบต่อนาที
S	Svedberg (10^{-13} second)	สเวดเบอร์ก
µg	microgram	ไมโครกรัม
µl	microlitre	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบและสุก

Development of Multiplex PCR for Identification of Animal Species in Raw and Cooked Meat Mixtures

คำนำ

ในการเลือกซื้อและบริโภคเนื้อสัตว์ ผู้บริโภคไม่สามารถรับรู้ได้ว่าส่วนผสมของเนื้อสัตว์ในอาหารมีแหล่งที่มาจากสัตว์ชนิดใดนอกจากการระบุส่วนประกอบที่ฉลากสินค้าหรืออาจไม่มีการระบุใดๆ เช่น ในตลาดสด เป็นการยากที่ผู้บริโภคจะสังเกตได้ด้วยตาเปล่าหรือตรวจสอบจากกลิ่นและการชิมว่ามีการปลอมปนเนื้อสัตว์ที่ราคาถูกกว่าหรือมีการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ที่ไม่ต้องการบริโภคหรือไม่ ผู้บริโภคมักประสบปัญหาการตัดสินในเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากไม่มั่นใจในส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นั้น นอกจากนั้นยังไม่มีการตรวจสอบมาตรฐานที่สามารถนำมาใช้ในประเทศ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความมั่นใจให้คุณภาพและมาตรฐานอาหารสำหรับบริโภคในประเทศ และยังไม่มีการตรวจสอบที่จะสามารถนำไปปรับใช้ในการรับรองมาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปส่งออกเพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อผู้บริโภคในต่างประเทศได้ ในปัจจุบันประเทศสมาชิกในอเมริกาและสหภาพยุโรปได้มีการตื่นตัวในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์อย่างมาก เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์และวัตถุดิบที่ทำมาจากสัตว์ต้องห้าม เช่น วัว กระบือ ม้า แกะ แพะ และสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่นๆ ซึ่งอาจมีโปรตีนprion ที่เป็นสาเหตุของโรควัวบ้า (mad cow disease หรือ Bovine spongiform encephalopathy, BSE) ซึ่งมีการตรวจพบในสหภาพยุโรป ดังจะเห็นได้จากการออกหนังสือข้อตกลงต่างๆในประเทศสหภาพยุโรป (European Commission 2000 และ 2002) ในการห้ามใช้วัตถุดิบที่มีส่วนผสมของสัตว์ที่กล่าวมาข้างต้น จากข้อห้ามดังกล่าวจึงทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มาของวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์อย่างต่อเนื่อง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์เป็นปริมาณมากสำหรับบริโภคในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆในเอเชียและยุโรป การสร้างความมั่นใจให้ผู้บริโภคทั้งในและนอกประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการสร้างตลาดผลิตภัณฑ์อาหารจากประเทศไทย การตรวจสอบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในประเทศยังไม่มีการพัฒนาอย่างจริงจังและยังไม่มีการนำเทคโนโลยีใหม่เข้ามาใช้ เทคนิคการตรวจซึ่งเป็นที่ยอมรับถึงความแม่นยำและความไว คือ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ดังนั้นจึงได้ทำการพัฒนาเทคนิคการตรวจนี้เพื่อให้สามารถจำแนก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเนื้อสัตว์ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ผสม โดยจะใช้ตรวจสอบเนื้อสัตว์ที่นิยมรับประทานและเป็นส่วนประกอบหลักในการผลิตผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสัตว์ในปัจจุบันได้แก่ โค กระบือ สุกร และไก่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ทั้งดิบและผ่านความร้อน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกชนิดของสัตว์ในเนื้อสัตว์ผสมในสัดส่วนต่างๆ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการออกแบบชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิดและให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันเมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้า
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ความจำเพาะและความไวของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์
3. ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมในการจำแนกชนิดของสัตว์ในเนื้อผสมทั้งดิบและผ่านความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการพยายามที่จะจำแนกเนื้อสัตว์ที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ทั้งอาหารสำหรับมนุษย์และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง เพื่อให้เกิดความมั่นใจต่อผู้บริโภคและผู้เลี้ยงสัตว์ว่าอาหารนั้นมีส่วนประกอบที่ถูกต้องตามที่ระบุที่ฉลากไม่มีสัตว์อื่นปลอมปน เช่น เนื้อสัตว์ที่ราคาถูกกว่า เนื้อสัตว์ต้องห้ามตามหลักศาสนาหรือเนื้อสัตว์ต้องห้ามตามมาตรฐานอาหารยุโรป (EU) เช่น การปนเปื้อนของเนื้อส่วนอื่นๆจากโคซึ่งอาจเป็นโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy) ในอาหารสัตว์หรือการปนเปื้อนเนื้อสุกรในอาหาร ฮาลาลของผู้บริโภคที่เป็นชาวมุสลิม รวมทั้งตรวจสอบที่มาของเนื้อสัตว์ซึ่งอาจเป็นเนื้อสัตว์ป่าสงวนที่ลักลอบนำมาบริโภค ที่ผ่านมาการพัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตอาหารยังมีไม่มากนักและยังให้ผลที่ยังไม่เป็นที่พอใจ ในช่วงแรกมีการใช้เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีน แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนเมื่อผ่านความร้อนจะมีการเปลี่ยนแปลงทำให้การตรวจวิเคราะห์โปรตีนเพื่อใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการปรุงสุกไม่ให้ผลการตรวจที่ดีนักเนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีน (Momcilovic and Avraham. 2000) ปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอแทนเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่มีความแม่นยำและความไวในการตรวจตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย (Meyer and Candrian. 1996) โดยเทคนิคทางดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่

เทคนิคการจับดีเอ็นเอด้วยโพรบที่จำเพาะ (Hybridrization)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

การเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีจำนวนน้อยให้มีจำนวนมากในเวลาอันสั้น เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง โดยส่วนของดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวน คือ ดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย 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) การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์สามารถประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับงานวิจัยได้หลายรูปแบบ ดังนี้

1. **PCR-RAPD** (Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA)

เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยอาศัยการจับแบบสุ่มของ ไพรเมอร์หลายๆคู่เนื่องจากสัตว์แต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทำให้ไพรเมอร์แต่ละเส้นเข้าจับในตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันทำให้ผลผลิตพีซีอาร์(PCR product) ของสัตว์แต่ละสปีชีส์จะมีรูปแบบที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะในแต่ละสัตว์ Lee and Chang (1994) ใช้เทคนิคนี้ในการแยกสปีชีส์สัตว์จากดีเอ็นเอของเลือดและเนื้อ โค แพะ สุกร หนู กระต่าย ไก่ และมนุษย์ออกจากกันโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์ โดยใช้ตรวจสอบส่วนประกอบในอาหาร Martinez and Yman (1998) ใช้เทคนิคนี้จำแนกชนิดของสัตว์ต่างๆ ได้แก่ โค ม้า ฟอ ลา กระบือ กวาง กวางเรนเดียร์ สุกร แกะ แพะ จิงโจ้ และนกกระจอกเทศ ในผลิตภัณฑ์เนื้อสดได้ Saez *et al*. (2003) เปรียบเทียบเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ arbitrarily primed PCR (AP- PCR, Selected primers) ในการแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ผสมโดยทั้งสองวิธีต่างกันที่ PCR – RAPD มีไพรเมอร์ยาว 10 nt ส่วน AP-PCR มีไพรเมอร์ยาวมากกว่า 18 nt ทั้งสองวิธีสามารถแยกสัตว์ได้ 5 สปีชีส์ คือ สุกร โค แกะ ไก่ และไก่งวง แต่AP-PCR ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

2. **PCR-RFLP** (Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism)

เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูปแแบบของการตัดจะมีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์ และสามารถนำมาใช้พิสูจน์สปีชีส์สัตว์ได้ Murray *et al*. (1995) อาศัยเทคนิค PCR – RFLP โดยเพิ่มจำนวนยีนส่วน D-loop region ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือด สามารถแยกสปีชีส์ของสัตว์ได้ 15 สปีชีส์ได้แก่ กวางมูส (*Alces alces*), กวางคาลิบู (*Rangifer tarandus*), ฟอ (*Odocoileus hemionus hemionus*), กวางหางดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*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*), วัวพื้นเมือง (*Bos taurus*) และวัวไบซัน (*Bison bison*) ได้ ต่อมา Zehner *et al.* (1998) ได้ออกแบบการทดลองเพื่อจำแนก สปีย์ของสิ่งส่งตรวจ เช่น เนื้อจากกระเพาะ น้ำจากกระเพาะ และกระดูก ในทางอาชญวิทยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน cytochrome b gene บนดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 981 bp จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I และ *Nco* I สัตว์บางชนิดให้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์เหมือนกัน จึงต้องนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยการหาลำดับเบส (sequencing analysis)

Tartaglia *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิคนี้ทำการตรวจสอบการปลอมปนของวัตถุดิบที่มาจากโค (meat and bonemeal , MBM) ในอาหารสัตว์เป็นครั้งแรก โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของโคโดยคลอบคลุมส่วนของ ATPase หน่วยย่อยที่ 8 และบางส่วนของหย่วยย่อยที่ 6 ในดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Dpn* II และ *Ssp* I โดยสามารถตรวจพบ MBM ได้ที่ปริมาณเพียง 0.125%ในอาหารสัตว์ Wang *et al.* (2004) ใช้เทคนิคเดียวกันในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารสุนัขและอาหารแมวในประเทศไต้หวัน โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนส่วน cytochrome b ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย ขนาด 359 bp แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I หรือ *Mbo* I จากการตรวจสอบอาหารสุนัขที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์จำนวน 8 ตัวอย่างสินค้า พบมีส่วนประกอบของเนื้อโค สุกร แพะ และไก่ ชนิดใดชนิดหนึ่งผสมอยู่ ขณะที่ในอาหารแมวที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์พบว่ามีเนื้อไก่เป็นส่วนประกอบจำนวน 5 ตัวอย่างจากตัวอย่างสินค้า 8 ตัวอย่าง

Montiel-Sosa *et.al.* (2000) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน D-loop ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย ของสุกร ขนาด 531 bp สามารถใช้ตรวจสอบการผสมเนื้อและไขมันสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารปรุงสุกได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเนื้อหมู่ป่าได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II ต่อมา Meyer *et al.* (2002) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้แยกเนื้อ สุกร โค แพะ แกะ ไก่ ไก่งวง และลิง ออกจากอาหาร โดยออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย บริเวณ 12s ribosomal RNA และ cytochome b แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Hinf* I, *Taq* I, *Rsa* I, *Mbo* I จากนั้นแยกด้วยโพรบที่จำเพาะทำให้สามารถแยกเนื้อสัตว์แต่ละชนิดดังกล่าวข้างต้นได้ Aida *et.al.* (2004) ได้ใช้เทคนิคเดียวกันทำการแยกเนื้อและไขมันสุกรออกจากอาหารฮาลาล โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรียส่วน cytochrome b ที่จำเพาะต่อสุกรแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa* II ทำให้สามารถแยกเนื้อและไขมันสุกรออกจากเนื้อแกะ เนื้อโค และเนื้อไก่ ในอาหารฮาลาลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Specie specific PCR

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบของสัตว์ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิด แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีขนาดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด Calvo *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิค Specie-specific PCR ในการหาปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุว่าทำจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร พบว่ามีการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อบด (pates) และการทดสอบมีความสามารถในการตรวจพบเนื้อสุกรที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ในส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ จากนั้น Calvo *et al.* (2002) ได้ทำการตรวจสอบเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ เช่น เนื้อดิบ เนื้อบด ไส้กรอก และแฮมเบอร์เกอร์ โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร โดยสามารถตรวจพบเนื้อสุกรที่มีอยู่ระดับ 0.005 เปอร์เซ็นต์ในผลิตภัณฑ์ จากนั้น Di Pinto *et al.* (2004) ใช้เทคนิค Duplex PCR ในการทดสอบการปลอมปนของเนื้อสุกรในไส้กรอกที่ระบุว่าทำมาจากเนื้อม้าโดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย บริเวณ cytochrom b ผลการทดสอบพบไส้กรอกที่มีเนื้อสุกรผสมอยู่ 6 ตัวอย่างและไม่พบเนื้อม้าในผลิตภัณฑ์ 1 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

Tajima *et al.* (2002) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยอาศัย ฐานข้อมูลของท่อนยีนซ้ำทั้งชนิดท่อนสั้น (SINE) และท่อนยาว (LINE) ได้แก่ Art2 SINE จำเพาะต่อสัตว์เคี้ยวเอื้อง PRE-1 SINE จำเพาะต่อสุกร และ CR1 LINE จำเพาะต่อไก่ พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงและสามารถใช้ตรวจสอบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร และไก่ที่ระดับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ Bellagamba *et al.* (2003) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนส่วน 12S rRNA ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรียของ โค แกะ แพะ สุกร และไก่ เพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่นำมาประกอบเป็นวัตถุดิบในอาหารปลาหลังการทำไร้เชื้อที่ 130 °C เวลา 40 นาที ความไวของการตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ที่ 0.125 ถึง 0.5% อย่างไรก็ตามเมื่อนำไพรเมอร์มารวมกันในปฏิกิริยาเดียว ขนาดชิ้นส่วนของพีซีอาร์ที่ได้ไม่สามารถจำแนกดีเอ็นเอของโค แกะ และแพะออกจากกันได้ Dalmasso *et al.* (2003) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกสปีชีส์ของสัตว์ในอาหารสัตว์โดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก ปลา และสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ได้ โดยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสัตว์แต่ละสปีชีส์โดยออกแบบจากดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย บริเวณ 12S rRNA , tRNA Val และ 16S rRNA ได้ผลิตภัณฑ์ยาว 104-106 bp สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง 183 bpสำหรับสัตว์ปีก 220-230 bp สำหรับปลา และ 290 bp สำหรับสุกร ตามลำดับ โดยสามารถแยกเนื้อปลาได้ในระดับการปนเปื้อน 0.004%และแยกเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก และสุกร ได้ในระดับการปนเปื้อน 0.002%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rajapasksha *et al.* (2002) ใช้เทคนิคนี้ในการจำแนกเนื้อกวางชนิดต่างๆซึ่งเป็นสัตว์สงวนในประเทศศรีลังกา โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์เพิ่มจำนวนยีนบริเวณ cytochrome b ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีนาด 450 bp ขณะที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากเนื้อวัว กระบือ แกะ แพะ สุนัข และสุกรมีขนาด 649 bp Rodriguez *et al.* (2004) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 12S ribosomal RNA gene ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรียของ สุกร โค แกะ และแพะ โดยสัตว์แต่ละสปีชีส์ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด จากการทดลองพบว่าความสามารถในการจำแนกอยู่ที่ 1%ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่ผสมอยู่

4. Sequencing

เป็นการเพิ่มดีเอ็นเอต้นแบบของสัตว์ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในสัตว์แต่ละชนิด หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับเบส โดยสัตว์แต่ละชนิดจะมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ต่างกัน Bottero *et al.* (2003) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) บนดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย ซึ่งมีขนาดระหว่าง 234 และ 265 bp 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 นาน 24 นาที ได้

5. Quantitative PCR หรือ Real-time PCR

เป็นการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง ไปพร้อมกับทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้สารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ซึ่งใช้เป็น Probe เข้าติดฉลากกับดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ไพรเมอร์เริ่มเข้าทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ หรือขั้นตอน annealing ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นและปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันทีด้วยคอมพิวเตอร์ John *et al.* (2004) ใช้เทคนิคนี้ โดยใช้ TaqMan probe 2 ชนิดคือ ชนิดที่จำเพาะต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (โค แกะ และสุกร) และชนิดที่จำเพาะต่อสัตว์ปีก (ไก่ และไก่งวง) โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ cytochrome b gene บนดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย พบว่าสามารถแยก เนื้อโค แกะ และไก่งวง จากเนื้อผสมที่ปริมาณต่ำกว่า 0.1%ได้ Rodriguez *et al.* (2004) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกเนื้อสุกรออกจากเนื้อผสม โดยผสมเนื้อสุกรในเนื้อโค 3 ระดับ คือ 0.5%, 1% และ 5% น้ำหนักรวม 100 กรัม นำไปผ่านความร้อน 121°C นาน 20 นาที โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ 12S ribosomal RNA gene ของดีเอ็นเอของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโตรคอนเดรียของสุกร แล้วตรวจหาดีเอ็นเอด้วย TaqMan probe พบว่าสามารถแยกเนื้อสุกร 0.5–5% ที่ผสมในเนื้อโคได้

Lopez–Andreo *et al.* (2005) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการจำแนกสปีชีส์สัตว์จากตัวอย่างเนื้อและอาหารที่จำหน่ายตามท้องตลาดได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะ ไก่ ไก่งวง และนกกระจอกเทศ โดยใช้ TaqMan probe ชนิด minor groove binding (MGB) probe โดยออกแบบไพรเมอร์จาก cytochrome b บนดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย โดยสามารถแยกเนื้อ สุกร ไก่และไก่งวง ที่ระดับการผสมมากกว่า 1%และโค แกะ ที่ระดับการผสมมากกว่า 5% โดยมีความแม่นยำถึง 90% Tasara *et al.* (2005) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกส่วนประกอบของ เจลาติน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อโค โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโค บริเวณ ATPase subunit gene ของดีเอ็นเอของไมโตรคอนเดรีย เพื่อใช้ในการแยกส่วนประกอบของโคออกจาก เจลาติน โดยสามารถแยกได้ที่การปนเปื้อนของเนื้อโคที่ระดับ 0.1–0.001%

จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีเทคนิคที่ให้ผลการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ที่ชัดเจน เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น PCR-RFLP ต้องอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ซึ่งอาจต้องมีการทดลองใช้เอนไซม์หลายชนิดจนกว่าจะเกิดความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ การเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลิอิคบางตัวในสัตว์สปีชีส์เดียวกันในจุดที่มีผลต่อการตัดเอนไซม์ อาจทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคอื่น เช่น RAPD-PCR ซึ่งมีความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ ในบางครั้งอาจให้จำนวนแถบยีนซึ่งแตกต่างจากความเป็นจริงเนื่องจากสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในแต่ละห้องปฏิบัติการอาจมีความแตกต่าง ทำให้โอกาสจับของไพรเมอร์แต่ละคู่ซึ่งไม่มีความจำเพาะเจาะจงมีความคลาดเคลื่อนได้ จากข้อจำกัดดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการออกแบบไพรเมอร์เป็นส่วนที่สำคัญในการแสดงความจำเพาะเจาะจงของสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารละลายที่ไม่ได้แสดงส่วนประกอบไว้ ณ. ที่นี้ ได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ก.

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดสัตว์ ได้แก่ โคพันธุ์บราห์มัน, โคพันธุ์กำแพงแสน, ไก่, กระบือ, สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์, สุกรพันธุ์แลนเรซ, สุกรพันธุ์ดูร็อค และหมูป่า จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของนายฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี เก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ในหลอดทดลองที่มี EDTA โดยใช้ EDTA 10 mg ต่อเลือด 1 ml นำมายังห้องปฏิบัติการโดยแช่ตัวอย่างในกระติกน้ำแข็ง

2. ตัวอย่างเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ และเนื้อกระบือ ซื้อจากตลาดสดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร นำมายังห้องปฏิบัติการโดยแช่ตัวอย่างในถังน้ำแข็ง

การผสมเนื้อสัตว์

ทำการผสมเนื้อสัตว์ในสัดส่วนต่างๆ ปั่นเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer: BRAUN Multiquick) โดยผสมเนื้อสัตว์ตามสัดส่วน ดังนี้

1. เนื้อสัตว์ผสมสองสปีชีส์ ได้แก่ โคผสมสุกร ไก่ผสมสุกร และโคผสมกระบือ ในสัดส่วนตั้งแต่ 0:100, 1:99, 5:95, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 90:10, 95:5, 99:1, และ 100:0 ให้ได้น้ำหนักรวม 100 กรัม
2. เนื้อสัตว์ผสมสามสปีชีส์ ได้แก่ สุกรผสมโคและกระบือ และ สุกรผสมโคและไก่ โดยใช้เนื้อสัตว์สปีชีส์ละ 30 กรัม
3. เนื้อสัตว์ผสมสี่สปีชีส์ ได้แก่ เนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ และ เนื้อกระบือ ผสมอย่างละ 25 กรัม

การทำให้เนื้อสัตว์ให้สุก

นำเนื้อสัตว์ผสมที่ทำการปั่นบดแล้วมาแบ่งเป็น 4 ส่วน ทำให้สุกด้วยความร้อนและเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 °C โดยเตรียมตัวอย่างดังนี้

ส่วนที่ 1 เนื้อสด ไม่ผ่านการทำให้สุก เป็นกลุ่มควบคุม

ส่วนที่ 2 ต้มในอ่างน้ำร้อน (Memmert รุ่น WB-14) ที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที

ส่วนที่ 3 นึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy รุ่น ES315) ที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาที

ส่วนที่ 4 นึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสัตว์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Helms (1990) โดยนำเลือดสัตว์ปริมาณ 150 µl ผสม Buffer A (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.75%(v/v) Triton X-100) 150 µl และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 300 µl นำส่วนผสมแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 3 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนน้ำและเก็บส่วนตะกอน ทำซ้ำขั้นตอนที่กล่าวมาอีกหนึ่งครั้ง ละลายตะกอนด้วย Buffer B (20 mM Tris-HCl, 4 mM Na_2EDTA, 100 mM NaCl) 300 µl และ10% SDS 30 µl ผสมด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 30 วินาที เติม 20 mg/ml proteinase K 5 µl ให้ความร้อนด้วยเครื่อง Digital Dry Bath (Labnet, USA) ที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที เติม 5.3 M NaCl 200 µl ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนน้ำใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 500 µl เก็บที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5-10 นาที ทิ้งส่วนน้ำ เก็บตะกอน เติม 70% Ethanol 500 µl กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน ปั่นด้วยความเร็ว 13,0000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ รอให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 µl นำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 *pro*: Biochrom, UK) เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Long-Cheng (2006) โดยนำตัวอย่างส่วนผสมเนื้อสัตว์ 50 mg กับ Lysis buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0.5% SDS, 400mM NaCl) 500 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2, USA) เติม 20 mg/ml Proteinase K 15 µl นำไปเข้าตู้บ่มสารแบบเขย่า (shaking incubator: Vision) ที่อุณหภูมิ 55°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เติม 5.3 M NaCl 190 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที เก็บส่วนน้ำใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม Isopropanol 600 µl เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 20-30 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 500 µl กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน ปั่นด้วยความเร็ว 13,0000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง รอให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 µl นำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 *pro*: Biochrom, UK) เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

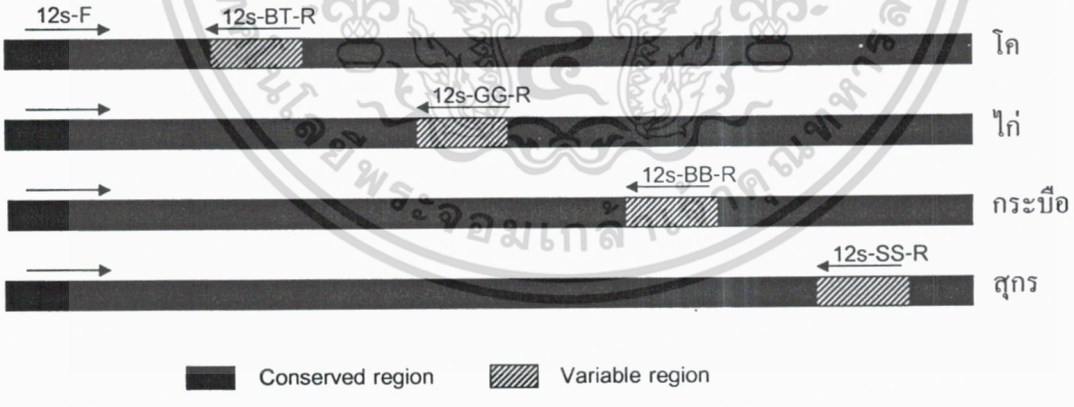
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ 12S rRNA (mtDNA 12S rRNA) โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์สปีชีส์ต่างๆมาจากฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) ได้แก่ สุกร (AY574048) โค (V00654) กระบือ (AY702618) แพะ (AF533441) แกะ (AF010406) และไก่ (AP003323) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวก ข. โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ (Invitrogen, Singapore) ดังนี้

ไพรเมอร์ร่วม	12s-F	5' – GTG CCA GCC ACC GCG GTC ATA – 3'
ไพรเมอร์โค	12s BT-R	5' – TCT ATA GTG CGT CGG CTA TTG TAG– 3'
ไพรเมอร์ไก่	12s GG-R	5' – AGC GTT TGT GCT CGT AGT TCT CA– 3'
ไพรเมอร์กระบือ	12s BB-R	5' – CGT TGT GAT TGC GCT TAC TTT TGT A– 3'
ไพรเมอร์สุกร	12s SS-R	5' – GTC TCT TCT TGC ATG GTT GTG TAA TTG– 3'

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเนื้อโค ไก่ กระบือ และสุกร ควรมีขนาด 180, 280, 430, และ 670 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบจากยีน mtDNA 12s-rRNA ไพรเมอร์ 12s-F เป็นไพรเมอร์ร่วม ไพรเมอร์ 12s-BT-R 12s-GG-R 12s-BB-R และ 12s-SS-R เป็นไพรเมอร์ที่จับจำเพาะต่อดีเอ็นเอของโค ไก่ กระบือและสุกรตามลำดับ

การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100-300 ng, 1XAmpliBuffer A (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9.1, 0.01% TritonTMX-100), 1.5mM $MgCl_2$, 10mM dNTP mix,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผสมไพรเมอร์ (0.8 μM 12s-F, 0.2 μM 12s-BT-R, 0.2 μM 12s-BB-R, 0.2 μM 12s-GG-R, 0.2 μM 12s-SS-R) **และเอนไซม์** *Taq* DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 unit **จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณยีนด้วยความร้อน** (T personal combi-block: Biometra, Germany) **โดยทำการแยกสายดีเอ็นเอ 1 รอบ ที่** 94°C **เป็นเวลา 5 นาที เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 30 รอบ ที่** 94°C **เป็นเวลา 30 วินาที** 65°C **เป็นเวลา 30 วินาที และ** 72°C **เป็นเวลา 45 วินาที และสร้างสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์จำนวน 1 รอบ ที่** 72°C **เป็นเวลา 10 นาที หลังจากทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามที่กำหนด เก็บรักษาดีเอ็นเอผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ที่** -20°C

การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเทคนิคพีซีอาร์ชุดไพรเมอร์รวม

1. ความจำเพาะของชุดไพรเมอร์รวม

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมของเนื้อสัตว์สี่ชนิดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 300 ng/μl **นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใส่ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ** 1 μl **ในปฏิกิริยาพีซีอาร์** 25 μl **วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า**

2. ความไวของเทคนิคพีซีอาร์ชุดไพรเมอร์รวม

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ และเนื้อกระบือ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10^{-5}-10^{2} ng/μl **นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใส่ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ** 1 μl **ในปฏิกิริยาพีซีอาร์** 25 μl **วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า**

3. ความสามารถในการจำแนกชนิดของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ผ่านการทำให้สุกด้วยความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 300 ng/μl **นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใส่ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ** 1 μl **ในปฏิกิริยาพีซีอาร์** 25 μl **วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า**

การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

ทำการเตรียม 1 % SeaKem® LE agarose gel (Cambrex, USA) **โดยใช้ชุดเตรียมเจล** electrophoresis chamber (GelMate 2000: Toyobo, Japan) **เท** 1XTBE buffer **ให้ท่วมเจล โหลดผลผลิตพีซีอาร์ที่ผสมกับ** Gel loading buffer **ในสัดส่วน** 1:6 **ลงในหลุมเจล ใช้ดีเอ็นเอ** 100-bp DNA ladder (Vivantis, USA) **เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับทำการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ รันเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด** 100 **โวลต์ เป็นเวลา** 1 **ชั่วโมง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง** ultraviolet **โดยใช้เครื่องวิเคราะห์รูปเจล** (SynGene: UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์รวม

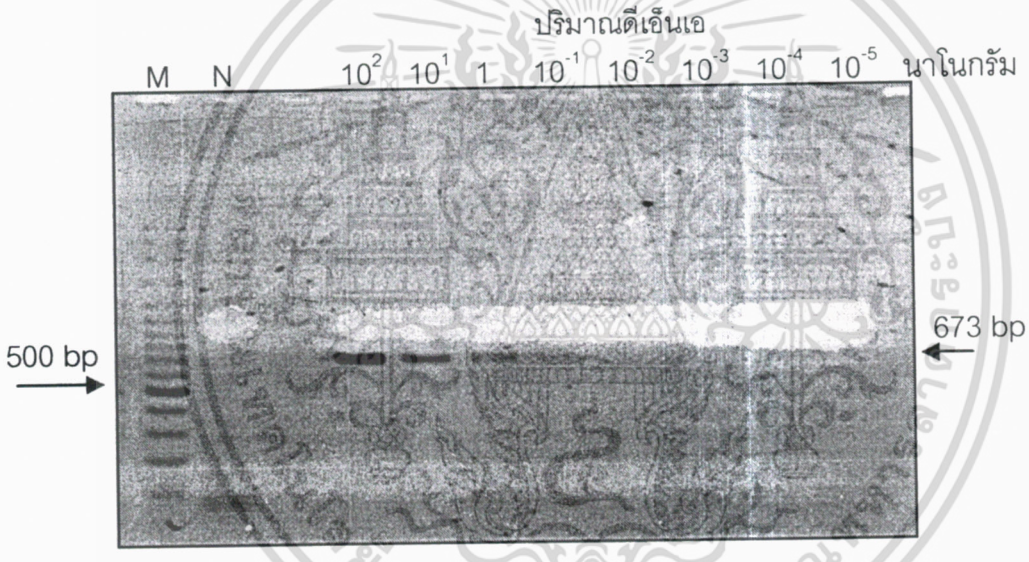
เพื่อทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบ ทำการทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด โคพันธุ์ บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่ กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนเรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และหมูป่า และใช้อุณหภูมิ Annealing Temperature ที่ 65°C นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปเจล ดังแสดงในภาพที่ 2 ผลของการทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบ พบว่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคทั้งโคสายพันธุ์บราห์มันและโคพันธุ์กำแพงแสน ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 180 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดไก่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 280 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดกระบือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 430 bp เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุกรทั้งสายพันธุ์ลาร์จไวท์ สายพันธุ์แลนด์เรซ สายพันธุ์ดูร็อค และหมูป่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 670 bp จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบมีความจำเพาะในการเข้าจับกับดีเอ็นเอของโค ไก่ กระบือ และสุกร ให้ผลผลิตพีซีอาร์ตามขนาดที่คาดหวัง และไม่เกิดการเข้าจับดีเอ็นเอข้ามสปีชีส์แต่อย่างใด

ภาพที่ 2 ความจำเพาะของชุดไพรเมอร์รวม แถว M แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานชนิด 100 bp DNA ladder แถวที่ 1-8 แสดงผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอของโคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่ กระบือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ สุกรพันธุ์แลนด์เรซ สุกรพันธุ์ดูร็อค และหมูป่า ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

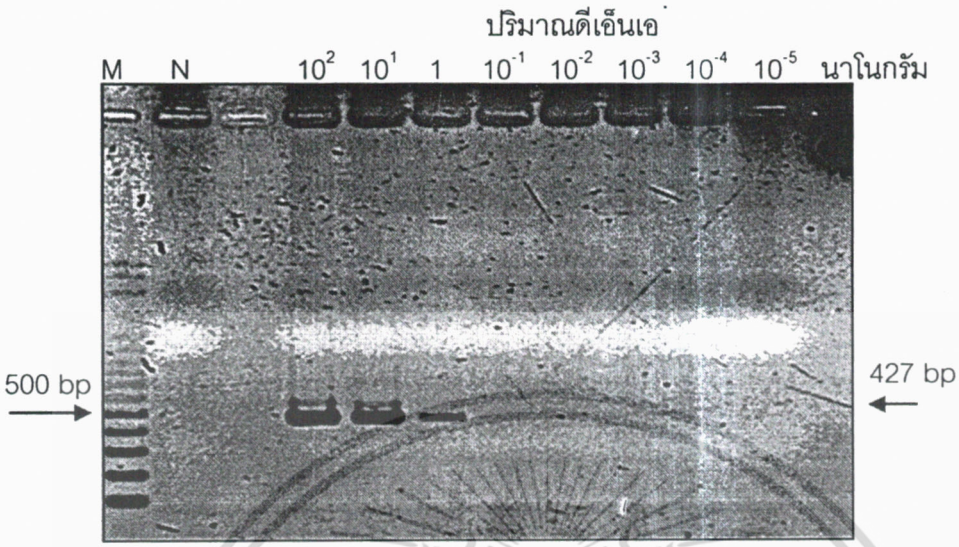
การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอ

เพื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละสปีชีส์ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของสุกร โค กระบือ และไก่ มาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 0.00001-100 ng/µl ใช้อุณหภูมิ Annealing Temperature ที่ 65°C นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปเจลเมื่อใช้ดีเอ็นเอของสุกร กระบือ ไก่ และโคเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 670 bp (ภาพที่ 3), 430 bp (ภาพที่ 4), 280 bp (ภาพที่ 5) และ 180 bp (ภาพที่ 6) ตามลำดับ ผลการทดลองปรากฏแถบดีเอ็นเอผลผลิตเมื่อใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นในปริมาณตั้งแต่ 0.1-100 นาโนกรัม แสดงให้เห็นว่า เทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบมีความไวของในการตรวจจับดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์อยู่ที่ระดับ 0.1 นาโนกรัม

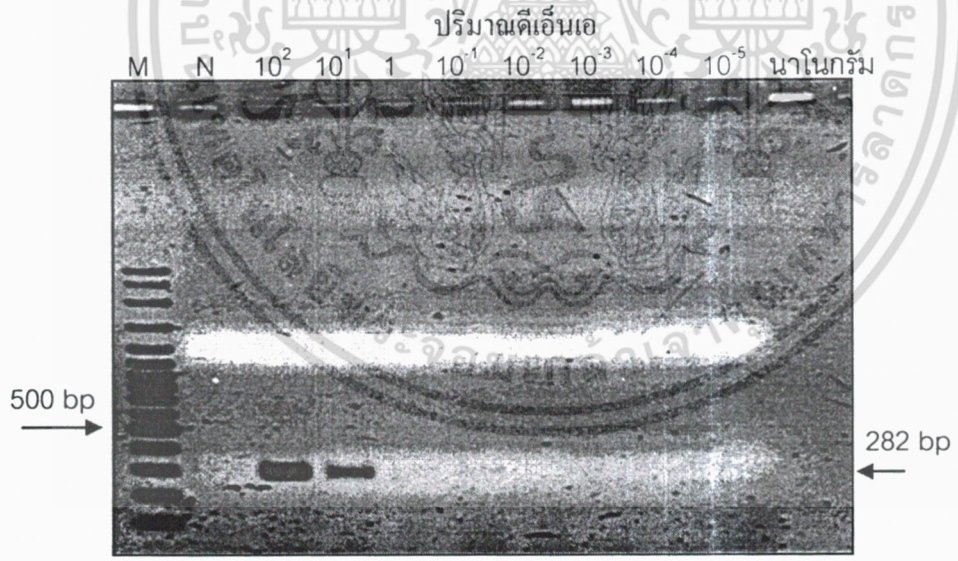


ภาพที่ 3 ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอสุกร แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

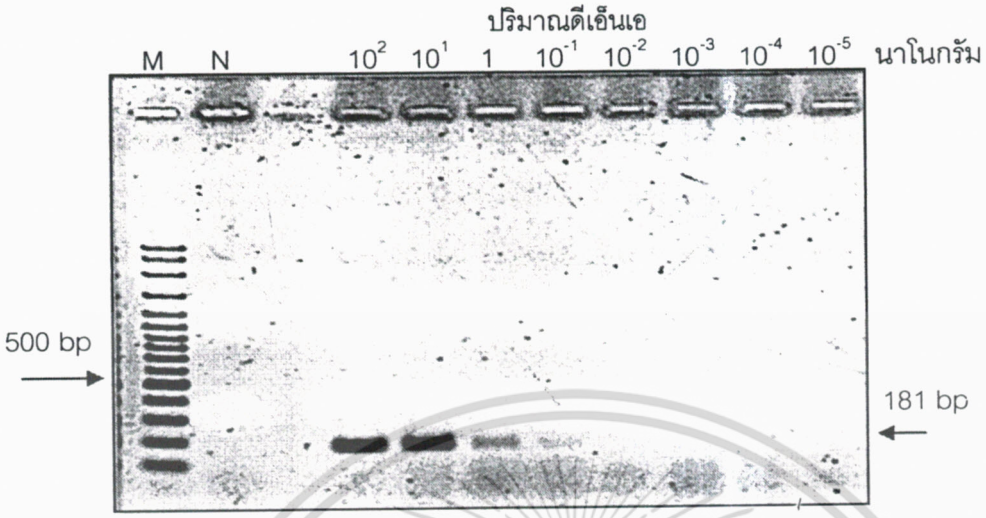


ภาพที่ 4 ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอกระบือ แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control



ภาพที่ 5 ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอไก่ แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ความไวของพีซีอาร์ในการตรวจจับดีเอ็นเอโค แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100-bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอในเนื้อดิบผสมที่สัดส่วนต่าง ๆ

เพื่อทดสอบความสามารถของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ในเนื้อดิบผสมที่สัดส่วนต่างๆ โดยทำการทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อผสม ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อโค และเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ ในสัดส่วน 0.0001 ถึง 100% และเนื้อโคผสมเนื้อกระบือ ในสัดส่วน 0 ถึง 100% เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ได้ผลการทดลองดังนี้

1. **เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่**

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อไก่เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบมีเนื้อสุกรอยู่ 1% ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของไก่ซึ่งมีขนาดประมาณ 280 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อไก่อย่างต่ำ 1% อยู่ในส่วนผสม แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ได้ในเนื้อดิบที่ปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อไก่อย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 7)

2. **เนื้อสุกรผสมเนื้อโค**

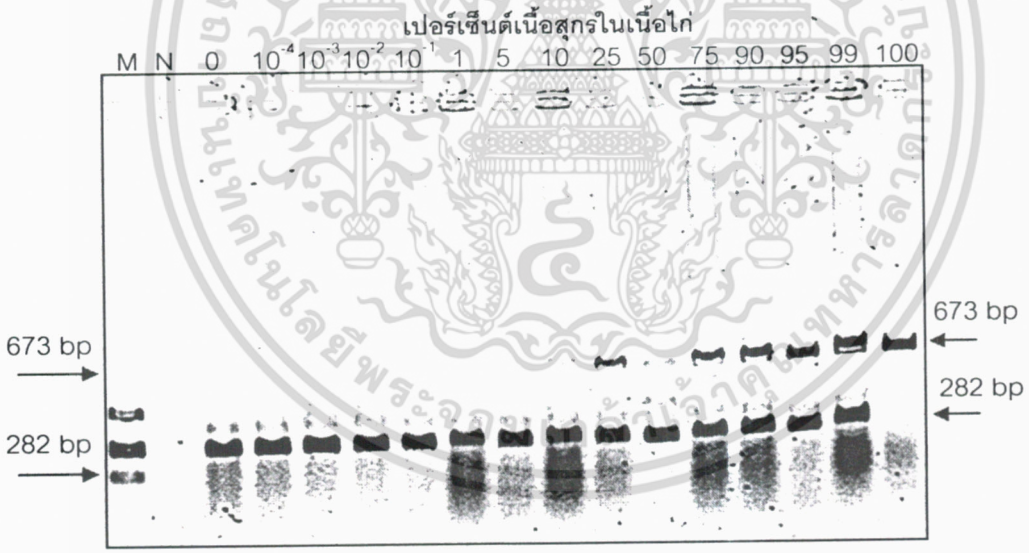
เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อโคเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบมีเนื้อสุกรอยู่ 1% ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคซึ่งมีขนาดประมาณ 180 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อโคอย่างต่ำ 1% อยู่ในส่วนผสม แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคได้ในเนื้อดิบที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อโคอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 8)

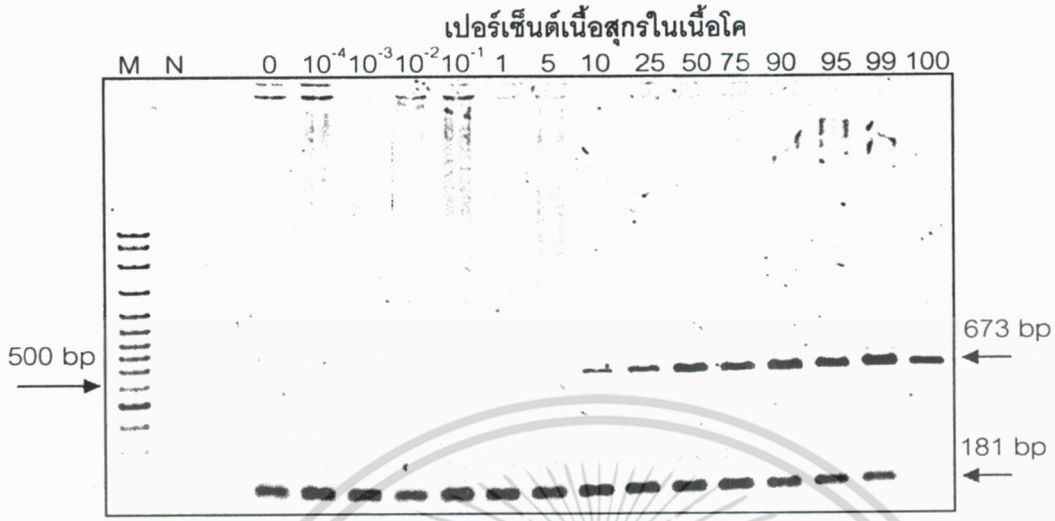
3. **เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ**

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคที่ขนาดประมาณ 180 bp เมื่อในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบมีเนื้อโคอยู่อย่างต่ำ 1% ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือซึ่งมีขนาดประมาณ 180 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อกระบืออย่างต่ำ 1% อยู่ในส่วนผสม แสดงว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือได้ในเนื้อดิบที่มีปริมาณการผสมของเนื้อโคและเนื้อกระบืออย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อดิบ แถบ M เป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสุกร กระบือ ไก่และโค แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อดิบ แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

ภาพที่ 9 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือในเนื้อดิบ แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของเนื้อผสมสองชนิดที่ทำให้สุก

เพื่อทดสอบความสามารถของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ โดยใช้เนื้อผสมสองชนิด ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อโค และเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ ในสัดส่วน 0.0001 ถึง 100% และเนื้อโคผสมเนื้อกระบือในสัดส่วน 0 ถึง 100% นำไปทำให้สุกด้วยระดับความร้อนและเวลาที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที

หลังจากปั่นเนื้อสัตว์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียดแล้วนำไปต้มด้วยอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที แล้วสกัดดีเอ็นเอนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบ และวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้บนอะกาโรสเจลโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อไก่ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 10% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของไก่ซึ่งมีขนาดประมาณ 280 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อไก่อยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 10) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อไก่อย่างต่ำ 10% และ 1% ตามลำดับ

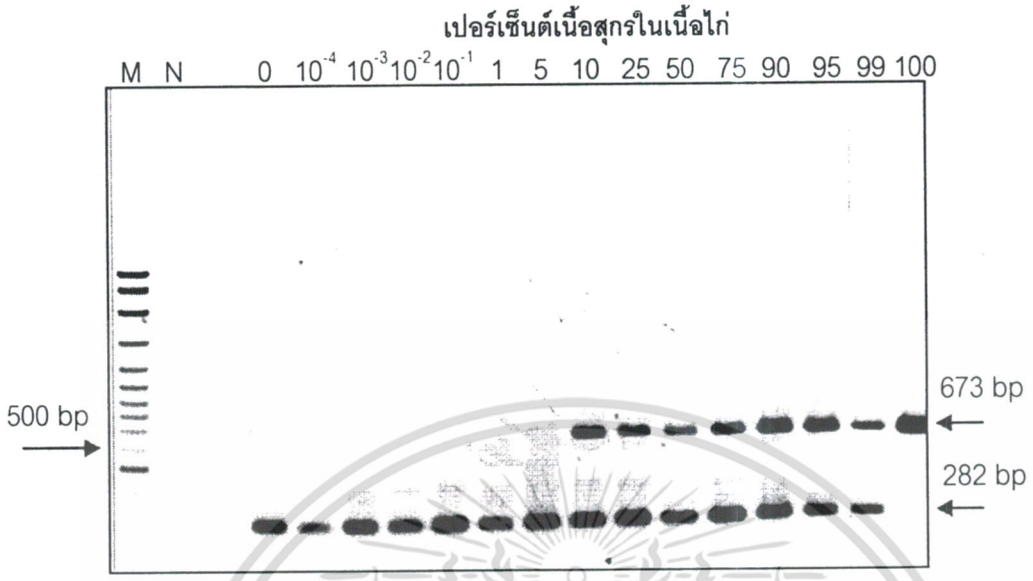
1.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อโคที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 10% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคซึ่งมีขนาดประมาณ 180 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อโคอยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 11) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อโคอย่างต่ำ 10% และ 1% ตามลำดับ

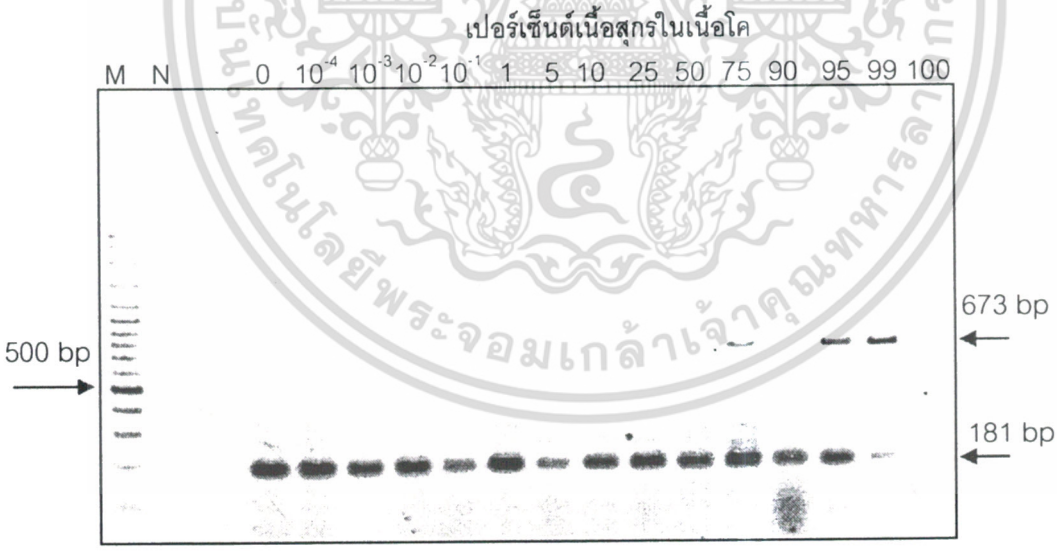
1.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคที่ขนาดประมาณ 180 bp เมื่อมีเนื้อโคอย่างต่ำ 1% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือซึ่งมีขนาดประมาณ 430 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อกระบืออยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 12) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อโคและเนื้อกระบืออย่างต่ำ 1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

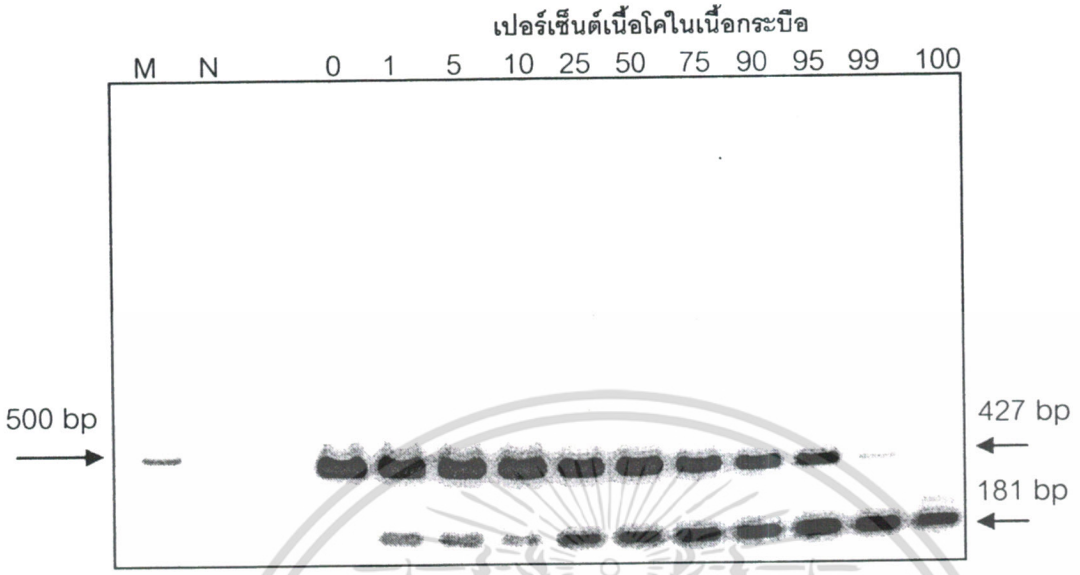


ภาพที่ 10 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อทำให้สุกที่ 82°C นาน 20 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control



ภาพที่ 11 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อทำให้สุกที่ 82°C นาน 20 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือในเนื้อทำให้สุกต้มที่ 82°C นาน 20 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

2. การทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาที

หลังจากปั่นเนื้อสัตว์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียดแล้วนำไปทำให้สุกโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาที แล้วสกัดดีเอ็นเอนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบ และวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้บนอะกาโรสเจลโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อไก่ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 10% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของไก่ซึ่งมีขนาดประมาณ 280 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อไก่อยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 13) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อไก่อย่างต่ำ 10% และ 1% ตามลำดับ

2.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อโคที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

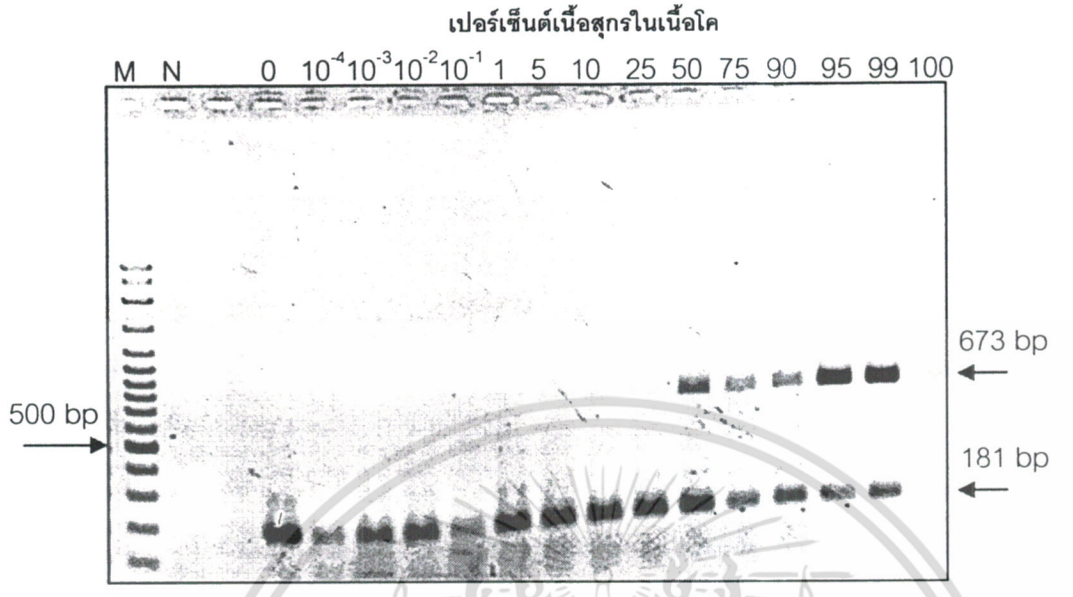
สุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 10% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคซึ่งมีขนาดประมาณ 180 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อโคอยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 14) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อโคอย่างต่ำ 10% และ 1% ตามลำดับ

2.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคที่ขนาดประมาณ 180 bp เมื่อมีเนื้อโคอย่างต่ำ 1% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือซึ่งมีขนาดประมาณ 430 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อกระบืออยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 15) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อโคและเนื้อกระบืออย่างต่ำ 1%

ภาพที่ 13 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

ภาพที่ 15 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาที

หลังจากปั่นเนื้อสัตว์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นละเอียดแล้วนำไปทำให้สุกโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาที แล้วสกัดดีเอ็นเอนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบ และวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้บนอะกาโรสเจลโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อไก่ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 50% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของไก่ซึ่งมีขนาดประมาณ 280 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อไก่อยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 16) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อไก่อย่างต่ำ 50% และ 1% ตามลำดับ

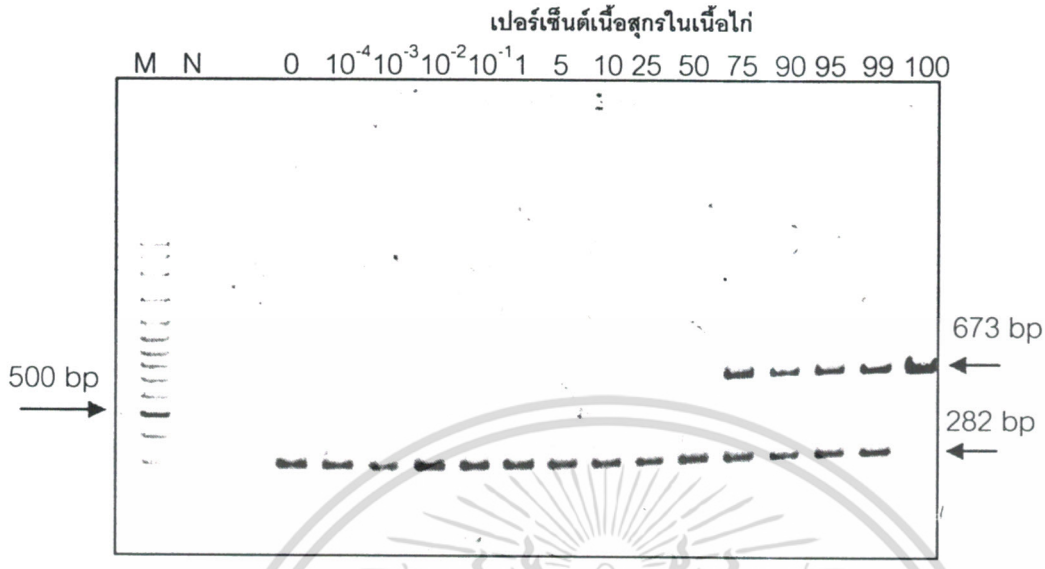
3.2 เนื้อสุกรผสมเนื้อโค

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกรและเนื้อโคที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรที่ขนาดประมาณ 670 bp เมื่อมีเนื้อสุกรอย่างต่ำ 90% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคซึ่งมีขนาดประมาณ 180 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อโคอยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 14) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อสุกรและเนื้อโคอย่างต่ำ 90% และ 1% ตามลำดับ

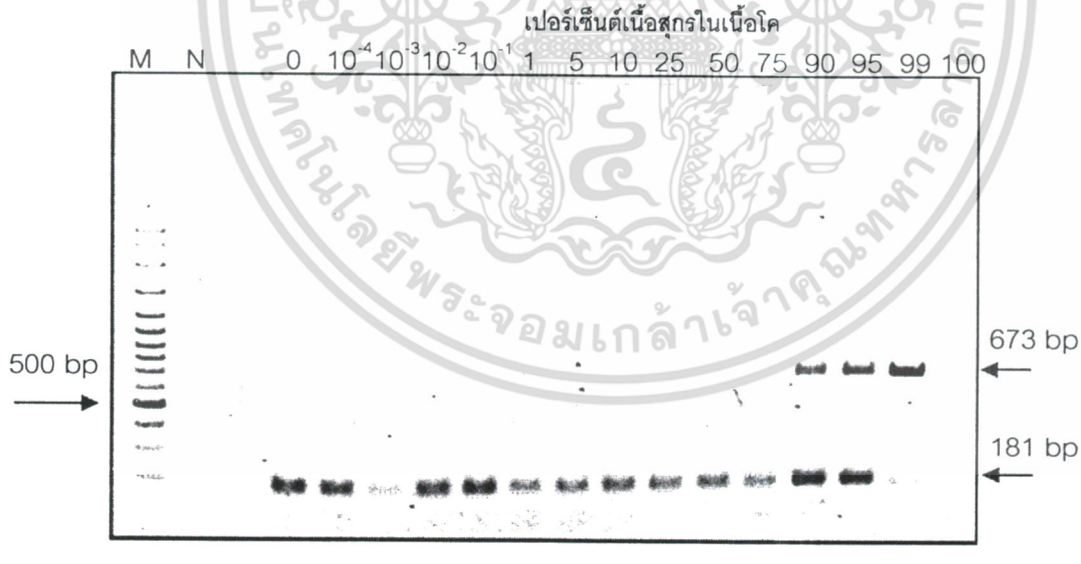
3.3 เนื้อโคผสมเนื้อกระบือ

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาทีเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของโคที่ขนาดประมาณ 180 bp เมื่อมีเนื้อโคอย่างต่ำ 1% ในส่วนผสม ขณะที่แถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือซึ่งมีขนาดประมาณ 430 bp ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อมีปริมาณเนื้อกระบืออยู่ในส่วนผสมอย่างต่ำ 1% (ภาพที่ 15) แสดงว่า เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือได้ในเนื้อสุกที่มีปริมาณการผสมของเนื้อโคและเนื้อกระบืออย่างต่ำ 1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

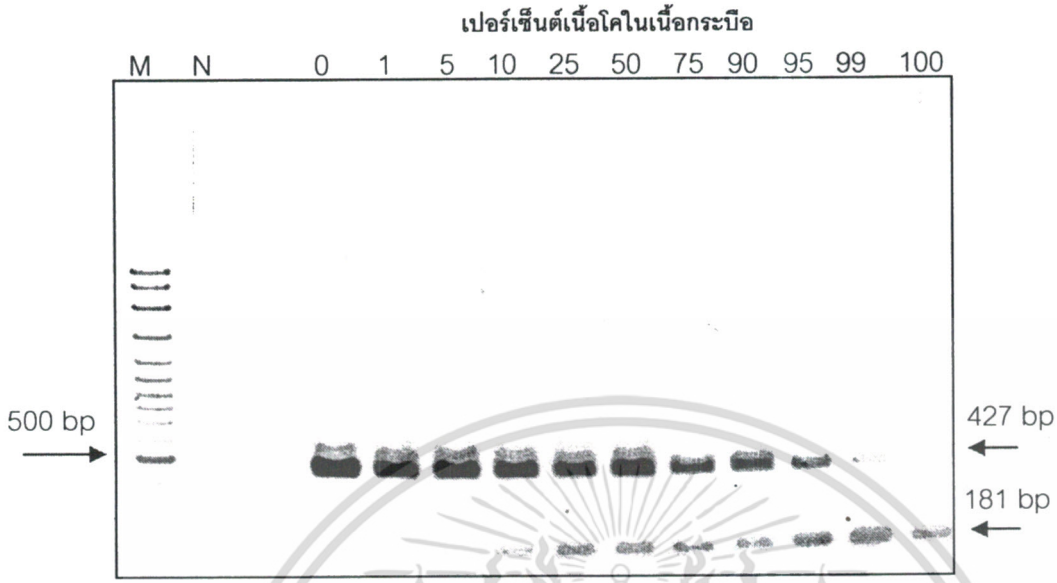


ภาพที่ 16 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและไก่ในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control



ภาพที่ 17 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและโคในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาทีแถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 18 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและกระบือในเนื้อทำให้สุกที่ 116°C นาน 30 นาที แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control

ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ผสมสามชนิด

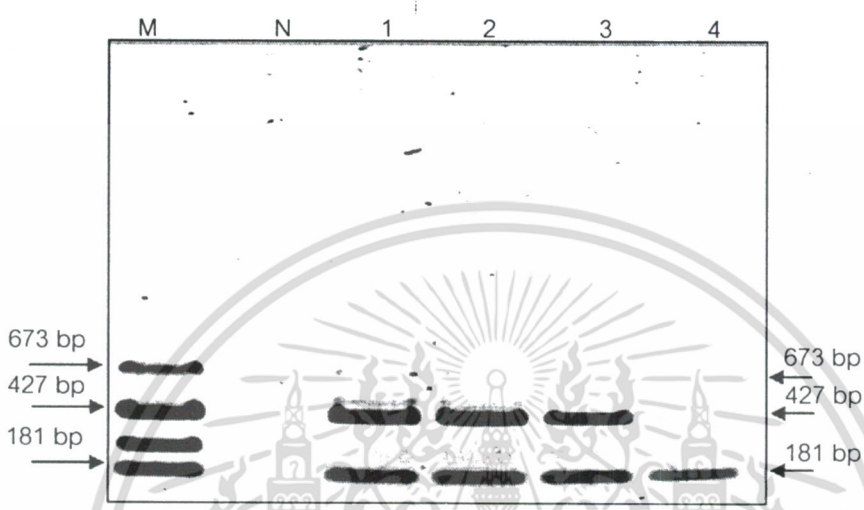
เพื่อทดสอบความสามารถของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ในเนื้อผสมสามชนิด ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือ และเนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อไก่ ในสัดส่วน 30:30:30 ทั้งในเนื้อดิบและเนื้อที่ทำให้สุกที่ระดับความร้อนและเวลาต่างๆ เมื่อนำส่วนผสมเนื้อสัตว์มาสกัดดีเอ็นเอและทำการจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบ และวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้บนอะกาโรสเจลโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยได้ผลการทดลองดังนี้

1. **เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อกระบือ**

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกร เนื้อโคและเนื้อกระบือ เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ในเนื้อดิบและเนื้อที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกร กระบือและโค ที่ขนาดประมาณ 670, 430 และ180 bp ตามลำดับ โดยที่แถบดีเอ็นเอของสุกรมีความเข้มน้อยกว่าแถบดีเอ็นเอของกระบือและโคประมาณ 5 เท่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ116°C นาน 30 นาที พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือและโค แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของสุกร และเท่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ116°C นาน 30 นาที พบว่า แถบดีเอ็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอจำเพาะของกระบือมีความเข้มลดลงแต่แถบดีเอ็นเอของโคยังคงมีความเข้มไม่แตกต่างจากเนื้อดิบมากนัก (ภาพที่ 19) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มระดับความร้อนและเวลาในการทำให้เนื้อสุก ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรและกระบือซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่กว่าจะลดลง

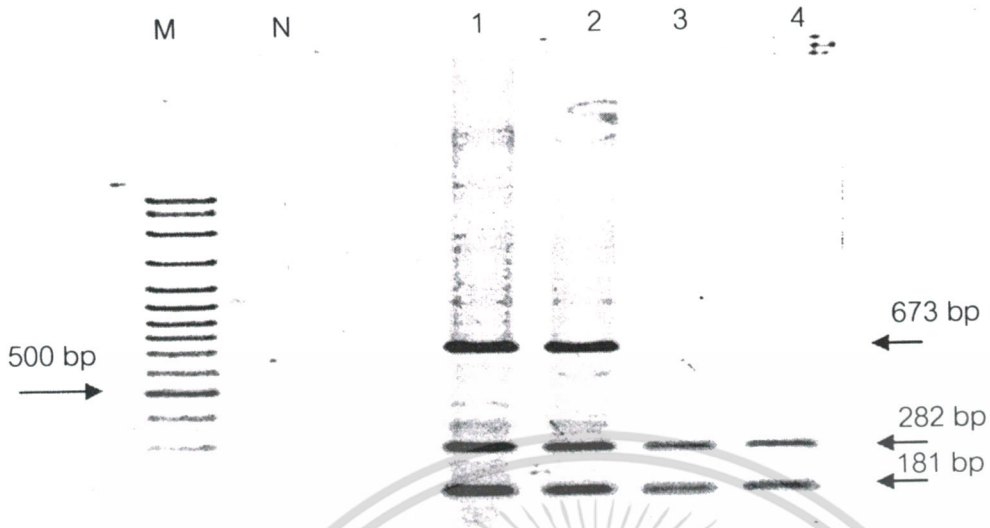


ภาพที่ 19 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกร โค และกระบือในเนื้อดิบและทำให้สุก แถบ M เป็นแถบดีเอ็นเอผลผลิตของสุกร กระบือ ไก่และโค แถบ N เป็น negative control แถบ 1-4 เป็นเนื้อดิบ, เนื้อทำให้สุกที่ 82°C นาน 20 นาที, ที่ 116°C นาน 30 นาที และ ที่ 116°C นาน 60 นาที ตามลำดับ

2. เนื้อสุกรผสมเนื้อโคและเนื้อไก่

เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสุกร เนื้อโคและเนื้อไก่ เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ในเนื้อดิบและเนื้อที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกร ไก่และโค ที่ขนาดประมาณ 670, 280 และ180 bp ตามลำดับ โดยที่แถบดีเอ็นเอของสุกรมีความเข้มไม่แตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของไก่และโค เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 11 °C นาน 30 นาที พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะของกระบือและโค แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของสุกร และเท่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกที่อุณหภูมิ 116°C นาน 30 นาที และ 60 นาที พบว่า แถบดีเอ็นเอจำเพาะของสุกรหายไป ขณะที่แถบดีเอ็นเอของไก่และโคยังคงตรวจพบได้ (ภาพที่ 20) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่จะลดลง ขณะที่ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของโคและไก่ยังคงให้ผลที่ดี เมื่อมีการเพิ่มระดับความร้อนและเวลาในการทำให้เนื้อสุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 20 ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกร โค และไก่ในเนื้อดิบและทำให้สุก แถบ M เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N เป็น negative control แถบ 1-4 เป็นเนื้อดิบ, เนื้อทำให้สุกที่ 82°C นาน 20 นาที, ที่ 116°C นาน 30 นาที และ ที่ 116°C นาน 60 นาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผล

เทคนิคพีซีอาร์ชุดไพรเมอร์รวมมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing temprature) ที่ 65°C โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์สามารถทำงานได้พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อสุกร กระบือ ไก่ และโค มีขนาดประมาณ 670 bp, 430 bp, 282 bp และ180 bp ตามลำดับ เทคนิคพีซีอาร์นี้มีความไวในการตรวจพบดีเอ็นเอของสัตว์ที่ระดับต่ำสุด 0.1 นาโนกรัมเมื่อใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น แต่เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อผสม พบว่า เทคนิคพีซีอาร์นี้สามารถจำแนกดีเอ็นเอของสุกร กระบือ ไก่ และโคได้ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ดิบเมื่อมีการผสมเนื้อสัตว์แต่ละสปีชีส์ปริมาณขั้นต่ำ 1 เปอร์เซ็นต์ (1 กรัมในน้ำหนักเนื้อรวม 100 กรัม) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Rodriguez *et al.* (2004) ซึ่งทำการจำแนกเนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อแกะ และเนื้อแพะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และการทดลองของ Calvo *et al.* (2001) ซึ่งทำการตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุไว้บนฉลากสินค้าว่าผลิตมาจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทดลองทำการผสมเนื้อสัตว์ในสัดส่วนที่ต่ำกว่า 1% เป็นไปได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบน่าจะมีความสามารถในการจำแนกเนื้อสัตว์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่านี้ เนื่องจากในการทดสอบกับดีเอ็นเอบริสุทธิ์ใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงแค่ 0.1 นาโนกรัมเท่านั้น

นอกจากนี้ในการวิจัยยังพบว่า เมื่อนำส่วนผสมเนื้อสัตว์ไปทำให้สุกด้วยระดับความร้อนและเวลาที่แตกต่างกัน เทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบสามารถจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ในสัดส่วนต่างๆ ได้ในเนื้อผสมที่นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 82°C นาน 20 นาที โดยมีระดับการตรวจพบที่ปริมาณเนื้อสัตว์ 1% เมื่อนำเนื้อผสมไปทำให้สุกด้วยนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 116°C นาน 30 นาที และ 60 นาที ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของไก่และโคยังคงให้ผลทดสอบที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arslan *et al* (2006) ที่ระบุว่าการนึ่งเนื้อโคด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 30-90 นาที ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยีนขนาดประมาณ 300 bp ในเนื้อโค อย่างไรก็ตามความสามารถของเทคนิคพีซีอาร์ในการจำแนกดีเอ็นเอของสุกรลดลงเมื่อนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 116°C นาน 30 นาที และ 60 นาที นอกจากนี้ความสามารถในการจำแนกดีเอ็นเอของกระบือลดลงเช่นกันเมื่อนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 116°C นาน 60 นาที ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกรและกระบือถูกออกแบบให้เพิ่มจำนวนส่วนของยีน12S rRNA ที่มีขนาด 670 และ 430 bp ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของไก่และโคถูกออกแบบให้เพิ่มจำนวนส่วนของยีน12S rRNA ที่มีขนาด 280 และ 180 bp ตามลำดับ การนำเนื้อสัตว์ไปผ่านการทำให้สุกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความร้อนและความดันสูง ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์สัตว์จะเกิดการแตกหัก ทำให้ดีเอ็นเอของสุกรและกระบือเกิดการแตกหักและมีขนาดสั้นลง ส่งผลให้ความสามารถในการเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นลดลง โดยที่การเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของสุกรซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการเข้าจับดีเอ็นเอของกระบือที่มีขนาดรองลงมา ทั้งนี้ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Ebbehoj and Thomsen (1991) ซึ่งนำเนื้อไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C นานเพียง 10 นาที พบว่าดีเอ็นเอมีการแตกหักเป็นท่อนสั้น ซึ่งมีขนาดสั้นกว่า 300 bp การออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเข้าจับดีเอ็นเอของสุกรและกระบือได้ในตำแหน่งที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดสั้นลง น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์เป้าหมายได้ดีขึ้น

ในกรรมวิธีการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูปทั่วไป เช่น การผลิตลูกชิ้น ใช้อุณหภูมิในการต้มที่ 72°C นาน 15 นาทีสำหรับลูกชิ้นไก่ ส่วนลูกชิ้นหมูหรือลูกชิ้นเนื้อโคใช้การต้มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 20 นาที และต้มครั้งที่สองในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 80-85°C นาน 5 นาที ส่วนในการผลิตหมูยอใช้การต้มในน้ำเดือดที่ 100°C นาน 45 นาที ในขณะที่การผลิตไส้กรอกใช้การอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง รมควันที่อุณหภูมิ 70°C นาน 45 นาที และผ่านไอน้ำเพื่อทำให้สุกที่อุณหภูมิ 75-90°C นาน 1-2 นาที (อิ่มเอิบพันสด, 2549) จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยครั้งนี้การทำให้เนื้อสัตว์สุกด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำจัดทำขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 116°C นาน 30-60 นาที ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิที่สูงกว่าและแรงดันมากกว่า (1 บาร์) กรรมวิธีการแปรรูปเนื้อสัตว์จริง ดังนั้นการนำเทคนิคพีซีอาร์ชุดไพรเมอร์รวมที่ออกแบบไปใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ทั้งสี่ชนิดในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปดังกล่าวจึงคงมีประสิทธิภาพที่ดีเพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มความไวในการตรวจสอบ การออกแบบไพรเมอร์ที่จะเพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์ที่นิยมบริโภคอื่นๆ เช่น แพะ แกะ เป็ด หรือห่าน รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ไปสู่การวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative PCR) ยังจะต้องจัดทำการวิจัยและพัฒนาต่อไป ซึ่งเหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบทั้งอาหารสำหรับมนุษย์และอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อิ่มเอิบ พันสด. 2549. เทคโนโลยีเนื้อและผลิตภัณฑ์. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. บทเรียนบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต. [Online]. Available: http://www.nsru.ac.th/e-learning/meattech/less.htm.

Aida A.A., Che Man Y.B., Wong C.M.V.L., Raha A.R. and Son R. 2004. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication. **Meat Sci.** 69(1): 47-52.

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.

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.

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.

Calvo J.H., Zaragoza P. and Osta R. 2002. Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **J. Anim. Sci.** 79(8): 2108-2112.

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.

Dalmasso A., Fontanella E., Piatti P., Civera 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

European Commission. 2000. Council Decision 2000/766/EC of 4 December 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. **Off. J. Eur. Comm.** L306(7/12/2000):32-33.

European Commission. 2002. Council Decision 2002/248/EC of 27 March 2002 amending Council Decision 2000/766/EC and Council Decision 2001/9/EC with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. **Off. J. Eur. Comm.** L84(28/3/2002):71-72.

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

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.

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

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.

Jurka J., Zietkiewicz 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.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. 2007. ClustalW2 and ClustalX version 2. **Bioinformatics**. 23(21): 2947-2948.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee J.C. and Chang J.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. **J. Forensic Sci.** 67(2): 103-107.

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.

Martinez, I. and Yman I.M. 1998. Identification in meat products by RAPD analysis. **Food Res. Int.** 31(6-7): 459-466.

Meyer R. and Candrian U. 1996. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenhauf and Technologie.** 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.

Momcilovic D. and Avraham R. 2000. Detection ad Analysis of Animal Materials in Food and Feed. **J. Food Prot.** 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.

Murry 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

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 bovine0derived 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.

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.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลาย

10X TBE buffer, pH 8.3

ชั่ง Tris base 107.80 กรัม Boric acid 55 กรัม disodium EDTA 7.44 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับpH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N NaOH เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ทำให้ไร้เชื้อด้วยการ autoclave

6X Gel loading buffer

ชั่ง bromophenol blue 25 มิลลิกรัม xylene cyanol 25 มิลลิกรัม and sucrose 4 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

1% Agarose gel

ชั่งอะกาโรสเจล 1 กรัม เติม 1XTBE buffer ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมในเครื่องไมโครเวฟจนเจลละลายเป็นเนื้อเดียว เทลงถาดสำหรับเตรียมเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtDNA 12S rRNA

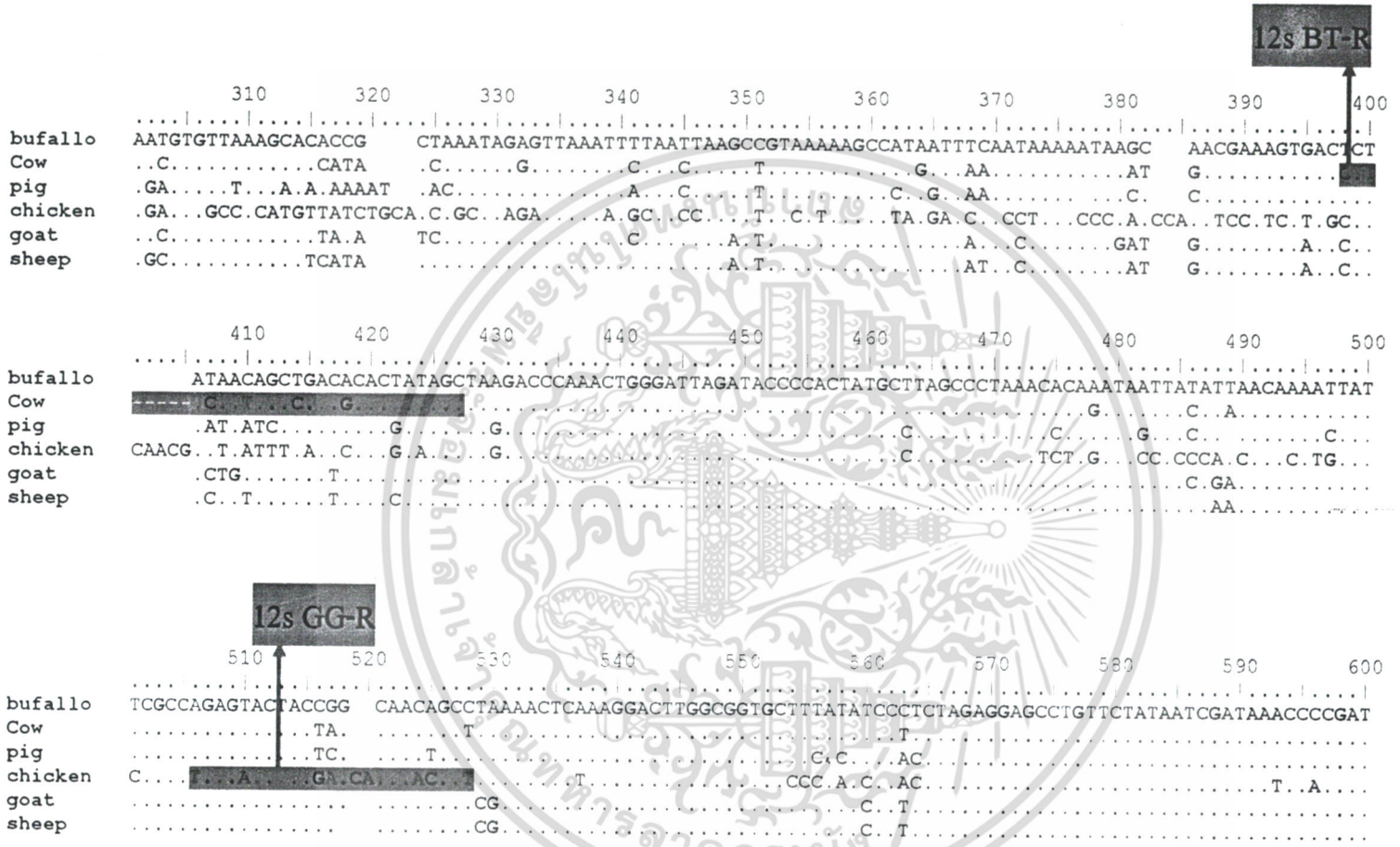
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtDNA 12S rRNA ของสุกร (AY574048), โค (V00654), กระบือ (AY702618), แพะ (AF533441), แกะ (AF010406) และไก่ (AP003323) ด้วยโปรแกรม ClustalW2

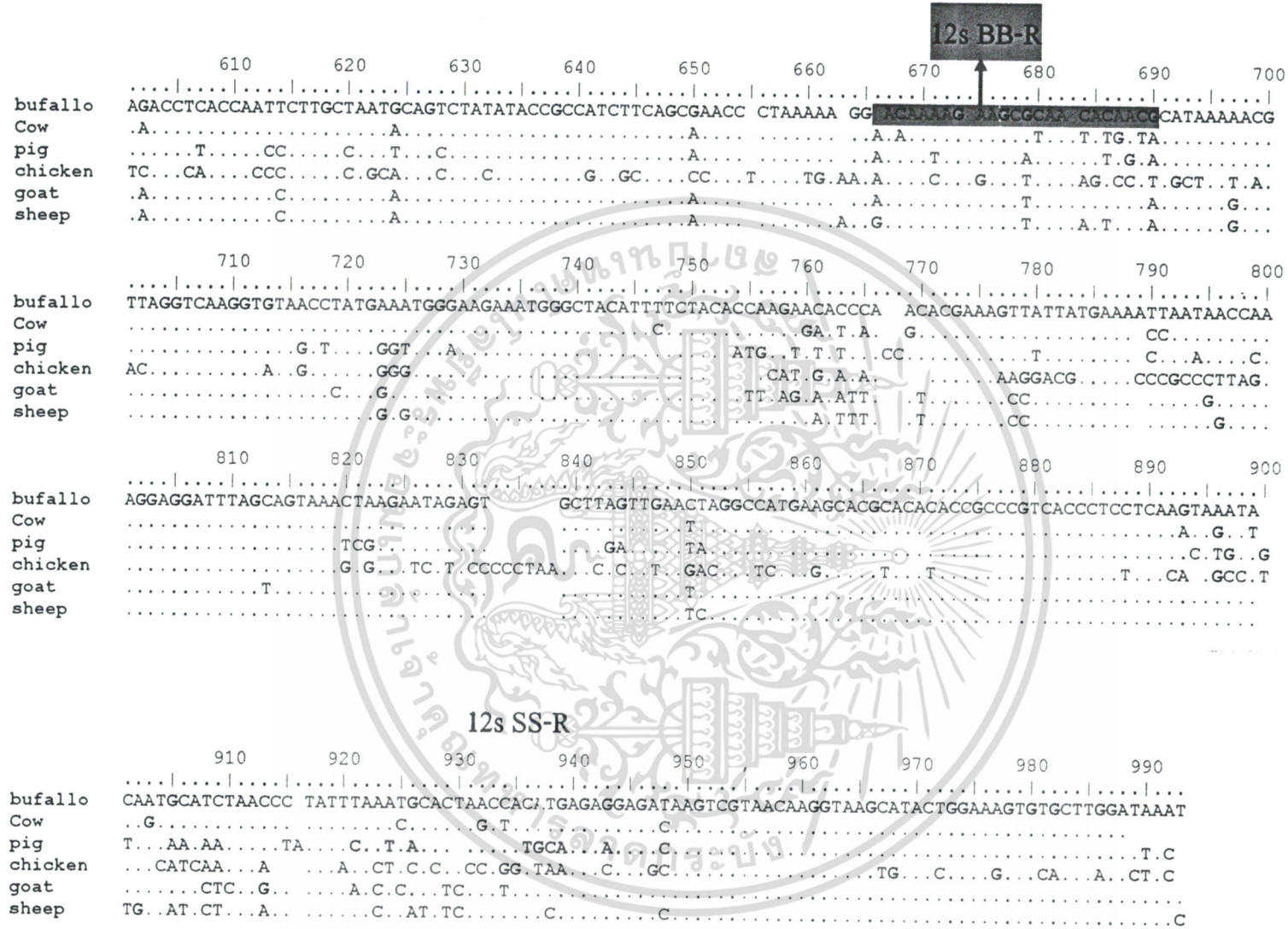
```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bufallo    CATAGGTTTGGTCCCAGCCTTCCTGTTAACTCTTAATAAACTTACACATGCAAGCATCCGCATCCCGGTGAG AATGCCCTCTAGGTCA   ACAAAACT
Cow        ..........................................................TA..C...A..... ..............T.   TT......
pig        ..C...........TG.....T..A....T.........A.............T.....GC......... .........C..A..T   TA..G.TC
chicken    A.A..AC..A....T.A....T..A..GGT.T..GC..G..A..T.........T.............A....A ........C.A.ACCTTTCTT.CC..GC
goat       ..............................C..C.G.....................A.GC.....T..C.....C.AA...    .T..G...
sheep      T.............................T.C....G.....T.............A.GC.....T..C.....TCGAA...C   ...GG...

                110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bufallo    AAGAGGAGCGGGCATCAAGCACAC  A CC TGTAGCTCACGACGCCTTGCTTAA CCACACCCCCACGGG AAACAGCAGTGACAAAAATTAAGCCATA
Cow        .........T.................  ..C.....................  ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
pig        ..A......A..T............CT.TAACG.......TA..........C.....  ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
chicken    ..A......A..T....G.....TC..  GCA.....C..A.....  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
goat       .........A..T.............  T.TC.....T..A.....C.....  ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
sheep      ..A......A..T.............  .CT.T.....A.....  ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

                210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
           ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bufallo    AACGAAAGTTTGACTAAGTTATATTAACTAAGGGTTGGTAAATCTCGTGCCAGCCACCGCGGTCATACGATTAACCCAAGCTAACAGGAGTACGGCGTAA
Cow        ..........................T.  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
pig        ..........................T..A..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
chicken    .GT.T..AC.....T..CC...GC..CC..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
goat       ..................CC..G..G..C..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
sheep      ..................C.....G..C..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
```

12s-F


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


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

ประวัติผู้วิจัย

1. **ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์**

ความรับผิดชอบในโครงการ

หัวหน้าโครงการ

คุณสมบัติทางวิชาการ

อาจารย์ (พนักงานสถาบัน)

หน่วยงานต้นสังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์: 02-7377000 ต่อ 6047

มือถือ: 089-7514162

โทรสาร: 02-3264313

อีเมล์: kjkanya@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2533-2536: วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ปีการศึกษา 2541-2543: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ปีการศึกษา 2543-2547: Doctor of Philosophy (Animal Science)
University of Nottingham ประเทศอังกฤษ

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

Genetic engineering in animal

ผลงานวิจัย

Pongjaroenkit, S., **K. Jirajaroenrat**, C. Boonchauy, U. Chanama, S. Leetachewa, L. Prapanthadara and A.J. Ketterman. 2001. "Genomic organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*" Insect Biochem. Mol. Biol. 31(1):75-85.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jirajaroenrat, K., S. Pongjaroenkit, C. Krittanai, L. Prapanthadara and A.J. Ketterman. 2001. "Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene" Insect Biochem. Mol. Biol. 31(9):867-875.

Oakley, A.J., **K. Jirajaroenrat**, T. Harnnoi, A.J. Ketterman and M.C. Wilce. 2001. "Crystallization of two glutathione S-transferases from an unusual gene family" Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57(Pt 6):870-872.

Oakley, A.J., T. Harnnoi, R. Udomsinprasert, **K. Jirajaroenrat**, A.J. Ketterman, and M. C. Wilce. 2001. "The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1- 4 from *Anopheles dirus* species B" Protein Sci. 10(11):2176-2185.

Jirajaroenrat, K., C. Denning, M. Hamshere and K.H.S. Campbell. 2003. "Selection of accessible cleavage sites on alpha1,3-galactosyltransferase gene" In The 8th RNA Society Conference. Austria: Vienna.

Jirajaroenrat, K. and C. Thammakarn. 2007. "Sex identification of some pet birds by Polymerase Chain Reaction-based methods" 376-379. In International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. Bangkok: King Monkut's Institute of Technology Ladkrabang.

Jirajaroenrat, K., Y.Opatpatanakit, L. Srisuwan and J. Sethakul. 2007. "Myofibrillar protein degradation over ageing period of Kampaengsaen beef" 193-194. In Proceeding of 53rd International Congress of Meat Science and Technology. China: Beijing.

Thammakarn, C., A. Punchukrang, **K. Jirajaroenrat** and K. Srikijkasemwat. 2007. "Sex identification of some Psittacine birds by polymerase chain reaction" Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine. 2(2):30-34.

กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. "การย้ายฝากยีนผ่านทางตัวอสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 26(1): 116-123. บทความ.

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. "การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิคพีซีอาร์" หน้า 164-168. ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กัญญา จิระเจริญรัตน์ ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2551. "การจำแนกสปีชี่ย์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงซ้อน" วารสารวิทยาศาสตร์ มข. (ระหว่างตีพิมพ์)

ฐาปนา **เขมนิพิฐพนธ์** จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ **กัญญา จิระเจริญรัตน์**. 2551. "การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อน" ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9. ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. (ระหว่างตีพิมพ์)

2. **นาย ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์**

ความรับผิดชอบในโครงการ

ผู้ร่วมวิจัย

คุณสมบัติทางวิชาการ

นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์

หน่วยงานต้นสังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์: 02-7377000 ต่อ 3640
โทรสาร: 02-3264313
อีเมล์: tapana.big@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2544 -2547 : วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลภาคตะวันออก วิทยาเขตบางพระ

ผลงานวิจัย

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. "การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิคพีซีอาร์" หน้า 164-168. ใน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. "การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรเมอร์เชิงซ้อน" ใน - การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9. ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. (ระหว่างตีพิมพ์)

กัญญา จิระเจริญรัตน์ **ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์** และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2551. "การจำแนกสปีชี่ย์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงซ้อน" วารสารวิทยาศาสตร์ มข. (ระหว่างตีพิมพ์)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้