การตรวจสอบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

Detection of Haram Animals in Processed Food Products using Real-Time PCR

มนฤดี เข็มทำ

MONRUEDEE KHEMTHAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-290

การตรวจสอบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

Detection of Haram Animals in Processed Food Products using Real-Time PCR

มนฤดี เข็มทำ

MONRUEDEE KHEMTHAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-290

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DETECTION OF HARAM ANIMALS IN PROCESSED FOOD PRODUCTS USING REAL-TIME PCR

MONRUEDEE KHEMTHAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

FACULTY OF AGRO–INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-AI-M-054-290

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2017

FACULTY OF AGRO–INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปด้วยเทคนิค Real-Time PCR

DETECTION OF HARAM ANIMALS IN PROCESSED FOOD PRODUCTS USING REAL-TIME PCR

ชื่อนักศึกษา นางสาวมนฤดี เข็มทำ

รหัสประจำตัว 56608030

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตติชัย บรรจง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 12 ธันวาคม 2560 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง D 213 อาคารเจ้าคุณทหาร

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 12 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปด้วยเทคนิค Real-Time PCR
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนฤดี เข็มทำ
รหัสประจำตัว	56608030
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.กิตติชัย บรรจง

บทคัดย่อ

ความปลอดภัยทางอาหารเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเฝ้าระวังเพื่อป้องกันอันตรายที่มาจากอาหาร ไม่ว่าจะเป็นอันตรายทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพ สำหรับผู้บริโภคมุสลิมการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามตามบทบัญญัติศาสนาอิสลามโดยเฉพาะสัตว์หะรอมเป็นสิ่งที่ต้องเฝ้าระวังเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งนอกจากจะส่งผลตามความเชื่อและหลักศรัทธาที่มีต่อพระเจ้ายังอาจส่งผลต่อผู้บริโภคที่มีอาการแพ้อาหารโปรตีนจากเนื้อสัตว์บางชนิดได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับการตรวจวัดสัตว์หะรอม 4 ชนิด ได้แก่ สุกร กบ งู และจระเข้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการประกันคุณภาพของอาหารฮาลาลและคุ้มครองผู้บริโภคที่ต้องการรับประทานอาหารที่ถูกต้องตรงตามฉลากอาหารที่ระบุไว้ การวิจัยเริ่มจากเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอจากสุกร กบ งู และจระเข้เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ รวมถึงคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่ตั้งอยู่บนไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อสัตว์หะรอมแต่ละชนิด ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กับดีเอ็นเอของสัตว์อื่นๆ เช่น สุนัข แมว หนู ลิง ไก่ ม้า ลา แพะ และแกะ ในส่วนของความไว (sensitivity test) ในการตรวจวัดพบว่า สามารถตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอสัตว์หะรอมแต่ละชนิดได้ต่ำสุดโดยสุกรตรวจวัดได้ที่ 0.00002 นาโนกรัม กบตรวจวัดได้ที่ 0.2 นาโนกรัม งูตรวจวัดได้ที่ 0.2 นาโนกรัม และจระเข้ตรวจวัดได้ที่ 0.000002 นาโนกรัม จากนั้นได้นำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าจำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่า ตรวจพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร 2 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอกบ ดีเอ็นเองู และดีเอ็นเอจระเข้ในตัวอย่างอาหารทางการค้า เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจการปนเปื้อนเนื้อสัตว์แปรรูปในอาหารฮาลาลได้ และสามารถต่อยอดงานวิจัยไปพัฒนาการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการคุ้มครองผู้บริโภคได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Detection of Haram Animals in Processed Food Products using Real-Time PCR
Student	Ms. Momruedee Khemtham
Student ID.	56608030
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2017
Thesis Advisor	Dr. Kittichai Banjong

ABSTRACT

This thesis proposes a demand for Halal foods increases globally hence requiring food industry to quickly and safely ensure the Halal food products. On the other hand, Muslim consumers must be informed of contamination of prohibited substances under Islamic law, especially when it concerns with haram (prohibited) animals in those food products. Recent development in laboratory technique of molecular biology based on the polymerase chain reaction (PCR), which was employed to determine the presence of a particular DNA sequence in real time, can enhance the detection of haram animal contamination in foods. This research aims to develop the Real-Time PCR technique (qPCR) for the detection of haram animals in processed food products using pig, frog, snake, and crocodile as specimens. The qPCR is to be used as a tool for Muslim consumer protection. To begin the experiment, the animal samples were collected, and the DNA was extracted and used as template DNA. Then primers were selected and designed from the genes located on mitochondria such as NADH dehydrogenase (ND5), and 16S rRNA (16S), which are specific to the particular species. The results showed that the primers employed in this study were specific to each of the haram animals with 100 % accuracy. According to the sensitivity test, the lowest concentration of DNA of each species was measured at a minimum of pig 0.00002 ng, frog 0.2 ng, snake 0.2 ng, and crocodile 0.000002 ng. For the reliability test, the developed technique was applied to detect the contamination of 100 commercial food products. It was found that two porcine DNA samples were detected and no DNA of frog, snake and crocodile were detected in commercial food samples. As a result, Real-Time PCR technique was successfully employed to detect the contamination in halal foods and it can be extended to other types of haram animals as a tool for Muslim consumer protection as well as Halal food certification.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กิตติชัย บรรจง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้ที่ดีแก่ข้าพเจ้า จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้งบประมาณสนับสนุนงานวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอขอบคุณ คุณอาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์ ที่เป็นพี่เลี้ยง ให้คำแนะนำ สิ่งที่เป็นประโยชน์ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์กรสวนสัตว์แห่งประเทศไทย กองพันสัตว์ต่างกรมการสัตว์ทหารบกที่ให้ความอนุเคราะห์เนื้อสัตว์และเลือดสัตว์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจและกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

มนฤดี เข็มทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....VII
สารบัญภาพ.....VIII
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
2.1 อาหารฮาลาลกับศาสนาอิสลาม.....5
2.1.1 การเชือดหรือฆ่าสัตว์ตามหลักการศาสนาอิสลาม.....6
2.2 มาตรฐานการผลิตอาหารฮาลาลตามหลักการของศาสนาอิสลาม.....7
2.2.1 มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์.....8
2.2.2 มาตรฐานฮาลาลประเทศไทย.....11
2.3 พัฒนาการการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป.....16
2.3.1 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนจากเนื้อสุกรและเนื้อสัตว์อื่นๆ.....16
2.3.2 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์.....16
2.3.2.1 DNA hybridization.....17
2.3.2.2 วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)..... 17
2.3.2.3 Random Amplification of Polymorphic (RAPD).....17
2.3.2.4 Single strand conformational polrmorphism analysis (SSCP).....17
2.3.2.5 Multiplex PCR.....17
2.3.2.6 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP).....18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2.7 Real-Time PCR……...18
2.4 หลักการ Real time PCR.....19
2.5 การประยุกต์ใช้ Real time PCR ในงานด้านต่าง ๆ.....22
2.5.1 การตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว (rapid diagnosis).....22
2.5.2 การทดสอบเชิงปริมาณ.....22
2.5.3 การทดสอบ PCR products โดย Melting curve.....22
2.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล.....23
2.7 การแพ้เนื้อสัตว์.....24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย……25
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....25
3.2 ตัวอย่างสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ.....26
3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ หรือเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit.....28
3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit.....29
3.5 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 Spectrophotometer.....30
3.6 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์หะรอม.....30
3.7 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....31
3.7.1 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสุกรด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....32
3.7.2 การตรวจวัดดีเอ็นเอของกบด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....32
3.7.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของงูด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....32
3.7.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอของจระเข้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....33
3.8 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Real-Time PCR.....34
3.9 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ของเทคนิค Real-Time PCR.....34
3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.11 สถานที่และระยะเวลาที่ทำวิจัย.....35

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....36

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เลือดสัตว์และตัวอย่างอาหาร.....36

4.2 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์หะรอม.....38

4.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....39

4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Real-Time PCR.....42

4.5 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....42

4.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า49

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....53

5.1 สรุปผลการทดลอง.....53

5.2 ข้อเสนอแนะ.....54

บรรณานุกรม.....55

ภาคผนวก.....59

ประวัติผู้เขียน.....62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แสดงสรุปแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควบคุมและทดสอบความจำเพาะ...27

3.2 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Real-Time PCR.....31

3.3 สรุปการตั้งค่าจำนวนรอบและอุณหภูมิในการตรวจวัดสัตว์หะรอมแต่ละชนิดด้วยเทคนิค Real-Time PCR.....33

4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง……..…...37

4.2 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 100 ตัวอย่าง……..…38

4.3 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกและออกแบบใหม่ การตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-Time PCR ……..……..……..…39

4.4 แสดงช่วงค่า Tm เฉลี่ย และช่วงค่า Tm ของสัตว์แต่ละชนิดจากการการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR รายละเอียดของคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ของสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด……..……..…40

4.5 แสดงการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ด้วยเทคนิค Real-Time PC..…….....43

4.6 แสดงการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของสุกร กบ งู จระเข้ ไก่ ม้า แพะ แกะ สุนัข หนู แมว ลิง และลา จำนวน 3 ซ้ำ.....44

4.7 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR……..……..…47

4.8 แสดงจำนวนตัวอย่างอาหารทางการค้าที่นำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR……..……..……..…...50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 เครื่องหมายฮาลาลของประเทศไทยเป็นลิขสิทธิ์ของสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย (สกอท.).....11
2.2 แสดงเครื่อง real time thermocycler.....19
2.3 แสดงการตรวจวัด PCR product ด้วย SYBR Green I (A)ในช่วงของการdenature.....20
2.4 แสดงการทดสอบ Melting curve.....21
2.5 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCR.....23
4.1 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอสุกร ทดลอง 3 ซ้ำ โดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 12.....40
4.2 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอกบ ทดลอง 3 ซ้ำโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 30.....41
4.3 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเองู ทดลอง 3 ซ้ำโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 12.....41
4.4 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอจระเข้ ทดลอง 3 ซ้ำโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 29.....42
4.5 แสดง Amplification Curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของสุกรที่ระดับ 0.00002 นาโนกรัม.....47
4.6 แสดง Amplification Curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของกบที่ระดับ 0.2 นาโนกรัม.....47
4.7 แสดง Amplification Curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของสุกรงูที่ระดับ 0.2 นาโนกรัม.....48
4.8 แสดง Amplification Curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของจระเข้ที่ระดับ 0.000002 นาโนกรัม.....48
4.9 แสดง Amplification Curves ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งพบการปนเปื้อนสุกร เทียบกับ Positive control ของสัตว์หะรอมซึ่งสอดคล้องซึ่งสอดคล้องกับ Positive control ดีเอ็นเอของสุกร.....50
4.10 แสดง Amplification Curves ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งพบการปนเปื้อนสุกร เทียบกับ Positive control ของสัตว์หะรอมซึ่งสอดคล้องกับ Positive control ดีเอ็นเอของสุกร.....51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันผู้บริโภคต่างให้ความสำคัญกับคุณภาพของอาหารที่บริโภคเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณค่าทางโภชนาการและคุณภาพของวัตถุดิบ ซึ่งต้องได้รับการตรวจสอบว่ามีคุณภาพและมีความปลอดภัยเหมาะสมที่จะนำมาบริโภค ทั้งนี้เพราะในยุคปัจจุบันเป็นยุคที่ผู้บริโภคสามารถเข้าถึงข้อมูลข่าวสารได้อย่างรวดเร็ว ตลอดจนผู้บริโภคเองยังมีส่วนร่วมเป็นอย่างมากในการตรวจสอบดูแลสิทธิประโยชน์ของผู้บริโภคในการบริโภคอาหารที่ปลอดภัยได้เองทั้งทางตรงและทางอ้อม (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556)

สำหรับประชากรมุสลิมซึ่งมีมากกว่า 1 ใน 4 ของประชากรโลก มีระเบียบแบบแผนการปฏิบัติตนตามศาสนบัญญัติอิสลามอย่างเคร่งครัดในเรื่องการดำเนินชีวิต ซึ่งรวมถึงการบริโภคอาหารที่อนุมัติตามศาสนบัญญัติอิสลามและหลีกเลี่ยงการบริโภคสิ่งที่ไม่อนุมัติอย่างเคร่งครัดเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การบริโภคเนื้อสัตว์ เช่น สุกร สัตว์ที่ไม่ได้รับการเชือดตามวิธีการที่ศาสนบัญญัติอิสลามกำหนดไว้ สัตว์ที่ล้มตาย รวมถึงสัตว์หะรอมชนิดอื่นๆ อีกด้วย ทั้งนี้การบริโภคสิ่งไม่อนุมัติเหล่านั้นจะส่งผลต่อความเชื่อในเรื่องจิตวิญญาณและการศรัทธาอันเป็นหัวใจหลักในการกระทำความดีตามหลักการศาสนาอีกด้วย ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารที่วางขายในท้องตลาดปัจจุบัน มีการพัฒนาทั้งรูปลักษณ์และส่วนผสมของอาหารเพื่อประโยชน์ทางด้านการค้า มีการใช้วัตถุดิบที่แปรสภาพไปจากรูปแบบวัตถุดิบดั้งเดิมไม่มากก็น้อย ทำให้ผู้บริโภคไม่สามารถพิจารณาได้ในทันท่วงที ต้องใช้กระบวนการสืบค้นข้อมูลไปจนกระทั่งการนำเอากระบวนการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยและการนำหลักการทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้ร่วมกับศาสนบัญญัติอิสลามเพื่อใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิต การตรวจติดตามคุณภาพอาหารฮาลาลนับเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเสริมสร้างภาพลักษณ์และความเชื่อมั่นให้เกิดกับผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556) ทำให้เกิดความมั่นใจในตัวสินค้าหรือผลิตภัณฑ์ และนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการแข่งขัน เป็นการเพิ่มส่วนแบ่งตลาดอาหารฮาลาลของประเทศไทยในตลาดอาหารฮาลาลของโลกได้

การระบุส่วนประกอบของอาหารในฉลากของผลิตภัณฑ์จะทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในการเลือกซื้ออาหารว่าจะไม่มีการปลอมปนส่วนประกอบอื่นใดนอกเหนือจากที่ระบุไว้ การรับรองมาตรฐานเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพในกระบวนการผลิตอาหารให้มีความสะอาดและปลอดภัยและถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลามที่มีกำหนดไว้อย่างชัดเจน เพื่อเป็นการปกป้องสิทธิและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมให้บริโภคอาหารที่ฮาลาลเท่านั้น คือต้องไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปนเปื้อนของสิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ ซึ่งอาจเกิดจากการผลิตที่มีต้นทุนต่ำ หรือเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อน เนื่องจากเนื้อสัตว์มีราคาสูง ผู้ผลิตส่วนใหญ่พยายามที่จะลดต้นทุนในการผลิตโดยการปลอมปนเนื้อสัตว์ที่มีราคาถูกในผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพดี เช่นการปลอมปนเนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อหนู เนื้อสุนัขในผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว (Ali et al., 2015) ซึ่งการกระทำดังกล่าวถือว่าเข้าข่ายการหลอกลวงผู้บริโภคความต้องการของอาหารข้อมูลไม่ถูกต้องตามที่ระบุไว้บนฉลาก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคที่มีการอาการแพ้อาหารได้ เช่นการแพ้โปรตีนในเนื้อสัตว์บางชนิด (Ganopoulos et al., 2013) หรือผู้บริโภคที่ไม่รับประทานเนื้อวัว หรือผู้บริโภคที่มีข้อจำกัดทางศาสนา เช่น ผู้บริโภคมุสลิม ซึ่งการปนเปื้อนเนื้อสัตว์หรือในผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนจากวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบจากสัตว์ต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลามจากสัตว์ที่ไม่ฮาลาลอยู่เสมอ หรือจากการติดฉลากที่ไม่ตรงกับความเป็นจริง

ความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในโลกเป็นไปอย่างรวดเร็ว ผู้บริโภคมีความประสงค์ที่จะได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยมากขึ้นทั้งทางกายภาพและทางจิตวิญญาณ จึงจำเป็นต้องมีการนำเอามาตรฐานต่างๆ เข้ามากำกับดูแลกระบวนการผลิตและการบริการ ซึ่งในอุตสาหกรรมปัจจุบันมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ซึ่งส่งผลให้การได้มาของวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสมัยใหม่จำนวนมากมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสิ่งหะรอม (สิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลาม) ทั้งโดยตั้งใจและมิได้ตั้งใจอยู่บ่อยครั้ง ความไม่เข้าใจของผู้ประกอบการตลอดจนการขาดความรู้ความเข้าใจอย่างถูกต้องของฝ่ายตรวจสอบและการรับรองฮาลาลขององค์กรศาสนาอิสลามส่งผลให้สิ่งหะรอมเหล่านั้นปนเปื้อนเข้าในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ง่ายขึ้น การกำหนดมาตรฐานฮาลาลมีการรับรองฮาลาลโดยองค์กรศาสนาอิสลามตามขั้นตอนปกติ อาจไม่มีการตรวจสอบอย่างถูกต้องและละเอียดถี่ถ้วนทั้งนี้เพราะขาดการใช้ประโยชน์จากห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่เข้าใจงานทางด้านวิทยาศาสตร์ฮาลาล ผลของการตรวจประเมินเพื่อการรับรองฮาลาลในลักษณะนี้ก่อให้เกิดปัญหาขึ้นได้ง่ายและบ่อยครั้ง

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและครอบคลุม ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสิ่งหะรอมโดยเฉพาะสัตว์หะรอมหลายประเภทจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ผู้บริโภคมุสลิมและผู้บริโภคทั่วไปเกิดความมั่นใจในผลิตภัณฑ์และที่ระบุรายละเอียดตามฉลากเพื่อการได้รับความคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภคตามพระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ. 2541 เพราะฉะนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาเทคนิค Real-Time PCR ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนสัตว์หะรอม 4 ชนิดในอาหารฮาลาล ได้แก่ สุกร กบ งู และจระเข้ ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปตามตลาดท้องถิ่นและห้างสรรพสินค้าในประเทศไทย และสามารถระบุและบ่งชี้สัตว์แต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารแปรรูป ซึ่งอาจมีการนำสัตว์หะรอมบางชนิดที่มีราคาถูกกว่ามาทดแทนหรือปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ และทวนสอบการใช้งานได้จริง (validation) ทั้งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่องความจำเพาะเจาะจงกับการเพิ่มดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย (specificity test) ความเชื่อถือได้ของวิธี (reliability test)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของประเภทเนื้อสัตว์ ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

1.2.2 เพื่อสามารถระบุและบ่งชี้สัตว์แต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารแปรรูป

1.2.3 เพื่อนำเทคนิคที่พัฒนาได้ ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพอาหารฮาลาลหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ที่ก่อให้เกิดอาการที่แพ้โปรตีนเนื้อสัตว์บางชนิด

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

เทคนิค Real-Time PCR สามารถตรวจหาชนิดของเนื้อสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิดได้ ได้โดยใช้กราฟ amplification เทียบกับ positive control และสามารถนำเทคนิค Real-Time PCR ไปประยุกต์ใช้จริงในการตรวจสอบเพื่อระบุและบ่งชี้สัตว์หะรอม 4 ชนิดที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปเนื้อสัตว์ได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 สกัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมในการนำไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

1.4.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบ

1.4.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธี Real-Time PCR

1.4.3.1 การเพิ่มสารปริมาณพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-Time PCR

1.4.3.2 การทดสอบความจำเพาะของ Real-Time PCR

1.4.3.3 การทดสอบหาความไวในการตรวจสอบ

1.4.4 ประยุกต์ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางการค้า

1.4.5 สรุปและรายงานผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของประเภทเนื้อสัตว์ ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

1.5.2 สามารถระบุและบ่งชี้สัตว์แต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารแปรรูป

1.5.3 สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพอาหารฮาลาลหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ที่ก่อให้เกิดอาการที่แพ้โปรตีนเนื้อสัตว์บางชนิด

1.5.4 ได้เทคนิคตรวจสอบหาเนื้อสัตว์หะรอม 4 ชนิดที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารฮาลาลที่รวดเร็ว และมีความละเอียดมากขึ้น

1.5.5 เพิ่มความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภคมุสลิม ผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติและผู้บริโภคทั่วไปได้บริโภคอาหารที่ถูกต้องตามข้อมูลบนฉลากซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผู้มีอาการแพ้โปรตีนเนื้อสัตว์บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารฮาลาลกับศาสนาอิสลาม

อาหารถือว่าเป็นสิ่งสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ และเป็นหนึ่งปัจจัย 4 ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพ สำหรับมุสลิมการบริโภคอาหารนอกจากให้ครบสารอาหารแล้วยังต้องถือปฏิบัติภายใต้บทบัญญัติของศาสนาอิสลามอย่างเคร่งครัด อาหารที่อนุญาตให้มุสลิมรับประทานได้จะเรียกว่า อาหารฮาลาล ซึ่งเป็นอาหารที่มีลักษณะตามที่กำหนด และกล่าวอ้างในคัมภีร์อัลกุรอานและอัลหะดีษ หลักการของศาสนาอิสลามที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคจึงไม่ใช่เป็นเพียงแต่ความเชื่อเป็นเหตุผลที่สามารถพิสูจน์ได้ในทางวิทยาศาสตร์ อาหารฮาลาลไม่เพียงแต่มีประโยชน์กับชาวมุสลิมเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์กับผู้บริโภคทุกเชื้อชาติศาสนา อาหารฮาลาลจึงมีความสำคัญต่อผู้บริโภคในประเทศและการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ (พรพิมล มะหะหมัด, 2549)

การปฏิบัติตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามเป็นหน้าที่ที่มุสลิมทุกคนพึงปฏิบัติไม่ว่าอาศัยอยู่ ณ แห่งใดก็ตาม ซึ่งการปฏิบัติตามบทบัญญัติถือเป็นเรื่องสำคัญมาก เนื่องจากมุสลิมมีความผูกพันกับอิสลามอย่างแน่นแฟ้น อยู่บนรากฐานของ “เอกภาพในพระเจ้า” ที่มุ่งสู่หลักการการรวมเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ทำให้อิสลามไม่แยกเป็นเรื่องของทางโลกและเรื่องของศาสนาออกจากกัน ดังนั้นบทบัญญัติของอิสลามจึงครอบคลุมถึงทุกอย่างของกิจกรรมของมนุษย์และพฤติกรรมของมุสลิมจะต้องอยู่ในกรอบของบทบัญญัติอยู่เสมอ ในคัมภีร์อัลกุรอานไม่เพียงแต่จะเกี่ยวข้องด้านความเชื่อหรือการเคารพภักดีต่อพระเจ้าเท่านั้น แต่จะเกี่ยวข้องกับทางด้านสังคม เศรษฐกิจ และการเมืองด้วย เช่นเดียวกันกับการบริโภคอาหาร ได้มีบทบัญญัติที่เกี่ยวกับการอนุญาตและห้ามในการบริโภคในสิ่งต่างๆ ซึ่งมุสลิมทุกคนต้องถือปฏิบัติให้ถูกต้องตามศาสนบัญญัติอย่างเคร่งครัด (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556)

ฮาลาล (Halal) เป็นคำในภาษาอาหรับแปลว่า ถูกต้องตามกฎ (lawful) หรืออนุญาต (permit) ซึ่งตรงข้ามกับคำว่า หะรอม (haram) ซึ่งแปลว่าผิดกฎหมาย (unlawful) หรือต้องห้าม (prohibit) โดยในการที่จะชี้ลงไปว่าอาหารอะไรเป็นสิ่งที่อนุญาตหรือสิ่งต้องห้ามนั้น ได้มีหลักการศาสนาที่ใช้เป็นแกนพิจารณา คือ บทบัญญัติของอัลเลาะห์ (ซบ.) ที่ประทานลงมาในคัมภีร์อัลกุรอานซึ่งสามารถแบ่งเป็นเกณฑ์ได้ดังนี้

<u>หลักการข้อที่หนึ่ง</u>

สัตว์ทุกชนิดที่ชาวอาหรับรับประทานได้ในยามปกติสุข และในยุคของท่านบรมศาสดามูฮำหมัด (ซล.) มีการรับประทาน ถือว่าสิ่งนั้นศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ สามารถจำแนกได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. สัตว์ที่มีชีวิตอยู่ในน้ำเท่านั้น ได้แก่ พวกปลาทุกชนิด ถือว่าเป็นสิ่งที่ฮาลาล

ข. สัตว์ที่ชาวอาหรับพิจารณาแล้วว่าสามารถรับประทานได้และมีบทบัญญัติสามารถรับประทานได้ ได้แก่ อูฐ วัว แพะ แกะ ม้า กระต่าย เก้ง เป็นต้นและสัตว์ที่ศาสนาไม่อนุญาตให้รับประทาน เช่น ล่อ และ ลา เป็นต้น ส่วนในกรณีของสัตว์ที่เกิดจากการผสมระหว่างสัตว์ที่อนุญาตกับสัตว์ที่ไม่อนุญาต เช่น ล่อซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างม้า และลา ศาสนาอิสลามไม่อนุญาตให้รับประทาน และสัตว์ที่ชาวอาหรับมีความเห็นว่าสกปรก เช่น พวกสัตว์เลื้อยคลานถือเป็นสิ่งที่ศาสนาห้ามรับประทาน

หลักการข้อที่สอง

ห้ามรับประทานสัตว์ที่ดุร้าย ได้แก่ สัตว์ที่มีเขี้ยวงาแข็งแรง และใช้เขี้ยวงาทำร้าย เช่น สุนัข สุกร หมาป่า หมี แมว เสือ และลิงเป็นต้น สัตว์ทุกชนิดที่มีกรงเล็บแข็งแรง เช่น เหยี่ยว นกอินทรีย์เนื่องจากสัตว์เหล่านี้รับประทานซากสัตว์ที่ตายจึงทำให้สัตว์สกปรกไปด้วย

หลักการข้อที่สาม

ห้ามรับประทานสัตว์ที่ปรากฏชัดว่าอันตราย เช่น งู แมงป่อง อีกา เหยี่ยว หนู เป็นต้น

นอกจาก 3 ข้อดังกล่าวแล้ว ห้ามรับประทานซากสัตว์ไม่ว่าจะตายด้วยสาเหตุใดก็ตาม รวมทั้งห้ามรับประทานเลือดสัตว์ทุกชนิดด้วย ทั้งนี้ข้อยกเว้นสำหรับ ปลา และตั๊กแตนที่ตาย ศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ เพราะได้รับการยกเว้นจากการเป็นซากสัตว์ที่ห้ามรับประทาน รวมทั้งตับและม้ามถือเป็นเลือดที่ศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ ข้อกำหนดที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นสามารถยกเว้นได้ในกรณีของผู้ที่ตกอยู่ในยามขับขัน โดยศาสนาอนุญาตให้รับประทานเพียงพอที่จะประทังชีวิตให้สามารถดำรงชีวิตต่อไป

2.1.1 การเชือดหรือฆ่าสัตว์ตามหลักการศาสนาอิสลาม

การเชือดหรือฆ่าสัตว์ตามหลักการศาสนาอิสลามที่ถูกต้องตามบทบัญญัติของศาสนาและสัตว์ที่ถูกเชือดต้องเป็นสัตว์ที่อนุญาตให้รับประทานได้ เงื่อนไขเกี่ยวกับตัวผู้เชือดมีดังนี้ ผู้เชือดต้องเป็นมุสลิมหรือเป็นผู้ศรัทธาในคัมภีร์ ถ้าหากไม่ได้เป็นมุสลิมและไม่ได้เป็นผู้ศรัทธาในคัมภีร์สัตว์ที่เขาเชือดไม่อนุญาตให้รับประทานและผู้เชือดจะต้องไม่เชือดสัตว์เพื่อสิ่งอื่นนอกจากอัลเลาะห์ (ซบ.) หรือเอ่ยนามอื่นนอกจากนามของอัลเลาะห์ (ซบ.) เงื่อนไขเกี่ยวกับสัตว์ที่ถูกเชือด คือ สัตว์ที่ถูกเชือดนั้น ต้องอยู่ในสภาพที่ชีวิตอยู่อย่างมั่นคง ถ้าหากทำการเชือดสัตว์ที่อยู่ในสภาพอ่อนเปลี้ยเหมือนสัตว์ใกล้ตาย ไม่ถือว่าเป็นการเชือดที่ถูกต้องตามบัญญัติอิสลามและไม่อนุญาตให้รับประทาน ต้องตัดหลอดลมและหลอดอาหารให้ขาด ถ้าตัดหลอดลมและหลอดอาหารไม่ขาด สัตว์ตัวนั้นไม่อนุญาตให้รับประทานต้องรีบตัดหลอดลมและหลอดอาหารให้ขาดเพียงครั้งเดียว หากผู้เชือดกระทำการเชือดอย่างช้าๆ จนสัตว์ที่ถูกเชือดอยู่ในสภาพใกล้ตายก่อนที่จะถูกตัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดลมและหลอดอาหารจนขาดหมด สัตว์ที่ถูกเชือดนั้นไม่อนุญาตให้รับประทานได้ ทั้งนี้การที่ทราบว่าสัตว์ที่ถูกเชือดอยู่ในสภาพที่มีชีวิตอยู่อย่างมั่นคงหรือเป็นสัตว์ที่อ่อนเปลี้ยใกล้ตาย ให้พิจารณาจากลักษณะการดิ้น สัตว์ที่มีชิวิตอย่างมั่นคงภายหลังที่ถูกเชือดแล้วจะมีการดิ้นอย่างรุนแรง ส่วนสัตว์ที่มีสภาพอ่อนเปลี้ยนั้น เมื่อถูกเชือดแล้วจะไม่สามารถดิ้นได้ เงื่อนไขที่เกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้เชือด เครื่องมือที่ใช้เชือดต้องทำให้เกิดบาดแผลด้วยคมของเครื่องมือที่ใช้ ไม่ว่าเครื่องมือนั้นจะเป็นเหล็ก ทองแดง ตะกั่ว หรือสิ่งใดก็ตาม ดังนั้นการทุบสัตว์ให้ตายโดยใช้ก้อนหินหรือสิ่งอื่นใดที่ไม่มีคมไม่ถือว่าเป็นการเชือดที่ถูกต้องตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม (พรพิมล มะหะหมัด, 2549)

2.2 มาตรฐานการผลิตอาหารฮาลาลตามหลักการของศาสนาอิสลาม

หัวใจสำคัญของการจัดทำมาตรฐานฮาลาลก็เพื่อให้การผลิตอาหารฮาลาลเป็นไปอย่างถูกต้องตามหลักศาสนบัญญัติอิสลาม โดยใช้ประโยชน์จากการมาตรฐานในการวางข้อกำหนดและแนวทางปฏิบัติบนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อขจัดปัญหาจากสิ่งต้องห้ามและเพื่อให้บรรลุถึงความสำเร็จสูงสุดนั่นคือการได้ผลิตภัณฑ์ฮาลาลตรงตามมาตรฐานที่วางไว้ ด้วยเหตุนี้ฮาลาลจึงมีความเป็นสากลในตัวเอง โดยหมายถึงสิ่งที่อนุญาตให้มุสลิมใช้ประโยชน์ได้ หากเป็นอาหารอนุญาตให้มุสลิมบริโภคได้ ฮาลาลจึงมีความหมายครอบคลุมตั้งแต่สิ่งที่เป็นอาหารและมิใช่อาหาร อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการบริโภคมักเป็นประเด็นปัญหาที่พบบ่อยที่สุดในสังคมมุสลิมที่ค่อนข้างเคร่งครัดในการบริโภค คำว่า “อาหารฮาลาล” หรืออาหารที่มุสลิมสามารถบริโภคได้ จึงกลายเป็นคำที่พบได้บ่อยที่สุด นอกเหนือจากความหมายที่ว่ามุสลิมบริโภคได้อย่างถูกต้องตามหลักศาสนาแล้วฮาลาลยังครอบคลุมถึงอาหารที่ปลอดภัยต่อการบริโภคของมุสลิมด้วย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับอาหารปลอดภัยริเริ่มการสร้างมาตรฐานฮาลาลเพื่อใช้เป็นแนวทางการผลิตอาหารฮาลาลที่มีความปลอดภัยมากขึ้น (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556)

มาตรฐานอาหารฮาลาลใช้เวลาดำเนินการจนกระทั่งได้รับการรับรองเป็นมาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ และกำหนดขึ้นเป็นมาตรฐานในทางสากลอย่างเป็นทางการ

Codex Alimentarius เป็นคำในภาษาละตินมีความหมายว่า “ฉลากอาหาร” หรือ Food Code ดังนั้นคณะกรรมาธิการโคเด็กซ์ที่ถูกจัดตั้งขึ้นจึงทำหน้าที่กำหนดมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่มีอยู่มากมายทั่วโลกให้เป็นแนวทางเดียวกัน นับเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคทั่วโลก เป็นการอำนวยความสะดวกให้แก่การค้าระหว่างประเทศ ด้วยเหตุนี้โคเด็กซ์จึงเป็นหน่วยงานระหว่างประเทศที่มีบทบาทสำคัญในการวางมาตรฐานและการควบคุมอาหารตลอดจนสภาวะการณ์ด้านการค้าของตลาดโลกที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดเวลา การมีแนวทางและมาตรฐานร่วมกันจะเป็นประโยชน์ต่อการค้าระหว่างประเทศทั้งในปัจจุบันและอนาคต การทำงานของโคเด็กซ์มีเป้าหมายเพื่อจัดระเบียบผลิตภัณฑ์อาหารทั่วทั้งโลกมีมาตรฐานอย่างเดียวกัน ทำให้ง่ายต่อการควบคุมดูแล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคเด็กซ์มีหน้าที่หลักคือ การกำหนดมาตรฐานอาหารให้เป็นแนวทางเดียวกันและเป็นที่ยอมรับของประเทศต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศสมาชิก 185 ประเทศทั่วโลก (ข้อมูล พ.ศ. 2554) ทั้งนี้ เพื่อการคุ้มครองสุขภาพอนามัยของผู้บริโภคและเพื่อให้เกิดความเป็นธรรมในด้านการค้าระหว่างประเทศ รวมทั้งเพื่อใช้เป็นเวทีระงับข้อพิพาททางการค้าระหว่างประเทศที่อาจเกิดขึ้น โดยโคเด็กซ์จัดแบ่งการดำเนินงานออกเป็น 5 ภูมิภาคทั่วโลก ได้แก่ กลุ่มยุโรป กลุ่มละตินอเมริกาและแคริบเบียน กลุ่มแอฟริกา กลุ่มเอเชีย กลุ่มอเมริกาเหนือและแปซิฟิกตะวันตกเฉียงใต้

2.2.1 มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์

มาตรฐานฮาลาลของ มอก. มีเนื้อหาว่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมมอก. 1701-2541 รับเอกสาร Codex Alimentarius: General Guideline for use of the Term "Halal" (CAC GL-24/1997) มาใช้ในระดับเหมือนกันทุกประการ (Identical) โดยใช้ Codex Alimentarius ดังกล่าวฉบับภาษาอังกฤษเป็นหลัก

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมฉบับนี้ กำหนดข้อเสนอแนะทั่วไป และมาตรฐานในการดำเนินการสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล" (Halal) หรือคำอื่นที่เทียบเท่าเพื่ออวดอ้างบนฉลากอาหารตามที่กำหนดในมาตรฐานทั่วไปสำหรับการแสดงฉลากของอาหารบรรจุหีบห่อ (General Standard for the labeling of Prepackaged Foods) และรวมถึงการใช้เครื่องหมายการค้าชื่อยี่ห้อและชื่อทางธุรกิจ และใช้เป็นส่วนเสริมของร่างข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการอวดอ้างฉบับแก้ไข (Draft Revision of Codex General Guidelines on Claims) แต่ไม่สามารถใช้แทนข้อห้ามใดๆ ในร่างข้อแนะนำดังกล่าว ข้อแนะนำนี้ได้รับการรับรองแล้ว จากคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) การนำข้อแนะนำนี้ไปใช้ปฏิบัติและการออกใบรับรองโดยประเทศผู้ส่งออกควรได้รับการยอมรับในหลักการจากประเทศผู้นำเข้าเกี่ยวกับการใช้คำ "ฮาลาล" บนฉลากอาหารที่ได้ปฏิบัติตามข้อแนะนำนี้

ข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล"

ขอบข่าย

1. ข้อแนะนำนี้นำเสนอมาตรการในการดำเนินการสำหรับการใช้คำฮาลาล(Halal) อวดอ้าง (Claim) บนฉลากอาหาร

2. ข้อแนะนำนี้ใช้ปฏิบัติสำหรับใช้คำ ฮาลาล และคำอื่นที่เทียบเท่า ในการอวดอ้างตามที่กำหนดในมาตรฐานทั่วไปสำหรับการแสดงฉลากของอาหารบรรจุหีบห่อ (General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods) และรวมถึงการใช้เครื่องหมายการค้า ชื่อยี่ห้อและชื่อทางด้านธุรกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ข้อแนะนำนี้ต้องการให้เป็นส่วนเสริมของร่างข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการอวดอ้าง ฉบับแก้ไข (Draft Revision of the Codex General Guidelines on Claims) และไม่สามารถใช้แทนข้อห้ามใดๆ ในร่างข้อแนะนำดังกล่าว

คำนิยาม

อาหารฮาลาล (Halal Food) หมายถึง อาหารที่ได้รับอนุญาตตาบทบัญญัติศาสนาอิสลาม และควรมีคุณสมบัติครบถ้วน ดังนี้

1. ไม่ประกอบด้วยหรือไม่บรรจุสิ่งใดที่ไม่ถูกต้องตามบทบัญญัติศาสนาอิสลาม

2. ต้องไม่ถูกเตรียม แปรรูป ขนส่ง หรือเก็บรักษา โดยใช้เครื่องมือหรือสิ่งอุปกรณ์ที่ไม่ได้ปลอดจากสิ่งผิดบทบัญญัติศาสนาอิสลาม

3. ต้องไม่อยู่ในขั้นตอนการเตรียม การแปรรูป การขนส่งหรือการเก็บรักษาโดยสัมผัสโดยตรงกับอาหารที่ไม่ถูกเกณฑ์ข้อ 1. และ 2. นอกจากข้อ 1. ข้างต้น อาหารฮาลาลสามารถเตรียม แปรรูป หรือเก็บรักษา

4. ในบริเวณที่แยกออกจากกัน หรือสายการผลิตที่แยกจากกัน ภายในสถานที่ผลิตเดียวกันกับการผลิตอาหารที่ไม่เป็นฮาลาล จัดหามาตรการที่จำเป็นที่ควรดำเนินการเพื่อป้องกันการสัมผัสกันระหว่างอาหารฮาลาลกับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาล

5. โดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการใช้กับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาล โดยจัดหาวิธีการล้างทำความสะอาดที่เหมาะสมตามข้อกำหนดของศาสนาอิสลามที่สามารถสังเกตเห็นได้

เกณฑ์กำหนดสำหรับการใช้คำฮาลาล

<u>อาหารที่ถูกต้องตามกฎ</u>

คำว่า ฮาลาล จะใช้สำหรับอาหารที่ได้พิจารณาแล้วว่าถูกต้องตามกฎภายใต้บทบัญญัติศาสนาอิสลามจะถือว่าแหล่งอาหารทั้งหมดถูกต้องตามกฎ ยกเว้นแหล่งอาหารต่อไปนี้ รวมทั้งผลิตภัณฑ์และสิ่งที่ได้จากแหล่งอาหารดังกล่าว ซึ่งได้รับการพิจารณาว่า ไม่ถูกต้องตามกฎ

- อาหารที่ได้จากสัตว์ เช่น สุกรและสุกรป่า สุนัข งู และลิง
- สัตว์กินเนื้อเป็นอาหารที่มีเขี้ยวและกรงเล็บ เช่น สิงโต เสือ หมี
- สัตว์อื่นที่คล้ายกัน นกกินเหยื่อที่มีกรงเล็บ เช่น นกอินทรี นกแร้ง และนกที่คล้ายกัน
- สัตว์ทำลาย เช่น หนู ตะขาบ แมลงป่อง และสัตว์ที่คล้ายกันอื่นๆ
- สัตว์ที่ห้ามฆ่าในศาสนาอิสลาม เช่น มด ผึ้ง และนกหัวขวาน
- สัตว์ที่น่ารังเกียจโดยทั่วไป เช่น เห็บ หมัด ไร เหา แมลงวัน หนอน และสัตว์ที่คล้ายกัน
- สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ จระเข้
- สัตว์ที่คล้ายกันอื่นๆ ล่อ และลา (ฬา) ที่เป็นสัตว์เลี้ยง
- สัตว์น้ำที่มีพิษและเป็นอันตรายทุกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สัตว์อื่นๆ ที่ไม่ได้ฆ่าถูกต้องตามกฎศาสนาอิสลาม
- เลือด (โลหิต)
- อาหารที่ได้จากพืช - พืชที่มีพิษและเป็นอันตราย ยกเว้นเมื่อสารพิษและอันตรายได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
- เครื่องดื่ม เช่น เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มทุกชนิดที่มีพิษและอันตราย
- วัตถุเจือปนอาหาร เช่น วัตถุเจือปนอาหารมีที่มาจากทั้ง 3 แหล่งคือ สัตว์ พืช และเครื่องดื่มข้างต้น

วิธีการฆ่าสัตว์

สัตว์บกที่ฆ่าถูกต้องตามกฎศาสนาอิสลาม การฆ่าควรต้องดำเนินการให้เป็นตามข้อกำหนดสุขลักษณะที่ดีของเนื้อสดที่โคเด็กซ์แนะนำ (Codex Recommended Code of Hygienic Practice for Fresh Meat) และตามข้อกำหนดต่อไปนี้

- คนฆ่าสัตว์ ต้องเป็นมุสลิม ผู้ยึดมั่นในหลักการศาสนาอิสลามอย่างเคร่งครัด และมีความรู้ในวิธีการฆ่าสัตว์ตามหลักของศาสนาอิสลาม
- สัตว์ที่ถูกฆ่า ควรถูกต้องตามกฎของศาสนาอิสลาม, ควรเป็นสัตว์ที่ยังมีชีวิต หรือเชื่อว่ายังมีชีวิต ณ เวลาที่ฆ่าสัตว์นั้น, ก่อนที่จะฆ่าสัตว์แต่ละตัวควรต้องกล่าวคำว่า "บิสมิลลา" (ในนามของอัลเลาะฮ์พระผู้เป็นเจ้า) อย่างทันทีทันใด
- อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการฆ่า ควรต้องมีความคม และไม่ยกออกจากตัวสัตว์ในระหว่างการฆ่า
- การฆ่า ควรต้องตัดหลอดลม หลอดอาหาร เส้นเลือดแดงใหญ่ และเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอให้ขาด

การเตรียม การผลิต การบรรจุหีบห่อ การขนส่งและการเก็บรักษา

อาหารทุกชนิดควรเตรียม แปรรูป บรรจุหีบ ขนส่ง และเก็บรักษาในลักษณะที่เป็นไปตามข้อกำหนดของคำนิยามข้างต้น และเป็นไปตามหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหารของโคเด็กซ์ (Codex General Principles on Food Hygienic) และมาตรฐานอาหารของโคเด็กซ์เรื่องอื่นที่เกี่ยวข้อง

ความต้องการเพิ่มเติมในเรื่องฉลาก

สำหรับเครื่องหมายฮาลาลของประเทศไทย เป็นลิขสิทธิ์ของสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย (สกอท.) ถึงแม้อำนาจการรับรองฮาลาลในประเทศไทยจะขึ้นกับสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำจังหวัดซึ่งมี 39 แห่ง และสกอท. แต่เครื่องหมายฮาลาลของประเทศไทยมีเพียงตราเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.1 เครื่องหมายฮาลาลของประเทศไทย เป็นลิขสิทธิ์ของสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย (สกอท.)

2.2.2 มาตรฐานฮาลาลประเทศไทย

มาตรฐานอาหารฮาลาลของประเทศไทยถือกำเนิดขึ้นนับแต่การประกาศใช้มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ มอก. 1701-2541 ข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล" ในปี พ.ศ.2541 อย่างไรก็ตาม การได้มาของมาตรฐานดังกล่าวสืบเนื่องมาจากมาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ซึ่งเกิดก่อนการจัดโครงสร้างการบริหารคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย (คกอท.) ตามพระราชบัญญัติการบริหารองค์กรในศาสนาอิสลาม พ.ศ. 2540 จึงเสมือนเป็นการประกาศฝ่ายเดียวผู้จัดทำ (ภาครัฐ) มิได้ปฏิบัติ ขณะที่ผู้ปฏิบัติ (คกอท.) มิได้จัดทำ นอกจากนี้งานมาตรฐานอาหารยังย้ายจากกระทรวงอุตสาหกรรมไปยังกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีการจัดตั้งสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ขึ้นในปี พ.ศ. 2545 โดยอาศัยอำนาจตามความในมาตรา 8 ฉ แห่งพระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2543 ให้ มกอช. เป็นหน่วยงานระดับกรม ภายใต้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556)

<u>มาตรฐานที่ใช้ในการผลิตอาหารฮาลาลในประเทศไทย</u>

1. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช.8400-2550 “อาหารฮาลาล”

ขอบข่าย

มาตรฐานอาหารฮาลาลนี้ครอบคลุม การจัดหาวัตถุดิบ การจัดเตรียม กระบวนการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา การนำเสนอและการจัดจำหน่าย การรักษาความปลอดภัยของอาหาร และการแสดงเครื่องหมายและฉลาก

อาหารฮาลาลที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานนี้จะต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของศาสนบัญญัติอิสลาม กฎหมายและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยอาหารและการแสดงเครื่องหมายและฉลาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากการตีความบทบัญญัติอิสลามของนิกายและสาขานิกาย อาจมีบางส่วนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้น ประเทศผู้ส่งออกและประเทศผู้นำเข้าหรือผู้ประกอบการค้าของทั้งสองประเทศควรมีข้อตกลงระหว่างกันให้ชัดเจน

นิยาม

- ฮาลาล หรือหะลาล (Halal) หมายถึง สิ่งของหรือการกระทำใดๆ ซึ่งได้รับการอนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม

- หะรอม หรือฮารอม (Haram) หมายถึง สิ่งของหรือการกระทำใดๆ ซึ่งเป็นสิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลาม

- นญิส (najis) หมายถึง สิ่งสกปรกตามศาสนบัญญัติอิสลาม ซึ่งมี 3 ประเภท ได้แก่ นญิสชนิดเบา (มุค็อฟฟะฟะฮฺ) นญิสชนิดปานกลาง (มุตะวัสสิเฏาะฮฺ) และนญิสชนิดหนัก (มุฆ็อลละเซาะฮฺ) รวมถึงอาหารที่ปนเปื้อนหรือสัมผัสกับนญิส เว้นแต่จะได้ขจัดนญิสนั้นออกไปแล้ว

- อัล-กุรอาน หมายถึง คัมภีร์ในศาสนาอิสลามที่อัลลอฮ์ (ซุบบะฮานะฮูวะตะอาลา) ทรงประทานให้ศาสดามูฮัมมัด (ศ็อลลัลลอฮุอะลัยฮิวะสัลลัม) เป็นธรรมนูญสูงสุดของศาสนาอิสลาม

- อัล-ซุนนะห์ หมายถึง แบบฉบับจากศาสดามูฮัมมัด (ศ็อลลัลลอฮุอะลัยฮิวะสัลลัม) ทั้งทางด้านวจนะ การปฏิบัติ การยอมรับ และถือเป็นบทบัญญัติรองจากอัล-กุรอาน

- อัล-อิจมะห์ หมายถึง ความเห็นพ้องต้องกันหรือมติเอกฉันท์ หรือการที่ผู้ที่มีความสามารถวิเคราะห์หาข้อกำหนดจากตัวบทอัล-กุรอาน หรืออัล-ซุนนะห์ได้เองเห็นพ้องต้องกันในการตีความศาสนบัญญัติอิสลาม

- อัล-กิยาส หมายถึง การนำเอาสิ่งหนึ่งไปเปรียบเทียบกับสิ่งหนึ่ง เช่น เกิดเหตุการณ์หนึ่งขึ้นนักการศาสนาจะใช้การเปรียบเทียบเหตุการณ์นั้นกับอัล-กุรอานหรืออัล-ซุนนะห์หรือ อัล-อิจมะห์หรือเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นคล้ายคลึงกันเพื่อการตีความทางศาสนา

- ศาสนบัญญัติอิสลาม (Islamic law) หมายถึง บทบัญญัติที่มุสลิมต้องถือปฏิบัติโดยยึดตัวบทจากคัมภีร์อัล-กุรอ่าน อัล-ซุนนะห์ อัล-อิจมะห์ และอัล-กิยาส ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันตามแนวทางในสาขานิกาย (มัซฮับ) ชาฟีอีหรือฮานาฟีหรือมาลิกีหรือฮัมบาลีขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศที่จะนำแนวทางนี้ไปใช้ปฏิบัติว่ายึดถือในแนวทางใด

- อาหารฮาลาล (Halal food) หมายถึง อาหารที่ได้รับอนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม รวมถึงสิ่งอื่นที่มีความหมายเช่นเดียวกันและมีคุณสมบัติครบถ้วน ตามข้อกำหนดในมาตรฐานฉบับนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกณฑ์กำหนดสำหรับการใช้คำ “ฮาลาล”

1. อาหารที่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม

ตามศาสนบัญญัติอิสลามถือว่าแหล่งอาหารทั้งหมดเป็นที่อนุญาตยกเว้นแหล่งอาหารรวมทั้งผลิตภัณฑ์และสิ่งที่ได้จากแหล่งอาหาร ต่อไปนี้

1. สุกร สุกรป่า และสุนัข
2. งูและลิง
3. สัตว์กินเนื้อเป็นอาหารที่มีเขี้ยวและกรงเล็บ เช่น สิงโต เสือ หมีและสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
4. นกล่าเหยื่อที่มีกรงเล็บ เช่น นกอินทรี นกแร้ง และนกอื่นๆที่คล้ายกัน
5. สัตว์ทำลาย เช่น หนู ตะขาบ แมลงป่อง และสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
6. สัตว์ที่ห้ามฆ่าในศาสนาอิสลาม เช่น มด ผึ้ง และนกหัวขวาน
7. สัตว์ที่น่ารังเกียจโดยทั่วไป เช่น เห็บ หมัด ไร เหา แมลงวัน หนอน และสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
8. สัตว์ที่อาศัยอยู่ได้ทั้งบนบกและในน้ำ เช่น กบ จระเข้ เต่าและสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
9. ลาและพ่อที่เป็นสัตว์เลี้ยงใช้งาน
10. สัตว์น้ำที่มีพิษหรือเป็นอันตรายทุกชนิด เว้นแต่พิษหรืออันตรายดังกล่าวได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
11. สัตว์บก สัตว์ปีก สัตว์ประเภทนกที่ไม่ได้ถูกเชือดถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลาม
12. เลือดที่มาจากการเชือดหรือไหลออกจากร่างกาย
13. อาหารที่ได้จากพืชที่มีพิษหรือทำให้มึนเมาหรือเป็นอันตราย เว้นแต่เมื่อสารดังกล่าวได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
14. อาหารและเครื่องดื่มที่ก่อให้เกิดความมึนเมา
15. เครื่องดื่ม แร่ธาตุจากธรรมชาติ และวัตถุเคมีทุกชนิดที่เป็นพิษและก่อให้เกิดอันตราย
16. อาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนประกอบอาหารที่ได้จากการดัดแปรพันธุกรรม (Genetically Modified Organism: GMO) จากสารพันธุกรรมของสัตว์ที่ไม่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม วัตถุเจือปนอาหารหรือส่วนผสมอาหารที่มาจากแหล่งข้างต้นตั้งแต่ 1-16

2. การเชือดสัตว์

การเชือดสัตว์ที่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลามต้องแยกออกจากสัตว์ที่ไม่อนุญาตอย่างเด็ดขาดตามหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1. การเชือดต้องกระทำโดยมุสลิมผู้ศรัทธาและมีความรู้ความเข้าใจในวิธีการเชือดสัตว์ตามศาสนบัญญัติอิสลาม
2. สัตว์ที่จะทำการเชือดต้องเป็นสัตว์ที่อนุญาตให้ใช้เป็นอาหารได้ตามศาสนบัญญัติอิสลาม
3. สัตว์จะต้องมีชีวิต ณ เวลาที่เชือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเชือดต้องตัดหลอดลม หลอดอาหาร เส้นเลือดแดงใหญ่ และเส้นเลือดใหญ่บริเวณลำคอให้ขาดในคราวเดียว หากมีความจำเป็นจะต้องรีบดำเนินการเชือดซ้ำก่อนสัตว์ตาย

5. ก่อนที่จะเชือดสัตว์ต้องกล่าวคำว่า “บิสมิลลา อัลลอฮุอักบัร” หรือ“บิสมิลลาฮิรฺเราะฮฺมานิรฺรอฮีม”

6. การเชือดให้ใช้เฉพาะมีดหรือเครื่องมือที่คมและไม่ควรยกออกจากลำคอสัตว์ขณะทำการเชือด สัตว์จะต้องตายเพราะการเชือด โดยไม่ทรมาน

7. ไม่ควรทำให้สัตว์สลบหรือหมดสติก่อนการเชือด (stunning) เว้นแต่กรณีที่จำเป็น การกระทำดังกล่าวต้องเป็นไปตามที่กำหนดไว้

8. ไม่ควรเชือดสัตว์ปีกโดยใช้เครื่องเชือดกล เว้นแต่กรณีที่จำเป็น การกระทำดังกล่าวต้องเป็นไปตามที่กำหนดไว้

การจัดเตรียม การผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา

อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตจะฮาลาลได้ต่อเมื่อเข้าเงื่อนไขดังต่อไปนี้

1. อาหารต้องไม่มีส่วนประกอบที่มาจากสัตว์ซึ่งไม่อนุญาต หรือมาจากสัตว์ที่เชือดไม่เป็นไปตามศาสนบัญญัติอิสลาม

2. อาหารต้องจัดเตรียม การผ่านกระบวนการผลิต การเก็บรักษาหรือการขนส่ง โดยใช้อุปกรณ์ที่ไม่มีปนเปื้อนนญิส

3. ในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง อาหารเหล่านั้นจะต้องแยกออกจากอาหารอื่นๆ หรือจากสิ่งที่เป็นนญิส

4. ในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง วัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลจะต้องแยกออกจากอาหารอื่นๆที่ไม่มีคุณสมบัติ หรือมีมาตรการที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งที่เป็นนญิส

5. กรณีการใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการใช้กับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาลมาก่อน ต้องล้างทำความสะอาดตามศาสนบัญญัติอิสลาม

6. เครื่องมือ ภาชนะ เครื่องจักรและอุปกรณ์การผลิตอาหารฮาลาลต้องไม่ทำมาจากวัสดุที่เป็นนญิส หรือต้องไม่มีส่วนประกอบของนญิสตามศาสนบัญญัติอิสลาม

7. กรณีที่มีการเปลี่ยนสายการผลิตอาหารที่ปนเปื้อนนญิสชนิดหนักมาผลิตอาหารฮาลาล สายการผลิตนั้นจะต้องได้รับการล้างและชำระตามศาสนบัญญัติอิสลาม ขั้นตอนการปฏิบัตินี้จะต้องอยู่ภายใต้การดูแลและทวนสอบผลการล้างโดยองค์กรทางศาสนาอิสลาม เมื่อได้มีการปรับเปลี่ยนสายการผลิตมาสู่การผลิตอาหารฮาลาลแล้วต้องผลิตอาหารฮาลาลเท่านั้น หากมีการเปลี่ยนสายการผลิตไปสู่การผลิตอาหารที่ปนเปื้อนนญิสชนิดหนัก จะไม่อนุญาตให้กลับมาสู่การผลิตอาหารฮาลาลอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชำระล้างนญิส

เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่สัมผัสกับอาหารโดยตรงหรือปนเปื้อนนญิส ทุกชนิดไม่ว่าจะมองเห็นหรือไม่ต้องกำจัดด้วยวิธีล้างทำความสะอาดตามที่ระบุไว้ในศาสนบัญญัติอิสลาม

สุขลักษณะอาหาร

อาหารทุกชนิดควรเตรียม ผลิต ปรุง ผ่านกระบวนการบรรจุ ขนส่ง และเก็บรักษาตามศาสนบัญญัติอิสลามและกฎหมายที่เกี่ยวข้องหรือตามหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหาร โครงการมาตรฐานอาหารเอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ (Codex General Principles on Food Hygiene) และมาตรฐานอาหารของโครงการมาตรฐานอาหาร เอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ เรื่องอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

บรรจุภัณฑ์และการบรรจุ

บรรจุภัณฑ์ต้องฮาลาล และไม่เป็นวัตถุที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และไม่ทำมาจากสิ่งที่ประกาศว่าเป็นนญิสตามศาสนบัญญัติอิสลามกระบวนการบรรจุต้องกระทำในพื้นที่ที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนนญิสและปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะ

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ วิธีการนำเสนอ (display) การโฆษณา และการจัดจำหน่าย

ต้องแยกผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล ที่ต้องการเก็บรักษา การนำเสนอ และการจัดจำหน่ายออกจากผลิตภัณฑ์ที่ไม่ฮาลาลหรือควรจะแสดงเครื่องหมาย “ฮาลาล” หรือ “ซาบีหะฮฺ” (เชือดถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลาม) ตามแต่กรณี จำแนกในทุกขั้นตอนของการดำเนินงาน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปะปนหรือปนเปื้อนจากสิ่งที่ไม่ฮาลาล

การแสดงเครื่องหมายและฉลาก อาหารฮาลาลให้มีข้อกำหนดฉลากเพิ่มเติมดังนี้

วัสดุที่เป็นฉลากและสัมผัสโดยตรงกับผลิตภัณฑ์อาหาร ต้องไม่เป็นวัสดุที่เป็นนญิสหรือมีส่วนประกอบที่เป็นนญิสหรือปนเปื้อนนญิส และไม่เป็นวัสดุที่มีอันตรายต่อสุขภาพ

อาหารที่จะกล่าวอ้างว่าเป็นอาหารฮาลาล ต้องแสดงคำว่า ฮาลาล (Halal) หรือข้อความอื่นที่เทียบเท่า เช่น ซาบีหะฮฺ หรือเครื่องหมายที่ได้รับการยอมรับจากหน่วยรับรองบนฉลากอาหาร

การกล่าวอ้างว่าเป็นอาหารฮาลาลต้องไม่กระทำในลักษณะที่ก่อให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหาร และไม่ทำให้เกิดความเข้าใจผิดเกี่ยวกับการได้รับการรับรองฮาลาล หรือทำให้เข้าใจว่าอาหารฮาลาล มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ

ถึงแม้ประเทศไทยจะมีมาตรฐานฮาลาลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องตามหลักการศาสนาอิสลาม แต่ก็พบผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลที่ผ่านมาจำนวนไม่น้อยเกิดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมอยู่บ่อยครั้งทั้งที่เกิดจากความรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากการจงใจ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในอาหารฮาลาลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 พัฒนาการการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป

ความซับซ้อนของกระบวนการผลิตอาหารทางอุตสาหกรรมสมัยใหม่ที่ส่วนใหญ่พัฒนาขึ้นโดยผู้ที่ขาดความเข้าใจความต้องการของผู้บริโภคมุสลิมก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลามเข้าสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่จำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมอยู่บ่อยครั้ง จากการตรวจสอบของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าเฉพาะสารเคมีที่ในกระบวนการผลิตมีการใช้เอนไซม์จากสุกรมีมากถึง 186 ชนิดนำไปใช้ผลิตอาหารมากกว่าพันรายการ นอกจากนี้การปลอมปนเนื้อสัตว์ต้องห้ามเพื่อทดแทนเนื้อสัตว์ที่ราคาแพงกว่าด้วยเนื้อสัตว์ราคาถูกก็พบอยู่บ่อยครั้ง เช่นการปลอมปนเนื้อสุกร เนื้อม้า เนื้อหนูและเนื้อสุนัข ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อวัว (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2556) เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและประกันคุณภาพของอาหารฮาลาลรวมถึงการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของประเทศในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนจึงมีความจำเป็น ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในอาหารฮาลาล โดยเฉพาะการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เทคนิคการทดสอบการปนเปื้อนเนื้อสัตว์จึงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Tanabe et al., 2007; Yaakob, 2010)

2.3.1 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนจากเนื้อสุกรและเนื้อสัตว์อื่นๆ

วิธีที่นิยมใช้ในการการตรวจสอบการปนเปื้อน จะใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งสามารถตรวจวัดได้จากโปรตีนหรือดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสัตว์ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูง แต่เทคนิคทางโปรตีนเช่น Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ยังมีข้อเสียเนื่องจากโปรตีนถูกทำลายระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร หรือผ่านความร้อน หรืออยู่ในรูปเนื้อผสม ทำให้ยากต่อการตรวจวัดและมีความไวต่ำ (Ayaz et al., 2005) เนื่องจากการตรวจการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์โดยวิธีวิเคราะห์หาโปรตีนจำเพาะนั้น มีความไวและความจำเพาะต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจวิเคราะห์อาหารที่ผ่านความร้อนและกระบวนการต่างๆ จึงไม่เหมาะสมในการตรวจการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร (พรพิมล มะหะหมัด, 2549) การตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอจึงมีข้อดีกว่า เนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงทนกว่าโปรตีนมากและตรวจวัดได้ในเนื้อผสม อีกทั้งมีความไวและมีความจำเพาะสูง (Bellis et al., 2003)

2.3.2 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากสัตว์เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะสูงและนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร การติดฉลากที่ถูกต้อง การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเนื้อสัตว์และการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์หะรอมสำหรับเหตุผลทางศาสนา ซึ่งการจำแนกสปีชีส์โดยวิธีทางดีเอ็นเอนั้นจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะ โดยบริเวณยีนที่ใช้ในการจำแนกเนื้อสัตว์ในแต่ละสปีชีส์ที่มีการรายงานเป็น potential markers มี 3 บริเวณ คือบริเวณภายใน chromosomal, mitochondrial DNA (mtDNA) และ ribosomal RNA (rRNA) (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1 DNA hybridization

การใช้เทคนิค DNA hybridization ซึ่งมีข้อเสียเนื่องจากใช้เวลานานในการติดฉลากโพรบ (พรพิมล มะหะหมัด, 2549) ต่อมาจึงพัฒนาใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) โดยเทคนิค PCR จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) สายสั้นๆ ของลำดับเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Garibyan, and Avashia., 2013) และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

2.3.2.2 วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Polymerase Chain Reaction (PCR)

การจำแนกสปีชีส์โดยวิธี PCR จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์(Oligonucleotide primers) สายสั้นๆ ของลำดับเบสคู่สมกันกับสาย DNA แม่แบบ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นจำนวนล้านเท่า (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์, 2560)

2.3.2.3 Random Amplification of Polymorphic (RAPD)

Random Amplification of Polymorphic (RAPD) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของ PCR ใช้ไพร์เมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบการสุ่ม (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใด แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์, 2560)

2.3.2.4 Single strand conformational polrmorphism analysis (SSCP)

เป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้สำหรับการตรวจการกลายพันธุ์โดยเอ็นเอสายคู่ของ PCR product จะถูกแยกเป็นสายเดี่ยว และนำไปแยกด้วย polyacrymide gel electrophoresis ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้เห็นจะขึ้นอยู่กับลักษณะ ขนาดและโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์, 2560)

2.3.2.5 Multiplex PCR

เทคนิค Multiplex PCR รวมไพรเมอร์ มากกว่า 2 ชนิดขึ้นไปเพื่อใช้ในการแยกสัตว์หลายสปีชีส์ (Kitpipit et al., 2014) ใช้ Multiplex-PCR ในการแยกเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่บริเวณยีน mitochondrial cytochrome b, cytochrome oxidase I และ 12s rRNA โดยรวมไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่ เพื่อแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ทั้งหมด 6 ชนิดออกจากกัน ได้แก่เนื้อสุกร เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้าและเนื้อวัว ที่ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ความยาว 100, 119, 133, 155, 253 และ 311 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสัตว์แต่ละสปีชีส์ได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCR เวลาตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งมีความยุ่งยาก อาจเกิดการปนเปื้อนได้ และใช้เวลาในการตรวจสอบนาน (Klomtong and Duangjinda, 2013)

2.3.2.6 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP)

PCR-RFLP เป็นเทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นในบริเวณที่จำเพาะจากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกความแตกต่างของลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับเทคนิค PCR-RFLP ได้ถูกนำมาใช้ในการแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์, 2560)

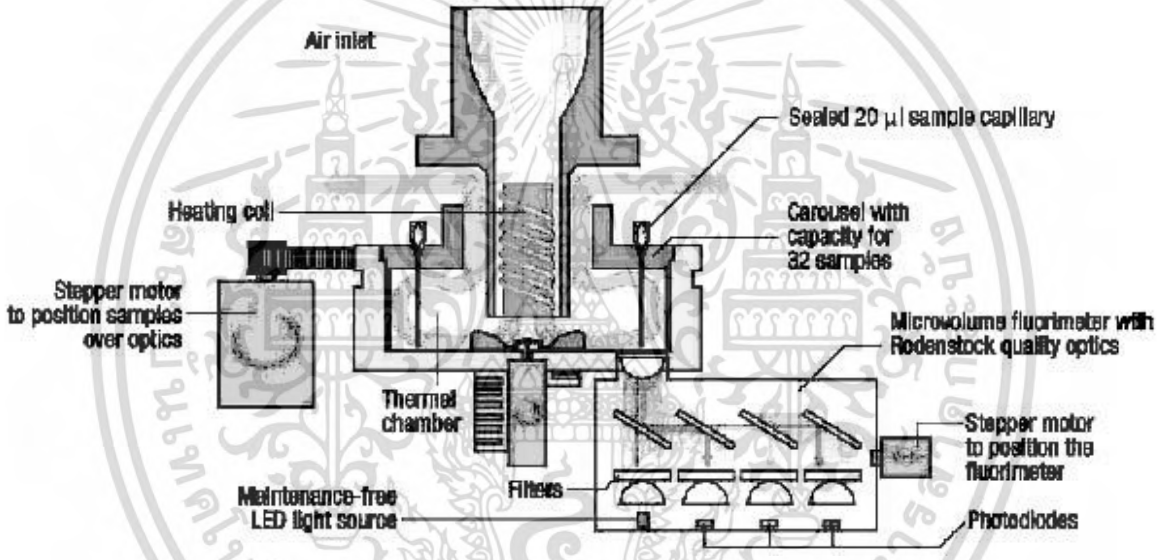
2.3.2.7 Real-Time PCR

เทคนิค Real-Time PCR เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ การวิเคราะห์โดย Real-Time PCR ข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่องและแสดงผลออกมา โดยทั่วไปจะมีกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบรวมถึงกราฟแสดงระดับสารเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบแบบ Real-Time สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณโดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณอยู่แล้วจากกราฟดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างไว้ (Safdar and Junejo, 2015) Rungmee และคณะ (2011) ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีตรวจหาเนื้อสุกรด้วยเทคนิค Real time PCR จากตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์ ขั้นตอนการสกัด DNA ใช้น้ำยาสำเร็จรูป ชุด primer และ probe ที่จำเพาะต่อยีน cytochrome b ของเนื้อสุกรได้ออกแบบขึ้น ซึ่ง probe ที่ใช้เป็นชนิด hydrolysis probe พบว่าสามารถตรวจหา DNA ของเนื้อสุกรที่มีระดับความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 0.001–0.01 เปอร์เซ็นต์ จากการนำไปใช้ตรวจตัวอย่างอาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์ที่ทราบชนิดจำนวน 62 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเนื้อสุกร 33 ตัวอย่าง และเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ 29 ตัวอย่าง พบว่าวิธีนี้มีความไว ความจำเพาะและความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 3 คุณสมบัติ สรุปได้ว่าวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจหาเนื้อสุกรในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ (วงศ์ขวัญ และคณะ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 หลักการ Real time PCR

เทคนิค Real time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา (ภาพที่ 2.2) ดังนั้น การทำ Real time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจ PCR products จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุด



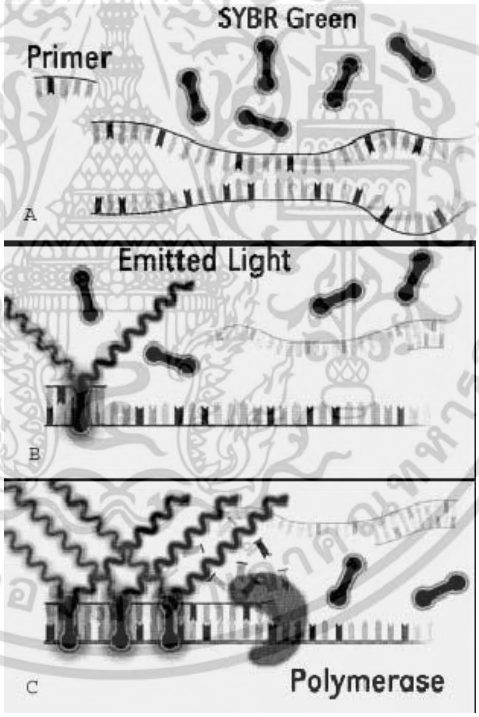
ภาพที่ 2.2 แสดงเครื่อง real time thermocycler
ที่มา : Wittwer และคณะ (1997)

เครื่อง real time thermocycler ประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา PCR เป็นส่วนที่มีหลักการทำงานเหมือนเครื่อง PCR แบบดั้งเดิม ในรูปนี้หลอดปฏิกิริยาจะมีลักษณะเป็นหลอดแก้ว ซึ่งจะสามารถดูดถ่ายความร้อนได้เร็วกว่าหลอด PCR ที่เป็นหลอดพลาสติกทำให้ระยะเวลาการทำ PCR สั้นลงกว่าเดิมมาก ส่วนที่ 2 เป็นส่วน Fluorimeter optical unit ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงและส่วนตรวจรับสัญญาณแสงที่ถูกปลดปล่อยจาก reporter dye และมีการประมวลค่าสัญญาณแสงเพื่อแสดงผลในที่สุด เนื่องจากสัญญาณการเรืองแสงที่วัดได้ในแต่ละรอบสามารถถูกแสดงผลออกบนหน้าจอทันที จึงเรียกการตรวจวัดเช่นนี้ว่า On-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

line and Real-time Detection การตรวจวัดแบบ Cycle-by-cycle Monitoring นี้เป็นการวัดผลแบบ Log-linear phase Analysis ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้น ได้แม่นยำมากกว่าการทดสอบแบบ End-point ซึ่งในงานวิจัยนี้เราได้ใช้ SYBR Green I Dye มีหลักการดังนี้

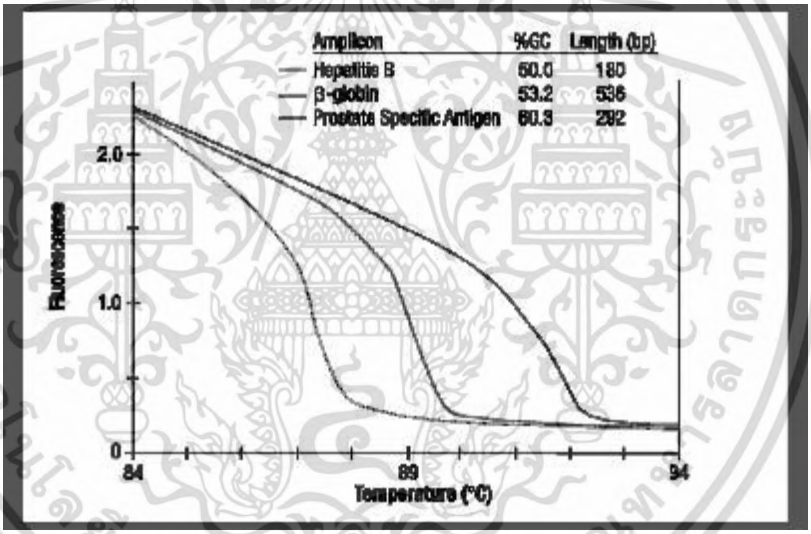
การตรวจวัด PCR product ด้วย SYBR Green I (A) ในช่วงของการ denature เพื่อสลายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว SYBR Green I ยังไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ (B) เมื่อ PCR primer เข้าจับและสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR Green I จะเริ่มสอดแทรกเข้าสู่สายคู่ของดีเอ็นเอ และจะมีการเรืองแสง (emission) เมื่อถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสง (C) ในช่วง DNA elongation จะมี SYBR Green I เข้าแทรกในดีเอ็นเอสายเป็นจำนวนมาก เราสามารถตรวจจับการเรืองแสงอย่างต่อเนื่องแบบ real-time ได้ และเมื่อ PCR cycle เวียนกลับมาสู่ช่วงของการ denature SYBR Green I จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ การเรืองแสงจะลดลง



ภาพที่ 2.3 แสดงการตรวจวัด PCR product ด้วย SYBR Green I (A) ในช่วงของการ denature
ที่มา : Wittwer และคณะ (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SYBR Green I เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่น (λ) ยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real time Thermocycler แม้ว่าการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ (ณยาพร บริเวธานันท์, 2555) เราสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) ที่เกิดจาก primer-dimer และ/หรือ non-specific products อื่น ๆ ออกจาก specific amplified product ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า Tm (Wittwer et al.,1997) โดยค่า Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ การหาค่า Tm จากเครื่อง real time thermocycler สามารถวิเคราะห์ได้จาก Melting curve การทดสอบ Melting curve สามารถใช้แยก PCR products ที่แตกต่างออกจากกันได้ เนื่องจาก PCR products ต่างชนิดกันจะมีค่า Tm แตกต่างกัน(ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 แสดงการทดสอบ Melting curve
ที่มา : Ririe และคณะ (1997)

โดยสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พวก non-specific products หรือ primer-dimer จะมีค่า Tm แตกต่างจาก specific amplified product เช่น Tm ของพวก primer-dimer จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 bp) ต่างจาก amplified DNA ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (>100 bp) และมีค่า Tm ที่สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real time PCR ในงานด้านต่างๆ

2.5.1 การตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว (rapid diagnosis)

เนื่องจาก การทำ Real-Time PCR มีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อม ๆ กับการตรวจวัด ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจวัดเหมือน conventional PCR จึงใช้เวลาในการตรวจที่สั้นกว่า จึงเหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เครื่อง Real-Time PCR บางชนิดใช้หลอดแก้ว (glass capillary tube) เป็นหลอดทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถดูดถ่ายความร้อนได้อย่างรวดเร็ว สามารถทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้เสร็จในเวลา 30-40 นาทีเท่านั้น จะมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว

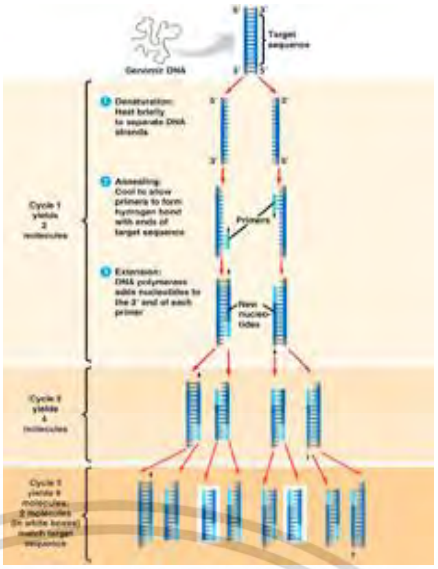
2.5.2 การทดสอบเชิงปริมาณ

ในปัจจุบันความต้องการในการทดสอบเชิงปริมาณมีมากขึ้น จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR มาทำการทดสอบเชิงปริมาณในงานต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานการตรวจวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ เช่น การประยุกต์ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดเพื่อใช้ในการทำนายโรคและติดตามการรักษา การตรวจหา minimal residual disease ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว การตรวจดูระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เป็นต้น

2.5.3 การทดสอบ PCR products โดย melting curve

ดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่จะมีค่า Tm ที่ต่างกัน โดยความแตกต่างจะแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น ๆ ดังนั้น เราสามารถนำค่า Tm ของดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้จำแนก Specific และ Non-specific PCR product ออกจากกัน ตลอดจนสามารถใช้แยก PCR products ต่างชนิดในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันออกจากกัน (ภาพที่ 2.5) แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCRการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจ หรือการตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP) โดยการออกแบบ hybridization probe ให้ครอบคลุมในส่วนที่เกิดการกลายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบค่า Tm ระหว่าง hybridization probe กับ ดีเอ็นเอเป้าหมาย จะพบว่าในตัวอย่างที่เกิดการกลายพันธุ์จะมีบางเบสที่ probe ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (mismatch) ทำให้มีค่า Tm ต่ำกว่าตัวอย่างที่มีความปกติ ซึ่ง probe จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์ (perfect match)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCR

ที่มา : http://www.wvww.vcharkarn.com/vcafe/39569

2.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล

จากความสามารถของเทคนิค Real-Time PCR ผนวกกับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามของผู้บริโภคชาวมุสลิม เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและการประกันคุณภาพของอาหารฮาลาล หน่วยงานต่างๆ ด้านมาตรฐานอาหารฮาลาลรวมถึงนักวิจัยในหลายประเทศได้ใช้เทคนิค Real-Time PCR เป็นฐานในการพัฒนาการตรวจวัดการปนเปื้อน เนื่องจากความจำเพาะและความไวของเทคนิค Real-Time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้ ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์ได้ (Cai et al., 2012)

Dooley และคณะ (2004) ใช้เทคนิค Real-Time PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 12S rRNA พบว่าสามารถจำแนกเนื้อสุกรจาก เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อแพะ เนื้อไก่ เนื้อไก่งวง เนื้อเป็ด และเนื้อห่าน และสามารถบอกปริมาณของเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในเนื้อผสมได้ โดยที่สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรปนเปื้อนที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.1 % และมีความไวในการตรวจวัดเนื้อสุกรในเนื้อสุกรผสมกับเนื้อวัวที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.5 % เช่นเดียวกันกับ Kim และคณะ (2016) ใช้ TaqMan Real-Time PCR ในการตรวจวัดเนื้อสุกรที่ผสมในเนื้อวัวและเนื้อไก่รวมถึงประยุกต์ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสุกรในตัวอย่างอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความไวสำหรับการตรวจวัดในเนื้อผสมอยู่ที่ช่วง 0.1 เปอร์เซ็นต์ และความไวในการตรวจวัดสำหรับอาหารแปรรูปที่ 0.1 พิโคกรัม อีกงานวิจัยหนึ่ง Al-Kahtani และคณะ (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการตรวจวัดเนื้อสุกรระหว่างเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมกับเทคนิค Real-Time PCR โดยการผสมเนื้อสุกรลงในเนื้อสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่นๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อไก่ เนื้อลูกู เนื้อกระต่าย เนื้อแพะและเนื้อแกะ ผสมที่อัตราส่วน 0%, 1%, 5%, 10% และ 20% ซึ่งพบว่าความไวในการตรวจวัดของเทคนิค Real-Time PCR อยู่ที่ 0.00001 นาโนกรัม ขณะที่ความไวในการตรวจวัดด้วยเทคนิค PCR ตรวจวัดได้ต่ำสุดเพียง 0.1 นาโนกรัม ซึ่งเทคนิค Real-Time PCR มีความไวกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมถึง 10,000 เท่า

2.7 การแพ้เนื้อสัตว์

โรคภูมิแพ้ Alpha-gal ส่วนใหญ่มักจะเกิดขึ้นในภาคกลางและภาคใต้ของสหรัฐอเมริกา โดยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เข้าไปในกระแสเลือดโดยการถูกกัดของสัตว์ ซึ่งสารนี้มีอยู่ในเนื้อสัตว์ ผู้ที่ถูกเห็บกัดจะมีอาการหนึ่งที่ถูกกระตุ้นให้แพ้อาหาร จากการศึกษา เมื่อถูกแมลงคล้ายแมงมุมกัดจะกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้เนื้อสัตว์ได้ ในสหรัฐอเมริกา ผู้ป่วยจะทรมานอย่างรุนแรงเป็นเวลาหลายชั่วโมงหลังจากที่กินเนื้อแดง ผู้เชี่ยวชาญตรวจสอบการตอบสนองต่อการแพ้จากเห็บกัด โดยเฉพาะเห็บโลนสตาร์ เมื่อสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเข้าไปในกระแสเลือด ซึ่งสารนี้มีอยู่ในส่วนประกอบของเนื้อสัตว์ การกัดของเห็บจะเข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้จดจำและมีการตอบสนองครั้งต่อไปเมื่อได้รับสารตัวนี้อีกครั้ง แต่ถ้าผู้ที่สงสัยว่าถูกเห็บกัด กินสเต็กเข้าไป อาการคันที่รุนแรงทั้งร่างกาย อาการลมพิษ angioedema ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารและแพ้รุนแรงถึงขนาดเสียชีวิต

ดาวน์ซินโดรมของโรคภูมิแพ้ Alpha-gal ในมนุษย์จะคล้ายกับ สุกร แมว ดาวน์ซินโดรมและดาวน์ซินโดรมของสุกร แมวจะมีการตอบสนองการแพ้ทันที ในขณะที่โรคภูมิแพ้ Alpha-gal ขอมนุษย์จะมีอาการแพ้หลังจาก 3-8 ชั่วโมง หลังจากกลืนกินสารก่อภูมิแพ้นั้น ผู้ที่ได้รับสารก่อภูมิแพ้นี้ควรหลีกเลี่ยงเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมด เช่น เนื้อวัว, เนื้อสุกร, เนื้อแกะและเนื้อกวาง และจากการกัดของเห็บโลนสตาร์ (lone star) อาจจะเข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ต่อต้านสารประกอบที่พบในเนื้อสัตว์และเป็นอันตรายต่อร่างกายได้ (Zaraska, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNeasy Blood & Tissue Kit , Qiagen, Germany)
   - สารละลายบัฟเฟอร์ ATL
   - สารละลาย Proteinase K
   - สารละลาย RNase
   - สารละลาย Absolute EtOH
   - สารละลายบัฟเฟอร์ AW1
   - สารละลายบัฟเฟอร์ Aw2
   - สารละลายบัฟเฟอร์ AE
   - สารละลายบัฟเฟอร์ PBS
   - DNeasy mini spin column & หลอดเก็บสารละลาย (Collection tube)
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร(Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA)
   - สารละลาย Cell lysis
   - สารละลาย Nuclei lysis solution
   - สารละลายตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)
   - สารละลาย DNA rehydration
   - สารละลาย RNase A
   - สารละลาย Iso-propanol
   - สารละลาย 70% ethanol
   - สารละลาย Proteinase K (20 mg/ml in water)
3. PCR Master Mix
   - 2XQIAGEN Multiplex PCR (Qiagen, Hilden, Germany)
   - Forward primer (10 μM) ของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด
   - Reverse primer (10 μM) ของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด
   - 20x LightCycler®480 ResoLight dye (Roche, Germany)
   - น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบในสภาพจริง (LightCycler® 480 Real-Time PCR System Roche, Germany)
5. เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) (Eppendorf, Germany)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Micro centrifuge) (Tomy Micro ONE, Tomy, Japan)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Tomy Tx-201, Tomy, Japan)
8. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet class II) (Nuaire, USA)
9. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical balance) (Pioneer,ohaus, USA)
10. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ (Laboratory freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Thermo, Germany)
11. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (G-560E Vortex Genie 2, USA)
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Nanodrop 2000c (Thermo, Germany)
13. เครื่องวัดขนาดดีเอ็นเอ QIAxcel Capillary Electrophoresis system (Qiagen, Hilden, Germany)
14. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Autopipett)
15. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentifuge tube)
16. เครื่องปั่นอาหาร (Blender) (Otto, Thailand)
17. อุปกรณ์เครื่องครัว เช่น ช้อน ส้อม มีด เขียง เป็นต้น
18. อุปกรณ์เครื่องแก้วอื่นๆ

3.2 ตัวอย่างสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ

3.2.1 ตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุม (DNA control) ของสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สุกร (*Sus scrofa*) กบ(*Bufo melanostictus*) งู (*Uropeltis*) และจระเข้ (*Felis catus*) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้มีตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่เป็นเลือด โดยนำตัวอย่างมาจากแหล่งจำหน่ายหรือขอความอนุเคราะห์จากหน่วยงานราชการ ได้แก่ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์กรสวนสัตว์แห่งประเทศไทย กองพันสัตว์ต่างกรมการสัตว์ทหารบก เป็นต้น เก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอย่างที่เป็นเนื้อ เลือกเอาตัวอย่างมาตัวอย่างละ 100 กรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งบด (pestle) จากนั้นเก็บใส่ในถุงถนอมอาหาร เพื่อนำมาใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป สำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือด ปิเปตตัวอย่างมาแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป ทั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างและแหล่งที่มาไว้ในตารางที่ 3.1

3.2.2 ตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุม ได้แก่ ไก่ (*Gallus gallus*) ม้า (*Equus caballus*) แพะ (*Capra aegagrus*) แกะ (*Ovis aries*) สุนัข (*Canis lupus familiaris*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิง (*Macaca fascicularis*) หนูนา (*Rattus argentiventer*) แมว (*Felis catus*) และลา (*Equus asinus*) เพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity test) เก็บตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่เป็นเลือด จำนวนสัตว์ชนิดละ 5 ตัวอย่าง

3.2.3 ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่วางจำหน่ายเชิงการค้าภายในประเทศไทย ทั้งที่มีการรับรองตราฮาลาลและไม่มีการรับรองตราฮาลาล โดยทำการ สุ่มตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1 แสดงสรุปแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควบคุมและทดสอบจำเพาะ

ชนิดสัตว์	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่มา
สุกร *(Sus scrofa)*	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดสามย่าน ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
กบ *(Bufo melanostictus)*	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดคลองเตย จ.กรุงเทพฯ
งู *(Uropeltis)*	เนื้อเยื่อ	ตลาดบ่อบัว จ.ฉะเชิงเทรา
จระเข้*(Felis catus)*	เนื้อเยื่อ	ห้างฟู้ดแลนด์ ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
ไก่ *(Gallus gallus)*	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดสามย่าน ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
ม้า *(Equus caballus)*	เลือด	กองพันสัตว์ต่างกรมการสัตว์ทหารบก จ.เชียงใหม่
แพะ *(Capra aegagrus)*	เลือด	องค์กรสวนสัตว์แห่งประเทศไทย จ.กรุงเทพฯ
แกะ *(Ovis aries)*	เนื้อเยื่อ	ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
สุนัข *(Canis lupus familiaris)*	เนื้อเยื่อ และเลือด	คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ลิง *(Macaca fascicularis)*	เนื้อเยื่อและเลือด	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย
หนู (*Rattus argentiventer*)	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดหัวรอ จ.อยุธยา
แมว *(Felis catus)*	เนื้อเยื่อ และเลือด	คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ลา *(Equus asinus)*	เลือด	กองพันสัตว์ต่างกรมทหารบก จ.เชียงใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์หรือเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit

นำเนื้อสัตว์หรือเลือดสัตว์ที่เตรียมไว้ มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับเป็นดีเอ็นเอควบคุมและสำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Germany ซึ่งเริ่มจากการชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 25-30 มิลลิกรัม หรือปิเปตตัวอย่างเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL 180 ไมโครลิตร เพื่อย่อยเนื้อเยื่อทำให้เซลล์แตก สำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือดปิเปตสารละลาย PBS เพื่อปรับ pH เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อย่อยโปรตีน เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างที่เป็นเนื้อ และ 10 นาทีสำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือด เมื่อครบเวลา เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเขย่า ให้เข้ากัน เติมสารละลาย absolute EtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายผสมจากหลอดตัวอย่างลงใน DNeasy mini spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้ง ย้าย DNeasy mini spin column ลงหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลาย AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนสารละลายทิ้ง นำ DNeasy mini spin column ย้ายลง หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่อีกครั้ง เติมสารละลาย AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนสารละลายทิ้ง นำ DNeasy mini spin column ย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อชะล้างดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บริเวณเมมเบรนของ DNeasy mini spin column ให้ตกลงมา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสกัดเสร็จสิ้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-Time PCR (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard® Genomic DNA Purification Kit

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารทางการค้าในข้อ 3.2.3 ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA ตามเอกสารแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เริ่มจากการบดตัวอย่างอาหารในถุงถนอมอาหารที่สะอาดจนละเอียด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile deionize water) 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ เวลา 2 นาที เพื่อกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยา PCR ซึ่งจะมีอยู่มากในอาหาร จากนั้นนำตัวอย่างอาหารมาชั่งหนัก ปริมาณ 20-30 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nuclei lysis 600 ไมโครลิตร ใช้แท่งบดที่สะอาด บดตัวอย่างจนละเอียดอีกครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย proteinase K ปริมาณ 17.5 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำมาเติมสารละลาย RNase ปริมาณ 3 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย protein precipitation ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน โดยเขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นปิเปตเอาเฉพาะส่วนที่ใสใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองใหม่ และเติมสารละลาย isopropanol ปริมาณ 600 ไมโครลิตร แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนที่ใสทิ้ง และล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จึงเทส่วนที่ใสทิ้งและตากดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้แห้งเร็วมากขึ้น เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาชะล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย DNA rehydration ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดไว้แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้มาเก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา Real-Time PCR (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 Spectrophotometer

การสกัดดีเอ็นเอเมื่อเสร็จสิ้นแล้วหลังจากนั้น จึงนำมาวัดปริมาณและตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี สเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โดยใช้เครื่อง Nano Drop 2000, Thermo Germany โดยเริ่มจากการทำความสะอาดแท่นวัด (Pedestal) ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและใช้กระดาษ Kimwipes เช็ดทำความสะอาดทั้งแท่นวัดและฝาปิด หลังจากนั้นหยดสารละลาย blank ซึ่งจะใช้สารละลายที่ดีเอ็นเอต้องการวัดละลายอยู่ เช่น สารละลายบัฟเฟอร์ AE หรือสารละลาย DNA rehydration เช็ดทำความสะอาด เมื่อทำความสะอาดเสร็จเรียบร้อยแล้ว ปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการวัด ปริมาณ 2 ไมโครลิตร โดยวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) ซึ่งค่าที่วัดได้จะคำนวณอัตโนมัติและแสดงผลที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ จึงสามารถประเมินความบริสุทธิ์ได้จาก อัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ดังนี้

- อัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ถ้าอยู่ในช่วงระหว่าง 1.65-2.00 จะแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นสายคู่บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถนำไปทำปฏิกิริยา Real-Time PCR ต่อไปได้
- อัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ถ้ามากกว่า 2.00 จะแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่
- อัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ถ้าน้อยกว่า 1.65 จะแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

ต่อจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่สกัดได้และผ่านการวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nano Drop แล้วนำมาเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสามารถนำไปในปฏิกิริยา Real-Time PCR ต่อไป(ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2555)

3.6 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์หะรอม

การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์เริ่มจากการค้นหาสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อที่จะนำมาศึกษาเป็นแนวทางในการทำวิจัยหลังจากนั้นจึงสืบค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีนต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของสัตว์หะรอมแต่ละชนิดได้แก่ ได้แก่ สุกร (*Sus scrofa*) กบ (*Bufo melanostictus*) งู (*Uropeltis sp.*) และจระเข้ (*Felis catus*) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกจากยีนที่ตั้งอยู่บนไมโตคอนเดรีย เช่น Cytochrome b (Cytb), และ 16S rRNA (Ali et al., 2015) ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมบนยีนเหล่านี้มีความจำเพาะสูงต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และมีจำนวนมากในแต่ละเซลล์รวมถึงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดี (Bottero and Dalmasso, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นทำการนำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของยีนเหล่านี้ในสัตว์แต่ละชนิดจากฐานข้อมูล GenBank มาวิเคราะห์เพื่อหาลำดับพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์เพื่อสร้างชุดไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 รวมถึงค่า Tm และขนาดผลผลิตปฏิกิริยาของสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ด้วยโปรแกรม Tm Utilities กรณีสัตว์ชนิดใดมีค่า Tm ใกล้เคียงกันหรือซ้อนทับกันก็ทำการดัดแปลงเพิ่มลดตามลำดับเบสเพื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือทำการลดอุณหภูมิค่า Tm จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกหรือออกแบบไว้กับสัตว์หรือพืชชนิดอื่นโดยทำการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST แบบออนไลน์บนฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi) (Kitpipit et al., 2014)

3.7 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR

การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์หะรอม เริ่มจากการนำไพรเมอร์ที่ผ่านการประเมินและคัดเลือก และเตรียมดีเอ็นเอควบคุมสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สุกร กบ งู และจระเข้ โดยเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมในสัตว์แต่ละชนิดบนยีนไมโตคอนเดรีย โดยทำการแยกสัตว์แต่ละชนิดด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งในปฏิกิริยา PCR Master mix ประกอบด้วย 2X LightCycler® 480 Probes Master ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาณ 7.0 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 18 ไมโครลิตร รายละเอียดการเตรียม PCR Master mix ดังแสดงในตารางที่ 3.2 หลังจากนั้นจึงปิเปตสารละลาย PCR Master mix ปริมาณ 18 ไมโครลิตร ลงใน Light Cycler® 480 multiwell plate ปิเปตดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ส่วน negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Light Cycler® 480 Real-Time PCR System (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2555)

ตารางที่ 3.2 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Real-Time PCR

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 ปฏิกิริยา (µl)
2X LightCycler® 480 Probes Master	10.0
Forward primer (10 µM)	0.5
Reverse primer (10 µM)	0.5
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	7.0
รวม	18.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสุกรด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ LightCycler 1.5.1 สำหรับการตรวจวัดสุกรดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (pre incubation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม amplification จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม melting analysis ซึ่งเป็นการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ amplification curve และค่า Tm รวม ด้วยโปรแกรม gene scanning

3.7.2 การตรวจวัดดีเอ็นเอของกบด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ LightCycler 1.5.1 สำหรับการตรวจวัดกบดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (pre incubation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม amplification จำนวนรอบทั้งหมด 42 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม melting analysis ซึ่งเป็นการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม Cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ amplification curve และค่า Tm รวม ด้วยโปรแกรม gene scanning

3.7.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของงูด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ LightCycler 1.5.1 สำหรับการตรวจวัดงูดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (pre incubation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม amplification จำนวนรอบทั้งหมด 40 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม melting analysis ซึ่งเป็นการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ amplification curve และค่า Tm รวม ด้วยโปรแกรม gene scanning

3.7.4 การตรวจวัดดีเอ็นเอของจระเข้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ LightCycler 1.5.1 สำหรับการตรวจวัดจระเข้ดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (pre incubation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม amplification จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม melting analysis ซึ่งเป็นการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ amplification curve และค่า Tm รวม ด้วยโปรแกรม gene scanning

ตารางที่ 3.3 สรุปการตั้งค่าจำนวนรอบและอุณหภูมิในการตรวจวัดสัตว์หะรอมแต่ละชนิดด้วยเทคนิค **Real-Time PCR**

สัตว์หะรอม	จำนวน(รอบ)	Denature (C^o)	Annealing (C^o)	Extension(C^o)
สุกร	35	95	56	72
กบ	42	95	57	72
งู	35	95	63	72
จระเข้	40	95	56	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Real-Time PCR

การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สัตว์หะรอมทั้ง 4 คู่ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมชนิดอื่นๆ ทั้ง 4 ชนิด และทำการทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์อื่นอีก 9 ชนิด ได้แก่ ไก่ ม้า แพะ แกะ สุนัข หนู แมว ลิง และลาโดยมีสภาวะและการตั้งค่าของโปรแกรมที่จะใช้ทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.7 และหากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีความจำเพาะ ผลการทดลองจะให้ผลบวกเฉพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น และจะไม่พบปฏิกิริยาข้ามระหว่างชนิดของสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เป้าหมาย (cross reaction)

3.9 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ของเทคนิค Real-Time PCR

ทำการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเข้มข้นเป็น 8 ระดับดังนี้ 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม 0.0002 นาโนกรัม 0.00002 นาโนกรัม และ 0.000002 นาโนกรัม จากนั้นทำการทดสอบความไวของเทคนิค Real-Time PCR ของสัตว์แต่ละชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ โดยในแต่ละปฏิกิริยาจะใช้ดีเอ็นเอควบคุมปริมาณ 2 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะและการตั้งค่าของโปรแกรมที่จะใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 3.7 ของสัตว์แต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

การทดสอบความเชื่อถือได้ (reliability test) ของเทคนิค Real-Time PCR โดยการนำมาตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารที่วางจำหน่ายทางการค้าในประเทศไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการรับรองตราฮาลาลและไม่มีการรับรองตราฮาลาล ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่มีวางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตามท้องตลาดทั่วไป จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 50 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์จากนม 10 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 10 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต 10 ตัวอย่าง และกลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 20 ตัวอย่าง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์อาหารมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit ตามข้อ 3.4 และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ตามข้อ 3.7.1 , 3.7.2, .3.7.3 และ 3.7.4 สามารถคำนวณความถูกต้องของเทคนิคได้จากสมการดังนี้(ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล, 2555)

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = \frac{\text{(จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ + จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ)}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100\%$$

3.11 สถานที่และระยะเวลาที่ทำวิจัย

สถานที่

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อยู่ 254 อาคารวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 11-13 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10330

ระยะเวลาที่ทำวิจัย

มกราคม พ.ศ. 2559 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เลือดสัตว์และตัวอย่างอาหาร

งานวิจัยครั้งนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และเลือดสัตว์ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการทดลอง สกัดด้วยชุดน้ำยา DNeasy Blood & Tissue Kit โดยทำการเตรียมตัวอย่างของสัตว์หะรอม ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สุกร กบ งู และจระเข้ รวมถึงสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ได้แก่ ไก่ ม้า แพะ แกะ สุนัข หนู แมว ลิง และลา จำนวนชนิดละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 Spectrophotometer จากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.76-2.01 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และสามารถสามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยา Real-Time PCR ต่อไปได้ (Yalcinkaya et al., 2017) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะอยู่ในช่วง 20-297 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

สำหรับการทดลองตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหารในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 50 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากนม 10 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 10 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต 10 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 20 ตัวอย่าง นำผลิตภัณฑ์อาหารมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดจากตัวอย่างอาหาร Wizard® Genomic DNA Purification Kit ซึ่งก่อนการสกัดดีเอ็นเอจะทำการบดตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารในถุงถนอมอาหารที่สะอาดจนละเอียดและนำมาล้างต่อด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยา PCR ซึ่งจะมีอยู่มากในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ไขมัน เครื่องรสต่างๆ และเครื่องเทศ เป็นต้น ซึ่งจากการทดลองจะพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาได้จะมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอนั้น อยู่ในช่วงตั้งแต่ 89-345 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่าชุดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร Wizard® Genomic DNA Purification Kit มีศักยภาพสูงเหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือกใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในอาหารฮาลาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง

ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ช่วงค่าการดูดกลืนแสง A280/A260
สุกร *(Sus scrofa)*	104.2-161.1	1.89-2.00
กบ *(Bufo melanostictus)*	198.8-297.2	1.81-1.82
งู *(Uropeltis)*	46.2-92.0	1.84-1.92
จระเข้*(Felis catus)*	71.7-146.9	1.81-1.83
ไก่ *(Gallus gallus)*	184.1-259.1	1.81- 1.87
ม้า *(Equus caballus)*	26.9-40.2	1.80-1.85
แพะ*(Capra aegagrus)*	22.6-25.2	1.79-1.88
แกะ *(Ovis aries)*	215.5-59.0	1.81-1.91
สุนัข *(Canis lupus familiaris)*	34.9-182.5	1.77-2.01
ลิง *(Macaca fascicularis)*	21.4-54.1	1.79-1.85
หนู (*Rattus argentiventer*)	55.5-153.8	1.76-1.86
แมว *(Felis catus)*	33.1-151.9	1.78-1.93
ลา *(Equus asinus)*	20.7-24.6	1.80-1.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 100 ตัวอย่าง

ชื่อตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ช่วงค่าการดูดกลืนแสง A280/A260
ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป	50	160-345	1.85-1.98
ผลิตภัณฑ์จากนม	10	126-251.2	1.82-1.888
ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่	10	95.2-258.1	1.79-1.95
ผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต	10	212-268.5	1.95-1.99
ผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร	20	89-125.1	1.76-1.84

4.2 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์หะรอม

โดยทั่วไปไพรเมอร์จะมีขนาดของความยาวอยู่ในช่วง 18-24 เบส ซึ่งมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพในการทำ PCR โดยมาตรฐานทั่วไปได้ดี แต่สำหรับแม่พิมพ์ของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่มีความอนุรักษ์ (conserved sequence) จะไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) การใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นกว่า 18 เบสนั้นมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องด้วยอาจเกิดจากการเพิ่มขยายปริมาณแบบไม่จำเพาะได้ง่าย ไพรเมอร์ทีมีขนาดยาว จะมีอัตราเร็วในการเข้าเกาะติดช้ากว่าไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้น แต่การขยายไพรเมอร์ให้ยาวกว่า 24 เบส ซึ่งพบว่าไม่มีปัญหาในการทำ PCR โดย PCR จะแปรผันตามความยาวของไพรเมอร์ ซึ่งความจำเพาะจะเพิ่มขึ้น 4 เท่าของทุกหนึ่งเบสที่เพิ่มขึ้น (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, 2557)

การศึกษาครั้งนี้ ไพรเมอร์ที่ได้ถูกคัดเลือกจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Ali et al., 2015; Jogayya et al., 2013) รวมถึงมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ซึ่งดังตารางที่ 4.3 ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้ผ่านการตรวจสอบว่ามีความจำเพาะ ด้วยโปรแกรม BLAST แบบออนไลน์ (http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi) และหลังจากนั้นนำไปทดสอบการเพิ่มปริมาณกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะเป็นตัวแทนของสัตว์แต่ละชนิดคือจะต้องมีการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้มีความจำเพาะและไม่เกิดการการ cross reaction กับสัตว์ชนิดอื่น (ภาคผนวก ก.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกและออกแบบใหม่ การตรวจวัดด้วยเทคนิค Real-Time PCR

สัตว์หะรอม	ชื่อไพรเมอร์	ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบส (5' to 3')	Tm (°C)	หมายเหตุ
สุกร	Ali-Pig- F	ND5	CCATCCCAATTATAATATCCAACTC	77.86	Ali และคณะ
	Ali-Pig-R		TGATTATTTCTTGGCCTGTGTGT		(2015)
กบ	ASN-Frog-F	16S	CACGAAGGTTATACTGTCTCCT	79.29	ออกแบบใหม่
	ASN-Frog-R		CTGAGGTAAATGATGATTCTGG		
งู	ASN-Snake-F	16S	AAGGTTGCGTAATCATTTG	85.29	ออกแบบใหม่
	ASN-Snake-*R*		GAAAGTGGCCATTATTTGGT		
จระเข้	CCD1-F	16S	AAAGCATTCTGCCTACACCTGAAA	83.87	Jogayya
	CCD1-R		TTGTGTTGGCTGCTTTAAGGCCTA		และคณะ
					(2013)

หมายเหตุ : ND5 หมายถึง NADH dehydrogenase 5

4.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ไพรเมอร์ของสัตว์หะรอม 4 ชนิด ที่ได้จากลำดับเบสบนยีนไมโตคอนเดรียซึ่งสุกรใช้ยีน NADH dehydrogenase 5 (ND5) กบ งู และจระเข้ใช้ยีนบน 16S rRNA นำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR แยกชนิดของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด โดยเตรียมดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ (repeatability) และมีการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) โดยทำการทดลองมีระยะห่าง 1 สัปดาห์

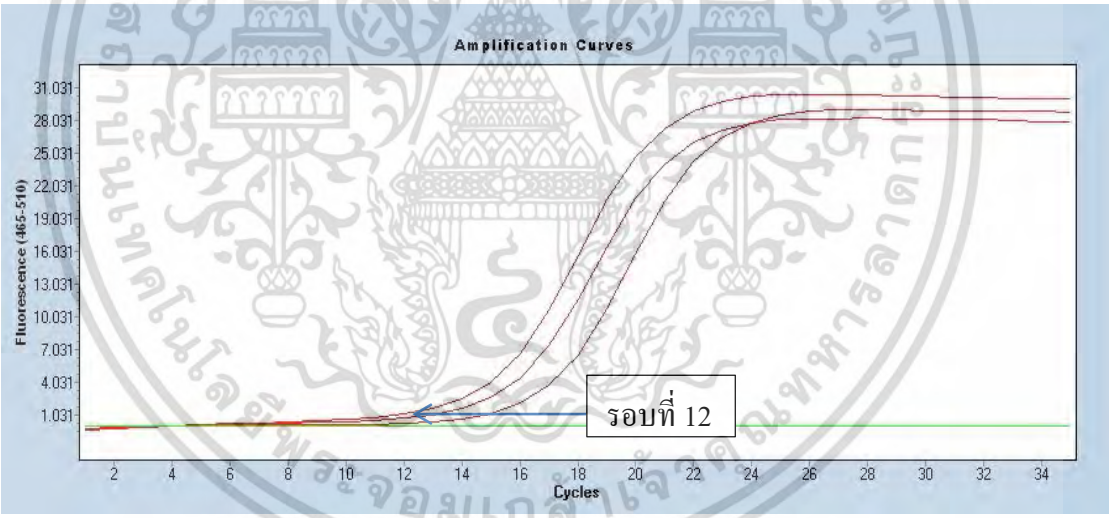
จากผลการทดลองพบว่า การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมแต่ละชนิด ประมาณผลจาก amplification curve ที่แสดงถึงการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ รวมถึงประเมินจากค่า melting temperature (Tm) ที่ออกแบบไว้ เทียบกับ Tm ที่วัดได้จริง สุกร มีค่า Tm อยู่ที่อุณหภูมิ 77.79 – 77.92 องศาเซลเซียส กบ มีค่า Tm อยู่ที่อุณหภูมิ 78.92 – 79.90 องศาเซลเซียส งู มีค่า Tm อยู่ที่อุณหภูมิ 85.19 – 85.35 องศาเซลเซียสและจระเข้ มีค่า Tm อยู่ที่อุณหภูมิ 83.79 – 83.94 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงช่วงค่า Tm เฉลี่ย และช่วงค่า Tm ของสัตว์แต่ละชนิดจากการการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR รายละเอียดของคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ของสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด (กราฟไม่ได้ถูกแสดง)

ชนิดสัตว์หะรอม	ค่า Tm (^{o}C) ที่ออกแบบไว้	ค่า Tm (^{o}C) เฉลี่ย	ช่วงค่า Tm (^{o}C)
สุกร	77.0	77.86	77.79 – 77.92
กบ	79.0	79.29	78.92 – 79.90
งู	85.0	85.29	85.19 – 85.35
จระเข้	83.0	83.87	83.79 – 83.94

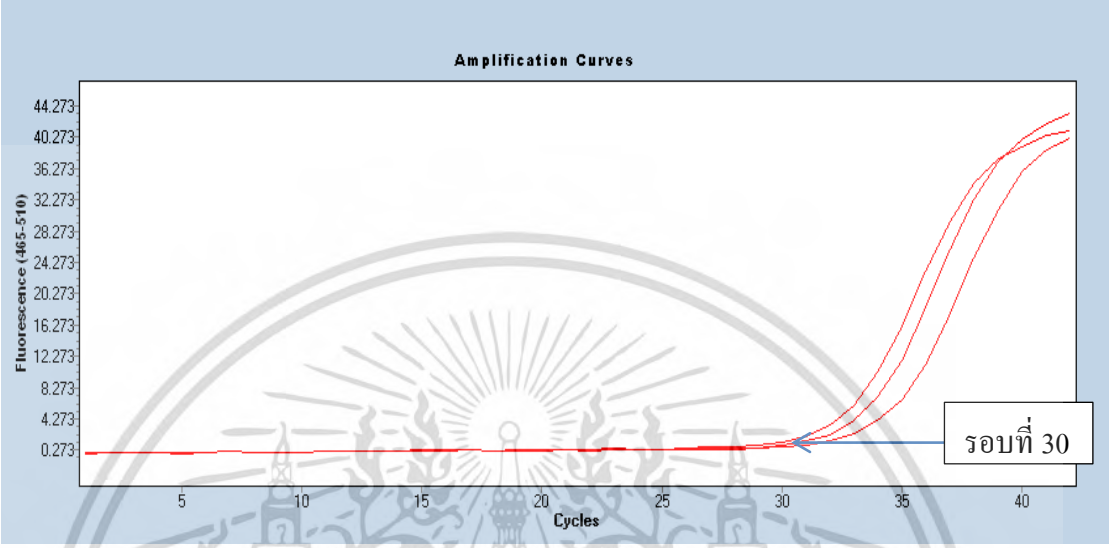
การตรวจวัดดีเอ็นเอของสุกรนั้นได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ บนยีน ND5 จากผลงานวิจัย (Ali et al., 2015) และเมื่อได้นำไปทดสอบด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานไว้ในเรื่องความไวและความจำเพาะ สามารถเพิ่มดีเอ็นเอสุกรได้ มีค่า Tm เฉลี่ยที่ 77.86 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอสุกร ทดลอง 3 ซ้ำโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 12

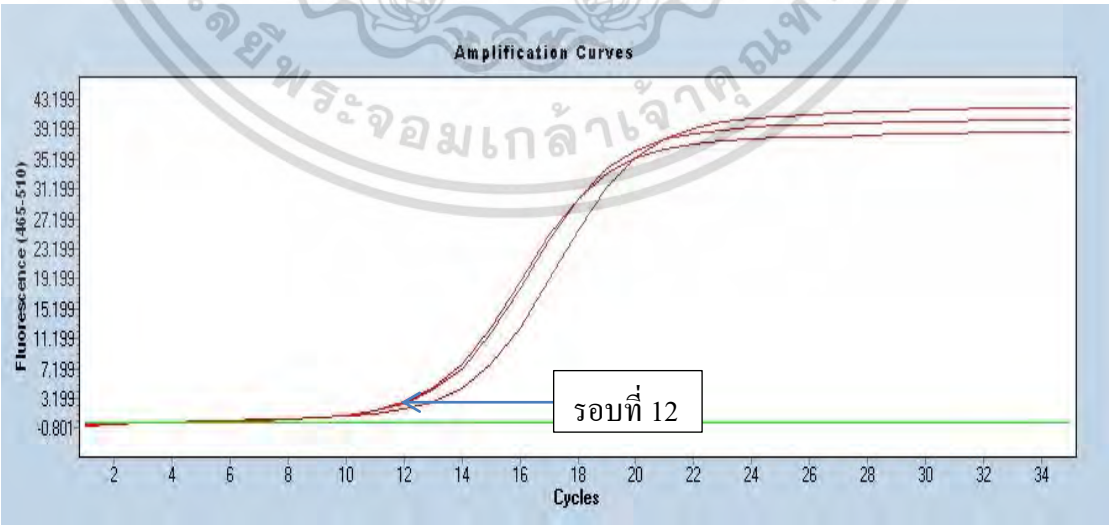
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจวัดดีเอ็นเอของกบ ได้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่จากยีน 16S เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Real-Time PCR สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของเป้าหมายได้ มีค่า Tm เฉลี่ยเท่ากับ 79.29 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอกบ ทดลอง 3 ซ้ำ โดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 30

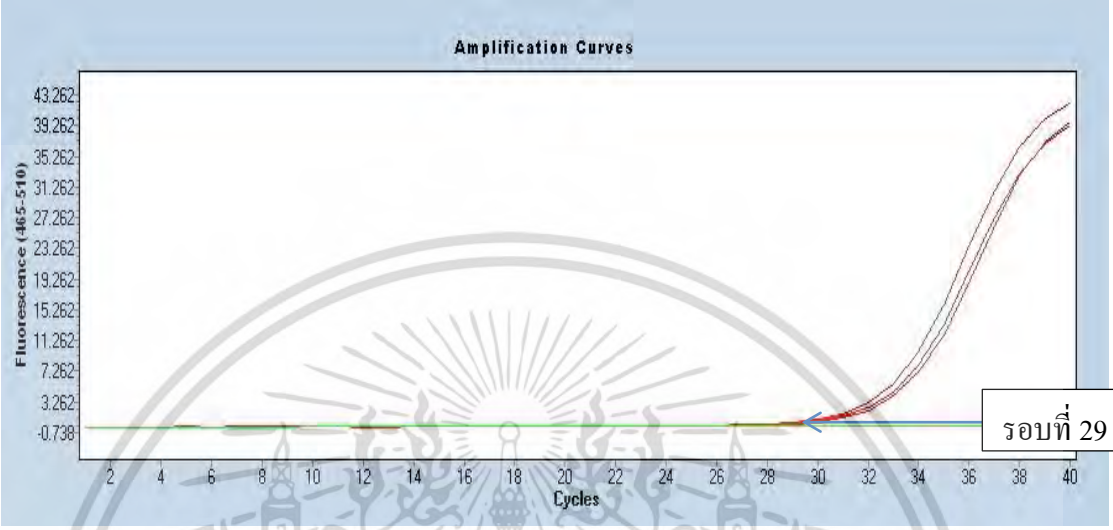
การตรวจวัดดีเอ็นเอของงู ได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากยีน 16S เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ มีค่า Tm เฉลี่ย เท่ากับ 85.29 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเองู ทดลอง 3 ซ้ำโดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจวัดดีเอ็นเอของจระเข้นั้นได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ 1 จากงานวิจัยของ คู่บนยีน 16S rRNA จากผลงานวิจัย (Jogayya et al., 2013) และ มีค่า Tm เฉลี่ยเท่ากับ 83.87 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 แสดง Amplification curve ของการตรวจวัดดีเอ็นเอจระเข้ ทดลอง 3 ซ้ำ โดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้รอบที่ 29

4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Real-Time PCR

ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ของสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมชนิดอื่นๆ ได้แก่ สุนัข หนู แมว ลิง และลา รวมถึงสัตว์อื่นๆ ได้แก่ ไก่ ม้า แพะ และแกะ จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ของสัตว์หะรอมทั้ง 4 คู่ ของสัตว์หะรอม 4 ชนิด มีความจำเพาะให้ผลบวกกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น แสดงในตารางที่ 4.5

ไพรเมอร์ของสุกร ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอของกบ ดีเอ็นเอของงู ดีเอ็นเอของจระเข้ ดีเอ็นเอของสุนัข ดีเอ็นเอของหนู ดีเอ็นเอของแมว ดีเอ็นเอของลิง ดีเอ็นเอของลา ดีเอ็นเอของไก่ ดีเอ็นเอของม้า ดีเอ็นเอของแพะ และดีเอ็นเอของแกะ

ไพรเมอร์ของกบ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอของสุกร ดีเอ็นเอของงู ดีเอ็นเอของจระเข้ ดีเอ็นเอของสุนัข ดีเอ็นเอของหนู ดีเอ็นเอของแมว ดีเอ็นเอของลิง ดีเอ็นเอของลา ดีเอ็นเอของไก่ ดีเอ็นเอของม้า ดีเอ็นเอของแพะ และดีเอ็นเอของแกะ

ไพรเมอร์ของงู ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอของสุกร ดีเอ็นเอของกบ ดีเอ็นเอของจระเข้ดีเอ็นเอของสุนัข ดีเอ็นเอของหนู ดีเอ็นเอของแมว ดีเอ็นเอของลิง ดีเอ็นเอของลา ดีเอ็นเอของไก่ ดีเอ็นเอของม้า ดีเอ็นเอของแพะ และดีเอ็นเอของแกะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ของจระเข้ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอของสุกร ดีเอ็นเอของกบ ดีเอ็นเอของงู ดีเอ็นเอของสุนัข ดีเอ็นเอของหนู ดีเอ็นเอของแมว ดีเอ็นเอของลิง ดีเอ็นเอของลา ดีเอ็นเอของไก่ ดีเอ็นเอของม้า ดีเอ็นเอของแพะ และดีเอ็นเอของแกะ

ตารางที่ 4.5 แสดงการทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ชนิดของสัตว์หะรอม และสัตว์ฮาลาล	**Species specific primer**			
	สุกร-ND5	**กบ-16S**	**งู-16S**	**จระเข้-16S**
สุกร (*Sus scrofa*)	+	-	-	-
กบ *(Bufo melanostictus*)	-	+	-	-
งู *(Uropeltis*)	-	-	+	-
จระเข้ *(Felis catus*)	-	-	-	+
ไก่ *(Gallus gallus*)	-	-	-	-
ม้า *(Equus caballus*)	-	-	-	-
แพะ *(Capra aegagrus*)	-	-	-	-
แกะ *(Ovis aries*)	-	-	-	-
สุนัข *(Canis lupus familiaris*)	-	-	-	-
หนู *(Rattus argentiventer*)	-	-	-	-
แมว *(Felis catus*)	-	-	-	-
ลิง *(Macaca fascicularis*)	-	-	-	-
ลา *(Equus asinus*)	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

- หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทั้ง 3 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของสุกร กบ งู จระเข้ ไก่ ม้า แพะ แกะ สุนัข หนู แมว ลิง และลา จำนวน 3 ซ้ำ

ชนิดของสัตว์หะรอม และสัตว์ฮาลาล	Species specific primer			
	สุกร-ND5	กบ-16S	งู-16S	จระเข้-16S
สุกร (*Sus scrofa*) 1	+	-	-	-
สุกร (*Sus scrofa*) 2	+	-	-	-
สุกร (*Sus scrofa*) 3	+	-	-	-
กบ *(Bufo melanostictus*) 1	-	+	-	-
กบ *(Bufo melanostictus*) 2	-	+	-	-
กบ *(Bufo melanostictus*) 3	-	+	-	-
งู *(Uropeltis*) 1	-	-	+	-
งู *(Uropeltis*) 2	-	-	+	-
งู *(Uropeltis*) 3	-	-	+	-
จระเข้ *(Felis catus*) 1	-	-	-	+
จระเข้ *(Felis catus*) 2	-	-	-	+
จระเข้ *(Felis catus*) 3	-	-	-	+
ไก่ *(Gallus gallus*) 1	-	-	-	-
ไก่ *(Gallus gallus*) 2	-	-	-	-
ไก่ *(Gallus gallus*) 3	-	-	-	-
ม้า *(Equus caballus*) 1	-	-	-	-
ม้า *(Equus caballus*) 2	-	-	-	-
ม้า *(Equus caballus*) 3	-	-	-	-
แพะ *(Capra aegagrus)*1	-	-	-	-
แพะ *(Capra aegagrus)*2	-	-	-	-
แพะ *(Capra aegagrus)*3	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

- หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

1,2,3 หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของสุกร กบ งู จระเข้ ไก่ ม้า แพะ แกะ สุนัข หนู แมว ลิง และลา จำนวน 3 ซ้ำ

ชนิดของสัตว์หะรอม และสัตว์ฮาลาล	Species specific primer			
	สุกร-ND5	กบ-16S	งู-16S	จระเข้-16S
แกะ *(Ovis aries)* 1	-	-	-	-
แกะ *(Ovis aries)* 2	-	-	-	-
แกะ *(Ovis aries)* 3	-	-	-	-
สุนัข *(Canis lupus familiaris)*1	-	-	-	-
สุนัข *(Canis lupus familiaris)*2	-	-	-	-
สุนัข *(Canis lupus familiaris)*3	-	-	-	-
หนู *(Rattus argentiventer)* 1	-	-	-	-
หนู *(Rattus argentiventer)* 2	-	-	-	-
หนู *(Rattus argentiventer)* 3	-	-	-	-
แมว *(Felis catus)* 1	-	-	-	-
แมว *(Felis catus)* 2	-	-	-	-
แมว *(Felis catus)* 3	-	-	-	-
ลิง *(Macaca fascicularis)* 1	-	-	-	-
ลิง *(Macaca fascicularis)* 2	-	-	-	-
ลิง *(Macaca fascicularis)* 3	-	-	-	-
ลา *(Equus asinus)* 1	-	-	-	-
ลา *(Equus asinus)* 2	-	-	-	-
ลา *(Equus asinus)* 3	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

- หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป้าหมายได้

1,2,3 หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

การทดสอบความไวของด้วยเทคนิค Real-Time PCR ต่อดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์หะรอมในแต่ละชนิด ซึ่งทำการเจือจางของดีเอ็นเอสุกร กบ งู และจระเข้ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นทั้งหมด 8 ระดับ ความเข้มข้นได้แก่ 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม 0.0002 นาโนกรัม 0.00002 นาโนกรัม และ 0.000002 นาโนกรัม แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค Real-Time PCR ของสัตว์หะรอมแต่ละชนิดให้ผลการทดลองดังนี้

ไพรเมอร์ของสุกรตรวจวัดดีเอ็นเอของสุกร ได้ความเข้มข้นที่ 7 ระดับการทดสอบ ได้แก่ ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม ระดับ 0.02 นาโนกรัม ระดับ 0.002 นาโนกรัม ระดับ 0.0002 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุด 0.00002 นาโนกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.5

ไพรเมอร์ของกบตรวจวัดดีเอ็นเอของกบ ได้ความเข้มข้นที่ 3 ระดับการทดสอบ ได้แก่ ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุด 0.2 นาโนกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.6

ไพรเมอร์ของงูตรวจวัดดีเอ็นเอของงู ได้ความเข้มข้นที่ 3 ระดับการทดสอบ ได้แก่ ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุด 0.2 นาโนกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.7

ไพรเมอร์ของจระเข้ตรวจวัดดีเอ็นเอของจระเข้ ได้ความเข้มข้นที่ 8 ระดับการทดสอบ ได้แก่ ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม ระดับ 0.02 นาโนกรัม ระดับ 0.002 นาโนกรัม ระดับ 0.0002 นาโนกรัม ระดับ 0.00002 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุด 0.000002 นาโนกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.8

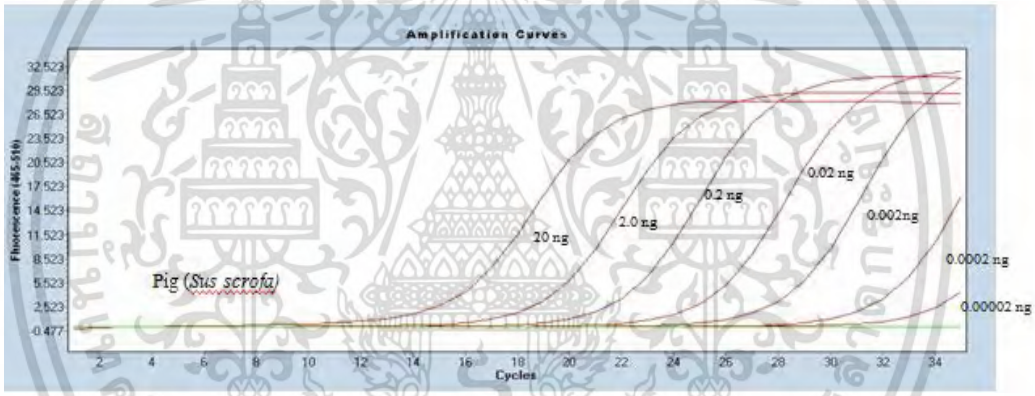
จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสัตว์แต่ละชนิดมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ทั้งที่สัตว์แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เท่ากัน เป็นผลมาจากลำดับเบสพันธุกรรมที่ต่างกันของสัตว์แต่ละชนิดรวมถึงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบและคัดเลือกไว้ ทำให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่างกัน กรณีถ้าต้องการให้สัตว์บางชนิดเช่น งู หรือกบ สามารถตรวจวิเคราะห์ ดีเอ็นเอได้ต่ำสุดมากกว่า 0.2 นาโนกรัม สามารถทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นหรือเพิ่มรอบในการ Amplified อย่างไรก็ดีพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์แล้วอาจเกิด Over-Amplified จนเครื่อง Real-Time ไม่สามารถตรวจวัดผลผลิตได้ ส่วนการเพิ่มรอบที่มากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

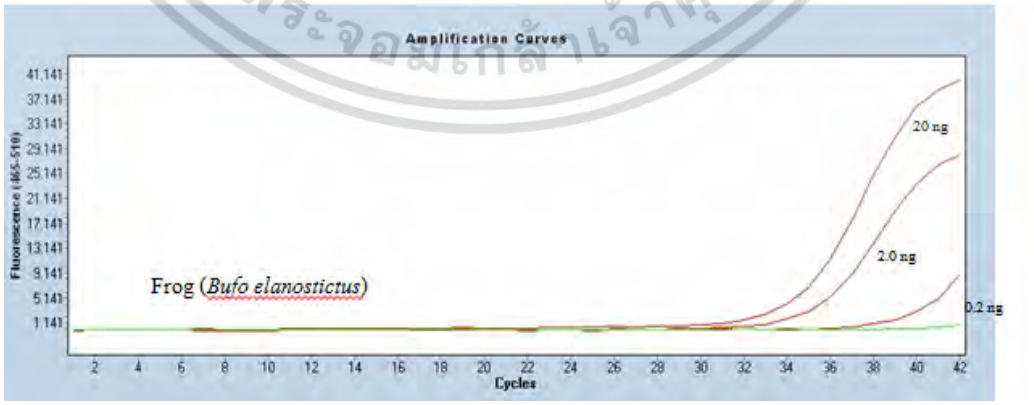
อาจทำให้เกิด การเพิ่มขยายแบบไม่จำเพาะหรือเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์ขึ้นได้ ซึ่งจากงานวิจัยนี้จำนวนความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว (อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์ , 2560)

ตารางที่ 4.7 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

Real-Time	**ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม(ng))**							
PCR	**20**	**2**	**0.2**	**0.02**	**0.002**	**0.0002**	**0.00002**	**0.000002**
สุกร	+	+	+	+	+	+	+	-
กบ	+	+	+	-	-	-	-	-
งู	+	+	+	-	-	-	-	-
จระเข้	+	+	+	+	+	+	+	+

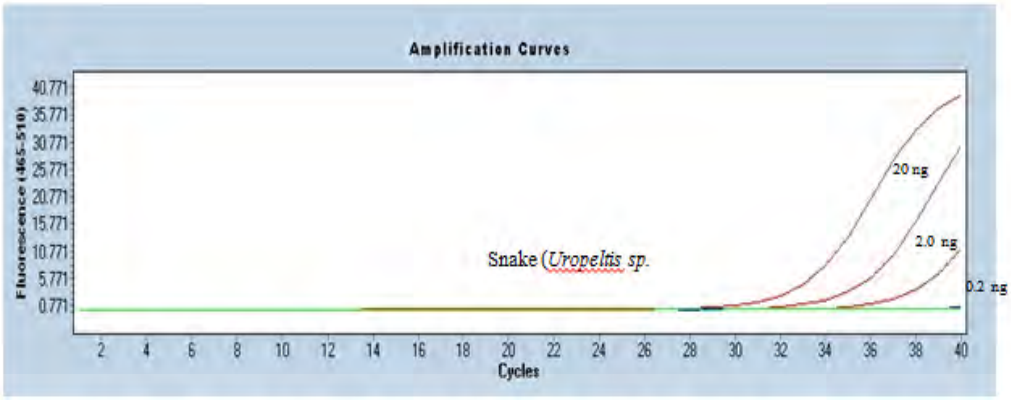


ภาพที่ 4.5 แสดง amplification curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของสุกรที่ระดับ 0.00002 นาโนกรัม

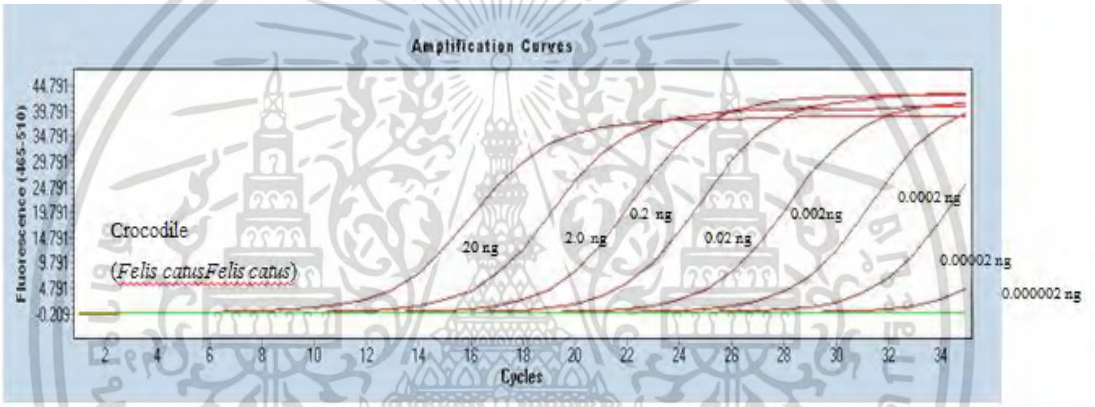


ภาพที่ 4.6 แสดง amplification curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของกบที่ระดับ 0.2 นาโนกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 แสดง amplification curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของสุกรงูที่ระดับ 0.2 นาโนกรัม



ภาพที่ 4.8 แสดง amplification curves จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดของจระเข้ที่ระดับ 0.000002 นาโนกรัม

จากผลการทดลองการทดสอบความไว หรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค Real-Time PCR สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสัตว์หะรอมแต่ละชนิดได้ที่ต่ำสุด 0.2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ยกเว้น สุกร ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถึงระดับ 0.00002 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และจระเข้ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถึงระดับ 0.000002 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในงานวิจัยนี้ ให้ผลที่สะดวกรวดเร็วและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้อยกว่า ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ของAli และคณะ (2015) ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์หะรอม ได้แก่ สุกร สุนัข หนู แมว ลิง ความไวอยู่ช่วง 0.01-0.02 นาโนกรัม แต่การประเมินผลของ Ali จะช้ากว่าเนื่องจากใช้ capillary electrophoresis (CE) ในการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน อาจยังไม่เหมาะสมกับงานตรวจด้านฮาลาลที่ต้องความแม่นยำและความรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

ความปลอดภัยของอาหารของบุคคลทั่วไปที่ต้องบริโภคอาหารที่ตรงตามข้อมูลบนฉลากแล้ว สำหรับผู้บริโภคที่เป็นมุสลิม การบริโภคสิ่งที่ถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลามเป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติในการดำเนินชีวิต เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและการประกันคุณภาพอาหารฮาลาล ในงานวิจัยนี้ได้นำเอาเทคนิค Real-Time PCR ที่พัฒนาได้ มาวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ผู้บริโภคมุสลิมนิยมนำมาบริโภค เป็นตัวอย่างอาหารที่ได้รับการรับรองฮาลาล และตัวอย่างที่ไม่มีการรับรองฮาลาล ซึ่งไม่ได้มีการระบุชัดเจนว่าเป็นตัวอย่างที่มีส่วนผสมของสัตว์หะรอม ดำเนินการเก็บตัวอย่างอาหารจำนวน 100 ตัวอย่าง โดยทำการแบ่งประเภทของตัวอย่างอาหารออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 50 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์จากนม 10 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 10 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต 10 ตัวอย่าง และกลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.8)

นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่ากลุ่มของผลิตภัณฑ์จากนม กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต และกลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร ไม่พบการเพิ่มของดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย ทั้ง 4 ชนิด คือ สุกร กบ งู จระเข้ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างอาหารทั้ง 4 กลุ่มนี้ ไม่มีการปนเปื้อนสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด ในขณะที่กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูปพบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกร 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างอาหารที่ไม่มีการรับรองฮาลาลทั้ง 2 ตัวอย่างอาหาร (ภาพที่ 4.9 และ 4.10) ซึ่งเป็นตัวอย่างอาหารที่ผู้บริโภคมุสลิมนิยมบริโภค และเพื่อเป็นการยืนยันผลของการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารได้ทำการส่งตัวอย่างอาหารทั้ง 2 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุกร ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัตินิติวิทยาศาสตร์ฮาลาล ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลที่สอดคล้องกันว่าพบตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างอาหารดังกล่าวพบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรจริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงจำนวนตัวอย่างอาหารทางการค้าที่นำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสัตว์หะรอม ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

ตัวอย่างอาหาร	จำนวน	Real-Time PCR			
		สุกร-ND5	กบ-16S	งู-16S	จระเข้-16S
ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป	50	2/50	0/50	0/50	0/50
ผลิตภัณฑ์จากนม	10	0/10	0/10	0/10	0/10
ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่	10	0/10	0/10	0/10	0/10
ผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบและช็อคโกแลต	10	0/10	0/10	0/10	0/10
ผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร	20	0/20	0/20	0/20	0/20

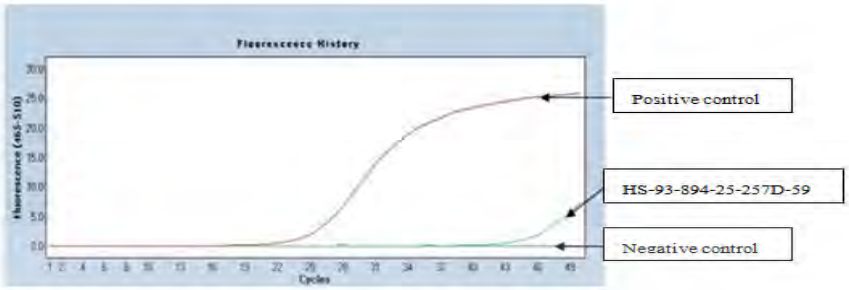
หมายเหตุ : ตัวเลขหน้า หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนของสัตว์หะรอม
ตัวเลขหลัง หมายถึง จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจการปนเปื้อนของสัตว์หะรอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบ : สารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร

เทคนิคการทดสอบ : Real-Time PCR (Light Cycler 480)

ผลการทดสอบ



สรุปผลการทดสอบ

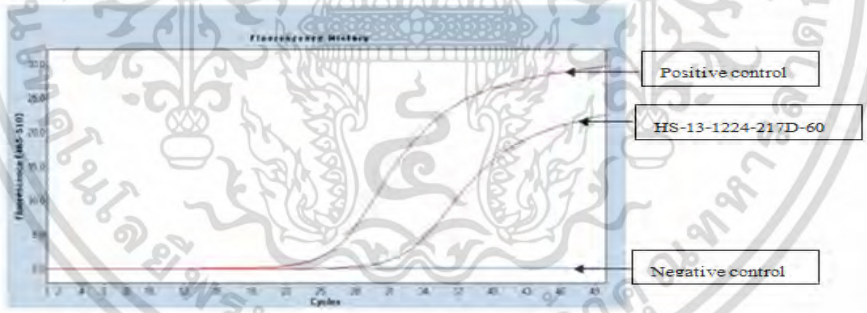
ที่ขีดจำกัดต่ำสุดของเทคนิควิเคราะห์ สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร ในตัวอย่าง HS-93-894-25-257D-59

ภาพที่ 4.9 แสดง amplification curves ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งพบการปนเปื้อนสุกร เทียบกับ positive control ของสัตว์หะรอม ซึ่งสอดคล้องกับ positive control ดีเอ็นเอของสุกร

การทดสอบ : สารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร

เทคนิคการทดสอบ : Real-Time PCR (Light Cycler 480)

ผลการทดสอบ



สรุปผลการทดสอบ

ที่ขีดจำกัดต่ำสุดของเทคนิควิเคราะห์ สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร ในตัวอย่าง HS-13-1224-217D-60

ภาพที่ 4.10 แสดง amplification curves ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งพบการปนเปื้อนสุกร เทียบกับ positive control ของสัตว์หะรอมซึ่งสอดคล้องกับ Positive control ดีเอ็นเอของสุกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทางการค้าด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน ตัวอย่างแรก คือ โบโลน่าไก่ ซึ่งจากการตรวจสอบข้อมูลพบว่าทางบริษัทมีการผลิตโบโลน่าไก่และเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสุกรผสมด้วย ซึ่งเป็นการผลิตโดยใช้สายการผลิตเดียวกัน จึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสุกรในผลิตภัณฑ์โบโลน่าไก่ได้ โดยผลิตภัณฑ์โบโล่น่าไก่ของบริษัทนี้ผู้บริโภคมุสลิมนิยมนำมาเป็นวัตถุดิบในการทำพิซซ่าหรือเครป ตัวอย่างที่สองคือไก่หยอง ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าบริษัทที่ผลิตไก่หยองนั้นมีการผลิตหมูหยองด้วย ซึ่งทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสุกรลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารไก่หยองได้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ไก่หยองบริษัทนี้เป็นที่นิยมของผู้บริโภคมุสลิมอย่างแพร่หลายโดยนำมาเป็นวัตถุดิบในการทำขนมเบเกอรี่ ซึ่งตัวอย่างอาหารทั้ง 2 ตัวอย่างอาหารเป็นตัวอย่างอาหารที่ไม่มีการรับรองฮาลาล แต่อย่างไรก็ตามผู้บริโภคมุสลิมควรคำนึงถึงผลิตภัณฑ์ที่มีการรับรองฮาลาลมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการรับรองฮาลาล เพราะบางผลิตภัณฑ์เป็นวัตถุดิบที่ใส่ในปริมาณน้อยจึงไม่สามารถระบุลงในฉลากของผลิตภัณฑ์ แต่การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งถึงแม้จะมีปริมาณน้อยมากแต่ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ทำให้สามารถตรวจพบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมได้ ดังนั้น การให้ความรู้และความเข้าใจในการบริโภคสิ่งที่ฮาลาลสำหรับผู้บริโภคมุสลิมถือเป็นสิ่งสำคัญและมีความจำเป็นอย่างยิ่ง และตัวอย่างอาหารที่มีการรับรองฮาลาลที่ได้มีการสุ่มมาตรวจในการทดลองครั้งนี้ ไม่พบการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น จึงแสดงให้เห็นถึงความมีคุณภาพและความเข้มงวดของมาตรฐานการรับรองฮาลาลของประเทศไทยที่ใช้ตามแนวทาง ศาสนารับรอง วิทยาศาสตร์รองรับ และเป็นการทำให้ตัวอย่างอาหารฮาลาลของประเทศไทยเมื่อมีการตรวจสัตว์ต้องจึงไม่พบการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น และยังทำให้อาหารฮาลาลของประเทศไทยได้รับความเชื่อมั่นของผู้บริโภคมุสลิมในระดับนานาชาติอีกด้วย

เพราะฉะนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค Real-Time PCR เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพที่สูง สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสัตว์หะรอมในอาหารฮาลาลได้จริง และให้ผลการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาล ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้สามารถตรวจเพิ่มสัตว์หะรอมได้อีก 3 ชนิด ได้แก่ กบ งู และจระเข้ นับว่าเป็นครั้งแรกของประเทศไทยที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ได้สำเร็จในการตรวจสัตว์หะรอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Real-Time PCR สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์หะรอม 4 ชนิดที่อาจปนเปื้อนในอาหารฮาลาล ได้แก่ สุกร กบ งู และจระเข้ ทั้งนี้เพื่อการสร้างระบบประกันคุณภาพให้ผู้บริโภคมุสลิมและผู้บริโภคทั่วไปเกิดความมั่นใจในผลิตภัณฑ์ที่ระบุรายละเอียดตามฉลากเพื่อได้รับการคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภคเองตามพระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ.2541

ในการทำวิจัยได้คัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่เฉพาะเจาะจงกับสัตว์หะรอมทั้ง 4 ชนิด ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่คือ ไพรเมอร์ของกบ และไพรเมอร์ของงู ส่วนไพรเมอร์ของสุกร และไพรเมอร์ของจระเข้ คัดเลือกมาจากงานวิจัยอื่น ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ของสัตว์หะรอมดังกล่าวคัดเลือกมาจากตำแหน่งยีนบนไมโตรคอนเดรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณจำนวนดีเอ็นเอได้ดี สุกรใช้ยีน NADH dehydrogenase 5 ส่วนกบ งู และจระเข้ใช้ยีนบน 16S rRNA พบว่าไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกและที่ได้ออกแบบมาใหม่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความแม่นยำในการระบุชนิดของสัตว์หะรอมถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ประเมินผลได้จาก amplification curves ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ รวมถึงค่า melting temperature (Tm) ที่วัดได้กับค่า Tm ที่ออกแบบไว้ไปในทิศทางเดียวกัน ในด้านการทดสอบความไว พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ของสัตว์หะรอม คือ สุกรอยู่ที่ระดับ 0.00002 นาโนกรัม กบและงูอยู่ที่ระดับ 0.2 นาโนกรัม และจระเข้อยู่ที่ระดับ 0.000002 นาโนกรัม

การศึกษาความน่าเชื่อถือของงานวิจัยครั้งนี้ โดยนำเทคนิค Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าที่มีวางจำหน่ายในประเทศไทย จำนวน 100 ตัวอย่างอาหาร พบว่ามีการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร 2 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธีมาตรฐาน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค Real-Time PCR มีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถใช้เทคนิค Real-Time PCR มาประยุกต์ตรวจวัดสัตว์หะรอมเพิ่มขึ้นอีก 3 ชนิด กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลได้ ซึ่งเทคนิคที่พัฒนาได้เป็นเสมือนเครื่องมือในการควบคุมและป้องกันไม่ให้ผู้ผลิตอาหารละเลยในการผลิตอาหารฮาลาลที่ถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลาม

ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป ยังสามารถนำเทคนิค Real-Time PCR ตรวจวัดการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์ที่ไม่ตรงกับข้อมูลบนฉลากของผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย แม้ว่าปัจจุบันจะมีกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค ซึ่งระบุให้ผลิตภัณฑ์อาหารจะต้องแสดงฉลากส่วนประกอบของอาหารไว้บนซองผลิตภัณฑ์ก็ตาม แต่ก็ยังมีผู้ผลิตบางรายที่หลีกเลี่ยงการแสดงข้อมูลบนฉลากหรือให้ข้อมูลที่ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครบถ้วนสมบูรณ์ เช่น การไม่ระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่นำใช้เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์นั้น ซึ่งการตรวจวัดการปนเปื้อนของสัตว์หะรอมหรือเนื้อสัตว์จะสามารถตรวจสอบส่วนประกอบให้ตรงกับข้อมูลบนฉลากของผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อคุ้มครองให้ผู้บริโภคทั่วไปได้บริโภคอาหารปลอดภัยและตรงตามข้อมูลบนฉลากผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุไว้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะ การพัฒนาเทคนิค Real-Time PCR ในครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Conventional PCR พบว่าการตรวจสอบผลผลิตและประมวลผลของเทคนิค Real-Time PCR มีประสิทธิภาพมากกว่า เนื่องจากมีความรวดเร็ว ความจำเพาะ มีความไวสูงกว่า และสามารถหาเชิงปริมาณได้ แต่อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนสัตว์หะรอมในอาหารฮาลาลถือว่าเป็น zero torrance กล่าวคือจะเจตนาหรือไม่เจตนาถ้ามีการปนเปื้อนไปในอาหารแล้ว อาหารนั้นจะไม่ฮาลาลทันที ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องหาเชิงปริมาณ สำหรับข้อเสียของเทคนิคนี้คือมีต้นทุนที่แพงกว่าเทคนิค Conventional PCR เล็กน้อย

นอกจากนี้สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากวิจัยครั้งนี้ไปต่อยอดพัฒนาตรวจวัดสัตว์หะรอมชนิดอื่นๆ รวมถึงสามารถพัฒนาต่อไปเป็นชุดตรวจวัดสำเร็จรูปอย่างง่าย (test kits) ในการตรวจการปนเปื้อนเชิงการค้า และพัฒนาถึงขั้นเป็นเทคนิค Multiplex ที่สามารถตรวจสัตว์พร้อมกันหลายชนิดได้อีกด้วย อีกทั้งเทคนิค Real-Time PCR ที่พัฒนาได้นั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการประกันคุณภาพอาหารฮาลาลและคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมได้ นอกจากนี้ยังสามารถคุ้มครองผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการรับประทานอาหารที่ถูกต้องตามฉลากอาหารที่ระบุไว้ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ณยาพร บริเวธานันท์. 2555. การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน AGAMOUS ในสบู่ดำ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพิมล มะหะหมัด. 2549. การพัฒนาวิธีการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาพแสดงขั้นตอนปฏิกิริยา PCR. เข้าถึงได้จาก http://www.wvww.vcharkarn.com/vcafe/39569 วันที่สืบค้น 16/10/2560

วินัย ดะห์ลัน. 2556. หนึ่งทศวรรษสถาบันด้านวิทยาศาสตร์ฮาลาลแห่งแรกของโลก. กรุงเทพฯ : ธนาเพรส.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2557. เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์. กรุงเทพฯ: ดีทรีโอ จำกัด.

วงศ์ขวัญ จิตนุพงศ์, สุนันทา รุ่งมี, เนาวรัตน์ เพ็ญจันทร์, และวนิดา ถลุงเรือง 2554.การตรวจหาเนื้อสุกรโดยวิธี Real time PCR.รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 1-8

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2555. คู่มือปฏิบัติการการทดสอบนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาล

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2556. รายงานฉบับสมบูรณ์ ผลการดำเนินงานโครงการภายใต้ การพัฒนาพื้นที่พิเศษ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ประจำปีงบประมาณ 2556.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2553. การจัดการเนื้อสัตว์ . พิมพ์ครั้งที่6 : โรงพิมพ์มิ่งเมืองสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มกอช. 8400-2550. อาหารฮาลาล. 2550.

อาณัฐ เด่นยิ่งโยชน์. 2560. การพัฒนาวิธีการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การละลายแบบแยกชัดสูง.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Al-Kahtani, H. A., Ismail, E. A., and Asif Ahmed, M. 2017. Pork detection in binary meat mixtures ans some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. Food Chemistry, 219, 54-60.

Ali , M. E., Razzak , M. A., Hamid, S. B., Rahman, M. M., Amin, M. A., Rashid, N. R. and Asing. 2015. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food Chemistry, 177, 214-224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Ayaz, Y., Ayaz, N, D., Erol, I. 2005. Detection of species in meat and meat products using enzyme- linked immunosorbent assay. Journal of Muscle Foods, 17, 214–220.

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

Bottero, M. T., and Dalmasso, A. 2011. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods.The Veterinary Journal, 190(1), 34-38.

Cai, H., Gu, X., Scanlan, M. S., Ramatlapeng, D. H., and Lively, C. R. 2012. Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. Journal of Food Composition and Analysis, 25(1), 83-87.

Dooley, J., Paine, E., Garrett, D,. and Brown, M. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. Meat Science, 68(3), 431-8.

Fang, X,. and Zhang, C. 2016. Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan (c) real-time PCR. Food Chemistry 192, 485-490.

Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P., and Tsaftaris, A. 2013. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. Food Chemistry141(2), 835-840

Garibyan, L. and Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. Journal of Investigative Dermatology, 133(3), e6.

Higuchi R. Dollinger G, Walsh PS and Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY), 10, 413-7.

Jogayya, N., Meganathan, R., Dubey, B., and Haque, I. 2013. Mitochondrial 16S ribosomal RNA gene for forensic identification of crocodile specie. Journal of Forensic and Legal Medicine, 334-338.

Kim, M., Yoo, I., Lee, S. Y., Hong, Y., and Kim, H. Y. 2016. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. Food Chemistry, 210, 102-106.

Kitpipit, T., Sittichan, K. and Thanakiatkrai, P. 2014. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry, 163, 77-82.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Klomtong, K., and Duangjinda, M. 2013. Detection and quantification of buffalo DNA contaminate in beef by using multiplex-high resolution melting technique (HRM). Proceedings of the 4th Meat Science and Technology, 61-66.

Koppel, R., Ruf, J. and Rentsch, J. 2011. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. European Food Research and Technology, 232, 151–155.

Lee, L, G., Connell, C, R,. and Bloch, W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Research, 21, 3761-6.

LightCycler® 2005. Operator's manual. LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I. Version September 2005. Roche Applied Science. Germany.

Mane, B, G., Mendiratta, S, K., Raut, A, A., and Tiwari, A, K. 2015. PCR-RFLP assay for authentication of meat and meat products. Journal of Meat Science and Technology, 8-11.

Nakyinsige, K., Man, Y. and Sazili, A. 2012. Halal authenticity issues in meat and meat products. Meat Science 91(3), 207-214.

Qiu, C., Zhi, Y., Shen, Y., Gong, J., Gong, J., Li, Y., and Li, X. 2015. High-resolution melting analysis of HPV-16L1 gene methylation: A promising method for prognosing cervical cancer. Clinical Biochemistry, 48(13-14), 855-859

Safdar, M. and Junejo, Y. 2015. Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER reen florescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. Food Chemistry, 173, 660-664.

Sarri, C., Stamatis, C., Sarafidou, T., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., and Mamuris, Z. 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. Food Control, 43, 45-41.

Song, K. Y., Hwang, H. J., and Kim, J. H. 2017. Ultra-fast DNA-based multiplex convention PCR method for meat species identification with possible on-site applications. Food Chemistry, 229, 341-346.

Tyagi, S. and Kramer, FR. 1996. Molecular Beacon: Probes that fluorescence upon hybridization. Nature Biotechnology, 14, 303-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Van der Spiegel, M., Van der Fels-klerx, H. J., Sterrenburg, P., Van Ruth, S. M., Scholtens-Toma, I. M. J., and Kok, E. J. 2012. Halal assurance in food supply chains: Verification of halal certificates using audits and laboratory analysis. Trends in Food Science & Technology, 27(2), 109-119.

Von Bargen, C., Dojahn, J., Waidelich, D., Humpf, H. U., and J. Brockmeyer. 2013. New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(49), 11986-11994.

Yaakob, M. 2010. Indigenous food Research and Development of Global Market, Proceeding of Food Innovation Asia Conference BITEC, Bangkok, Thailand, 12th Agro-Industrial Conference, 14

Yalcinkaya,B., Yumbul, E., Mozioglu, E., and Akgoz, M. 2017. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. Food Chemistry, 221, 1253-1257.

Zaraska, M. 2013. Want hives with that burger. The Washington Post. HEALTH;E01. เข้าถึงได้จาก https://www.revolvy.com/main/index.php?s=Alpha- gal%20allergy&item_type =topic วันที่สืบค้น 20/07/2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับงาน Real-Time PCR

ปัจจัยสำคัญที่สุดของความสำเร็จในการทำ Real-Time PCR ก็คือ การออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ถูกต้องเหมาะสม การออกแบบไพรเมอร์ที่ดี จะช่วยให้การทำพีซีอาร์มีความจำเพาะและเกิดประสิทธิภาพสูงสุด ในขณะที่ถ้าไพรเมอร์ออกแบบไม่เหมาะสมตามกฎเกณฑ์พื้นฐานที่จะกล่าวต่อไป มักมีประสิทธิภาพในการทำพีซีอาร์ต่ำ รวมถึงอาจมีการเพิ่มขยายแบบไม่จำเพาะหรือเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์ขึ้น การพยายามปรับเปลี่ยนสภาวะการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพมักไม่ได้ผลเท่าใดนัก ซึ่งในกรณีเช่นนี้ การออกแบบไพรเมอร์ใหม่น่าจะเป็นทางออกที่ดี ที่ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำ Real-Time PCR ให้สำเร็จ ในปัจจุบัน มีโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์จำนวนมาก โปรแกรมเหล่านี้ส่วนใหญ่ถูกออกแบบโดยอาศัยกฎเกณฑ์พื้นฐานของการออกแบบไพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่คล้ายคลึงกัน แต่อาจมีส่วนปลีกย่อยที่แตกต่างกันบ้าง เช่น เกณฑ์การคัดเลือกไพรเมอร์ที่อาจมีมากน้อยแตกต่างกัน ความยากง่ายในการใช้โปรแกรม ฯลฯ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้ โปรแกรม Primer 3 ในการออกแบ โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่คือ ไพรเมอร์กบและไพรเมอร์งู

เป้าหมายสำคัญของการออกแบบไพรเมอร์ในการทำ Real-Time PCR มี 2 อย่างคือ ความจำเพาะและประสิทธิภาพ โดยธรรมชาติของการทำ Real-Time PCR เมื่อพยายามปรับความจำเพาะของการทำ Real-Time PCR ให้สูงขึ้น ประสิทธิภาพของการทำ Real-Time PCR มักจะลดลง ในขณะที่ถ้าพยายามปรับให้ประสิทธิภาพการทำ Real-Time PCR สูงขึ้น ความจำเพาะของการทำ Real-Time PCR มักจะลดลง โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ที่มีอยู่ในปัจจุบันถูกพัฒนาให้ออกแบบไพรเมอร์โดยรักษาความสมดุลระหว่างความจำเพาะกับประสิทธิภาพ ความสมดุลดังกล่าวถูกกำหนดขึ้นโดยค่าโดยปริยาย (default) ที่กำหนดขึ้นของตัวแปร (variables) ที่มีผลต่อความจำเพาะและประสิทธิภาพ ตัวแปรเหล่านี้สามารถปรับเปลี่ยนค่าเพื่อเพิ่มหรือลดความจำเพาะและประสิทธิภาพให้เหมาะสมกับรูปแบบวัตถุประสงค์ของงาน ตัวอย่างเช่น การประยุกต์ใช้ Real-Time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยทั่วไป มุ่งคำนึงถึงความจำเพาะเป็นเกณฑ์หลัก ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกเท็จ ซึ่งจะก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อการวินิจฉัยโรค การตัดสินใจและรูปแบบในการรักษา ในกรณีนี้ ค่าตัวแปรต่างๆ จะถูกปรับเพื่อให้ความสมดุลปรับมาอยู่ในส่วนของความจำเพาะมากกว่าประสิทธิภาพ ในกรณีนำ Real-Time PCR ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดกรองเลือดผู้บริจาคเลือด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคที่อาจมีอยู่ในเลือดผู้ให้ จะต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยของผู้รับเลือดเป็นเกณฑ์หลัก จึงต้องปรับการทำ Real-Time PCR มีความไวสูงสุด โดยความจำเพาะของการทดสอบอาจจะด้อยลงไปบ้าง แต่ในทางปฏิบัติ เลือดที่ให้ผลบวกเหล่านี้จะถูกนำไปตรวจยืนยันด้วยการทดสอบที่มีความจำเพาะที่สูงสุดต่อไป จากตัวอย่างที่ยกข้างต้น จะเห็นว่าการประยุกต์นำเอาเทคนิค Real-Time PCR มาใช้งาน เพื่อที่จะได้ปรับค่าตัวแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหลายให้เหมาะสมสำหรับคัดเลือกไพรเมอร์ที่มี ความจำเพาะและประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับงาน Real-Time PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวมนฤดี เข็มทำ

วัน เดือน ปีเกิด 26 ธันวาคม 2526 ที่จังหวัดนครนายก

ที่อยู่ปัจจุบัน 23 หมู่ 8 ต. พระอาจารย์ อ. องครักษ์ จ. นครนายก 26120

ประวัติการศึกษา 2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ.2559 – ปัจจุบัน ผู้อำนวยการฝ่ายบริหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2549 – ปัจจุบัน ผู้จัดการคุณภาพระบบ ISO/IEC 17025 ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2549 – ปัจจุบัน ที่ปรึกษาและผู้ตรวจประเมินระบบ HAL-Q ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2553 – ปัจจุบัน ผู้ตรวจประเมินระบบความปลอดภัยโรงอาหารของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2559 – ปัจจุบัน เลขานุการคณะกรรมการบริหารศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2553 – 2558 คณะกรรมการบริหารศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2560 รองประธานงานเมาลิดกลางแห่งประเทศไทย

พ.ศ.2559 คณะกรรมการฝ่ายกิจกรรมสตรีงานเมาลิดกลางแห่งประเทศไทย

พ.ศ.2558 รองประธานฝ่ายประเมินผลงานเมาลิดกลางแห่งประเทศไทย

พ.ศ.2556 เลขานุการฝ่ายประเมินผลงานเมาลิดกลางแห่งประเทศไทย

พ.ศ.2560 เสนอผลงานทางวิชาการแบบนำเสนอปากเปล่า เรื่อง Detection of Haram Animals in Processed Food Products Using Real-Time PCR ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ European Conference on Science, Art & Culture (ECSAC) 2017 ระหว่างวันที่ 19 – 22 ตุลาคม พ.ศ. 2560 โรงแรม Vienna House Diplomat Prague ณ กรุงปราก สาธารณรัฐเช็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้