รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ตรวจหาการปนเปื้อน Porcine/Canine DNA ในอาหารฮาลาลด้วย Multiplex Real- time PCR

Determination of Porcine and Canine DNA Contamination in Halal Food Products using multiplex Real- Time PCR

โดย

นางพจชนาถ พัทบุรี
นางสาวจารุณี มหารัตน์
นายทรงพล หอมอุทัย
อุทัย ไทยเจริญ

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

06.D46
4

อุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประเภททั่วไป ประจำปี 2552

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้ประเภททั่วไป และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยจนสำเร็จ

สารบัญ

	หน้า
บททั่วไป	1
วัตถุประสงค์	4
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	18
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	46

ตรวจหาการปนเปื้อน Porcine/Canine DNAในอาหารฮาลาลด้วย Multiplex Real-time PCR

Determination of Porcine and Canine DNA Contamination in Halal Food Products using multiplex Real-Time PCR

นางพจชนาถ พัทบุรี นางสาวจารุณี มหารัตน์ นายทรงพล หอมอุทัยและอุทัย ไทยเจริญ

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศึกษาการตรวจหา DNA สุกรและสุนัขที่ปนเปื้อนในอาหารฮาลาล โดยใช้เทคนิค Multiplex Real- time PCR ซึ่งมีความจำเพาะให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อสุกรและสุนัขท่านั้น แต่ให้ผลเป็นลบในเนื้อเนื้อไก่

สำหรับความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกัน 3 ชุด พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอ Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US) ให้ความไวของปฏิกิริยาดีที่สุด โดยสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.0000001% สำหรับดีเอ็นเอสุกร และตรวจสอบดีเอ็นเอสุนัขได้ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.0001%

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัขในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตพบว่า มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบได้ดีกว่าเนื่องจากสามารถตรวจสอบ DNA สุนัขที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตที่ยากต่อการตรวจสอบได้เช่น gelatin จากสุกรที่ผสมในอาหาร และผลิตภัณฑ์ปรุงรส เช่น ซุปก้อน ได้

บทนำ

ประชากรมุสลิมในโลก มีประมาณ 1,800-1,900 ล้านคน ตลาดอาหารฮาลาลในโลกมีมูลค่าประมาณ 6,000,000 ถึง 8,000,000 ล้านบาท แต่ตลาดอาหารฮาลาลมิได้จำกัดเฉพาะชาวมุสลิมเท่านั้น ยังได้รับความนิยมจากกลุ่มผู้บริโภคทั่วไปด้วย ดังนั้นจึงคาดว่ามูลค่าตลาดอาหารฮาลาลมีขนาดใหญ่กว่าที่ประมาณการกันไว้ กลุ่มประเทศที่ส่งออกสินค้าอาหารฮาลาลมากที่สุด ได้แก่ NAFTA EU และ AN (ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์) ซึ่งเป็นประเทศกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วแต่ไม่ใช่กลุ่มประเทศที่เป็นมุสลิม หากแต่ประเทศเหล่านี้มีศักยภาพในด้านเทคโนโลยีมาตรฐานและวิสัยทัศน์ที่จะเป็นศูนย์กลางการผลิตสินค้าฮาลาลของโลก ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพประเทศหนึ่งในด้านอาหารสามารถที่จะเป็นศูนย์กลางของธุรกิจอาหารฮาลาลเนื่องจากประเทศไทยมีความได้เปรียบในด้านวัตถุดิบ มีหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนที่เป็นที่ยอมรับพร้อมที่จะผลักดันด้านมาตรฐานการผลิตสินค้าอาหารฮาลาล ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกอาหารฮาลาลเฉลี่ยปีละ 120,000-130,000 ล้านบาท มีอัตราการขยายตัวประมาณร้อยละ 9 ต่อปี โดยมีตลาดตะวันออกกลางเป็นตลาดที่มีการขยายตัวที่สำคัญที่สุด โดยเพิ่มขึ้นถึงประมาณร้อยละ 20 ในปี 2544-2547 มีบริษัทได้รับการรับรองฮาลาลถึง 1,055 บริษัทหรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 71.7 จากปี 2543 ที่มีเพียง 321 บริษัท

ตาราง 1 มูลค่าส่งออกอาหารฮาลาลของไทย

ปี พ.ศ.	2553	2552
มูลค่าส่งออกอาหารฮาลาล (ล้านเหรียญสหรัฐฯ)	10,000	8,360

ที่มา: โดย**สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ**

จะเห็นว่าอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งปัญหาและอุปสรรคในการขยายตลาดฮาลาลได้แก่

1. ในช่วงที่ผ่านมาประเทศไทยมีศักยภาพด้านการส่งออกอาหารสูง แต่มีส่วนร่วมในตลาดอาหารฮาลาลต่ำ หากรัฐบาลมีนโยบายสนับสนุนอุตสาหกรรมที่ชัดเจน ธุรกิจอาหารฮาลาลของไทยมีโอกาสสูงในการค้าโลก
2. หากประเทศไทยต้องการเป็นศูนย์กลางการค้าอาหารฮาลาล (Halal Hub) จะต้องเน้นคุณภาพของผลิตภัณฑ์และความเชื่อมั่นของผู้บริโภคภายในประเทศและควรมองตลาดใหม่ๆ เช่น สหรัฐอเมริกา และ EU ซึ่งเป็นตลาดฮาลาลขนาดใหญ่และมีอำนาจการซื้อสูง
3. ปัญหาที่พบในธุรกิจสินค้าฮาลาลได้แก่ มาตรฐานการตรวจสอบและรับรองฮาลาลแต่ละประเทศแตกต่างกัน ขาดการประชาสัมพันธ์และขาดหน่วยงานกลางในการเข้าไปประสานหน่ายงานที่เกี่ยวข้องรวมถึงนักธุรกิจยังขาดทักษะและความเข้าใจธุรกิจฮาลาล

ซึ่งปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ยังขาดวิธีการที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือในการตรวจสอบการปนเปื้อนของกลุ่มอาหารฮารอมในการผลิตอาหารฮาลาลซึ่งผิดต่อหลักศาสนาอิสลาม ได้แก่ เนื้อสุกร ไขมันสุกร หนังสุกร และองค์ประกอบอื่นๆ ของสุกร รวมทั้งตรวจสอบเนื้อสุนัข เป็นต้น โดยปัจจุบันรายละเอียดของหลักเกณฑ์ในการตรวจสอบเพื่อรับรองอาหารฮาลาลเป็นการตรวจสอบเฉพาะส่วนประกอบก่อนเข้าสู่ระบบการผลิต เช่น ส่วนผสมอาหาร สารปรุงแต่ง สี สารเติมระหว่างการผลิต อุปกรณ์การผลิต สารเร่ง สารทดแทน และอื่นๆ นอกจากนั้นมีเพียงการตรวจสอบกระบวนการผลิต วิธีการผลิต และการเตรียมส่วนประกอบ เป็นต้น ตามหลักศาสนาอิสลาม (นลินี โหมาศวิน, 2548)

งานวิจัยที่ผ่านมา Saiki และคณะ (1988) ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA สุกรและสุนัข ซึ่งเป็นสัตว์ต้องห้ามตามหลักศาสนาอิสลาม โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณ DNA ของสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารเพียงเล็กน้อยด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งใช้

เวลาน้อยและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบได้ครั้งละประมาณ 90 ตัวอย่าง ในเวลา 1 วัน ในการวิจัยที่ผ่านมาสามารถยืนยันได้ว่า วิธี PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและไวต่อปฏิกิริยาสูง สามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ได้ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเพียง 1 copy

งานวิจัยของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ดำเนินการไปแล้วได้ศึกษาหา primer ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA สุกรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต โดยเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา PCR ของ primer ในส่วน repetitive element และ mitochondrial DNA จากการศึกษาพบว่า primer ในส่วน repetitive element มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบได้ดีกว่าเนื่องจากสามารถตรวจสอบ DNA สุกรที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตที่ยากต่อการตรวจสอบในตัวอย่างเจลาติน และซุปก้อนปรุงรส ในขณะที่ primer ในส่วน mitochondrial ไม่สามารถตรวจสอบได้ ซึ่งในปัจจุบันศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ได้มีการนำวิธีการตรวจสอบดังกล่าวมาใช้ในการบริการลูกค้าที่สนใจตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล

ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมโดยการเปรียบเทียบการสกัด DNA อย่างน้อย 3 ชุดเพื่อหาชุดสกัด DNA ที่เหมาะสมต่อการทดลองนี้และศึกษาการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัขในอาหารฮาลาลในครั้งเดียวกันด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR เพื่อความสะดวกรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย โดยออกแบบ primer และ probe ในส่วน repetitive element สำหรับ ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีเหมาะสมแก่การจำแนกชนิดของสัตว์เนื่องจาก

- มีความจำเพาะกับชนิดของสิ่งมีชีวิตสูง
- สามารถตรวจติดตามผลในขณะทำปฏิกิริยาและรายงานผลเชิงปริมาณได้
- มีความไวของปฏิกิริยามากกว่าการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ด้วยเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม
- มีความสะดวกและรวดเร็วกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมและไม่มีสารเคมีที่สลายตัวยากต้องกำจัด

เทคนิค Multiplex Real-time PCR จะต้องคำนึงถึงสภาวะและการใช้สารละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสัตว์สองชนิดออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมามีตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสุกรและสุนัขในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ไม่มากนัก โดยเฉพาะการตรวจสอบ DNA ที่ได้จากสุนัขมีการศึกษาน้อยมาก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ต้องทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค Multiplex Real-time PCR มาใช้สำหรับการตรวจสอบต่อไป

นอกจากนั้นการวิจัยนี้เป็นการส่งเสริมการเป็นหน่วยงานร่วมในนิคมอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล เพื่อให้การรับรองมาตรฐานอาหารฮาลาล เพื่อสร้างความมั่นใจในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแก่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล และสร้างความมั่นใจในการเลือกบริโภคอาหารฮาลาลที่มีขั้นตอนการผลิตถูกต้องตามบทบัญญัติในศาสนาอิสลามด้วยการนำวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยในการพิสูจน์และยืนยันสิ่งที่ต้องห้ามอย่างเป็นระบบให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ของสุกรและสุนัขด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR
3. ศึกษาความไวของปฏิกิริยาที่สามารถตรวจสอบได้
4. ศึกษาการปนเปื้อนจากสัตว์ต้องห้ามในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P100 (20-100 µl) และ P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, Villiers-le-bel, France)
2. Vortex (Scientific industry, USA)
3. pH meter (Cyberscan, Eutech Cybernitech, Singapore)
4. Hot plate (Kika Labortechnik, Malaysia)
5. Balance (Precisa, Switzerland)
6. Microcentrifuge (National Labnet Co., Ltd, USA)
7. Real-time PCR 7300
8. microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA
9. Water Purification equipment (Barnstead/Thermolyne, Easypure RF, USA)
10. Microcentrifuge tube : 0.2 ml และ 1.5 ml (Gilson, Villiers-le-bel, France)
11. Beaker : 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
12. Flask : 250, 500 และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
13. Reagent bottom : 100, 250, 500 และ 1,000 ml (Duran, USA)

14. Cylinder : 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ml (Pyrex,USA)
15. Parafilm (American National Can, USA)Stirring-magnetic bar
16. Tris-HCl, pH 7.0 (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
17. Primer β-actin F และ β-actin R, Pig F และ Pig R (QIAGEN, Hilden, Germany)
18. Absolute ethanol (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
19. Tris base (USB, New Territories, Hong Kong)
20. iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany)
21. Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US)
22. Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัขด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับ DNA สุกรและสุนัข

   ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

   - กลุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรและผิวหนังสุนัข
   - ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ เนื้อไก่

   วิธีการศึกษา

   1.1 สกัดดีเอ็นเอจากสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุด ทดลองครั้ง ตามขั้นตอนชุดสกัดโดยย่อคือ

   1.1.1 ชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany)

   ชั่งเนื้อสัตว์ 50 มิลลิกรัม ใส่ proteinase K 25 ไมโครลิตรและใส่สารละลาย Lysis Buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ ครึ่งชั่วโมง ใส่สารละลายเพื่อให้ตัวอย่างละลายหมดด้วย Lysis Buffer ที่ 2 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สารละลายใน Column แล้วล้างด้วย Washing Buffer 500 ไมโครลิตร แล้ว Elute DNA ด้วย Elution Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

   1.1.2 ชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US)

   ชั่งเนื้อสัตว์ 5 มิลลิกรัม ใส่ proteinase K 20 ไมโครลิตรและใส่สารละลาย Lysis Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ ครึ่งชั่วโมง ใส่สารละลายเพื่อให้ตัวอย่างละลายหมดด้วย Lysis Buffer ที่ 2 ปริมาณ 180

ไมโครลิตรบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลายใน Column แล้วล้างด้วย Washing Buffer 750 ไมโครลิตร แล้ว Elute DNA ด้วย Elution Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

1.1.3 ชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA)

ชั่งเนื้อสัตว์ 30 มิลลิกรัม ใส่ proteinase K 20 ไมโครลิตรและใส่สารละลาย Lysis Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ ครึ่งชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สารละลายใน Column แล้วล้างด้วย Washing Buffer 500 ไมโครลิตร แล้วElute DNA ด้วย Elution Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

1.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

1.3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

Primer	Primer Sequence
Pig pre-1-F	5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′
Pig pre-1-R	5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′
Canine-F	5′CGAGGTGCCTATGAGGTGAAC 3′
Canine-R	5′ TCCCTTTTTCAATAGGCCCTACTG 3′

Taqman™ probes	Sequence of probes
Pig probe	5′ (FAM)-CTAGCCTGGGAACCTCCATA-(TAMRA) -3′
Canine probe	5′ (VIC)- TCCCTGTGTAAACTTG -(TAMRA) -3′

1.4 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลองดังนี้

สารเคมี	ปริมาณ
primer Pig pre-F,R	200 nM
primer Canine-F,R	200 nM
TaqMan Master Mix PCR	10 ul

Probe Pig .Canine	200 nM
DNA	50-100 ng
ปริมาณทั้งหมด	25 ul

1.4 หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง Real-time PCR ซึ่งได้ตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้

อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
50	2	1
95	10	1
95	0.15	40
60	60	

1.6 ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และให้ค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจสอบสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และค่า Ct ไม่สามารถตรวจสอบได้

2. **ตรวจสอบความจำเพาะของ primer และ probe ที่ใช้**

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดย ใช้ตัวอย่าง เนื้อหมูสด

ตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อปลา

2.1 สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด 3 ชุด

2.1.1 ชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.1

2.1.2 ชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.2

2.1.3 ชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.3

โดยเตรียมนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ สารละลายตามตารางการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับ Real-time PCR

3. **ศึกษาความไวของปฏิกิริยาการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัข โดยใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR**

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

- อย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%
- ตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 °C เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%
- ดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%

3.1 เปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตร์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลองครั้ง ตามขั้นตอนชุดสกัดโดยย่อคือ

3.1.11 ชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.1

3.1.1.2 ชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.2

3.1.1.3 ชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.3

3.1.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ สารละลายตามตารางการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับ Real-time PCR

ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และให้ค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจสอบสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และค่า Ct ไม่สามารถตรวจสอบได้

3.2 ศึกษาเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 120 องศาเซลเซียสในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%

3.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลองครั้ง ตามขั้นตอนชุดสกัดโดยย่อคือ

3.2.1.1 ชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.1

3.2.1.2 ชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.2

3.1.1.3 ชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.3

3.2.2 โดยเตรียมนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ สารละลายตามตารางการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับ Real-time PCR

ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และให้ค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจสอบสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และค่า Ct ไม่สามารถตรวจสอบได้

3.3 ดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%

3.3.1สกัดดีเอ็นเอจากสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลองครั้ง ตามขั้นตอนชุดสกัดโดยย่อคือ

3.3.1.1 ชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.1

3.2.1.2 ชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit (TAKARA , US) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.2

3.1.1.3 ชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA) ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเหมือนกับข้อ 1.1.33.3.2 โดยเตรียมนำดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.1 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ สารละลายตามตารางการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับ Real-time PCR

4. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัขในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลที่ยากต่อการตรวจสอบ เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปต่าง ซุปก้อน เจลาตินแห้ง และขนมผสมเจลาติน ประมาณ 30 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีดังนี้

- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ต่างๆที่ซื้อจากซูปเปอร์มาร์เก็ต เช่น กุนเชียงไก่, กุนเชียงปลา, กุนเชียงหมู, แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1, แกงเผ็ดหมู, ยอ, ลูกชิ้น ฯลฯ
- วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต gelatin, shortening, collagen และ lard

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ต่างๆ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

1. ข้าวเกรียบปลาทอด Jadini		2.บูดูยีเซ็งสายบุรี	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
-Fish -Sago flour -Salt - Sugar		ปลาไส้ตัน เกลือ น้ำตาล	70% 25% 5%
3. ไส้กรอกไทยอีสานไก่ IBF		4. รังนกบรรจุขวด ANGKASAA	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
-		-	
5.Filament fish Stick		6. TOFU Shishamo Fish egg	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
เนื้อปลา น้ำ น้ำมันพืช น้ำตาล เกลือ เครื่องเทศ แต่งรสด้วย Monosodium Glutamate(E621) Phosphate(E450iii, E451I) Sorbitol		ปลาแผ่น น้ำ แป้งมันสำปะหลัง น้ำตาล น้ำมันพืช ไข่ขาว แป้งสาลี เกลือ โปรตีนจากถั่วเหลือง แต่งกลิ่นด้วยผงชูรส phosphate Fish roe สีจากธรรมชาติ	

7.FLAVOURED Fish Ball		8.STUFFED SEAFOOD Roll	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
ปลาแผ่น น้ำ แคลรอท หอมใหญ่ ถั่วฝักยาว แป้งมันสำปะหลัง น้ำตาล ไข่ขาว Wheat Gluten เกลือ แต่งรสด้วยผงชูรส phosphate		ปลาแผ่น น้ำ แป้งมันสำปะหลัง น้ำตาล น้ำมันพืช ไข่ขาว แป้งสาลี เกลือ โปรตีนจากถั่วเหลือง แต่งกลิ่นด้วยผงชูรส phosphate กลิ่นปู สีจากธรรมชาติ	
9. Fish finger		10. FRIED SEAFOOD TOFU CURD	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
เนื้อปลา น้ำ เกล็ดขนมปัง น้ำมันพืช น้ำตาล เกลือ เครื่องเทศ แต่งรสด้วย Monosodium Glutamate(E621) Phosphate(E450iii, E451I) Sorbitol		เนื้อปลา น้ำ สาหร่าย (สาหร่ายสีแดง) น้ำมันพืช แป้งมันสำปะหลัง ถั่วเหลือง น้ำตาล เครื่องเทศ เกลือ แต่งรสด้วย Monosodium Glutamate Phosphate	

23. Tofu sandwich		24. Salmal ball	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
เนื้อปลา น้ำน้ำมันพืช ถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง เกลือ ไข่ขาว Phosphate(E450iii, E451I) เกลือ แต่งรส ด้วย Monosodium Glutamate(E621) สี ธรรมชาติ(E100)		เนื้อปลา น้ำแป้งมันสำปะหลังถั่ว เหลืองไข่ขาวน้ำมันพืช น้ำตาล เกลือ กลิ่นปลา Salmon แต่งรสด้วย Monosodium Glutamate(E621) Phosphate(E450iii, E451I) carmine & paprika colour(E120, E160c)	
13. Band		14.ไส้อั่ว	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
		เนื้อหมูคัดพิเศษ เครื่องเทศ มันหมู เกลือไอโอดีน	75% 18% 5% 2%
15. Gummy Berry		16. Sweet gelly	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose - Sugar - Gelatin	45% 40% 7%	- Glucose - Sugar - Gelatin	45% 40% 7%
17. Jele		18. Yupi	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose - Sugar - Gelatin	45% 40% 5%	กลูโคสไซรัป น้ำตาล เจลาติน อะการ์	48% 32% 6% 0.7%

19. Jelly rainbow		20. amino	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose	45%	น้ำองุ่น	11%
- กลูโคสไซรัป	39%	น้ำตาล	3.5%
- Gelatin	10%	น้ำส้ม	1%
		คอลลาเจน	0.255%
		แอล-กลูตาไธโอน	0.016%
		วิตามินซี	0.0008%
		กรดอะมิโนไลซีน	0.004%
		กรดอะมิโนลูซีน	0.004%
		กรดอะมิโนไอโซลูซีน	0.004%
21. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1		22. ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Pork	60%	มีเนื้อหมูอบแห้ง	5%
- Red Curry poste	5%		
- coconut cream	28%		
- Egg plant	3%		
- Chilli	2%		
- sugar	1%		
23. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2		24. ซุปก้อนหมูชนิดที่ 2	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Pork	63%	มีเนื้อหมูอบแห้ง	1%
- Red Curry poste	5%		
- coconut cream	28%		
- Chilli	2%		
- sugar	1%		

25. รังนกผสมคอลลาเจน			
ส่วนประกอบ	ปริมาณ		
- ซอร์บิทอล - ไซลิทอล - คอลลาเจน - รังนก	12% 4% 1.4% 1.1%		

4.1 สกัด DNA จากตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้งโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่ให้ความไวในการตรวจสอบมากที่สุด และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 2

4.2 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยนำไปวัดนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีค่าความบริสุทธิ์ (A260/280) ระหว่าง 1.5-1.8 และปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

4.3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

Primer	Primer Sequence
Pig pre-1-F	5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′
Pig pre-1-R	5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′
Canine-F	5′CGAGGTGCCTATGAGGTGAAC 3′
Canine-R	5′ TCCCTTTTTCAATAGGCCCTACTG 3′

Taqman™ probes	Sequence of probes
Pig probe	5′ (FAM)-CTAGCCTGGGAACCTCCATA-(TAMRA) -3′
Canine probe	5′ (VIC)- TCCCTGTGTAAACTTG -(TAMRA) -3′

4.4 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลอง

สารเคมี	ปริมาณ
primer Pig pre-F,R	200 nM
primer Canine-F,R	200 nM
TaqMan Master Mix PCR	10
Probe Pig ,Canine	200 nM
DNA	50-100 ng
ปริมาณทั้งหมด	25 ul

4.5 หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง Real-time PCR ซึ่งได้ตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้

อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
50	2	1
95	10	1
95	0.15	40
60	60	

4.6 นอกจากนี้ต้องตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอาหารฮาลาล โดยใช้ ใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*,2003) โดยมีลำดับเบสคือ

ชื่อ primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์
β-actin f	5′CGGAACCGCTCATTGCC 3′
β-actin r	5′TAGATGGGCACAGTGTGGGT 3′

4.7 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลอง

สารเคมี	ปริมาณ
β-actin f	200 nM
β-actin r	200 nM
SYBR green Master mix	10 ul
DI	10 ul
DNA	50-100 ng
ปริมาณทั้งหมด	25 ul

4.8 หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง Real-time PCR ซึ่งได้ตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้

อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
50	2	1
95	10	1
95	0.15	40
60	60	
95	0.15	1
60	1.0	
95	0.15	
60	0.15	

ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และให้ค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจสอบสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และค่า Ct ไม่สามารถตรวจสอบได้

ผลการทดลอง

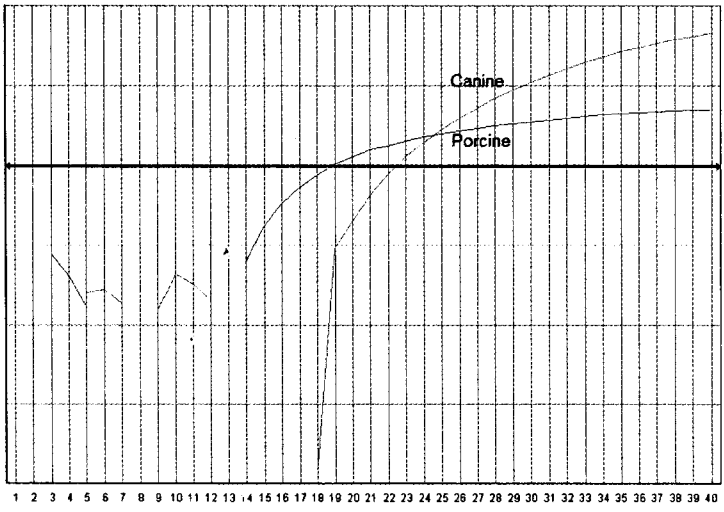
1. **ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCRและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัขด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับ DNA สุกรและสุนัข**

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

กลุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรและผิวหนังสุนัข

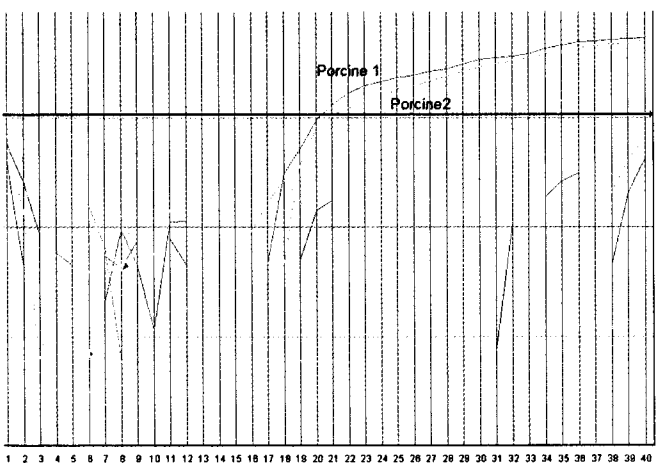
ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ เนื้อไก่

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ primer และ probe ที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและสุนัข หลังจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบว่าให้ผลบวกโดยจะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ที่ กราฟ Amplification Plot เฉพาะในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสุกรและสุนัขเท่านั้น สำหรับเนื้อไก่ ให้ผลเป็นลบไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ที่กราฟ Amplification Plot ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 1



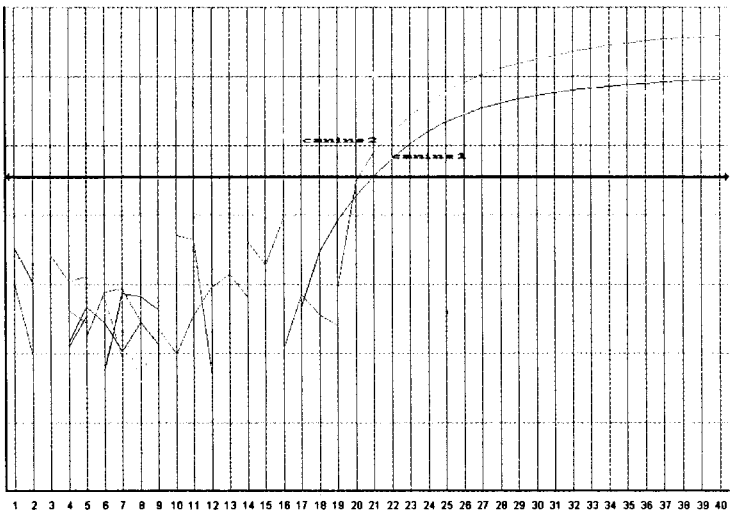
รูปที่ 1 ภาพ Amplification plot แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA สุกรและสุนัขโดยเทคนิค Multiplex Real-time PCR สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรและสุนัขในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างไก่

2. **ศึกษาความจำเพาะของ Primer และ Probe** ที่เลือกใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและดีเอ็นเอสุนัขด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดย ใช้ตัวอย่าง เนื้อหมูสด
ตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อปลา
โดยเตรียมนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot สำหรับดีเอ็นเอของสุกรและสุนัขเท่านั้น แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot ในตัวอย่างเนื้อปลา เนื้อวัว และเนื้อไก่ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างสุกร สำหรับตัวอย่างปลา วัวและไก่ ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence

สถาบันวิทยบริการเพื่อการเรียนรู้คุณหญิงหลง รัตนกระวีสุนทร



รูปที่ 3 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างสุนัข สำหรับตัวอย่างปลา ไก่ และวัว ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence

ในตัวอย่างสุกรและสุนัข สัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้แสดงเป็นค่า Cycle number (Ct) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงรอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจสอบพบสัญญาณ Fluorescence ได้ดังแสดงตามตารางที่ 2

Well	Sample Name	Detector	Ct	StdDev Ct	StdDev Qty	Task	Quantity	Mean Qty
H1	canine	canine	20.0992			Unknown		
H2	canine2	porcine	Undet.			Unknown		
H2	canine2	canine	20.9478			Unknown		
H3	porcine	porcine	20.9968			Unknown		
H3	porcine	canine	Undet.			Unknown		
H4	porcine2	porcine	20.3514			Unknown		
H4	porcine2	canine	Undet.			Unknown		
H5	fish2	porcine	Undet.			Unknown		
H5	fish2	canine	Undet.			Unknown		
H7	chichen	porcine	Undet.			Unknown		
H7	chichen	canine	Undet.			Unknown		
H8	chichen2	porcine	Undet.			Unknown		
H8	chichen2	canine	Undet.			Unknown		
H9	caw	porcine	Undet.			Unknown		
H9	caw	canine	Undet.			Unknown		
H10	caw2	porcine	Undet.			Unknown		
H10	caw2	canine	Undet.			Unknown		
H11		porcine	Undet.			NTC		
H11		canine	Undet.			NTC		

Detector	ค่า SD ของ Ct
Canine	0.60
Porcine	0.45

ตารางที่ 2 แสดงค่า Ct และ ค่า SD ของ Ct ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรและสุนัข แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอปลา และดีเอ็นเอวัวไม่สามารถตรวจวัดได้ (Undet)

3. **ศึกษาความไวของปฏิกิริยาการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรและสุนัข โดยใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR**

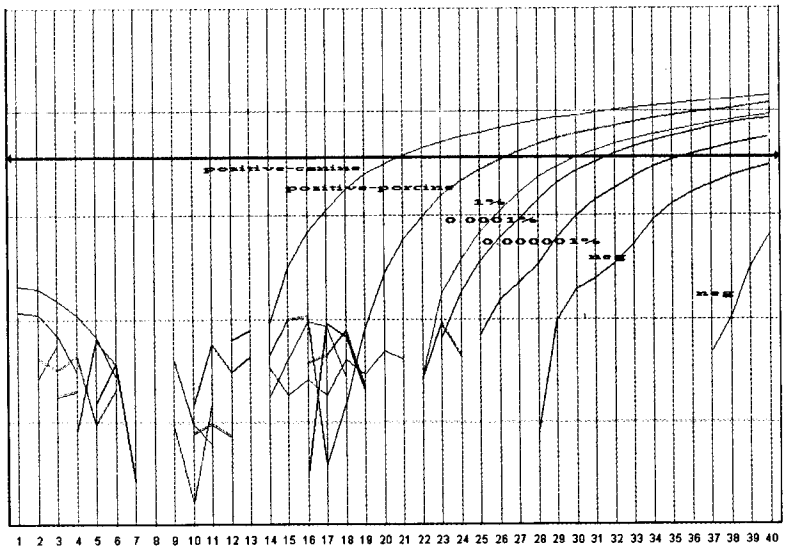
ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

- ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%
- ตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 120 °C เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%
- ดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง เช่น 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001%

3.1 **เปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง เช่น** 1 %, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% , 0.00000001% **มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่** สกัดดีเอ็นเอสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลอง

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ผ่านความร้อนระดับต่ำที่สุดที่ 0.00000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 3 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 2



รูปที่ 3 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตร์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

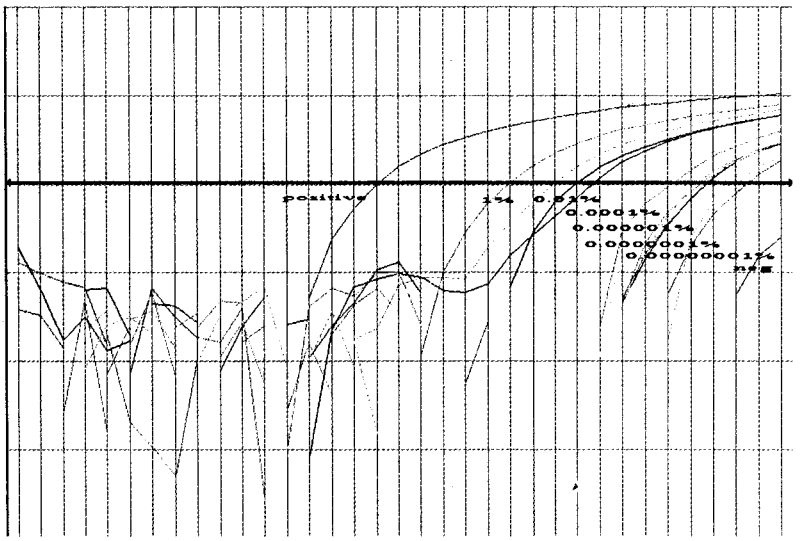
Sample name	Detector	Ct
Raw 1%	porcine	20.77
Raw 0.1%	porcine	24.8504
Raw 0.01%	porcine	28.124
Raw 0.0001%	porcine	29.3542
Raw 0.000001%	porcine	36.1941
Raw 0.00000001%	porcine	-

Detector	ค่า SD ของ Ct
1%	2.88
0.01%	3.09
0.0001%	0.4
0.000001%	1.8

ตารางที่ 3 แสดงค่า Ct และค่า SD รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกร แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.00000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 4 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 3



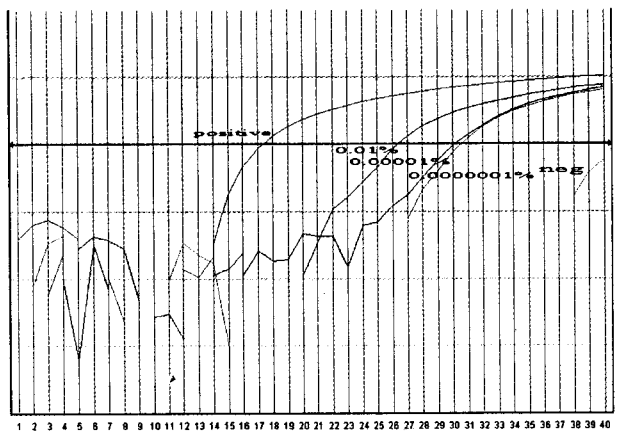
รูปที่ 4 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
Raw 1%	porcine	23.7736
Raw 0.1%	porcine	25.8409
Raw 0.01%	porcine	28.8409
Raw 0.0001%	porcine	30.8379
Raw 0.000001%	porcine	32.5368
Raw 0.00000001%	porcine	34.33451

ตารางที่ 4 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.0000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 5 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 5



รูปที่ 5 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
Raw 1%	porcine	23.7736
Raw 0.1%	porcine	25.8409
Raw 0.01%	porcine	28.2813
Raw 0.0001%	porcine	32.1188
Raw 0.000001%	porcine	32.3447
Raw 0.00000001%	porcine	-

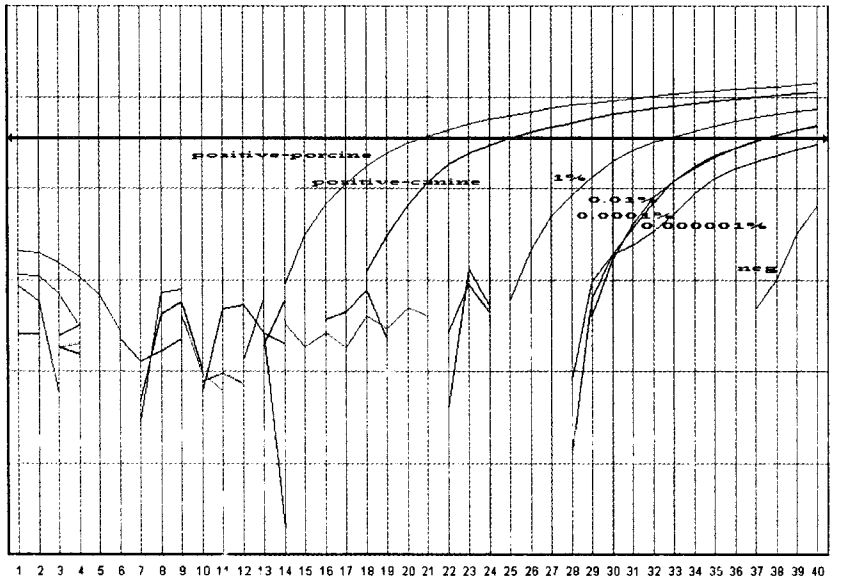
ตารางที่ 5 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

3.2 **เปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 °C เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น** 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001%

3.3 สกัดดีเอ็นเอสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลอง

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.0000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 7 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 6



รูปที่ 7 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 °C ในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

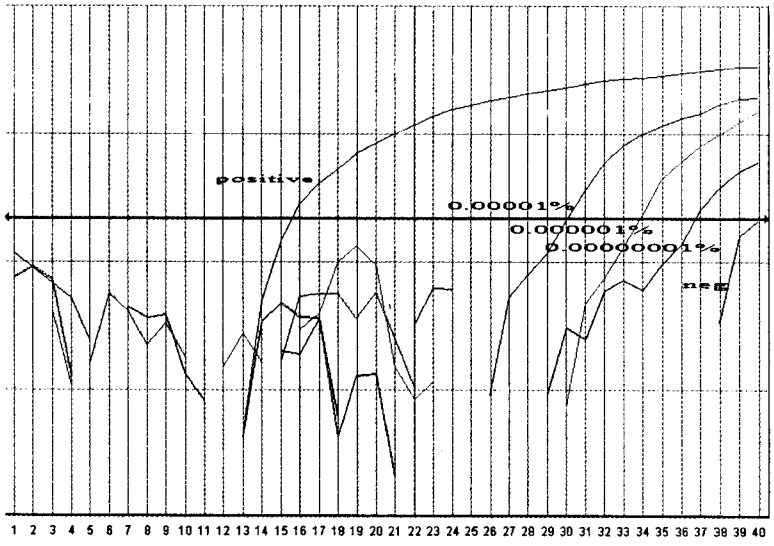
Sample name	Detector	Ct
121 °C 1%	porcine	25.0168
121 °C 0.1%	porcine	26.3043
121 °C 0.01%	porcine	32.8425
121 °C 0.0001%	porcine	37.4672
121 °C 0.000001%	porcine	37.5576
121 °C 0.00000001%	porcine	-

Detector	ค่า SD ของ Ct
1%	2.46
0.01%	0.49
0.0001%	0.98
0.000001%	0.98

ตารางที่ 6 แสดงค่า Ct และค่า SD ของ Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกร แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.00000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 4 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 3



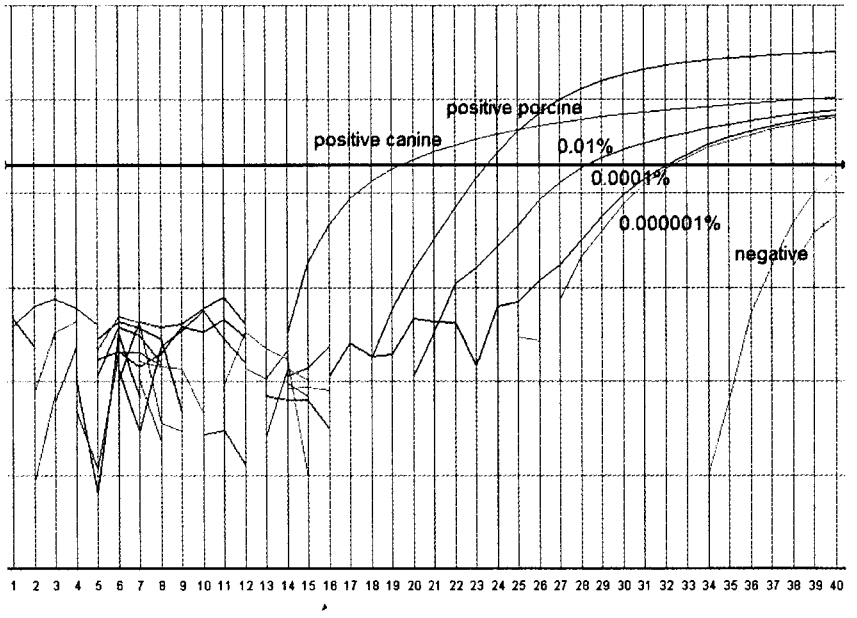
รูปที่ 4 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 °C ในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
121 °C 1%	porcine	23.7736
121 °C 0.1%	porcine	24.8408
121 °C 0.01%	porcine	25.8409
121 °C 0.0001%	porcine	30.8379
121 °C 0.000001%	porcine	32.5368
121 °C 0.00000001%	porcine	34.3451

ตารางที่ 2 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 °C ในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.00000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 9 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 7



รูปที่ 9 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
121 °C 1%	porcine	23.7736
121 °C 0.1%	porcine	24.8408
121 °C 0.01%	porcine	30.0807
121 °C 0.0001%	porcine	34.515
121 °C 0.000001%	porcine	35.6034
121 °C 0.00000001%	porcine	-

ตารางที่ 7 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุกรที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวก คือ เนื้อหมูสด, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

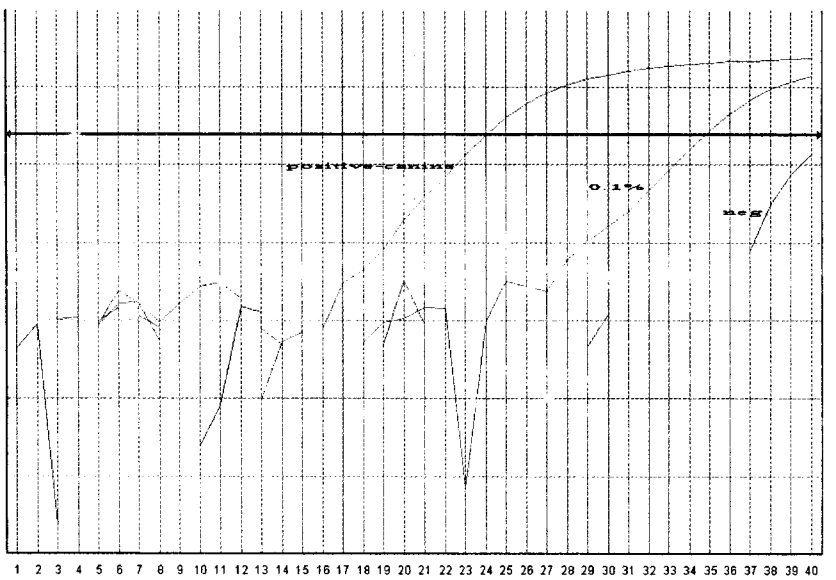
ผลที่ได้พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดที่ 2 ให้ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในสัตว์ชนิดอื่นได้ดีที่สุดที่ระดับต่ำเพียง 0.00000001% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 1และ 3ที่ตรวจสอบระดับต่ำเพียง 0.0000001% ซึ่งชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 1 มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอดีกว่า 10 เท่า

3.3 **เปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง เช่น** 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% **มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ ดีเอ็นเอสุนัขที่ไม่เจือจาง, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่**

สกัดดีเอ็นเอสัตว์ด้วยชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป โดยใช้ชุดสกัด DNA จำนวน 3 ชุดทดลอง

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 1 iNNuprep DNA Mini kit (Analytik gena, Konrad-Zuse-Strasse, Germany)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.1% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 10 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 8



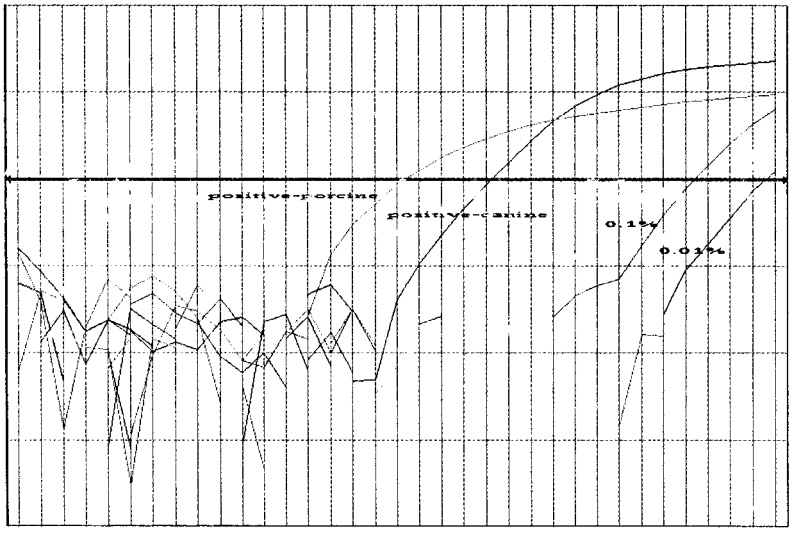
รูปที่ 10 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง เช่น 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
1%	canine	28.7736
0.1%	canine	34.7505
0.01%	canine	-
0.0001%	canine	-
0.000001%	canine	-
0.00000001%	canine	-

ตารางที่ 8 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างสุนัข แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 2 Miniprep DNA purification Kit

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.01% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 11 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 9



รูปที่ 4 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง เช่น 1%, 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

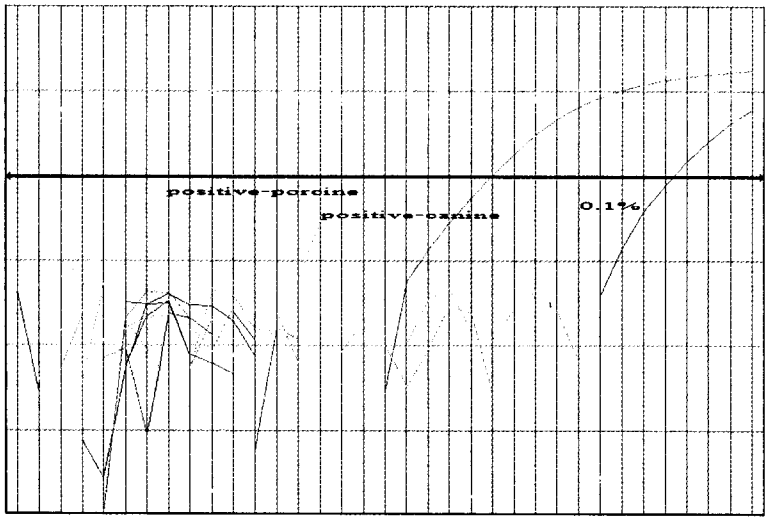
Sample name	Detector	Ct
1%	canine	28.7736
0.1%	canine	31.2857
0.01%	canine	34.4521
0.0001%	canine	-
0.000001%	canine	-
0.00000001%	canine	-

Detector	ค่า SD ของ Ct
0.1%	0.7
0.01%	1.6

ตารางที่ 9 แสดงค่า Ct และ SD ของ Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอสุนัขเจือจางที่ความเข้มข้นในอัตราส่วนต่าง 1%, 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือดีเอ็นเอสุนัขที่ไม่เจือจาง, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดที่ 3 Genomic DNA Extraction Kit (GenaidA, goura Hills, USA)

ปรากฏสัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถตรวจสอบระดับต่ำที่สุดที่ 0.00000001% แต่ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากไก่ ตามรูปที่ 12 และแสดงค่า Ct จำนวนรอบที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ตามตารางที่ 10



รูปที่ 10 แสดงภาพ Amplification Plot แสดงสัญญาณ Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือดีเอ็นเอสุนัขที่ไม่เจือจาง, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

Sample name	Detector	Ct
1%	canine	28.7736
0.1%	canine	31.206
0.01%	canine	-
0.0001%	canine	-
0.000001%	canine	-
0.00000001%	canine	-

Detector	ค่า SD ของ Ct
0.1%	0.5

ตารางที่ 10 แสดงค่า Ct รอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ได้ในตัวอย่างดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง 0.01 %, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ ดีเอ็นเอสุนัขที่ไม่เจือจาง, แต่ในตัวอย่างดีเอ็นเอไก่และวัวไม่สามารถตรวจสอบได้ (Undet)

ตารางที่ 3 สรุปการเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาการตรวจสอบ

1. การตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยใช้เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% โดยใช้ primer และ Probe สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอสุกร จากชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุด

ตัวอย่าง	ชุดสกัดที่ 1			ชุดสกัดที่ 2			ชุดสกัดที่ 3		
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.000001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00000001%	-	-	-	+	+	+	-	-	-

จากการทดลอง การเปรียบเทียบการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ primer และ probe สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอสุกร จากชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุด พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ให้ประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีที่สุด สามารถตรวจสอบระดับต่ำมากที่สุดที่ 0.00000001% ซึ่งมีความไวของปฏิกิริยาดีกว่าชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 1 และ 3 ถึง 10 เท่า

2. การตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสุกรอย่างที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสโดยใช้เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% โดยใช้ primer และ Probe สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอสุกร จากชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุด

ตัวอย่าง	ชุดสกัดที่ 1			ชุดสกัดที่ 2			ชุดสกัดที่ 3		
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0000001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.000001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00000001%	-	-	-	+	+	+	-	-	-

ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียสพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุดพบว่าชุดทดสอบดีเอ็เอชุดที่ 1และ 3 สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.0000001 % และชุดสกัดดีเอ็เนเอชุดที่ 2 สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.00000001% ซึ่งมีความไวของปฏิกิริยาดีกว่าชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 1 และ 3 ถึง 10 เท่า

4. การตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.1%, 0. 01%, 0.0001%, 0.000001%, และ 0.00000001% โดยใช้ primer และ Probe สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอสุนัข จากชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุด

ตัวอย่าง	ชุดสกัดที่ 1			ชุดสกัดที่ 2			ชุดสกัดที่ 3		
ดีเอ็นเอสุนัขเจือจางความเข้มข้น 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดีเอ็นเอสุนัขเจือจางความเข้มข้น 0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ดีเอ็นเอสุนัขเจือจางความเข้มข้น 0.0001%	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ดีเอ็นเอสุนัขเจือจางความเข้มข้น 0.00001%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ดีเอ็นเอสุนัขเจือจางความเข้มข้น 0.000001%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ 3 ชุดพบว่าชุดทดสอบดีเอ็เอชุดที่ 1และ 3 สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.1 % และชุดสกัดดีเอ็เนเอชุดที่ 2 สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.01% ซึ่งมีความไวของปฏิกิริยาดีกว่าชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 1 และ 3 ถึง 10 เท่า

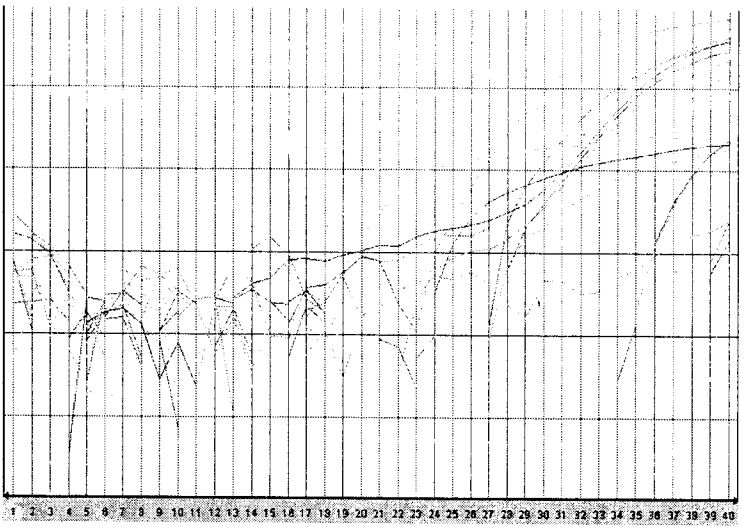
จากการศึกษาความไวของปฏิกริยา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับชนิดอื่นในอัตราส่วนต่างๆที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer และ Probe สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.00000001% จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อชนิดอื่นได้ดีกว่าเมื่อสกัดดีเอ็เอด้วยชุดสกัดที่ 1 และ 3 ซึ่งสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับเพียง 0.0000001% เท่านั้น ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 มีความไวกว่าชุดสกัดเอ็นเอที่ 1และ 3ถึง 10 เท่า เมื่อศึกษาความไวของปฏิกริยา

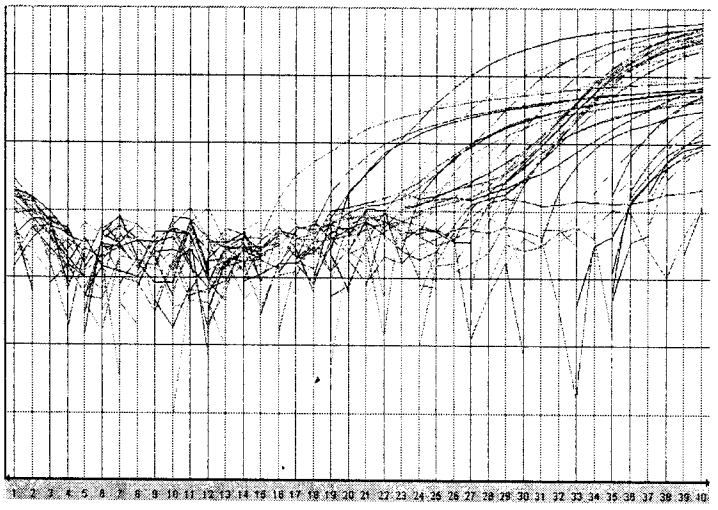
ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อชนิดอื่นที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าเมื่อสกัดดีเอ็เอด้วยชุดสกัดที่ 1 และ 3 ซึ่งสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับเพียง 0.0000001% เท่านั้น ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 มีความไวกว่าชุดสกัดเอ็นเอที่ 1และ 3 ถึง 10 เท่าซึ่งให้ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนได้เหมือนกันเนื้อสุกรที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง จากการศึกษาความไวของปฏิกริยา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างดีเอ็นเอสุนัขเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer และ Probe สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขในระดับต่ำเพียง 0.01% จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆได้ดีกว่าเมื่อสกัดดีเอ็เอด้วยชุดสกัดที่ 1 และ 3 ซึ่งสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขในระดับเพียง 0.1% เท่านั้น ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 มีความไวกว่าชุดสกัดเอ็นเอที่ 1และ 3 ถึง 10 เท่า

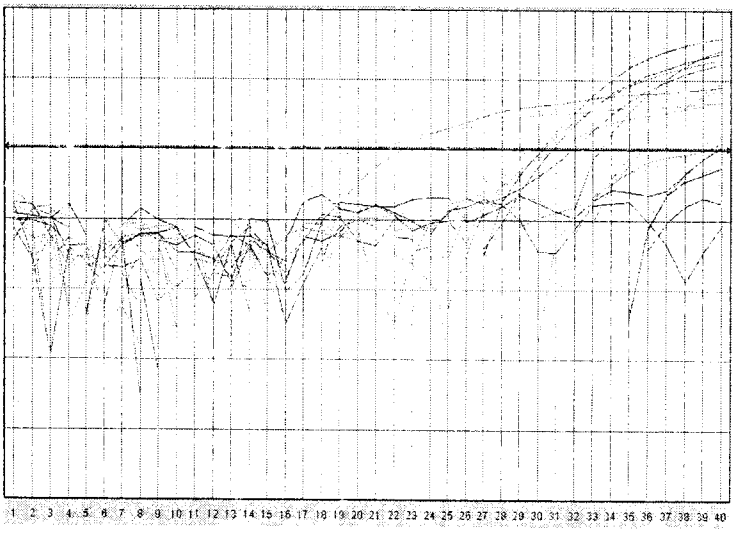
4. ตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและสุนัขในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลและวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต

4.1 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจสอบการสกัด DNA β-actin (Bellis, *et al.*,2003) พบว่าในตัวอย่างบางประเภท เช่น gelatin ที่ผสมในขนมเยลลี่ ไม่สามารถสกัดดีเอ็นได้ โดยจะให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจสอบด้วย primer β-actin แต่ในตัวอย่างอื่น สามารถสกัดดีเอ็นเอ โดยให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วย primer β-actin ได้ เช่น ในตัวอย่าง กุนเชียงปลา ไส้อั่ว ฯลฯ

4.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลโดยใช้ Primer และ Probe สำหรับตรวจสอบ DNA สุกรและสุนัขด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR พบในตัวอย่างที่เป็นขนมที่มีส่วนผสมของ Gelatin (มีเครื่องหมายฮาลาล) ให้ผลเป็นลบ แต่มีบางตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกสำหรับ primer และ probe สำหรับสุนัข พบว่ามี 1 ตัวอย่างให้ผลเป็นบวก


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Well	Sample Name	Detector	Ct	StdDev Ct	StdDev Qty	Task	Quantity	Mean Qty
H5	STD5	porcine	Undet.			Standard		
H5	STD5	canine	Undet.			Standard		
H4	STD4	porcine	Undet.			Standard		
H4	STD4	canine	Undet.			Standard		
H3	STD3	porcine	34.9366			Standard	1.0e-006	
H3	STD3	canine	Undet.			Standard		
H2	STD2	porcine	31.3475			Standard	1.0e-005	
H2	STD2	canine	Undet.			Standard		
H1	STD	porcine	23.4722			Standard	100	
H1	STD	canine	26.4666			Standard		
G12	positive	B-actin1	28.8374			Unknown		
F9	neg	B-actin1	31.1081			NTC		
H11	neg	porcine	Undet.			NTC		
H11	neg	canine	Undet.			NTC		
D11	Mini IBF	B-actin1	32.3855			Unknown		
H8	Mini IBF	porcine	Undet.			Unknown		
H8	Mini IBF	canine	Undet.			Unknown		
D10	Jadini Fish	B-actin1	30.2529			Unknown		
H7	Jadini Fish	porcine	Undet.			Unknown		
H7	Jadini Fish	canine	Undet.			Unknown		
D9	BUDO	B-actin1	27.1147			Unknown		
H6	BUDO	porcine	Undet.			Unknown		
H6	BUDO	canine	Undet.			Unknown		
G11	bird nest-ANGKASAA	B-actin1	31.8264			Unknown		
H10	bird nest-ANGKASAA	porcine	Undet.			Unknown		
H10	bird nest-ANGKASAA	canine	Undet.			Unknown		
D12	`SaiGrok IBF	B-actin1	32.1286			Unknown		
H9	`SaiGrok IBF	porcine	Undet.			Unknown		
H9	`SaiGrok IBF	canine	Undet.			Unknown		

Well	Sample Name	Detector	Ct	StdDev Ct	StdDev Qty	Task	Quantity	Mean Qty
C7	Band	canine	Undet.			Unknown		
E7	Band	B-actin1	Undet.			Unknown		
D2	Gummy Berry	porcine	33.8672			Unknown	4.91728e-007	
D2	Gummy Berry	canine	Undet.			Unknown		
F2	Gummy Berry	B-actin1	32.786			Unknown		
C11	Jele	porcine	Undet.			Unknown		
C11	Jele	canine	Undet.			Unknown		
E11	Jele	B-actin1	33.1695			Unknown		
C3	Jelly rainbow	porcine	Undet.			Unknown		
C3	Jelly rainbow	canine	Undet.			Unknown		
E3	Jelly rainbow	B-actin1	32.5247			Unknown		
C5	pork soup	porcine	25.6877			Unknown	0.0940995	
C5	pork soup	canine	Undet.			Unknown		
E5	pork soup	B-actin1	35.4878			Unknown		
C6	pork soup2	porcine	25.1383			Unknown	0.213002	
C6	pork soup2	canine	Undet.			Unknown		
E6	pork soup2	B-actin1	30.186			Unknown		
C12	Queen gelly	porcine	Undet.			Unknown		
C12	Queen gelly	canine	Undet.			Unknown		
E12	Queen gelly	B-actin1	31.8724			Unknown		
D1	sai ua	porcine	21.8624			Unknown	27.7821	
D1	sai ua	canine	Undet.			Unknown		
F1	sai ua	B-actin1	31.6187			Unknown		

C2	soup	porcine	29.6561			Unknown	2.57628e-004	
C2	soup	canine	Undet.			Unknown		
E2	soup	B-actin1	28.1863			Unknown		
C8	Soup staws	porcine	36.9871			Unknown	4.75394e-009	
C8	Soup staws	canine	Undet.			Unknown		
E8	Soup staws	B-actin1	31.6986			Unknown		
D3	STD1	porcine	21.2316			Standard	100	
D3	STD1	canine	24.3299			Standard		
D4	STD2	porcine	29.3696			Standard	1.0e-004	
D4	STD2	canine	Undet.			Standard		
D5	STD3	porcine	34.082			Standard	1.0e-006	
D5	STD3	canine	Undet.			Standard		
C1	Sweet gelly	porcine	Undet.			Unknown		
C1	Sweet gelly	canine	Undet.			Unknown		
E1	Sweet gelly	B-actin1	32.7022			Unknown		
C4	YoYo	porcine	30.5809			Unknown	6.51321e-005	
C4	YoYo	canine	Undet.			Unknown		
E4	YoYo	B-actin1	32.136			Unknown		
C10	Yupi	porcine	Undet.			Unknown		
C10	Yupi	canine	Undet.			Unknown		
E10	Yupi	B-actin1	31.7426			Unknown		

ตารางสรุปผลการตรวจสอบดีเอ็เอสุกรและสุนัขด้วยเทคนิค Real-time PCR ในตัวอย่างอาหารฮาลาล

ตัวอย่าง	β-actin	ตรวจสอบ Porcine	ตรวจสอบ Canine
1. ข้าวเกรียบปลาทอด Jadini	+	-	-
2. บูดูยีเซ็งสายบุรี	+	-	-
3.รังนกบรรจุขวด ANGKASAA	+	-	-
4.มินิคอกเทลไก่ IBF	+	-	-
5.ไส้กรอกไทยอีสานไก่ IBF	+	-	-
6.TOFU Shishamo Fish egg	+	-	-
7.Filament fish Stick	+	-	-
8.FLAVOURED Fish Ball	+	+	+
9.STUFFED SEAFOOD Roll	+	-	-
10.Fish finger	+	-	-
11.FRIED SEAFOOD TOFU CURD	+	-	-
12.Tofu sandwich	+	-	-
13.Salmal ball	+	-	-
14. รังนก(Band)	-	-	-
15.ไส้อั่ว	+	+	-
16.Gummy Berry	+	+	-
17.Sweet gelly	+	-	-
18.Jele	+	-	-
19.Yupi	+	-	-
20.Jelly rainbow	+	-	-
21.amino	+	-	-
22.ซุปก้อนหมู1	+	+	-
23.ซุปก้อนหมู 2	+	+	-
24.ซุปก้อนหมู 3	+	+	-
25.Queen Gelly	+	-	-
26.YoYo	+	+	-

ผลการทดลองจากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต โดยใช้ Primer และ Probeที่จำเพาะสำหรับการตรวจสอบ DNA สุกร/สุนัข ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าในตัวอย่างที่บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากเนื้อสุกรเช่น ไส้อั่วสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูได้ โดยสามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence ที่ปรากฏได้

สำหรับตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อย เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ primer และ probe สำหรับตรวจสอบสุกร/สุนัข พบว่าสามารถตรวจสอบได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ปรุงอาหารที่ได้จากเนื้อสุกร เนื่องจากสามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescence และค่า Ct ที่วัดสัญญาณได้

ในตัวอย่างที่เป็นขนม ที่มีส่วนผสมของ Gelatin ที่มีเครื่องหมายฮาลาล เมื่อใช้ primer β-Actin ซึ่งเป็นบวก และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร/สุนัข โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอสุกร/สุนัขเท่านั้น พบว่าให้ผลเป็นบวกใน primer สำหรับตรวจสอบสุกร เช่นในตัวอย่างขนม YoYo Gummy Berry เนื่องจากในตัวอย่างดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรหรือมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร แต่ให้ผลเป็นลบสำหรับ primer ที่ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุนัข

ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากเนื้อปลาเมื่อใช้ primer β-Actin ซึ่งเป็นบวก และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร/สุนัข โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอสุกร/สุนัขเท่านั้น พบว่าให้ผลเป็นบวกใน primer สำหรับตรวจสอบสุกร เนื่องจากในตัวอย่างดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรหรือมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร และให้ผลเป็นบวกเหมือนกันสำหรับ primer ที่ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุนัขซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากสุนัขด้วย

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการตรวจสอบความเหมาะสมของ primer และ probe ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุกรโดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA หมู ในส่วน repetitive element ให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อสุกรเท่านั้น ทั้งในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แต่ในเนื้อวัวและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo และคณะ ซึ่งได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรในเนื้อสัตว์โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ DNA ในสุกร ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีหลายชนิดได้แก่ แกะ, ไก่, แพะ, คน, หมูและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

สำหรับ primer และ probe ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุนัขโดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ DNA ของสุนัขให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อสุนัขเท่านั้น แต่ในเนื้อวัว เนื้อหมูและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohd และคณะที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขที่ไม่ได้ผ่านความร้อนได้

การเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นจำนวน 3 ชุดโดยสกัด DNA จากเนื้อสุกรที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนตามอัตราส่วนคือ 100 %, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001% และ 0.00000001% พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 1 และ 3 มีความไวของปฏิกริยาเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.0000001% แต่สำหรับชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ให้ประสิทธิภาพการสกัดได้ดีกว่าโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.00000001% เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohd และคณะที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรโดยใช้เทคนิค Real-tim PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรได้ระดับต่ำเพียง 0.0001 นาโนกรัมได้

การตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรที่ไม่ได้ผ่านความร้อน Miguel และคณะได้ตรวจสอบเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวโดยความไวที่สามารถตรวจสอบได้ปริมาณที่น้อยที่สุดที่ 0.5% เมื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ตามอัตราส่วนดังนี้ 100 %, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001%, 0.0000001%และ0.00000001% สกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจำนวน 3 พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 1 และ 3 มีความไวของปฏิกริยาเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.0000001% แต่สำหรับชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ให้ประสิทธิภาพการสกัดได้ดีกว่าโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.00000001% เท่านั้น ซึ่งมีความไวกว่าถึง 10 เท่า จากงานวิจัยของ Ali Arslan และคณะได้ตรวจสอบชนิดสัตว์โดยตัวอย่างที่ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบลดลงเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจาก DNA มีการขาดออกจากกัน แต่สำหรับ Primer และ probe ที่

ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ขนาดเล็กจะสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรที่ผ่านความร้อนสูงได้ประสิทธิภาพเหมือนกับเนื้อสุกรที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

เปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขตามอัตราส่วนดังนี้ 100 %, 10%,1%, 0.1%, 0.01%, โดยสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจำนวน 3 ชุด พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 1 และ 3 มีความไวของปฏิกริยาเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.1% แต่ชุดสกัดดีเอ็นเอชุดที่ 2 สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.01%

ซึ่งจากผลการทดสอบที่ได้พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุกรและสุนัขซึ่งมีความไวมากกว่าชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 1และ 3 ถึง10 เท่า เนื่องจากชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ใช้ปริมาณตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอน้อย

จึงเลือกใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่ 2 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร/สุนัขในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล

ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารและตรวจสอบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น เจลาติน collagen และไขมันสัตว์ ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหาร ผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้ primer และ probe สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอสุกรในตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบ เช่น ไส้อั่ว หรือในตัวอย่างบางชนิดที่ไม่ได้บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเนื้อสุกร และไม่มีเครื่องหมายฮาลาลแต่มีการปนเปื้อนเนื้อสุกร เช่น ลูกชิ้นปลา ซึ่งผลการวิจัยที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo ที่ตรวจสอบเนื้อหมู ไส้กรอก รวมทั้งไขมันหมู ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Rene Koppel และคณะ พบว่าการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงโดยใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR สามารถตรวจสอบปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.1%

สำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปบางชนิด ตรวจพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุนัขโดยเทคนิค Multiplex Real-time PCR เช่นตัวอย่างลูกชิ้นปลา เมื่อใช้ Primer และ Probe ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอของสุนัข สามารถตรวจวัดสัญญาณ fluorescence ได้

ในตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อย และมีผสมสารอื่นๆลงในผลิตภัณฑ์ เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร หรือเจลาตินจากเนื้อหมูที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ primer และ probe สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต พบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ในตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อยและต้องผ่านขบวนการผลิตอื่นๆ เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร เจลาตินจากเนื้อสุกรที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว หรือตัวอย่างที่เป็นขนมที่ผสมเจลาตินพบว่าสามารถตรวจสอบได้หรือให้ผลเป็นบวกในตัวอย่างนั้นๆ โดยสามารถตรวจวัดสัญญาณ Fluorescenceในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกได้

ซึ่งวิธิการตรวจสอบการปนเปื้อนเจลาตินในวิธีการทางเคมีสามารถบอกได้เพียงว่าในส่วนผสมมีเจลาตินผสมอยู่หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ผลิตจากสัตว์ชนิดใด เนื่องจากว่าในปัจจุบันเจลาตินสามาถผลิตจากสัตว์หลายชนิด แต่เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบและบอกได้ว่าส่วนผสมที่ได้มีดีเอ็นเอสุกรปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็วและถูกต้อง

ข้อเสนอแนะ

เทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ รวดเร็ว และแม่นยำในการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยต้องเลือกใช้ primer ที่จำเพาะและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสภาวะ ที่เหมาะสมในการตรวจสอบได้ สามารถตรวจสอบได้ในระดับต่ำและตรวจสอบตัวอย่างที่ยากต่อการตรวจสอบได้ เช่น เจลาตินที่ผสมในผลิตภัณฑ์อาหารและซุปก้อน เนื่องจากว่าวิธีการตรวจสอบทางด้านอื่นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตอะไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารที่ปนเปื้อนเนื้อสุกรและสุนัขในปริมาณน้อย เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ยาและเครื่องสำอาง ซึ่งปัจจุบันมีความสงสัยถึงส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตเพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

รายงานความก้าวหน้าการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล โดยคณะกรรมการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, พฤษภาคม 2548

นลินี โหมาศวิน. (2548). อาหารฮาลาลทางเลือกในการส่งออกอาหาร (ตอนที่ 1). ผู้ส่งออก 421; 47-54.

Calvo JH, Zaragoza P, Osta R. In processed food amplification of a new specific DNA fragment. J Anim Sci 2001; 79: 2108-2112.

Jerilyn ,A W., David, A H., Bridget A A., Jaiprakash S., Sudhir K S., and Mark, A B., 2003. Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. Anal. Biochem. 316: 259-269.

King NL, Kruth L. Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. J Food Sci 1982; 47(5): 1608-1612.

Laube IS, Butschke A, Zagon J, Schauzu M, Kroh L, Broll H. Method for detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. International Journal of Food Science and Technology 2003; 38: 111-118.

Lahiff S, Glennon M, O'Brien L, Lyng J, Smith T, Maher M, Shilton N. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM). Mol Cell Probes 2001; 15(1): 27-35.

Miguel AR, Teeresa G, Isabel G, Pablo EH, Rosario M. TagMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. Meat Science 2005; 70: 113-120.

Maharat C, Intaraphad U, and Jantarasamee P. Development of pork DNA detection in meat product by PCR technique. Songklanakarin J Sci Technol 2005; 27(5): 993-1002.

Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Shibata K, Yamada T, Shinmura Y. A quick and simple method for the identification of meat speciesand meat products by PCR assay. Meat Sci 1998; 51: 143-148.

Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncaies P, Lopez-Perez MJ, Perez-Martos A. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat

in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. J Agric Food Chem 2000; 48(7): 2829-2832.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Muyllis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239(4839): 487-491.

Ursing BM, Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). J Mol Evol 1998; 47(3): 302-306.

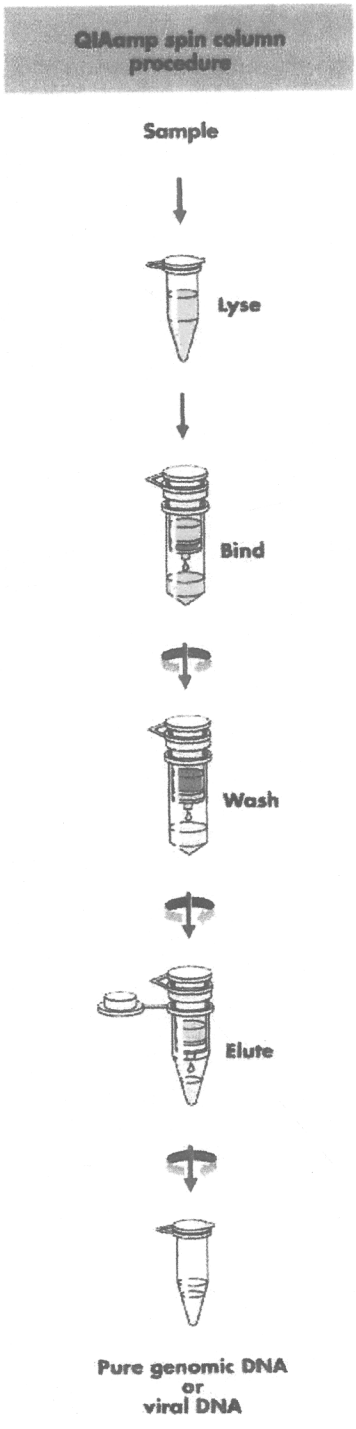
Rene K, Jug R, Franziska Z. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. Eur Food Res Technol 2008; 227: 1199-1203.

Zhang CL, Mark RF, Nigel WS, Graham L, Adrian S. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milk and cheeses. J Food Control 2007; 18: 1149-1158.

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp spin column)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่ง 25 มิลลิกรัมละลายด้วยบัฟเฟอร์ AL 180 ไมโครลิตรและProteinase K 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

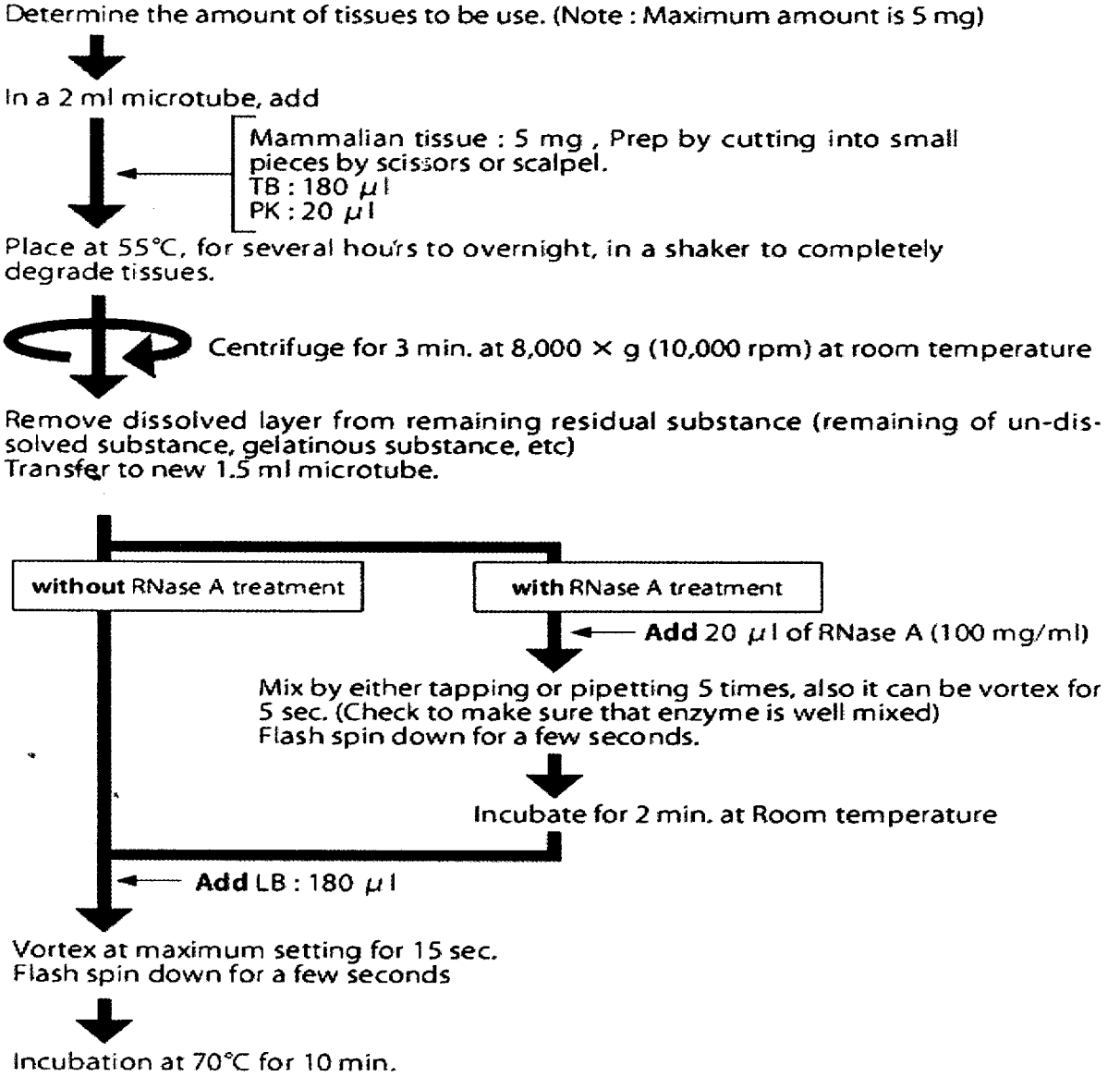
ดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์แล้วล้างดีเอ็นอด้วยบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นชะดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ AE 200 ไมโครลิตร ดังรูปที่แสดง



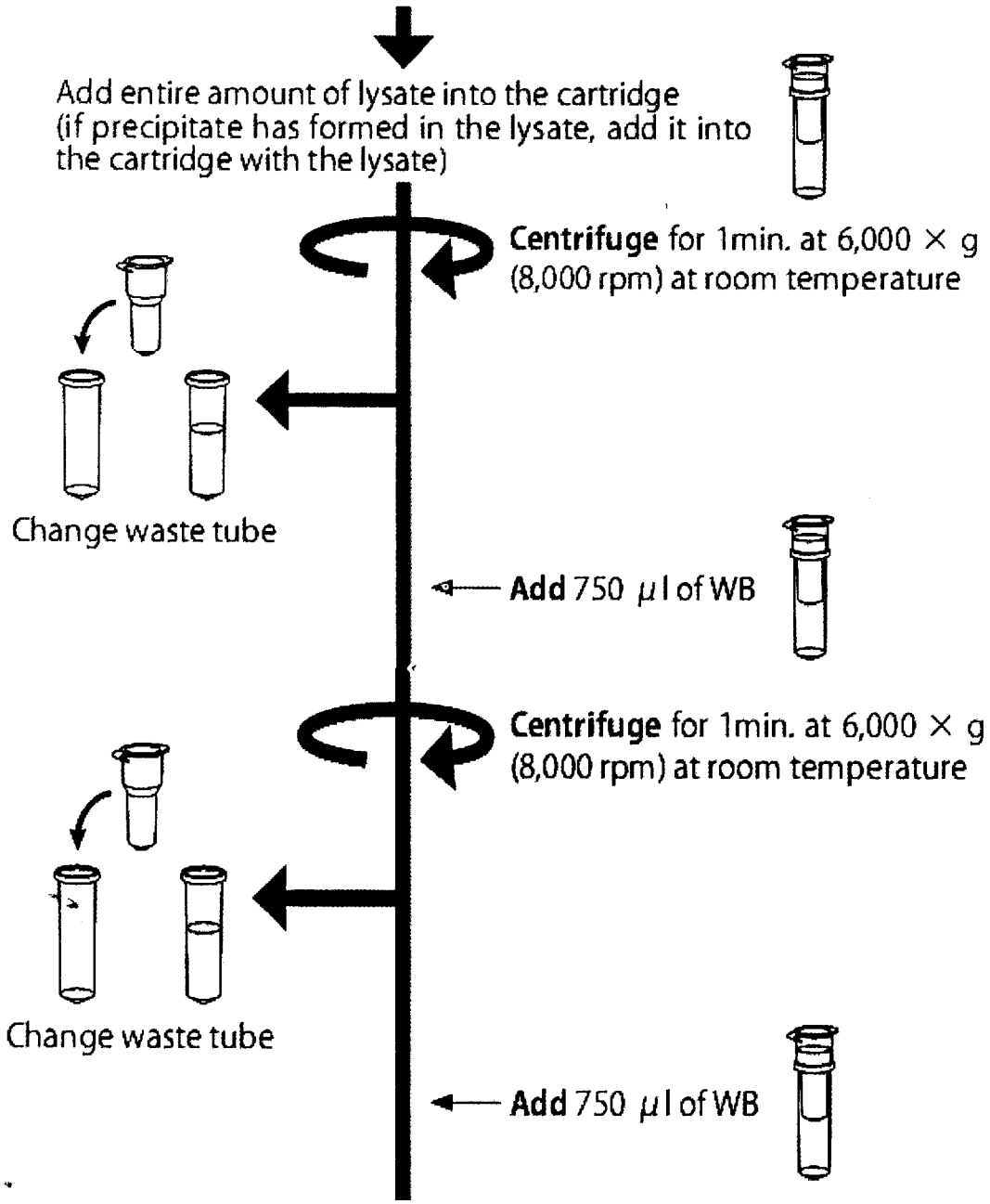
ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (TAKARA spin column)

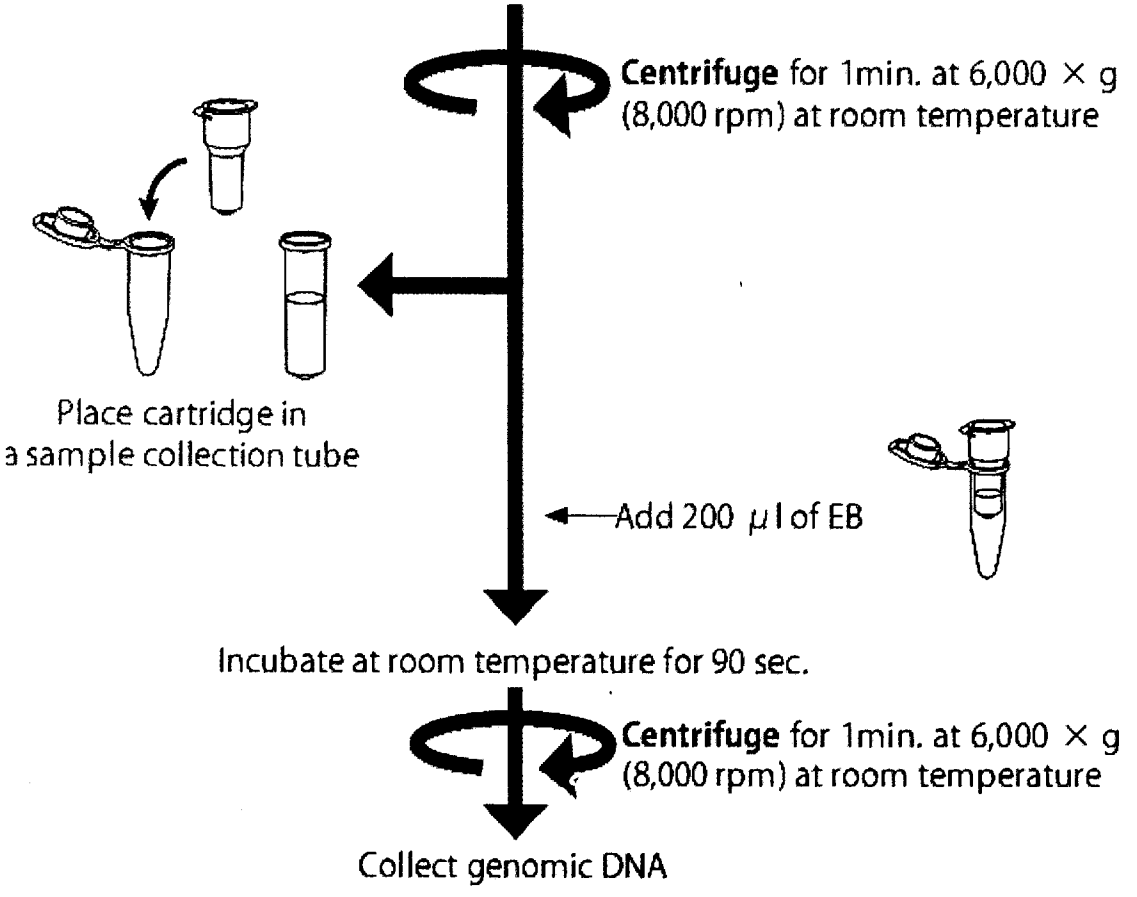
1. ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่ง 5 มิลลิกรัมละลายด้วยบัฟเฟอร์ TB 180 ไมโครลิตรและProteinase K 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ละลายด้วยบัฟเฟอร์ LB 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C จนตัวอย่างละลายสมบูรณ์
2. ดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์แล้วล้างดีเอ็นอด้วยบัฟเฟอร์ Wash 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นชะดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ AE 200 ไมโครลิตร ดังรูปที่แสดง

DNA Extraction TAKARA



/

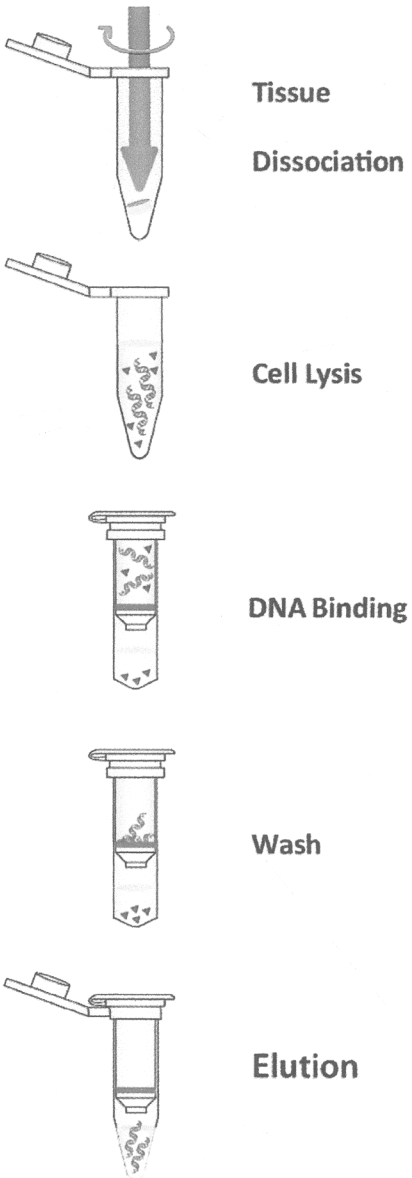

Add entire amount of lysate into the cartridge
(if precipitate has formed in the lysate, add it into the cartridge with the lysate)
Centrifuge for 1min. at 6,000 × g (8,000 rpm) at room temperature
Change waste tube
Add 750 µl of WB
Centrifuge for 1min. at 6,000 × g (8,000 rpm) at room temperature
Change waste tube
Add 750 µl of WB


Centrifuge for 1min. at 6,000 × g
(8,000 rpm) at room temperature
Place cartridge in
a sample collection tube
Add 200 μl of EB
Incubate at room temperature for 90 sec.
Centrifuge for 1min. at 6,000 × g
(8,000 rpm) at room temperature
Collect genomic DNA

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid spin column)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่ง 30 มิลลิกรัมละลายด้วยบัฟเฟอร์ GB 180 ไมโครลิตรและ Proteinase K 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ละลายด้วยบัฟเฟอร์ GTB 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C จนตัวอย่างละลายสมบูรณ์

ดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์แล้วล้างดีเอ็นอด้วยบัฟเฟอร์ Wash 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นชะดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ AE 200 ไมโครลิตร ดังรูปที่แสดง



ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัด

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA)

เครื่อง microplate reader, PowerWaveX

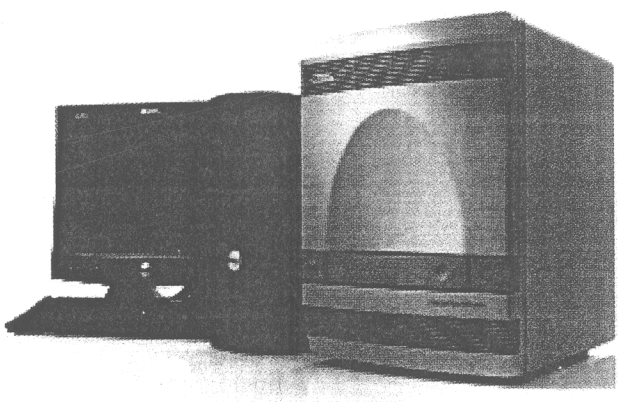
วัดปริมาณสารที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280) ระหว่าง 1.5-1.8 และปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ขั้นตอนตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเครื่อง Real-time PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลองดังนี้

สารเคมี	ปริมาณ
primer Pig pre-F,R	200 nM
primer Canine-F,R	200 nM
TaqMan Master Mix PCR	10
Probe Pig ,Canine	200 nM
DNA	50-100 ng
ปริมาณทั้งหมด	25 ul

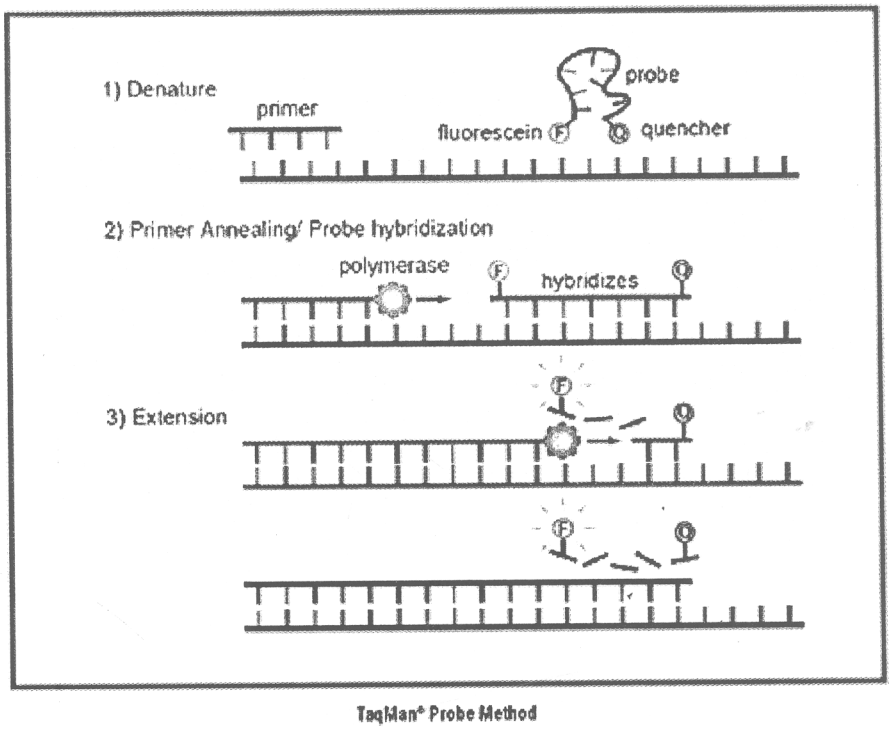
หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง Real-time PCR



ตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้

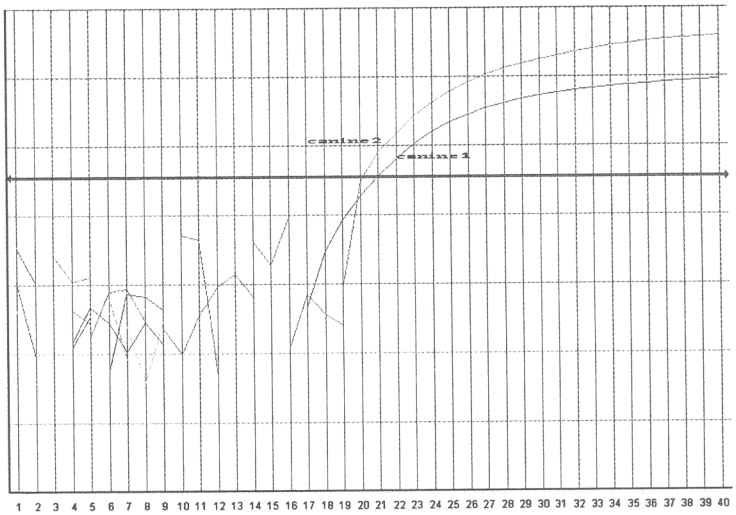
อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวน รอบ
50	2	1
95	10	1
95	0.15	40
60	60	

แสดงปฏิกิริยา Real-time PCR

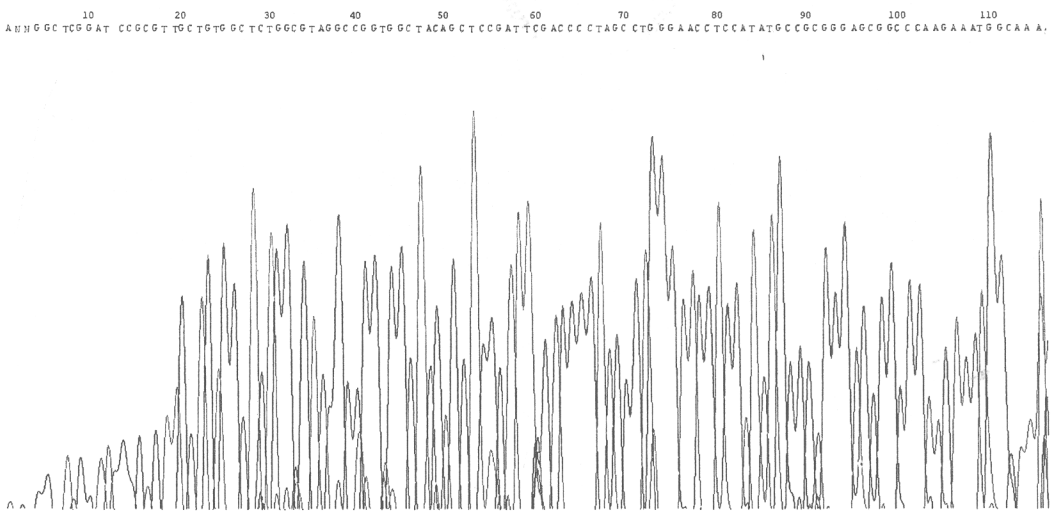


TaqMan® Probe Method

โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ที่กราฟผล amplification plot



แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสุกรที่ได้ โดยใช้ Primer PrepigF, pig R



GGCTCGGATCCGCGTTGCTGTGGCTCTGGCGTAGGCCGGTGGCTACAGCTCCGATTCGACCCCTAGCCT

GGGAACCTCCATATGCCGCGGGAGCGGCCCAAGAAATGGCAAAAAAAGACNAANNNNNNNNNNNNNNN