การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์

Application of Multiplex-Direct PCR Technique for Meat Species Identification

จิราภา เดชนัครินทร์

Jirapa Dechnakarin

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์

Application of Multiplex-Direct PCR Technique for Meat Species Identification

จิราภา เดชนัครินทร์

Jirapa Dechnakarin

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ (Application of Multiplex-direct PCR Technique for Meat Species Identification)
ผู้เขียน นางสาวจิราภา เดชนัครินทร์
สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(พ.ต.ต.หญิง ดร. แสนสุข บุญสืบ)

.....กรรมการ
(ดร. เครือวัลย์ ยุนรัมย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(นางสาวจิราภา เดชนัครินทร์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวจิราภา เดชนัครินทร์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์
ผู้เขียน นางสาวจิราภา เดชนัครินทร์
สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

การปลอมปนและปลอมแปลงเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยการปิดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริงเป็นปัญหาที่พบบ่อยในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและผิดต่อบทบัญญัติทางศาสนาอีกด้วย นิติวิทยาศาสตร์จึงเป็นเครื่องมือที่มีบทบาทสำคัญในการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารเพื่อคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภค ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาและทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์เพื่อการตรวจระบุชนิดของสัตว์ที่นิยมบริโภคในภูมิภาคเอเชียจำนวน 5 ชนิดพร้อมๆกัน ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) แพะ (*Capra hircus*) ควาย (*Bubalus bubalis*) และแกะ (*Ovis aries*) ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนไซโตโครมออกซิเดส หน่วยย่อยที่ 1 ของสัตว์เป้าหมายโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สามารถตรวจระบุชนิดเนื้อสัตว์ได้สำเร็จโดยให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 230 283 363 396 และ 477 คู่เบส สำหรับ สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ ตามลำดับ ผลการทวนสอบพบว่าชุดทดสอบมีความแม่นยำ 100% โดยสามารถตรวจระบุเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ถูกต้องถึงแม้ตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายเหล่านั้นจะมาจากแหล่งที่มาต่างกัน อีกทั้งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อสัตว์เป้าหมายอีกด้วย ผลการทดสอบความไวแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูง สามารถตรวจพบเนื้อสัตว์เป้าหมายได้แม้มีดีเอ็นเอเพียง 6,250 mitochondrial copies หรือประมาณ 1 เซลล์เนื้อเยื่อเท่านั้น นอกจากนี้ยังได้ทวนสอบการใช้งานชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในตรวจสอบตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆ ในท้องตลาดจำนวน 62 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าสามารถตรวจพบเนื้อสัตว์เป้าหมายในอาหารได้สูงถึง 83.9 % แม้ว่าอาหารจะผ่านกระบวนการปรุงสุกด้วยความร้อนมาแล้ว ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจึงนับได้ว่ามีความรวดเร็วและความน่าเชื่อถือ อีกทั้งยังมีประโยชน์อย่างมาก ในการบังคับใช้กฎหมายเพื่อคุ้มครองสิทธิผู้บริโภค

Thesis Application of Multiplex-direct PCR Technique for Meat Species Identification

Author Miss Jirapa Dechnakarin

Major Program Forensic Science

Academic Year 2015

Abstract

Fraudulent ingredients and mislabeling are the issues often encountered in food manufacturer. Substitution of unlisted ingredients causes the serious problems to the consumer both affect health and breach the religious laws. To protect consumer rights, forensic science thus plays an important role as a tool for identification the questioned samples. This study aimed to develop and validate the technique called “multiplex-direct PCR” to simultaneously identify five meat species widely consumed in Asia; dog (*Canis lupus familiaris*), buffalo (*Bubalus bubalis*), sheep (*Ovis aries*), duck (*Anas platyrhynchos*), goat (*Capra hircus*). The assay can be performed without prior DNA extraction process and employed cytochrome oxidase I (COI) gene-specific primers to amplify target DNA. The results indicated this assay was successfully developed, providing the expected size of DNA fragments of 230, 283, 363, 396, and 477 bp for dog, duck, goat, buffalo and sheep, respectively. Fully validation found the assay was 100% accuracy, correctly identify the target species from different sources. The assay also has been proven to be specific to target species and can clearly distinguish between target and non-target species. The limit of detection was as low as 6,250 mitochondrial DNA copies indicating high sensitivity of assay. Moreover, the technique was implemented on several types of food and found it was successfully detected meat species in processed food. Therefore, the developed assay is rapid, reliable, and useful for detection of the meat target species in meat product to provide the food safety standard and enforcing the laws for protection of consumer rights.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติกา กิจพิพิธ และ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภูวดล ธนะเกียรติไกร ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา ตรวจทานแก้ไข และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณพันตำรวจตรีหญิง ดร.แสนสุข บุญสืบ ที่กรุณามาเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.เครือวัลย์ ยุนรัมย์ ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์อีกทั้งยังสละเวลาตรวจทานเล่มวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ด้วย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำหรับทุนสนับสนุนการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับการศึกษาและการทำวิจัย

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนเพื่อนๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ทุกคน ที่ คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนด้วยดีเสมอมา

จิราภา เดชนัครินทร์

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....		(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....		(6)
กิตติกรรมประกาศ.....		(7)
สารบัญ.....		(8)
รายการตาราง.....		(10)
รายการภาพประกอบ.....		(11)
1	**บทนำ**	**1**
	1.1 บทนำต้นเรื่อง.....	1
	1.2 การตรวจเอกสาร.....	4
	1.3 วัตถุประสงค์.....	35
2	**วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ**	**36**
	2.1 วิธีดำเนินการ.....	36
	2.2 วัสดุและอุปกรณ์.....	54
3	**ผลการศึกษา**	**57**
	3.1 การทดสอบไพรเมอร์และหาอุณหภูมิ annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมโดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradiant PCR).....	57
	3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ (Primer-singleplex specificity test).....	63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ (Optimization of multiplex-direct PCR)..... 69

3.4 ผลการทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น (Assay validation)..... 84

4 อภิปรายผลการศึกษา..... 95

4.1 การทดสอบไพรเมอร์..... 95

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบ..... 96

4.3 การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์..... 98

5 **สรุปผลการทดลอง** **102**

บรรณานุกรม..... 104

ภาคผนวก..... 116

ก ผลงานวิจัยที่นำเสนอแบบบรรยายในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 117

ประวัติผู้เขียน..... 123

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่พบจากวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์…….…… 31

2. ชื่อวิทยาศาสตร์ ชนิด จำนวน และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง…… 36

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ ยีน และ Accession number ของตัวอย่างสัตว์ที่ นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์……. 38

4. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์…….. 42

5. องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์…… 43

6. สภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์…… 44

7. องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์…… 46

8. ชื่อวิทยาศาสตร์ จำนวน และแหล่งที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ หาความจำเพาะเจาะจง…… 47

9. ประเภท จำนวน และแหล่งที่เก็บตัวอย่างที่นำมาใช้สำหรับทดสอบการทำซ้ำ……. 48

10. ชนิดและแหล่งที่เก็บตัวอย่างอาหารที่มีส่วนผสมของสัตว์เป้าหมาย…….. 51

11. ชื่อไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ยีน ขนาด และอุณหภูมิที่จำเพาะ เจาะจงกับไพรเมอร์ของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด……..... 57

12. สรุปผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์…….. 63

13. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์คู่ใหม่ที่จำเพาะเจาะจงกับสุนัข เป็ด แพะและแกะ…….. 73

14. ผลการทดสอบความไวของชุดทดสอบปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์…… 91

15. ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารด้วยชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์…… 93

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่ **หน้า**

1. มูลค่าการส่งเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ปี 2546-2556..... 4

2. การจำหน่ายเนื้อสุนัขอย่างเปิดเผยในประเทศเวียดนาม..... 6

3. มูลค่าการนำเข้า-ส่งออกเป็ดและผลิตภัณฑ์ ปี 2548-2557..... 8

4. ลักษณะการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทย..... 9

5. มูลค่าการนำเข้า-ส่งออกแพะและผลิตภัณฑ์ ปี 2557..... 11

6. สายพันธุ์แพะที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย..... 11

7. มูลค่าการนำเข้า-ส่งออกควายและผลิตภัณฑ์ ปี 2557..... 13

8. สายพันธุ์ควายที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย..... 13

9. มูลค่าการนำเข้า-ส่งออกแกะและผลิตภัณฑ์ ปี 2557..... 15

10. แกะพันธุ์กลันตันที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย..... 15

11. โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ..... 19

12. ตำแหน่งของยีนบนไมโทคอนเดรียลจีโนม..... 20

13. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส..... 26

14. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายต่างชนิดกันโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์..... 28

15. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาไดเร็คพีซีอาร์..... 29

16. ขั้นตอนต่าง ๆในการออกแบบไพรเมอร์..... 40

17. ผลการทดสอบไพรเมอร์แพะ..... 58

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

18. ผลการทดสอบไพรเมอร์เป็ด…… 59

19. ผลการทดสอบไพรเมอร์สุนัข…… 60

20. ผลการทดสอบไพรเมอร์ควาย…… 61

21. ผลการทดสอบไพรเมอร์แกะ…….. 62

22. ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะ…… 64

23. ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ด…… 65

24. ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัข…… 66

25. ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ควาย…….. 67

26. ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะ……. 68

27. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา มัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 1…….. 70

28. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา มัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2…….. 70

29. 2% Low Electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3…….. 72

30. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขด้วย วิธีเกรเดียนพีซีอาร์…… 74

31. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดด้วย วิธีเกรเดียนพีซีอาร์…… 75

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

32. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพะด้วย วิธีเกรเดียนพีซีอาร์..... 75

33. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแกะด้วย วิธีเกรเดียนพีซีอาร์..... 76

34. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัขด้วย วิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์..... 77

35. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ดด้วย วิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์..... 78

36. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะด้วย วิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์..... 79

37. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะด้วย วิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์..... 80

38. 2% Low Electroendosmosis agarose gel แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4..... 81

39. 2% Low Electroendosmosis agarose gel แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่5..... 82

40. 2% Low Electronedosmosis agarose gel แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6..... 83

41. 2% Low Electroendosmosis agarose gel แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์กับเป้าหมาย..... 85

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

42. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของสุนัข…….. 86

43. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของเป็ด…….. 87

44. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของแพะ…….. 87

45. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของควาย…… 88

46. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของแกะ…….. 88

47. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการความไวจากตัวอย่างแพะ (A) ควาย (B) และแกะ (C)…….. 89

48. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการความไวจากตัวอย่างสุนัข…… 90

49. 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการความไวจากตัวอย่างเป็ด…….. 90

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมรับประทานเนื้อสัตว์ ทำให้อุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อสัตว์เติบโตอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันมีการวางจำหน่ายเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปหลากหลายรูปแบบตามท้องตลาด เช่น เนื้อสัตว์สด เนื้อสัตว์แช่แข็ง เนื้อสัตว์แห้งหรือผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ต่างๆ ซึ่งสะดวกต่อการเลือกซื้อของผู้บริโภค เนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภค ได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อจระเข้และเนื้อนกกระจอกเทศ แต่อย่างไรก็ตามในบางประเทศโดยเฉพาะประเทศในกลุ่มอาเซียนรวมถึงประเทศไทยยังมีความนิยมในการบริโภคเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น เนื้อควาย เนื้อแพะ เนื้อสุนัข อีกด้วย เนื้อสัตว์เศรษฐกิจบางชนิดมีราคาสูง ทำให้มีผู้ผลิตบางรายต้องการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลกำไรในธุรกิจ โดยการปลอมปนหรือผสมเนื้อสัตว์ต่างชนิด (Woolfe and Primrose 2004) ทำให้พบรายงานการปลอมแปลงเนื้อสัตว์ ติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริง หรือผิดบทบัญญัติของศาสนา เป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น กรณีพบการปนเปื้อนเนื้อหมูในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเครื่องหมายฮาลาล (Bonne and Verbeke 2008) กรณีการปลอมแปลงเนื้อแกะด้วยเนื้อหนู เนื้อสุนัขจิ้งจอกและเนื้อมิงค์ที่ประเทศจีน (Dai and Jiang 2013, Rasul 2014) หรือกรณีการตรวจพบเนื้อม้าปลอมปนในอาหารที่ทำจากเนื้อวัวจากหลายประเทศในทวีปยุโรป (O'Mahony 2013) จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นส่งผลเสียต่อประเทศทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ด้านศาสนา และทำลายความเชื่อมั่นของผู้บริโภคเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภคไม่ให้ถูกเอารัดเอาเปรียบจากกรณีดังกล่าว กระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์จึงเข้ามามีบทบาทในการตรวจพิสูจน์ระบุชนิดของเนื้อสัตว์จากตัวอย่างอาหารต้องสงสัยเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการดำเนินคดีทางกฎหมายและเพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมายที่เกี่ยวข้อง เช่น พระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ. 2522 ประมวลกฎหมายอาญา มาตรา 236 มาตรา 237 และมาตรา 271 การปลอมปน การขายของโดยหลอกลวง กฎกระทรวงว่าด้วยการกำหนดคดีพิเศษเพิ่มเติมตามกฎหมายว่าด้วยการสอบสวนคดีพิเศษ (ฉบับที่2) พ.ศ. 2555 กระทรวงยุติธรรมออกกฎกระทรวงเพิ่มคดีพิเศษในความผิดตามกฎหมายว่าด้วยอาหาร สถานการณ์ในการปลอมปนของผลิตภัณฑ์อาหารทั้งในและต่างประเทศ เป็นต้น (บังอร 2557)

เมื่อความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์มีความเจริญก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้มีผู้ศึกษาและคิดค้นวิธีการตรวจสอบองค์ประกอบและการระบุชนิดของเนื้อสัตว์หลากหลายวิธี เช่น การศึกษาทางด้านกายภาพของเนื้อสัตว์โดยการวิเคราะห์โครงสร้างและสีของเนื้อ (Basset *et al.* 2000) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อุปกรณ์ในการตรวจสอบน้อยและไม่ยุ่งยาก แต่จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญของผู้วิจัยในการวิเคราะห์เนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ จากนั้นได้มีการนำเทคนิคทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunoassay) (García *et al.* 1994) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (Substrate) และเทคนิคไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิง (Isoelectric focusing, IEF) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนโดยเน้นประจุเป็นกลางในสนามไฟฟ้ามาใช้ (Gibthai 2014) ทั้งสองเทคนิคมีความจำเพาะเจาะจงและมีความไววิเคราะห์สูงแต่มักเกิดปัญหาในการตรวจสอบ เนื่องจากโปรตีนในเนื้อสัตว์ที่นำมาวิเคราะห์มักไม่คงตัวและเสียสภาพจากความร้อนในกระบวนแปรรูปอาหาร ทำให้ผลที่ได้จากการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ไม่มีความน่าเชื่อถือ ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาและพัฒนาการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์จากอาหารโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์-เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ในรูปแบบต่างๆ เช่น เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) ที่สามารถตรวจสอบเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพและพบว่ามีความไววิเคราะห์และความจำเพาะในการตรวจพิสูจน์สูง (Zhang *et al.* 2007, Kesmen *et al.* 2009, Rodríguez *et al.* 2005) รวมถึงเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่สามารถตรวจระบุชนิดของสัตว์ได้หลายชนิดในการทำพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว (Henegariu *et al.* 1997, Bataille *et al.* 1999)

เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR) คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความนิยมในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวสามารถลดการปนเปื้อนและลดการสูญเสียดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ (Kitpipit *et al.* 2013) นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความไววิเคราะห์ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสูง จากงานวิจัยของ Ottens และคณะ (ปี พ.ศ.2556) ได้นำเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ มาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์มนุษย์ได้ประสบความสำเร็จด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเส้นผมในระยะ Anagen และ ระยะ Telogen เพียงเส้นเดียว (Ottens *et al*. 2013) และล่าสุดจากงานวิจัยของ Kitpipit และคณะ (ปี พ.ศ.2557) สามารถ

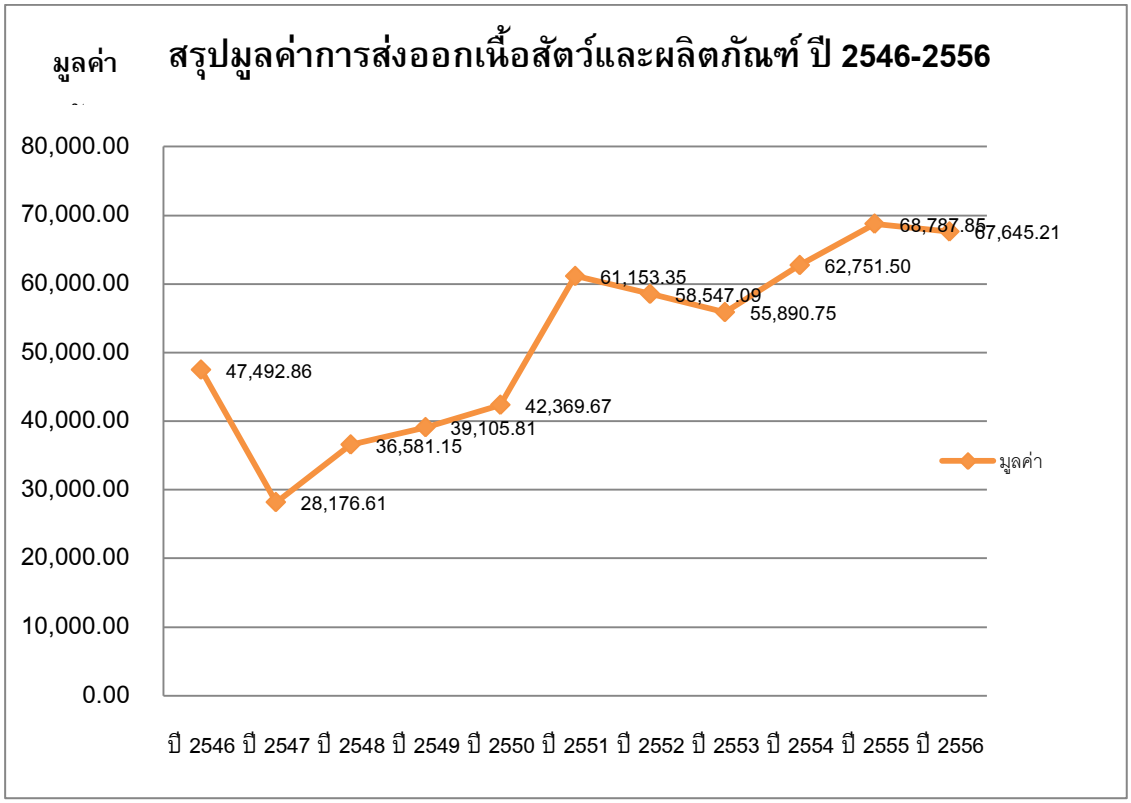
ประยุกต์ใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างชีวภาพของสัตว์ป่าจำนวน 12 ประเภทได้สำเร็จ ได้แก่ ตัวอย่างเส้นขน เนื้อเยื่อ เลือด กระดูก หู ผิวหนัง ปัสสาวะ อุจจาระ เขา รวมถึงเนื้อสัตว์ (Kitpipit *et al.* 2014) ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวถูกนำไปใช้ต่อยอดเพื่อพัฒนาเทคนิคระบุชนิดของสัตว์ได้สำเร็จจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อแกะ เนื้อม้า เนื้อวัว และเนื้อเป็ด อีกด้วย (Kitpipit *et al.* 2014)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์อีกหลายชนิดที่นิยมบริโภคในแถบทวีปเอเชียหรือแม้แต่ในประเทศไทย เช่น เนื้อควาย เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อเป็ด และเนื้อสุนัข เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็ค-พีซีอาร์ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อประโยชน์ในการบังคับใช้กฎหมายที่เกี่ยวข้องในการคุ้มครองสิทธิผู้บริโภค

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1. ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์และความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์

อุตสาหกรรมอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ในประเทศไทย เริ่มต้นจากการผลิตภายในครัวเรือนจากนั้นจึงเริ่มพัฒนาขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่ มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่หลากหลายมาใช้ในกระบวนการผลิต ซึ่งทำให้สินค้าที่ผลิตมีมาตรฐาน คุณภาพ และมีกำลังผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั้งในและนอกประเทศ โดยตลาดส่งออกของประเทศไทย ได้แก่ กลุ่มสหภาพยุโรป ญี่ปุ่น จีน สหรัฐอเมริกา และกลุ่มอาเซียน ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์จึงเป็นอีกหนึ่งอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ที่สามารถสร้างรายได้เป็นจำนวนมากให้แก่ประเทศไทย ดังแสดงในรูปที่ 1 มูลค่าการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ปี 2546-2556



รูปที่ 1 แสดง มูลค่าการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ปี 2546-2556

(Planning Division 2015)

1.2.2 การบริโภคและความสำคัญของเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด

1.2.2.1 สุนัข (Dog)

การบริโภคเนื้อสุนัขในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ เวียดนาม เกาหลีใต้ และจีน มีความนิยมกันอย่างแพร่หลาย (Podberscek 2009) สำหรับประเทศไทยการบริโภคเนื้อสุนัขไม่แพร่หลายมากนัก แต่จะมีการลักลอบขนส่งและค้าสุนัขกันอย่างต่อเนื่อง ส่วนใหญ่แหล่งการผลิตและบริโภคเนื้อสุนัขจะอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดบึงกาฬ จังหวัดหนองคาย และจังหวัดมุกดาหาร รวมถึงจังหวัดชายแดน ได้แก่ จังหวัดสกลนครและจังหวัดนครพนม ซึ่งจะทำการขนส่งสุนัขออกจากจังหวัดดังกล่าวผ่านทางประเทศลาว เพื่อไปยังประเทศเวียดนาม เนื่องจากประเทศเวียดนามมีการค้าและบริโภคเนื้อสุนัขอย่างเปิดเผยและไม่ผิดกฎหมาย ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยผู้ที่นิยมบริโภคเนื้อสุนัข มักมีความเชื่อว่าเนื้อสุนัขมีสรรพคุณทางยาและอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ทำให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรงรวมถึงเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ

แต่อย่างไรก็ตามการลักลอบและค้าสุนัขเพื่อบริโภคเนื้อในประเทศไทยยังถือว่าเป็นเรื่องผิดพระราชบัญญัติป้องกันการทารุณกรรมและการจัดสวัสดิภาพสัตว์ พ.ศ. 2557 อีกทั้งยังไม่มีการสนับสนุนให้มีการค้าและส่งออกเนื้อสุนัขอย่างถูกต้องตามกฎหมาย เนื่องจากการค้าสุนัขเป็นการทารุณกรรมสัตว์และถูกต่อต้านจากองค์กรต่างๆทั้งภายในและต่างประเทศ เช่น องค์กรพันธมิตรเพื่อคุ้มครองสัตว์ในเอเชีย (Asia Canine Protection Alliance-ACPA) เพื่อการคุ้มครองสวัสดิภาพของสุนัขและสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งเป็นองค์กรที่มีวัตถุประสงค์ในการหยุดยั้งการค้าสุนัขเพื่อการบริโภคเนื้อที่โหดร้ายและผิดกฎหมาย โดยการลักลอบค้าข้ามแดนจากประเทศไทย ลาว และกัมพูชา ไปยังประเทศเวียดนาม เป็นต้น

การค้าและบริโภคเนื้อสุนัขในประเทศไทยจึงเป็นการลักลอบจำหน่ายในตลาดมืด สำหรับเนื้อสุนัขที่นำมาชำแหละเพื่อจำหน่ายจะได้มาจากการรับซื้อในราคาถูกหรือแลกด้วยกะละมังตามหมู่บ้านแถวชนบท การขโมยจากวัดหรือจากสุนัขที่ไม่มีเจ้าของ เนื่องจากใช้เงินลงทุนน้อยแต่ให้ผลตอบแทนที่สูง (Totton *et al.* 2010) ซึ่งสุนัขเหล่านี้ไม่ได้มีการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคต่างๆ แต่อย่างใด โดยเนื้อสุนัขที่นำมาจำหน่ายจะวางปะปนกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ หรือเก็บไว้ในตู้แช่ ซึ่งผู้จำหน่ายจะไม่มีการปิดป้ายหรือปิดฉลากบ่งบอกชนิดของเนื้อสุนัข เพื่อหลีกเลี่ยงการจับกุมจากเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง โดยผู้บริโภคส่วนใหญ่ก็มักจะเป็นลูกค้าประจำ

ทั้งนี้การที่ผู้จำหน่ายไม่มีการปิดฉลากระบุชนิดของเนื้อสุนัขและสุนัขที่นำมาชำแหละไม่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคต่าง ๆ ซึ่งอาจจะนำมาซึ่งโรคระบาดต่าง ๆที่มีสุนัขเป็นพาหะ เช่น โรคพยาธิบางชนิด โรคอหิวาตกโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคพิษสุนัขบ้าที่สามารถแพร่กระจายจากสุนัขสู่คนได้ จากการรายงานของสำนักงานกลางในการป้องกันสุขภาพ (Central Bureau of Preventative Health) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization-WHO) ระบุว่าปัญหาการแพร่ระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าอย่างกว้างขวางใน 12 ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ บังคลาเทศ ภูฏาน สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนเกาหลี อินเดีย อินโดนีเซีย สาธารณรัฐมัลดีฟส์ พม่า เนปาล ศรีลังกา ไทย เวียดนาม และสาธารณรัฐประชาธิปไตยติมอร์เลสเต เป็นผลเชื่อมโยงมาจากการค้าเนื้อสุนัขและการบริโภคเนื้อสุนัข ซึ่งส่งผลกระทบในวงกว้าง ทั้งต่อผู้บริโภคเนื้อสุนัขโดยตรง รวมถึงผู้บริโภคที่ไม่นิยมรับประทานเนื้อสุนัข โดยประชากรในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้กว่า 1.4 พันล้านคนมีความเสี่ยงของการติดเชื้อพิษสุนัขบ้า (Gongal and Wright 2011,Organization 2013) ซึ่งถ้ารัฐบาลของแต่ละประเทศไม่มีการควบคุมการลักลอบค้าสุนัขอีกก็ยากที่จะควบคุมและกำจัดโรคพิษสุนัขบ้าให้หมดไป

ดังนั้นเพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับสุขภาพของผู้บริโภค รวมถึงการปกป้องไม่ให้สุนัขถูกทารุณ จึงจำเป็นต้องมีการรณรงค์ไม่ให้มีการบริโภคเนื้อสุนัข รวมกับการบังคับใช้กฎหมายควบคุมโรคและจำเป็นจะต้องมีการเข้มงวดในตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสุนัขในผลิตภัณฑ์อาหารมากยิ่งขึ้น

รูปที่ 2 แสดงการจำหน่ายเนื้อสุนัขอย่างเปิดเผยในประเทศเวียดนาม

(http://www.dogilike.com/)

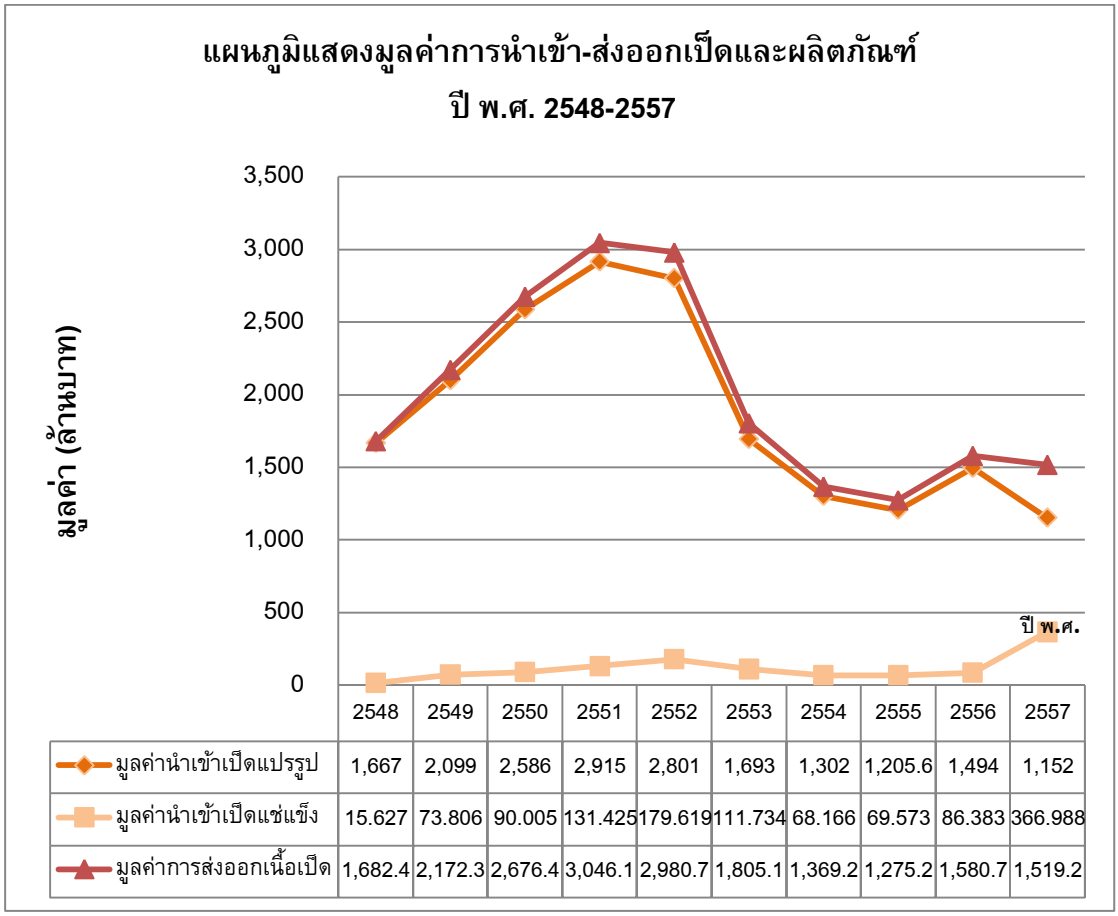
1.2.2.2 เป็ด (Duck)

เป็ด จัดอยู่ในวงศ์ Anatidae ซึ่งเป็นสัตว์ปีกที่มีลักษณะปากแบน เท้าแบนและติดกันเป็นพังผืด มีขนาดตัวและน้ำหนักประมาณ 1.5 ถึง 4 กิโลกรัม ออกลูกเป็นไข่ ครั้งละ 1 ฟอง ในหลายประเทศนิยมเลี้ยงเป็ดไว้เป็นสัตว์เศรษฐกิจ เช่น จีน อินโดนีเซีย มาเลเซีย เวียดนาม รวมถึงประเทศไทย ที่มีการเลี้ยงเป็ดไว้เพื่อการบริโภคหลากหลายสายพันธุ์ ทั้งเป็ดพันธุ์เนื้อ ที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตรวดเร็ว และสามารถให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรในระยะเวลาสั้น เช่น เป็ดเทศ (Muscovy) เป็ดเทศพันธุ์เนื้อพันธุ์แท้ เป็ดพันธุ์ปักกิ่ง (Pekin) เป็ดโป๊ยฉ่าย และเป็ดเทศพันธุ์ท่าพระ เป็นต้น และพันธุ์ไข่ เช่น เป็ดพันธุ์กากีแคมป์เบลล์ (Khaki Campbell) และเป็ดพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ปากน้ำ (Pak Nam) และพันธุ์นครปฐม เป็นต้น

การบริโภคเป็ดในประเทศไทย ถือว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉลี่ยประมาณ 1.22 กิโลกรัมต่อคนต่อปี (USDA 2013) รวมถึงมีการขยายอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็ดเพิ่มมากขึ้น เพื่อส่งออกขายทั้งในและต่างประเทศซึ่งปัจจัยที่ทำให้ตลาดต่างประเทศนำเข้าเนื้อเป็ดแปรรูปจากไทยเพิ่มขึ้น เนื่องจากประเทศผู้นำเข้ามีความเชื่อมั่นในคุณภาพเนื้อเป็ดแปรรูปของไทยที่มีการเลี้ยงในระบบโรงเรือน รวมทั้งผ่านการผลิตในโรงงานแปรรูปที่ได้การรับรองมาตรฐานส่งออกจากกรมปศุสัตว์และจากประเทศคู่ค้า จึงทำให้ประเทศที่เป็นตลาดส่งออกหลักของไทย มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากเป็ดเพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3

ลักษณะการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทย สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท ดังแสดงในรูปที่ 4 ได้แก่ ประเภทที่ 1 เป็นการเลี้ยงแบบปล่อยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือที่เรียกว่า การเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง เพื่อลดต้นทุนในการเลี้ยงเป็ด โดยให้เป็ดหากินอาหารที่มีอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติเอง เช่น กุ้ง หอย ปูและปลา สำหรับจังหวัดที่มีการเลี้ยงเป็ดเป็นจำนวนมาก คือ อุดรธานี สุรินทร์ อุบลราชธานี นครราชสีมา นครปฐม อ่างทอง ชลบุรี สุราษฎร์ธานี และสมุทรสาคร เป็นต้น ประเภทที่ 2 เกษตรกรหันมาเลี้ยงเป็ดในระบบโรงเรือนมากขึ้น เพื่อลดอัตราความเสี่ยงในการเกิดโรคและการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์ปีก เช่น เชื้อไข้หวัดนกชนิดสายพันธุ์รุนแรง H5N1 (H5N1 influenza virus) ที่สามารถแพร่ระบาดจากสัตว์ปีกสู่มนุษย์ได้ ซึ่งได้คร่าชีวิตมนุษย์ไปถึง 12 คน ส่งผลให้มีการฆ่าสัตว์ปีกในประเทศถึง 60 ล้านตัวและหยุดการผลิตและการค้าสัตว์ปีก เพื่อความปลอดภัยต่อทั้งเกษตรกร ผู้ประกอบการ และผู้บริโภค

(Songserm *et al.* 2006) ประเภทที่ 3 เป็นการเลี้ยงเป็ดเพื่อการส่งออกในระบบปิดที่ได้มาตรฐาน และประเภทที่ 4 เป็นการเลี้ยงเป็ดไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือน โดยจะเลี้ยงไว้บริเวณหลังบ้าน



	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557
มูลค่านำเข้าเป็ดแปรรูป	1,667	2,099	2,586	2,915	2,801	1,693	1,302	1,205.6	1,494	1,152
มูลค่านำเข้าเป็ดแช่แข็ง	15.627	73.806	90.005	131.425	179.619	111.734	68.166	69.573	86.383	366.988
มูลค่าการส่งออกเนื้อเป็ด	1,682.4	2,172.3	2,676.4	3,046.1	2,980.7	1,805.1	1,369.2	1,275.2	1,580.7	1,519.2

รูปที่ 3 แสดง มูลค่าการนำเข้า-ส่งออกเป็ดและผลิตภัณฑ์ ปี 2548 -2557

(Planning Division 2015)

รูปที่ 4 ลักษณะการเลี้ยงเป็ดในประเทศไทย

A การเลี้ยงเป็ดไล่ทุ่ง โดยลักษณะการเลี้ยงจะปล่อยให้เป็ดหาอาหารเองและเกษตรกรจะเคลื่อนย้ายเป็ดไปหากินในหลายๆพื้นที่ ซึ่งเสี่ยงต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไข้หวัดนกชนิดสายพันธุ์รุนแรง H5N1

B การเลี้ยงเป็ดในระบบโรงเรือนเปิด

C การเลี้ยงเป็ดในระบบปิดที่ได้มาตรฐาน และมีการป้องกันโรคจากสัตว์ปีกอย่างถูกต้อง

D การเลี้ยงเป็ดหลังบ้าน

(ที่มา: www.manager.co.th(A), www.komchadluek.net (B), www.chiangraifocus.com (C), www.rakbankerd.com (D))

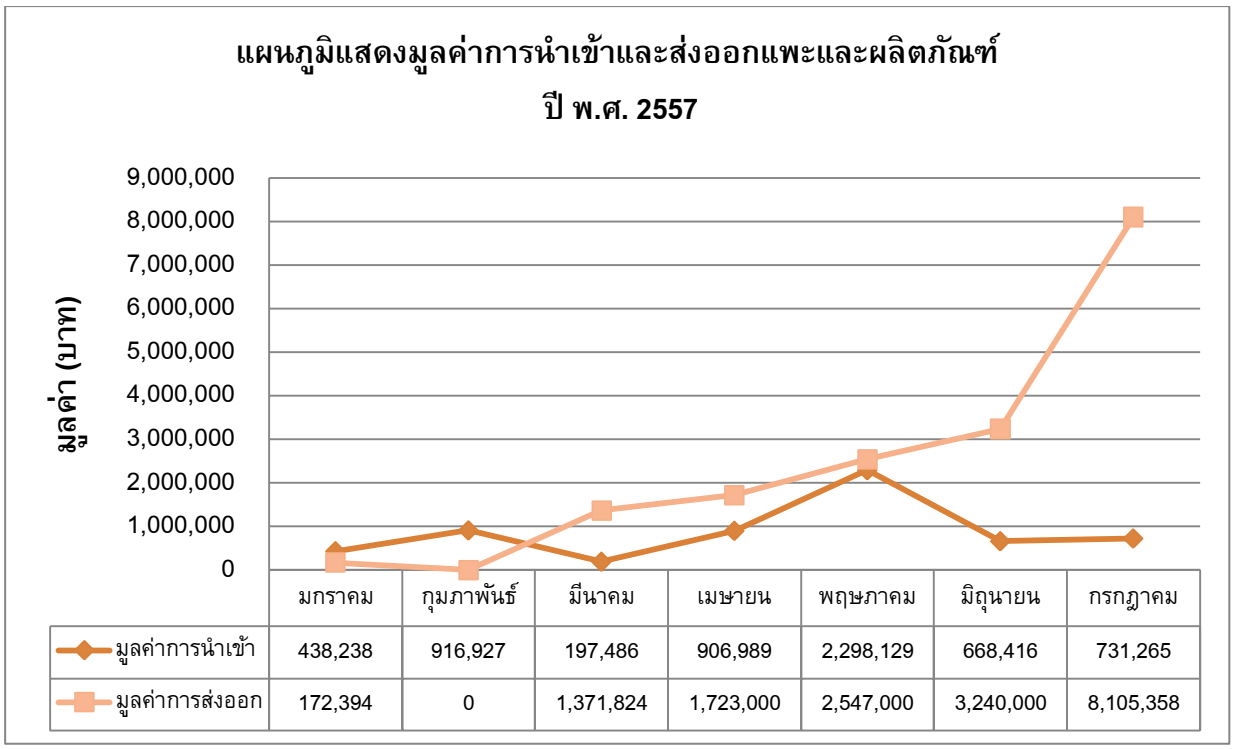
1.2.2.3 แพะ (Goat)

แพะ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Capra aegagrus hircus* จัดอยู่อันดับ Artiodactyla ซึ่งเป็นอันดับของสัตว์ที่มีลักษณะกีบเท้าเป็นคู่ขนาดกลางและมีความหนา อยู่ในวงศ์ Bovidae ซึ่งจะมีเขา 1 คู่ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีขนาดเล็ก เพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย แต่เพศผู้จะมีเครา ขนหยาบสีดำ ขาว หรือน้ำตาล หางสั้น มีความอดทนและทนทานต่อโรคได้ดีกว่าสัตว์กีบคู่ชนิดอื่นๆ

แพะ ถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภค ซึ่งเนื้อแพะอุดมไปด้วยโปรตีนที่สำคัญสำหรับร่างกาย อีกทั้งยังมีไขมันในระดับที่ต่ำกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น แพะสามารถรับประทานได้ทั้งชาวไทยพุทธและมุสลิม สำหรับประเทศไทยแหล่งที่มีการเลี้ยงและบริโภคแพะกันเป็นจำนวนมากอยู่ทางภาคใต้ของประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพื้นที่ที่มีผู้ที่นับถือศาสนาอิสลามอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โดยจังหวัดที่มีการเลี้ยงแพะมากที่สุด คือ จังหวัดยะลา รองลงมา คือ จังหวัดปัตตานี ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงวันสำคัญทางศาสนาของผู้ที่นับถือศาสนาอิสลาม จะนิยมนำเนื้อแพะมาใช้ในการประกอบพิธีกรรมทางศาสนา

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงแพะเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้ปริมาณของแพะเพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคในประเทศที่เพิ่มมากขึ้นและเพื่อส่งออกไปยังประเทศคู่ค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารฮาลาล ที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่มีองค์ประกอบของเนื้อแพะมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคทั้งที่เป็นมุสลิมและผู้บริโภคที่นิยมรับประทานเนื้อแพะ ทั้งนี้การนำเข้าและส่งออกแพะ พบว่า มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังในรูปที่ 5 ซึ่งแสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกแพะและผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ.2557

สายพันธุ์แพะเนื้อที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ แพะพันธุ์พื้นเมือง (Native goat) ซึ่งนิยมเลี้ยงทางภาคใต้ของประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ที่มาจากแถบประเทศมาเลเซีย ประเทศอินเดีย และประเทศปากีสถาน ลักษณะของแพะพันธุ์พื้นบ้าน จะมีขนาดตัวเล็ก เลี้ยงง่ายและทนทานต่อทุกสภาพแวดล้อม ส่วนแพะเนื้อสายพันธุ์ต่างประเทศที่นิยมเลี้ยง คือ สายพันธุ์บอร์ (Boer) และพันธุ์แบล็คเบงกอล (Black Bengal) ซึ่งให้ผลผลิตเนื้อที่คุณภาพดีและมีปริมาณไขมันน้อย ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 แสดง มูลค่าการนำเข้าและส่งออกแพะและผลิตภัณฑ์ ปี 2557 (ดลณพรรษ 2557)

รูปที่ 6 สายพันธุ์แพะเนื้อที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย

A แพะพันธุ์พื้นเมือง (Native goat)

B แพะพันธุ์แบล็คเบงกอล (Black Bengal)

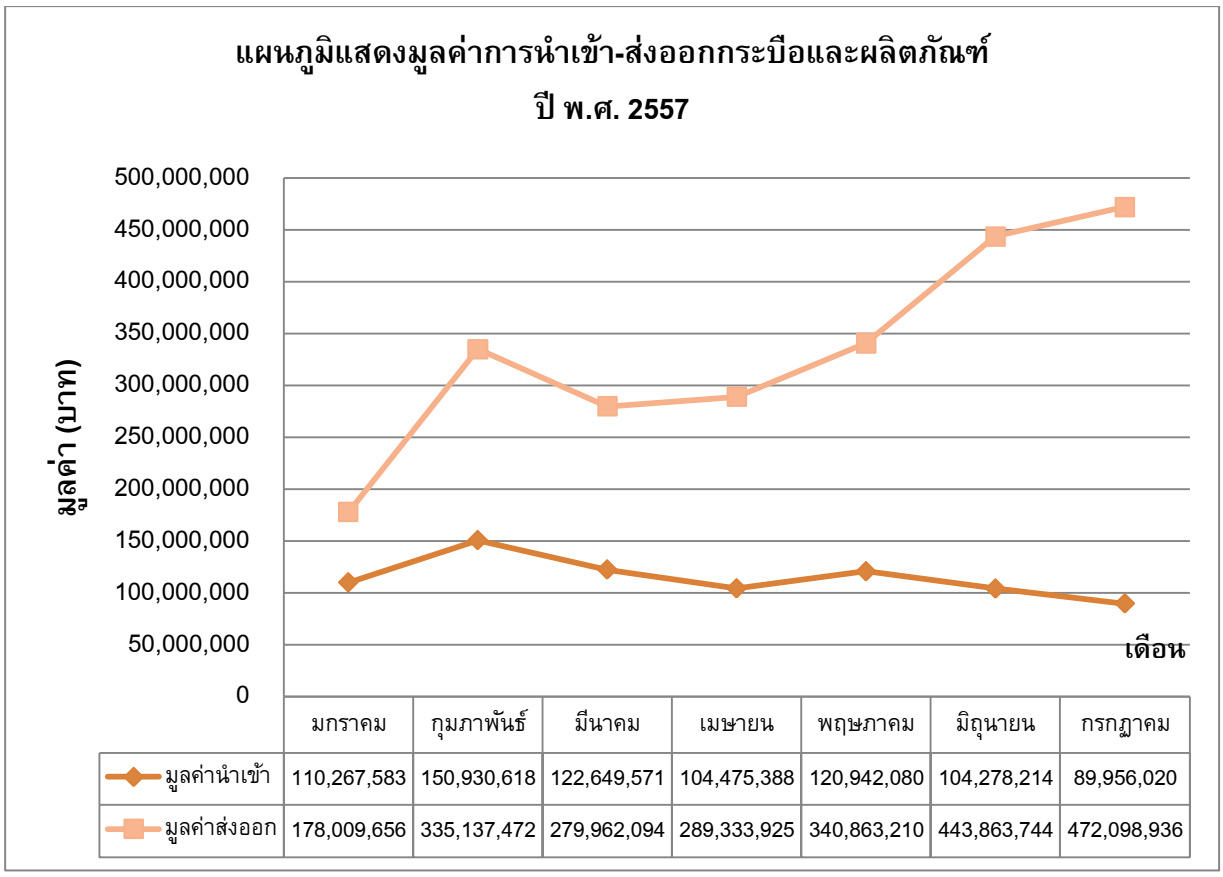
C แพะสายพันธุ์บอร์ (Boer)

(ที่มา:breeding.dld.go.th (A), e-book.ram.edu/e-book/a/AT335/AT335-3.pdf (B), small.breeding.dld.go.th (C))

1.2.2.4. ควาย (Buffalo)

ควาย หรือ กระบือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bubalus bubalis* จัดอยู่ในวงศ์ Bovidae ซึ่งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่ มีเท้าเป็นกีบ เพศผู้จะมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 520-560 กิโลกรัม ส่วนเพศเมียเฉลี่ยประมาณ 360-440 กิโลกรัม ควายเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ออกลูกครั้งละ 1-2 ตัว โดยมีลักษณะเขาที่แตกต่างจากวัว คือ เขาจะแบนและโค้งยาว มีผิวสีเทาดำและผิวสีขาวอมชมพู ซึ่งเรียกว่า ควายเผือก ควายเป็นสัตว์ที่อยู่คู่กับคนไทยมาช้านาน ในอดีตเกษตรกรจะเลี้ยงควายไว้สำหรับไถนาหรือใช้เป็นพาหนะในการเดินทาง รวมถึงเลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหาร โดยทั่วไปแล้วสายพันธุ์ควายที่นิยมเลี้ยง คือ ควายปลัก (Swamp buffalo) และควายแม่น้ำ (River buffalo) ควายทั้งสองสายพันธุ์มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เหมือนกัน คือ *Bubalus bubalis* แต่จะมีรูปร่างลักษณะทางกายภาพและทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน คือ ควายปลัก จะมีรูปร่างลักษณะทางกายภาพที่แข็งแรง ทนทาน เหมาะแก่การทำเกษตรกรรม และมีจำนวนโครโมโซม 24 คู่ (2n=48) ส่วนควายแม่น้ำ จะมีรูปร่างลักษณะทางกายภาพที่ใหญ่ เหมาะแก่การนำไปบริโภคเนื้อและนม และมีจำนวนโครโมโซม 25 คู่ (2n=50)

ควายที่เลี้ยงในประเทศไทย รวมถึงประเทศกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศพม่า เวียดนาม กัมพูชา อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซียและฟิลิปปินส์ คือ ควายปลัก (Swamp buffalo) ซึ่งเกษตรกรจะเลี้ยงไว้สำหรับทำการเกษตร เช่น ไถนา ทำไร่ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยจะเลี้ยงควายกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดนครพนม จังหวัดอุบลราชธานี เป็นต้น รองลงมา คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตามลำดับ นอกจากจะเลี้ยงควายสำหรับใช้แรงงานแล้วยังเลี้ยงไว้สำหรับบริโภคเนื้ออีกเช่นกัน โดยเนื้อแดงของควายมีไขมันและคอเลสเตอรอลต่ำ เหมาะแก่ผู้บริโภคที่รักสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่นิยมนำไปทำลูกชิ้น อย่างไรก็ตามเนื้อควายก็ยังไม่เป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากเนื้อควายมีความเหนียวกว่าเนื้อโค ทำให้ผู้ผลิตนำเนื้อควายมาผลิตผลิตภัณฑ์อาหารน้อย อีกทั้งจำนวนควายที่มีอยู่ในปัจจุบันมีจำนวนลดลงมากซึ่งไม่เพียงพอต่อการบริโภค ในด้านการนำเข้าและส่งออกพบว่า ประเทศไทยมีการนำเข้าควายและผลิตภัณฑ์ลดลง เนื่องจากราคาควายในประเทศคู่ค้ามีราคาที่สูงขึ้น ส่วนการส่งออกไปยังประเทศคู่ค้ามีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยควายสายพันธุ์ต่างๆที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 7 แสดง มูลค่าการนำเข้าและส่งออกควายและผลิตภัณฑ์ ปี 2557 (ดลณพรรษ 2557)

รูปที่ 8 สายพันธุ์ควายที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย

A ควายปลัก (Swamp buffalo)

B ควายแม่น้ำ (River buffalo)

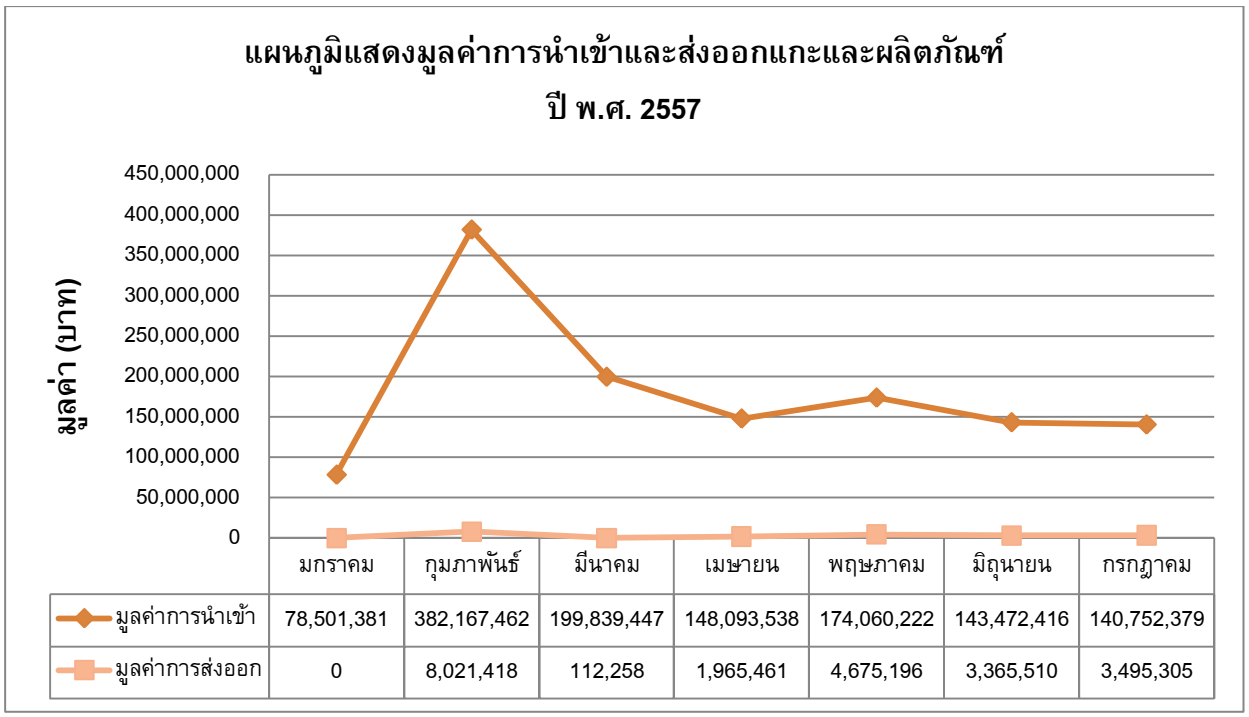
(ที่มา:http://202.143.171.227/buffalo/index.php?option=com_content&view=article&id=9&Itemid=9 (A), www.oknation.net (B))

1.2.2.5 แกะ (Sheep)

แกะ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ovis aries จัดอยู่ในวงศ์ Bovidae* ซึ่งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่มีลักษณะเท้าเป็นกีบคู่ มีขนฟู สีขาว ดำ และน้ำตาล โดยจะออกลูกครั้งละ 1-2 ตัวและเลี้ยงลูกด้วยนม แกะเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว สามารถกินได้ทั้งหญ้าและพืชได้ทุกชนิด อีกทั้งยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยได้ดี ส่วนใหญ่เกษตรกรจะนิยมเลี้ยงแกะแบบปล่อยโดยให้ออกหากินตามทุ่งหญ้า ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนในการเลี้ยง สำหรับสายพันธุ์แกะที่นิยมเลี้ยงมีอยู่หลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แกะพันธุ์ขน แกะพันธุ์นม และแกะพันธุ์เนื้อ

แกะพันธุ์เนื้อที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งให้ผลผลิตเนื้อที่มีคุณภาพ ได้แก่ พันธุ์กลันตัน ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันมากทางภาคใต้ พันธุ์เพรียงกัน พันธุ์ปากีสถานหรือพม่า พันธุ์พื้นเมืองของไทย พันธุ์คาทาดิน พันธุ์ดอร์เปอร์และพันธุ์บาร์บาโดส แบล็คเบลลี เป็นต้น โดยเนื้อแกะที่นิยมรับประทานจะแบ่งเป็นเนื้อลูกแกะ (Lamb) เนื้อแกะรุ่น (Hogget) และเนื้อแกะ (Mutton) ซึ่งมีช่วงอายุของแกะเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยจะมีลักษณะของเนื้อที่แตกต่างกัน โดยเนื้อลูกแกะ จะได้จากการชำแหละลูกแกะที่มีอายุไม่เกิน 5 เดือน ลักษณะเนื้อจะนุ่ม ส่วนเนื้อแกะรุ่น จะเป็นเนื้อที่ได้จากแกะอายุประมาณ 5-10 เดือน และเนื้อแกะจะได้จากแกะที่โตเต็มวัย โดยลักษณะของเนื้อแกะจะมีสีที่เข้มและกลิ่นเนื้อที่แรงขึ้นตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแกะภายในประเทศไทยยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก จึงทำให้ปริมาณแกะไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค

ด้วยเหตุนี้ ทำให้ประเทศไทยไม่มีการส่งออกแกะ และจำเป็นต้องนำเข้าแกะเพิ่มมากขึ้น ดังในรูปที่ 9 ซึ่งแสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกแกะและผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ.2557 ดังนั้นผู้จำหน่ายจึงต้องนำเข้าเนื้อแกะจากต่างประเทศ ซึ่งการนำเข้าเนื้อแกะมาในประเทศจะต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบและประกาศของหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กรมศุลกากร กระทรวงพาณิชย์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมปศุสัตว์ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อป้องกันและควบคุมโรคระบาดที่มาพร้อมกับเนื้อสัตว์ที่นำเข้ามา ซึ่งอาจจะแพร่ระบาดจากสัตว์สู่คนและสัตว์สู่สัตว์ได้ ตลอดจนควบคุมและตรวจสอบเนื้อสัตว์ที่นำเข้ามาอย่างผิดกฎหมาย เพื่อให้เกิดความปลอดภัยและสร้างความน่าเชื่อถือแก่ผู้บริโภค สำหรับสายพันธุ์แกะที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ดังแสดงในรูปที่ 10



	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม
มูลค่าการนำเข้า	78,501,381	382,167,462	199,839,447	148,093,538	174,060,222	143,472,416	140,752,379
มูลค่าการส่งออก	0	8,021,418	112,258	1,965,461	4,675,196	3,365,510	3,495,305

รูปที่ 9 แสดง มูลค่าการนำเข้าและส่งออกแกะและผลิตภัณฑ์ ปี 2557 (ดลณพรรษ 2557)

รูปที่ 10 แกะพันธุ์กลันตัน ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันมากทางภาคใต้ของประเทศไทย

(ที่มา: seekun.net/anim-less3-4h.pdf)

1.2.3 กฎหมายที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันปัญหาการปลอมปนเนื้อสัตว์ราคาถูกลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปมักพบอยู่บ่อยครั้งดังเช่นกรณีตัวอย่าง การปลอมปนเนื้อม้าในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวในสหภาพยุโรป โดยได้มีการสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์เนื้อวัวที่วางจำหน่ายในประเทศไอแลนด์และอังกฤษ จากผลการตรวจสอบพบว่ามีดีเอ็นเอของม้าปลอมปนอยู่ (O'Mahony 2013) ต่อมาได้มีการตรวจสอบในอาหารชนิดอื่นๆ เช่น ไส้กรอกเนื้อ มีตบอล พาสต้าเนื้อ ลาซานญา ที่วางขายในสเปน อิตาลี โปรตุเกส เยอรมนี และรัสเซีย ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบพบดีเอ็นเอของม้าเช่นกัน (บังอร 2557) นอกจากนั้นยังพบว่ามีผู้ผลิตหลายรายนำเนื้อสัตว์ราคาถูกมาปลอมแปลงเป็นเนื้อสัตว์ราคาแพงและปิดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริงอีกเช่นกัน ซึ่งเห็นได้จากหน้าหนังสือพิมพ์ที่เป็นข่าวโด่งดัง เช่น ในประเทศจีนมีการตรวจพบการนำเนื้อหนู สุนัขจิ้งจอก และตัวมิงค์ มาผสมกันแล้วปิดฉลากว่าเป็นเนื้อแกะ นำมาวางขายตามท้องตลาด หลังจากนั้นยังมีการตรวจพบเนื้อแกะปลอม ซึ่งปลอมแปลงมาจากเนื้อเป็ดและเนื้อหมู โดยในปี พ.ศ.2557 ประเทศจีนมีการตรวจยึดเนื้อปลอมแล้วทั้งสิ้น 20,000 ตัน (http://www.thairath.co.th/content/342656) ทั้งนี้สาเหตุที่ผู้ผลิตทำการปลอมแปลงเนื้อสัตว์ ก็เพื่อหวังผลกำไรที่เพิ่มขึ้นจากการนำเนื้อสัตว์ราคาถูกมาวางขายแทนเนื้อสัตว์ราคาแพง

จากปัญหาการปลอมปนและปลอมแปลงเนื้อสัตว์ที่เกิดขึ้นในหลายๆประเทศ ทำให้เกิดผลกระทบต่อประเทศนั้นๆหลากหลายด้าน ทั้งด้านความเชื่อมั่นของผู้บริโภคภายในประเทศและประเทศคู่ค้าที่ลดลงหลังจากมีการตรวจพบผลิตภัณฑ์ที่มีการปลอมปนหรือปลอมแปลงเนื้อสัตว์รวมถึงด้านสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งการปิดฉลากผลิตภัณฑ์อาหารไม่ชัดเจนและไม่ถูกต้อง อาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคที่แพ้เนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ระบุในฉลากได้ และด้านศาสนา โดยเฉพาะศาสนาอิสลามที่มีบทบัญญัติในการบริโภคอาหารไว้อย่างเคร่งครัด ซึ่งการปลอมปนและปลอมแปลงเนื้อสัตว์ยังถือว่าเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย ดังนั้นในหลายประเทศจึงได้มีการออกกฎหมายเพื่อควบคุมการกระทำที่ผิดกฎหมายเหล่านี้ รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีกฎหมายบัญญัติบทลงโทษแก่ผู้ที่กระทำความผิดไว้ ดังนี้

พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 (ฉบับปรับปรุง ปี 2554) หมวด 4 การควบคุมอาหาร มาตรา 25 ห้ามมิ ให้ผู้ใดผลิต นำเข้าเพื่อจำหน่าย หรือจำหน่าย ซึ่งอาหารดังต่อไปนี้ (1) อาหารไม่บริสุทธิ์ (2) อาหารปลอม (3) อาหารผิดมาตรฐาน (4) อาหารอื่นที่รัฐมนตรีกำหนด และ หมวด 8 บทลงโทษ มาตรา 59 ผู้รับอนุญาตผู้ใดฝ่าฝืน มาตรา 22 วรรค

หนึ่ง หรือมาตรา 23 ต้องระวางโทษปรับไม่เกินหนึ่งพันบาท (Consumers 2009)

พระราชบัญญัติความรับผิดต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. 2551 มาตรา 10 ให้คณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค สมาคม และมูลนิธิซึ่งคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภคให้การรับรองตามกฎหมายว่าด้วยการคุ้มครองผู้บริโภค มีอำนาจฟ้องคดีเรียกค่าเสียหายแทนผู้เสียหายได้ โดยให้นำบทบัญญัติเกี่ยวกับการฟ้องและดำเนินคดีแทนตามกฎหมายดังกล่าวมาใช้บังคับโดยอนุโลม การฟ้องและดำเนินคดีแทนผู้เสียหายตามวรรคหนึ่งให้ได้รับยกเว้นค่าฤชาธรรมเนียมทั้งปวง แต่ไม่รวมถึงความรับผิดในค่าฤชาธรรมเนียมในชั้นที่สุดและ มาตรา 12 สิทธิเรียกร้องค่าเสียหายอันเกิดจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัยตามพระราชบัญญัตินี้เป็นอันขาดอายุความเมื่อพ้นสามปีนับแต่วันที่ผู้เสียหายรู้ถึงความเสียหายและรู้ตัวผู้ประกอบการที่ต้องรับผิด หรือเมื่อพ้นสิบปีนับแต่วันที่มีการขายสินค้านั้น ในกรณีที่ความเสียหายเกิดขึ้นต่อชีวิต ร่างกาย สุขภาพ หรืออนามัย โดยผลของสารที่สะสมอยู่ในร่างกายของผู้เสียหายหรือเป็นกรณีที่ต้องใช้เวลาในการแสดงอาการ ผู้เสียหายหรือผู้มีสิทธิฟ้องคดีแทนตามมาตรา 10 ต้องใช้สิทธิเรียกร้องภายในสามปีนับแต่วันที่รู้ถึงความเสียหายและรู้ตัวผู้ประกอบการที่ต้องรับผิด แต่ไม่เกินสิบปีนับแต่วันที่รู้ถึงความเสียหาย

ประมวลกฎหมายอาญามาตรา 236 ว่า ผู้ใดปลอมปนอาหาร ยา หรือเครื่องอุปโภค บริโภค อื่นใดเพื่อบุคคลอื่นเสพหรือใช้และการปลอมปนนั้นน่าจะเป็นเหตุให้เกิดอันตรายแก่สุขภาพ หรือจำหน่ายหรือเสนอขายสิ่งเช่นว่านั้น เพื่อให้บุคคลเสพหรือใช้ ต้องระวางโทษจำคุก ไม่เกิน 3 ปี หรือปรับไม่เกิน 6,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ และมาตรา 238 ถ้าการกระทำความผิดตาม มาตรา 226 ถึง มาตรา 237 เป็นเหตุให้บุคคลอื่นถึงแก่ความตาย ผู้กระทำต้องระวางโทษ จำคุกตลอดชีวิตหรือจำคุกตั้งแต่ห้าปีถึงยี่สิบปี และปรับตั้งแต่ หนึ่งหมื่นบาทถึงสี่หมื่นบาท

1.2.4. ทฤษฎีพื้นฐานในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์

1.2.4.1. ความสำคัญของดีเอ็นเอ

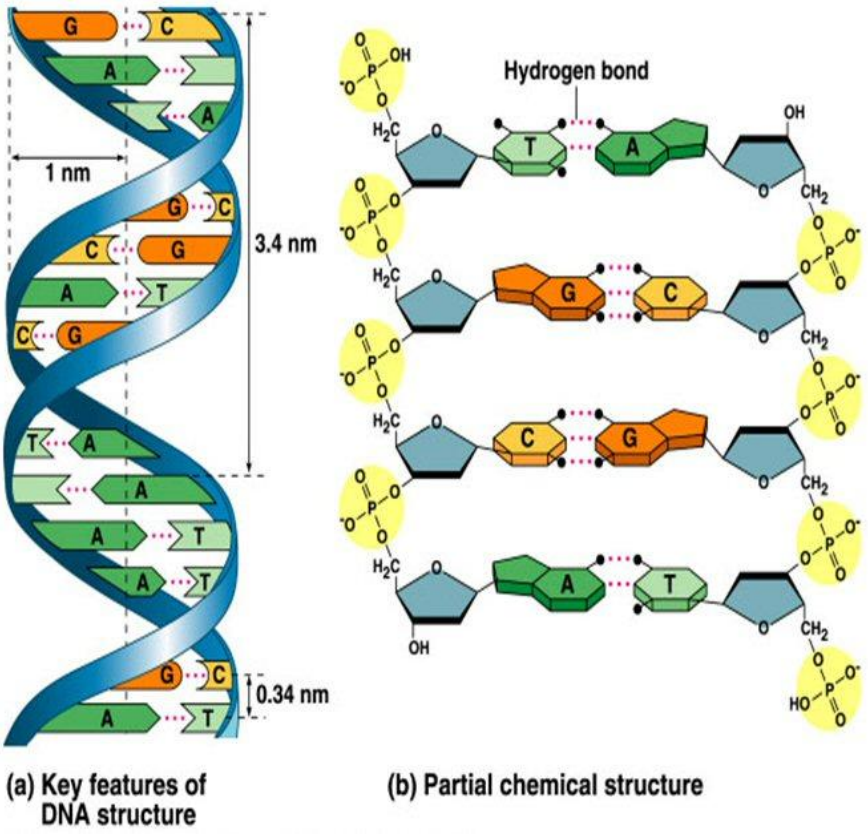
ดีเอ็นเอ ทำหน้าที่ในการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยจะถูกเก็บไว้ในรูปของรหัสพันธุกรรม (Genetic code) ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากรุ่นพ่อและแม่อย่างละครึ่งจะสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกและรุ่นหลานได้ และนอกจากนี้สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็ยังมีลำดับและจำนวนนิวคลีโทไทด์ในสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและลำดับนิวคลีโทด์นี้เองคือ ข้อมูลที่ใช้กำหนดลักษณะต่าง ๆของสิ่งมีชีวิต (Kingston 1991)

1.2.4.2 โครงสร้างและส่วนประกอบของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอ (DNA) หรือดีออกซีไรโบนิวคลีอิกแอซิด (Deoxyribonucleic acid) เป็นสารชีวโมเลกุลจำพวกกรดนิวคลีอิกและมีสภาพประจุเป็นลบ โดยโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์นับล้านโมเลกุลเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ซึ่งเบสของโมเลกุลนิวคลีโอไทด์มี 4 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ คือ พิวรีน (Purine) ได้แก่ เบสอะดีนีน (Adenine) หรือเบส A และเบสกัวนีน (Guanine) หรือเบส G ส่วนไพริมิดีน (Pyrimidine) ประกอบด้วย เบสไซโตซีน (Cytosine) หรือเบส C และเบสไทมีน (Tymine) หรือเบส T (กรเกียรติ 2550) โดยกรดนิวคลีอิกที่ประกอบขึ้นจากนิวคลีโอไทด์ทีมีความยาวไม่มาก เรียกว่า โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide) สำหรับในเซลล์ยูคาริโอตดีเอ็นเอจะถูกพบอยู่ 2 แห่ง คือ ในนิวเคลียส (Nucleus) ซึ่งจะพบนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) และในไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) จะพบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA) (Sinden 1994)

โครงสร้างดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วย สายพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) จำนวน 2 สาย เรียงตัวในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน สายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 3’ ไป 5’ และอีกสายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 5’ไป 3’ ทั้งสองสายยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) มีน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) และหมู่ฟอสเฟตอยู่ด้านนอกโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ และมีเพียงเบส 4 ชนิดเท่านั้น นั่นก็คือ เบส A เบส T เบส C และเบส G อยู่ภายในโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ เบสของนิวคลีโอไทด์ทุกโมเลกุลที่อยู่บนสายตรงกันข้ามกันจะต้องเป็นเบสที่เข้าคู่สมกัน (Complementary) โดยที่เบส A จะเชื่อมต่อกับ

เบส T ด้วยพันธะคู่ (Double bond) และเบส C จะเชื่อมต่อกับเบส G ด้วยพันธะสาม (Triple bond) ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายหนึ่งจะเป็นตัวกำหนดชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งเดียวกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์อีกสายหนึ่ง (Watson and Crick 1953) โดยโครงสร้างของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็น 3 มิติ ภายในหนึ่งรอบเกลียวจะประกอบด้วยคู่เบสจำนวน 10 คู่ ซึ่งแต่ละคู่จะอยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร ดังนั้นเกลียวคู่ที่หมุนภายในหนึ่งรอบจึงมีความยาว 3.4 นาโนเมตร และจากเกลียวคู่นี้เองทำให้ดีเอ็นเอมีลักษณะคล้ายบันไดเวียนขวา (Double helix) และเกิดเป็นร่อง 2 ขนาด คือ ร่องใหญ่ (Major groove) และร่องเล็ก (Minor groove) โดยเกลียวคู่ของดีเอ็นเอจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นาโนเมตร และเมื่อดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ได้รับความร้อน พันธะไฮโดรเจนที่ยึดกันระหว่างเบสคู่สมจะถูกทำลาย ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวได้ โดยเรียกสภาวะแบบนี้ว่า การเสียสภาพ (Denaturation) แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอก็สามารถกลับมาเข้าคู่กันใหม่ได้อีกครั้ง เรียกสภาวะแบบนี้ว่า การคืนสภาพ (Renaturation) (Watson and Crick 1953)

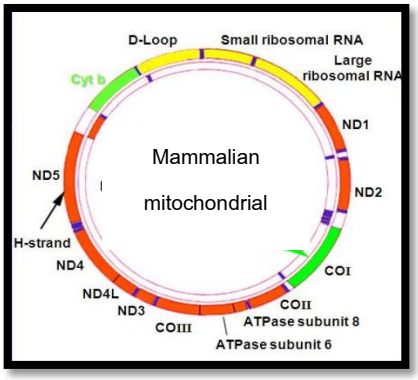


รูปที่ 11 โครงสร้างและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (Stuff 2003)

1.2.4.3 โครงสร้างและหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม ทำหน้าที่ในกระบวนการหายใจและเป็นแหล่งผลิตอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) ซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ไมโทคอนเดรียพบได้ในเซลล์ยูคาริโอต โดยจำนวนไมโทคอนเดรียในเซลล์แต่ละเซลล์จะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและกิจกรรมของเซลล์นั้นๆว่ามากน้อยเพียงใด ลักษณะโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ เยื่อหุ้มด้านนอก มีลักษณะเรียบหนาประมาณ 60-80 อังสตรอมและเยื่อหุ้มด้านในมีลักษณะเป็นรอยหยักพับเข้าหากัน เรียกว่า คริสตี (Cristae) หนาประมาณ 60-80 อังสตรอม เช่นเดียวกัน (สมพร 2546) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีดีเอ็นเอเป็นของตัวเอง เรียกว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA, mtDNA) ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีโครงสร้างง่ายๆ ลักษณะเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบวงกลม (Double stranded circular DNA) จำนวน 1 วง มีความยาวประมาณ 16-20 กิโลเบส โดยสายที่ประกอบด้วยเบสพิวรีนมากกว่าอีกสายหนึ่ง เรียกว่า Heavy strand (H-strand) และอีกสายหนึ่งเรียกว่า Light strand (L-strand) ซึ่งจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไพริมิดีนมากกว่า (ฐิติกา 2556)

ขนาดของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีความยาวประมาณ 16-20 กิโลเบส จำนวนยีนในไมโทคอนเดรียมีทั้งหมด 37 ยีน โดยเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็น Transfer RNA (tRNA) จำนวน 22 ยีน ถอดรหัสเป็น Ribosomal RNA (rRNA) จำนวน 2 ยีน และแสดงออกเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในเซลล์ซึ่งใช้ในกระบวนการหายใจอีกจำนวน 13 ยีน (Taanman 1999) (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ตำแหน่งของยีนบนไมโทคอนเดรียลจีโนม

(http://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903#)

1.2.4.4 ความสำคัญของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์

การตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์จากวัตถุพยานในทางนิติ-วิทยาศาสตร์ นิยมเลือกใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่ในไมโทคอนเดรียหรือที่เรียกว่า ไมโทคอน-เดรียลดีเอ็นเอ (Wilson *et al.* 1995) ซึ่งจะมีขนาดเล็กและมีอัตราการกลายพันธุ์สูง ทำให้สามารถพบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมอีกหลายประการ ดังนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียมีความผันแปรสูง พบว่า มากกว่าในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ต่างชนิดกันมีความหลากหลายและแตกต่างกันมาก (High inter-species variation) ในขณะที่ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสัตว์ชนิดเดียวกันพบได้น้อยมาก (Low intra-species variation) นับว่าเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมในการระบุชนิดของสัตว์ได้อย่างน่าเชื่อถือ (Holland and Parsons 1999)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีจำนวนซ้ำ (Copy number) ของดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากและภายในไมโทคอนเดรียหนึ่งอัน สามารถพบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ 5-10 โมเลกุล ดังนั้นในหนึ่งเซลล์อาจพบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ประมาณ 1,000-3,000 โมเลกุล ขึ้นอยู่กับหน้าที่และความต้องการในการใช้พลังงานปริมาณมากน้อยเพียงใด (Holland and Parsons 1999) ซึ่งคุณสมบัติที่ได้กล่าวมานี้มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่มักพบดีเอ็นเอในปริมาณน้อยและดีเอ็นเอมักเสื่อมสภาพและถูกทำลายไป การเลือกใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบวัตถุพยานดังกล่าว จึงอาจจะได้ผลจากการตรวจสอบมากขึ้น นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆที่ส่งผลต่อการทำลายดีเอ็นเอ เช่น ความร้อน แสงแดด เป็นต้น และสำหรับวัตถุพยานที่มีอายุเก่าแก่ก็สามารถตรวจพบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ (Cronin *et al.* 1991) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไมโทคอนเดรียประกอบด้วยเยื่อหุ้มสองชั้นดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้สามารถรักษาสภาพของดีเอ็นเอได้ดีกว่าในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

1.2.4.5 เครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมใช้ในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์

เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นิยมใช้ในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์ คือ ยีนไซโตโครมบี (Cytochrome b) ซึ่งมีความยาว 1,140 คู่เบส อยู่ระหว่างเบสที่ 14,747 และ 15,887 ในไมโทคอนเดรียลจีโนมของมนุษย์ (สมพร 2546) และยีนไซโตโครมซี-ออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 (cytochrome c oxidase I gene, COI) มีความยาว 1,541 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ายีนไซโตโครมบี อยู่ระหว่างเบสที่ 5,904-7,445 ในไมโทคอนเดรียจีโนมของมนุษย์ (Anderson *et al.* 1981) เนื่องจากยีนทั้งสองตำแหน่งมีความผันแปรสูง (High variation) (Clayton 1982) และมีการรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนทั้งสองตำแหน่งนี้เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งมีความสะดวกและมีประโยชน์ต่องานวิจัยในการเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ได้อย่างเหมาะสม (Tobe *et al.* 2011) สำหรับข้อดีของยีนไซโตโครมบี คือ มีการรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ชนิดต่างๆไว้เป็นจำนวนมาก แต่มักพบว่ามีการระบุสายพันธุ์ของสัตว์ชนิดนั้นๆไม่ถูกต้อง ซึ่งส่งผลทำให้การออกแบบไพร-เมอร์ไม่ถูกต้องและทำให้ผลการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์ผิดพลาดตามไปด้วย ด้วยเหตุผลนี้ทำให้ยีนไซโตโครมออกซิเดสหรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) (Hebert *et. al* 2003) ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ระบุชนิดของสัตว์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีการตรวจสอบที่มาของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงที่นำมาใช้อย่างถูกต้องแน่นอน สามารถบอกลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตนั้นๆและสามารถแสดงความความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (Hebert *et. al* 2003) จากการศึกษาของ Tobe และคณะ (ปี พ.ศ.2553) ในการเปรียบเทียบความแม่นยำและประสิทธิภาพของยีนไซโตโครมบีและยีนไซโตโครมซีออกซิเดสในการระบุสายพันธุ์ของเลี้ยงลูกด้วยนม โดยนำค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสัตว์ต่างชนิดกัน (Inter-specific) และในสัตว์ชนิดเดียวกัน (Intra-specific) มาใช้ร่วมกับการคำนวณทางสถิติ พบว่า ยีนไซโตโครมบี มีความแม่นยำในการระบุสายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ดีกว่ายีนไซโตโครมซีออกซิเดส (Tobe *et al.* 2010) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยีนอื่นๆอีกหลายชนิดในการระบุชนิดของสัตว์ ได้แก่ ยีนเอ็นเอดีเอชดีไฮโดรจีเนส ซับยูนิต 1 (NADH dehydrogenase subunit 1 (ND 1)) ยีน 16 เอสไรโบโซมอล-อาร์เอ็นเอ (16S rRNA) และยีน 12 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (12S rRNA) เป็นต้น (Dalmosso *et al.* 2004)

1.2.5 เทคนิคระดับโมเลกุลในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์

1.2.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ในการใช้ประโยชน์ดีเอ็นเอจากวัตถุพยานชีวภาพในทางนิติ-วิทยาศาสตร์ ส่วนใหญ่ดีเอ็นเอที่พบจะมีปริมาณน้อยและมีลักษณะเสื่อมสภาพจากสภาพแวดล้อมต่างๆ จึงทำให้ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) (Hebert *et al.* 2004) ในการบ่งบอกชนิดและความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ แต่ถึงอย่างไรวิธีการแรกที่จำเป็นต้องปฏิบัติในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์ คือ การตรวจสอบเปรียบเทียบลักษณะของวัตถุพยานนั้นๆจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาก่อนถึงแม้ว่าการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจสอบก็ตาม หลังจากนั้นก็ใช้วิธีการอื่นๆในการตรวจสอบซึ่งวิธีการที่นิยม คือ การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) (Vignal *et al.* 2002) โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์

ช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการคิดค้นเทคนิคต่างๆเกิดขึ้นมากมายซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาให้เกิดความเจริญก้าวหน้าทางด้านอณูชีววิทยา ในบรรดาเทคนิคต่างๆที่คิดค้นขึ้นมานั้น เทคนิคที่ทำให้สายงานทางด้านอณูชีววิทยาเกิดความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก คือ เทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอถูกคิดค้นขึ้นในปี พ.ศ.2526 โดยคารีย์ มูลลีส (Kary Mullis) (Bartlett and Stirling 2003) ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพอลิเมอเรส-เชนรีเอ็คชัน (Polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายซ้ำๆกันหลายรอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบซึ่งถ้าเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นจำนวน n รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ก็จะเท่ากับ 2^n และเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอตามที่ต้องการ (Innis *et al.* 1990) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจึงต้องใช้สารเคมีเป็นองค์ประกอบ ดังนี้

ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ สามารถใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดหรือดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างโดยตรง และเนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยให้มีปริมาณเพิ่มมาก

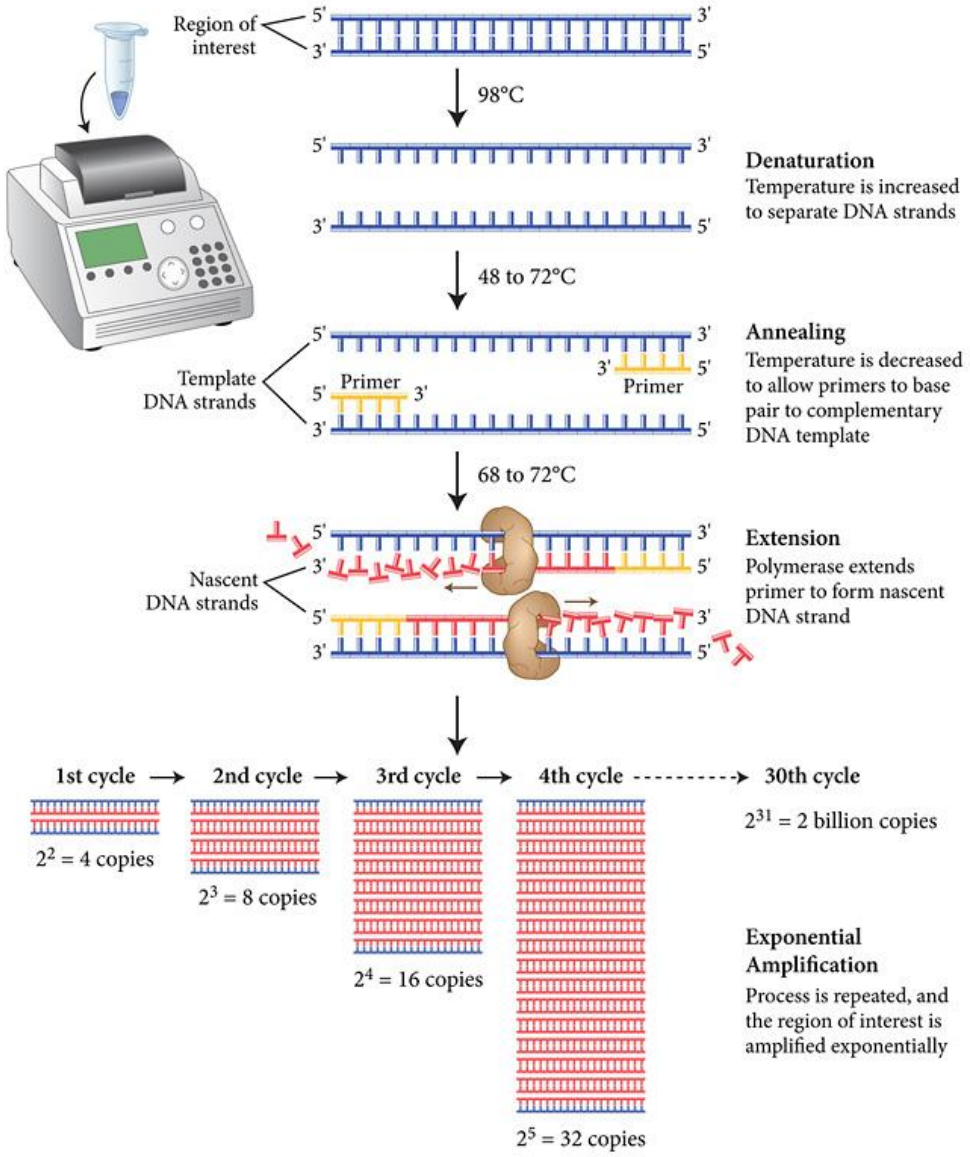
ขึ้นเป็นล้านๆเท่าได้ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งนับว่าเป็นปฏิกิริยาที่มีความไววิเคราะห์สูง (Sensitivity) การปนเปื้อนดีเอ็นเอจากภายนอกจึงเป็นปัญหาสำคัญในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงต้องทำในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาที่มีการควบคุมและระมัดระวังการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้อง จากสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น จากเส้นผม ผิวหนัง น้ำลาย และอากาศ เป็นต้น และในการปฏิบัติงานควรใส่ผ้าปิดปาก สวมเสื้อคลุม และสวมถุงมือทุกครั้ง ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะอยู่ในช่วง 1 นาโนกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม และจะต้องทำหลอดควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอ (Negative control) และหลอดควบคุมที่ใส่ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ (Positive control) ทุกครั้ง เพื่อสะดวกในการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้

ไพรเมอร์ (Primer) ถือเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายสำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวประมาณ 18-24 เบส ไพรเมอร์มี 2 ชนิด คือ ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) ซึ่งออกแบบจากบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันของสัตว์ทุกชนิดและไพรเมอร์อีกชนิดจะเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย (Species-specific primer) ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างสัตว์เป้าหมายกับสัตว์ชนิดต่างๆ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีลักษณะเป็นคู่ๆ โดยแบ่งเป็นไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ด (Reverse) และด้านฟอเวิร์ด (Forward) ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่ควรมีจำนวนเบส G+C เท่าๆกันเพื่อให้อุณหภูมิ melting ของไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันการออกแบบไพรเมอร์สามารถออกแบบได้ด้วยโปรแกรมสำหรับรูปซึ่งจะมีความสะดวกและรวดเร็ว (Dieffenbach *et al.*1993)

เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพรเมอร์ เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสมีหลายชนิด ดังนั้นการเลือกใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จึงขึ้นอยู่กับประเภทของการศึกษาว่าต้องการความถูกต้องในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอมากน้อยเพียงใดและต้องการเอนไซม์ที่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีแค่ไหน สำหรับเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ เอนไซม์ *Taq* polymerase ซึ่งเป็น Thermostable DNA polymerase ที่แยกสกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* แบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาศัยอยู่บริเวณบ่อน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติทนความร้อนและสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 70-80 องศาเซลเซียส เหมาะสมในการ

นำมาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เนื่องจากเอนไซม์จะไม่สูญเสียคุณสมบัติในขั้นตอนที่ต้องใช้ความร้อนในการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดียวในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Kidd and Ruano 1995)

นอกจากองค์ประกอบหลักที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วนั้น การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ยังต้องใช้ Deoxynucleotides (dNTPs) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ dATP (Deoxyadenosine triphosphate) dCTP (Deoxycytidine triphosphate) dTTP (Deoxythymidine triphosphate) dGTP (Deoxyguanosine triphosphate) (Henegariu *et al.* 1997) โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสจะทำหน้าที่ในการนำนิวคลีโอไทด์แต่ละหน่วยย่อยมาเชื่อมต่อจากไพรเมอร์บริเวณปลาย 3’ และมีบัฟเฟอร์ (Buffer) ซึ่งทำหน้าที่ในการปรับสภาวะต่างๆให้เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น ค่าพีเอช และเกลือต่างๆ โดยบัฟเฟอร์จะมีแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) อยู่ด้วยเสมอ เนื่องจากแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ดังนั้นความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนจึงมีผลต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นอย่างมาก ความเข้มข้นที่ใช้จะต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของสารอื่นที่ใช้ด้วย แต่ปัจจุบันบัฟเฟอร์มักมาพร้อมกับเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ซึ่งจะมีการปรับความเข้มเข้นของแมกนีเซียมไอออนมาแล้ว ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะเกิดขึ้นซ้ำกันต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยในแต่ละรอบ (Cycle) จะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ของดีเอ็นเอแม่แบบให้เป็นสายเดี่ยวด้วยการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (Denaturation) โดยการใช้ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพนิยมใช้อุณหภูมิประมาณ 94 องศาเซลเซียส ขั้นตอนที่ 2 เป็นการคืนสภาพ (Annealing) กล่าวคือ เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ถูกแยกออกจากกันจะลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกัน ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะสังเคราะห์จากด้าน 5' ของไพรเมอร์ ไปยังด้าน 3' ตามลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย เรียกขั้นตอนนี้ว่าไพรเมอร์เอ็กเทนชัน (Primer Extension) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานทำให้มีการสังเคราะห์พอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบเดิม (Innis *et al.* 1990) โดยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 13

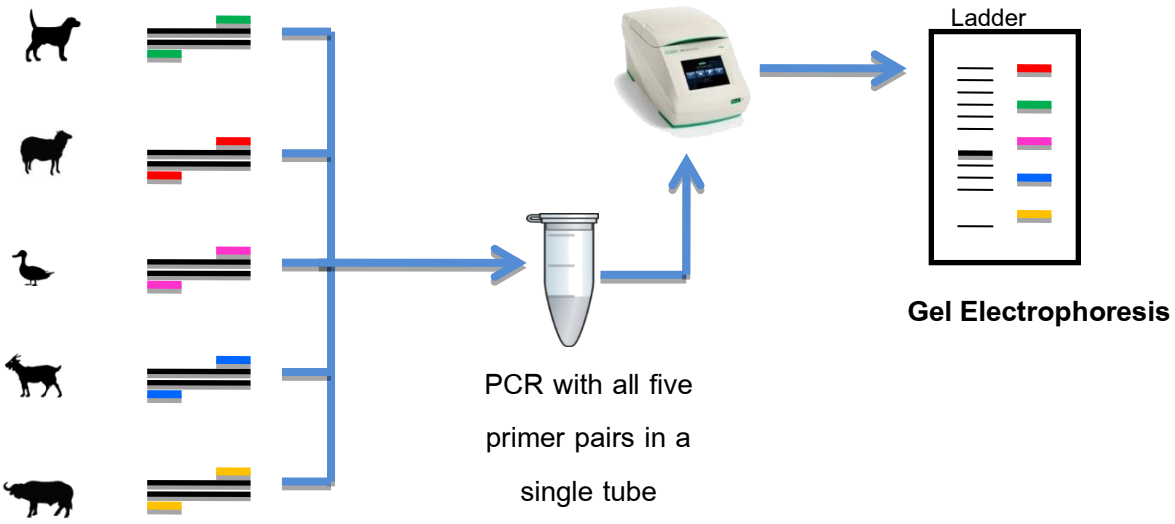


รูปที่ 13 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์ (PCR)

(New England BioLab.Ltd)

1.2.5.3 เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

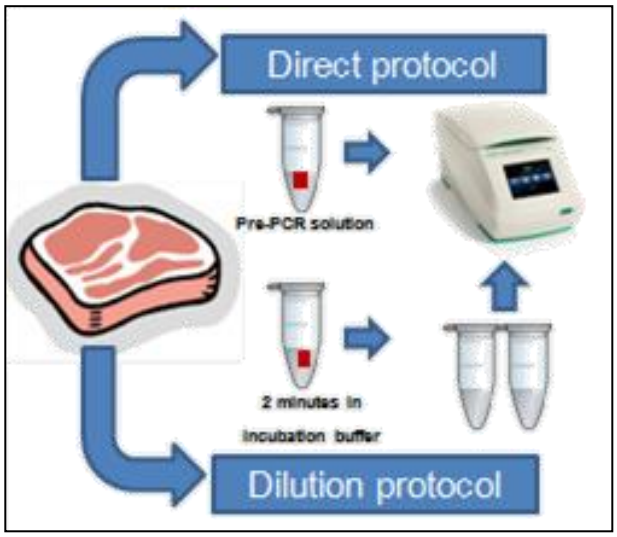
สำหรับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) นับว่าเป็นเทคนิคหนึ่งที่ประยุกต์มาจากเทคนิคพีซีอาร์ โดยจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพร-เมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว ไพรเมอร์แต่ล่ะคู่ที่นำมาใช้ต้องออกแบบให้มีคุณสมบัติเหมาะสม คือ จะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างไพรเมอร์ ซึ่งถ้าไพรเมอร์ที่นำมาใช้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3’ เป็นคู่สม (Complementary) จะสามารถทำปฏิกิริยาระหว่างกันและทำหน้าที่เสมือนไพรเมอร์แม่พิมพ์ ซึ่งเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสสามารถใช้เป็นสับสเตรทสร้างสายใหม่ออกจากปลาย 3’ ของไพรเมอร์ทั้งสองสายได้ ก่อให้เกิด primer-dimer และไพรเมอร์ที่ดีจะต้องไม่เกิด hair-pin ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อไพรเมอร์เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ภายในสายโดยลำดับนิวคลีโอไทด์บางเบสมีลักษณะเป็นคู่สมกัน จึงทำให้มีการม้วนของไพรเมอร์มาจับกันเองเกิดเป็นลักษณะ hair-pin ขึ้น (Henegariu *et al.* 1997) ดังนั้นการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาใช้ในเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์จึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก ทั้งนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกหลายปัจจัยที่ส่งเสริมให้การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ประสบความสำเร็จ ได้แก่ ขนาดความยาวของผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อทำการแยกและตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) ขนาดความยาวของผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นหลายแถบซึ่งสอดคล้องกับสิ่งมีชีวิตเป้าหมายแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 14 และในการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ต้องออกแบบไพรเมอร์และปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมเช่นกัน โดยสภาวะที่ต้องปรับ ได้แก่ ค่าอุณหภูมิ annealing (Ta) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากค่าอุณหภูมิ melting (Tm) โดยประมาณจากสูตร Tm-[4*(G+C)]+[2*C] ค่าที่ได้จากการคำนวณจะมีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิ annealing ที่นิยมใช้จะมีค่าน้อยกว่าอุณหภูมิ melting อยู่ประมาณ 5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไพรเมอร์และปริมาณดีเอ็นเอก็ต้องปรับให้เหมาะสมเช่นกัน เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกมีความน่าเชื่อถือและสามารถตรวจสอบและระบุชนิดของสัตว์ได้มากกว่าหนึ่งชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียว (Henegariu *et al.* 1997)



รูปที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายต่างชนิดกันโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

1.2.5.4 เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR) เป็นอีกเทคนิคที่ได้รับความนิยม ซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิคพีซีอาร์ เดิมดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอก่อนนำมาใช้ การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดแต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานานและมักพบปัญหาการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไม่เพียงพอต่อการใช้งาน (Bogner and Killeen 2005) ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์มาใช้กันมากขึ้น โดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องและลดการสูญเสียดีเอ็นเอจากขั้นตอนการสกัดแต่ละขั้นตอนได้อีกด้วย เทคนิคดังกล่าวจึงเป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว มีความไววิเคราะห์สูง ดีเอ็นเอที่ได้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์นั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ ไดลูชั่นโพรโทคอล (Dilution protocol) หรือเตรียมตัวอย่างก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และไดเร็คโพรโทคอล (Direct protocol) หรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรง (Kitpipit *et al.* 2013) ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งทั้งสองวิธีมีขั้นตอนที่แตกต่างกันเล็กน้อย คือ ไดลูชั่นโพรโทคอลจะเติมสารละลายลงไปในตัวอย่างและนำส่วนใสมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ส่วนไดเร็คโพรโทคอลจะนำตัวอย่างเนื้อของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรง จากการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของทั้งสองวิธี พบว่า ไดลูชั่นโพรโทคอล มีอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างต่างชนิดได้มากกว่าและมีประสิทธิภาพดีกว่า (Kitpipit *et al.* 2014)



รูปที่ 15 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาไดเร็คพีซีอาร์ซึ่งมี 2 วิธีการ ได้แก่ ไดลูชั่นโพรโทคอลและไดเร็คโพรโทคอล

1.2.5.5. ปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ (Factor affecting and Optimizing PCRs)

บางครั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ อาจได้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ปริมาณน้อยหรือไม่ได้ผลตามที่ต้องการ และอาจพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลผลิต (Nonspecific band) เกิดขึ้น (Innis and Gelfand 1999) จึงจำเป็นต้องหาสาเหตุของปัญหาที่เกิดขึ้นและทำการปรับสภาวะต่างๆในการทำพีซีอาร์ ถึงแม้ว่าการปรับสภาวะให้มีความเหมาะสมจะต้องใช้เวลานานและใช้ค่าใช้จ่ายสูงก็ตาม เพื่อให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีประสิทธิภาพและมีปริมาณมาก การเพิ่มประสิทธิภาพของพีซีอาร์สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับปัญหาที่พบเจอ (Kidd and Ruano 1995) เช่น ถ้าปัญหาที่เกิดขึ้น คือ พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช้ผลผลิต (Nonspecific band) สิ่งที่ควรปฏิบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพของพีซีอาร์ ได้แก่ ปรับเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน annealing ซึ่งขั้นตอนนี้ไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยอุณหภูมิ annealing ที่ต่ำกว่าอุณหภูมิ melting ของไพรเมอร์มากๆ ส่งผลให้ไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งที่ไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงต้องเพิ่มอุณหภูมิและเวลาให้มากขึ้นในช่วงการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในรอบแรกๆ จากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงหรืออาจเลือกใช้ Hot-start enzyme และปรับจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้เหมาะสม โดยจำนวนรอบที่นิยมใช้ประมาณ 30-35 รอบ หรือไม่ควรเกิน 40 รอบ เนื่องจากจำนวนรอบที่มากอาจทำให้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการได้ และถ้าปัญหาที่เกิดขึ้น คือ ปริมาณผลิตผลพีซี-อาร์ที่ได้มีปริมาณน้อย สิ่งที่ควรปรับในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ ปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียม ซึ่งความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่มากหรือน้อยเกินไปล้วนแต่ส่งผลต่อปฏิกิริยาพีซี-อาร์ทั้งสิ้น สำหรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่มากเกินไป จะทำให้ดีเอ็นเอสายคู่มีความเสถียรภาพ ส่งผลให้ไปขัดขวางขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลที่ได้ คือ ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีปริมาณน้อยและการใช้แมกนีเซียมที่มีความเข้มข้นมากเกินไป ยังทำให้ไพรเมอร์ไปจับกับตำแหน่งที่ไม่เจาะจง ผลที่ได้ คือ ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่จำเพาะ ส่วนความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่น้อยเกินไป (น้อยกว่า 0.5 ไมโครโมลาร์) จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ซึ่งทำให้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสทำงานได้น้อยลง โดยแมกนีเซียมทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (Co-factor) ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส จะทำการตรวจสอบความถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์และอาจมีการปรับองค์ประกอบอื่นได้อีก เช่น ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบหรือเพิ่ม

ปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ แต่อย่างไรก็ตามการปรับความเข้มข้นและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่มากเกินไปอาจทำให้มีปริมาณของตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน และอาจปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์หรือเลือกใช้ไพรเมอร์ใหม่ เป็นต้น (Innis and Gelfand 1999)

1.2.5.6 ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็วและมีความไววิเคราะห์สูง ฉะนั้นปฏิกิริยาพีซีอาร์จึงมีความไวต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซี-อาร์ (PCR inhibitor) เช่นกัน สำหรับตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นปัจจัยที่ขัดขวางการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งผลที่ตามมาจากการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีปริมาณลดลงหรือผลที่ได้เป็นผลลบปลอม (False-negative) ตัวยับยังปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น เกิดขึ้นจากตัวอย่างโดยตรงหรืออาจจะเกิดขึ้นจากการเตรียมตัวอย่าง ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบ (Matrix) ในตัวอย่าง อย่างไรก็ตามตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถพบได้ทั้งจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน อากาศ เป็นต้น จากอาหาร เช่น เนื้อ นม ผัก ผลไม้ เป็นต้น แต่สำหรับตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่พบจากวัตถุพยานทางชีวภาพและวัตถุพยานทางเคมีในงานนิติวิทยาศาสตร์มีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่พบจากวัตถุพยานทางนิติวิทยาศาสตร์ (Alaeddini 2012)

แหล่งที่มาของตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์	**ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์**	**อ้างอิง**
เลือด (Blood)	- ฮีม (Heme) - ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) - แลคโตเฟอร์ริน (Lactoferrin) - อิมมูโนโกลบูลินจี (Immunoglobulin G)	(Akane *et al.* 1994)
ปัสสาวะ (Urine)	- ยูเรีย (Urea)	(Al-Soud *et al.* 2000, Wilson 1997)

แหล่งที่มาของตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์	ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์	อ้างอิง
กล้ามเนื้อ (Muscle Tissue)	- ไมโอโกลบิน (Myoglobin)	(Belec *et al.* 1998)
เส้นผม (Hair)	- เมลานิน (Melanin)	(Yoshii *et al.* 1992)
	- ยูเมลานิน (Eumelanin)	
กระดูก (Bone	- แคลเซียม (Calcium ion)	(Yoshii *et al.* 1993)
ดิน (Soil)	- กรดฮิวมิค (Humic acid)	(Opel *et al.* 2010)
กางเกงยีนส์ (Denim)	- สีย้อม (Indigo dye)	(Watson and Blackwell 2000)

1.2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์และเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ในหลากหลายสาขา รวมถึงนำมาใช้ในการจำแนกและระบุชนิดของเนื้อสัตว์อย่างแพร่หลาย โดยที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาและพัฒนาเทคนิคระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่

Matsunaga และคณะ (ปี พ.ศ.2542) ได้นำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ มาใช้เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่เป็นวัตถุดิบหลักในผลิตภัณฑ์อาหารจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อแพะ เนื้อแกะ และเนื้อม้า โดยไพรเมอร์ด้านฟอร์เวิร์ดถูกออกแบบบนลำดับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียตรงตำแหน่งยีนไซโตโครมบี ส่วนไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ดถูกออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อแพะ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อหมูและเนื้อม้า มีขนาดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 157 227 274 331 398 และ 439 คู่เบส ตามลำดับ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่า สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อแกะ และเนื้อแพะ ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีได้แต่เนื้อม้าที่ผ่านอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้และปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 0.25 นาโนกรัม (Matsunaga *et al.* 1999)

Bottero และคณะ (ปี พ.ศ.2546) ทำการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการระบุชนิดของวัว แพะ และแกะ จากผลิตภัณฑ์นม โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงถูกออกแบบจากยีน 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA) และยีน 12 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (12S rRNA) เพื่อให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของแกะ แพะ วัว แตกต่างกัน ได้แก่ 172 326 และ 256 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเทคนิคถูกนำไปใช้ตรวจสอบชีส 19 ตัวอย่างจากร้านค้าขายปลีก พบว่า เทคนิคสามารถให้ผลการตรวจสอบได้รวดเร็วและมีความไววิเคราะห์ (Sensitivity) ที่สูง (Bottero *et al.* 2003)

Dalmasso และคณะ (ปี พ.ศ.2547) นำเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มาใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในวัตถุดิบการทำอาหารสัตว์ โดยทำการระบุชนิดของเนื้อสัตว์หลายประเภท ได้แก่ สัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก ปลา และวัตถุดิบที่มาจากส่วนต่างๆของหมู ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาใช้ได้รับการออกแบบจากตำแหน่งที่แตกต่างกันของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ยีน 12S rRNA ยีน tRNA Val และ 16S rRNA) จากนั้นทำการรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งไพรเมอร์ของสัตว์เคี้ยวเอื้องถูกออกแบบให้มีขนาด 104-106 คู่เบส สัตว์ปีกมี

ขนาด 183 คู่เบส ปลามีขนาด 220-230 คู่เบส และไพรเมอร์ของหมูมีขนาด 290 คู่เบส ผลจากการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ควบคู่กับวิธีการใช้กล้องจุลทรรศน์ในครั้งนี้ พบว่า สามารถตรวจสอบวัตถุดิบจากสัตว์ต้องห้ามตามกฎระเบียบของสหภาพยุโรปได้ (Dalmasso *et al.* 2004)

Ghovvati และคณะ (ปี พ.ศ.2552) ได้ทำการตรวจสอบการทุจริตโดยการปลอมปนผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ สัตว์ที่เลือกใช้ในการศึกษา คือ สัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีกและหมู โดยเลือกตรวจสอบจากเนื้อสัตว์ที่วางขายทั่วไป ไส้กรอก และเนื้อสัตว์ตัดแต่งแช่แข็ง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ยีนจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ได้แก่ ยีน 16 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (16S rRNA) และยีน 12 เอสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (12S rRNA) ผลการตรวจสอบ พบว่า ในทุกตัวอย่าง ไม่มีหมูปนเปื้อน แต่ 40 % ของตัวอย่างไส้กรอก และ 30 % จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ตัดแต่งแช่แข็งพบการปนเปื้อนสัตว์ปีก ส่วนเนื้อสัตว์ที่วางขายทั่วไป ไม่พบการปนเปื้อนจากสัตว์ปีก (Ghovvati *et al.* 2009)

Eun และคณะ (ปี พ.ศ.2556) ได้พัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับการระบุสายพันธุ์ของวัว หมู ไก่ และเป็ดจากเนื้อดิบ เพื่อปกป้องผู้บริโภคจากการถูกหลอกลวงด้วยการปลอมปนเนื้อสัตว์ที่ผิดกฎหมาย ด้วยเหตุผลทางเศรษฐกิจ ศาสนาและสุขภาพ โดยขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของหมู ไก่ วัว และเป็ด ได้แก่ 94 192 279 และ 477 คู่เบส ตามลำดับจากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรวจพบได้อยู่ที่ 1 พิโคกรัม ส่วนผลการทดสอบจาก 145 ตัวอย่าง (วัว 55 ตัวอย่าง หมู 30 ตัวอย่าง ไก่ 30 ตัวอย่าง และเป็ด 30 ตัวอย่าง) พบว่า เทคนิคสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ดังกล่าวได้ทั้งหมด และผลการทดสอบกับตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่น เช่น ม้า แกะ แพะ และไก่งวง พบว่าเทคนิคไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เหล่านั่นได้ดังนั้นแสดงว่าเทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจง และสามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของสัตว์ได้ (Cho 2013)

Kitpipit และคณะ (ปี พ.ศ.2556) นำเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์มาใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์จำนวน 6 ชนิด โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงถูกออกแบบจากยีนไซโตโครมบี (Cyt *b*) ยีนไซโตโครมออกซิเดส หน่วยย่อยที่ 1 (COI) และยีน 12 เอสไรโบโซ-มอลอาร์เอ็นเอ (12S rRNA) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว มีขนาดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 100 119 133 155 253 และ 311 คู่เบส ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ เป็น

เทคนิคที่มีความไววิเคราะห์ที่ดี สะดวกและประหยัดค่าตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้จริง (Kitpipit *et al.* 2014)

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาและพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เนื้อสุนัข (*Canis lupus familiaris*) เนื้อเป็ด (*Anas platyrhynchos domestica*) เนื้อแพะ (*Capra hircus*) เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) และเนื้อแกะ (*Ovis aries*) ในการทดสอบครั้งเดียว

2.เพื่อทวนสอบการใช้งานชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น โดยทวนสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ความไววิเคราะห์ (Sensitivity test) การทำซ้ำ (Reproducibility) และทวนสอบกับอาหารทั่วไปในท้องตลาด (Commercial food test)

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการ

2.1.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาจะต้องมีการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์นั้นๆ ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) หรือทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยนำตัวอย่างเนื้อที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian universal primer) ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 520 คู่เบส (ไพรเมอร์ด้านฟอร์-เวิร์ด 5-CCYATYATRATYGGAGGGTTYGGHAAYTG-3 และไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ด 5-CDGGGTGTCCRAARAAYCARAATARGTGTTG-3, Kitpipit *et al.* 2014) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (GenBank) ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเลือกใช้ Blastn เพื่อระบุชนิดของสัตว์ก่อนนำมาใช้ในการศึกษา จากนั้นตัดชิ้นเนื้อที่ทราบชนิดพันธุ์แล้วด้วยมีดที่ปราศจากเชื้อ (Sterile scalpel) ใส่ถุงซิปที่สะอาด ปราศจากเชื้อ พร้อมทั้งระบุชนิดของเนื้อ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เพื่อป้องกันการสับเปลี่ยนตัวอย่างและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงชื่อวิทยาศาสตร์ ชนิด จำนวน และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
สุนัข (Dog)	*Canis lupus familiaris*	เลือด (Blood)	2	จังหวัดสงขลา
ควาย (Buffalo)	*Bubalus bubalis*	เลือด (Blood) เนื้อ (Meat)	1 4	จังหวัดสงขลา จังหวัดพัทลุง จังหวัดภูเก็ต

ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
เป็ด (Duck)	*Anas platyrhynchos domestica*	เนื้อ (Meat)	7	จังหวัดสงขลา จังหวัดยะลา จังหวัดสตูล
แพะ (Goat)	*Capra hircus*	เนื้อ (Meat)	7	จังหวัดสงขลา จังหวัดยะลา จังหวัดสตูล
แกะ (Sheep)	*Ovis aries*	เนื้อ (Meat)	3	จังหวัดสงขลา

2.1.2 การออกแบบไพรเมอร์

การศึกษาครั้งนี้จะเลือกวิเคราะห์ตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายจากยีนไซโตโครม-ซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 (cytochrome c oxidase subunit I, COI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็น-เอ โดยทำการออกแบบยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ด (Reverse-universal primer) และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าแต่ละชนิด (Species-specific primers) ด้านฟอเวิร์ด (Forward) ซึ่งขั้นตอนแรกทำการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ควาย (*Bubalus bubalis*) แพะ (*Capra hircus*) เป็ด (*Anas platyrhynchos domestica*) สุนัข (*Canis lupus familiaris*) และแกะ (*Ovis aries*) รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใกล้เคียงหรือสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำไปประกอบอาหาร (Possible meat species) จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ วัว (*Bos primigenius taurus,Bos primigenius indicus)* กวางแดง (*Cervus elaphus*) กวางซิก้า (*Cervus nippon*) จระเข้ (*Crocodilus acutus*, *Crocodylus novaeguineae*) ช้าง (*Elephas maximus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) แมว (*Felis catus*) ไก่ (*Gallus gallus*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) หมูป่า (*Sus scrofa*) และหมู (*Sus scrofa domesticus*) ดังแสดงในตารางที่ 3 สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย (Species-specific primer) ขั้นตอนแรกทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ดังกล่าวจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ที่ได้มารวบรวม (Sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.2 (Kumar *et al.* 2001)

ทำการ alignment เพื่อเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเดียวกัน หลังจากนั้นออกแบบยูนิ-เวอร์แซลไพรเมอร์ โดยหาตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากที่สุดในสัตว์ทุกชนิด เลือกตำแหน่งดังกล่าวเพื่อออกแบบเป็นยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ และสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ด้านฟอเวิร์ด (Forward) ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย (Species-specific primer) นั้นทำการค้นหาตำแหน่งสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันระหว่างสัตว์เป้าหมายกับสัตว์ชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ตำแหน่งดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน ในการศึกษาครั้งนี้เลือกออกแบบไพรเมอร์ให้ตำแหน่ง SNP อยู่ตรงปลาย 3’

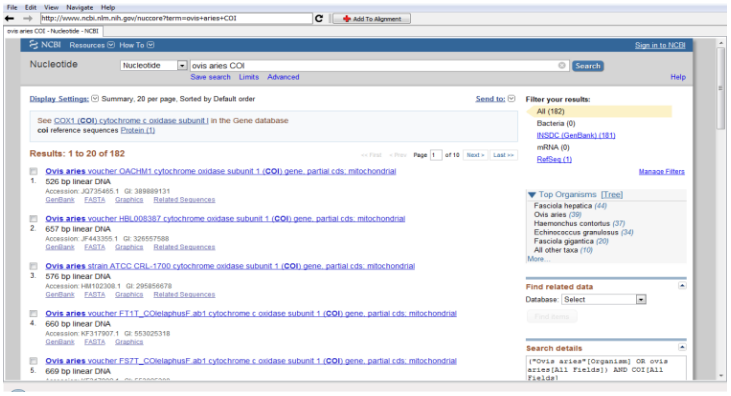
ตารางที่ 3 แสดงชื่อวิทยาศาสตร์ (Species) ตำแหน่งยีน และ Accession number ของตัวอย่างสัตว์ที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

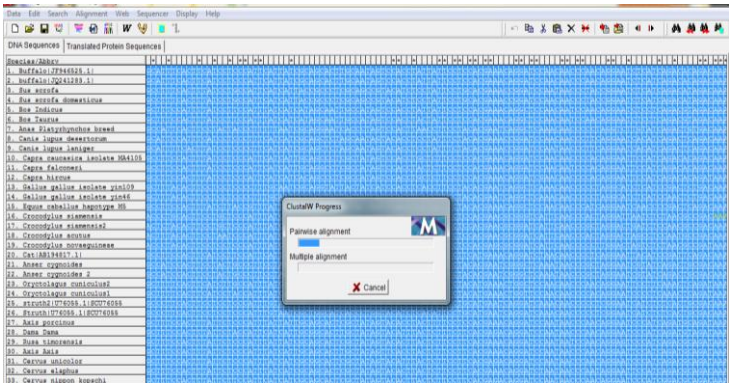
ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ยีน	Accession number Genbank
สุนัข	*Canis lupus familiaris*	COI	JF443208
(Dog)			JN850778
ควาย	*Bubalus bubalis*	COI	JX218054
(Buffalo)			KF385969
เป็ด	*Anas platyrhynchos*	COI	JF499088
(Duck)	*domestica*		JX178052
แพะ	*Capra hircus*	COI	KF317905
(Goat)			FJ958337
แกะ	*Ovis aries*	COI	EF490463
(Sheep)			EF490457
วัว	*Bos primigenius Taurus*	COI	JX218055
(Cow)	*Bos primigenius indicus*		KF952285
กวาง	*Cervus elaphus*	COI	JF700147
(Deer)	*Cervus Nippon*		KF509970

ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ยีน	Accession number Genbank
จระเข้	*Crocodylus acutus*	COI	KF273841.
(Crocodile)	*Crocodylus novaeguineae*		NC_015651
ช้าง	*Elephas maximus*	COI	KF983348
(Elephant)			KF385965
แมว	*Felis catus*	COI	FJ958340
(Cat)			JF443237
ไก่	*Gallus gallus*	COI	JX178026
(Chicken)			KF799988
นกกระจอกเทศ	*Struthio camelus*	COI	JX178057
(Ostrich)			U76062
หมู	*Sus scrofa*	COI	EU623453
(Pig)	*Sus scrofa domesticus*		JX218087

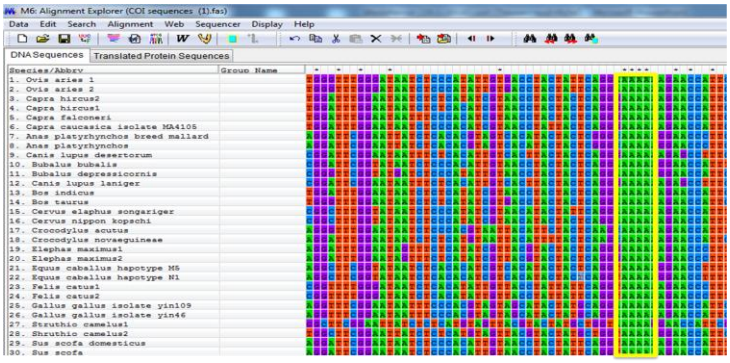
เมื่อออกแบบไพรเมอร์ได้ตามที่ต้องการแล้ว นำไพรเมอร์ไปตรวจสอบคุณสมบัติเพื่อให้มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคุณสมบัติที่ต้องตรวจสอบ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบของเบส G และ C และตรวจสอบการเข้าคู่กันของเบสบนสายไพรเมอร์เดียวกัน (Self-complementarity) ปัจจุบันมีโปรแกรมที่สามารถใช้ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์หลากหลายโปรแกรม สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northestern.edu/biotools/oligocalc.html) ซึ่งข้อดีของการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์นั้น ช่วยลดปัญหาที่จะเกิดขึ้นในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาการทำพีซีอาร์ นอกจากนั้นยังมีการตรวจสอบคุณสมบัติอื่นๆ อีก เช่น การปรับอุณหภูมิ melting ของทุกไพรเมอร์ให้ใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วง 66.0-67.0 องศาเซลเซียส โดยใช้โปรแกรม Thermo scientific (http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/) ทั้งนี้ได้แสดงขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ในรูปที่ 16 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบในตารางที่ 4

- ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมายทั้ง จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นรวบรวม Sequence alignment โดยใช้ซอฟแวร์ MEGA 5.2

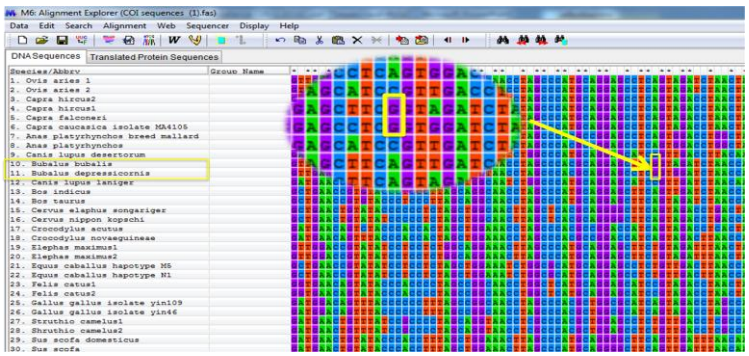




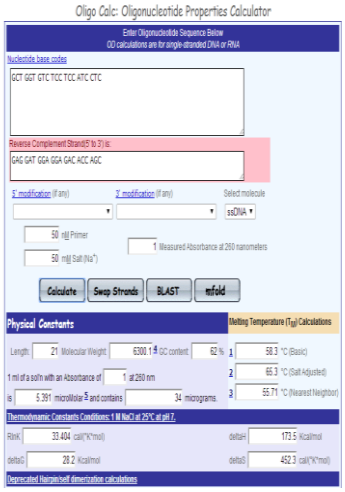
- ออกแบบรีเวิร์สยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ (Reverse universal primer)

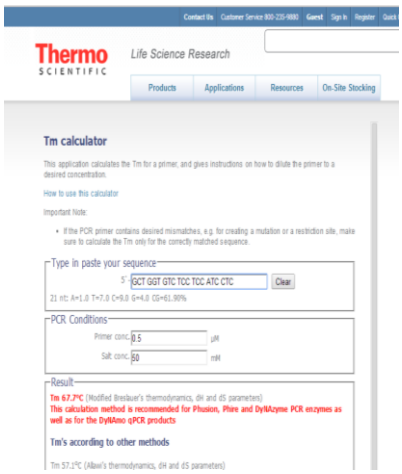


- ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิด (Forward species-specific primers)



- ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator และใช้โปรแกรม Thermo scientific ในการปรับอุณหภูมิ melting ของทุกไพรเมอร์ให้ใกล้เคียงกัน





รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนต่างๆในการออกแบบไพรเมอร์

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษานี้

ชนิดสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (5'⟶ 3')	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	Tm (°C)
Dog	Dog-specific 1	F:GACCTTACAATTTTCTCCTTACACTTAGCC	377	66.5
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
	*Dog-specific 2	F:GTTCTACTCTTACTATCCCTGCCTGTACTG	230	66.1
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Duck	Duck-specific 1	F:GCTGGTGTCTCCTCCATCCTC	350	67.1
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
	*Duck -specific 2	F:CACTCTCACAATACCAAACCCCA	283	67.1
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Goat	Goat-specific 1	F:ATCCTCCTGCTCGCAACAATG	329	68.8
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
	*Goat -specific 2	F:TTTCCCTACACCTAGCAGGCA	363	66.0
	Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Buffalo	Buffalo-specific 1	F: CCACGCAGGAGCTTCG	396	65.2
	Universal COI	R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Sheep	Sheep-specific 1	F: ACTTCTTCCCCCATCTTTCCTG	498	66.1
	Universal COI	R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
	*Sheep-specific 2	F:GTTACTCCTAGCATCCTCTATGGTTGAG	477	66.6
	Universal COI	R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3

* ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์

2.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ ต้องทำการเตรียม Pre-PCR solution โดยนำตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมาย มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 1×1 มิลลิเมตร ใส่ใน

หลอดไมโครเซนติฟิว เติม PBS buffer พีเอช 7.4 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นนำเข้าเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลองที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เนื้อสัตว์ตกตะกอน ดูดส่วนใส (Pre-PCR solution) ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวที่สะอาด ปราศจากเชื้อและดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป (Kitpipit *et al.* 2014)

การศึกษาครั้งนี้เตรียมองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดน้ำยา Phire®Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand) ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร เติมสารเคมีในการทำพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 5 ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง Thermal cycler รุ่น T100™ Bio-Rad โดยสภาวะที่ใช้เริ่มต้นดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นเก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจสอบและแยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยกระแสไฟฟ้าต่อไป ทั้งนี้จะทำการทดสอบหาสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR condition) ที่เหมาะสมที่จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งหมดด้วยไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงที่ออกแบบไว้

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Singleplex PCR)

ส่วนประกอบ	ชุดควบคุมผลบวก (ไมโครลิตร)	ชุดควบคุมผลลบ (ไมโครลิตร)
- 5X PCR [Phire® Animal Tissue PCR Buffer (Thermo Scientific, Thailand)]	4.0	4.0
- 10 mM dNTP	0.4	0.4
- เอนไซม์ DNA polymerase [Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand)]	0.4	0.4
- 10 µM Forward Primer	1	1
- 10 µM Reverse Primer	1	1
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	11.2	13.2
- ดีเอ็นเอแม่แบบ	2	-
ปริมาตรรวม	20	20

ตารางที่ 6 สภาวะเริ่มต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	98	30	1
Denaturation	98	5	
Annealing	66	30	35
Extension	72	60	
Final Extension	4	∞	1

2.1.4 การตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นจึงต้องนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจลอะกาโรส (Agarose gel) ซึ่งอาศัยความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตามโครงสร้างและขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ การทดลองนี้จะทำการนำผลผลิตพีซี-อาร์ที่ได้ไปตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอ บน 2% เจลอะกาโรส สำหรับวิธีการเตรียม 2% เจลอะกาโรส สามารถทำได้โดยชั่งเจลอะกาโรส 2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Tris Borate acid EDTA และ dH_2O ให้ความร้อนและนำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ เติมเอธิเทียมโบรไมด์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เทเจลอะกาโรสลงในถาดเจลให้สูงประมาณ 4-5 มิลลิเมตร วางหวี (Comb) ลงไปที่บริเวณส่วนบนของเจลอะกาโรส รอให้เจลอะกาโรสแข็งตัวประมาณ 30 นาที ถอดหวี จากนั้นนำเจลอะกาโรสไปวางใน electrophoresis tank ที่มี 1X TBE buffer อยู่ ซึ่ง 1X TBE buffer จะต้องท่วมเจลอะกาโรส ผสมผลผลิตพีซีอาร์กับสีย้อม (Loading dye) ในอัตราส่วน 5:1 ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละหลายทั้งหมดลงในช่อง (Well) ของเจล ในการตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทร-โฟรีซีสจะต้องมีการหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ซึ่งใช้สำหรับเทียบขนาดแถบของดีเอ็นเอที่แยกทุกครั้ง โดยส่วนใหญ่จะนิยมหยอดลงไปที่ช่องแรกของเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำแผ่นเจลอะกาโรสมาตรวจสอบผลโดยส่อง

ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตและบันทึกผลและถ่ายภาพด้วยเครื่อง Bio-rad Gel Doc™ EZ System (Bio-rad, USA)

2.1.5 การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex Direct PCR) ที่พัฒนาขึ้น

การศึกษาครั้งนี้ทำการทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับระบุชนิดของเนื้อสัตว์ โดยทำการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) การทดสอบการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความไววิเคราะห์ (Sensitivity test) และการทดสอบกับตัวอย่างอาหาร (Commercial food test)

2.1.5.1 การทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์กับเป้าหมาย (Specificity test)

ทำการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย โดยใช้สารเคมีในการทำพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 7 จากนั้นนำชุดทดสอบดังกล่าวเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมาย จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) ควาย (*Bubalus bubalis*) แกะ (*Ovis aries*) เป็ด (*Anas platyrhynchos domestica*) แพะ (*Capra hircus*) และเนื้อสัตว์อื่นๆ จำนวน 10 ชนิด ที่นิยมนำไปประกอบอาหาร (Possible meat species) ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยทดสอบตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

ส่วนประกอบ	ชุดควบคุมผลบวก (ไมโครลิตร)	ชุดควบคุมผลลบ (ไมโครลิตร)
5X PCR buffer	4.0	4.0
10 mM dNTP	0.4	0.4
เอนไซม์ DNA polymerase	0.4	0.4
Buffalo-specific primer	1	1
Goat-specific primer	1	1
Duck-specific primer	1	1
Dog-specific primer	1	1
Sheep-specific primer	1	1
Universal primer	5	5
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	3.2	5.2
ดีเอ็นเอแม่แบบรวม 5 ชนิด	2	-
ปริมาตรรวม	20	20

ตารางที่ 8 แสดงชื่อวิทยาศาสตร์ จำนวนและแหล่งที่เก็บตัวอย่างสัตว์ที่นำมาใช้ในการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจง

ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
จระเข้ (Crocodile)	*Crocodylus siamensis*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
นกกระจอกเทศ (Ostrich)	*Struthio camelus*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
ม้า (Horse)	*Equus ferus caballus*	1	กรมปศุสัตว์ จังหวัดสงขลา
หมู (Pig)	*Sus scrofa domestica*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
ไก่ (Chicken)	*Gallus gallus domesticus*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
วัว (Cow)	*Bos Taurus*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
กบ (Frog)	*Hoplobatrachus rugulosus*	1	ตลาดสด จังหวัดยะลา
กระรอก (Squirrel)	*Callosciurus finlaysonii*	1	ตลาดสด จังหวัดยะลา
กวาง (Deer)	*Rusa timorensis*	1	ห้างสรรพสินค้า จังหวัดสงขลา
มนุษย์ (Human)	*Homo sapiens*	1	อาสาสมัคร จังหวัดสงขลา

2.1.5.2 การทดสอบการทำซ้ำ (Reproducibility test)

เป็นการตรวจสอบความแม่นยำและตรวจระบุเนื้อสัตว์เป้าหมายซ้ำด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น โดยทำการรวบรวมตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข ควาย แกะ เป็ด และแพะ จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 มาตรวจสอบด้วยชุดทดสอบตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4

ตารางที่ 9 แสดงประเภท จำนวนและแหล่งที่เก็บตัวอย่างของตัวอย่างสัตว์เป้าหมายที่นำมาใช้สำหรับทดสอบการทำซ้ำ

ตัวอย่าง	ประเภท	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
สุนัข (Dog)	- เลือด (Blood)	**8**	
		1	สำนักงานปศุสัตว์อำเภอหาดใหญ่
		1	ปุณณกันต์สัตวแพทย์
		6	คลินิกรักษาสัตว์
	- น้ำคร่ำ (Amniotic fluid)	**1**	
		1	ปุณณกันต์สัตวแพทย์
	- หลอดนำอสุจิ(Spermatic cord)	**1**	
		1	ปุณณกันต์สัตวแพทย์
ควาย (Buffalo)	- เลือด (Blood)	**2**	
		2	สำนักงานปศุสัตว์อำเภอหาดใหญ่
	- เนื้อ (Meat)	**8**	
		4	ตลาดสดตำบลทะเลน้อย
		2	ตลาดสดภูเก็ต
		2	ตลาดสดอำเภอระโนด

ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
เป็ด (Duck)	- เนื้อ (Meat)	**10**	
		1	ตลาดสดอำเภอลำใหม่
		4	ตลาดสดอำเภอรัตภูมิ
		1	ตลาดสดจังหวัดพัทลุง
		1	ตลาดสดจังหวัดยะลา
		1	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้โลตัสหาดใหญ่
		1	ห้างสรรพสินค้าแม็คโครหาดใหญ่
		1	ตลาดสดอำเภอควนโดน จังหวัดสตูล
แพะ (Goat)	- เลือด (Blood)	**2**	
		2	ฟาร์มเลี้ยงแพะ
	- เนื้อ (Meat)	**8**	
		2	ตลาดสดอำเภอลำใหม่
		1	ตลาดสดอำเภอควนโดน
		1	ตลาดสดอำเภอรัตภูมิ
		3	ตลาดสดจังหวัดยะลา
		1	ตลาดสดจังหวัดพัทลุง
แกะ (Sheep)	- เนื้อ (Meat)	**10**	
		4	ท็อปซุปเปอร์มาร์เก็ตสาขาหาดใหญ่
		3	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้โลตัสหาดใหญ่
		3	ห้างสรรพสินค้าแม็คโครหาดใหญ่
รวม		**50**	

2.1.5.3 การทดสอบความไววิเคราะห์ (Sensitivity test)

การทดสอบหาความไววิเคราะห์ในการตรวจสอบระบุเนื้อสัตว์เป้าหมายด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเป็นการทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจสอบได้ โดยเริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ทุกชนิดบนยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 520 คู่เบส (ไพรเมอร์ด้านฟอร์เวิร์ด 5-CCYATYATRATYGGAGGGTTYGGHAAYTG-3 และไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ด 5-CDGGGTGTCCRAARAAYCARAATARGTGTTG-3, Kitpipit *et al.* 2014) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบผลและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส บน 2% เจลอะกาโรส จากนั้นตัดเจลอะกาโรสตรงบริเวณที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 520 คู่เบส เก็บใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ (Purified PCR product) ด้วยชุดน้ำยา QIAquick Gel Extraction เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer นำค่าที่ได้มาคำนวณหาจำนวนซ้ำ (Number of copies) ด้วยสูตรดังแสดง

<u>สูตร</u> **Number of copies** = $\dfrac{(\text{ค่าที่วัดได้} \times 6.022\times10^{23})}{(\text{ความยาวของผลผลิตพีซีอาร์} \times 1\text{x}10^{9})}$

น้ำหนักของคู่เบส (Weight of a base pair) = 650 Daltons.

ค่าคงตัวอาโวกราโดร(Avogadro's number) = $6.022\text{x}10^{23}$ molecules/mole

จากนั้นเจือจางผลผลิตพีซีอาร์ให้มีความเข้มข้น 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจางในอัตราส่วนดังกล่าว ไปสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธีการของ Tobe และคณะ (Tobe and Linacre 2008) โดยใช้เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) ซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง SSoFast Evagreen supermix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นดังที่กล่าวไปข้างต้น ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 3.5 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ รุ่น CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad,USA) เมื่อสิ้นสุดการทำเรียลไทม์พีซีอาร์จะได้กราฟมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อนำดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดมา

ใช้เปรียบเทียบและใช้บอกปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่ในตัวอย่างเนื้อสัตว์แต่ละชนิด เมื่อทราบปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าทั้ง 5 ชนิดแล้ว นำดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100,000 50,000 25,000 12,500 และ 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียลต่อไมโครลิตร นำดีเอ็นเอของสัตว์เป้าทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4

2.1.5.4 การทดสอบกับตัวอย่างอาหาร (Commercial food test)

เป็นการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ดิบและอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปซึ่งวางขายตามท้องตลาด จำนวนประมาณ 62 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อแช่แข็ง 19 ตัวอย่าง อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง 9 ตัวอย่าง เนื้อแห้ง 3 ตัวอย่าง และอาหารที่วางขายตามท้องตลาด 31 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยนำมาตรวจสอบระบุชนิดของเนื้อสัตว์ด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4

ตารางที่ 10 แสดงชนิดและแหล่งที่เก็บตัวอย่างอาหารที่มีส่วนผสมของสัตว์เป้าหมาย

ตัวอย่างอาหาร	จำนวน	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
เนื้อสัตว์แช่แข็ง		
ขาหน้าแพะแช่แข็ง	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
คอเป็ด	1	ตลาดสดอำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา
คอเป็ด	1	ตลาดสดอำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา
คอเป็ด	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
ซี่โครงเนื้อแกะ	1	ท็อป ซุปเปอร์มาร์เก็ต สาขาหาดใหญ่
เนื้อสันในแกะ	1	โลตัส ซูเปอร์เซ็นเตอร์ สาขาหาดใหญ่
เนื้อแกะ	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เนื้อแพะแช่แข็ง	1	ตลาดสด จังหวัดยะลา
เนื้อแพะแช่แข็ง	1	ตลาดสด จังหวัดยะลา
เนื้อแพะแช่แข็ง	1	ตลาดสด จังหวัดยะลา
เนื้อแพะแช่แข็ง	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เนื้อแพะแช่แข็ง	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เศษเนื้อเป็ดแช่แข็ง	1	บิ๊กซีซูเปอร์เซ็นเตอร์ จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่

ตัวอย่างอาหาร	จำนวน	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
เศษเนื้อแพะแช่แข็ง	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
ปีกกลางเป็ด	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
ปีกบนเป็ด	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เป็ดล้วงเครื่องในแช่แข็ง	1	ท็อป ซุปเปอร์มาร์เก็ต สาขาหาดใหญ่
สันในเป็ดแช่แข็ง	1	ท็อป ซุปเปอร์มาร์เก็ต สาขาหาดใหญ่
อกเป็ดเนื้อสัน	1	บิ๊กซีซูเปอร์เซ็นเตอร์ จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง		
เนื้อเป็ดต้มทอดซีพี	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เนื้อเป็ดย่างซีพี	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
บะหมี่เป็ด	1	ท็อป ซุปเปอร์มาร์เก็ต สาขาหาดใหญ่
เบอร์เกอร์แกะ	1	งานแสดงสินค้าฮาลาลนานาชาติ 56 ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี ม.อ.หาดใหญ่
เบอร์เกอร์แพะ	1	งานแสดงสินค้าฮาลาลนานาชาติ 56 ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี ม.อ.หาดใหญ่
เบอร์เกอร์แพะ	1	บิ๊กซีซูเปอร์เซ็นเตอร์ จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เป็ดย่างโฟร์ซีซั่นส์	1	ท็อป ซุปเปอร์มาร์เก็ต สาขาหาดใหญ่
อกเป็ดรมควันซีพี	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
อกเป็ดรมควันดาลี	1	สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาหาดใหญ่
เนื้อสัตว์แห้ง		
เนื้อควายตากแห้ง	1	ทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง
เนื้อควายตากแห้ง	1	จังหวัดขอนแก่น
หนังควายตากแห้ง	1	จังหวัดขอนแก่น
อาหารตามท้องตลาด		
แกงเขียวหวานแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
แกงคั่วเนื้อควาย	1	ร้านอาหารในทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง
แกงแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา
แกงแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ตัวอย่างอาหาร	จำนวน	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
แกงแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
แกงแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอเทพา จังหวัดสงขลา
แกงแพะ	1	ร้านอาหารใน จังหวัดสตูล
แกงมัสมั่นเป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ข้าวหมกแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ข้าวหน้าเป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ข้าวหน้าเป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ข้าวหน้าเป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ข้าวหน้าเป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ซุปแพะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ต้มเป็ดมะขาม	1	ร้านอาหารในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
บะหมี่เป็ด	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เนื้อเป็ดย่าง	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เนื้อเป็ดย่าง	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เป็ดพะโล้	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เป็ดพะโล้	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เป็ดพะโล้	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
เป็ดพะโล้	1	ร้านอาหารในจังหวัดยะลา
เป็ดย่าง	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ผัดเผ็ดเนื้อควาย	1	ร้านอาหารในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา
สเต็กแกะ	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
อกเป็ดรมควัน	1	ร้านอาหารในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2.2 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดสอบ

2.2.1.1 เนื้อควายสด

2.2.1.2 เนื้อเป็ดสด

2.2.1.3 เนื้อแพะสด

2.2.1.4 เนื้อแกะสด

2.2.1.5 เนื้อสุนัขสด

2.2.1.6 เลือดควาย

2.2.1.7 เลือดสุนัข

2.2.2 อุปกรณ์และสารเคมี

2.2.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในเตรียม Pre PCR solution

2.2.2.1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Microcentrifuge)

2.2.2.1.2 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)

2.2.2.1.3 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixing)

2.2.2.1.4 หลอดไมโครเซนติฟิว (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.2.1.5 ทิป (Tip) ขนาด 10 - 100 ไมโครลิตร

2.2.2.1.6 ไมโครปิเปต (Micropipette)

2.2.2.1.7 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2.1.8 กระดาษทิชชู

2.2.2.1.9 ขวดสเปรย์สำหรับใส่ 70% ethanol

2.2.2.1.10 ปากคีบ (Forceps)

2.2.2.1.11 กรรไกร (Scissors)

2.2.2.1.12 ถุงมือยาง

2.2.2.1.13 มีด (Scalpel)

2.2.2.1.14 ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2.2.2.1.15 Phosphate buffer saline (pH 7.4)

2.2.2.1.16 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (70% Ethanol)

2.2.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.2.3.1 ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette) ขนาด 1000 200 20 ไมโครลิตร

2.2.3.2 หลอดพีซีอาร์ (PCR Tube) ขนาด 0.2 ml

2.2.3.3 เครื่องสปินด์ดาวน์ (Spin down)

2.2.3.4 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler)

2.2.3.5 ที่วางหลอดพีซีอาร์ (Rack)

2.2.3.6 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3.7 ทิป (Tip) ขนาด 1000 200 100 1 ไมโครลิตร

2.2.3.8 ตู้ปฏิบัติงานพีซีอาร์ (PCR Cabinet)

2.2.3.9 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (70% Ethanol)

2.2.3.10 5X PCR buffer [Phire® Animal Tissue PCR Buffer (Thermo Scientific, Thailand)]

2.2.3.11 10 mM Deoxynucleotides (dNTPs)

2.2.3.12 เอนไซม์ DNA polymerase [Phire® Hot Start II DNA Polymerase (ThermoScientific, Thailand)]

2.2.3.13 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2.2.3.14 ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)

2.2.3.15 Buffalo-specific primer

2.2.3.16 Goat-specific primer

2.2.3.17 Duck-specific primer

2.2.3.18 Dog-specific primer

2.2.3.19 Sheep-specific primer

2.2.3.20 Universal primer

2.2.4 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

2.2.4.1 เครื่อง Gel electrophoresis

2.2.4.2 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System)

2.2.4.3 เตาไมโครเวฟ

2.2.4.4 ถาดเตรียมเจลอะกาโรส (Gel tray)

2.2.4.5 ไมโครปิเปต (Micropipette)

2.2.4.6 เจลอะกาโรส (Agarose gel)

2.2.4.7 6 X loading buffer

2.2.4.8 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

2.2.4.9 1 X Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer)

2.2.4.10 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 การทดสอบไพรเมอร์และหาอุณหภูมิ annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมโดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradiant PCR)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย (Species-specific primer) ซึ่งออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายจำนวนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) แพะ (*Capra aegagrus hircus*) ควาย (*Bubalus bubalis*) และแกะ (*Ovis aries*) โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงชื่อไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ยีน ขนาด และอุณหภูมิที่จำเพาะเจาะจงกับไพรเมอร์ของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด

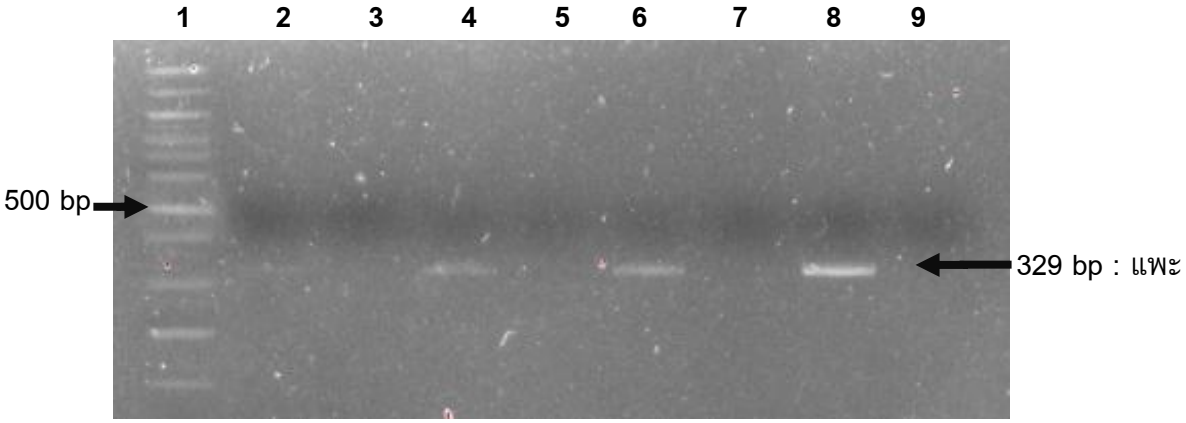
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (5' ⟶ 3')	ยีน (Gene)	ขนาด (คู่เบส)	Tm (°C)
Goat-specific 1 Universal COI	F: ATCCTCCTGCTCGCAACAATG R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA	COI	329	68.8
Duck-specific 1 Universal COI	F: GCTGGTGTCTCCTCCATCCTC R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA	COI	350	67.1
Dog-specific 1 Universal COI	F: GACCTTACAATTTTCTCCTTACACTTAGCC R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA	COI	377	66.5
Buffalo-specific1 Universal COI	F: CCACGCAGGAGCTTCG R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA	COI	396	68.2
Sheep-specific 1 Universal COI	F: ACTTCTTCCCCCATCTTTCCTG R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA	COI	498	66.6

ทั้งนี้ก่อนทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องมีการเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างแช่ลงใน 1X Phosphate Buffered Saline (PBS Buffer) พีเอช 7.4 และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ เรียกว่า วิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR) ซึ่งในขั้นแรกต้องมีการทดสอบ

ประสิทธิภาพของไพรเมอร์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ด้วยอุณหภูมิ annealing ทั้งหมด 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 70 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิสูงสุดที่ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงสำหรับใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ต่อไป ซึ่งผลการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่เป็นดังนี้

3.1.1 ผลการทดสอบไพรเมอร์แพะ (Goat-specific primer)

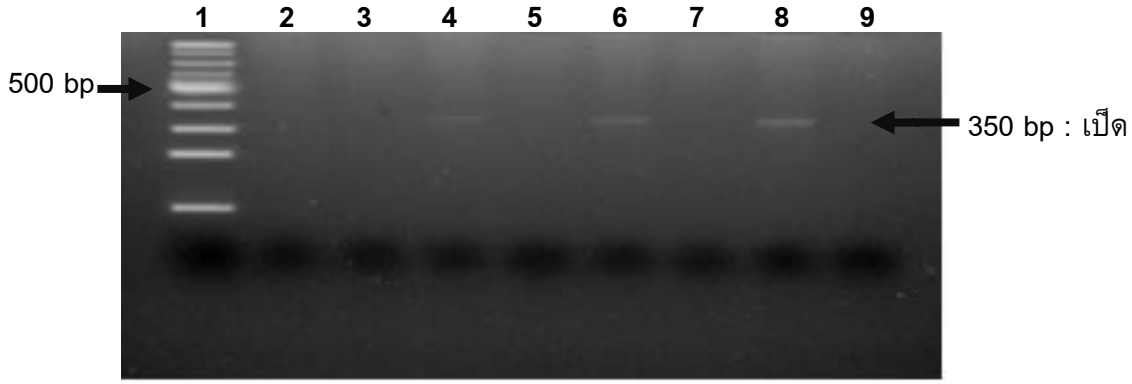
ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแพะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพะได้ 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 70 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 329 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 17 แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เลือกใช้ได้และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นถัดไปได้ ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดสอบเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



รูปที่ 17 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

3.1.2 ผลการทดสอบไพรเมอร์เป็ด (Duck-specific primer)

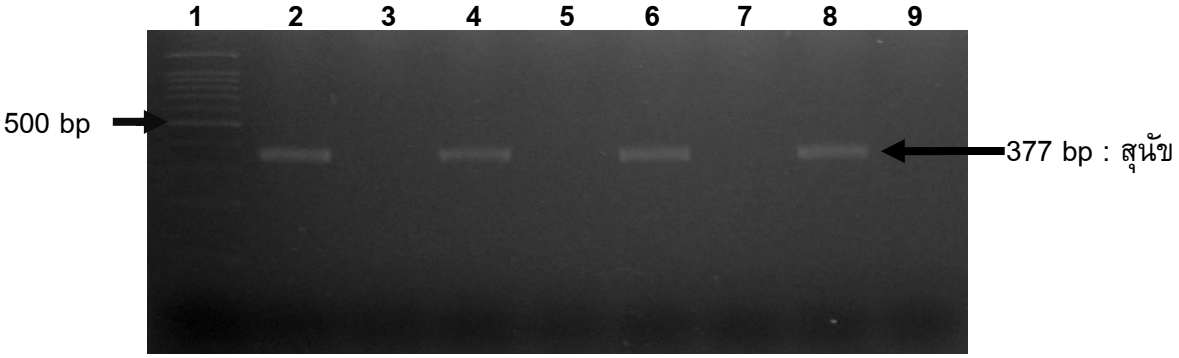
ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเป็ดด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดได้ 3 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 350 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 18 ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดลองเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



รูปที่ 18 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C, 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

3.1.3 ผลการทดสอบไพรเมอร์สุนัข (Dog-specific primer)

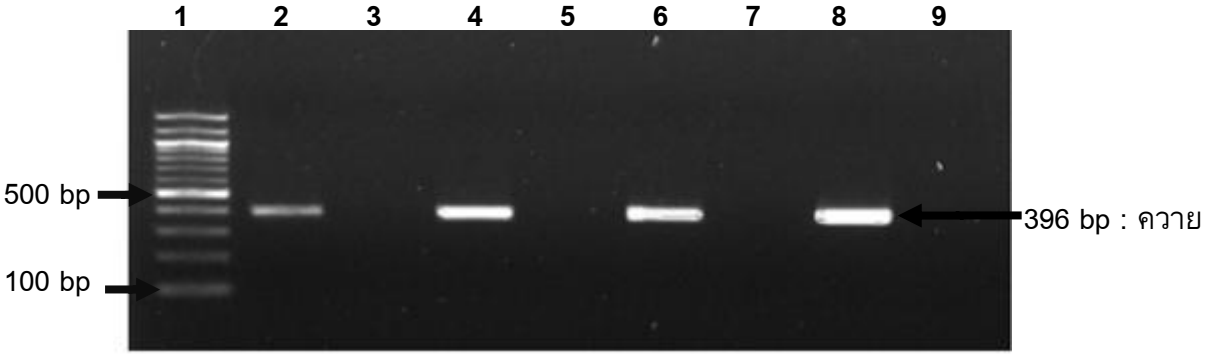
ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสุนัขด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขได้ทั้ง 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 70 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 377 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงผลในรูปที่ 19 ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดลองเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



รูปที่ 19 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

3.1.4 ผลการทดสอบไพรเมอร์ควาย (Buffalo-specific primer)

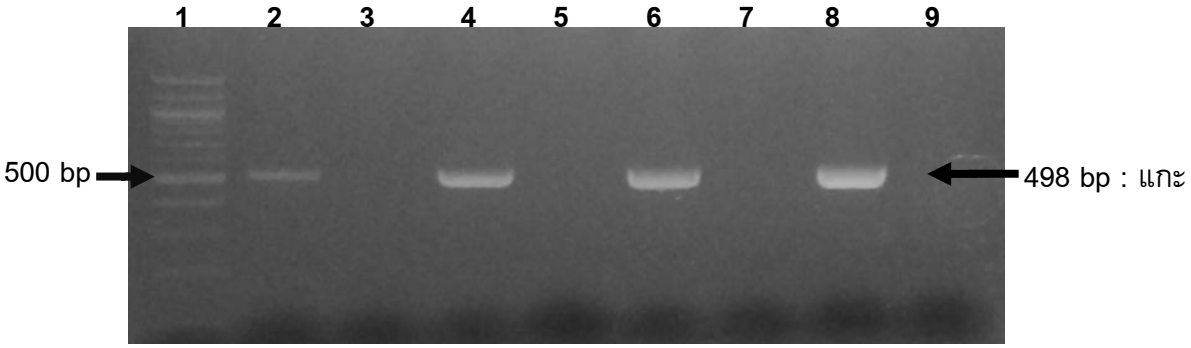
ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับควายด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ พบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของควายได้ทั้ง 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 70 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 396 คู่เบสตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 20 ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดลองเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



รูปที่ 20 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของควายด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

3.1.5 ผลการทดสอบไพรเมอร์แกะ (Sheep-specific primer)

ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแกะได้ทั้ง 4 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 70 68 66 และ 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 498 คู่เบสตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 21 ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดลองเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



รูปที่ 21 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแกะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

สำหรับผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradient PCR primer test) ของไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 12 โดยอุณหภูมิ annealing ที่สูงที่สุดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายได้ทุกชนิดและให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่สามารถมองเห็นได้ชัดเจนพบว่า คือ อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิ annealing ที่ได้จากการทดสอบในขั้นนี้จะถูกนำไปใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ต่อไป

ตารางที่ 12 สรุปผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradient PCR primer test) ของไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ โดยสัญลักษณ์ +++ คือ แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมาก ++ คือ แถบดีเอ็นเอมีความเข้มปานกลาง + คือ แถบดีเอ็นเอจาง และ – คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์	อุณหภูมิ annealing (ºC)			
	64	66	68	70
Goat-specific primer 1	+++	++	++	+
Duck-specific primer 1	+++	++	+	-
Dog-specific primer 1	+++	++	++	+
Buffalo-specific primer 1	+++	++	++	+
Sheep-specific primer 1	+++	++	++	+

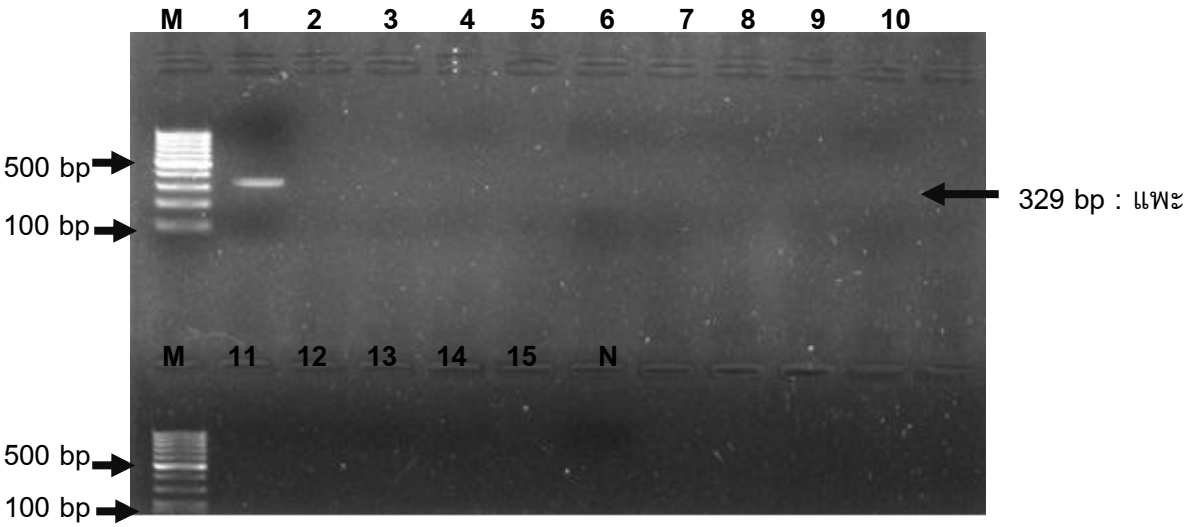
3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ (Primer-singleplex specificity test)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบและใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายหรือไม่ ซึ่งทำได้โดยนำไพรเมอร์แต่ละคู่ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์จำนวน 15 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็นสัตว์เป้าหมาย 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) แพะ (*Capra hircus*) ควาย (*Bubalus bubalis*) และแกะ (*Ovis aries*) รวมถึงดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นๆที่นิยมนำมาประกอบอาหารหรือที่มีการวางจำหน่ายตามท้องตลาดอีกจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) หมู (*Sus scrofa domestica*) ไก่ (*Gallus gallus*) วัว (*Bos Taurus*) กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) กวาง (*Rusa timorensis*) และมนุษย์ (*Homo sapiens*) โดยทดสอบตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4 ทั้งนี้เลือกใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 66 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ได้จากการทดสอบในขั้นเกรเดียนพีซีอาร์ ซึ่งหากผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์คู่ใดที่ให้ผลไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย จะต้องทำการออกแบบไพรเมอร์คู่นั้นใหม่ แต่ถ้าผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ให้ผลการทดสอบโดยไพรเมอร์ทุกคู่สามารถ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะสัตว์เป้าหมาย ก็สามารถนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ขั้นต่อไป

3.2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะ

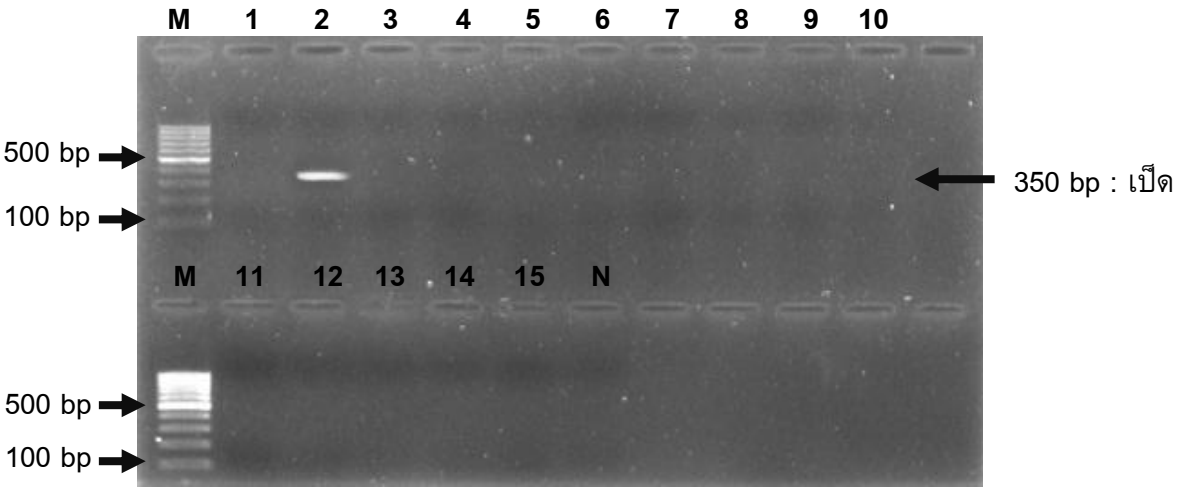
ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะจากดีเอ็นเอของแพะ ขนาด 329 คู่เบส (รูปที่ 22 ช่อง 1) ตามที่คาดหวังไว้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น (รูปที่ 22 ช่อง 2-15) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของแพะเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



รูปที่ 22 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos primigenius*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

3.2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ด

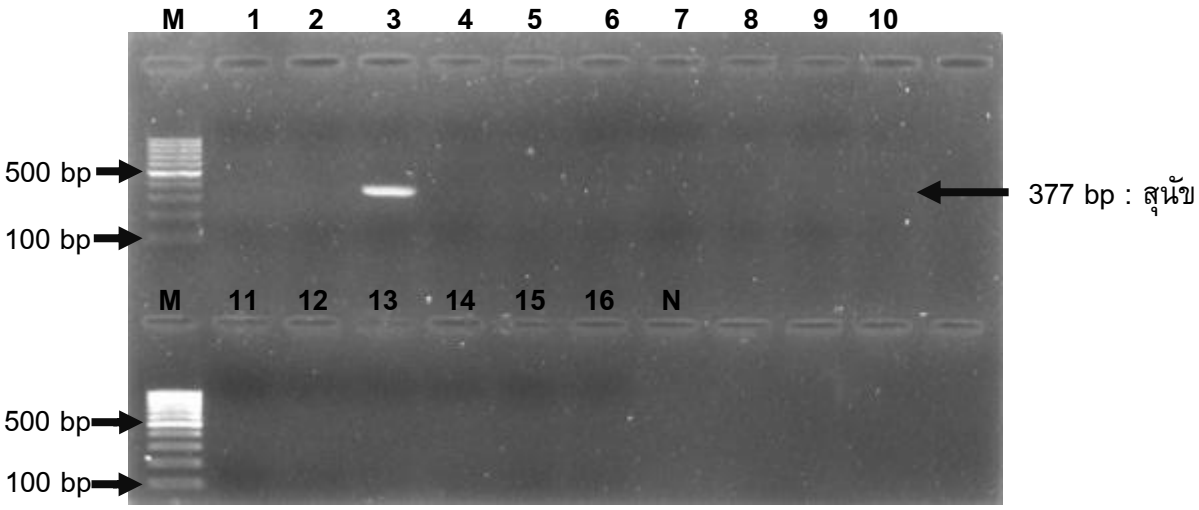
ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ดด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะจากดีเอ็นเอของเป็ด ขนาด 350 คู่เบส (รูปที่ 23 ช่อง 2) ตามที่คาดหวังไว้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น (รูปที่ 23 ช่อง 1 และ 3-15) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของเป็ดเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



รูปที่ 23 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ดด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง (ช่อง) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

3.2.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัข

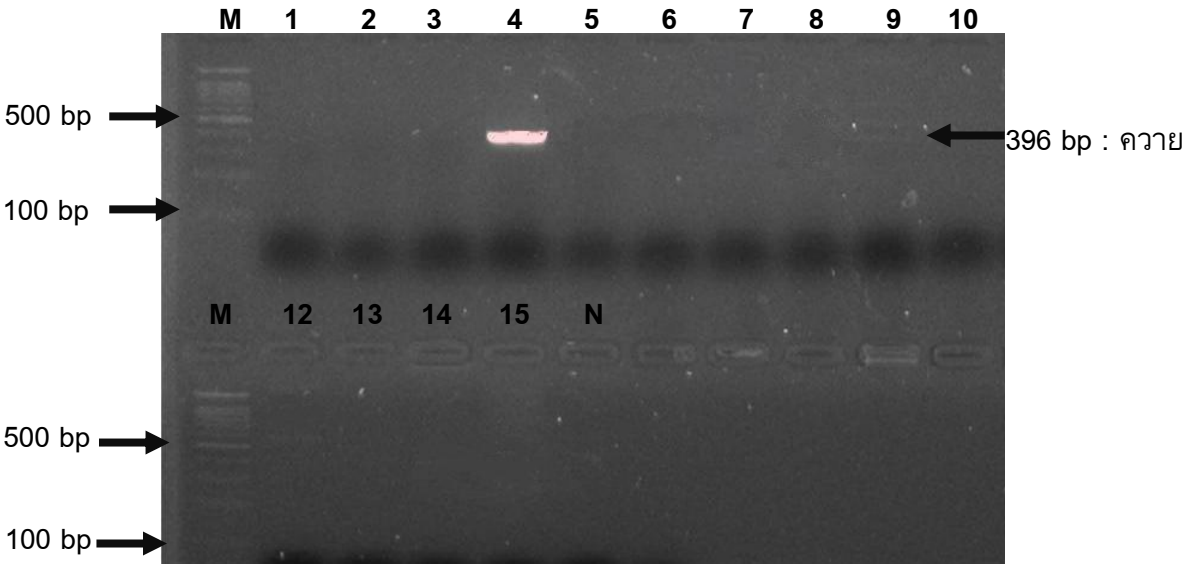
ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัขด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะจากดีเอ็นเอของสุนัข ขนาด 377 คู่เบส (รูปที่ 24 ช่อง 3) ตามที่คาดหวังไว้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น (รูปที่ 24 ช่อง 1-2 และ 4-15) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของสุนัขเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



รูปที่ 24 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัขด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

3.2.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ควาย

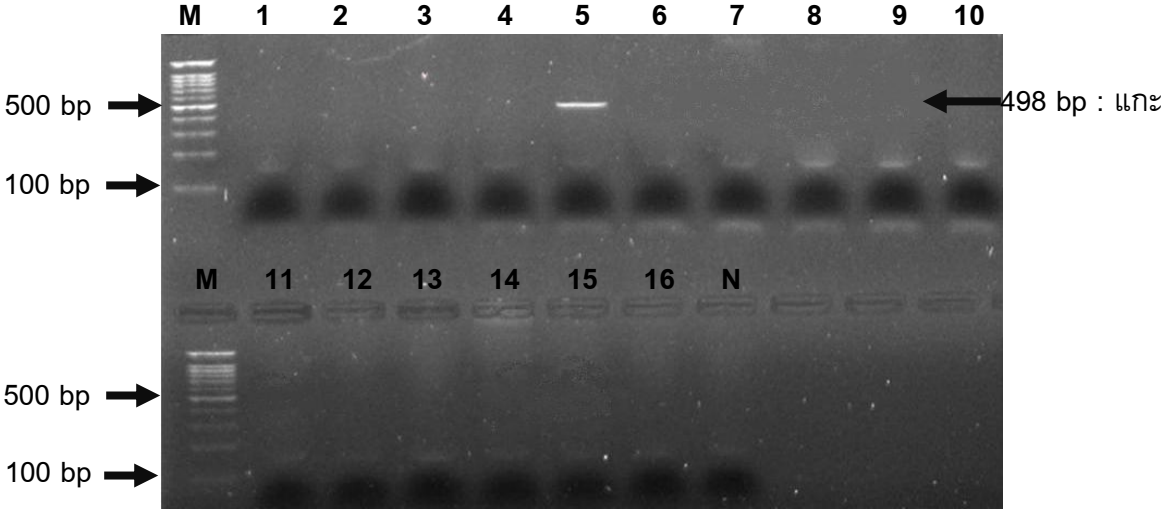
ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ควายด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะจากดีเอ็นเอของควาย ขนาด 396 คู่เบส (รูปที่ 25 ช่อง 4) ตามที่คาดหวังไว้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น (รูปที่ 25 ช่อง 1-3 และ 5-15) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของควายเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



รูปที่ 25 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ควายด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

3.2.5 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะ

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะจากดีเอ็นเอของแกะ ขนาด 498 คู่เบส (รูปที่ 26 ช่อง 5) ตามที่คาดหวังไว้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น (รูปที่ 26 ช่อง 1-4 และ 6-15) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของแกะเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



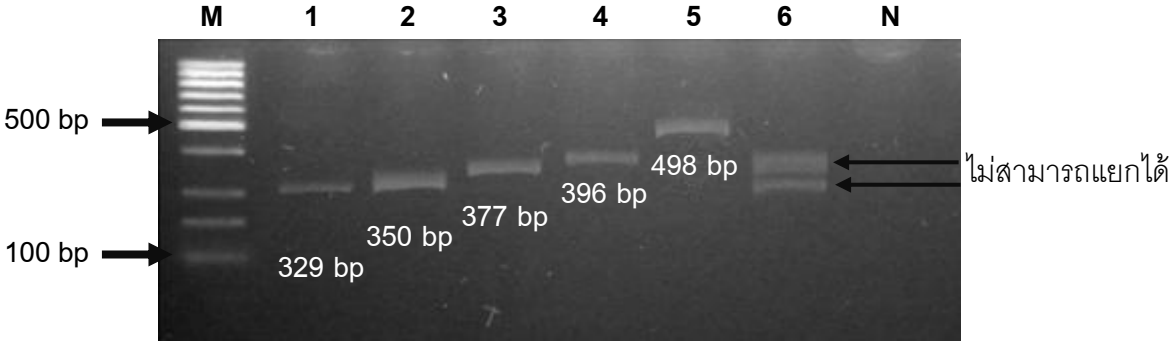
รูปที่ 26 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง (ช่อง) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

จากผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง รวมถึงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากสัตว์แต่ละชนิดมีความเข้ม ดังนั้นไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ จึงเหมาะสมในการนำไปใช้พัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย 5 ชนิดขั้นต่อไป

3.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ (Optimization of multiplex-direct PCR)

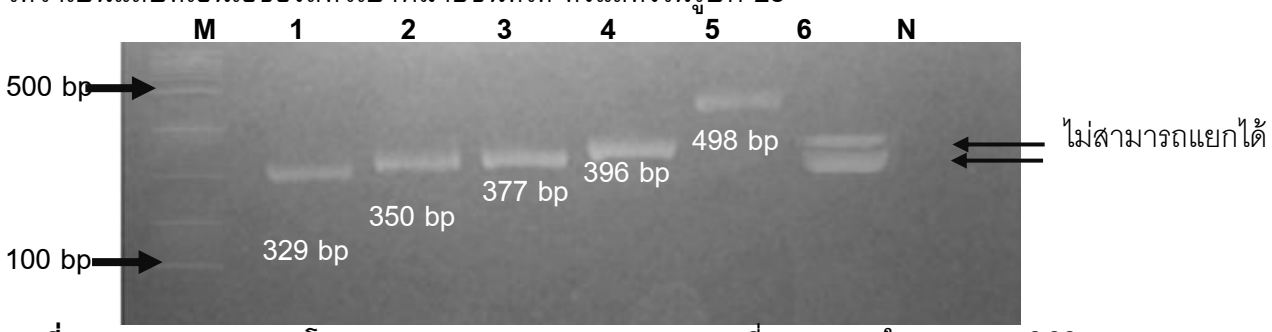
การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ทำได้โดยใส่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 คู่ลงไปในปฏิกิริยา และหาสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดพร้อมกันในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยไม่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอซึ่งผลที่คาดหวังของการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์จะต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดตามขนาดที่คาดหวัง ทั้งนี้การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสามารถปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆได้ เช่น ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไพรเมอร์ ปรับจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปรับอุณหภูมิ annealing ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียม เป็นต้น

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ครั้งที่ 1 ใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ดังแสดงในหัวข้อ 2.1.3-2.1.4 และใช้ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงทั้งหมด 5 คู่ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 66 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความชัดเจนในการทดสอบด้วยเกรเดียนพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 2% เจลอะกาโรส ผลการศึกษาปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แบน จากจำนวนที่คาดหวังทั้งหมด 5 แบนสำหรับสัตว์เป้าหมาย 5 ชนิด (รูปที่ 27 ช่อง 6) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดใด โดยแถบดีเอ็นเอแรกอยู่ในช่วงขนาด 329-350 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ระหว่างของแพะและเป็ด ส่วนอีกแถบดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 377-396 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ระหว่างของสุนัข และควาย ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอดังกล่าวอาจเกิดจากการซ้อนทับกันของผลผลิตพีซีอาร์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายมากกว่า 1 ชนิดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการใช้ความเข้มข้นของเจลที่น้อยเกินไป จึงทำให้เจลมีรูพรุนขนาดใหญ่ส่งผลให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ต่างก็วิ่งผ่านรูพรุนภายในเจลได้อย่างรวดเร็ว จึงไม่เกิดการแยกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่ละแบน (Arnott *et al.* 1974) ส่วนแถบดีเอ็นเอของแกะขนาด 498 คู่เบส ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและตรวจสอบได้ในการทดสอบครั้งนี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ใหญ่เกินไปทำให้สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่เพียงพอสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดนั้น นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่พบแถบดีเอ็นเอในชุดควบคุมผลลบ นั่นคือ ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์



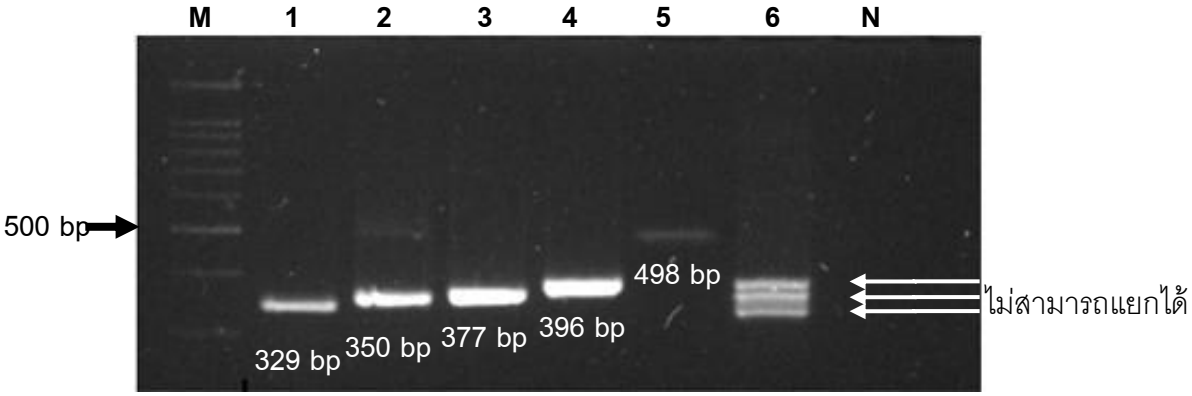
รูปที่ 27 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 1 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ครั้งถัดไป จึงทำการทดลองเหมือนครั้งแรกแต่ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของเจลอะกาโรส จาก 2% เจลอะกาโรส เป็น 4% เจลอะกาโรส เพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่ซ้อนทับกันสามารถแยกออกจากกันได้ในขั้นตอนการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็ก-โทรโฟรีซีส ผลการศึกษา ยังคงปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แบนเช่นเดียวกับผลการทดสอบก่อนหน้านี้ คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาด 329-350 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ระหว่างของแพะและเป็ด ส่วนอีกแบนมีขนาดอยู่ระหว่าง 377-396 คู่เบส ที่ยังคงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดใด ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 28 4% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

การศึกษาถัดไปจึงทำการปรับเปลี่ยนชนิดของเจลอะกาโรส ในขั้นตอนการตรวจสอบและแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสจาก 4% เจลอะกาโรส เป็น 2% low electroendosmosis agarose ผลการศึกษา ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แบนจากจำนวน 5 แบน แต่ยังคงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดใด เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้ง 3 แบนมีขนาดใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 29 ช่อง 6) ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนชนิดของเจลจากเจลอะกาโรส มาเป็นเจลอะกาโรสชนิด Low Electroendosmosis (LE) สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายได้จากเดิมที่สามารถแยกได้เพียง 2 แบนเพิ่มขึ้นเป็น 3 แบน ซึ่งเจลอะกาโรสชนิด LE เป็นเจลที่มีค่า resolution หรือค่าความละเอียดในการแสดงผลของภาพสูงกว่าเจลอะกาโรสแบบเดิม ทั้งนี้เนื่องจากเจลอะกา-โรสเป็นเจลที่มีอนุภาคของประจุลบอื่นๆเจือปน อย่างเช่น ไพรูเวทและซัลเฟต ซึ่งเมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปอนุภาคเหล่านี้จะจับกับแคทไอออนและเคลื่อนที่ไปทางประจุลบซึ่งเป็นทิศทางที่สวนทางกับการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดได้ช้าลง เรียกว่า ปรากฏการณ์ electroendosmosis ดังนั้นการเลือกใช้เจลที่มีการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวได้น้อยอย่างเจลอะกาโรสชนิด LE จะช่วยให้สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดีขึ้น (ศิวพร 2555) โดยเฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแกะซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังขนาด 498 คู่เบส ก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ครั้งนี้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแกะนั้นมีขนาดใหญ่ที่สุด ทำให้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่างๆที่มีอยู่อย่างจำกัดถูกใช้ไปกับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า (Innis and Gelfand 1999) ส่งผลให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแกะมีโอกาสเกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้น้อย ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายที่มีขนาดใกล้เคียงกันที่ยังระบุไม่ได้ว่าเป็นสัตว์ชนิดใด อาจเกิดจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 4 ชนิดซ้อนทับกัน เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์ทั้ง 4 ชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน



รูปที่ 29 2% Low electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ แพะ (*Capra hircus*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

การศึกษาถัดไปจึงเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์แกะ จากเดิมความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้น 1.5 และ 2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ 2% low electroendosmosis agarose ในการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ผลการศึกษาที่ได้เป็นเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (รูปที่ 30) นั่นคือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แบน จากจำนวน 5 แบน แต่ยังคงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดใด ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแกะ ขนาด 498 คู่เบส ยังคงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ครั้งนี้เช่นเดียว

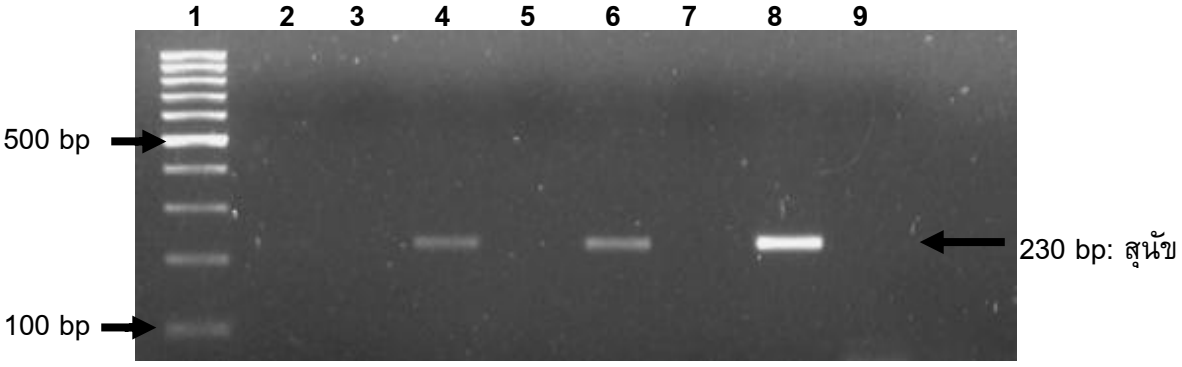
ทั้งนี้เนื่องจากไพรเมอร์ของแกะไม่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ และผู้วิจัยเล็งเห็นปัญหาว่าแถบดีเอ็นเอของเป็ด ขนาด 350 คู่เบส แพะ ขนาด 329 คู่เบส และสุนัข ขนาด 377 คู่เบส มีขนาดใกล้เคียงกันมากเกินไปยากต่อการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังนั้นการศึกษาถัดไปจึงทำการออกแบบไพรเมอร์สุนัข เป็ด แพะ และแกะใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 13 ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่จะต้องนำไปทดสอบไพรเมอร์เพื่อหาอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ รวมถึงทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้งสามคู่ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์

ตารางที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ชุดเก่าและใหม่ที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการทดสอบครั้งเดียว

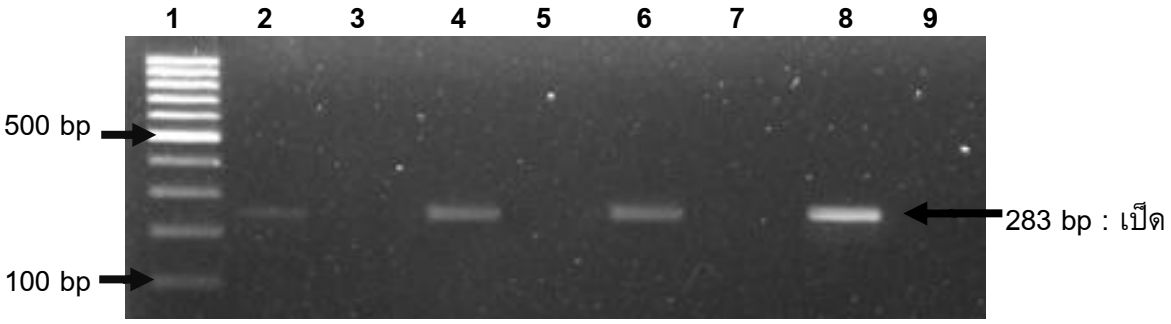
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (5' ⟶ 3')	ขนาด (คู่เบส)	Tm (°C)
ไพรเมอร์ชุดเก่า			
Goat-specific 1	F:ATCCTCCTGCTCGCAACAATG	329	68.8
Universal COI	R: CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Duck-specific 2	F:GCTGGTGTCTCCTCCATCCTC	350	66.0
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Dog-specific 1	F:GACCTTACAATTTTCTCCTTACACTTAGCC	377	66.5
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Sheep-specific 1	F: ACTTCTTCCCCCATCTTTCCTG	498	66.6
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
ไพรเมอร์ชุดใหม่			
Dog-specific 2	F:GTTCTACTCTTACTATCCCTGCCTGTACTG	230	66.1
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Duck-specific 3	F:CACTCTCACAATACCAAACCCCA	283	67.1
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Goat-specific 2	F:TTTCCCTACACCTAGCAGGCA	363	66.0
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3
Sheep-specific 2	F:GTTACTCCTAGCATCCTCTATGGTTGAG	477	66.1
Universal COI	R:CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAGTAGTA		71.3

โดยผลการทดสอบไพรเมอร์ใหม่ พบว่า ไพรเมอร์สุนัขสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 3 อุณหภูมิ ได้แก่ 68 66 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาด 230 คู่เบส ไพรเมอร์เป็ด แพะ และแกะ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 70 68 66 64 องศาเซลเซียส โดยให้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาด ขนาด 283 คู่เบส 363 และ 477 คู่เบส

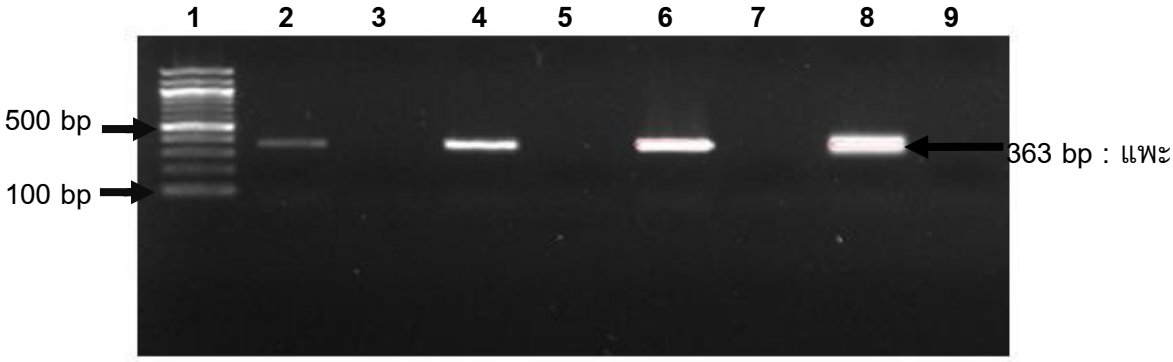
ตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 30-33 แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ annealing ที่เลือกใช้ โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ 64-68 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่แถบดีเอ็นเอมีความจางมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ส่วนชุดควบคุมลบ (Negative control) ทดสอบเพื่อตรวจสอบว่าองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ โดยผลการทดสอบ พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์



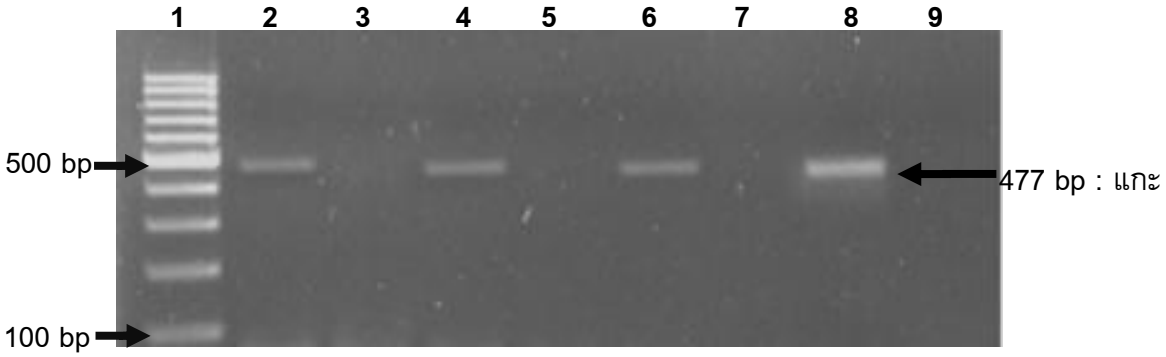
รูปที่ 30 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C, 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C



รูปที่ 31 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C, 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

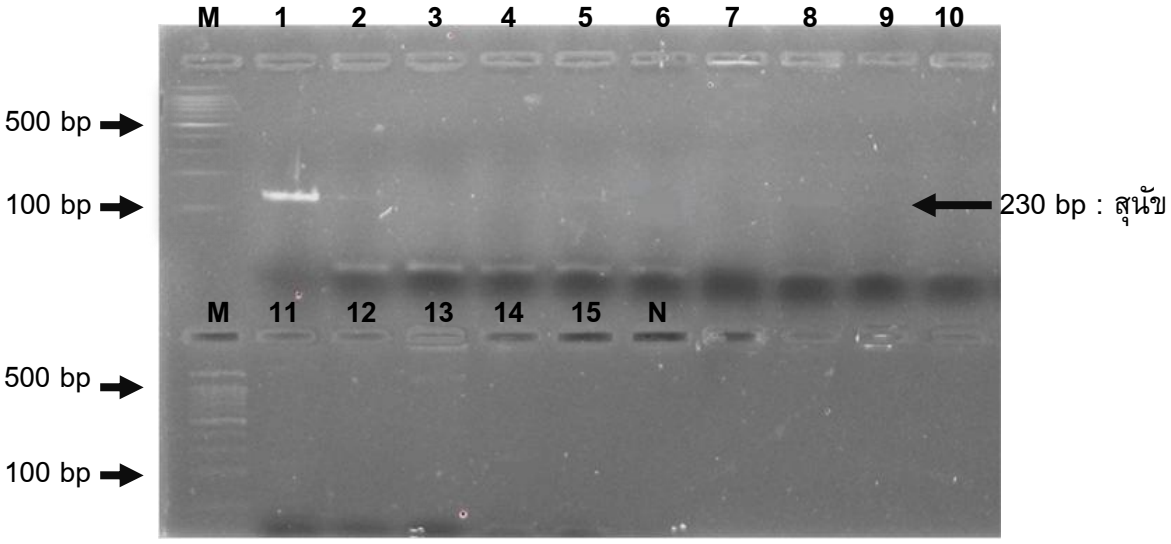


รูปที่ 32 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C, 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

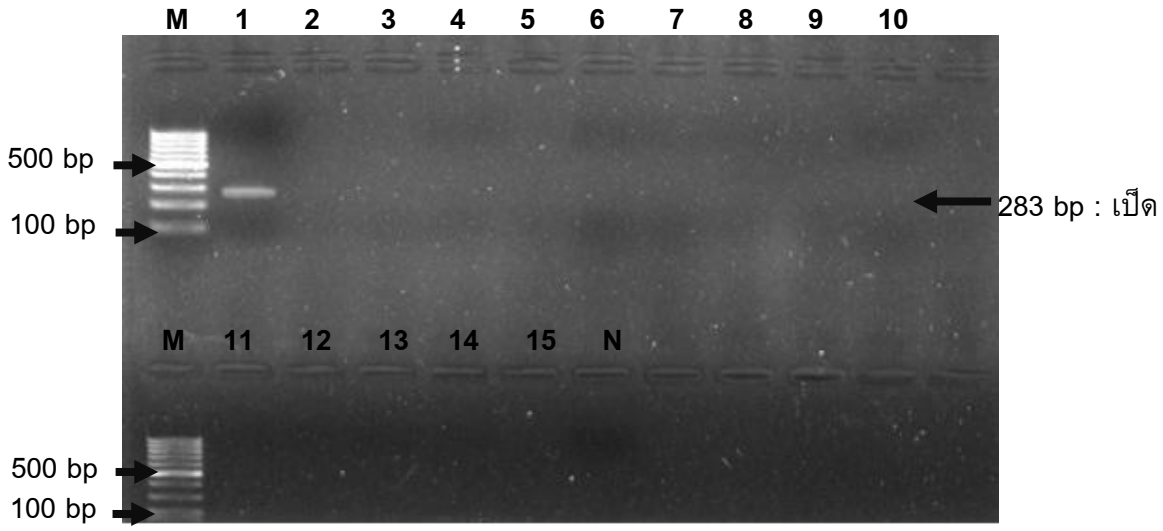


รูปที่ 33 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแกะด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ โดยช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 2 คือ อุณหภูมิ 70 °C 3 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 70 °C 4 คือ อุณหภูมิ 68 °C 5 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 68 °C, 6 คือ อุณหภูมิ 66 °C 7 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 66 °C 8 คือ อุณหภูมิ 64 °C และ 9 คือ ชุดควบคุมผลลบที่อุณหภูมิ 64 °C

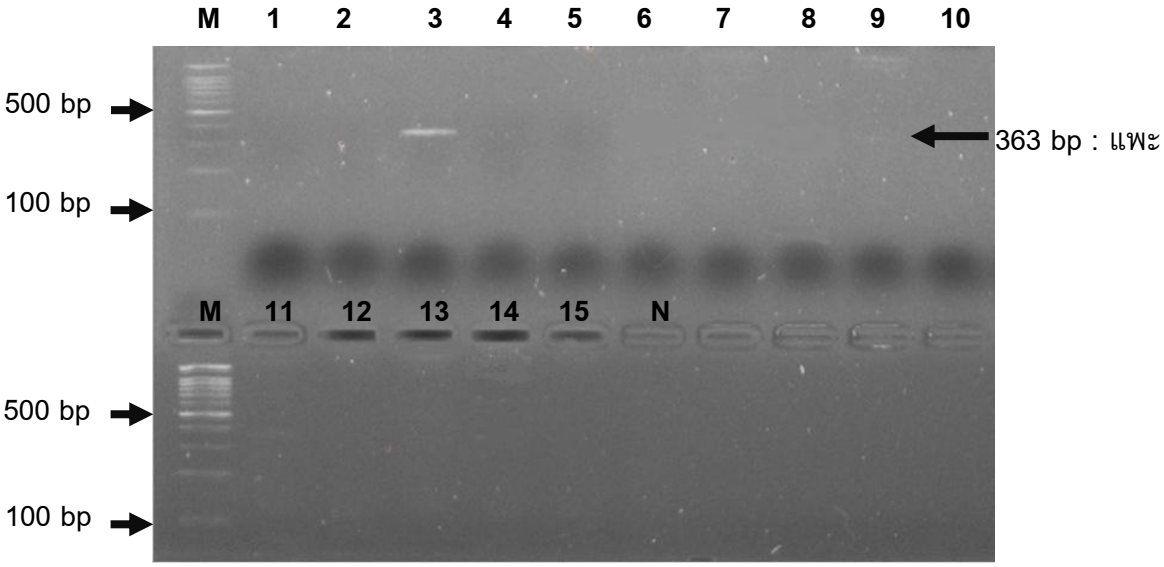
สำหรับผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ชุดใหม่ด้วยวิธีซิงเกิล-เพล็กซ์พีซีอาร์ ไพรเมอร์สุนัขสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 230 คู่เบส (รูปที่ 34) ไพรเมอร์เป็ดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 283 คู่เบส (รูปที่ 35) ไพรเมอร์แพะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 363 คู่เบส (รูปที่ 36) และไพรเมอร์แกะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 477 คู่เบส (รูปที่ 37) ตามที่คาดหวังไว้ โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น สำหรับผลของชุดควบคุมลบ (Negative control) พบว่า ชุดควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์



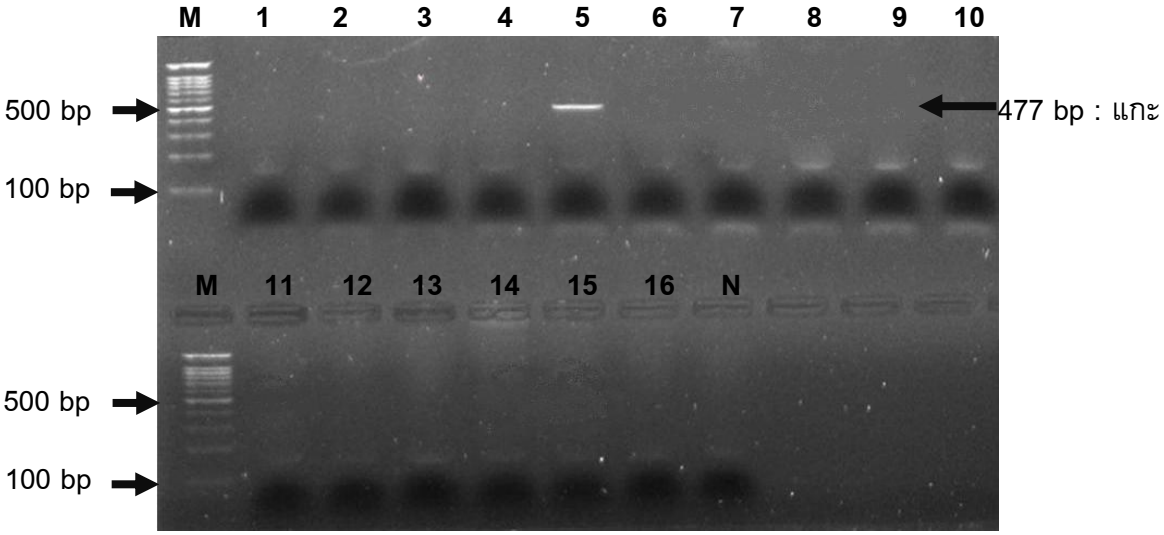
รูปที่ 34 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์สุนัขด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ แพะ (*Capra hircus*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 35 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์เป็ดด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ แพะ (*Capra hircus*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (*Negative control*)

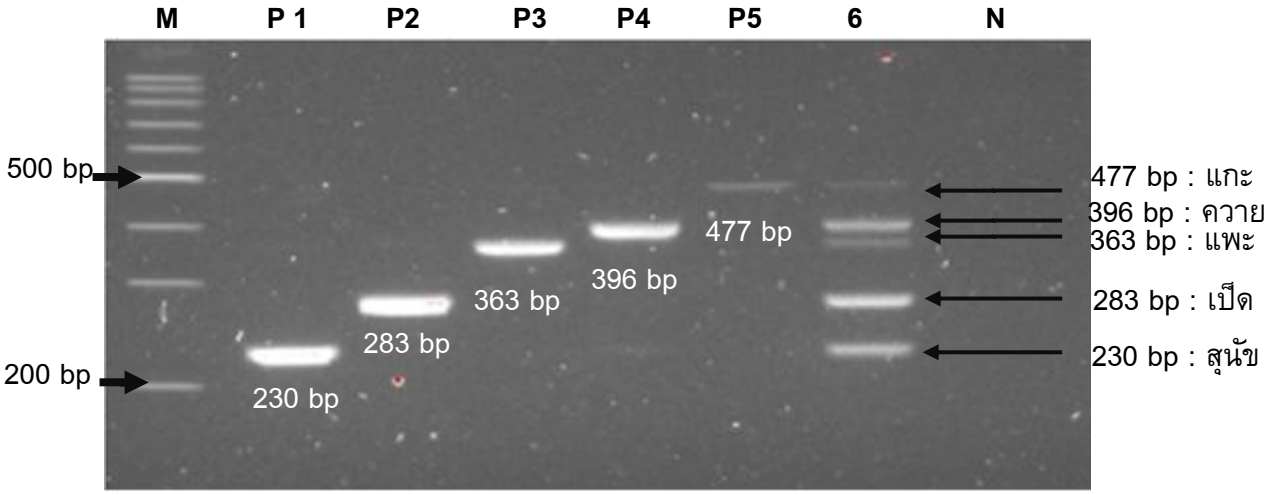


รูปที่ 36 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แพะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ แพะ (*Capra hircus*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



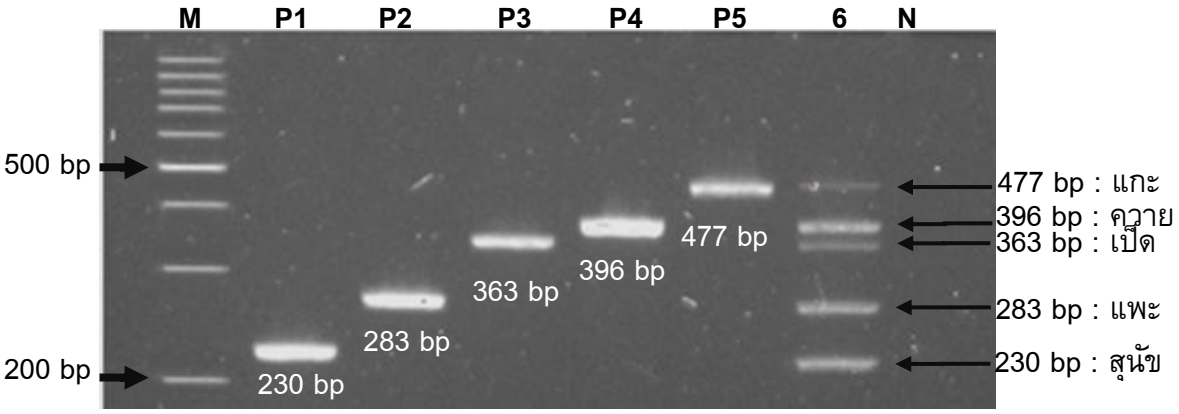
รูปที่ 37 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แกะด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ แพะ (*Capra hircus*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

หลังจากที่เปลี่ยนมาใช้ไพรเมอร์ชุดใหม่ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์สุนัข ไพรเมอร์เป็ด ไพรเมอร์แพะ และไพรเมอร์แกะ และได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใส่ไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ผลการศึกษา พบว่า ที่ 2% Low electroendosmosis agarose ปรากฏแถบดีเอ็นเอครบทั้ง 5 แบน นั่นคือ แถบดีเอ็นเอ ขนาด 230 283 363 396 และ 477 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ ตามลำดับ (รูปที่ 38 ช่องที่ 6) แต่อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอของแพะและแกะมีลักษณะแบนที่จางกว่าแบนของสัตว์เป้าหมายชนิดอื่นๆ



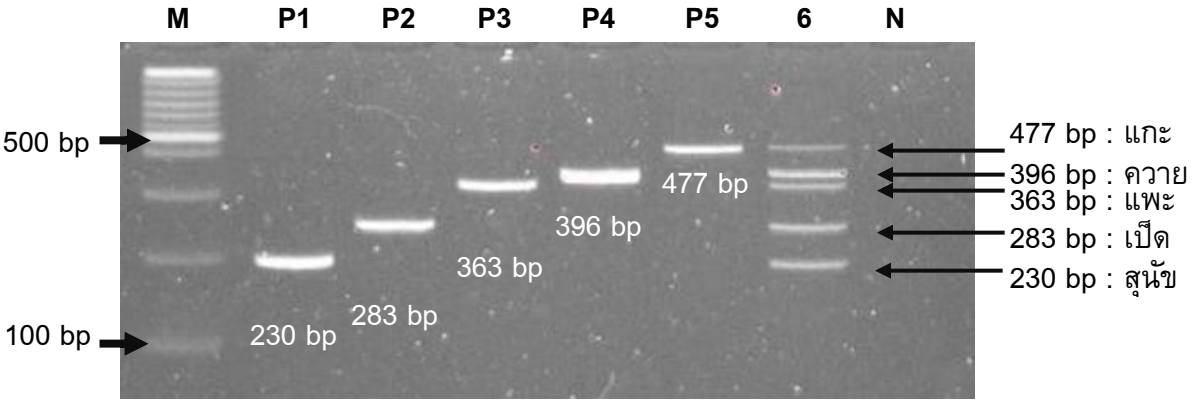
รูปที่ 38 2% Low electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) P1 คือ ชุดควบคุมผลบวกของสุนัข (*Canis lupus familiaris*) P2 คือ ชุดควบคุมผลบวกของเป็ด (*Anas platyrhynchos*) P3 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแพะ (*Capra hircus*) P4 คือ ชุดควบคุมผลบวกของควาย (*Bubalus bubalis*) P5 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

การศึกษาถัดไปทำการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไพรเมอร์แพะและแกะจากเดิมความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้เนื่องจากแถบดีเอ็นเอของแพะและแกะมีลักษณะจางกว่าแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดอื่น ผลการศึกษาพบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แบน นั่นคือ แถบดีเอ็นเอ 230 283 363 396 และ 477 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ ตามลำดับ (รูปที่ 39) ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์แพะและแกะ ทำให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแพะและแกะเข้มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแกะยังคงจางกว่าแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดอื่นๆ



รูปที่ 39 2% Low electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 5 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) P1 คือ ชุดควบคุมผลบวกของสุนัข (*Canis lupus familiaris*) P2 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแพะ (*Capra hircus*) P3 คือ ชุดควบคุมผลบวกของเป็ด (*Anas platyrhynchos*) P4 คือ ชุดควบคุมผลบวกของควาย (*Bubalus bubalis*) P5 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์แกะจากเดิมความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไพรเมอร์แกะในครั้งนี้ก็เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ของแกะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอแกะมีความเข้มใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายชนิดอื่น ผลการศึกษา พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แบน นั่นคือ แถบดีเอ็นเอ ขนาด 230 283 363 396 และ 477 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์สุนัข แพะ เป็ด ควาย และแกะ ตามลำดับ โดยลักษณะแถบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทุกชนิดมีความเข้มใกล้เคียงกัน (รูปที่ 40) และไม่พบแถบดีเอ็นเอในชุดควบคุมผลลบในช่อง N นั่นคือ ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์



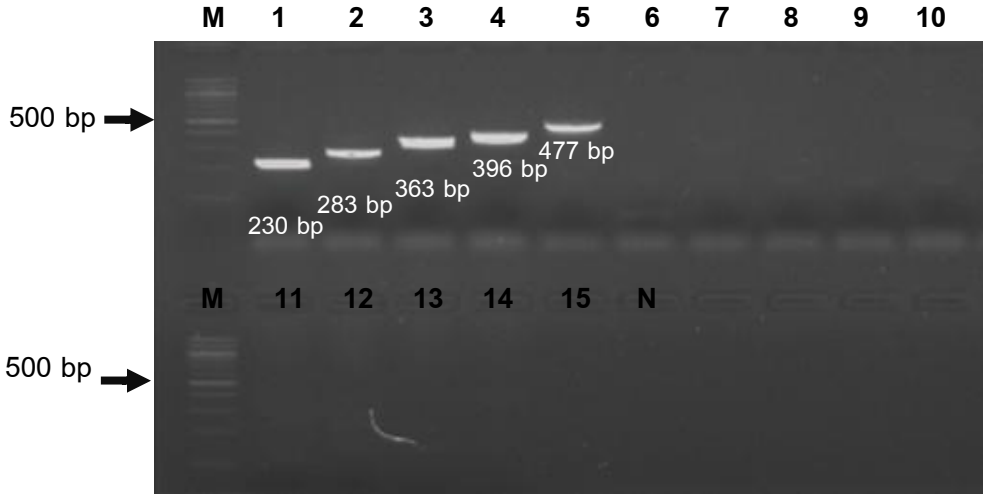
รูปที่ 40 2% Low electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6 โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) P1 คือ ชุดควบคุมผลบวกของสุนัข (*Canis lupus familiaris*) P2 คือ ชุดควบคุมผลบวกของเป็ด (*Anas platyrhynchos*) P3 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแพะ (*Capra hircus*) P4 คือ ชุดควบคุมผลบวกของควาย (*Bubalus bubalis*) P5 คือ ชุดควบคุมผลบวกของแกะ (*Ovis aries*) 6 คือ Pre PCR solution รวม (สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

3.4 ผลการทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น (Assay validation)

3.4.1 ผลการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย (Specificity test)

การทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย เป็นการทวนสอบชุดทดสอบเพื่อยืนยันว่าชุดทดสอบดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น โดยนำชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสัตว์เป้าหมายจำนวนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) แพะ (*Capra hircus*) ควาย (*Bubalus bubalis*) และแกะ (*Ovis aries*) และสัตว์อื่นๆ ที่นิยมนำไปประกอบอาหาร (Possible meat species) หรือที่มีการวางจำหน่ายตามท้องตลาดอีกจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) หมู (*Sus scrofa domestica*) ไก่ (*Gallus gallus*) วัว (*Bos Taurus*) กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) กวาง (*Rusa timorensis*) และมนุษย์ (*Homo sapiens*) โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบ พบว่า ชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสัตว์เป้าหมายได้เท่านั้น รวมถึงให้ชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังสำหรับไพรเมอร์ของแต่ละสัตว์เป้าหมาย (รูปที่ 41) สำหรับดีเอ็นเอจากสัตว์ชนิดอื่นๆ พบว่าไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดเท่านั้น และสามารถแยกกลุ่มสัตว์เป้าหมายออกจากสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

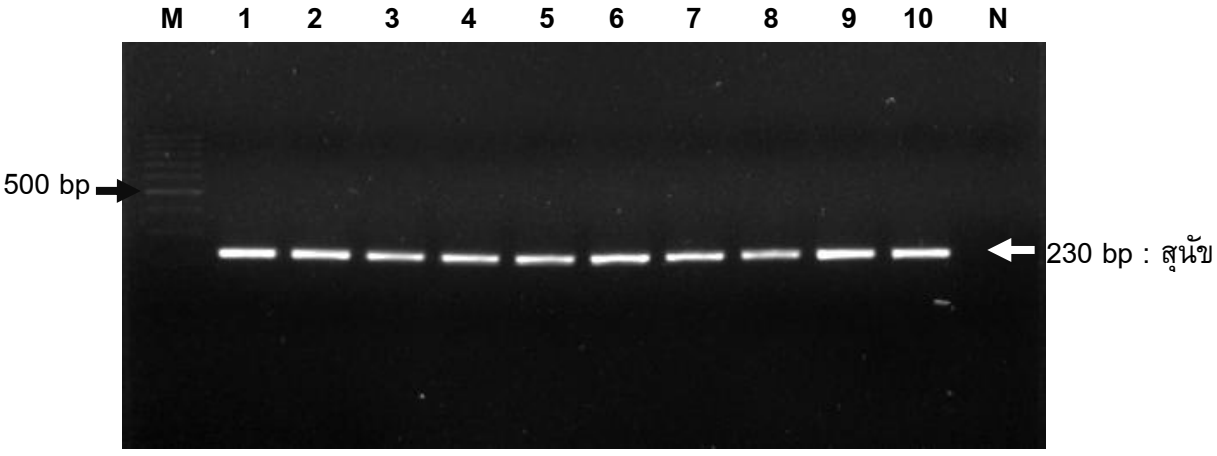


รูปที่ 41 2% Low electroendosmosis agarose แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์กับเป้าหมาย โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) 2 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) 3 คือ แพะ (*Capra hircus*) 4 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) 5 คือ แกะ (*Ovis aries*) 6 คือ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 7 คือ วัว (*Bos Taurus*) 8 คือ หมู (*Sus scrofa domestica*) 9 คือ ม้า (*Equus ferus caballus*) 10 คือ ไก่ (*Gallus gallus*) 11 คือ กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) 12 คือ กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) 13 คือ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) 14 คือ กวาง (*Rusa timorensis*) 15 คือ มนุษย์ (*Homo sapiens*) และ N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

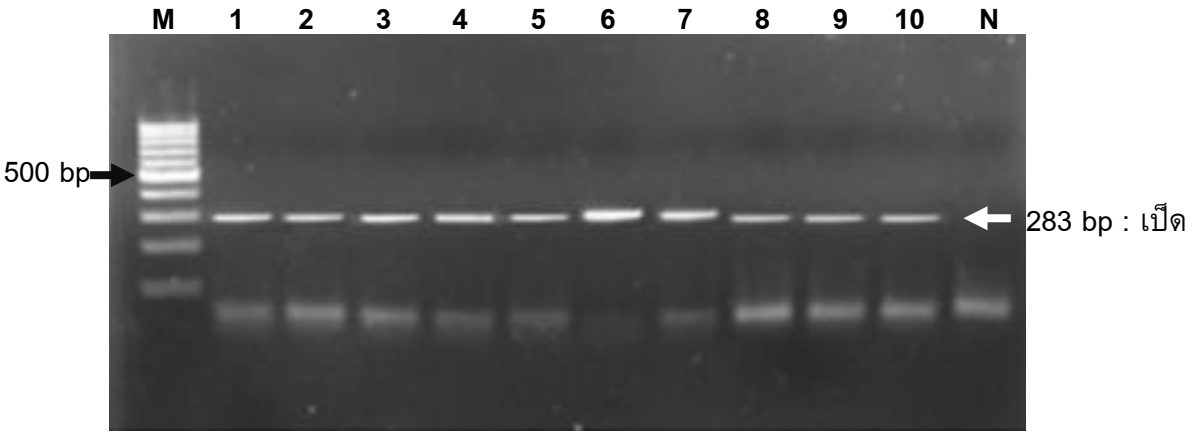
3.4.2 ผลการทดสอบการทำซ้ำ (Reproducibility test)

การทดสอบการทำซ้ำของชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย เป็นการทวนสอบชุดทดสอบเพื่อยืนยันว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจะสามารถให้ผลการตรวจสอบระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายแม่นยำหรือไม่ โดยทำการรวบรวมตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข ควาย แกะ เป็ด และแพะ ชนิดละ 10 ตัวอย่าง จากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อที่ 2.1.3-2.1.4

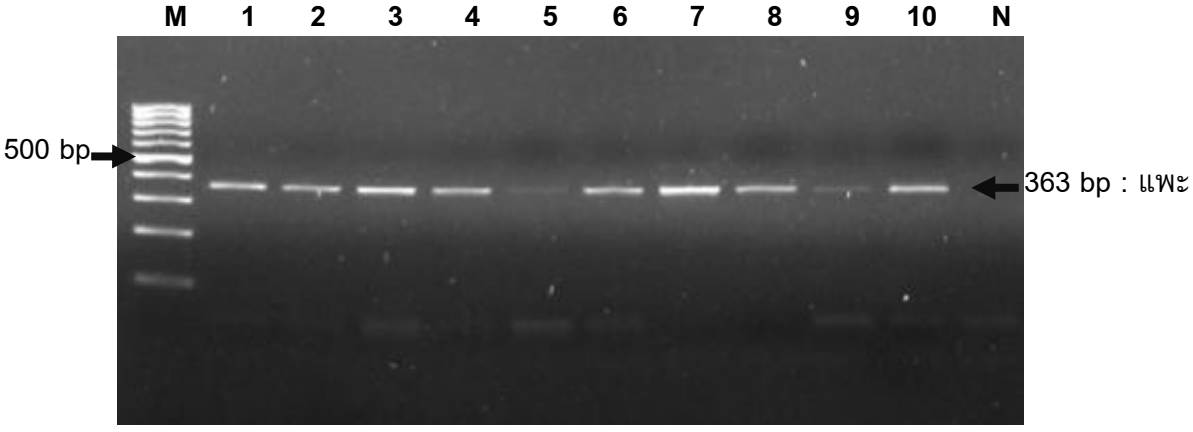
ผลการทดสอบ พบว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดได้ทั้ง 50 ตัวอย่าง และมีความถูกต้อง 100 % แม้จะมีแหล่งที่มาต่างกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดไว้คือ 230 คู่เบสสำหรับสุนัข (รูปที่ 42) 283 คู่เบสสำหรับเป็ด (รูปที่ 43) 363 คู่เบสสำหรับแพะ (รูปที่ 44) 396 คู่เบสสำหรับควาย (รูปที่ 45) และ 477 คู่เบสสำหรับแกะ (รูปที่ 46) และไม่พบแถบดีเอ็นเอในชุดควบคุมผลลบ ในช่อง N นั่นคือ ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องในสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการทำซ้ำ



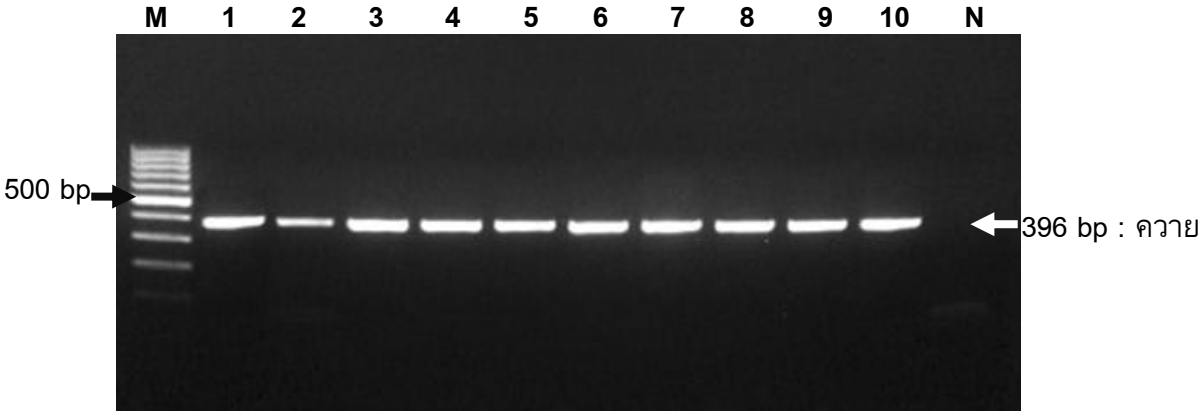
รูปที่ 42 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของสุนัข โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1-10 คือ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



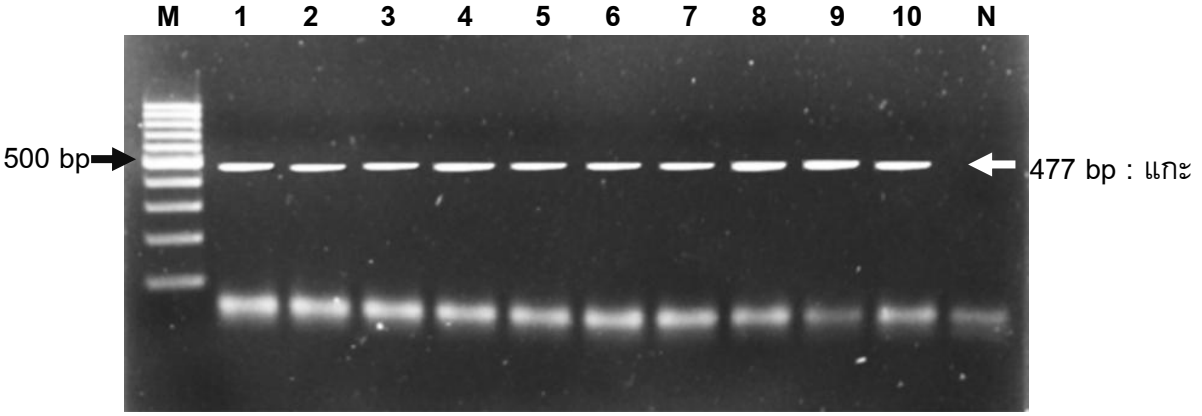
รูปที่ 43 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของเป็ด โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1-10 คือ เป็ด (*Anas platyrhynchos*) N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 44 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของแพะ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1-10 คือ แพะ (*Capra hircus*) N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 45 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของควาย โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1-10 คือ ควาย (*Bubalus bubalis*) N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

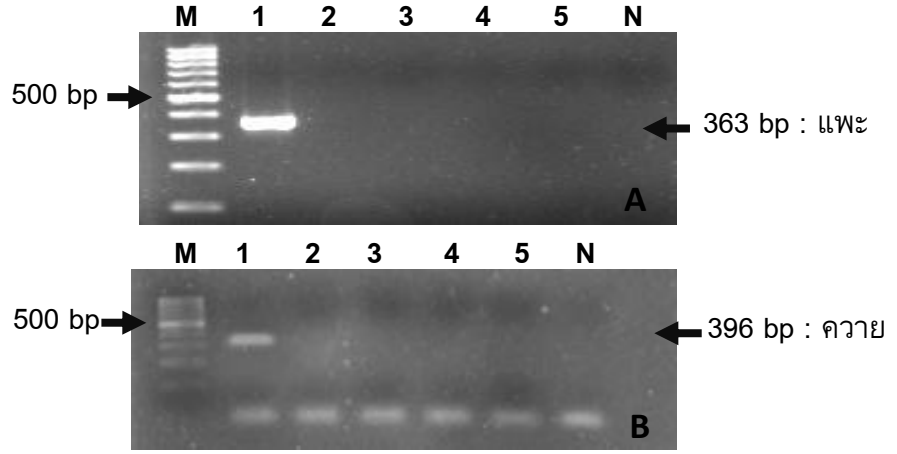


รูปที่ 46 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการทำซ้ำจากตัวอย่างของแกะ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1-10 คือ แกะ (*Ovis aries*) N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

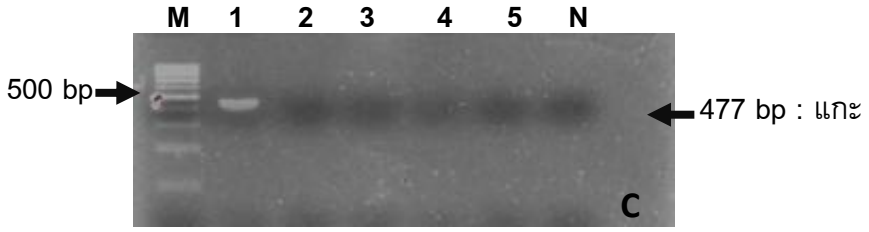
3.4.3 ผลการทดสอบความไววิเคราะห์ (Sensitivity test)

การทดสอบความไววิเคราะห์ของชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิดที่น้อยที่สุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจสอบได้ ทั้งนี้การทดสอบความไววิเคราะห์สามารถทดสอบได้โดยการเจือจางดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จำนวน 5 ความเข้มข้น คือ 100,000 50,000 25,000 12,500 และ 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล (mitochondrial copies) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เจือจางไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้อ 2.1.5.3

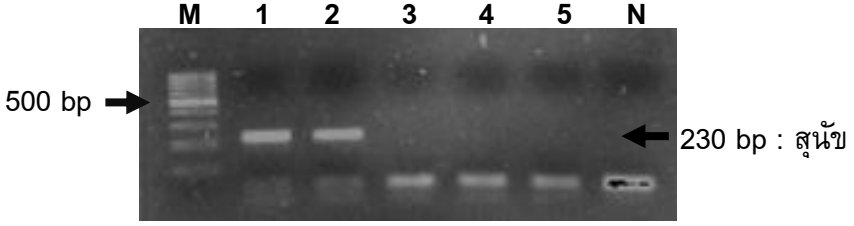
ผลการทดสอบความไววิเคราะห์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ของแพะ ควาย และแกะที่สามารถตรวจสอบได้ในปริมาณที่น้อยที่สุด คือ 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียล (รูป 47) และผลผลิตพีซีอาร์ของสุนัขและเป็ดที่สามารถตรวจสอบได้ในปริมาณที่น้อยที่สุด คือ 50,000 ชุด-ไมโทคอนเดรียล (รูป 48) และ 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล (รูป 49) ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 14



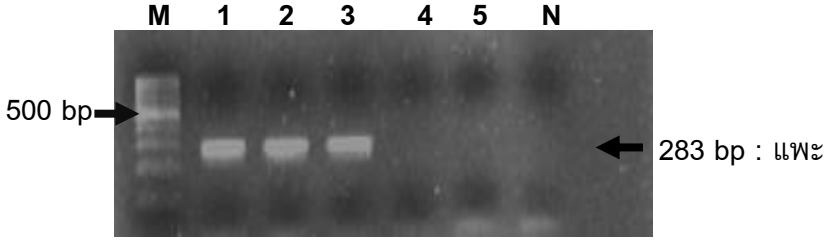
รูปที่ 47 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการความไววิเคราะห์จากตัวอย่างแพะ (A) ควาย (B) ตามลำดับ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 2 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 50,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 3 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 25,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 4 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 12,500 ชุดไมโทคอนเดรียล และ 5 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 47 (ต่อ) 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบการความไววิเคราะห์จากตัวอย่างแกะ (C) ตามลำดับ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 2 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 50,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 3 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 25,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 4 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 12,500 ชุดไมโทคอนเดรียล และ 5 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 48 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความไววิเคราะห์จากตัวอย่างสุนัข โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 2 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 50,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 3 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 25,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 4 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 12,500 ชุดไมโทคอนเดรียล และ 5 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)



รูปที่ 49 2% เจลอะกาโรส แสดงผลการทดสอบความไววิเคราะห์จากตัวอย่างเป็ด โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) 1 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 2 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 50,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 3 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 25,000 ชุดไมโทคอนเดรียล 4 คือ ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 12,500 ชุดไมโทคอนเดรียล และ 5 คือ ดีเอ็น-เอที่ความเข้มข้น 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียล N คือ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบความไววิเคราะห์ของชุดทดสอบปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่าง	mtDNA quantity (copies)				
	100,000	**50,000**	**25,000**	**12,500**	**6,250**
สุนัข (Dog)	++	+	-	-	-
แพะ (Goat)	+++	++	++	++	+
เป็ด (Duck)	++	-	-	-	-
ควาย (Buffalo)	++	-	-	-	-
แกะ (Sheep)	++	-	-	-	-

3.4.4 ผลการทดสอบกับตัวอย่างอาหาร (Commercial food test)

การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารโดยใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ดิบและอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปซึ่งวางขายตามท้องตลาด เป็นการทดสอบว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้จริงหรือไม่ เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปที่ต้องใช้ความร้อนทำให้ดีเอ็นเอในเนื้อสัตว์ถูกทำลายไป ดังนั้นการทวนสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างอาหารจึงนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อนำมาทดสอบจำนวน 62 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อสัตว์แช่แข็งจำนวน 19 ตัวอย่าง อาหารสำเร็จรูปแช่แข็งจำนวน 9 ตัวอย่าง เนื้อสัตว์ตากแห้งจำนวน 3 ตัวอย่าง และอาหารที่วางขายตามท้องตลาดจำนวน 31 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารทั้งหมด พบว่า ชุดทดสอบดังกล่าวสามารถตรวจสอบระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้ 52 ตัวอย่าง จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด 62 ตัวอย่าง คิดเป็น 83.9% โดยแบ่งเป็นประเภทเนื้อสัตว์แช่แข็ง 17 ตัวอย่างจากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง (89.47%) ซึ่งแบ่งเป็นตัวอย่างเนื้อเป็ด 7 ตัวอย่างจากทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างเนื้อแกะ 3 ตัวอย่าง จากตัวอย่างเนื้อแกะทั้งหมด 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อแพะ 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ในกรณีตัวอย่างเนื้อแพะ มีตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบดีเอ็นตรงกับของแพะและแกะ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์มากกว่า 1 ชนิด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปลอมแปลงได้เท่ากับ 15.5%

สำหรับผลการทวนสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นในการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารประเภทอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งจำนวน 9 ตัวอย่าง สามารถตรวจระบุชนิดได้ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 % โดยแบ่งเป็นตัวอย่างอาหารจากเนื้อเป็ดจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารจากเนื้อแพะจำนวน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารจากเนื้อแกะจำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เหล่านั้นตรงตามที่ระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารทุกตัวอย่าง

ประเภทเนื้อสัตว์ตากแห้งจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากเนื้อควายทั้งหมดพบว่า ชุดทดสอบสามารถตรวจสอบระบุชนิดของเนื้อสัตว์ดังกล่าวได้ในทุกตัวอย่าง คิดเป็น 100 % และประเภทอาหารตามท้องตลาดจำนวน 31 ตัวอย่าง พบว่า สามารถตรวจสอบ

ระบุชนิดเนื้อสัตว์ได้จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 74.19% โดยแบ่งเป็นตัวอย่างอาหารจากเนื้อเป็ดจำนวน 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารจากเนื้อแพะจำนวน 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 9 ตัวอย่าง อาหารจากเนื้อควายจำนวน 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารจากแกะจำนวน 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้ตัวอย่างอาหารที่ไม่สามารถตรวจระบุชนิดได้ อาจมีสาเหตุมาจากเนื้อสัตว์เหล่านั้นผ่านกระบวนการแปรรูปมาหลายขั้นตอนจึงทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายรวมถึงเครื่องปรุงและเครื่องเทศบางชนิดเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยผลการทดสอบตัวอย่างอาหารด้วยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น ดังแสดงผลในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างอาหารด้วยชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์

ประเภทตัวอย่างอาหาร	จำนวนรวม	สัตว์เป้าหมาย					% การปลอมแปลง
		สุนัข	เป็ด	แพะ	ควาย	แกะ	
เนื้อสัตว์แช่แข็ง	**19**						15.5
สุนัข	0	0/0					
เป็ด	9		7/9				
แพะ	7			5/7		2/7	
ควาย	0				0/0		
แกะ	3					3/3	
อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง	**9**						0
สุนัข	0	0/0					
เป็ด	6		6/6				
แพะ	2			2/2			
ควาย	0				0/0		
แกะ	1					1/1	
เนื้อสัตว์ตากแห้ง	**3**						0
สุนัข	0	0/0					
เป็ด	0		0/0				
แพะ	0			0/0			
ควาย	3				3/3		
แกะ	0					0/0	

ประเภทตัวอย่างอาหาร	จำนวนรวม	สัตว์เป้าหมาย					% การปลอมแปลง
		สุนัข	เป็ด	แพะ	ควาย	แกะ	
อาหารตามท้องตลาด	**31**						0
สุนัข	0	0/0					
เป็ด	20		15/20				
แพะ	8			5/8			
ควาย	2				2/2		
แกะ	1					1/1	

บทที่ 4

อภิปรายผลการศึกษา

ในการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร ความรู้ทางวิทยาศาสตร์หลายแขนงได้ถูกนำมาใช้ อาทิเช่น การดูโครงสร้าง วิเคราะห์โปรตีน และภูมิคุ้มกันวิทยา (Basset *et al.* 2000, García *et al.* 1994) เทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัยความชำนาญ และมักเกิดปัญหาโปรตีนเสื่อมสภาพจากความร้อนเมื่ออาหารผ่านกระบวนการแปรรูป เทคนิคทางอณูชีววิทยาจึงเป็นอีกสาขาหนึ่งที่มีการนำมาใช้เนื่องจากมีความแม่นยำและให้ผลรวดเร็ว อย่างไรก็ตามขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอยังคงใช้เวลามากและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากภายนอก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิดที่นิยมบริโภคในแถบเอเชีย ได้แก่ เนื้อสุนัข เป็ด แพะ ควายและแกะ ซึ่งชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นได้มีการนำไปทวนสอบประสิทธิภาพ ได้แก่ การทดสอบการทำซ้ำ การทดสอบความจำเพาะเจาะจง การทดสอบความไววิเคราะห์ และการประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆเพื่อเป็นการยืนยันว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้จริง

4.1 การทดสอบไพรเมอร์

ขั้นแรกของการพัฒนาชุดทดสอบ คือ การทดสอบไพรเมอร์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเป้าหมายด้วยเทคนิคเกรเดียนพีซีอาร์เพื่อหาอุณหภูมิ annealing สูงสุดที่ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้พร้อมๆกัน จากผลการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ 64-70 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ annealing ต่ำจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มมากกว่าที่อุณหภูมิ annealing สูง เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำไพรเมอร์สามารถเข้าไปจับกับสายแม่แบบและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายส่งผลให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์สูง ในขณะที่อุณหภูมิสูงๆ ไพรเมอร์เข้าไปเกาะสายแม่แบบได้ยากกว่าทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง อย่างไรก็ตามหากใช้อุณหภูมิที่ต่ำเกินไปไพรเมอร์อาจเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบอย่างไม่จำเพาะจงและส่งผลให้เกิดแถบดีเอ็นเอไม่จำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์เป้าหมายได้ และหากอุณหภูมิสูงเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์น้อย (Rychlik *et al.*1990, Edwards and Gibbs 1994) สำหรับไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้ จะมีอุณหภูมิ melting อยู่ระหว่าง 66.0-67.0 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงของอุณหภูมิ annealing ที่เลือกใช้ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ ดังนั้นการเลือกช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงถือเป็นเรื่องที่สำคัญ ซึ่งจากผลการทดสอบไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ทุกคู่ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดหวัง แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมี

ประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมายเท่านั้น ส่งผลให้ชุดทดสอบมัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย

4.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์

ในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็ค-พีซีอาร์ มีจุดประสงค์เพื่อปรับสภาวะทั้งหมดให้เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทุกตัว ซึ่งโดยปกติสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปรับอุณหภูมิ annealing ปรับความเข้มข้นไพรเมอร์ ปรับความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์ ปรับจำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ เป็นต้น (Butler 2005) สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ ปัจจัยที่ส่งผลให้ผู้วิจัยสามารถพัฒนาชุดทดสอบได้สำเร็จ ได้แก่ การเลือกใช้ชุดน้ำยาและวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม การเพิ่มความเข้มข้นไพรเมอร์และปริมาณตัวอย่างที่พอเหมาะ สำหรับชุดน้ำยาที่ใช้ในงานวิจัย คือ Phire Hot Start II DNA polymerase ซึ่งเป็นชุดน้ำยาใหม่ที่ได้รับการยืนยันจากผู้ผลิตว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิกว่าชุดน้ำยาดั้งเดิมอย่าง *Taq* DNA polymerase (Kitpipit *et al.* 2014) ทั้งนี้เนื่องมาจากชุดน้ำยา Phire มีองค์ประกอบที่เรียกว่า Sso-binding domain ซึ่งจะเข้าไปสร้างพันธะไฮเดรเจนกับนิวคลีโอไทด์บริเวณ minor groove ของสายดีเอ็น-เอ ทำให้โพลิเมอร์เรสสามารถเกาะกับสายดีเอ็นเอได้อย่างแข็งแรง (Wang *et al.* 2004) และทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอ็นเออย่างต่อเนื่องของโพลิเมอร์เรส (Processivity) เพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้บัฟเฟอร์ที่อยู่ในชุดน้ำยายังมี Bovine serum albumin (BSA) เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง BSA มีคุณสมบัติในการต้านทานตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเชื่อว่าเป็นตัวที่เข้าไปจับกับตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่จะเข้าไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิ-เมอร์เรส ทำให้เอนไซม์โพลิเมอร์เรสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Farell and Alexandre 2012) ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการไดเร็คพีซีอาร์นั้น ในงานวิจัยได้เลือกใช้ไดลูชั่นโพรโทคอลตามการศึกษาของ Kitpipit และคณะ (Kitpipit *et al.* 2014) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่างๆ เช่น ไมโอโกลบิน คอลลาเจน ไขมัน และเมลา-นิน (Schrader *et al.* 2012) ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารถูกเจือจางลงไป รวมทั้งยังปรับปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นในตัวอย่างให้มีปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกด้วย (Kitpipit *et al.* 2014, Linacre and Tobe 2013) และในกระบวนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะมีการใช้ Phosphate Buffered Saline (PBS) แช่ตัวอย่าง ซึ่งบัฟเฟอร์จะช่วยคงสภาวะพีเอชของสารละลาย และป้องกันการเกิดแอซิดไฮโดรไลซีสกับดีเอ็นเอในตัวอย่างได้ กระบวนการให้ความร้อนตัวอย่างที่ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 นาที จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกสู่สารละลาย รวมไปถึงทำลายเอนไซม์ DNase ที่จะย่อยสลายดีเอ็นเอในตัวอย่างด้วย (Kitpipit *et al.* 2014)

สำหรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย จะมีช่วงอยู่ตั้งแต่ 0.5-2.0 ไมโครโมลาร์ โดยไพรเมอร์คู่ที่มีความเข้มข้นสูงสุดเป็นไพรเมอร์ของแกะซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ถือว่าสูงกว่าช่วงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เล็กน้อย ซึ่งโดยปกติความเข้มข้นไพรเมอร์มักอยู่ในช่วง 0.1-1.0 ไมโครโมลาร์ (Butler 2005) อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์สูง ๆไม่ได้ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการตรวจวัดของชุดทดสอบ แต่การเพิ่มความเข้มข้นไพรเมอร์แกะกลับทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอของแกะได้ชัดขึ้น กรณีเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้และมีรายงานไว้ในงานวิจัยของ Petri และคณะ ซึ่งใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในการระบุเชื้อแบคทีเรียแลคติกในไวน์โดยใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่ 2-3 ไมโครโมลาร์ กับไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบสขึ้นไป (Petri *et al.* 2013) อย่างไรก็ตามการใช้ไพรเมอร์ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีโอกาสทำให้เกิดไดเมอร์ได้มาก หรือส่งผลให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับสายดีเอ็นเอผิดตำแหน่ง ซึ่งจะมาแย่งใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา เช่น dNTPs หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ส่งผลให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังน้อยกว่าปกติ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำเกินไปก็ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและส่งผลให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้น้อยเช่นกัน

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างปริมาณ 1×1 มิลลิเมตร โดยการศึกษา พบว่า ขนาดของตัวอย่างมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดของชุดทดสอบด้วย การใช้ปริมาณตัวอย่างมากเกินไปจะทำให้มีตัวยับยั้งพีซีอาร์มากทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและตรวจวัดดีเอ็นเอได้ และดีเอ็นเอที่มีมากเกินพออาจเข้าจับกับไพรเมอร์อย่างไม่จำเพาะเจาะจงหรืออาจเปลี่ยนแปลงสภาวะพีเอชของปฏิกริยาอีกด้วย ในขณะที่ปริมาณตัวอย่างน้อยเกินไปก็อาจไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์ (National Forensic Science Technology Center 2007) ในการทดลองเมื่อเตรียมตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kitpipit และคณะ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ในชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยใช้ปริมาณตัวอย่างในช่วง 0.3-1.0 ตารางมิลลิเมตร (Kitpipit *et al.* 2014) นอกจากนี้ ในกรณีที่ใช้ตัวอย่างในปริมาณมากเกินไปและไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ การแก้ปัญหาเบื้องต้นสามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างดังกล่าวมาเจือจางเพื่อให้ปริมาณของตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ลดลงและมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่เหมาะสมแก่การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในช่วง 1 นาโนกรัมถึง 1 ไมโครกรัม (New England Biolabs 2010)

4.3 การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์

หลังจากพัฒนาชุดทดสอบได้สำเร็จแล้ว จำเป็นจะต้องมีการทวนสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้มั่นใจว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยทำการทดสอบการทำซ้ำ การทดสอบความจำเพาะเจาะจง การทดสอบความไววิเคราะห์ และการประยุกต์ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างอาหารในท้องตลาด

4.3.1 การทดสอบการทำซ้ำ

การทดสอบการทำซ้ำมีจุดประสงค์เพื่อดูว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำในการตรวจวัดเนื้อสัตว์เป้าหมายหรือไม่ โดยจากผลการทดสอบพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้งหมด ซึ่งดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละชนิดที่เพิ่มปริมาณได้มีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เข้ม แสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง 100% ในการตรวจระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด แม้ว่าจะมาจากแหล่งที่มาใดๆก็ตาม จึงเป็นการยืนยันความมั่นใจในการนำชุดทดสอบไปประยุกต์ใช้จริงว่ามีความแม่นยำสูงและไม่มีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร

4.3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ในขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะเจาะจงมีจุดประสงค์เพื่อพิจารณาว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อเนื้อสัตว์เป้าหมายหรือมีโอกาสเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นๆหรือไม่ ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบมีความจำเพาะต่อเนื้อสัตว์เป้าหมายเท่านั้น และไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่นๆแม้จะเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงทางสายวิวัฒนาการก็ตาม โดยปัจจัยสำคัญที่ทำให้ชุดทดสอบมีความจำเพาะในการตรวจวัด คือ การออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งส่งผลต่อความจำเพาะเจาะจงของชุดทดสอบ โดยออกแบบไพรเมอร์จาก SNP ที่จำเพาะเจาะจงกับสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายมาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์หา SNP ของแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์โดยให้บริเวณ SNP อยู่ทางด้านปลาย 3’ ของไพรเมอร์ เช่นนี้จะทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายแม่แบบได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีโอกาสที่จะเกิดการจับกันผิด (mismatch) ได้น้อย และมีเพียงดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในกระบวนการพีซีอาร์ภายใต้สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม (ฐิติกา และภูวดล 2556) โดยตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมาที่นำหลักการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ อาทิเช่น Tobe และ Linacre ได้ใช้มัลติเพล็กซ์ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุม SNP เพื่อระบุชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 18 ชนิดในตัวอย่างดีเอ็นเอ

ผสมได้สำเร็จ (Tobe and Linacre 2008) ดังนั้น SNP จึงมีข้อดีที่เหมาะสำหรับใช้ในการพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ คือ สามารถใช้ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะแม้ตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นดีเอ็นเอผสม (Tobe and Linacre 2010) และสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 (COI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นบริเวณที่มีความแปรผันสูงระหว่างสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (high inter-species variation) แต่ในขณะเดียวกันก็มีความแปรผันน้อยในสิ่งมีชีวิตกลุ่มเดียวกัน (low intra-species variation) จึงสามารถใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ (Tobe *et. al* 2009) สำหรับยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 เป็นยีนที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (mutation) ต่ำกว่ายีนไซโตโครมบี (Petri *et al.* 2013, Schrader *et al.* 2012) และมีฐานข้อมูล BOLD (Barcode Of Life Database) เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงที่น่าเชื่อถือซึ่งสร้างขึ้นจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ทราบแหล่งที่มาแน่นอน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จึงทำให้ชุดทดสอบมีความจำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย (Hebert *et al.* 2004, Smith, Poyarkov, and Hebert 2008, Raju Panday *et al.* 2014)

4.3.3 การทดสอบความไววิเคราะห์

จากผลการศึกษาในการทดสอบความไววิเคราะห์ จะเห็นว่าชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่มีความไววิเคราะห์สูง ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้คือ 100,000 ชุดไมโทคอนเดรียลสำหรับเป็ด ควาย และแกะ 50,000 ชุดไมโทคอนเดรียลสำหรับสุนัข และต่ำสุด คือ 6,250 ชุดไมโทคอนเดรียลสำหรับแพะ ซึ่งปริมาณน้อยที่สุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้นั้นมีค่าเทียบเท่ากับ 0.84 เฟมโตกรัม ทั้งนี้ความไววิเคราะห์ของชุดทดสอบเป็นผลเนื่องมาจากการใช้วิธีไดเร็คในการเตรียมตัวอย่าง กล่าวคือตัวอย่างที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นไม่จำเป็นต้องผ่านการสกัดดีเอ็นเอมาก่อน เพียงแค่มีการปรับสภาพตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้ไม่มีการสูญเสียดีเอ็นเอไปเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ต้องผ่านการสกัดมาก่อน (Kitpipit *et al.* 2014) ดังนั้นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้งานทางนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งตัวอย่างที่ได้มามักจะมีความไม่สมบูรณ์ ดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพ หรือตัวอย่างอาหารก็มักมีการปนเปื้อนหรือปลอมปนดีเอ็นเอในปริมาณต่ำๆ (Kitpipit *et al.* 2014) เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความไววิเคราะห์สูงกว่างานวิจัยอื่นๆในลักษณะเดียวกัน เช่น งานวิจัยของ Hou และคณะ ทำการระบุชนิดของไก่ เป็ด และห่านด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณยีน 12S rRNA และ Cyt *b* ของสัตว์เป้าหมาย พบว่าเทคนิคสามารถตรวจวัดได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 500 พิโคกรัม (Hou *et al.* 2015) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Karabasanavar และคณะ ที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงกับ D-loop

ของหมูในการตรวจอาหารฮาลาลได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 10 พิโคกรัม (Karabasanavar *et al.* 2014)

4.3.4 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหาร

ในการนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหาร จะเห็นว่าชุดทดสอบสามารถระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ถูกต้องถึงกว่า 83.9% โดยมีเพียง 2 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่ตรงกับฉลากที่ระบุไว้ และอีก 10 ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างอาหารเหล่านี้ผ่านกระบวนการแปรรูปหลายขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ที่นำมาปรุงอาหารถูกทำลายหรือเสื่อมสภาพ รวมถึงส่วนประกอบและเครื่องปรุงที่นำมาใช้ประกอบอาหารอาจจะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น ไขมัน โปรตีน คอลลาเจน (Silva *et al.* 2011, KlanČnik *et al.*, Nielsen 2010) ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ในตัวอย่างอาหารดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นได้ออกแบบให้ชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเล็กเพื่อที่จะเพิ่มโอกาสในการตรวจเจอดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ในอาหารที่ต้องการตรวจสอบการปลอมปนของเนื้อสัตว์เป้าหมายปริมาณน้อยมากหรือผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปซึ่งผ่านกระบวนการการปรุงสุกจนดีเอ็นเอเกิดการเสียสภาพไปแล้วได้ (Köppel, Ruf, and Rentsch 2011, Kitpipit *et al.* 2014, Ali *et al.* 2012) สำหรับงานวิจัยนี้ผลผลิตพีซีอาร์ของสัตว์เป้าหมายอยู่ในช่วง 230-477 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กพอที่จะสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารได้และสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆในลักษณะเดียวกันก่อนหน้านี้ (Dalmasso *et al.* 2004, Bai *et al.* 2009) ทั้งนี้การออกแบบไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซี-อาร์ที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจทำให้การตรวจเกิดผลบวกปลอม เนื่องจากไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งแบบไม่จำเพาะเจาะจง ในขณะที่ผลผลิตพีซีอาร์ใหญ่เกินไปอาจทำให้เกิดผลลบปลอมเพราะชุดทดสอบไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพได้

การพัฒนาและทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าชุดทดสอบสามารถนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติเพื่อการตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารได้อย่างน่าเชื่อถือ แม่นยำ และมีโอกาสเกิดความผิดพลาดน้อย อย่างไรก็ตามชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นการตรวจวัดเชิงคุณภาพ จึงไม่สามารถบอกปริมาณการปลอมปนของเนื้อสัตว์ได้ อีกทั้งชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆกันไม่เท่ากัน ส่งผลให้ความไววิเคราะห์ของการตรวจหาสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิดไม่เท่ากันด้วย (Kitpipit *et al.* 2014, Ali *et al.* 2012) ดังนั้นจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ให้มีความไววิเคราะห์มากขึ้นได้ รวมถึงยังสามารถพัฒนาให้ชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซี-

อาร์มีความสามารถในการตรวจระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายได้ในจำนวนที่มากขึ้น เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบระบุชนิดของสัตว์เป้าหมายหลายชนิดได้พร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียว

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในการวิจัยครั้งนี้ สามารถพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์เพื่อตรวจระบุเนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภคในภูมิภาคเอเชีย 5 ชนิด ได้แก่ เนื้อสุนัข เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อควาย และเนื้อแกะได้สำเร็จ โดยผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบสามารถตรวจระบุชนิดเนื้อสัตว์ได้พร้อมๆกัน โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งปัจจัยสำคัญหลายอย่างที่ส่งผลต่อการพัฒนาชุดทดสอบ คือ การเลือกใช้วิธีการในการเตรียมตัวอย่าง การเลือกไพรเมอร์ และเลือกใช้ชุดน้ำยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม รวมถึงการหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่ ความเข้มข้นไพรเมอร์และปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น

หลังจากทำการพัฒนาชุดทดสอบได้สำเร็จ ได้มีกระบวนการทวนสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อยืนยันความมั่นใจในการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยทดสอบการทำซ้ำ ทดสอบความจำเพาะเจาะจง ทดสอบความไววิเคราะห์ และการนำเอาชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารจริง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ 100% โดยสามารถตรวจหาสัตว์เป้าหมายได้ตรงตามที่คาดหวังทุกตัวอย่าง และยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์เป้าหมายเนื่องจากการเลือกใช้ยีนไซโตโครมซีออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 และ SNP ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์ อีกทั้งชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นยังมีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้สำเร็จแม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยหรือมีดีเอ็นเออื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องปนเปื้อนอยู่ ซึ่งเป็นลักษณะของตัวอย่างที่มักพบบ่อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังใช้ทดสอบตัวอย่างอาหารที่มีการวางขายตามท้องตลาดได้จริง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของชุดทดสอบ คือ สามารถใช้ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อบอกว่ามีหรือไม่มีการปนเปื้อนของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณการปนเปื้อนได้

โดยสรุป ชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีมากมายหลายประการ ทั้งสามารถทำได้ง่ายและเสร็จสิ้นรวดเร็วภายในเวลา 2 ชั่วโมง ประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากสามารถใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา อีกทั้งชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นยังได้มีการทวนสอบการใช้งานจริงตามมาตรฐานสากล (Kitpipit *et al.* 2014 ,Butler 2005) ชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์จึงเป็นอีกเครื่องมือทางเลือกที่สำคัญในการ

ตรวจสอบมาตรฐานอาหารเพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนด และเพื่อประโยชน์ในบังคับใช้กฎหมายสำหรับการคุ้มครองปกป้องสิทธิของผู้บริโภค

บรรณานุกรม

กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน. 2550. ดีเอ็นเอกับงานนิติเวช. วารสารนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 1: 91-96.

กองแผนงาน. 2558. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเนื้อเป็ด (เนื้อเป็ดแปรรูปและเนื้อเป็ดแช่เย็น/แช่แข็ง) ปี 2548-2557. กรมปศุสัตว์. http://planning.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=795%3Asection-13-&catid=54%3Asection13&Itemid=87. (สืบค้นเมื่อ 22 มกราคม 2558).

กองแผนงาน. 2558. สรุปปริมาณและมูลค่าการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ปี 2548-2557. กรมปศุสัตว์. http://planning.dld.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=795%3Asection-13&catid=54%3Asection-13&Itemid=87 (สืบค้นเมื่อ 22 มกราคม 2558).

ฐิติกา กิจพิพิธ และภูวดล ธนเกียรติไกร. 2556. การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของสัตว์ป่าในงานนิติวิทยาศาสตร์. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 23: 729-740.

ฐิติกา กิจพิพิธ. เอกสารประกอบการสอน รายวิชา 309-503 นิติชีววิทยา 2(2-0-4), หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดลณพรรษ เฟื่องแก้ว. 2557. สรุปมูลค่าการนำเข้า/ส่งออก กระบือและผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ. 2557. http://ict.dld.go.th/th2 / index.php/th/report/397-import-export-year/inoutyear57/buffalo57/655-totalboffalo57 (สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 2557).

ดลณพรรษ เฟื่องแก้ว. 2557. สรุปมูลค่าการนำเข้า/ส่งออก แกะและผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ. 2557. http://ict.dld.go.th/th2 / index.php/th/report/400-import-export-year/inoutyear57/sheep57/698-totalsheep57 (สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 2557).

ดลณพรรษ เฟื่องแก้ว. 2557. สรุปมูลค่าการนำเข้า/ส่งออก แพะและผลิตภัณฑ์ ปี พ.ศ. 2557. http://ict.dld.go.th/th2 / index.php/th/report/3 9 9 -import-export-year/inoutyear5 7 / goat57/685-totalgoat57 (สืบค้นเมื่อ มิถุนายน 2557).

ด๊อกไลค์ดอทคอม. 2555. บทความ "เนื้อสุนัข" วัฒนธรรมการกินที่ทั่วโลกต่อต้าน!. บริษัทเด็กดี อินเตอร์แอคทีฟ จำกัด. http://www.dogilike.com/content/tip/1653/ (สืบค้นเมื่อ 20 กันยายน 2555).

ไทยรัฐออนไลน์. 2556. ข่าว จีนฉาวอีก! จับเนื้อปลอม 2 หมื่นตัน ผสมหนู จิ้งจอก สารเคมี. สำนักข่าวต่างประเทศ. http://www.thairath.co.th/content/342656 (สืบค้นเมื่อ 18 พฤษภาคม 2556).

บังอร บุญชู. 2557. ระวังอาหารปลอม. วราสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 194.

มูลนิธิเพื่อผู้บริโภค. 2552. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2552. ศูนย์พิทักษ์สิทธิผู้บริโภค. http://www.consumerthai.org/web/index.php/data-storage/law-right/food-law/122-2522.html (สืบค้นเมื่อ 25 มิถุนายน 2558)

ศิวพร อินต๊ะหล่อ. 2555. การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2546. พันธุศาสตร์โมเลกุล. ฝ่ายเทคโนโลยีการศึกษา สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J. Forensic Sci. 39: 362-372.

Al-Soud, W. A., Jönsson, L. J., Rådström, P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J. Clin. Microbiol. 38: 345-350.

Alaeddini, R. 2012. Forensic implications of PCR inhibition—a review. Forensic Sci. Int-Gen. 6: 297-305.

Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C. 2012. Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. Food Anal. Methods. 5: 935-955.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M., Coulson, A. R., Drouin, J. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nuture. 290: 457-465.

Arnott, S., Fulmer, A., Scott, W. E., Dea, I. C. M. 1974. Moorhouse R, Rees DA. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. J. Mol. Biol. 90: 269-284.

Bai, W., Xu, W., Huang, K., Yuan, Y., Cao, S., Luo, Y. 2009. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. Food Control. 20: 366-370.

Bartlett, J. M., Stirling, D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. PCR protocols: Springer: 3-6.

Basset, O., Buquet, B., Abouelkaram, S. D., Delaachartre, P., Culioli, J. 2000. Application of texture image analysis for the classification of bovine meat. Food Chem. 69: 437-445.

Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M., de Mazancourt, P. 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. Forensic Sci. Int. 99: 165-170.

Belec, L., Authier, J., Eliezer-Vanerot, M. C., Piédouillet, C., Mohamed, A. S., Gherardi, R. K. 1998. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of Thermus thermophilus polymerase. Muscle & nerve. 21: 1064-1067.

Bogner, P. N., Killeen, A. A. 2005. Extraction of nucleic acids. Molecular Diagnostics: Springer: 25-30.

Bonne, K., Verbake, W. 2008. Muslim consumer trust in halal meat status and control in Belgium. Meat Sci. 79: 113-123.

Borah, P. 2011. Primer designing for PCR. Sci Vis. 11: 134-136.

Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., Turi, R. M. 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats and sheep's milk in dairy products. Int. Diary J. 13: 277-282.

Butler, J. M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers: Academic Press.

Chial, H., Craig, J. 2008. mtDNA and mitochondrail diseases. Nature Education. 1: 217.

Cho, J. I. 2013. Development of Multiplex PCR Assay for Species Identification of cattle, hog, chicken and duck from raw meats. International Association for Food Protection. https://iafp.confex.com/iafp/2013/webprogram/Paper4361.html (accessed 15 June 2015)

Clayton, D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell. 28: 693-705.

Cronin, M. A. 1991. Palmisciano DA, Vyse ER, Cameron DG. Mitochondrial DNA in wildlife forensic science: species identification of tissues. Wildlife Soc. B. 19: 94-105.

Dai, C., Jiang M. 2013. Fake meat scandals add to Chinese food fears. BMJ 3385: 346.

Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., Bottero, M. T. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol. Cell. Probes. 18: 81-87.

Dieffenbach, C., Lowe, T., Dveksler, G. 1993. General concepts for PCR primer design. PCR Methods Appl. 3: S30-S37.

Edwards, M. C., Gibbsm, R. A. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Research. 3: S65-S75.

Farell, E. M., Alexandre, G. 2012. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. BMC research notes. 5: 257.

García, T., Martín, R., Morales, P., Haza, A. I., Anguita, G., González, I. Sanz, B., Hernández, P. E., 1994. Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. J. Sci. Food Agr. 66: 411-415.

Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Moussavi, A. H., Javadmanesh, A. 2009. Fraud I dentification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control. 20: 696-699.

Gibthai. 2014. Gel electrophoresis of protein. http://www.gibthai.com/service/note_detail/21 (accessed 10 September 2015).

Gongal, G., Wright, A. E. 2011. Human rabies in the WHO Southeast Asia Region: forward steps for elimination. Adv. Prev. Med: 1-5.

Hebert , P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biol. Sci. 270: 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biol. Sci. 270: S96-S99.

Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol. 2: e312.

Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., Vogt, P. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques. 23: 504-511.

Holland, M. M., Parsons, T. J. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. Forensic Science Review. 11: 21-50.

Hou, B., Meng, X., Zhang, L., Guo, J., Li, S., Jin, H. 2015. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. Meat Sci. 101: 90-94.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: Elsevier Science.

Innis, M., Gelfand, D. 1999. Optimization of PCR: conversations between Michael and David. PCR applications: protocols for functional genomics: 3-22.

Karabasanavar, N. S., Singh, S. P., Kumar, D., Shebannavar, S. N. 2014. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. Food Chem. 145: 530-534.

Kesmen, Z., A. Gulluce, F. S., Yetim, H. 2009. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Sci. 82: 444-449.

Khan, G., Kangro, H., Coates, P., Heath, R. 1991. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. J. Clin. Pathol. 44: 360-365.

Kidd, K., Ruano, G. 1995. Optimizing PCR. PCR. 2: 1-22.

Kingston, R. E. 1991. Introduction of DNA into mammalian cells. Current protocols in molecular biology: 9.0.1-9.0.5.

Kitpipit, T., Chotigeat, W., Linacre, A., Thanakiatkrai, P. 2014. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. Forensic Science, Medicine, and Pathology. 10: 29-38.

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

Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., Chotigeat, W. 2013. Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction. Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement Series. 4: e364-e365.

Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., Linacre, A., Lapwong, Y., Chotigeat, W. 2013. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis. Forensic Sci. Int.:Genetics Supplement Series. 4: e71-e72.

KlanČnik A, KovaČ M, Toplak N, Piskernik S, Jeršek B. 2012. PCR in Food Analysis. Polymerase chain reaction. Patricia Hernandez-Rodriguez. 195. Croatia: InTech.

Köppel, R., Ruf, J., Rentsch, J. 2011. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. Eur. Food Res. Technol. 232: 151-155.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 17: 1244-1245.

Linacre, A., Tobe, S. S. 2013. Wildlife DNA Analysis: Applications in Forensic Science. Oxford: Wiley-Blackwell.

New Englane Biolabs, Ltd. 2014. Principle of PCR. https://www.neb.com/~/media/NebUs/Page%20Images/Products/Polymerases%20and%20Amplification%20Technologies/pcr.jpg (accessed 24 October 2014).

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

National Forensic Science Technology Center, NFSTC. 2015. DNA Template. http://www.nfstc.org/pdi/Subject04/pdi_s04_m01_03_f.htm (accessed 15 October 2015)

New England Biolabs, Inc. 2015. Guidelines for PCR optimization with Phire Hot Start DNA polymerase https://www.neb.com/protocols/2012/05/31/guidelines-for-pcr-optimization-with-phire-hot-start-dna-polymerase (accessed 5 October 2014)

Nielsen S. S. 2010. Food analysis: Springer.

O'Mahany, P. 2013. Finding horse meat in beef product-a global problem. QIM. 106: 595-597.

Opel, K. L., Chung, D., McCord, B. R. 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real-time PCR. J. Forensic Sci. 55: 25-33.

World Health Organization. 2013. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organization technical report series: 1.

Ottens, R., Taylor, D., Abarno, D., Linacre, A. 2013. Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle. Forensic Sci. Med. Pathol. 9: 238-243.

Panday, R., Jha, D. K., Thapa, N., Pokharel, B. R., Aryal, N. K. 2014. Forensic wildlife parts and their product identification and individualization using DNA barcoding. Open Forensic Sci. J. 7: 6-13.

Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J., König, H. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. Food Microbiol. 33: 48-54.

Podberscek, A. L. 2009. Good to pet and eat: The keeping and consuming of dogs and cats in South Korea. J. Soc. Issues. 65: 615-632.

Rasul, C. H. 2014. Alarming situation of food adulteration. Bangladesh Medical Journal Khulna. 46: 1-2.

Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Hernández, P. E., Martín, R. 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. Meat Sci. 70: 113-120.

Rychlik, W., Spencer, W., Rhoads, R. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Res. 18: 6409-6412.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. 2012. PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. J. Appl. Microbiol. 113: 1014-1026.

Science. 2014. Recipes and Protocols. http://science.marshall.edu/murraye/Recipes.htm (accessed 10 Sep 2015).

Silva, D. S. P., Canato, T., Magnani, M., Alves, J., Hirooka, E. Y., de Oliveira, T. C. R. M. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. Int. J. Food Sci. Tech. 46: 1502-1507.

Sinden, R. R. 1994. DNA structure and function. Academic Press: Gulf Professional Publishing.

Smith, M. A., Poyarkov, N. A. Jr., Hebert, P. D. 2008. DNA barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Mol. Ecol. Resour. 8: 235-246.

Songserm, T., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Hulse-Post, D. J., Sturm-Ramirez, K. M., xxx. 2006. Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand. Emerg. Infect. Dis. 12: 575.

Stuff, Gallant's Biology. 2014. DNA Structure. http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/DNA_structure.jpg (accessed 24 October 2014).

Taanman, J. W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics: 1410: 103-123.

Tobe, S. S., Linacre, A. 2010. DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. Forensic Sci. Med. Pathol. 6:195-206.

Tobe, S. S., Linacre, A. M. 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. Electrophoresis. 29: 340-347.

Tobe, S. S., Kitchener, A. C., Linacre, A. 2011. Assigning confidence to sequence comparisons for species identification: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement Series. 3: e246-e247.

Tobe, S. S., Kitchener, A., Linacre, A. 2009. Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification—An answer to the debate. Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement Series. 2:306-307.

Tobe, S. S., Linacre, A. M. 2008. A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures. Forensic Sci. Int.: Genet. 2: 249-256.

Tobe, S., Kitchener, A., Linacre, A. 2010. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome. Plos One. 5: e14156.

Totton, S. C., Wandeler, A. I., Zinsstag, J., Bauch, C. T., Ribble, C. S., Rosatte, R. C.. 2010. Stray dog population demographics in Jodhpur, India following a population control/rabies vaccination program. Prev. Vet. Med. 97: 51-57.

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet. Select. Evol. 34: 275-306.

Wang, Y., Prosen, D. E., Mei, L., Sullivan, J. C., Finney, M., Vander-Horn, P. B. 2004. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. Nucleic Acids Res. 32: 1197-1207.

Watson, J. D., Crick, F. H. 1953. The structure of DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson, R., Blackwell, B. 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol. 46: 633-642.

Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741.

Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Polanskey, D., Replogle, J., Budowle, B. 1995. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. Int. J. Legal. Med. 108: 68-74.

Woolfe, M., Primerose, S. 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends Biotechnol. 22: 222-226.

Yoshii, T., Tamura, K., Ishiyama, I. 1992. Presence of a PCR-inhibitor in hairs. Jap. J. Leg. Med. 46: 313-316.

Yoshii, T., Tamura, K., Taniguchi, T., Akiyama, K., Ishiyama, I. 1993. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. Jap. J. Leg. Med. 47: 323-329.

Zhang, C. L., Mark R., Fowler, N. W., Scott, G. L., Slater, A. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. Food Control. 18: 1149-1158.

ภาคผนวก

การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิดในอาหาร

Multiplex-direct PCR Assay of Five Meat Species Identification in Foods

จิราภา เดชนัครินทร์[1*] **ภูวดล ธนะเกียรติไกร**[1] **และฐิติกา กิจพิพิธ**[1]

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(*Corresponding author; e-mail: Jirapa.Dechnakarin@gmail.com)

บทคัดย่อ การปลอมปนและปนเปื้อนของเนื้อสัตว์เป็นปัญหาที่มักพบในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งมักส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เศรษฐกิจ และอาจผิดต่อบทบัญญัติทางศาสนา การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารโดยไม่ต้องผ่านการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิดที่นิยมบริโภคในภูมิภาคเอเชียได้พร้อมๆกัน ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) ควาย (*Bubalus bubalis*) แกะ (*Ovis aries*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) และแพะ (*Capra hircus*) ด้วยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจง (species-specific primers) ซึ่งถูกออกแบบจากยีนไซโตโครมออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลการศึกษา พบว่า สามารถพัฒนาชุดทดสอบได้สำเร็จโดยให้แถบดีเอ็นเอขนาด 200,224,343,380 และ 421 คู่เบส สำหรับเนื้อเป็ด ควาย แพะ สุนัข และแกะ ตามลำดับ นอกจากนี้ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นยังได้มีการทวนสอบโดยการทดสอบการทำซ้ำ ความจำเพาะเจาะจง ความไวและการทดสอบกับตัวอย่างอาหาร และพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความน่าเชื่อถือ มีความจำเพาะเจาะจง และสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วโดยให้ผลการวิเคราะห์ภายในเวลา 90 นาที จึงนับว่าเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร เพื่อคุ้มครองสิทธิผู้บริโภคและบังคับใช้กฎหมายที่เกี่ยวข้องต่อไป

ABSTRACT Fraudulent labeling and unintentional contamination are often found in food manufacturing. They cause serious problems to public health and might break religious laws. In this study, a multiplex-direct PCR technique was developed to simultaneously identify five meat species consumed in Asia: dog (*Canis lupus familiaris*), duck (*Anas platyrhynchos*), buffalo (*Bubalus bubalis*), goat (*Capra hircus*) and mutton (*Ovis aries*), without the need for DNA extraction. Species-specific primers were designed from cytochrome oxidase I (COI) gene of mitochondrial DNA and provided the specific PCR fragments of 200, 224, 343, 380, and 421 bp for duck, buffalo, goat, dog and mutton, respectively. The assay was validated for its reproducibility, specificity, sensitivity and applicability in street food testing. The results indicated that this developed technique was highly reproducible, specific and reliable. It was also rapid as it can be completed within ninety minutes. Therefore, the multiplex-direct PCR could be useful for meat species identification in food products and could help in protecting consumer rights and enforcing food safety legislations.

คำสำคัญ: มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์, ไดเร็คพีซีอาร์, การระบุชนิดของเนื้อสัตว์

Keywords: Multiplex PCR, direct PCR, meat species identification

บทนำ

ปัจจุบันมีการวางจำหน่ายเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปหลากหลายรูปแบบ ซึ่งสะดวกต่อการเลือกซื้อของผู้บริโภค สำหรับประเทศในกลุ่มอาเซียนรวมถึงประเทศไทย นิยมรับประทานเนื้อสัตว์หลากหลายชนิด เช่น เนื้อเป็ด เนื้อควาย เนื้อแพะ เนื้อสุนัขและเนื้อแกะ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อสัตว์บางชนิดราคาแพงและบางชนิดเป็นเนื้อสัตว์ต้องห้ามที่ผิดหลักศาสนา [1] จึงทำให้ผู้ผลิตบางรายต้องการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลกำไรในธุรกิจโดยการปลอมปนหรือผสมเนื้อสัตว์ต่างชนิดที่มีราคาถูกหรือไม่ได้มาตรฐานลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นแล้วปิดฉลากไม่ตรงกับความจริง เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเจที่มีการปลอมปนเนื้อสัตว์หลายชนิด เช่น ปลา ปลาหมึก กุ้ง หรือไก่ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและส่งผลเสียต่อประเทศทั้งทางด้านเศรษฐกิจ ด้านศาสนา และทำลายความเชื่อมั่นของผู้บริโภคเป็นอย่างยิ่ง [2] ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองผู้บริโภคไม่ให้ถูกเอารัดเอาเปรียบจากกรณีดังกล่าว กระบวนการทางนิติวิทยาศาสตร์จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจพิสูจน์ระบุชนิดของเนื้อสัตว์จากตัวอย่างอาหารต้องสงสัยเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการดำเนินคดีทางกฎหมายและเพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมายที่เกี่ยวข้อง

เทคนิคที่สามารถใช้ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์มีหลากหลายเทคนิค เช่น การศึกษาทางด้านกายภาพของเนื้อสัตว์ โดยการวิเคราะห์โครงสร้างและสีของเนื้อ [3] เทคนิคทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunoassay) [4] เทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวสูง แต่มักเกิดปัญหาในการตรวจสอบเนื่องจากโปรตีนในเนื้อสัตว์ที่นำมาวิเคราะห์มักเสียสภาพจากความร้อนในกระบวนแปรรูปอาหาร ทำให้ผลที่ได้จากการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ไม่มีความน่าเชื่อถือ ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์จากอาหารโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล เช่น เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) [5] ที่สามารถตรวจสอบเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพและพบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจพิสูจน์สูง เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้หลายชนิดในการทำพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว [6-9] รวมถึงการนำเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR) [10] มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ [11] สำหรับตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ หมู แกะ ไก่ นกกระจอกเทศ ม้า และวัว ซึ่งเป็นเนื้อสัตว์ที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลาย [12] ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Canis lupus familiaris*) ควาย (*Bubalus bubalis*) แกะ (*Ovis aries*) เป็ด (*Anas platyrhynchos*) และแพะ (*Capra hircus*) ซึ่งเป็นเนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชีย และยังไม่มีรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์เหล่านี้ รวมทั้งทำการทวนสอบชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น เพื่อสามารถนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นไปใช้งานได้จริง

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and methods)

การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เป็ด ควาย แพะ สุนัข และแกะ รวมถึงเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้จะต้องมีการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์นั้นๆด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) ก่อน เพื่อเป็นการยืนยันว่าเนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยเป็นชนิดที่ตรงตามที่ระบุไว้จริง จากนั้นตัดชิ้นเนื้อด้วยมีดที่ปราศจากเชื้อ (Sterile scalpel) ใส่ถุงซิปที่สะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดจากบริเวณยีนไซโทโครมออกซิเดสหน่วยย่อยที่ 1 (cytochrome c oxidase subunit I, COI) บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ด้านฟอร์เวิร์ด (Forward species-specific primers) เป็นตำแหน่งที่จำเพาะกับสัตว์เป้าหมาย(5'TACTACTCAGGAAAAA AAGAACCATTCGG-3') ส่วนไพรเมอร์ด้านรีเวิร์ด (Reverse-universal primer) เป็นยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายได้ทุกชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์แพะ (5'-TTTCCCTACACCTAGC AGGCA-3') ไพรเมอร์สุนัข (5'-GTTCTACTCTTACTATCCCTGCCTGTACTG-3') ไพรเมอร์ควาย(5'-CCACGCAGGAGCTTCG-3') ไพรเมอร์เป็ด (5'-CACTCTCACAATACCAAACCCCA-3') และไพรเมอร์แกะ (5'-GTTACTCCTAGCATCCTCTATGGTTGAG-3') โดยออกแบบไพรเมอร์แต่ละคู่ให้มีค่าอุณหภูมิการหลอมตัว (Melting temperature, Tm) อยู่ในช่วง 65-67 องศาเซลเซียส รวมถึงมีการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical parameters) การจับกันภายในสายไพรเมอร์ (Self-complementary) และโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ก่อนนำไปใช้พัฒนาชุดทดสอบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ มาเตรียมตามวิธีการของ Kitpipit และคณะ [12] โดยตัดเป็นชิ้นประมาณ 1 ตารางมิลลิเมตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม 1M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใส (Pre-PCR solution) ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาครั้งนี้เตรียมองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดน้ำยา Phire®Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand) ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5X PCR [Phire® Animal Tissue PCR Buffer (Thermo Scientific, Thailand)] ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Deoxynucleotides (dNTPs) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร 1.0 unit PhirePhire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ชุดไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย ปริมาตรรวม 5.25 ไมโครลิตร Pre-PCR solution ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น (Distilled water) ปริมาตร 7.95 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น T100™ Bio-Rad จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) บน 2% อะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที

การทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex Direct PCR) ที่พัฒนาขึ้น

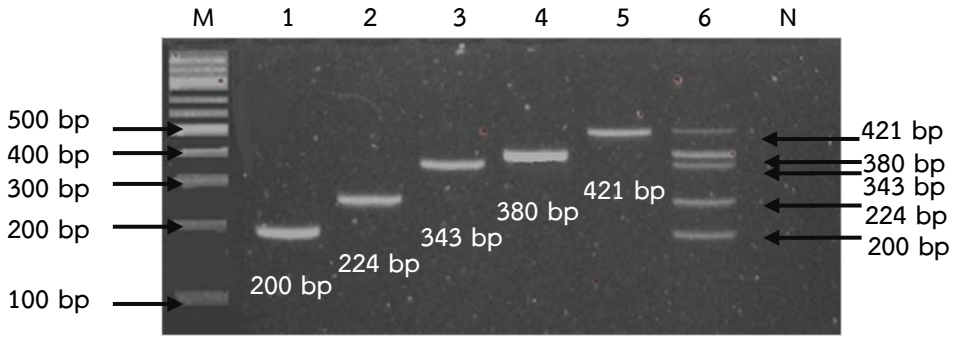
การศึกษาครั้งนี้ทำการทวนสอบชุดทดสอบมัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์สำหรับระบุชนิดของเนื้อสัตว์ โดยทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) โดยนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ จระเข้ (*Crocodylus siamensis*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) หมู (*Sus scrofa domestica*) ไก่ (*Gallus gallus domesticus*) วัว (*Bos primigenius*) กบ (*Hoplobatrachus rugulosus*) กระรอก (*Callosciurus finlaysonii*) และมนุษย์ (*Homo sapiens*) ทดสอบความไว (Sensitivity test) โดยการนำชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่เจือจางให้

มีความเข้มข้นระหว่าง 10^5-10^1 จำนวนซ้ำต่อไมโครลิตร (copies/µL) ทดสอบการทำซ้ำ (Reproducibility test) ของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น โดยทำการรวบรวมตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน จำนวน 26 ตัวอย่า**ง** และทดสอบกับตัวอย่างอาหาร (Street food test) จำนวน 31 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็นเนื้อสัตว์แช่เยือกแข็ง (Raw frozen meat) จำนวน 17 ตัวอย่าง อาหารแช่เยือกแข็ง (Instant frozen food) จำนวน 4 ตัวอย่าง อาหารแห้ง (Dried food) 3 ตัวอย่าง และอาหารข้างถนน (Street food) จำนวน 9 ตัวอย่าง

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย (Results and discussion)

การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย 5 ชนิดที่นิยมบริโภคในกลุ่มประเทศอาเซียนได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียวได้สำเร็จ โดยเนื้อสัตว์เป้าหมายที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ สุนัข เป็ด แพะ ควาย และแกะ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 200 224,343,380 และ 421 คู่เบส (bp) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้สามารถพัฒนาชุดทดสอบมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ทั้ง 5 ชนิดได้ประสบความสำเร็จ เป็นผลมาจากการใช้ชุดน้ำยา Phire®Hot Start II DNA Polymerase ซึ่งสามารถทนต่อสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitors) ที่สามารถพบได้ในตัวอย่างเนื้อดิบและผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ไมโอโกลบิน (Myoglobin) และ ฮีม (Heme) [13] นอกจากนี้การใช้ไดลูชั่นโพรโทคอล (Dilution protocol) ซึ่งช่วยเจือจางสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ [12] และการใช้ PBS ยังช่วยรักษาความเป็นกรดด่าง (pH) ให้เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่ส่งเสริมความสำเร็จ ได้แก่ การออกแบบไพรเมอร์ให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมและการกำหนดอุณหภูมิการหลอมตัวของไพรเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA template) ได้ที่อุณหภูมิ annealing (Ta) เดียวกัน รวมถึงการออกแบบไพรเมอร์ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกผลผลิตพีซีอาร์เหล่านี้ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผลการทวนสอบการใช้งานจริงแสดงให้เห็นว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายเท่านั้นและไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ ซึ่งให้ผลการทดสอบเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดได้ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบความไวในการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิดที่น้อยที่สุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจวัดได้ อยู่ระหว่าง 10^4 – 10^5 ชุด (mitochondrial copies) เทียบเท่ากับ 1-10 เซลล์กล้ามเนื้อลาย (muscle cell) เท่านั้น [14] ซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยมาก เหมาะสำหรับการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อสัตว์ในหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งตัวอย่างมักจะเสื่อมสภาพและเป็นตัวอย่างที่เกิดจากการปลอมปนและการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์อื่นๆในปริมาณที่น้อย และผลทดสอบการทำซ้ำของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด จำนวน 26 ตัวอย่า**ง** และผลการทดสอบกับตัวอย่างอาหาร จำนวน 31 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างเนื้อเป้าหมายและตัวอย่างอาหารทั้งหมดที่นำมาทดสอบไม่มีการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ทั้งนี้ผลจากการทวนสอบชุดทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นยังถือเป็นการยืนยันว่าชุดทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และสามารถนำไปใช้งานได้จริง



รูปที่ 1 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด ด้วยชุดทดสอบปฏิกิริยามัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder), 1: สุนัข (200 คู่เบส), 2: เป็ด (224 คู่เบส), 3: แพะ (343 คู่เบส), 4: ควาย (380 คู่เบส), 5: แกะ (421 คู่เบส), 6: รวมสัตว์เป้าหมายทั้ง 5 ชนิด (รวมPre-PCR solution สุนัข, เป็ด, แพะ, ควาย และแกะ), N ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

ชุดทดสอบมัลติเพล็กไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์จำนวน 5 ชนิดโดยการทดสอบเพียงครั้งเดียวและไม่ต้องผ่านการสกัดดีเอ็นเอนั้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดได้อย่างความจำเพาะเจาะจง มีความน่าเชื่อถือ รวมถึงประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดสอบ และใช้เวลาในการตรวจสอบและให้ผลภายในระยะเวลา 90 นาที จึงนับได้ว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมีประโยชน์ในการตรวจสอบและระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร เพื่อผลประโยชน์ทั้งในด้านสุขภาพ เศรษฐกิจ ศาสนาและคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภคและเพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมายเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารได้

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย และทุนวิจัยจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง (References)

[1] Woolfe M, Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends in Biotechnology. 2004;22:222-6.

[2] Ali ME, Razzak MA, Hamid SBA, Rahman MM, Amin MA, Rashid NRA, et al. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food Chemistry. 2015;177:214-24.

[3] Basset O, Buquet B, Abouelkaram Sd, Delachartre P, Culioli J. Application of texture image analysis for the classification of bovine meat. Food Chemistry. 2000;69:437-45.

[4] García T, Martín R, Morales P, Haza AI, Anguita G, González I, et al. Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1994;66:411-5.

[5] Zhang C-L, Fowler MR, Scott NW, Lawson G, Slater A. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. Food Control. 2007;18:1149-58.

[6] Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. International Dairy Journal. 2003;13:277-82.

[7] Cho JI. Development of Multiplex PCR Assay for Species Identification of Cattle, Hog, Chicken and Duck from Raw Meats. 2013 Annual Meeting (July 28-31, 2013): Iafp; 2013.

[8] Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control. 2009;20:696-9.

[9] Bataille M, Crainic K, Leterreux M, Durigon M, de Mazancourt P. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. Forensic Science International. 1999;99:165-70.

[10] Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Chotigeat W. Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4:e364-e5.

[11] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry.

[12] Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. Forensic Sci Med Pathol. 2014;10:29-38.

[13] Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition—a review. Forensic Science International: Genetics. 2012;6:297-305.

[14] Sforza S. Food Authentication Using Bioorganic Molecules: DEStech Publications, Inc; 2013.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจิราภา เดชนัครินทร์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220011

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistantship) คณะวิทยาศาสตร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ผู้ช่วยนักวิทยาศาสตร์ กลุ่มงานตรวจชีววิทยาและดีเอ็นเอ สังกัดศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 10

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

นำเสนอผลงาน เรื่อง การประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ 5 ชนิดในอาหาร ในงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 “พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์” เมื่อวันที่ 15-17 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมเซ็นทารา แอนด์ คอนเวนชั่นเซนเตอร์ ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น