การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร

A Multiplex Direct PCR for Meat Identification in Food Products

กึ่งทิวา สิทธิเชนทร์

Kuangtiwa Sittichan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Forensic Sciences

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร

A Multiplex Direct PCR for Meat Identification in Food Products

กึ่งทิวา สิทธิเชนทร์

Kuangtiwa Sittichan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Forensic Sciences

Prince of Songkla University

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร

ผู้เขียน นางสาวกึ่งทิวา สิทธิเชนทร์

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก **คณะกรรมการสอบ**

……..... ……..ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร) (พ.ต.ต. หญิง ดร. แสนสุข บุญสืบ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ……..กรรมการ

(ดร.เครือวัลย์ ยุนรัมย์)

……..... ……..…..กรรมการ

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

……..…..กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตวิทยาลัย สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ…….....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ…….....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ…….....
(นางสาวกิ่งทิวา สิทธิเชนทร์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ…….....

(นางสาวกึ่งทิวา สิทธิเชนทร์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร
ผู้เขียน นางสาวกึ่งทิวา สิทธิเชนทร์
สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นครั้งแรกในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารได้สำเร็จ โดยสามารถระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ถึง 6 ชนิดภายในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว ซึ่งไพรเมอร์ที่เลือกใช้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 6 ชนิด (Species-specific primer) โดยรวบรวมมาจากงานวิจัยต่างๆ ที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่น่าเชื่อถือ และออกแบบเอง ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวถูกออกแบบจากยีนไซโทโครมบี (Cyt *b*) ไซโตโครมออกซิเดส 1 (COI) และ 12 เอส ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (12s rRNA) โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) 100 คู่เบส 119 คู่เบส 133 คู่เบส 155 คู่เบส 253 คู่เบส และ 311 คู่เบส สำหรับเนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ตามลำดับ และชุดทดสอบดังกล่าวเป็นวิธีที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ใช้ระยะเวลาไม่เกิน 90 นาที ซึ่งเป็นประหยัดเวลาเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม ซึ่งความไวของวิธีนี้เกิดจากการที่ไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลให้ไม่มีการสูญเสียดีเอ็นเอไป อีกทั้งได้มีการทวนสอบชุดทดสอบ (Validation test) โดยให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ 100 เปอร์เซ็นต์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อสัตว์เป้าหมายสูง เป็นที่น่าเชื่อถือ และสามารถใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารในตัวอย่างตามท้องตลาดได้จริง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ต้องการตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย ประมาณ 0.3-1.0 ตารางมิลลิเมตร ก็เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จ สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ทั้งในอาหารที่เป็นเนื้อดิบ เนื้อปรุงสุก หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือปรุงสุกโดยใช้ความร้อนสูง ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการบังคับใช้ทางกฎหมาย เพื่อตรวจสอบการปลอมปนดีเอ็นเอของสัตว์อื่นในอาหาร

คำสำคัญ: ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง การสกัดดีเอ็นเอ ขนาดดีเอ็นเอ และการทวนสอบชุดทดสอบ

Thesis Title A Multiplex Direct PCR for Meat Identification in Food Products

Author Miss Kuangtiwa Sittichan

Major Program Forensic Sciences

Academic Year 2015

ABSTRACT

This is the first time that direct PCR, DNA amplification without prior DNA extraction, was successfully developed and fully validated for rapid and economical simultaneous identification of six commonly consumed meat species. To achieve this, six species-specific primers were selected from previous reports and newly designed from the mitochondrial cytochrome b (cyt b), cytochrome oxidase I (COI), and 12s rRNA gene. The assay generated PCR products of 100, 119, 133, 155, 253, and 311 bp for pork, lamb/mutton, chicken, ostrich meat, horsemeat and beef, respectively. Validation showed that the assay is robust, rapid, economical, reproducible, specific, and sensitive down to 12,500 mitochondrial copy (equating to seven fg). It could be used with a variety of raw meats and products, including highly degraded and processed food samples. This proposed method will be greatly beneficial to the consumers, food industry, and law enforcement.

Keywords: Multiplex PCR, Direct PCR, Meat species, Identification and Validation

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติกา กิจพิพิธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และแนะนำเทคนิคต่างๆ ทางด้านนิติอณูชีววิทยาที่จำเป็นในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงช่วยตรวจทาน แนะนำวิธีการเขียน และแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ พ.ต.ต. หญิง ดร. แสนสุข บุญสืบ ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.เครือวัลย์ ยุนรัมย์ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่า และเสนอแนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนวิจัยทั่วไปของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่คอยให้คำแนะนำ และดำเนินการด้านเอกสารต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณครอบครัว สำหรับโอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษาและกำลังใจตลอดช่วงระยะที่ผ่านมาจนสำเร็จการศึกษา

กึ่งทิวา สิทธิเชนทร์

สารบัญ

รายการ	หน้า
รายการตาราง	(12)
รายการภาพประกอบ	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	4
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	5
1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในอาหารแลการบริโภค	5
2. ความรู้เกี่ยวกับอาหารฮาลาล	8
3. กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองสิทธิ์ผู้บริโภค	9
4. เทคนิคการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์	12
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	25
1. การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ (Sample collection)	25
2. การออกแบบ และการเลือกไพรเมอร์ (Oligonucleotide primer design)	26
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)	34
4. การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA seperation and detection)	37
5. การทวนสอบชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Validation test)	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง	44
1. การทดสอบไพรเมอร์โดยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Primer test and direct amplification)	44
2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แบบซิงเกิลเพล็กซ์ (Singleplex)	49
3. การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex optimization)	53
4. การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดทดสอบ (Assay validation test)	61
บทที่ 5 การอภิปรายผลการทดลอง	67
ขนาดของตัวอย่างชิ้นเนื้อมีความเหมาะสม	67

สารบัญ (ต่อ)

รายการ	หน้า
บทที่ 5 การอภิปรายผลการทดลอง (ต่อ)	
กระบวนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้ PBS buffer ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	68
การใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	68
การเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ (Primer)	69
มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ	71
วิเคราะห์ผลการศึกษาเรื่องการทวนสอบการใช้งานจริงของชุดทดสอบ (Assay validation)	72
ข้อดีและข้อเสียของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่พัฒนาขึ้น	74
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	75
บรรณานุกรม	77
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียน	91

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ (Sample collection)	25
ตารางที่ 2	แสดงไพรเมอร์ที่เลือกมาจากวารสารนานาชาติที่น่าเชื่อถือ	26
ตารางที่ 3	แสดงเลขหมายทะเบียน (Accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Genbank	27
ตารางที่ 4	แสดงไพรเมอร์ที่มาจากการออกแบบในการศึกษานี้	31
ตารางที่ 5	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา	32
ตารางที่ 6	แสดงสภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	34
ตารางที่ 7	แสดงส่วนประกอบที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Singleplex PCR)	35
ตารางที่ 8	แสดงส่วนประกอบที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Multiplex PCR)	36
ตารางที่ 9	แสดงชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย จำนวนตัวอย่าง แหล่งที่มาของเนื้อสัตว์ และจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test)	38
ตารางที่ 10	แสดงประเภท และที่มาของตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test)	39
ตารางที่ 11	แสดงประเภทของผลิตภัณฑ์อาหาร รายการอาหาร ตราสินค้า เนื้อสัตว์ที่ระบุข้างฉลาก และแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้ในตรวจสอบการปนเปื้อนของตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด	40
ตารางที่ 12	แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้	44
ตารางที่ 13	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2	54

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		**หน้า**
ตารางที่ 14	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3	56
ตารางที่ 15	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4	57
ตารางที่ 16	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 5	58
ตารางที่ 17	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6	59
ตารางที่ 18	แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 7	60
ตารางที่ 19	แสดงผลการศึกษาการใช้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test)	66

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	แสดงอัตราการเติบโตของสินค้าการแปรรูปในรายกลุ่มประเทศ	8
รูปที่ 2	แสดงโครงสร้างดีเอ็นเอ	12
รูปที่ 3	แสดงจีโนมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์	13
รูปที่ 4	แสดงการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อการทำพีซีอาร์	16
รูปที่ 5	แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	17
รูปที่ 6	แสดงการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์อาร์	18
รูปที่ 7	แสดง Sequence alignment ของไซโทโครมบียีน (Cytochome *b*; Cyt *b*) โดยใช้โปรแกรม Geneious	29
รูปที่ 8	แสดง Sequence alignment ของไซโทโครมออกซิเดส (Cytochom oxidase I; COI) โดยใช้โปรแกรม Geneious	29
รูปที่ 9	แสดงขั้นตอนการออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Foreward primer) ให้มีความจำเพาะเจาะจง (Specific primer) กับลำดับเบส (Single nucleotide polymorphism; SNP) บนสายนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมายตรงปลาย 3' โดยใช้โปรแกรม Geneious	30
รูปที่ 10	แสดงขั้นตอนการออกแบบรีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) โดยออกแบบเป็นยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) ซึ่งจะเลือกบริเวณมีลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในสัตว์ต่างชนิดกันตรงปลาย 3' โดยใช้โปรแกรม Geneious	30
รูปที่ 11	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่บนไมโทคอนเดรียลยีน	33
รูปที่ 12	ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C	46

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 13 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C 46

รูปที่ 14 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus* -specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C 47

รูปที่ 15 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C 47

รูปที่ 16 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C 48

รูปที่ 17 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C 48

รูปที่ 18 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific primer) 49

รูปที่ 19 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries* -specific primer) 50

รูปที่ 20 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus*-specific primer) 50

รูปที่ 21 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific primer) 51

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 22 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific primer) 51

รูปที่ 23 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus* -specific primer) 52

รูปที่ 24 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 1 54

รูปที่ 25 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 55

รูปที่ 26 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒน าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3 56

รูปที่ 27 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4 57

รูปที่ 28 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 5 58

รูปที่ 29 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6 59

รูปที่ 30 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 7 60

รูปที่ 31 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) มาการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) 62

รูปที่ 32 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) 64

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันมนุษย์มีการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เพิ่มมากขึ้นเป็นทวีคูณ ซึ่งพบวางขายในท้องตลาดหลากหลายรูปแบบ อาทิเช่น เนื้อสัตว์ดิบ (Raw meat) เนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut) อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food) เป็นต้น ทำให้การตรวจสอบองค์ประกอบในอาหาร รวมถึงการตรวจระบุชนิดเนื้อสัตว์ เป็นข้อบังคับตามกฎหมายในหลายๆประเทศ เพื่อที่จะคุ้มครองผู้บริโภคไม่ให้ถูกเอาเปรียบจากผู้ประกอบการที่หวังผลกำไรเกินควร โดยการใช้วัตถุดิบที่ไม่ได้มาตรฐาน การปนเปื้อนของเนื้อสัตว์อื่น หรือติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริง (1) นอกจากนี้ปัญหาการปนเปื้อนเนื้อหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลยังเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญซึ่งขัดต่อบทบัญญัติทางศาสนา จากรายงานพบว่าการบริโภคอาหารฮาลาลได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้มียอดขายผลิตภัณฑ์อาหาร ฮาลาลสูงถึง 641 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (USD) ในปี พ.ศ.2553 และเพิ่มขึ้นมากกว่า 661 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (USD) ในปี พ.ศ.2554 ดังนั้นในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย สิงคโปร์ จึงจัดตั้งหน่วยงานเฉพาะที่ทำหน้าดูแลและควบคุมการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล (1) เพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารเหล่านี้ให้ได้มาตรฐาน จากกรณีศึกษาที่ผ่านมาพบการละเมิดกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภคอยู่บ่อยครั้งในหลากหลายรูปแบบ อาทิเช่น จากการสำรวจของมหาวิทยาลัยอิสลามมาเลเซีย (Islamic University, Malaysia) พบการปนเปื้อนเนื้อหมูในอาหารฮาลาลจำนวน 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง (2) หรือกรณีพบการปนเปื้อนเนื้อม้าในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวจำนวนทั้งสิ้นร้อยละ 29 ของตัวอย่างทั้งหมดจากห้างเทสโก้ ในประเทศอังกฤษ ซึ่งตรวจพบในปี พ.ศ.2556 (3) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการปลอมปนเนื้อสัตว์ราคาถูกแทนที่เนื้อสัตว์เศรษฐกิจที่มีราคาแพง เพื่อลดต้นทุนการผลิต ดังเช่นในกรณีการปลอมปนเนื้อไก่ในผลิตภัณฑ์จระเข้ หรือในกรณีการปลอมปนอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของสัตว์ชนิดอื่น เช่น หมู วัว แกะ และสัตว์ปีกในผลิตภัณฑ์เนื้อกวาง (4-6) เป็นต้น ดังนั้นนิติวิทยาศาสตร์จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจองค์ประกอบเนื้อสัตว์ในอาหารเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน หรือการปลอมปนเนื้อสัตว์ใน

ผลิตภัณฑ์อาหารทุกรูปแบบ เพื่อเป็นประโยชน์ในการบังคับใช้กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค

เทคนิคทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในอาหารได้รับการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อให้มีประสิทธิภาพและความไวในการตรวจสอบที่ดีขึ้น โดยเริ่มแรกมีการนำเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ วิธีเอ็นไซม์ไลน์เกด อิมมูโนซอบแบนท์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) และไอโซเล็คทริค โฟคัสซิ่ง (Isoelectric focusing; IEF) เป็นต้น (4) ซึ่งวิธีเหล่านี้นิยมใช้วิเคราะห์เนื้อสัตว์ดิบ แต่มีข้อจำกัดในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ คือโปรตีนที่จำเพาะกับเนื้อสัตว์แต่ละชนิดในอาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่ใช้ความร้อนมักถูกทำลาย ทำให้ตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าวได้ยาก (7, 8) ต่อมาจึงมีการประยุกต์ใช้การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร ได้แก่ วิธีดีเอ็นเอ ไฮบริไดซ์เซชัน (DNA hybridization) มัลติเพล็กซ์ด้วยสปีชีส์สเปคซิฟิคไพรเมอร์พอลิเมอร์เรสเชนรีแอ็คชัน (Multiplex species-specific primer polymerase chain reaction; PCR) หรือเรียลไทม์ พีซีอาร์ (real-time PCR) เป็นต้น (4, 9-13) ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์สูง มีความจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อสัตว์เป้าหมาย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่พบในปริมาณน้อยได้ และสามารถประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้ทั้งเนื้อสัตว์ดิบและเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการพัฒนาเทคนิคการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ในอาหารมากมาย เช่น Abbas Doosti และคณะ ประยุกต์ใช้เทคนิคพอลิเมอร์เรสเชนรีแอ็คชัน (Polymerase chain reaction; PCR) การใช้เทคนิคพอลิเมอร์เรสเชนรีแอ็คชันแฟรกเมนต์เลงท์พอลิมอร์พีซีม (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP) (14) หรือ การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR (4, 6) ซึ่งพบว่าเทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดเวลา มีความจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อสัตว์เป้าหมาย มีความไวในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์สูง และน่าเชื่อถือ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เหมาะต่อการนำไปใช้ทดสอบเนื้อสัตว์ในตัวอย่างอาหารในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในทางอณูชีววิทยา รวมถึงในสาขานิติวิทยาศาสตร์ดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่สามารถประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในด้านสารเคมี เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ อีกทั้งยังมีความไวในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสูง เนื่องจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอนั้นทำให้สูญเสียดีเอ็นเอจากตัวอย่าง โดยจะได้ปริมาณดีเอ็นเอกลับคืนเพียงร้อยละ 16-30 ของดีเอ็นเอทั้งหมด (15-17) จึงทำให้โอกาสในการได้รับผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอลดลง เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ยังสามารถลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องได้ดีกว่าวิธีการ

สกัดดีเอ็นเอ เนื่องมาจากการสกัดดีเอ็นเอจะมีขั้นตอนการถ่ายโอนสารซึ่งจะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนดีเอ็นจากสิ่งแวดล้อม จากงานวิจัยของ Kitpipit T. และคณะในปี พ.ศ.2557 พบว่าเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานสัตว์ป่าหลากหลายประเภท เช่น ตัวอย่างเลือด เส้นผม เนื้อสัตว์ แม้กระทั่งในตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย หรือ มีอายุการเก็บที่ยาวนาน เช่น ตัวอย่างกระดูก และเขากวางจากพิพิธภัณฑ์ (18) เป็นต้น และจากงานวิจัยของ Swaran และคณะในปี พ.ศ.2555 ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอมนุษย์จากสไลด์ที่ทำด้วยแก้ว พลาสติก เหล็ก และเซรามิค พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวัตถุพยานที่พบตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) ได้ และให้ข้อมูลลายพิมดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (17)

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ในการตรวจสอบองค์ประกอบของเนื้อสัตว์ในอาหารมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์จำนวน 6 ชนิด ที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในอาหาร ซึ่งได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA; mtDNA) และทำการทวนสอบชุดทดสอบ (Validation test) ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) และการทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test) ซึ่งยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ใช้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารปรากฏมาก่อน

วัตถุประสงค์

1.เพื่อพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex-direct PCR) ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์จำนวน 6 ชนิดในการทดสอบครั้งเดียว ซึ่งประกอบไปด้วยเนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหาร หรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

2.เพื่อทวนสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น (Validation test) โดยการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) และการทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test)

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในอาหารและการบริโภค

เนื้อสัตว์ (Meat)

เนื้อสัตว์ (Meat) หมายถึง ชิ้นส่วนของร่างกายสัตว์ที่มนุษย์นำมาบริโภคเป็นอาหาร ได้แก่ กล้ามเนื้อ เอ็น ไขมัน หัวใจ ตับ อวัยวะเพศ เป็นต้น โดยจะสามารถแบ่งออกตามลักษณะและแหล่งที่มาได้ดังนี้ (19)

1. เนื้อแดง (Red meat) คือ เนื้อของสัตว์ที่มีกีบเท้า ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อควาย เนื้อแกะ เนื้อแพะ เป็นต้น

2. เนื้อสัตว์ปีก (Poultry meat) คือ เนื้อของสัตว์ปีกที่มนุษย์เลี้ยงไว้สำหรับบริโภค ได้แก่ เนื้อห่าน เนื้อเป็ด เนื้อไก่ เป็นต้น

3. เนื้อสัตว์ป่า (Game meat) คือ เนื้อของสัตว์บกทุกชนิดที่เติบโตมาโดยธรรมชาติในป่าเขา ซึ่งมนุษย์จะออกล่าเพื่อความสนุกแบบเกมกีฬา หรือออกล่าเพื่อนำมาบริโภค ได้แก่ เนื้อเก้ง เนื้อกวาง เนื้อหมูป่า เนื้อกระรอกป่า เป็นต้น

4. เนื้อสัตว์น้ำ (Aquatic meat) คือ เนื้อของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ หมายความรวมทั้งสัตว์น้ำจืดและสัตว์น้ำค็ม ทั้งชนิดที่เติบโตมาโดยธรรมชาติและที่มนุษย์เลี้ยงไว้สำหรับบริโภค ได้แก่ กุ้ง หอย ปู ปลา เป็นต้น

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีประโยชน์มากในด้านโภชนาการ เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงซึ่งจะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (Essential amino acid) ครบถ้วนทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ เฟนิลอลานีน (Phenylalanine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ลิวซีน (Leucine) แวลีน (Valine) ทรีโอนีน (Threonine) เมทไทโอนีน (Methionine) ทริปโตเฟน (Tryptophan) และไลซีน (Lysine) ในปริมาณ

ที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (19) นอกจากนี้ในเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะพบกรดไขมันทั้งประเภทอิ่มตัว ได้แก่ กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) และกรดสเตียริก (Stearic acid) และกรดไขมันประเภทไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid) กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid) และกรดอะราชิโดนิก (Arachidonic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นสิ่งที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ โดยจะมีประโยชน์ในกระบวนการเมตาโบลิซึม (Metabolism) นอกจากนี้เนื้อสัตว์ยังอุดมด้วยแร่ธาตุ และเป็นแหล่งของวิตามินต่างๆ ซึ่งหากร่างกายขาดสารอาหารเหล่านี้จะส่งผลให้ร่างกายไม่เจริญเติบโต แคระแกร็น ผอม มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง หรือเป็นโรคโลหิตจาง เป็นต้น

ผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ และประโยชน์

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการแปรรูปเนื้อสัตว์โดยผ่านกระบวนการหรือกรรมวิธีต่างๆ เช่น การบด การหมัก การปั่น การรมควัน การให้ความร้อน การใส่ไส้ ปรุงแต่งรสกลิ่นสี เป็นต้น โดยเนื้อสัตว์ที่นิยมนำมาแปรรูปส่วนใหญ่ คือ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อไก่ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมได้แก่ แหนม กุนเชียง ลูกชิ้น หมูแผ่น หมูหยอง ไก่หยอง แฮม เบคอน เป็นต้น (19)

ประโยชน์ของการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์

1. ทำให้เนื้อสัตว์ที่ถูกนำมาแปรรูปสามารถเก็บรักษาได้นานโดยไม่เกิดการเน่าเสีย เนื่องจากในกระบวนการแปรรูปเนื้อสัตว์จะผ่านกระบวนการ หรือกรรมวิธีต่างๆ ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ถูกทำลาย หรือถูกยับยั้งทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้

2. ในด้านคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จะมีประโยชน์เทียบเท่ากับเนื้อสดแล้ว ในบางผลิตภัณฑ์ยังมีการเพิ่มผักหรือสมุนไพรเข้าไปทำให้มีวิตามิน และเกลือแร่ที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

3. ช่วยเพิ่มมูลค่าของเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์ผ่านกระบวนการ หรือกรรมวิธีต่างๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เช่น แหนม กุนเชียง หมูแผ่น ไก่หยอง แฮม เบคอน เป็นต้น จะสามารถจำหน่ายได้ในราคาที่สูงขึ้น

4. ช่วยส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศ ทำให้มีการขยายตลาดเพื่อการจำหน่ายได้เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งในกรณีที่มีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ จะทำให้ทำให้มีเงินตราไหลเข้าประเทศ และช่วยลดปัญหาการขาดดุลการค้า

5. ช่วยส่งเสริมให้ประชากรในประเทศมีงานทำเพิ่มขึ้น ลดปัญหาคนว่างงาน ทำให้มีรายได้เลี้ยงครอบครัว เนื่องจากแรงงานคนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นในอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์

การบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ และรูปแบบของอาหาร

ปัจจุบันโลกมีจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น และเพื่อให้ก้าวทันโลกที่ทันสมัยทำให้มนุษย์มีการดำรงชีวิตอย่างเร่งรีบ เนื่องจากมีอัตราการแข่งขันที่สูงขึ้น ทำให้เวลาส่วนใหญ่ถูกใช้ไปกับการทำงาน อาหารสำเร็จรูปจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการบริโภคมากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตได้มีการปรับรูปแบบของผลิตภัณฑ์ให้มีความหลากหลายมากขึ้น ทั้งในด้านรูปแบบ รสชาติ และสีสัน ตลอดจนบรรจุภัณฑ์เพื่อให้เหมาะกับความชอบของผู้บริโภค เช่น เนื้อสัตว์ดิบ (Raw meat) เนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut) อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food) เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคให้สามารถเลือกซื้อได้ตามความชอบ

ปริมาณการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้นตามจำนวนของประชากร จากข้อมูลของสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตรพบว่า สาขาปศุสัตว์มีอัตราการขยายตัวในภาพรวมของปี พ.ศ.2554 เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 1.2 ของปีที่ผ่านมา คิดเป็นตัวเลขการผลิตเนื้อสัตว์ทุกชนิดรวมประมาณ 5.3 ล้านตัน และขยายตัวเพิ่มมากขึ้นเป็นร้อยละ 2.1-3.1 ในปี พ.ศ.2555 เนื่องจากความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์ทั้งตลาดในประเทศและตลาดต่างประเทศมีอัตราที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (19, 20) และจากข้อมูลของสำนักงานที่ปรึกษาทางเศรษฐกิจ บมจ. เจริญโภคภัณฑ์อาหาร พบว่าประเทศที่มีอัตราการเติบโตของอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปมากที่สุดคือ อิหร่าน และประเทศที่น่าสนใจได้แก่ อินเดีย จีน และอินโดนีเซีย โดยเมื่อพิจารณาในเชิงการเติบโตของอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปพบว่า สินค้าไทยยังมีอัตราการเติบโตติด 1 ใน 10 ประเทศของโลก

เมื่อพิจารณาอัตราการเติบโตของสินค้าการแปรรูปในรายประเทศพบว่า ประเทศที่มีอัตราการเติบโตสูงสุดคือ กลุ่มประเทศในเอเชียแปซิฟิก แต่ในเชิงมูลค่าสูงสุดพบว่าเป็นของกลุ่มประเทศแอฟริกา และกลุ่มประเทศตะวันออกกลาง ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงอัตราการเติบโตของสินค้าการแปรรูปในรายกลุ่มประเทศ

จากข้อมูลของเอแบคโพลล์พบว่าคนไทยร้อยละ 57.5 นิยมบริโภคอาหารแช่แข็ง (19) ซึ่งในปี พ.ศ.2555 ที่ผ่านมาประเทศไทยมีอัตราการเติบโตของตลาดอาหารแช่แข็งสูงถึง 3,100 ล้านบาท และคาดว่าภายในปี พ.ศ.2560 จะมีอัตราการเติบโตอย่างต่อเนื่องคิดเป็นร้อยละ 10 ต่อปี และประเภทอาหารแช่แข็งที่นิยมบริโภค 3 อันดับแรก ได้แก่ อาหารแช่แข็งปรุงสำเร็จที่เสริฟพร้อมกับ เช่น ข้าวกระเพรา อาหารแช่แข็งปรุงสำเร็จ เช่น นักเก็ต เฟรนช์ฟราย และอาหารแช่แข็งปรุงสำเร็จประเภทเส้น เช่น ก๋วยเตี๋ยว สปาเก็ตตี้

2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับอาหารฮาลาล

อาหารฮาลาล คือ อาหารที่ปราศจากการเจือปนสิ่งต้องห้าม (Haram) เช่น เหล้า หรือไขมันหมู เป็นต้น โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จะต้องผ่านการเชือดที่ถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลาม ดังนี้

1). ผู้เชือดต้องเป็นมุสลิมที่รู้และเข้าใจวิธีเชือดอย่างแท้จริง

2). ต้องไม่เป็นสัตว์ต้องห้าม เช่น สุกร สัตว์ที่ไม่บริโภคสัตว์อื่นเป็นอาหาร ได้แก่ เสือ สุนัข สัตว์ปีกที่ไม่บริโภคสัตว์อื่นเป็นอาหาร ได้แก่ เหยี่ยว อินทรีย์ หรือสัตว์เลื้อยคลาน ได้แก่ งู เป็นต้น

3). สัตว์จะต้องมีชีวิตอยู่ขณะเชือด

4). ก่อนเชือดต้องพูดว่า "บิสมิลลาฮ"

5). ต้องใช้มีดที่คมเชือดบริเวณลำคอโดยตัดเส้นเลือดใหญ่ หลอดลม หลอดอาหาร เพราะจะทำให้สัตว์ตายอย่างไม่ทรมาน

6). ต้องให้สัตว์ตายสนิทก่อนแล่เนื้อ

เนื่องจากโลกมีจำนวนประชากรที่เป็นมุสลิมถึง 1.8 ล้านในปี พ.ศ.2554 หรือนับเป็นร้อยละ 36 ของประชากรโลก อีกทั้งในปัจจุบันมนุษย์มีการดำเนินชีวิตที่เร่งรีบ และมีการแข่งขันสูง ทำให้ต้องทุ่มเทเวลาส่วนใหญ่ไปกับการทำงาน และการเดินทาง จนไม่มีเวลาในการเข้าครัวทำอาหาร ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะหันมาบริโภคอาหารฮาลาลสำเร็จรูป (ready-made Halal foods) เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ พิซซ่า ไส้กรอก แซนด์วิช ลูกชิ้น เป็นต้น จึงส่งผลให้หลายๆประเทศ ได้แก่ มาเลเซีย อินโดนีเซีย จีน อินเดีย ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ บราซิล ตุรกี และสิงคโปร์ เล็งเห็นถึงความสำคัญ และก่อเกิดการแย่งชิงเพื่อเป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลสำเร็จรูปรายใหญ่ ซึ่งเป็นโอกาสที่จะขยายตัวเข้าสู่ตลาดโลก ประกอบกับประเทศไทยก็เป็นอีกแหล่งผลิตอาหารฮาลาลที่สำคัญของโลกเช่นกัน เนื่องจากรัฐบาลได้เล็งเห็นถึงช่องทางการตลาด (Market channel) ที่สำคัญ และควรเจาะตลาดฮาลาลเพื่อที่จะเพิ่มส่วนแบ่งทางการตลาด (Market segmentation) ให้มากขึ้น จึงมีนโยบายเพื่อส่งเสริมอุตสาหกรรมอาหาร และผลิตภัณฑ์ฮาลาลเพื่อส่งออก ทั้งในแง่ของวัตถุดิบ หรือการส่งเสริมผู้ประกอบการ เพื่อการแสวงหาผลกำไร และการพัฒนาในเรื่องของการรับรองมาตรฐานฮาลาล เพื่อให้เป็นที่ไว้วางใจ น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ

3. กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองสิทธิ์ผู้บริโภค

กฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค

กฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค คือกฎหมายที่คุ้มครองเกี่ยวกับการดำรงชีวิตในสังคม โดยจะครอบคลุมไปถึงการบริโภคสินค้าและการใช้บริการต่างๆ ซึ่งผู้ประกอบการจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของสินค้าและบริการ ให้ได้ครบถ้วนตามมาตรฐานที่ควรจะเป็นดังที่ได้มีการโฆษณาแนะนำไว้ ด้วยเหตุนี้ ภาครัฐจึงเข้ามามีบทบาทหน้าที่ช่วยในเรื่องของการคุ้มครองดูแล และรักษาสิทธิ์ของผู้บริโภค ไม่ให้ถูกเอาเปรียบจากผู้ประกอบการ อีกทั้งในกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนอันเนื่องมาจากการใช้สินค้าและบริการ ภาครัฐมีหน้าที่เพื่อเข้ามาแก้ไข เยียวยา และชดเชย

ค่าเสียหายให้กับประชาชน โดยหน่วยงานที่จะเข้ามามีบทบาทหน้าที่ในการคุ้มครองผู้บริโภค จะถูกแบ่งตามประเภทของการบริโภคสินค้า และบริการ ดังนี้

- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (กระทรวงสาธารณาสุข) : ดูแลกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนเกี่ยวกับอาหาร ยา หรือเครื่องสำอาง

- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (กระทรวงอุตสาหกรรม) : ดูแลกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนเกี่ยวกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

- กรมที่ดิน (กระทรวงมหาดไทย) : ดูแลกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนเกี่ยวกับเจ้าของธุรกิจจัดสรรที่ดิน อาคารชุด

- กรมการค้าภายใน (กระทรวงพานิชย์) : จะดูแลกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนเกี่ยวกับคุณภาพ หรือราคาสินค้าอุปโภคบริโภค

- กรมการประกันภัย (กระทรวงพานิชย์) : ดูแลกรณีที่ประชาชนได้รับความเดือดร้อนเกี่ยวกับการประกันภัย หรือประกันชีวิต

พระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ. 2522 เป็นกฎหมายที่สอดคล้องกับหน่วยงานที่คุ้มครองผู้บริโภคในข้างต้น ซึ่งหากประชาชนที่ได้รับความเดือดร้อนอันเนื่องมาจากการใช้สินค้าและบริการ ไม่ได้รับการช่วยเหลือจากหน่วยงานดังกล่าว สามารถร้องเรียนต่อสำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค สังกัดสำนักนายกรัฐมนตรีได้

พระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ.2522

มีสาระสำคัญดังนี้

1. กำหนดสิทธิขั้นพื้นฐานของผู้บริโภค

1). ผู้บริโภคมีสิทธิที่จะได้รับข่าวสาร คำพรรณนาคุณภาพที่ถูกต้อง และเพียงพอเกี่ยวกับสินค้า หรือบริการ

2). ผู้บริโภคมีอิสระในการเลือกหาสินค้า หรือบริการ

3). ผู้บริโภคจะต้องได้รับความปลอดภัยจากการใช้สินค้า หรือบริการ

4). ผู้บริโภคมีสิทธิที่จะได้รับการพิจารณาและชดเชยความเสียหาย

2. การก่อตั้งสำนักงานคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค

สังกัดสำนักนายกรัฐมนตรี อำนาจหน้าที่ของคณะกรรมการคุ้มครองผู้บริโภค

1). พิจารณาเรื่องราวร้องทุกข์จากผู้บริโภคที่ได้รับความเดือดร้อน หรือเสียหาย เนื่องมาจากการกระทำของผู้ประกอบธุรกิจ

2). ดำเนินการเกี่ยวกับสินค้าที่อาจเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค และข่าวสารเกี่ยวกับการบริโภคที่ผู้บริโภคควรทราบ

3. การกำหนดมาตรการในการคุ้มครองผู้บริโภค

1). การคุ้มครองผู้บริโภคด้านการโฆษณา

2). การคุ้มครองผู้บริโภคในด้านฉลาก

3). การคุ้มครองผู้บริโภคในด้านสัญญา

พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522

มีสาระสำคัญดังนี้

1. กำหนดให้มีการประกาศที่ชัดเจนว่าอาหารใดเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ
2. กำหนดให้มีคณะกรรมการอาหารและยา ทำหน้าที่ให้คำปรึกษา เพื่อควบคุมคุณภาพของอาหาร
3. กำหนดให้มีการขออนุญาตเพื่อผลิต จำหน่าย หรือนำเข้าเพื่อจำหน่ายอาหาร
4. กำหนดลักษณะของอาหารลักษณะต่างๆ ที่ผิดกฎหมาย หรือห้ามผลิต ห้ามจำหน่าย หรือห้ามนำเข้าเพื่อจำหน่าย ได้แก่

1). อาหารที่ไม่บริสุทธิ์ หรือมีการปนเปื้อน

2). อาหารที่มีการปลอมปน

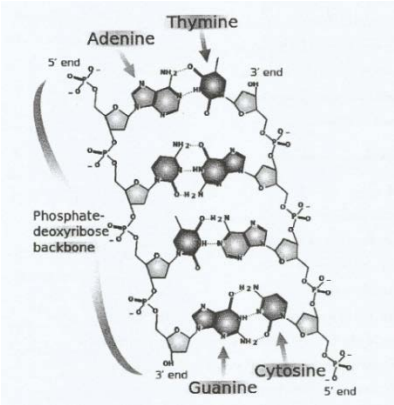
3). อาหารที่ไม่ได้มาตรฐาน

4. เทคนิคการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์

4.1 ความรู้เบื้องต้นทางนิติพันธุศาสตร์ดีเอ็นเอ เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA)

ดีเอ็นเอ คือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) ซึ่งเป็นแหล่งรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยชนิดและการจัดเรียงตัวของลำดับเบสที่ต่างกัน รวมถึงความยาวของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ที่ไม่เท่ากัน จะทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิต นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) มีองค์ประกอบพื้นฐาน 3 ส่วน ได้แก่ น้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) คือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม หมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) มี 2 ประเภท คือ พิวรีน (Purine) ซึ่งประกอบด้วยอะดีนีน (Adenine; A) และกัวนีน (Guanine; G) และไพริมิดีน (Pyrimidine) ซึ่งประกอบด้วย ไทมีน (Thymine; T) และไซโทซีน (Cytosine; C) ดีเอ็นเอจะอยู่ในรูปแบบเกลียวคู่ (Double helix) เป็นสายยาวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (Phosphodiester bonds) ขนานกันไปในทิศทางที่ตรงข้าม (Antiparallel) คือสายหนึ่งจะเริ่มต้นจากคาร์บอน 5' ไป 3' ส่วนอีกสายจะเริ่มต้นจากคาร์บอน 3' ไป 5' ใน 1 รอบของเกลียวคู่ ดีเอ็นเอจะมีจำนวนเบส 10 คู่ ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจะเข้าคู่กันเป็นเบสคู่สม (Compremental base) คือ T จับกับ A และ G จับกับ C ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) 2 พันธะและ 3 พันธะตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

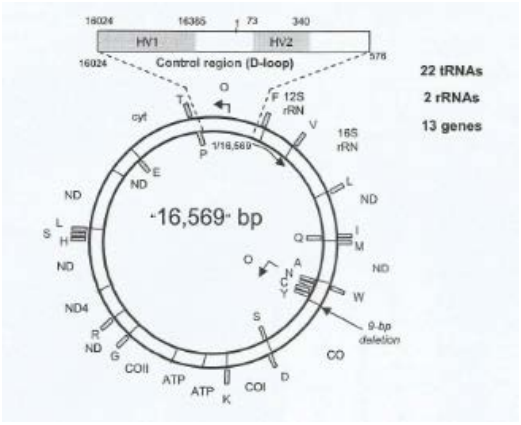


รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างดีเอ็นเอ (รูปนี้ได้รับอนุญาตจากผู้ถือครองลิขสิทธิ์ คือ Incnis Mrsi, 2013 ผ่านสัญญาอนุญาตครีเอทีฟคอมส์มอนส์ให้สามารถทำสำเนาและเผยแพร่ได้: http://en.wikipedia.org/wiki/ File: DNA_chemical_structure.svg)

ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA; mtDNA)

ไมโทคอนเดรีย เป็นออแกแนลล์ (Organelle) ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นแท่งวงรี ประกอบไปด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น โดยชั้นนอกทำหน้าที่ควบคุมปริมาณ และชนิดของสารเข้าออก ส่วนชั้นในทำหน้าที่เกี่ยวกับการหายใจระดับเซลล์ และการเผาผลาญอาหารเพื่อสร้างพลังงานในรูปของ ATP ให้กับเซลล์ ดีเอ็นเอภายในไมโทคอนเดรีย เรียกว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA; mtDNA) (21) ซึ่งสืบทอดมาจากแม่โดยตรง

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) มีลักษณะเป็นสายคู่ (Double-stranded DNA) มีรูปแบบเป็นวงกลม (Circular) โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Coding region เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้ในการสร้างโปรตีน และ Control region หรือ D-loop เป็นส่วนที่มีลำดับแตกต่างกันมากเพียงพอที่จะบอกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ จีโนมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจะมีประมาณ 16,569 เบส ซึ่งประกอบด้วย 37 ยีน โดยมี 22 ยีนเป็น tRNA (Transfer RNA) มี 2 ยีนเป็น rRNA (Ribosomal RNA) และมี 13 ยีนเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงจีโนมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ ขนาด 16,569 bp ในส่วน Control region แบ่งออกเป็น Hypervariable region 1 และ 2 ซึ่งมักใช้ในการตรวจทางนิติเวชศาสตร์ การอ่านลำดับเบสบนสายไมโทคอนเดรียจะอ่านตามลำดับเบสอ้างอิงของ Anderson หรือ revised Cambridge reference sequence (r-CRS)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) จะส่งผ่านจากแม่สู่ลูกเท่านั้น โดยในกระบวนการปฏิสนธิ (Fertilization) ในขณะที่สเปิร์ม (Sperm) เจาะเข้าไปเพื่อผสมกับไข่ และสลัดส่วนหางออก ซึ่งบริเวณหางนั้นเป็นส่วนที่มีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) จากพ่ออยู่ ทำให้มีการรับเอาเฉพาะส่วนของ Acrosome ซึ่งมีไมโทคอนเดรียจากแม่ ดังนั้นในโครโมโซม (Chromosome) ของลูก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอจากนิวเคลียสจะได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ครึ่งหนึ่ง และพ่อครึ่งหนึ่ง ส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย จะได้รับมาจากแม่เท่านั้น ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) จะไม่มีการ Recombination ทำให้ลำดับเบส (Sequence) มีความอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอของนิวเคลียสจะมีกระบวนการ Reprication repair โดยใช้เอ็นไซม์ที่มีชื่อว่า Proof-reading enzyme ซึ่งมีหน้าที่ในการตรวจสอบความถูกต้อง ซ่อมแซมดีเอ็นเอที่มีการต่อผิด หรือมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป แต่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียจะไม่มีกระบวนการนี้ ทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์ (Mutation) สูง

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) นิยมใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร เนื่องจากเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนหรือกระบวนการแปรรูปอาหาร ดีเอ็นเอในเซลล์ส่วนใหญ่อาจเกิดการเสียหาย หรือเสื่อมสภาพ แต่ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) จะยังคงสมบูรณ์อยู่ เพราะมีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (High copy number) โดยไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) มีจำนวนมากกว่า 1,000 ชุด (Copies) ต่อเซลล์ (22) ซึ่งมากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) ที่มีจำนวนเพียงแค่ 2 ชุด (Copies) ต่อเซลล์ อีกทั้งไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ยังมีความแตกต่างสูงระหว่างชนิดที่ต่างกัน (High interspecies vairations) แต่มีความแตกต่างต่ำระหว่างสัตว์ในชนิดเดียวกัน (Low intraspecies variation)

นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ยังมีความคงทนต่อการเสื่อมสภาพที่เกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (High stability) เนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานที่เป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ทำให้สามารถปกป้องตัวเองจากปัจจัยแวดล้อมภายนอกที่อาจส่งผลกระทบต่อดีเอ็นเอได้ เช่น ความร้อน ความชื้น หรือเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตเล็กๆ (รา แบคทีเรีย จุลินทรีย์ เป็นต้น) จากคุณสมบัติ ดังกล่าวทำให้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหาร ซึ่งในปัจจุบันมีการประดิษฐ์คิดค้นเทคนิค และเครื่องมือต่างๆ เกิดขึ้นอย่างมากมาย ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการผลักดันให้เกิดความเจริญก้าวหน้าในด้านในทางอณูชีววิทยา ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในด้านชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตต่างๆ อย่างกว้างขวาง

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) คือวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA amplification) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการได้ในเวลาอันสั้นภายในหลอดทดลอง เทคนิคพีซีอาร์ได้พัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2528 โดยศาสตราจารย์ Kary Mullis ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์จัดเป็นเทคนิคที่สำคัญ และมีบทบาทต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงานแขนงต่างๆ อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ จะให้ผลที่รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบ และใช้ปริมาณสารตัวอย่างตั้งต้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งองค์ประกอบของวิธีพีซีอาร์มีดังนี้ (23)

- ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) คือ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งได้มาจากการสกัดเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ หรือได้มาจากวิธีการอื่นๆในอณูชีววิทยา

- เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DND polymerase) คือ เอนไซม์ที่ได้มาจากแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้สูง ได้แก่ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณบ่อน้ำพุร้อน (อุณหภูมิสูงประมาณ 70-80 องศาเซลเซียส) หรือ *Pyrococcus species* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอยแยกใต้ทะเลลึก (อุณหภูมิสูงประมาณ 104 องศาเซลเซียส) เนื่องจากในเทคนิคพีซีอาร์จะต้องแยกดีเอ็นดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน ดังนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรสที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจึงจำเป็นต้องทนต่ออุณหภูมิสูงๆได้

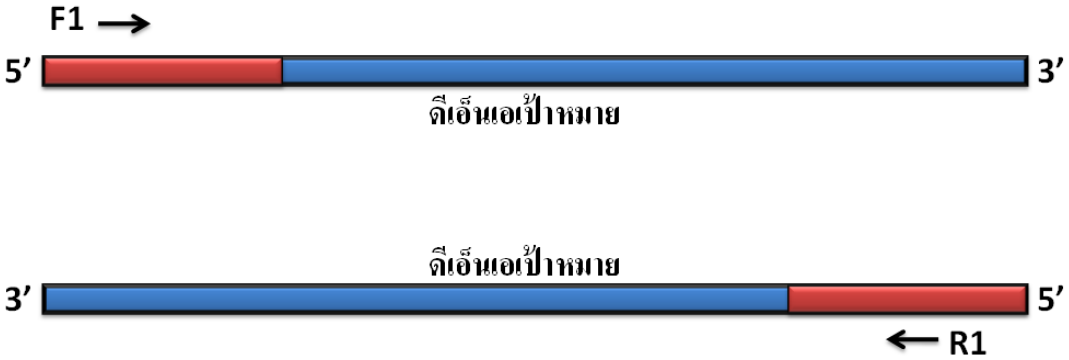
- ไพรเมอร์ (Primer) คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความยาวประมาณ 18-25 เบส ซึ่งจะออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (Complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์

- ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxy nucleotide triphosphate;dNTPs) คือเบสที่จะนำมาต่อสายไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจะประกอบไปด้วย dATP (Deoxy adenosine triphosphate) dTTP (Deoxy thymidine triphosphate) dCTP (Deoxy cytidine triphosphate) และ dGTP (Deoxy guanosine triphosphate)

- สารละลายบัฟเฟอร์ (PCR buffer) เป็นสารละลายที่ช่วยในการควบคุมสภาวะต่างๆ ทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไปได้อย่างเหมาะสม ประกอบไปด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นอย่างมาก เนื่องจากแมกนีเซียมทำหน้าที่เป็น Cofactor ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอ-โพลีเมอร์เรสช่วยให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สารละลายบัฟเฟอร์ยังประกอบไปด้วยเกลือ เช่น ทริสคลอไรด์ (Tris HCl) และโพรแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ซึ่งจะมีหน้าที่ปรับค่า pH ให้มีสภาพเหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นต้น

ปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (Conventional PCR)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบดั้งเดิม คือ เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ในการทำปฏิกิริยาหนึ่งครั้ง ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA amplification) ดังแสดงในรูปที่ 4



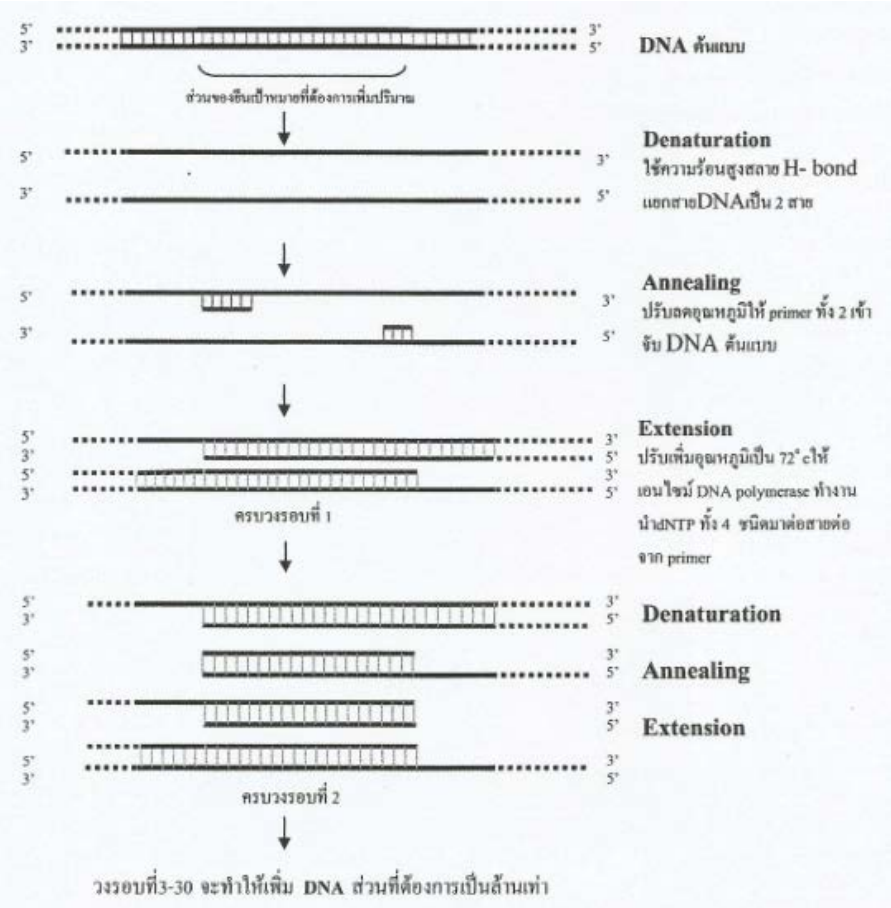
รูปที่ 4 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อการทำพีซีอาร์แบบดั้งเดิม

ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะดำเนินไปซ้ำๆ ประมาณ 25-35 รอบ ปริมาณจะเพิ่มขึ้นเป็น 2^n (n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยา) ซึ่งในแต่ละรอบจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 5 (24)

1. Denaturation เป็นขั้นตอนแรก โดยจะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 92-98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

2. Annealing ลดอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสำหรับการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของไพรเมอร์

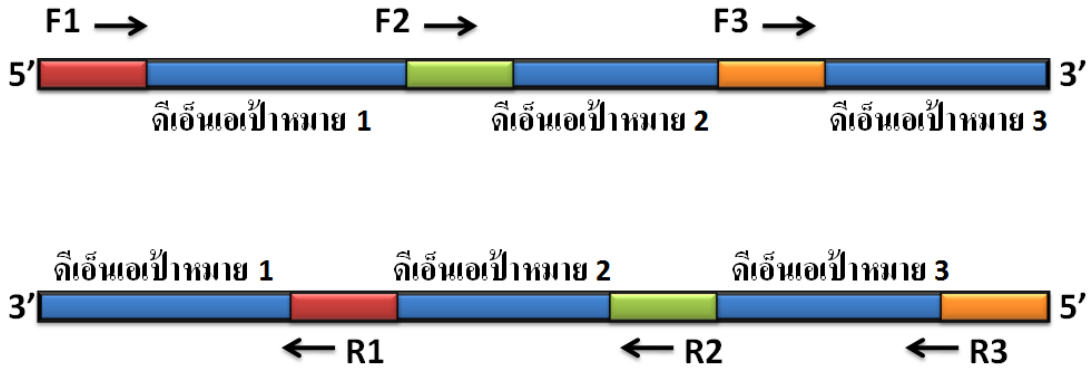
3. Extension เพิ่มอุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส โดยการนำเบสทั้ง 4 ในดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) เข้าจับกับเบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบจากทิศ 5' ไป 3'



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (24)

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ คือ เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในการทำปฏิกิริยาหนึ่งครั้ง ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) ได้หลายตำแหน่งในครั้งเดียว ดังแสดงในรูปที่ 6 ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้แต่ละคู่จะต้องไม่มีเบสที่เป็นคู่สม (Complementary) ระหว่างไพรเมอร์ด้วยกัน เพื่อป้องกันการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ (Primer dimer) อีกทั้งไพรเมอร์แต่ละคู่ควรจะมี Melting temperrature (Tm) ที่ใกล้เคียงกัน และจะต้องให้ชิ้นดีเอ็นเอ (PCR product) ที่มีขนาดแตกต่างกัน การทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ให้ประสบผลสำเร็จจะขึ้นอยู่กับการปรับสภาวะให้เหมาะสม (Optimization) ได้แก่ การเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของความเข้มข้นระหว่างไพรเมอร์แต่ละตัว การเพิ่มหรือลด Annealing temperature (Ta) ในขั้นตอน Annealing เพื่อให้ได้สภาวะ (PCR condition) ที่เหมาะสมที่จะทำให้ไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ครบถ้วนตามคาดหวัง (22)



รูปที่ 6 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อการทำมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์อาร์

ไดเร็คพีซีอาร์ (direct PCR)

ไดเร็คพีซีอาร์ คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกันกับเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) เพียงแต่วิธีดังกล่าวไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ โดยสามารถนำตัวอย่างทางชีวภาพมาใช้แทนดีเอ็นเอต้นแบบได้ ในปัจจุบันเทคนิคไดเร็คพีซีอาร์เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในทางอณูชีววิทยา รวมถึงในสาขานิติวิทยาศาสตร์ดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว ประหยัดเวลา และประหยัดค่าใช้จ่ายในด้านสารเคมี เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอเป็นวิธีมีประสิทธิภาพ

ต่ำ คือเมื่อทำการสกัดเสร็จสิ้นจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงร้อยละ 16-30 ของดีเอ็นเอทั้งหมด (15-17) อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ที่ยาวนาน

4.2 เครื่องหมายพันธุกรรมในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์

ไมโทคอนเดรียลยีน (mitochondrial gene) ที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ คือ ยีนไซโทโครมบี (Cytochrome *b*; Cyt *b*) และยีนไซโทโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI) (25) เนื่องจากยีนทั้งสองนี้มีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์เบสสูงในสัตว์ต่างชนิดกัน และมีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์เบสเกิดขึ้นน้อยมากในสัตว์ชนิดเดียวกัน ซึ่งถือเป็นคุณลักษณะที่เอื้อต่อการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ และนอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ไมโทคอนเดียลยีนอื่นๆ ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ ได้แก่ 12 เอส ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (12S ribosomal RNA; 12S rRNA) (25) เป็นต้น

ยีนไซโทโครมบี (Cytochrome *b*; Cyt *b*) และ ไซโทโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบการหายใจของไมโตคอนเดรีย โดยไซโตโครมมีด้วยกันหลายชนิด จะแบ่งประเภทของไซโตโครมโดยการใช้ตัวอักษรแทนชื่อชนิดของไซโตโครม เช่น ไซโตโครม เอ ไซโตโครม บี หรือไซโตโครม ซี เป็นต้น ยีนไซโตโครม บี และ ไซโทโครมออกซิเดสจะประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1140 คู่เบส และ 800 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีดีเอ็นเอบางช่วงที่มีลักษณะที่มีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิด จึงได้มีการพัฒนาโดยนำเอาดีเอ็นเอส่วนนี้มาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของสัตว์ (Species Identification)

4.3 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์

หลักในการออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เป็นขั้นตอนสำคัญ โดยการออกแบบไพรเมอร์เริ่มจากการดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ชนิดที่สนใจศึกษา และสัตว์ชนิดที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมาจากฐานข้อมูล Genbank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ได้แก่ โปรแกรมจีเนียส (Geneious) โปรแกรมเมก้า (MEGA) หรือโปรแกรมไพรเมอร์ 3 (Primer 3) เป็นต้น จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมต่างๆ ได้แก่ Oligonucleotide

Properties Calculator (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) ซึ่งจะสามารถตรวจสอบความยาวของไพรเมอร์ (Length) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ปริมาณเบสของ G และ C (CG content) อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Self-complementarity) ได้แก่ การฟอร์มแฮฟิน (Potential hairpin formation) การจับคู่เบสผิดทางปลาย 3' (3' Complementarity) ได้ และโปรแกรม Thermo scientific (http://www.thermoscientificbio.com/ webtools/tmc/) ซึ่งจะสามารถตรวจวัดและปรับอุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) ของไพรเมอร์ ให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมตามที่ต้องการ

ทั้งนี้การเลือกไพร์เมอร์ ซึ่งไพรเมอร์ที่ดีควรมีความยาวประมาณ 18-25 เบส มี CG-content อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และควรมีค่า Annealing temperature (Ta) ใกล้เคียงกันทั้ง Forward primer และ Reverse primer โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 52-70 องศาเซลเซียส กรณีที่ต้องการออกแบบไพรเมอร์หลายๆ คู่เพื่อใช้ในเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์ ต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอต้นแบบของสัตว์เป้าหมาย (template DNA) มีขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR product size) ที่ต่างกัน และควรหลีกเลี่ยงการใช้ไพรเมอร์ที่ลำดับเบสเป็นคู่สม (Complementary) กันเอง เพราะจะเสี่ยงต่อการเกิดไพรเมอร์ไดเมอร์ (Primer dimer) (22)

ยูนิเวอร์ซอลไพรเมอร์ (Universal primer) จะออกแบบบน Sequence alignment ตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (Conserve region) ของสัตว์หลายชนิด เพื่อให้สามารถจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบของสัตว์ได้หลายชนิด จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจเช็คประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ (Length) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weigth) ปริมาณเบสของ G และ C (CG content) อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) รวมทั้งตราวจเช็คโอกาสที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Self-complementarity) ได้แก่ การฟอร์มแฮพิน (Potential hairpin formation) การจับคู่เบสผิดทางปลาย 3' (3' Complementarity) เป็นต้น

ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (Specific primer) จะออกแบบบน Sequence alignment ตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายให้แตกต่างไปจากสัตว์ชนิดอื่นๆ (species-specific Single Nucleotide Polymorphism; SNP) เพื่อให้สามารถจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายเท่านั้น จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจเช็คประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ (Length) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weigth) ปริมาณเบสของ G และ C (CG content) อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) รวมทั้งตราวจเช็คโอกาสที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Self-complementarity)

ได้แก่ การฟอร์มแฮพิน (Potential hairpin formation) การจับคู่เบสผิดทางปลาย 3' (3' Complementarity) เป็นต้น

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Meyer R. และคณะ ในปี พ.ศ.2537 ได้ใช้วิธีพีซีอาร์ (PCR) ในการระบุดีเอ็นเอของหมู เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology) พบว่าเทคนิคพีซีอาร์สามารถใช้กับตัวอย่างเนื้อที่สัตว์ที่มีการผสมกันระหว่างเนื้อหมูและเนื้อวัวได้ และสามารถใช้ได้ทั้งเนื้อดิบและเนื้อที่ผ่านกระบวนการปรุงสุกโดยใช้ความร้อน โดยสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาจะไม่สามารถใช้กับเนื้อมีการปรุงสุกหรือเนื้อที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนได้ เนื่องจากโปรตีนเสียสภาพ หรือถูกทำลายไป ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 20 เปอร์เซ็นต์ (26)

ต่อมางานวิจัยของ Matsunaga T. และคณะ ในปี พ.ศ.2542 ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหาร 6 ชนิด ได้แก่ วัว หมู ไก่ แกะ แพะ และม้า ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อตรวจสอบชนิดเนื้อสัตว์ 6 ชนิดดังกล่าว โดยออกแบบมาจากยีนในส่วนของยีนไซโตโครม บี ผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแพะ ไก่ วัว แกะ หมู และม้า มีขนาดเท่ากับ 157, 227, 274, 331, 398 และ 439 คู่เบส ตามลำดับ โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.25 นาโนกรัม และสามารถใช้ได้กับเนื้อที่ผ่านการให้ความร้อนสูงถึง 120 องศาเซลเซียส (27)

ต่อมางานวิจัยของ Lopea-Calleja IM และคณะ ในปี พ.ศ.2550 ได้ศึกษาการปนเปื้อนของนมวัวในผลิตภัณฑ์ชีส (ชีสนมแพะ และชีสนมแกะ) โดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) โดยใช้ยีน 12srRNA ร่วมกับวิธี Indirect ELISA ซึ่งผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) สามารถแยกการปนเปื้อนนมวัวในผลิตภัณฑ์นมแพะ และนมแกะได้ และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้แม้จะมีการปนเปื้อนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ หรือมีการเจือจางเพียง 1:10,000 และผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลสอดคล้องกับวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) (28)

ต่อมางานวิจัยของ Yin RH และคณะ ในปี พ.ศ.2552 ได้ศึกษาการระบุชนิดของจามรี (Yak) และวัว โดยใช้วิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณยีน 12s rRNA บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitocvndria DNA) โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR Product)

ของจามรี (Yak) และวัวเท่ากับ 290 และ 159 คู่เบสตามลำดับ ผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจสอบการปลอมปนของเนื้อวัวในผลิตภัณฑ์เนื้อจามรีได้แม้จะมีปริมาณน้อยเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้ได้กับเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกโดยใช้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส (29)

ต่อมา จากงานวิจัยของ Murugaiah C และคณะ ในปี พ.ศ.2552 ได้ศึกษาการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารฮาลาล โดยวิธี PCR RFLP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนไซโทโครมบี (Cytochome *b*; Cyt *b*) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Alu 1 และตรวจสอบผลโดยใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ซึ่งผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอเนื้อหมูจากผลิตภัณฑ์เนื้อวัว ควาย นก ไก่ แพะ และกระต่ายได้ ซึ่งสามารถดูได้จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบน agarose gel ซึ่งหมูจะให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR Product) เท่ากับ 224 และ 115 คู่เบส และสามารถตรวจสอบได้แม้จะมีปริมาณการปนเปื้อนเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (30)

ต่อมาจากงานวิจัยของ S.Ghovvati และคณะ ในปี พ.ศ.2552 ได้ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เพื่อทำการตรวจสอบการปลอมปนของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปในกลุ่มสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วัว แพะ และแกะ) สัตว์ปีก (ไก่) และหมู โดยงานวิจัยเลือกใช้ไพรเมอร์จากยีน 12s RNA และ 16s RNA ในการตรวจสอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ เคี้ยวเอื้อง (วัว แพะ และแกะ) สัตว์ปีก (ไก่) และหมู มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 104-106 183 และ 290 คู่เบส ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทดสอบตัวอย่างอาหารในแต่ละกลุ่มจำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ เนื้อบด ไส้กรอก และชิ้นเนื้อแช่แข็ง เป็นจำนวนกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในตัวอย่างทั้งหมด แต่พบการปนเปื้อนของสัตว์ปีกในตัวอย่างไส้กรอกและชิ้นเนื้อแช่แข็ง เป็นจำนวน 40 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (31)

ต่อมาจากงานวิจัยของ Daiming Zha และคณะ ในปี พ.ศ.2553 ได้ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่ปลอมปนในผลิตภัณฑ์จากเนื้อกวาง ได้แก่ วัว แกะ หมู และสัตว์ปีก โดยเลือกใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยที่ตีพิมพ์มาก่อนหน้า และออกแบบเองจากบริเวณ tRNA-Val และ 16s rRNA ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ให้ขนาดดีเอ็นเอของวัว สัตว์ปีก แกะ และหมู เท่ากับ 124 183 225 และ 290 คู่เบส ตามลำดับ โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเนื้อหมูและแกะเท่ากับ 1 นาโนกรัม เนื้อสัตว์ปีกเท่ากับ 5 นาโนกรัม และเนื้อวัวเท่ากับ 0.5 นาโนกรัม ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปัญหาการปลอมปนเนื้อสัตว์อื่นในผลิตภัณฑ์จากเนื้อกวางมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในส่วนของหัวใจ เลือด อวัยวะเพศ และเขาของกวาง (6)

ต่อมางานวิจัยของ Dai-Ming Zha และคณะ ในปี พ.ศ.2554 ใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) เพื่อระบุชนิดของกวางในผลิตภัณฑ์เนื้อกวางทั้งหมด 4 ชนิด คือ กวางซิก้า (Sika deer) กวางวาปิติ (Wapiti deer) กวางแดง (Red deer) และกวางเรนเดียร์ (Rein deer) โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ 16s rRNA ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้ให้ขนาดดีเอ็นเอของกวางซิก้า (Sika deer) เท่ากับ 307 คู่เบส กวางวาปิติ (Wapiti deer) เท่ากับ 307 และ 246 คู่เบส กวางแดงทาริม (Tarim red deer) เท่ากับ 272 คู่เบส กวางแดง (Red deer) เท่ากับ 230 คู่เบส และกวางเรนเดียร์ (Rein deer) เท่ากับ 141 bp โดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัดของกวางซิก้า (Sika deer) และกวางวาปิติ (Wapiti deer) เท่ากับ 0.05 นาโนกรัม กวางแดงทาริม (Tarim red deer) เท่ากับ 0.10 นาโนกรัม กวางแดง (Red deer) เท่ากับ 0.50 นาโนกรัม และกวางเรนเดียร์ (Rein deer) เท่ากับ 0.02 นาโนกรัม (5)

ต่อมางานวิจัยของ Ali ME. และคณะ ในปี พ.ศ.2555 ได้เทคนิค TaqMan probe real-time PCR ควบคู่กับการทำ PCR RFLP เพื่อระบุการปนเปื้อนของเนื้อหมูในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น (Meatballs) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (Porcine-specific primer) ที่ออกแบบจากยีนไซโทโครมบี (Cytochome *b*; Cyt *b*) ผลการศึกษาให้ขนาดดีเอ็นเอของหมูเท่ากับ 109 คู่เบส และเมื่อใช้เอนไซม์ Alu ตัด จะให้ขนาดดีเอ็นเอ 27 33 และ 49 คู่เบส ซึ่งจะสามารถตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนได้แม้จะมีดีเอ็นเอหมูเพียง 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในลูกชิ้นเนื้อ (32)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจากงานวิจัยที่ผ่านมามีข้อเด่นคือ เทคนิค Multiplex PCR และไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีนไซโตโครม บี มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมาย ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ต่าง ๆ จากอาหาร หรือผลิตภัณฑ์อาหาร ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ โดยจากงานวิจัยของ Erica L.R. Butts และคณะในปี พ.ศ.2553 พบว่าการขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำ กล่าวคือเมื่อทำการสกัดเสร็จสิ้นจะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพียง 16-30 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง (15-17) ซึ่งนอกจากวิธีไดเร็คพีซีอาร์จะเป็นวิธีที่ประหยัดเวลาแล้ว ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง เนื่องจากไม่มีการสูญเสียดีเอ็นเอไปในขั้นตอนการสกัด จึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการประสบความสำเร็จในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป หรือการปรุงสุกโดยใช้ความร้อนสูง ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย หรือเสื่อมสภาพไป อีกทั้งวิธีดังกล่าวยังให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ มีความจำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย สามารถระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในอาหารได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว ทำให้ได้ผลรวดเร็วมากยิ่งขึ้น ซึ่งการร่นระยะเวลาใน

การวิเคราะห์นี้นับเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สูงสุดในการบังคับใช้กฎหมายเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพอาหาร ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน หรือการปลอมปนในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือการติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริง ซึ่งถือเป็นการกระทำผิดต่อกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค และขัดต่อบทบัญญัติทางศาสนา

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ (Sample collection)

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 6 ชนิด ได้แก่ หมู (*Sus scrofa*) แกะ (*Ovis aries*) ไก่ (*Gallus gallus*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) และวัว (*Bos taurus*) ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จะต้องได้รับการยืนยันชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Voucher specimen) ก่อนนำมาใช้ในการศึกษา จากนั้นตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อเหล่านี้ให้มีขนาดเล็กประมาณ 2×2 เซนติเมตร โดยใช้มีดผ่าตัดที่สะอาด ปลอดเชื้อ ซึ่งทำความสะอาดด้วยเอทานอล (70% ethanol) แล้วเก็บเนื้อตัวอย่างใส่ถุงซิบล็อคที่ปลอดเชื้อ 1 ถุง ต่อตัวอย่าง 1 ชนิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ จากนั้นเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ (Sample collection)

ชนิดของเนื้อสัตว์	ประเภทของตัวอย่าง	จำนวน	แหล่งที่มา
หมู (*Sus scrofa*)	เนื้อ	1	ตลาดคลองเรียน จ.สงขลา
แกะ (*Ovis aries*)	เลือด	1	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
ไก่ (*Gallus gallus*)	เนื้อ	1	ตลาดคลองเรียน จ.สงขลา
นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*)	เนื้อ	1	พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยา 50 พรรษา สยามบรมราชกุมารี จ.สงขลา
ม้า (*Equus ferus caballus*)	เส้นขน	1	ฮอร์ตสปอร์ท จ.สงขลา
วัว (*Bos taurus*)	เนื้อ	1	ตลาดคลองเรียน จ.สงขลา

2. การออกแบบ และการเลือกไพรเมอร์ (Oligonucleotide primer design)

ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์ทั้ง 6 ชนิด (Species-specific primer) ซึ่งได้จากการออกแบบเองในการศึกษาครั้งนี้ และรวบรวมมาจากงานวิจัยต่างๆ ที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่น่าเชื่อถือ โดยการเลือกไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงมาใช้ในการศึกษานี้ มีหลักเกณฑ์ในการเลือก 3 ประการ คือ 1) ไพรเมอร์ที่เลือกใช้จะต้องให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product size) ที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะสามารถระบุชนิดของชิ้นเนื้อตัวอย่างได้โดยการดูจากขนาดที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสเจล 2) ไพรเมอร์นั้นๆ ต้องผ่านการทดสอบประสิทธิภาพมาแล้วทั้งสิ้น เช่น การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (Specificity test) และการทดสอบความไวของไพรเมอร์ (Sensitivity test) เป็นต้น 3) ไพรเมอร์นั้นๆ จะต้องมีอุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่ในเวลาเดียวกัน โดยในการศึกษานี้จะเลือกใช้อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) ในช่วง 64-67 $^{\circ}$C ทั้งนี้ได้เลือกไพรเมอร์ที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่น่าเชื่อถือมาทั้งสิ้น 4 คู่ สำหรับหมู แกะ ไก่ และนกกระจอกเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ที่เลือกมาจากวารสารนานาชาติที่น่าเชื่อถือ

ชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm)($^{\circ}$C)	ชื่อยีน (mtgene)	ขนาดดีเอ็นเอ	อ้างอิง
หมู (Pork)	Sus-F1	**5'- GAA AAA TCA TCG TTG TAC TTC AAC TAC A -3'**	64.24	ไซโตโครมบี (Cytochrom *b*; cyt *b*)	100 bp	López-Andreo และคณะ (2005)
	Sus-R1	**5'- GGT CAA TGA ATG CGT TGT TGA T -3'**	66.07			
แกะ (Mutton)	Ovi-F2	**5'- GAA AAA CCA TCG TTG TCA TTC AAC T -3'**	66.10	ทรานสเฟอร์อาร์อีนเอ กลูตาเมท - ไซโตโครมบี (transfer RNA glutamate ; t-Glu - Cytochrom *b*; cyt *b*)	119 bp	López-Andreo และคณะ (2005)
	Ovi-R2	**5'- AAA TAT TTG ATG GAG CTG GGA GA -3'**	64.84			
ไก่ (Chicken)	Gal-F3	**5'- AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA-3'**	66.66	ไซโตโครมบี (Cytochrom *b*; cyt *b*)	133 bp	C.-L. Zhang และคณะ (2007)
	Gal-R3	**5'- GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A-3'**	65.03			
นกกระจอกเทศ (Ostrich)	Str-F2	**5'- CCC TTT AAA GAC ATC TGG TAT TGT GAG -3'**	65.66	12 เอส ไรโบโซมอล อาร์อีนเอ (12S ribosomal RNA; 12s rRNA)	155 bp	Rojas และคณะ(2011)
	Str-R2	**5'- TAA ATT GTA GGC TCT CTG GGG TTC -3'**	65.45			

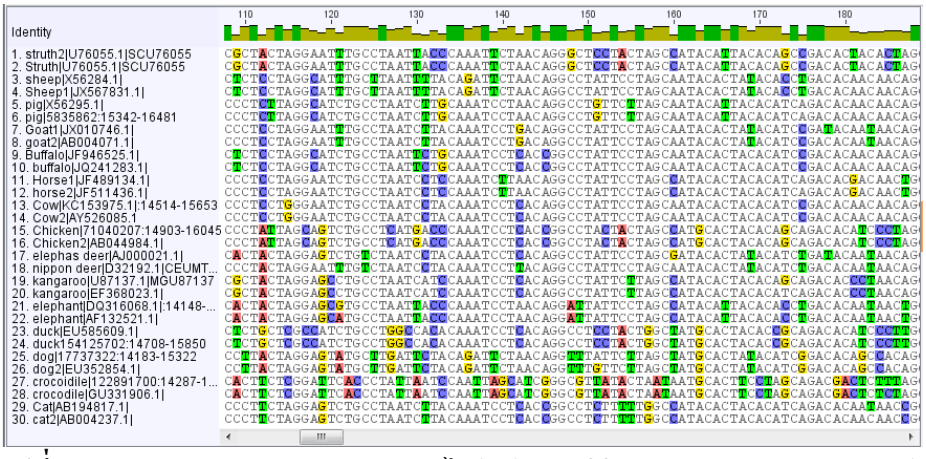
ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเนื้อสัตว์เป้าหมายอีก 2 ชนิด คือ ม้า และวัว โดยจะเลือกใช้ยีนไซโตโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I, COI) ซึ่งเป็นยีนจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูง จึงเหมาะสำหรับใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ อีกทั้งยีนไซโตโครมออกซิเดส 1 เป็นยีนที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ทำให้มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งจะง่ายแก่การรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเริ่มจากการรวบรวมข้อมูลของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมาย รวมไปถึงนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ชนิดใกล้เคียงกัน และสัตว์ชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการประกอบอาหาร จำนวนทั้งสิ้น 12 ชนิด ได้แก่ เป็ด ควาย หมาป่า แพะ กวาง จระเข้ ช้าง แมว ไก่ นกกระจอกเทศ หมู และแกะ อย่างน้อยชนิดละ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งดาวน์โหลดมาจากฐานข้อมูล Genbank มีเลขหมายทะเบียน (Accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษานี้ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงเลขหมายทะเบียน (Accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I, COI) จาก Genbank

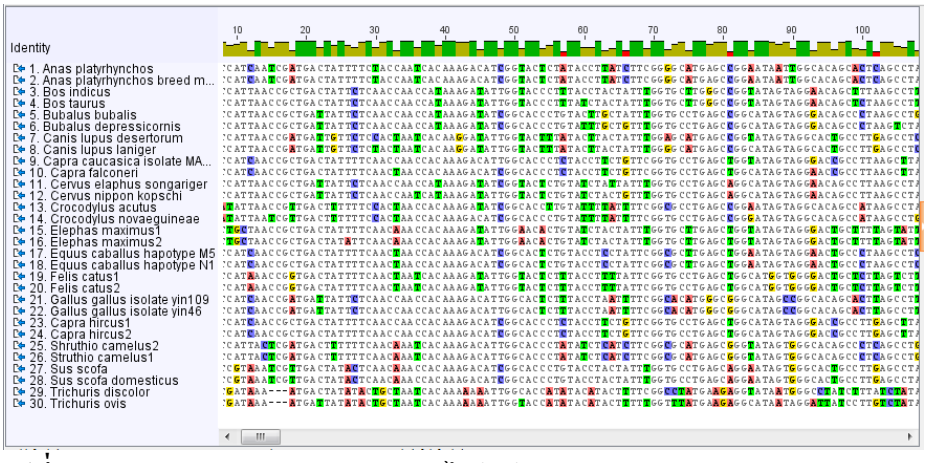
สัตว์เป้าหมาย	**เลขหมายทะเบียน (Accession number)**	**อ้างอิง**
1. เป็ด	EU755253.1	Tu, J. *et al*. 2012
2. เป็ด	NC_009684.1	Tu, J.F. *et al*. 2007
3. วัว	AF492350.1	Hiendleder, S. *et al*. 2008
4. วัว	AF492351.1	Hiendleder, S. *et al*. 2008
5. ควาย	NC_006295.1	Qian, J.X. *et al*. 2004
6. ควาย	NC_020615.1	Hassanin, A. *et al*. 2012
7. หมาป่า	KC461238.1	Zhang, H. *et al*. 2014
8. หมาป่า	NC_011218.2	Meng, C. *et al*. 2009
9. แพะ	NC_020683.1	Hassanin, A. *et al*. 2012
10. แพะ	NC_020622.1	Hassanin, A. *et al*. 2009
11. แพะ	GU068049.1	Xi, W.H. *et al*. 2010
12. แพะ	NC_005044.2	Hassanin, A. *et al*. 2010

สัตว์เป้าหมาย	เลขหมายทะเบียน (Accession number)	อ้างอิง
13. กวาง	NC_014703.1	Yu, H. *et al*. 2012
14. กวาง	NC_016178.1	Pan, H.C. *et al*. 2014
15. จระเข้	NC_015647.1	Zhang, M. *et al*. 2011
16. จระเข้	NC_015651.1	Zhang, M. *et al*. 2011
17. ช้าง	NC_005129.2	Rogaev, E.I. *et al*. 2006
18. ช้าง	EF588275.2	Maikaew, U. *et al*. 2007
19. ม้า	CK203026.1	Allard, F. *et al*. 2003
20. ม้า	CK203028.1	Allard, F. *et al*. 2003
21. แมว	NC_001700.1	Lopez, J.V. *et al*. 1996
22. แมว	U20753.1	Lopez, J.V. *et al*. 1996
23. ไก่	HQ857210.1	Miao, Y. *et al*. 2010
24. ไก่	HQ857212.1	Miao, Y. *et al*. 2010
25. นกกระจอกเทศ	NC_002785.1	Haddrath, O. *et al*. 2001
26. นกกระจอกเทศ	Y12025.1	Harlid, A. *et al*. 1997
27.หมู	AF034253.1	Lin, C.S. *et al*. 1998
28. หมู	NC_012095.1	Yasue, H. *et al*. 2009
29. แกะ	NC_018596.1	Liu, G.H. *et al*. 2012
30. แกะ	JQ996232.1	Liu, G.H. *et al*. 2012

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Geneious (ดังแสดงในรูปที่ 7-8)

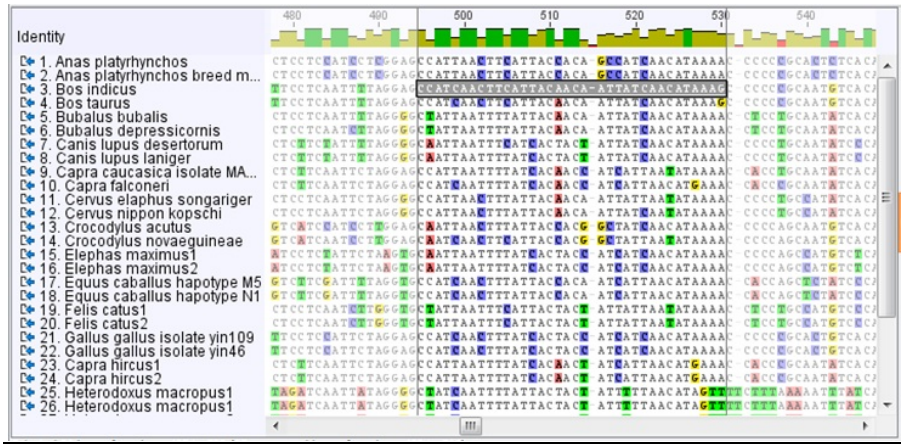


รูปที่ 7 แสดง Sequence alignment ของไซโทโครมบียีน (Cytochrome *b*; Cyt *b*) โดยใช้โปรแกรม Geneious

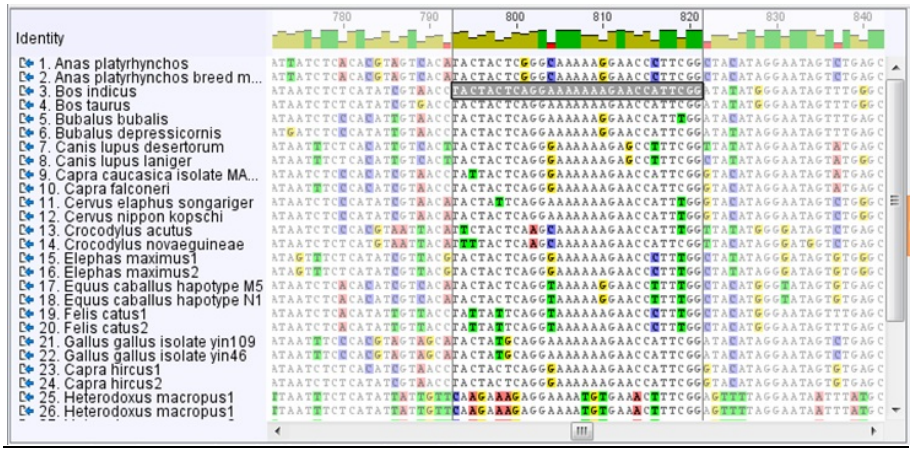


รูปที่ 8 แสดง Sequence alignment ของไซโทโครมออกซิเดส (Cytochrom oxidase I; COI) โดยใช้โปรแกรม Geneious

ในการศึกษาครั้งนี้จะออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจง (Specific forward primer) กับสนิป (Single nucleotide polymorphism; SNP) บนสายนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมายตรงปลาย 3' ซึ่งลำดับเบสดังกล่าวจะต้องแตกต่างไปจากสัตว์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 9-10 ส่วนรีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) จะออกแบบเป็นยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) ซึ่งจะเลือกบริเวณมีลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในสัตว์ต่างชนิดกันตรงปลาย 3' ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer) ให้มีความจำเพาะเจาะจง (Specific primer) กับลำดับเบส (Single nucleotide polymorphism; SNP) บนสายนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เป้าหมายตรงปลาย 3' โดยใช้โปรแกรม Geneious



รูปที่ 10 แสดงขั้นตอนการออกแบบรีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) โดยออกแบบเป็นยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) ซึ่งจะเลือกบริเวณมีลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในสัตว์ต่างชนิดกันตรงปลาย 3' โดยใช้โปรแกรม Geneious

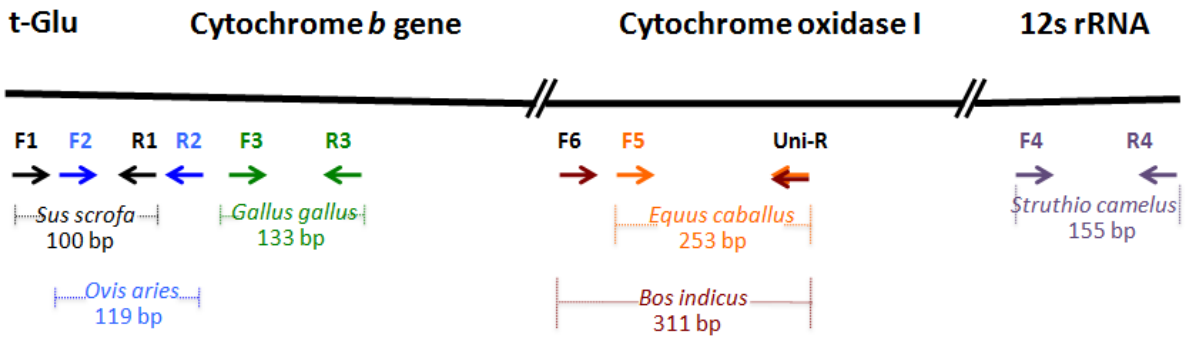
จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของไพรเมอร์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ (Length) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ปริมาณเบสของ G และ C (CG content) อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบโอกาสที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Self-complementarity) ได้แก่ การฟอร์มแฮพิน (Potential hairpin formation) การจับคู่เบสผิดทางปลาย 3' (3' Complementarity) เป็นต้น ด้วยโปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) ต่อมาจะนำไพรเมอร์ไปตรวจวัดและปรับอุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) ของไพรเมอร์ให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมและใกล้เคียงกันทุกๆไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Thermoscientific (http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/) ทั้งนี้อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) ที่เลือกใช้สำหรับฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (Specific forward primer) จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 65-69^{o}C ส่วนรีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) ที่เป็นยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer) จะใช้อุณหภูมิ 71.30^{o}C ดังแสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ไพรเมอร์รวมทั้งสิ้น 6 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 5 และมีตำแหน่งการเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่บนไมโทคอนเดรียลยีน ดังแสดงในรูปที่ 11

ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ที่มาจากการออกแบบในการศึกษานี้

ชนิดของสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ(Melting temperature; Tm)(^{o}C)	ชื่อยีน(mtgene)	ขนาดดีเอ็นเอ	อ้างอิง
ม้า (Horse)	Equ-CO-F1	**5'- GTT TGA TCT GTC CTT ATT ACG GCA -3'**	**65.1**0	ไซโตโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI)	253 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			
วัว (Cow)	Bos-CO-F4	**5'- CCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG-3'**	68.40	ไซโตโครมออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI)	311 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			

ตารางที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดของสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ(Melting temperature; Tm)(°C)	ชื่อยีน (mtgene)	ขนาดดีเอ็นเอ	อ้างอิง
หมู (Pork)	Sus-F1	**5'- GAA AAA TCA TCG TTG TAC TTC AAC TAC A -3'**	64.24	ไซโตโครมบี (Cytochrom *b*; cyt *b*)	100 bp	López-Andreo และคณะ (2005)
	Sus-R1	**5'- GGT CAA TGA ATG CGT TGT TGA T -3'**	66.07			
แกะ (Mutton)	Ovi-F2	**5'- GAA AAA CCA TCG TTG TCA TTC AAC T -3'**	66.10	ทรานสเฟอร์อาร์อีนเอ กลูตาเมท-ไซโตโครมบี (transfer RNA glutamate t-Glu-Cytochrom *b*;cyt *b*)	119 bp	López-Andreo และคณะ (2005)
	Ovi-R2	**5'- AAA TAT TTG ATG GAG CTG GGA GA -3'**	64.84			
ไก่ (Chicken)	Gal-F3	**5'- AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA-3'**	66.66	ไซโตโครมบี (Cytochrom *b*; cyt *b*)	133 bp	C.-L. Zhang และคณะ (2007)
	Gal-R3	**5'- GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A-3'**	65.03			
นกกระจอกเทศ (Ostrich)	Str-F2	**5'- CCC TTT AAA GAC ATC TGG TAT TGT GAG -3'**	65.66	12เอส ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (12S ribosomal RNA ; 12s rRNA)	155 bp	Rojas และคณะ(2011)
	Str-R2	**5'- TAA ATT GTA GGC TCT CTG GGG TTC -3'**	65.45			
ม้า (Horse)	Equ-CO-F1	**5'- GTT TGA TCT GTC CTT ATT ACG GCA -3'**	65.10	ไซโตโครม ออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI)	253 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			
วัว (Cow)	Bos-CO-F4	**5'- CCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG-3'**	68.40	ไซโตโครม ออกซิเดส 1 (Cytochrome oxidase I; COI)	311 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			



รูปที่ 11 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่บนไมโทคอนเดรียลยีน
โดย F1 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific forward primer), F2 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries*-specific forward primer), F3 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus*-specific forward primer), F4 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific forward primer), F5 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific forward primer), F6 คือ ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus*-specific forward primer), R1 คือ รีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific reverse primer), R2 คือ รีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries*-specific reverse primer), R3 คือ รีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus*-specific reverse primer), R4 คือ รีเวิร์สไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific reverse primer) และ Uni-R คือ รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) ที่เป็นยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (Universal primer)

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Direct PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อตามวิธีของ Kitpipit และคณะ ในปี พ.ศ.2557 (33) ซึ่งสามารถทำได้โดยตัดชิ้นเนื้อสัตว์ตัวอย่างให้มีขนาดเล็กประมาณ 1×1 มิลลิเมตรใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติม PBS ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อดึงให้สารละลายที่ติดอยู่ข้างหลอดลงไปผสมรวมกับสารละลายในหลอดแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-5 นาที จากนั้นนำไปบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนของสารละลายใสด้านบนไปใช้ในการทำพีซีอาร์ต่อไป (กรณีที่ไม่ได้ใช้ตัวอย่างทันทีต้องเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

สำหรับกระบวนการพีซีอาร์นั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Finnzymes Phire® Hotstart II DNA Polymerase (Thermoscientific, Germany) โดยในแต่ละหลอดจะมีปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5X Phire® Reaction Buffer (ซึ่งประกอบไปด้วย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate; dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer) 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Phire® Hot Start II DNA Polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, น้ำ (H_2O) ปริมาตร 5.85 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง T100 thermocycler (Bio-Rad; California, USA) ทั้งนี้จะใช้สภาวะเริ่มต้นดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	98	30	1
Denaturation	98	5	35
Annealing	55	5	35
Extension	72	10	35
Final extention	4	∞	1

3.1 ซิงเกิลเพล็กซ์ พีซีอาร์ (Singleplex PCR)

เป็นขั้นตอนการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ว่าสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิดได้ดีหรือไม่ ทดสอบโดยการใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ต่อตัวอย่างเนื้อสัตว์ 1 ชนิดในหลอดพีซีอาร์หนึ่งๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งขั้นตอนนี้จะแบ่งการทดสอบเบื้องต้นนี้ออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1). การหาค่า Annealing temperature (Ta) ด้วย Gradien PCR และ 2). การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test)

ตารางที่ 7 แสดงส่วนประกอบที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Singleplex PCR)

ส่วนประกอบ (Reagent)	**หลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (Positive control) (µM)**	**หลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative control) (µM)**
5X Phire® Reaction Buffer	2.00	2.00
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxy nucleotide triphosphate; dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	0.20	0.20
Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.20	0.20
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer) 0.5 ไมโครโมลาร์	0.50	0.50
รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) 0.5 ไมโครโมลาร์	0.50	0.50
น้ำ (H_2O)	5.85	6.60
ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA)	0.75	-
ปริมาตรรวม	10.00	10.00

1). การหาค่า Annealing temperature (Ta) ด้วย Gradien PCR โดยจะใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C เพื่อหา Annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมที่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีที่สุด

2). การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) โดยจะใช้เนื้อสัตว์ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อวัว (*Bos taurus*) เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) เนื้อเป็ด (*Anas spp*) เนื้อแพะ (*Capra hircus*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) และเนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) โดยจะเลือกใช้ Annealing temperature (Ta) ที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดสอบ Gradien PCR ในข้างต้นของไพรเมอร์แต่ละตัว เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายเท่านั้น

3.2 มัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ (multiplex PCR)

เป็นขั้นตอนการนำไพรเมอร์ที่ผ่านการทดสอบซิงเกิลเพล็กซ์ พีซีอาร์ (Singleplex PCR) จากข้างต้นมารวมในหลอดพีซีอาร์หลอดเดียวกันทั้ง 6 คู่ และใช้ดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายผสมกันทั้ง 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 8 จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสม (PCR optimization) ที่จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 6 ชนิดได้ในเวลาเดียวกัน ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของความเข้มข้นระหว่างไพรเมอร์แต่ละคู่ การเพิ่มหรือลดอุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) ในขั้นตอน Annealing และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ เป็นต้น

ตารางที่ 8 แสดงส่วนประกอบที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Multiplex PCR)

ส่วนประกอบ (Reagent)	**หลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (Positive control) (µM)**	**หลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative control) (µM)**
5X Phire® Reaction Buffer	2.00	2.00
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxy nucleotide triphosphate; dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	0.20	0.20
Phire® Hot Start II DNA Polymerase	0.20	0.20
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (Forward primer) 40 ไมโครโมลาร์		
Sus-F1	0.50	0.50
Ovi-F2	0.45	0.45
Gal-F3	0.20	0.20
Str-F2	0.30	0.30
Equ-CO-F1	0.50	0.50
Bos-CO-F4	0.25	0.25
รีเวิร์สไพรเมอร์ (Reverse primer) 40 ไมโครโมลาร์		
Sus-R1	0.50	0.50
Ovi-R2	0.45	0.45
Gal-R3	0.20	0.20
Str-R2	0.30	0.30
Uni-CO-R	0.75	0.75
น้ำ (H_2O)	1.20	3.20
ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA)	2.00	-
ปริมาตรรวม	10.00	10.00

4. การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA separation and detection)

การตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR products) จะทำโดยการแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนเจลอะกาโรส การเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้นประมาณ 2% (Electrophoresis) ทำโดยชั่งอะกาโรสแบบผง 2 กรัม ละลายใน TBE buffer (ประกอบด้วย Tris Base, Boric Acid และ EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลาประมาณ 1 นาที รอให้เจลอุ่น เติม Ethidium bromide ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทเจลลงในถาด (Tray) ที่เตรียมไว้ ซึ่งวางหวี (Comb) ไว้แล้ว และรอให้เจลแข็ง (ประมาณ 20 นาที) จากนั้นถอดหวี (comb) ออก แล้วนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ที่มี TBE buffer อยู่ สังเกตปริมาณ Buffer ต้องท่วมเนื้อเจล จากนั้นผสมดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ (PCR product) 10 µl กับสีย้อม 5X (loading dye) 2 µl แล้วปิเปตลงในช่องของอะกาโรสเจล ซึ่งในการทำ Gel electrophoresis นี้จะใช้ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK) ซึ่งเป็นตัวเทียบขนาดของแถบของดีเอ็นเอที่ได้มาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลอะกาโรส และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 15 - 30 นาที จากนั้นจึงนำเจลไปส่องดูด้วยเครื่อง LED transilluminator (Nevada, USA) ถ่ายภาพ และบันทึกผล

ทั้งนี้ในการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละการทดลองนั้นจะใช้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่แตกต่างกัน คือในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบซิงเกิลเพล็กซ์ (Singleplex PCR) จะใช้การเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex PCR) จะใช้การเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้นประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีขนาดที่ใกล้เคียงกันทำให้การระบุชนิดของเนื้อสัตว์จากขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลอะกาโรสนั้นทำได้ยาก ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลจะทำให้เจลมีขนาดของรูพรุนที่เล็กลง ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้าลง และสามารถที่จะระบุชนิดของเนื้อสัตว์จากขนาดของดีเอ็นเอจากแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลอะกาโรสทำได้ง่ายขึ้น และปรับการใช้กระแสไฟฟ้าเป็น 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45-75 นาที

5. การทวนสอบชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Validation test)

การทวนสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะนำมาทดสอบ 3 รูปแบบ คือ

5.1 การทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test)

การทำซ้ำทำเพื่อทดสอบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ มีความแม่นยำในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายหรือไม่ กล่าวคือเมื่อทดสอบกับเนื้อสัตว์ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ หมู แกะ ไก่ นกกระจอกเทศ ม้า และวัวเป็นจำนวนหลายซ้ำ ซึ่งได้มาจากการรวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวนชนิดละอย่างน้อย 2 ตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 จะได้ผลในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์เหล่านั้นถูกต้องทั้งหมดหรือไม่

ตารางที่ 9 แสดงชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย จำนวนตัวอย่าง แหล่งที่มาของเนื้อสัตว์ และจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test)

ชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย		**จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่าง**	**แหล่งที่มา**	**จำนวนตัวอย่าง**
ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์			
หมู	*Sus scrofa*	5	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร (จ.สงขลา)	1
			ตลาดชายปลีกพิปูน (จ.นครศรีธรรมราช)	1
			ห้างสรรพสินค้าเทสโก้โลตัส (จ.สงขลา)	1
			ตลาดชายปลีกคลองเรียน (จ.สงขลา)	1
			ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี (จ.สงขลา)	1
แกะ	*Ovis aries*	1	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร (จ.สงขลา)	1
ไก่	*Gallus gallus*	5	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร (จ.สงขลา)	1
			ตลาดชายปลีกบูดล (จ.ปัตตานี)	1
			ห้างสรรพสินค้าเทสโก้โลตัส (จ.สงขลา)	1
			ตลาดชายปลีกคลองเรียน (จ.สงขลา)	1
			ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี (จ.สงขลา)	1
นกกระจอกเทศ	*Struthio camelus*	2	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร (จ.สงขลา)	1
			พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยา 50 พรรษา สยามบรมราชกุมารี จ.สงขลา	1
ม้า	*Equus ferus caballus*	2	ฮอร์ตสปอร์ท หาดใหญ่ (จ.สงขลา)	1 เส้น
			ตลาดชายปลีกบูดล (จ.ปัตตานี)	1 เส้น

ชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมาย		จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง
ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์			
วัว	*Bos taurus*	3	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร (จ.สงขลา) ตลาดชายปลีกบูดล (จ.ปัตตานี) ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี (จ.สงขลา)	1 1 1

5.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง ทำเพื่อตรวจสอบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (multiplex direct PCR) ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายหรือไม่ โดยทำการทดสอบในเนื้อสัตว์หรือดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายและสัตว์อื่นๆ รวม 20 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงประเภท และที่มาของตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test)

ลำดับ	ชนิด	ชื่อวิทยาศาสตร์	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	หมู	*Sus scrofa*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
2	แกะ	*Ovis aries*	เลือด	สวนสัตว์ จ.สงขลา
3	ไก่	*Gallus gallus*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
4	นกกระจอกเทศ	*Struthio camelus*	เนื้อ	พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยา 50 พรรษา สยามบรมราชกุมารี จ.สงขลา
5	ม้า	*Equus ferus caballus*	ขน	ฮอร์ตสปอร์ท จ.สงขลา
6	วัว	*Bos taurus*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
7	จระเข้	*Crocodylus spp*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
8	เป็ด	*Anas spp*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
9	คน	*Homo sapiens*	เยื่อบุกระพุ้งแก้ม	นักศึกษามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
10	กวาง	*Cervid spp*	เนื้อ	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
11	ช้าง	*Elephas maximus*	อุจจาระ	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
12	ลิง	*Macaca mulatta*	เส้นขน	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
13	เสือ	*Panthera tigris*	เส้นขน	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
14	สิงโต	*Panthera leo*	เลือด	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
15	หมีหมา	*Ursus malayanus*	เลือด	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา

16	แรด	*Rhinoceros spp*	เนื้อ	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
17	เก้ง	*Muntiacus muntjak*	เขา	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
18	หมา	*Canis lupus familiaris*	เส้นขน	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
19	แมว	*Felis catus*	เส้นขน	สวนสัตว์สงขลา จ.สงขลา
20	ควาย	*Bubalus bubalis*	ขน	อ.มายอ จ.ปัตตานี

5.3 การทดสอบกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด (Street sample test)

การทดสอบกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด เพื่อตรวจสอบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ ทดสอบกับตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปตามท้องตลาด หรือเนื้อสัตว์แช่แข็งที่วางขายในห้างสรรพสินค้าต่างๆในจังหวัดสงขลา ทั้งหมดจำนวน 101 ตัวอย่าง โดยจะแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ เนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut) จำนวน 17 ตัวอย่าง อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food) จำนวน 19 ตัวอย่าง อาหารจากร้านอาหาร (Street food) จำนวน 27 ตัวอย่าง และอาหารฮาลาล (Halal food) จำนวน 38 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 11 สำหรับการทดสอบกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาดจะทำการสุ่มหยิบชิ้นเนื้อจากภาชนะมาล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการ ดังอธิบายในหัวข้อที่ 1 จากนั้นจึงทำการตรวจสอบว่าในอาหารนั้นๆ มีเนื้อสัตว์ปนอยู่กี่ชนิดและเป็นสัตว์ชนิดไหนบ้าง ตรงตามที่ระบุไว้ในฉลากหรือไม่

ตารางที่ 11 แสดงประเภทของผลิตภัณฑ์อาหาร รายการอาหาร ตราสินค้า เนื้อสัตว์ที่ระบุข้างฉลาก และแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้ในตรวจสอบการปนเปื้อนของตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด

ประเภทของผลิตภัณฑ์อาหาร	รายการอาหาร	ยี่ห้อ	เนื้อสัตว์ที่ระบุข้างฉลาก	แหล่งที่มา
1.เนื้อตัดแช่แข็ง	**- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู**			
(Cold cut)	1. กุนเชียง	บ้านไผ่	หมูเนื้อแดง, มันหมู	ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี จ.สงขลา
	2. หมูยอไร้แป้ง	สุทธิลักษณ์	เนื้อสัตว์ (เนื้อหมู เนื้อไก่) มันหมู	7-Eleven
	3. แหนมหมูย่าง	สุนิสา	เนื้อหมูคัดพิเศษ 70%	7-Eleven
	4. แหนมหมูสไลซ์พร้อมทาน	สุทธิลักษณ์	เนื้อหมู, หนังหมู	7-Eleven
	5. แหนมหมู	Big C	เนื้อหมู 50%, หนังหมู 36%	ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี จ.สงขลา
	6. ลูกชิ้นเอ็นหมู	นัมเบอร์วัน	เนื้อหมู, เนื้อไก่, เอ็นไก่	7-Eleven
	7. ลูกชิ้นเนื้อหมู	นายฮั้งเพ้ง	เนื้อหมู 92%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	8. พอร์คเวียนเนอร์	CP	เนื้อสัตว์	7-Eleven

	9. ไส้กรอกอิตาเลียน	S&P	หมู	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	10. ไส้กรอกชีส	S&P	หมู	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	11. ไส้กรอกเฟรงเฟอร์เตอร์	S&P	หมู	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	12. ไส้กรอกหมูกระเทียมพริกไทย	S&P	หมู	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	13. ไส้กรอกเบอร์เกอร์หมูย่าง	เจด ดราก้อน	หมู	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	14. หมูยอพริกไทยดำ	ส.ขอนแก่น	เนื้อหมู, มันหมู	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	15. ลูกชิ้นหมู	หมูดี	เนื้อหมู 70%	7-Eleven
	16. เบคอนสติ๊ป	TGM	เนื้อหมู 80%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว			
	1. ลูกชิ้นเนื้อ	แชมป์	เนื้อวัว	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
2. อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง **(Instant frozen food)**	**- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู**			
	1. ข้าวหมูพะโล้	S&P	หมู 11%, ไข่ไก่ 11%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	2. สปาเก็ตตี้ขี้เมาหมู	Big C	หมู 12%	ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี จ.สงขลา
	3. ข้าวผัดกระเพราขี้เมาหมู	7 FRESH	หมู 9.07%	7-Eleven
	4. ข้าวผัดกระเพราขี้เมาหมู	พรานไพร	ผัดกระเพราหมู 6%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	5. เกี๊ยวซ่าหมู	CP	หมู 23%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	6. คุโรบุตะหมักน้ำผึ้งสูตรฮ่องกง	CP	หมู	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	7. คอปป้า	TGM	เนื้อหมู 95%	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	8. ข้าวหมูเกหลี	TESCO	หมูเกหลี 28%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	9. หมูเส้นกรอบ	สะเบียง	เนื้อหมู 85%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	10. หมูปิ้ง	7 FRESH	เนื้อหมู 37%, นมข้นจืด 1.50%	7-Eleven
	11. แซนวิชแฮม	บางกอกแฮม	(เนื้อสัตว์) Meat	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่			
	1. เขียวหวานไก่	S&P	ไก่ 13%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	2. ข้าวไก่กระเทียมพริกไทย	Big C	ไก่	ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี จ.สงขลา
	3. ข้าวกระเพราไก่	7 FRESH	ไก่ 12.52%	7-Eleven
	4. ข้าวราดกระเพราไก่	Tasty meat	ไก่ 26.5%	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	5. ไก่กระเทียม	S&P	ไก่	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	6. ไก่เทอริยากิ	TESCO	ไก่เทอริยากิ 30%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	7. ไก่ป๊อป	TPF	เนื้อไก่ 68%, ไข่ไก่ 12%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	8. ไก่ทอดคาราเกะ	CP	ไก่ 69%	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
3. อาหารจากร้านค้า **(Street food)**	**- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู**			
	1. หมูทอด	ลุงโย่ง	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	2. ไส้กรอกหมูเยอรมัน	ส้มตำอินเตอร์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	3. ผัดเผ็ดหมู	สีฟ้า	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	4. .ไส้กรอกหมูรมควัน	Mr.Stack	-	จ.สงขลา
	5. แกงเทโพหมู	กุ๊กสิงห์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	6. ผัดพริกหมู	ป้าเจียม	-	โรงอาหารคณะวิทย์ มอ. จ.สงขลา
	7. ก๋วยเตี๋ยวหมูสับ	ป้าแอ๊ด	-	โรงอาหารคณะวิทย์ มอ. จ.สงขลา
	8. แกงพริกหมูมะเขือ	ยายเจียร	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 108 จ.สงขลา
	9. ต้มผักกะราหมู	ยายเจียร	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 108 จ.สงขลา
	10. หมูทอด	ป้าเล็ก	-	โรงอาหารคณะวิทย์ มอ. จ.สงขลา
	11. แกงเผ็ดหมู	ครัวคนคอน	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	12. หมูผัดข้าวโพดอ่อน	ครัวเพิ่มสุข	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 109 จ.สงขลา
	13. หมูทอดกระเทียม	ครัวคนคอน	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	14. พะแนงหมู	ครัวคนคอน	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	15. หมูผัดพริก	ครัวเพิ่มสุข	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 109 จ.สงขลา

	- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่			
	1. ไก่ตะกร้า	Mr.Stack	-	จังหวัดสงขลา
	2. สเต็กไก่สไปรซี่	Mr.Stack	-	จังหวัดสงขลา
	3. ต้มยำไก่	กุ๊กสิงห์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	4. แกงเขียวหวานไก่	กุ๊กสิงห์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	5. แกงเขียวหวานไก่	สีฟ้า	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	6. นักเกตไก่	ลุงโย่ง	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	7. ไก่ย่างเทอริยากิ	ส้มตำอินเตอร์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	8. แกงข่าไก่	ยายเจียร	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 108 จ.สงขลา
	9. แกงกระทิไก่มะเขือ	ยายเจียร	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 108 จ.สงขลา
	10. แกงกระทิไก่หยวก	ป้าเจียม	-	โรงอาหารคณะวิทย์มอ. จ.สงขลา
	11. แกงกระทิไก่	ครัวคนคอน	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	12. แกงเผ็ดไก่	ครัวคนคอน	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
4. อาหารฮาลาล	**- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ (ฮาลาล)**			
(Halal - certified	1. ไก่เกาหลี	BigC	ไก่	ห้างสรรพสินค้าบิ๊กซี จ.สงขลา
food)	2. นักเกตไก่คลาสสิค	CP	ไก่	ห้างสรรพสินค้าท็อป จ.สงขลา
	3. เบอร์เกอร์สเต็กไก่พริกไทยดำ	CP	ไก่	7-Eleven
	4. มินิคอกเทลไก่	TESCO	ไก่	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	5. ไส้กรอกจูเนียร์คอกเทลไก่	BKP	ไก่	7-Eleven
	6. สปาเกตตี้ไก่สับ	CP	ไก่	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	7. สปาเกตตี้เขียวหวานไก่	CP	ไก่	7-Eleven
	8. ข้าวมันไก่ต้ม	ฮัสซารณ์	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา
	9. ข้าวหมกไก่ทอด	ฮัสซารณ์	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา
	10. มัสมั่นไก่	นูรดา โภชนา	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	11. พะแนงไก่	นูรดา โภชนา	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	12. ไก่ผัดพริก	ซามีย์ คิทเช่นท์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	13. เครื่องแกงไก่	ซามีย์ คิทเช่นท์	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	14. ไก่กรอบผัดน้ำพริกเผา	สุไลมาน โภชนา	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	15. ไก่ผัดกระเทียมพริกไทย	สุไลมาน โภชนา	-	โรงช้าง มอ. จ.สงขลา
	16. ไก่ทอด	ไก่ทอดฟาตีมา	-	ถนนปุณณกัณฑ์ 108 จ.สงขลา
	17.เบอร์เกอร์ไก่	ฮัมชิวเบอร์เกอร์	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	18. แหนมไก่	ฟาอิซย๊ะ	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	19. ลูกชิ้นเอ็นไก่	อาซียา ลูกชิ้น ปิ้งย่าง	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	20. โรตีมะตะบะไก่	โรตีมุสลิม	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	21. ต้มไก่ผัดเขียง	ก๊ะไหม	-	โรงอาหารคณะวิทย์ มอ. จ.สงขลา
	22. ข้าวหน้าไก่	บังฮาดิส	-	โรงอาหารคณะวิทย์ มอ. จ.สงขลา
	23. ไก่ผัดผงกระหรี่	อามีนะห์	-	ถ.ทุ่งรี จ.สงขลา
	24. ข้าวผัดไก่	อามีนะห์	-	ถ.ทุ่งรี จ.สงขลา
	25. ผัดพริกไก่	อามีนะห์	-	ถ.ทุ่งรี จ.สงขลา
	26.แกงเนื้อวัว	รร.บ้านบูดล	-	รร.บ้านบูดล จ.ปัตตานี
	27. ผัดผักเนื้อแดง	รร.บ้านบูดล	-	รร.บ้านบูดล จ.ปัตตานี
	28. แกงมัสมั่นเนื้อ	ร้านอาหารมุสลิม	-	ปั๊ม ปตท. อ.จะนะ จ.สงขลา
	39. เนื้อทอด	ร้านอาหารมุสลิม	-	ปั๊ม ปตท. อ.จะนะ จ.สงขลา
	30. เนื้อผัดพริก	ร้านอาหารมุสลิม	-	ปั๊ม ปตท. อ.จะนะ จ.สงขลา
	- ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว (ฮาลาล)			
	1. ไส้กรอกเนื้อสมุนไพรแซ่แข็ง	บ้านเนื้อโคขุน	เนื้อวัว	ห้างสรรพสินค้าโลตัส จ.สงขลา
	2. ลูกชิ้นเนื้อจัมโบ่	IBF	เนื้อวัว	ห้างสรรพสินค้าแม็คโคร จ.สงขลา
	3. คั่วกลิ้งเนื้อ	อลิน อิสลามตามสั่ง	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา

	4. ผัดคะน้าเนื้อทอด	อลิน อิสลามตามสั่ง	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา
	5. เกาเหลาเนื้อเปื่อย	เตียวตุ๋นอิสลาม	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา
	6. เกาเหลาลูกชิ้นเนื้อ	เตียวตุ๋นอิสลาม	-	ห้างสรรพสินค้าไดอะน่า จ.สงขลา
	7. ลูกชิ้นเนื้อ	อาซียา ลูกชิ้น ปิ้งย่าง	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา
	8. เบอร์เกอร์เนื้อ	ฮัมชิวเบอร์เกอร์	-	ตลาดศรีตรัง จ.สงขลา

หมายเหตุ: - คือ อาหารจากร้านค้า ซึ่งไม่สามารถระบุปริมาณเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดสอบไพรเมอร์โดยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ (Primer test and direct amplification)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบไพรเมอร์ (Species-specific primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากสัตว์เป้าหมายทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้โดยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายจำนวน 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ซึ่งรวบรวมมาจากรายงานการวิจัยในวารสารนานาชาติอื่นๆ จำนวน 4 คู่ และออกแบบในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 2 คู่ รายละเอียดของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา แสดงในตารางที่ 12

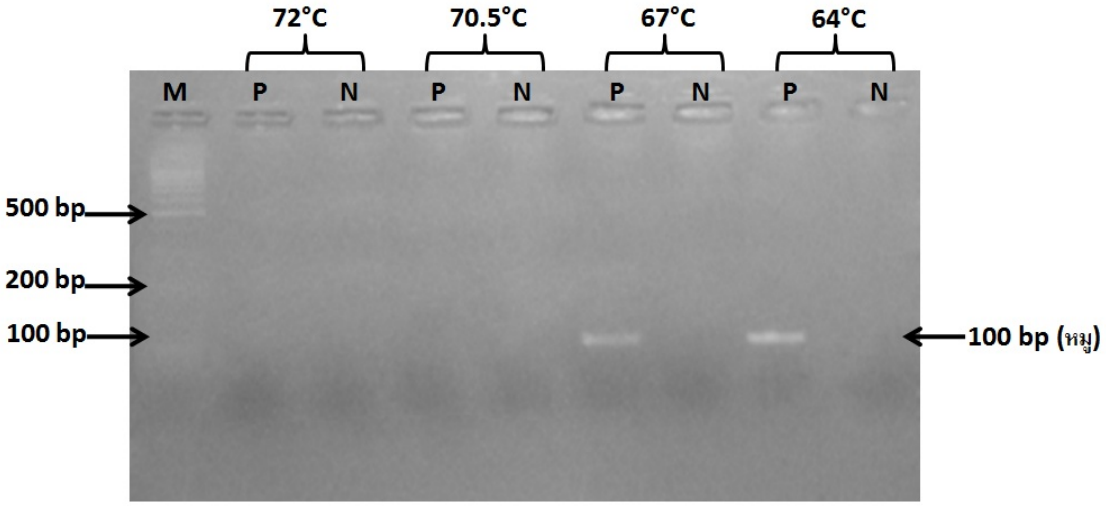
ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งได้แก่ ชนิดของสัตว์เป้าหมายที่จำเพาะเจาะจง ชื่อไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิ Melting temperature (Tm) ไมโทคอนเดรียลยีน ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product size) และงานวิจัยอ้างอิงแหล่งที่มาของแต่ละไพรเมอร์

ชนิดของสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ Melting temperature (°C)	ไมโทคอนเดรียลยีน	ขนาดดีเอ็นเอ	อ้างอิง
หมู (Pork)	Sus-F1	**5'- GAA AAA TCA TCG TTG TAC TTC AAC TAC A -3'**	64.24	ไซโตโครมบี (Cytocrom b; cyt *b*)	100 bp	(34)
	Sus-R1	**5'- GGT CAA TGA ATG CGT TGT TGA T -3'**	66.07			
แกะ (Mutton)	Ovi-F2	**5'- GAA AAA CCA TCG TTG TCA TTC AAC T -3'**	66.10	ทรานสเฟอร์อาร์อีนเอ กลูตาเมท-ไซโตโครมบี(transfer RNA glutamate t-Glu-Cytocrom b;cyt b)	119 bp	(34)
	Ovi-R2	**5'- AAA TAT TTG ATG GAG CTG GGA GA -3'**	64.84			
ไก่ (Chicken)	Gal-F3	**5'- AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA-3'**	66.66	ไซโตโครมบี (Cytocrom b; cyt b)	133 bp	(35)
	Gal-R3	**5'- GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A-3'**	65.03			
นกกระจอกเทศ (Ostrich)	Str-F2	**5'- CCC TTT AAA GAC ATC TGG TAT TGT GAG -3'**	65.66	12เอส ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (12S ribosomal RNA ; 12s rRNA)	155 bp	(36)
	Str-R2	**5'- TAA ATT GTA GGC TCT CTG GGG TTC -3'**	65.45			

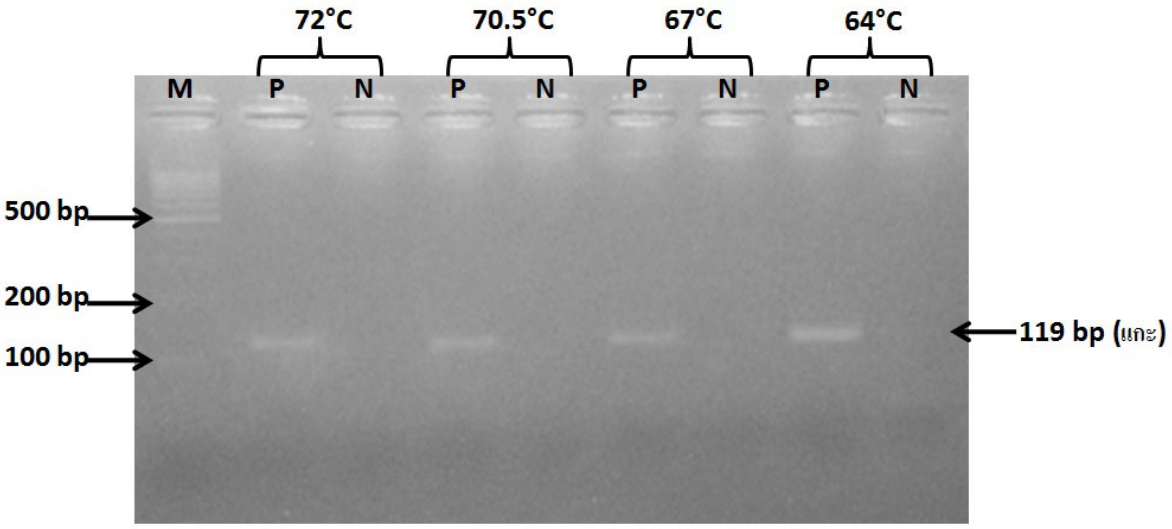
ชนิดของสัตว์เป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิ Melting temperature (°C)	ไมโทคอนเดรียลยีน	ขนาดดีเอ็นเอ	อ้างอิง
ม้า (Horse)	Equ-CO-F1	**5'- GTT TGA TCT GTC CTT ATT ACG GCA -3'**	**65.1**0	ไซโตโครม ออกซิเดส(Cytochrome oxidase I; COI)	253 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			
วัว (Cow)	Bos-CO-F4	**5'- CCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG-3'**	68.40	ไซโตโครม ออกซิเดส(Cytochrome oxidase I; COI)	311 bp	ออกแบบในการศึกษานี้
	Uni-CO-R	**5'- CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA -3'**	71.30			

ไพรเมอร์ดังกล่าวทั้งหมดนำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradient PCR) ซึ่งทดสอบโดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) ที่ต่างกัน จำนวน 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C เพื่อหาอุณหภูมิ Annealing temperature ที่สูงที่สุดที่ไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้

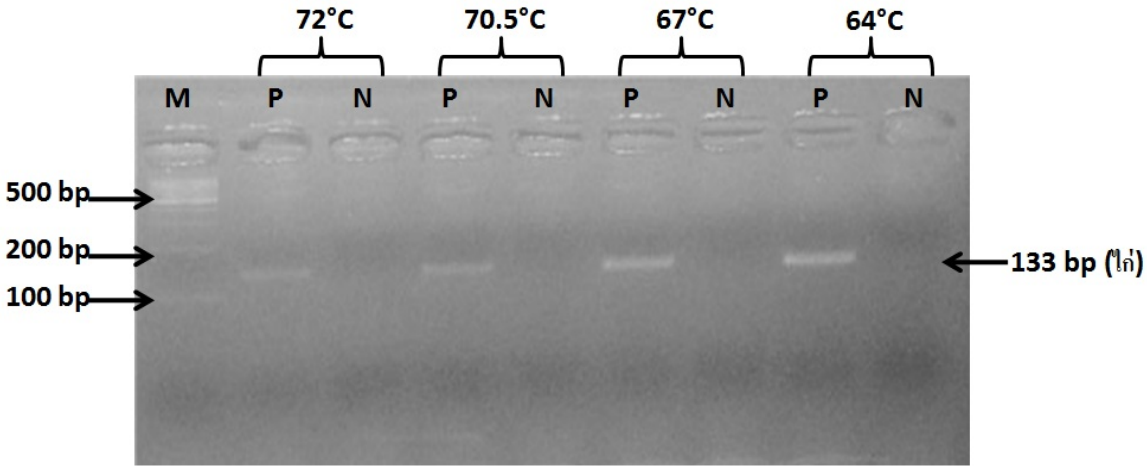
ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 6 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ที่เกี่ยวข้องได้สำเร็จด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) ตามที่คาดหวัง คือ 100 119 133 155 253 และ 311คู่เบส สำหรับเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 12-17 โดยไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific primer) สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อหมู ด้วยอุณหภูมิ Annealing temperature เพียง 2 อุณหภูมิ คือ 67°C และ 64°C ดังแสดงในรูปที่ 12 ในขณะที่ไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries*-specific primer) ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus*-specific primer) ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific primer) ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific primer) และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus*-specific primer) สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์เป้าหมาย ได้ทั้ง 4 อุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 13-17 นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ในทุกการทดลอง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเกิดจากดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมาย และไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในชุดน้ำยาที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



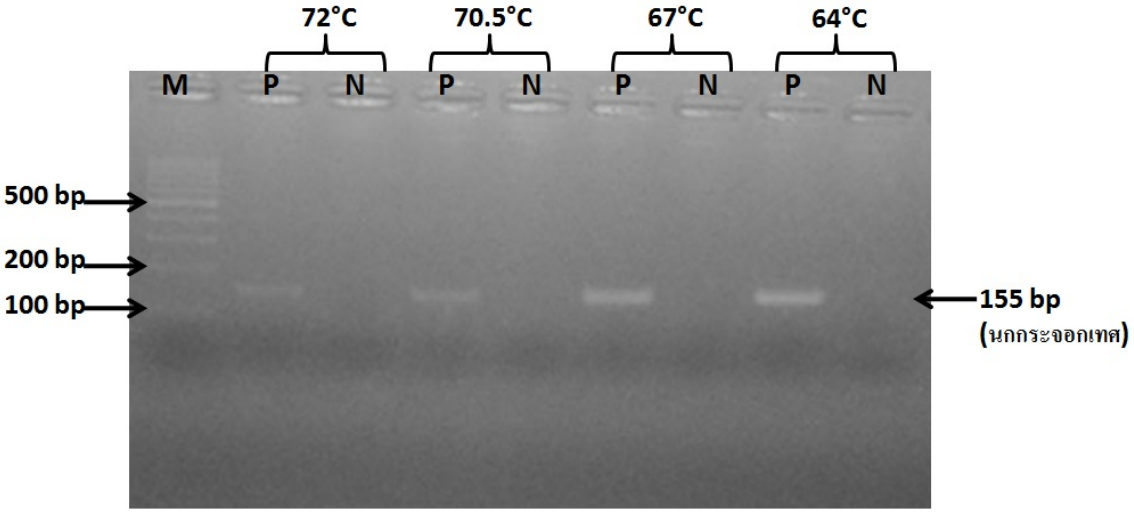
รูปที่ 12 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของหมู และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ



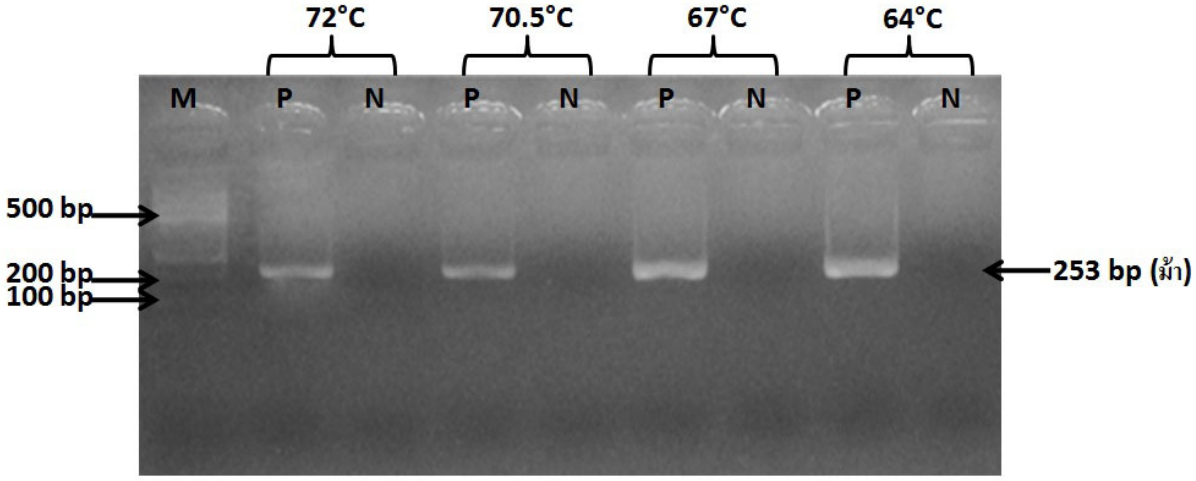
รูปที่ 13 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของแกะ และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ



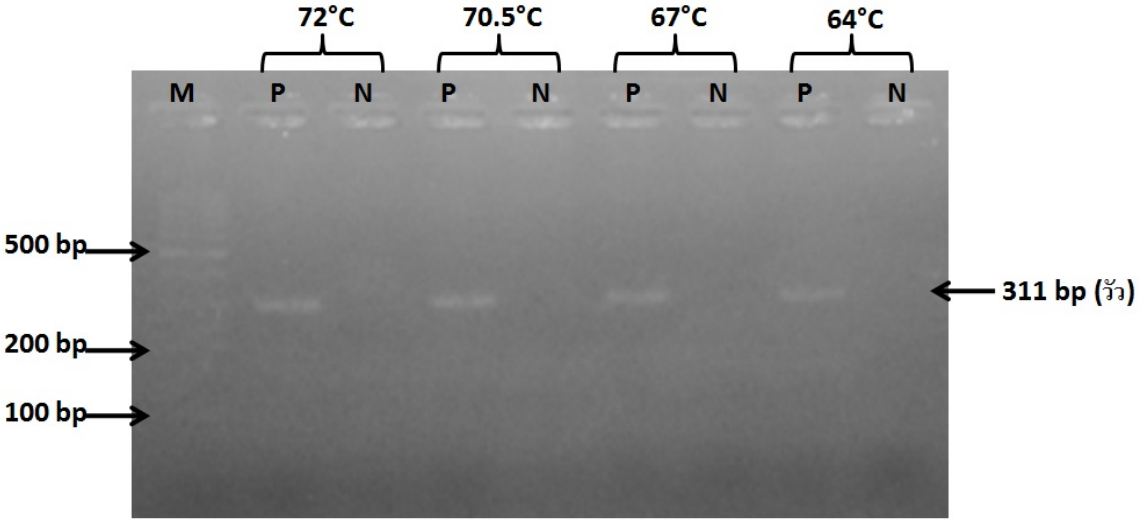
รูปที่ 14 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus* -specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของไก่ และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ



รูปที่ 15 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของนกกระจอกเทศ และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ



รูปที่ 16 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของม้า และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ

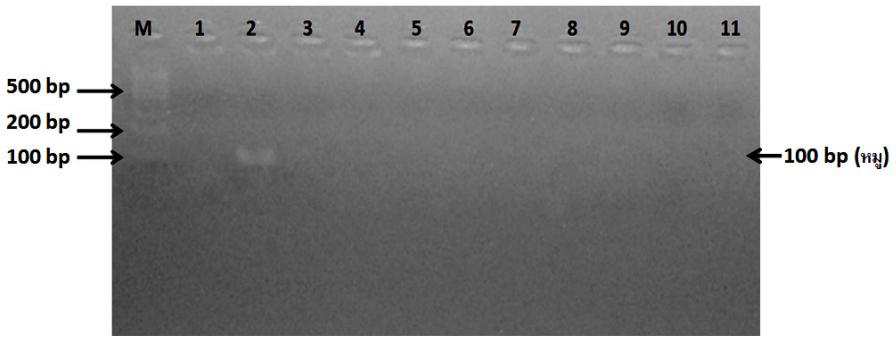


รูปที่ 17 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus*-specific primer) โดยใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 72°C, 70.5°C, 67°C และ 64°C โดยสัญลักษณ์ M คือ 100 bp Marker, P คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวกที่มีดีเอ็นเอของวัว และ N คือ ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ

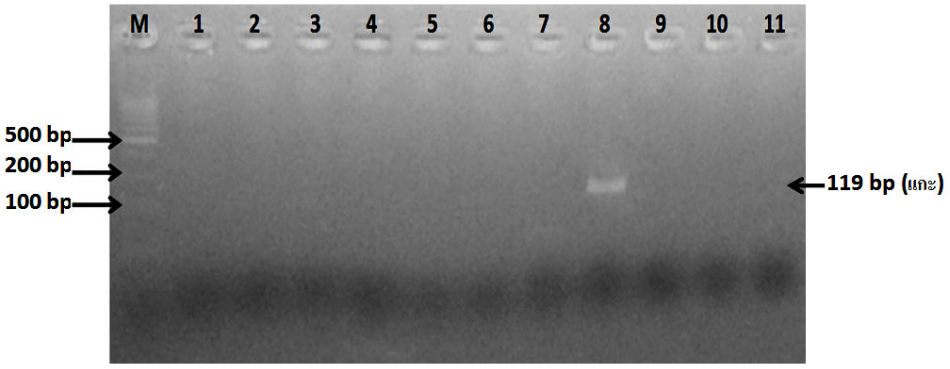
2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์แบบซิงเกิลเพล็กซ์ (Singleplex)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ที่เลือกศึกษาด้วยชุดทดสอบซิงเกิลเพล็กซ์ไดเร็คพีซีอาร์ (Singleplex direct PCR) โดยนำไพรเมอร์แต่ละคู่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื้อสัตว์เป้าหมาย และเนื้อสัตว์อื่นๆที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอาหาร (Possible meat) รวมทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อวัว (*Bos taurus*) เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) เนื้อเป็ด (*Anas spp*) เนื้อแพะ (*Capra hircus*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) และเนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้อุณหภูมิ Annealing temperature (Ta) 67 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงทั้ง 6 คู่ ซึ่งได้มาจากการทดสอบด้วยวิธีเกรเดียนพีซีอาร์ (Gradient PCR) ในการศึกษาก่อนหน้า

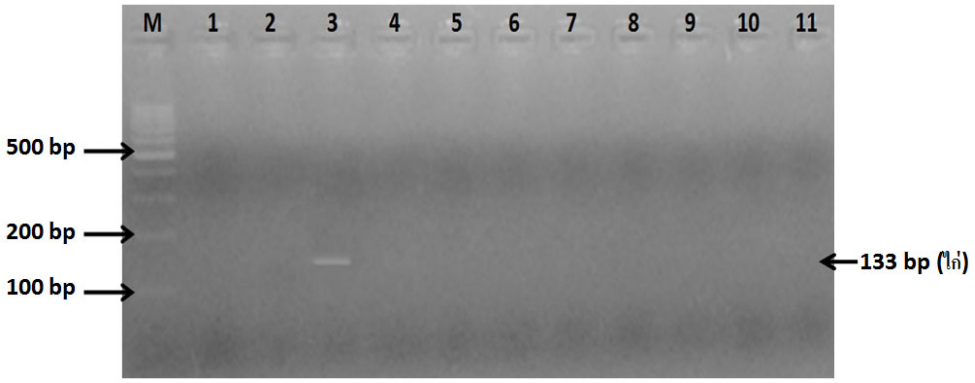
ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะกับเนื้อสัตว์เป้าหมายเท่านั้น โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) ตามที่คาดหวัง คือ 100 คู่เบส 119 คู่เบส 133 คู่เบส 155 คู่เบส 253 คู่เบส และ 311คู่เบส สำหรับเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18-23 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมาย นอกจากนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



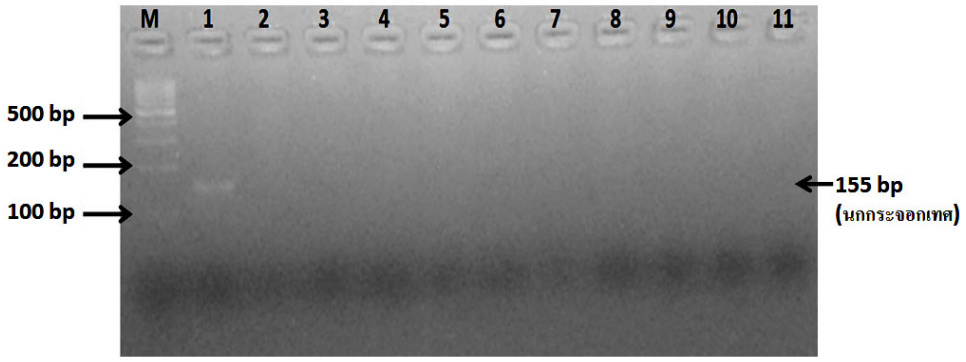
รูปที่ 18 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู (*Sus scrofa*-specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



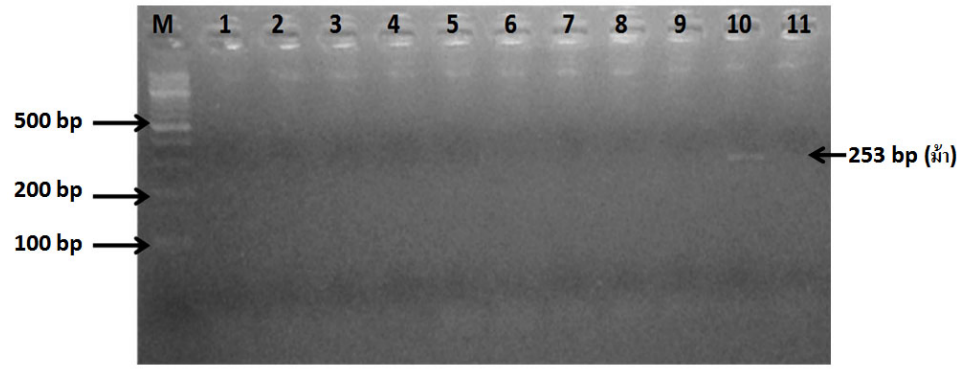
รูปที่ 19 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ (*Ovis aries* -specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



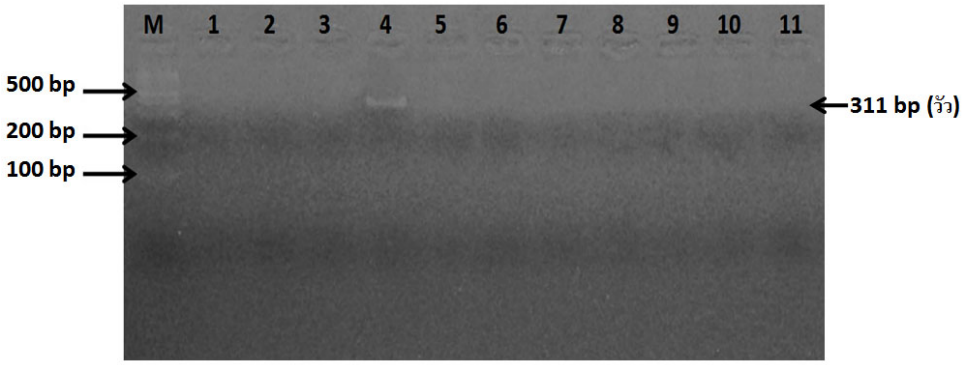
รูปที่ 20 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่ (*Gallus gallus*-specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



รูปที่ 21 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*-specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



รูปที่ 22 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า (*Equus ferus caballus*-specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

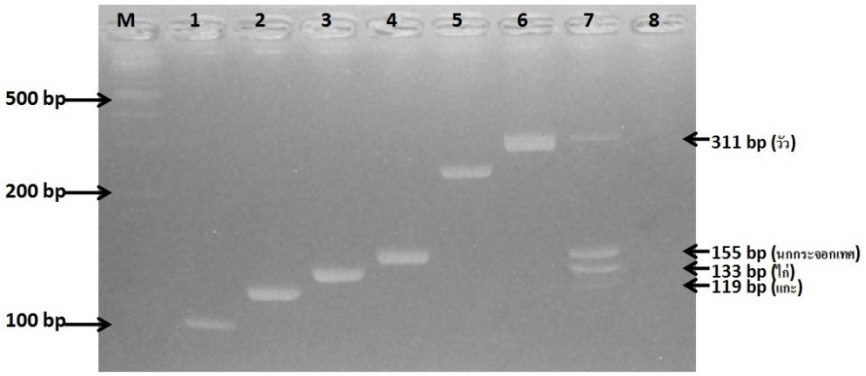


รูปที่ 23 ภาพ 2% อะกาโรสเจล แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว (*Bos taurus* -specific primer) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 2 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 5 : เนื้อควาย (*Bubalus bubalis*) 6 : เนื้อเป็ด (*Anas spp*) 7 : เนื้อแพะ (*Capra hircus*) 8 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 9 : เนื้อจระเข้ (*Crocodylus spp*) 10 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และ 11 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

3. การพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex optimization)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม ที่สามารถเพิ่มประมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 6 ชนิดได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์มาแล้วจากการศึกษาก่อนหน้า คือ มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อสัตว์เป้าหมายเท่านั้น และมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ไม่มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (No secondary structure) และมีอุณหภูมิ Melting temperature ใกล้เคียงกัน ซึ่งส่งเสริมให้เกิดความสำเร็จในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์

การทดลองแรกเพื่อพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ทำโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสัตว์เป้าหมาย เลือกใช้ Annealing temperature 67 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาก่อนหน้า โดยใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermoscientific, Germany) และใช้สภาวะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามคู่มือปฏิบัติการของชุดน้ำยาดังกล่าว โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละคู่เท่ากับ 0.5 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้จะใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 30 รอบ ผลการศึกษาเมื่อแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 4% พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ มีขนาด (PCR product size) เท่ากับ 119 133 155 และ 311 คู่เบส (รูปที่ 24) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังของเนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ และเนื้อวัว ตามลำดับ โดยแถบดีเอ็นเอของเนื้อแกะ และเนื้อวัว จะมีความเข้มของแถบ (Intensity) น้อย และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเนื้อหมู และเนื้อม้า ที่ขนาดเท่ากับ 100 คู่เบส และ 253 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ดังแสดงในรูปที่ 24



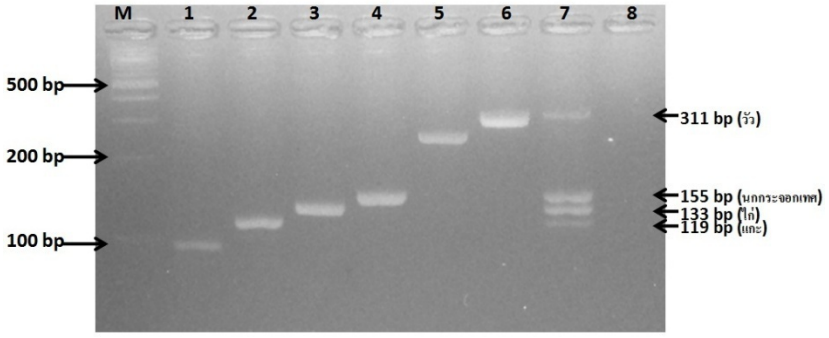
รูปที่ 24 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 1 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์หมู และม้า ที่ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 0.5 µM เป็น 0.75 µM และเพิ่มเข้มข้นของไพรเมอร์แกะ และวัว ที่มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อย โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 0.5 µM เป็น 0.6 µM ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	0.75
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	0.60
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	0.75
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	0.60

ผลการศึกษาปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา คือ พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 119 133 155 และ 311 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังของเนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ และเนื้อวัว ตามลำดับ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเนื้อหมู และเนื้อม้าเหมือนเดิม และไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ดังแสดงในรูปที่ 25



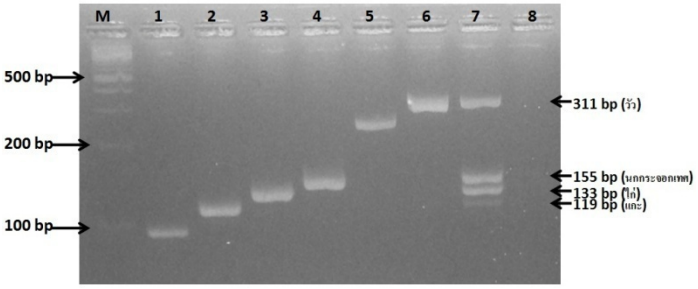
รูปที่ 25 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 2 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelum*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์หมู และม้า ที่ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 0.75 µM เป็น 1.25 µM และเพิ่มเข้มข้นของไพรเมอร์แกะ และวัว ที่มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อย โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 0.60 µM เป็น 1.00 µM ดังแสดงในตาราง 14

ตารางที่ 14 แสดงะความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	1.25
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	1.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	1.25
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	1.00

ผลการศึกษายังคงปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า แต่พบแถบดีเอ็นเอของเนื้อวัว (311 คู่เบส) ที่มีความเข้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของเนื้อแกะ (119 คู่เบส) ยังคงจางเหมือนเดิม และไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ดังแสดงในรูปที่ 26



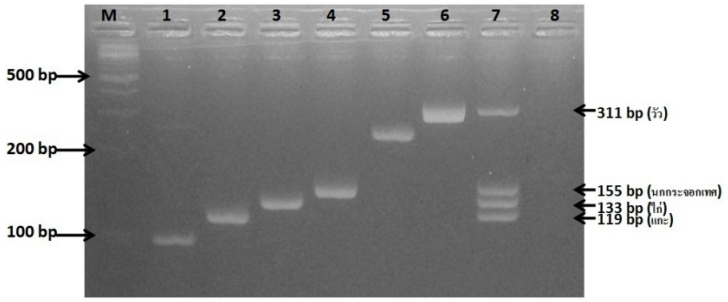
รูปที่ 26 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 3 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelum*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์หมู และม้า ที่ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 1.25 µM เป็น 1.75 µM และเพิ่มเข้มข้นของไพรเมอร์แกะ ที่มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อย โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 1.00 µM เป็น 1.50 µM ดังแสดงในตาราง 15

ตารางที่ 15 แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	1.75
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	1.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	1.75
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	1.00

ผลการศึกษายังคงปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า ในขณะที่ความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแกะ (119 คู่เบส) เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ดังแสดงในรูปที่ 27



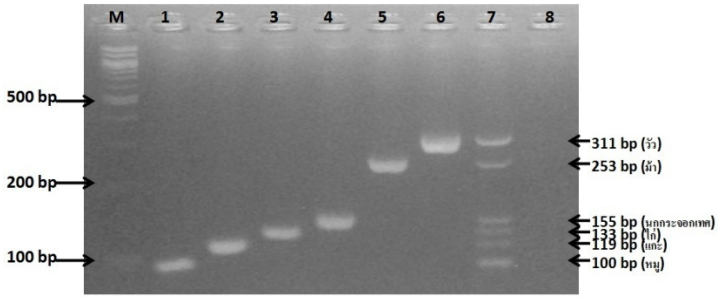
รูปที่ 27 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 4 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelum*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์หมู และม้า ที่ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 1.75 µM เป็น 2.00 µM ดังแสดงในตาราง 16

ตารางที่ 16 แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 5

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	1.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	0.50
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	1.00

ผลการศึกษาปรากฏแถบดีเอ็นเอครบทั้ง 6 แถบที่คาดหวังไว้ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 100 119 133 155 253 และ 311 คู่เบส (รูปที่ 17) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังของเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอของเนื้อแกะ (119 คู่เบส) เนื้อไก่ (133 คู่เบส) และเนื้อนกกระจอกเทศ (155 คู่เบส) มีความเข้มของแถบน้อย สำหรับผลการศึกษานี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) เช่นเดียวกับผลการศึกษาข้างต้น ดังแสดงในรูปที่ 28



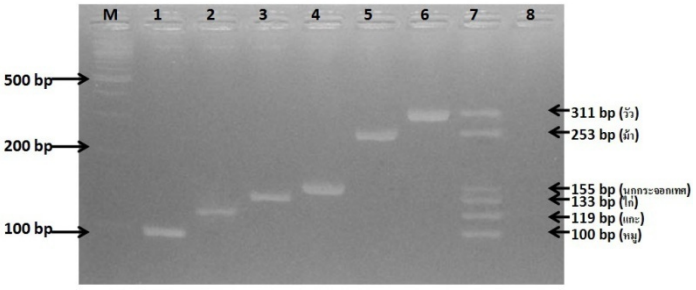
รูปที่ 28 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 5 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

การศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์แกะ ไก่ และนกกระจอกเทศ ที่ให้แถบดีเอ็นเอค่อนข้างจาง โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์แกะ จาก 1.50 µM เป็น 1.80 µM และเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ไก่ และนกกระจอกเทศ จาก 0.50 µM เป็น 0.80 µM ดังแสดงในตาราง 17

ตารางที่ 17 แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	1.80
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.80
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	0.80
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	1.00

ผลการศึกษาปรากฏแถบดีเอ็นเอครบทั้ง 6 แถบที่คาดหวังไว้ โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอแกะ (119 คู่เบส) และไก่ (133 คู่เบส) มีความเข้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ยังจางอยู่ และไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls) ดังแสดงในรูปที่ 29



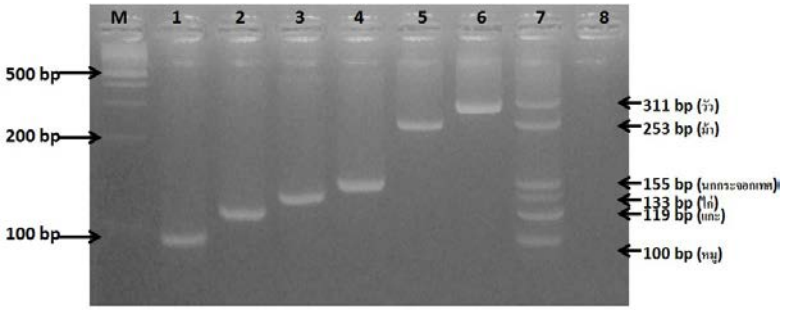
รูปที่ 29 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 6 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelum*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

ดังนั้นการศึกษาถัดไปจึงทำการเพิ่มเข้มข้นของไพรเมอร์นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ที่มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อย โดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์จาก 0.80 µM เป็น 1.20 µM ดังแสดงในตาราง 18

ตารางที่ 18 แสดงความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 7

ชนิดของไพรเมอร์	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ (µM)
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับหมู	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับแกะ	1.80
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับไก่	0.80
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับนกกระจอกเทศ	1.20
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับม้า	2.00
ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับวัว	1.00

ผลการศึกษาพบว่าสามารถพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ได้สำเร็จ โดยจากผลการทดลองปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนครบทั้ง 6 แถบที่คาดหวัง ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 100 119 133 155 253 และ 311 คู่เบส (รูปที่ 17) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังของเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว ตามลำดับ โดยแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมีความเข้มที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 30 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ครั้งที่ 7 ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 2 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 3 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 4 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) 5 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 6 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 7 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

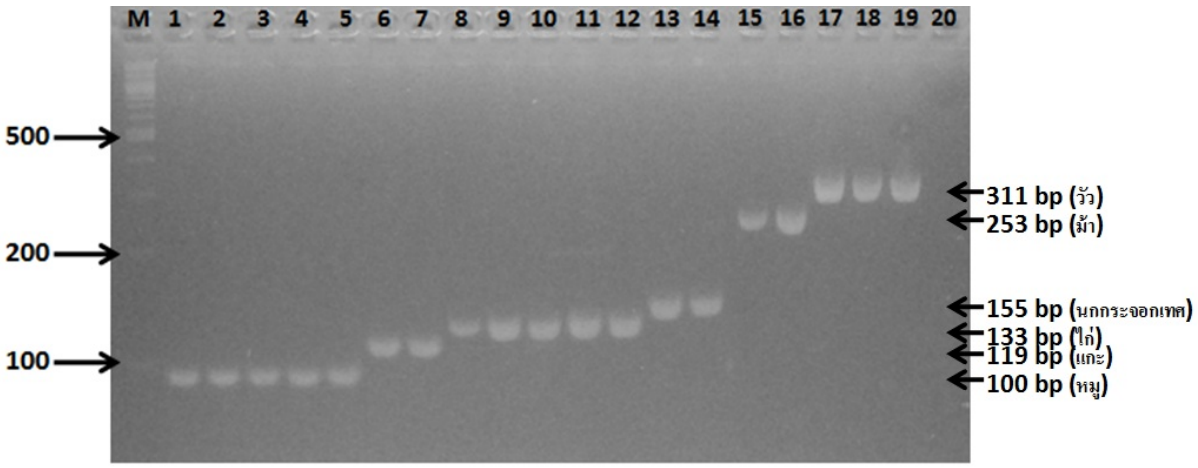
4. การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดทดสอบ (Assay validation test)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทวนสอบการใช้งานจริงชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ โดยจะแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน คือ การทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) และการทดสอบการใช้งานชุดทดสอบจริงกับตัวอย่างอาหารที่วางขายตามท้องตลาด (Market/Street sample test)

4.1 การทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test)

การทดสอบโดยการทำซ้ำมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ ในด้านความถูกต้องและแม่นยำของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื้อสัตว์เป้าหมาย โดยจะทดสอบกับตัวอย่างเนื้อดิบที่เป็นสัตว์เป้าหมายทั้ง 6 ชนิด เป็นจำนวนทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อหมู 5 ตัวอย่าง เนื้อแกะ 2 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 5 ตัวอย่าง เนื้อนกกระจอกเทศ 2 ตัวอย่าง เนื้อม้า 2 ตัวอย่าง และเนื้อวัว 3 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายทั้ง 19 ตัวอย่างได้ถูกต้องทั้งหมด โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) ตามที่คาดหวัง คือ 100 คู่เบส 119 คู่เบส 133 คู่เบส 155 คู่เบส 253 คู่เบส และ 311 คู่เบส สำหรับเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 31 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื้อสัตว์เป้าหมายทั้ง 19 ตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)



รูปที่ 31 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) มาการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1-5 : เนื้อหมู (*Sus scrofa*) 6-7 : เนื้อแกะ (*Ovis aries*) 8-12 : เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) 13-14 : เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelum*) 15-16 : เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) 17-19 : เนื้อวัว (*Bos taurus*) 20 : เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) และ 8 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (multiplex direct PCR) ในด้านของความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่มีต่อเนื้อสัตว์เป้าหมาย โดยทดสอบกับตัวอย่างทั้งหมด 20 ชนิด ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วยสัตว์เป้าหมายจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ หมู (*Sus scrofa*) แกะ (*Ovis aries*) ไก่ (*Gallus gallus*) นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ม้า (*Equus ferus caballus*) และวัว (*Bos taurus*) และสัตว์อื่นๆที่อาจนำมาประกอบอาหารท้องถิ่น หรือสัตว์ป่า เป็นจำนวน 14 ชนิด ได้แก่ จระเข้ (*Crocodylus spp*) เป็ด (*Anas spp*) คน (*Homo sapiens*) กวาง (*Cervid spp*) ช้าง (*Elephas maximus*) ลิง (*Macaca mulatta*) เสือ (*Panthera tigris*) สิงโต (*Panthera leo*) หมีหมา (*Ursus malayanus*) แรด (*Rhinoceros spp*) เก้ง (*Muntiacus muntjak*) หมา (*Canis lupus familiaris*) แมว (*Felis catus*) และควาย (*Bubalus bubalis*)

ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิดเท่านั้น โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) ตามที่คาดหวัง คือ 100 คู่เบส 119 คู่เบส 133 คู่เบส 155 คู่เบส 253 คู่เบส และ 311คู่เบส สำหรับเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อม้า และเนื้อวัว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 32 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างอื่นๆ ที่ไม่ใช่สัตว์เป้าหมาย แสดงให้เห็นว่า ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์เป้าหมายสูง ดังนั้นหากนำไปใช้ทดสอบตัวอย่างเนื้อที่ไม่ทราบชนิด (Unknown) จะสามารถมั่นใจได้ว่า ผลที่ได้มาจากเนื้อเป้าหมายเท่านั้น และจะไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์อื่นๆ นอกจากนี้ผลการศึกษาไม่พบแถบดีเอ็นเอสำหรับตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

รูปที่ 32 ภาพ 4% อะกาโรสเจลแสดงผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) ของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ช่อง (Lane) M : 100 คู่เบส (bp) Ladder 1 :เนื้อสัตว์ผสมกันทั้ง 6 ชนิด (เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) 2 : จระเข้ (*Crocodylus spp*) 3 : เป็ด (*Anas spp*) 4 : คน (*Homo sapiens*) 5 : กวาง (*Cervid spp*) 6 : ช้าง (*Elephas maximus*) 7 : ลิง (*Macaca mulatta*) 8 : เสือ (*Panthera tigris*) 9 : สิงโต (*Panthera leo*) 10 : หมีหมา (*Ursus malayanus*) 11 : แรด (*Rhinoceros spp*) 12 : เก้ง (*Muntiacus muntjak*) 13 : หมา (*Canis lupus familiaris*) 14 : แมว (*Felis catus*) 15 : ควาย (*Bubalus bubalis*) และ 16 : ตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (Negative controls)

4.3 การทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test)

การทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาดมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่าชุดทดสอบสามารถใช้ตรวจเนื้อสัตว์เป้าหมายในอาหารประเภทต่างๆได้จริง รวมทั้งตรวจสอบการปนเปื้อน หรือการปลอมปนของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ต่างๆ และอาหารปรุงสุกที่มีเนื้อสัตว์เป็นองค์ประกอบซึ่งมีการวางจำหน่ายอยู่ตามร้านอาหารทั่วไป โดยจะนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้ มาตรวจสอบกับตัวอย่างอาหารและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปตามท้องตลาด หรือเนื้อสัตว์แช่แข็งที่วางขายในห้างสรรพสินค้าต่างๆ รวมทั้งสิ้น 101 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ เนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut) จำนวน 17 ตัวอย่าง อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food) จำนวน 19 ตัวอย่าง อาหารจากร้านอาหาร (Street food) จำนวน 27 ตัวอย่าง และอาหารฮาลาล (Halal food) จำนวน 38 ตัวอย่าง (ตารางที่ 11)

ผลการศึกษาพบว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์สามารถใช้ทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาดได้ แม้ในตัวอย่างจะมีปริมาณของตัวยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhihitor) อยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งมาจากในชิ้นเนื้อ และในเครื่องปรุงประเภทเครื่องเทศต่างๆ โดยจากตัวอย่างทั้งหมด 101 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้สูงถึง 97 ตัวอย่าง (ตารางที่ 19) คิดเป็นอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเท่ากับ 96.04 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มีเพียง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเนื้อวัวในเกาเหลาเนื้อเปื่อย จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างโรตีมะตะบะไก่ จำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างลูกชิ้น จำนวน 2 ตัวอย่าง นอกจากนี้ผลการทวนสอบการใช้งานชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้กับอาหารตามท้องตลาด พบการปลอมปนของเนื้อสัตว์ที่ไม่ตรงกับฉลากระบุไว้ รวมทั้งสิ้น 25 จากตัวอย่างทั้งหมด 101 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 24.75 เปอร์เซ็น โดยในเนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut) ของหมู พบการปลอมปนเนื้อไก่จำนวน 9 ใน 14 ตัวอย่าง คิดเป็น 52.94 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างเนื้อสัตว์แช่แข็งทั้งหมด สำหรับอาหารจากร้านค้า (Street food) ของเนื้อหมู พบการปลอมปนเนื้อไก่จำนวน 9 ใน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งทั้งหมด สำหรับอาหารฮาลาล (Halal food) ของเนื้อวัว พบการปลอมปนเนื้อแกะและเนื้อไก่รวมเป็นจำนวน 5 ใน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 18.42 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างอาหารฮาลาลทั้งหมด และไม่พบปลอมปนในสำหรับอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food) ทั้ง 19 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงผลการศึกษาการใช้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์เพื่อทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test) ซึ่งได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหาร (Food products) จำนวนตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้ง 6 ชนิด (Multiplex 6 species) และ อัตราการปลอมปนในอาหาร (Fraud ratio (%))

ผลิตภัณฑ์อาหาร	จำนวนตัวอย่าง	ชนิดของเนื้อ						อัตราการปลอมปน (%)
		หมู	แกะ	ไก่	นกกระจอกเทศ	ม้า	วัว	
1. เนื้อสัตว์แช่แข็ง (Cold cut)	**17**							52.94%
1.1 เนื้อหมู	14	13/14	-	*9/14*	-	-	-	
1.2 เนื้อวัว	1*	-	-	-	-	-	-	
1.3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่	2	2/2	-	2/2	-	-	-	
2. อาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Instant frozen food)	**19**							0%
2.1 เนื้อหมู	10	10/10	-	-	-	-	-	
2.2 เนื้อไก่	8	-	-	8/8	-	-	-	
2.3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่	1	1/1	-	1/1	-	-	-	
3. อาหารจากร้านอาหาร (Street food)	**27**							33.33%
3.1 เนื้อหมู	15	15/15	-	*9/15*	-	-	-	
3.2 เนื้อไก่	12	-	-	12/12	-	-	-	
4. อาหารฮาลาล (Halal food)	**38**							18.42%
4.1 เนื้อไก่	30*	-	-	29/30	-	-	-	
4.2 เนื้อวัว	8*	-	*2/8*	*5/8*	-	-	1/8	

หมายเหตุ * หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ตัวเอียงสีแดง หมายถึง ตัวอย่างที่มีการปลอมปน

บทที่ 5

การอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาชุดทดสอบสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ในอาหารได้สำเร็จ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดความสำเร็จในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ 1. ขนาดของตัวอย่างชิ้นเนื้อมีความเหมาะสม 2. กระบวนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้ PBS buffer ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 3.การใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 4.การเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) 5.มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

ขนาดของตัวอย่างชิ้นเนื้อมีความเหมาะสม

ขนาดของตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ มีผลต่อประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ชิ้นเนื้อตัวอย่างขนาดประมาณ 1×1 ตารางมิลลิเมตร (mm^2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kitpipit และคณะ ในปี พ.ศ.2557 (33) ที่พบว่าขนาดของชิ้นเนื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ มีขนาดประมาณ 1×1 ตารางมิลลิเมตร (mm^2) โดยมีอัตราความสำเร็จ (Success rate) ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อสัตว์สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (33, 37) และพบว่าในกรณีที่ใช้ชิ้นเนื้อขนาดใหญ่เกินไป อาจทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) มากเกินไป อาจส่งผลให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่ใช้เป้าหมาย (Non-specific binding) ได้ (22, 38) นอกจากนี้การใช้ชิ้นเนื้อขนาดใหญ่ทำให้ปริมาณตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) มีมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลดลง ทำให้ได้ปริมาณผลผลิต (Yield) น้อยกว่าที่ควรจะเป็น หรือยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปอย่างสิ้นเชิง (22) ในทาง

กลับกันหากใช้ขนาดชิ้นเนื้อที่เล็กเกินไป จะทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ มีน้อยเกินไป เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้ปริมาณผลผลิตน้อยจนอาจไม่สามารถตรวจเช็คผลโดยวิธีการแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านไฟฟ้าบนเจลอะกาโรส (Electrophoresis) ได้

กระบวนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้ PBS buffer ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

กระบวนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเร็คพีซีอาร์ ซึ่งทำได้โดยตัดชิ้นเนื้อสัตว์ตัวอย่างให้มีขนาดเล็กประมาณ 1×1 มิลลิเมตร แล้วใส่ลงไปใน PBS Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่ง PBS buffer จะช่วยเจือจางตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR Inhibitor) จากตัวอย่างเนื้อสัตว์ (39) ทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินต่อไปได้ อีกทั้ง PBS buffer ยังช่วยในการเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ให้มีปริมาณอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ นอกจากนี้หลังจากเตรียมตัวอย่างด้วย PBS จะนำตัวอย่างไปบ่ม (Incubation) ที่อุณหภูมิสูงถึง 98°C ซึ่งอาจช่วยทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) ทำให้ปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ดีขึ้น และยับยั้งเอ็นไซม์ที่จะทำลายนิวเคลียสให้ไม่ทำงาน (Inactivate nuclease) เช่น เอ็นไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) เป็นต้น (40)

การใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การใช้ชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermoscientific, Germany) เป็นปัจจัยหนึ่งที่เอื้อต่อการประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) เนื่องจากชุดน้ำยาดังกล่าวประกอบไปด้วยโพลีเมอร์เรสรูปแบบใหม่ (Novel polymerase) ที่ได้รับการพัฒนาให้ทนทานต่อตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Inhibitor) จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเป้าหมายแม้จะมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Inhibitor) อยู่ด้วยก็ตาม ทำให้ได้ปริมาณของผลผลิต (Yield) หรือดีเอ็นเอ (PCR product) สูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kitpipit *et al* ในปี ค.ศ.2014 พบว่าดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ของชุดน้ำยา Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) ให้อัตราการประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์สูงถึง 95% เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA

Polymerase) ของชุดน้ำยา Q5 DNA polymerase (NEB, USA) ชุดน้ำยา *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) ชุดน้ำยา TopTaq DNA polymerase (Qiagen, USA) ชุดน้ำยา Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) และชุดน้ำยา Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) ซึ่งให้อัตราการประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์เป็น 89.2% 85% 5% 0% และ 0% ตามลำดับ (33) นอกจากนี้ใน PCR buffer ยังประกอบไปด้วยสารบางอย่าง เช่น Bovine serum albumin (BSA) และ Tween-20 ซึ่งการเติมสารเหล่านี้ลงไปจะช่วยทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูงขึ้น แม้จะมีตัวรบกวนปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) อยู่ด้วยก็ตาม นอกจากนี้ตัวรบกวนปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) จะถูกเจือจางในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (33, 41, 42)

การเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

ไพรเมอร์ (Primer) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เอื้อต่อการประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดทดสอบนี้ โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงทั้ง 6 คู่ได้ผ่านการตรวจสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นโดยใช้โปรแกรมต่างๆ เช่น โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basic.northwestern. edu/biotools/OligoCalc. html) เพื่อตรวจสอบความยาวของไพรเมอร์ (Length) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weigth) ปริมาณเบสของ G และ C (CG content) อุณหภูมิ (Melting temperature; Tm) และยังสามารถตรวจสอบโอกาสในการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (Self-complementarity) อันได้แก่ การฟอร์มแฮฟิน (Potential hairpin formation) การจับคู่เบสผิดทางปลาย 3' (3' Complementarity) เป็นต้น ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมในการพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (http://www. thermoscientificbio.com/webtools/tmc/)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ถูกออกแบบจากยีนไซโทโครมบี (Cyt *b*) ไซโตโครมออกซิเดส 1 (COI) และ 12 เอส ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (12s rRNA) ซึ่งอยู่บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ซึ่งมีคุณสมบัติที่เอื้อต่อการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์เบสสูงระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน และมีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์เบสระหว่างสัตว์ชนิดเดียวกันเล็กน้อย (25, 33) ทำให้สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของเนื้อสัตว์ได้อย่างน่าเชื่อถือ อีกทั้งไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกออกแบบให้ไพรเมอร์ทั้งหมดมีความยาวประมาณ 22-34 คู่เบส ซึ่งการเลือกใช้ไพรเมอร์ในช่วงความยาวที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมให้

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีความจำเพาะเจาะจง ลดโอกาสในการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบผิดตำแหน่ง (Mismatch) หากไพรเมอร์ยาวเกินไปอาจเกิดการไฮบริไดเซชันข้ามระหว่างยีนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน (Cross-hybridized) กับไพรเมอร์อื่นๆ และอาจเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Non-specific) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และหากไพรเมอร์สั้นเกินไป จะทำให้ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์นี้ลดน้อยลง ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่เป็นที่น่าเชื่อถือ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมดออกแบบให้มีอุณหภูมิ Melting temperature (Tm) ที่ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 64-69ºC ทั้งนี้เพื่อให้ไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ในชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ทั้ง 6 ชนิดในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว

การศึกษานี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR product) ขนาดต่างกันจากสัตว์ต่างชนิด โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีขนาด 100 119 133 155 253 และ 311 คู่เบส สำหรับเนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ตามลำดับ ทำให้สามารถระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ โดยการนำดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกแถบดีเอ็นเอโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนเจลอะกาโรส (Electrophoresis) ได้

อีกทั้งได้ออกแบบให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product size) ทั้งหมดอยู่ในช่วง 100-311 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เล็กมาก จึงช่วยเพิ่มโอกาสที่จะได้รับผลการตรวจวัดโดยเฉพาะในอาหารที่มีปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์หลงเหลืออยู่น้อย ทั้งในตัวอย่างเนื้อดิบ เนื้อปรุงสุก หรือแม้แต่ในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อนสูง ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอของตัวอย่างเสียสภาพไป นอกจากนี้การเลือกใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเนื้อหมูที่มีขนาดเล็กเพียง 100 คู่เบส ช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจพบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในอาหารแม้มีเพียงปริมาณน้อยๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปใช้ตรวจสอบกับผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Ali M. E. และคณะ (43, 44) ที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดที่น้อยกว่า 150 คู่เบส จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จในอัตราที่สูง แม้จะใช้กับตัวอย่างที่ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพแล้วก็ตาม

มาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

จากผลการศึกษาการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (PCR Product) สำหรับตัวควบคุมให้ผลลบ (Negative controls) เป็นการยืนยันถึงมาตรฐานของห้องปฏิบัติการว่า PCR reagent ที่ใช้สะอาดปราศจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ รวมไปถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดทดลองขนาดเล็ก และไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) เป็นต้น ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะนำมาใช้งาน ซึ่งเป็นวิธีการฆ่าเชื้อโรคที่เป็นมาตรฐานที่ใช้กันโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ทำให้สามารถทำลายได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมไปถึงดีเอ็นเอแปลกปลอมต่างๆ และในขั้นตอนการเตรียมพีซีอาร์มาสเตอร์มิกซ์ (PCR master mix) จะเตรียมภายในตู้ปฏิบัติงานพีซีอาร์ (PCR cabinet) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในอากาศ นอกจากนี้บริเวณพื้นผิวของโต๊ะ และอุปกรณ์ต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการจะต้องเช็ดทำความสะอาดทั้งก่อนและหลังการใช้งาน โดยใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Ethanol) เนื่องจากระเหยได้ช้ากว่าเมื่อเทียบกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol) เพื่อให้มีฤทธิ์ในการสัมผัสกับเชื้อได้นานขึ้น ทำให้ฆ่าเชื้อได้ดีกว่า เนื่องจากเอทานอลมีฤทธิ์ละลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างเป็นฟอสโฟลิพิด ไบเลเยอร์ (Phospholipid bilayer) จึงทำให้เซลล์แตก ส่งผลให้เชื้อโรคเหล่านั้นตายลง อีกทั้งเมื่อเอทานอลผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียจะทำให้สภาพขั้วของตัวทำละลายภายในเซลล์เปลี่ยนไป กล่าวคือโมเลกุลน้ำจะจับกับแอลกอฮอล์มีผลให้สภาพขั้วภายในเซลล์ลดลง ซึ่งจากเดิมโปรตีนภายในเซลล์ที่เคยละลายน้ำได้ดี เปลี่ยนไปเป็นละลายไม่ได้ ทำให้โปรตีนเสียสภาพไป ซึ่งส่งผลให้โปรตีนเหล่านั้นไม่ทำงาน และทำให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตายลงในที่สุด (45) และสุดท้ายการแต่งกายของผู้ปฏิบัติการได้แต่งกายตามมาตรฐานของการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด อาทิเช่น การสวมผ้าปิดปากและจมูก (Mask) เพื่อป้องกันการกระจายของลมหายใจซึ่งอาจมีดีเอ็นเอ หรือเชื้อโรคต่างๆปะปนอยู่ การสวมเสื้อกาวน์ตัวยาวและแขนยาว และการสวมถุงมือยาง เพื่อป้องกันการสัมผัสโดยตรงระหว่างตัวผู้ปฏิบัติการกับอุปกรณ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากในทุกๆครั้งที่มีการสัมผัสหมายถึงการส่งผ่านดีเอ็นเอไปยังผิวสัมผัสนั้นๆ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นต้น

วิเคราะห์ผลการศึกษาเรื่องการทวนสอบการใช้งานจริงของชุดทดสอบ (Assay validation)

การทวนสอบการใช้งานจริงของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกการทดสอบทดสอบเป็น 3 รูปแบบ คือ การทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) และการทดสอบกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด (Market/Street sample test) เพื่อยืนยันว่าชุดทดสอบดังกล่าวสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงกับสัตว์เป้าหมาย และสามารถใช้ทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาดได้จริง โดยการทดลองดังกล่าวเป็นไปตามมาตรฐานงานทางนิติวิทยาศาสตร์สากล

สำหรับการทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) โดยการนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นตรวจสอบตัวอย่างเนื้อดิบที่เป็นเนื้อสัตว์เป้าหมายจำนวน 6 ชนิด ที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ เป็นจำนวนทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิดทั้ง 19 ตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง และให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) จากสัตว์เป้าหมายทุกชนิดตามที่คาดหวัง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำไปใช้ได้จริงอย่างน่าเชื่อถือ

สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) โดยการนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้นตรวจสอบตัวอย่างทั้งหมด 20 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วยสัตว์เป้าหมายจำนวน 6 ชนิด และสัตว์อื่นๆที่อาจนำมาประกอบอาหารท้องถิ่น รวมไปถึงสัตว์ป่าจำนวน 14 ชนิด ผลที่ได้พบว่าชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิดเท่านั้น และให้ขนาดดีเอ็นเอ (PCR product) จากสัตว์เป้าหมายทุกชนิดตามที่คาดหวัง ในขณะที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่เนื้อสัตว์เป้าหมาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมาย กล่าวคือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะในตัวอย่างเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิดเท่านั้น ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในแง่ของการนำไปใช้ทดสอบกับตัวอย่างเนื้อที่ไม่ทราบชนิด (Unknown) เพราะสามารถมั่นใจได้ว่าผลที่ได้มาจากเนื้อเป้าหมายเท่านั้น และจะไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์อื่นๆ

สำหรับการทดสอบกับตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด (Market/Street sample test) โดยการนำชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้นตรวจสอบตัวอย่างอาหารตามท้องตลาด ผลที่ได้พบว่าชุดทดสอบดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะในตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์เป้าหมาย 6 ชนิด ซึ่งคิดเป็นอัตราความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างสูงถึง 96.04 เปอร์เซ็นต์ โดยตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มี 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเนื้อวัวในเกาเหลาเนื้อเปื่อย จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างโรตีมะตะบะไก่ จำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างลูกชิ้น จำนวน 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากในกรณีของตัวอย่างลูกชิ้นซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ อาจจะเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตนั้นนิยมผสมแป้งปริมาณมากในลูกชิ้นเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนการผลิตของผู้ประกอบการ ทำให้ปริมาณเนื้อสัตว์มีปริมาณน้อยมาก จึงมีผลให้โอกาสในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์ในตัวอย่างดังกล่าวลดน้อยลงไปด้วยเช่นกัน ส่วนกรณีที่ตัวอย่างเนื้อวัวในเกาเหลาเนื้อเปื่อย และตัวอย่างโรตีมะตะบะไก่ซึ่งไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ อาจเนื่องมาจากเครื่องเทศ หรือเครื่องปรุงในอาหารดังกล่าวเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibitor) ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์เป้าหมายได้

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายในอาหารได้จริง รวมไปถึงสามารถใช้ได้กับอาหารทุกประเภท ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการบังคับใช้กฎหมายเพื่อคุ้มครองสิทธิผู้บริโภค โดยตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน หรือการปลอมปน และการติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริงในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ รวมไปถึงอาหารปรุงสุกซึ่งวางจำหน่ายอยู่ตามร้านอาหารทั่วไป

ข้อดีและข้อเสียของชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ที่พัฒนาขึ้น

ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาในการศึกษาครั้งนี้ สามารถระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้ถึง 6 ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ภายในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว ซึ่งได้เปรียบกว่าวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ (Singleplex PCR) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้เพียง 1 ชนิดต่อการทำปฏิกิริยา 1 ครั้ง ทำให้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อได้เปรียบกว่าในด้านของการประหยัดเวลา และสารเคมี อีกทั้งชุดทดสอบดังกล่าวเป็นวิธีที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ใช้ระยะเวลาไม่เกิน 90 นาที ซึ่งเป็นประหยัดเวลาเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมซึ่งจะเสียเวลาไปกับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบว่าขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีผลทำให้สูญเสียดีเอ็นเอจากตัวอย่าง กล่าวคือเมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอดสร็จสิ้น จะได้ดีเอ็นเอกลับคืนมาเพียงร้อยละ 16-30 ของดีเอ็นเอทั้งหมด (15-17) ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์จึงได้เปรียบอย่างยิ่งในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยๆ เนื่องจากวิธีนี้ต้องการตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย ประมาณ 0.3-1.0 ตารางมิลลิเมตร ก็เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวกประหยัดค่าใช้จ่ายทั้งในด้านสารเคมี และเครื่องมือต่างๆ

อย่างไรก็ตามชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาในการศึกษาครั้งนี้ มีข้อจำกัด 2 ประการ ประการแรก คือ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) วิธีนี้ไม่สามารถบอกข้อมูลในเชิงปริมาณได้ (46, 47) แต่อย่างไรก็ตามการบอกปริมาณในวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) จะสามารถบอกได้เมื่อมีวัตถุดิบอ้างอิงที่เหมาะสมเท่านั้น อีกทั้งส่วนประกอบในอาหารอาจส่งผลรบกวนกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR) ได้ ซึ่งจะส่งผลรบกวนต่อปริมาณที่วัดได้ (46, 48, 49) ประการที่สอง คือ ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และความไวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสัตว์ทั้ง 6 ชนิด ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ไม่เท่ากัน ซึ่งเป็นปัญหาที่ต้องพบในวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ทุกชนิด (43, 46)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้สามารถพัฒนาชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ (Multiplex direct PCR) ได้สำเร็จ มีประโยชน์ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายถึง 6 ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู (*Sus scrofa*) เนื้อแกะ (*Ovis aries*) เนื้อไก่ (*Gallus gallus*) เนื้อนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เนื้อม้า (*Equus ferus caballus*) และเนื้อวัว (*Bos taurus*) ภายในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยสัตว์ที่เลือกมาทั้ง 6 ชนิด เป็นสัตว์ที่นิยมบริโภคกันโดยทั่วไปจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เนื้อแกะ เนื้อไก่ เนื้อนกกระจอกเทศ และเนื้อวัว และเป็นสัตว์ต้องห้ามทางศาสนาจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เนื้อหมู และเนื้อม้า และชุดทดสอบดังกล่าวเป็นวิธีที่ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอทำให้ใช้ระยะเวลาไม่เกิน 90 นาที ซึ่งเป็นประหยัดเวลา และไม่มีการสูญเสียดีเอ็นเอไปเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม ซึ่งจะเสียเวลาไปกับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่ายในด้านสารเคมี อีกทั้งวิธีนี้ต้องการตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อย ประมาณ 0.3-1.0 ตารางมิลลิเมตร ก็เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

นับเป็นครั้งแรกในการประยุกต์ใช้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ สำหรับการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร สามารถตรวจสอบได้ทั้งในอาหารที่เป็นเนื้อดิบ เนื้อปรุงสุก หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อนสูง ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยหน่วยงานที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตรวจสอบอาหารได้ทั่วโลก เช่น สถาบันรับรองระบบการผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตร (Institute of Certified Agricultural Production System : ICAPS) ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อรับรองมาตรฐานสินค้าทางการเกษตร อาทิเช่น การผลิตพืชผักผลไม้ สินค้าจำพวกสัตว์น้ำ รวมถึงสินค้าจำพวกปศุสัตว์ โดยภาครัฐได้กำหนดให้เกษตรกร ผู้ผลิต หรือผู้ประกอบการปฏิบัติตามมาตรฐานการผลิตและแปรรูป และสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ (Institute of Product Quality and Standardization: IQS) ซึ่งเป็นองค์กรในกำกับของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารและสินค้าเกษตรให้เป็นไปตาม

นโยบายอาหารปลอดภัย รวมไปถึงการส่งเสริมครัวไทยเป็นครัวของโลก โดยมีหน้าที่หลายด้าน เช่น ตรวจสอบสารตกค้างยาฆ่าแมลงในผัก ผลไม้ และสินค้าเกษตร สารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ วัตถุเจือปนอาหาร บริการตรวจสอบวิเคราะห์อาหาร และคุณภาพน้ำ เป็นต้น นอกจากนี้ชุดทดสอบหลายตำแหน่งแบบไดเร็คพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังมีประโยชน์อย่างยิ่งในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล โดยจะต้องไม่พบการปนเปื้อนหรือการปลอมปนดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ซึ่งเป็นข้อห้ามในบทบัญญัติทางศาสนาอิสลาม เช่น เนื้อหมู และเนื้อม้า เป็นต้น

วิธีนี้ได้รับการทวนสอบการใช้ชุดทดสอบจริงตามมาตรฐานแนะนำ ได้แก่ การทดสอบโดยการทำซ้ำ (Reproducibility test) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) และการทดสอบกับตัวอย่างตามท้องตลาด (Market/Street sample test) ซึ่งทำให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าเชื่อถือ เหมาะสำหรับการบังคับใช้ทางกฎหมาย เพื่อใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อน การปลอมปน หรือการติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริงในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ 100 เปอร์เซ็นต์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อสัตว์เป้าหมายสูง และสามารถใช้ในการระบุชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารได้จริง จึงเป็นวิธีที่เหมาะกับงานตรวจประจำวันในห้องปฏิบัติการ เพื่อทดสอบการปลอมปน หรือการติดฉลากไม่ตรงกับความเป็นจริงของอาหารตามท้องตลาด ซึ่งนอกจากวิธีนี้ต้องการตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อย ในการศึกษาครั้งนี้ยังเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดเล็ก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเพิ่มโอกาสสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของเนื้อสัตว์เป้าหมายในกรณีที่ชิ้นเนื้อได้ผ่านกระบวนการปรุงสุก หรือผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อนสูงที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพไป และยังเป็นประโยชน์สำหรับในกรณีที่อาหารมีการปนเปื้อนหรือการปลอมปนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์อื่นในปริมาณเล็กน้อย เช่น การปลอมปนเนื้อม้าในเบอร์เกอร์ที่ฉลากระบุว่าเป็นเนื้อวัว หรือการปนเปื้อนเนื้อหมูในอาหารฮาลาล เป็นต้น ซึ่งเป็นการกระทำที่ผิดต่อหลักศาสนา และมีผลต่อกระบวนการทางกฎหมายในด้านการคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภค (21)

บรรณานุกรม

1. Ali ME, Kashif M, Uddin K, Hashim U, Mustafa S, Che Man Y. Species Authentication Methods in Foods and Feeds: the Present, Past, and Future of Halal Forensics. Food Anal Methods. 2012 2012/10/01;5(5):935-55. English.

2. Farouk A-E, Batcha MF, Greiner R, Salleh HM, Salleh MR, Sirajudin AR. The use of a molecular technique for the detection of porcine ingredients in the Malaysian food market. Saudi medical journal. 2006;27(9):1397-400.

3. เทสโก้ อังกฤษขอโทษหลังตรวจพบมีการใช้เนื้อม้าผสมในเบอร์เกอร์เนื้อ. (กรุงเทพธุรกิจออนไลน์). สืบค้นได้จาก http://www.food4change.in.th/ariticle/news-launcher/bad-news/621-2013-01-31-08-11-11.html. วันที่ 16 มกราคม 2556.

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

5. Zha D-M, Xing X-M, Yang F-H. Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay. Food Chemistry. 2011;129(4):1904-8.

6. Zha D, Xing X, Yang F. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. Food Control. 2010;21(10):1402-7.

7. Dincer B, Spearow JL, Cassens RG, Greaser ML. The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. Meat Science. 1987;20(4):253-65.

8. Jones SJ, Patterson RL. Double-antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. Meat science. 1985;15(1):1-13.

9. Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T, Kato S. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. Meat Science. 1990;27(2):119-28.

10. Ebbehøj KF, Thomsen PD. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. Meat science. 1991;30(4):359-66.

11. Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE, Martín R. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. Journal of Food Protection®. 2004;67(1):172-7.

12. Aida A, Che Man Y, Wong C, Raha A, Son R. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. Meat science. 2005;69(1):47-52.

13. Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat science. 2007;77(4):649-53.

14. Doosti A, Arshi A, Vatankhah M, Amjadi P. Kappa-casein gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). African Journal of Biotechnology. 2013;10(25):4957-60.

15. Kishore R, Reef Hardy W, Anderson VJ, Sanchez NA, Buoncristiani MR. Optimization of DNA Extraction from Low‐Yield and Degraded Samples Using the BioRobot® EZ1 and BioRobot® M48. Journal of forensic sciences. 2006;51(5):1055-61.

16. Colussi A, Viegas M, Beltramo J, Lojo M. Efficiency of DNA IQ System< sup>®</sup> in recovering semen DNA from cotton swabs. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2009;2(1):87-8.

17. Swaran YC, Welch L. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. Forensic Science International: Genetics. 2012;6(3):407-12.

18. Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Linacre A, Lapwong Y, Chotigeat W. Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4(1):e71-e2.

19. พรเพ็ญ ชาติกุล. 2548. ผลิตภัณฑ์สัตว์ รหัส 2501- 2302. คณะวิชาอุตสาหกรรมเกษตร วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีพัทลุง กรมอาชีวศึกษา. 80 หน้า. (เอกสารประกอบการสอน)

20. ละอองวรรณ ศรีจันทร์. 2537. เนื้อและผลิตภัณฑ์. นครศรีธรรมราช : สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. 239 หน้า. (เอกสารประกอบการสอน)

21. Mcpherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A,Wallis J. A physical map of the human genome. Nature 2001; 409(6822): 934-941

22. Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers: Academic Press; 2005.

23. Salehi, T. Zahraei, M. Mahzounieh, and A. Saeedzadeh. รายงานวิชการเสนอ. International Journal of Poultry Science 4.5 (2005): 320-322.

24. สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร, ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. (2546). เวชศาสตร์โมเลกุล. (บรรณาธิการ. พิมพลักษณ์), หน้า 3-44. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

25. ฐิติกา กิจพิพิธ. 2556. ความรู้เบื้องต้นทางนิติชีววิทยา การตรวจพิสูจน์สารคัดหลั่งของมนุษย์ นิติพันธุศาสตร์ การตรวจพิสูจน์เส้นขนและเส้นผม นิติมนุษย์วิทยา นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า. หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวินยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 138 หน้า. (เอกสารประกอบการสอน)

26. Meyer R, Candrian U, Lüthy J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. Journal of AOAC International. 1993;77(3):617-22.

27. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat science. 1999;51(2):143-8.

28. López-Calleja IM, González I, Fajardo V, Hernández PE, García T, Martín R. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International dairy journal. 2007;17(1):87-93.

29. Yin R, Bai W, Wang J, Wu C, Dou Q, Yin R, et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. Meat science. 2009;83(1):38-44.

30. Murugaiah C, Noor ZM, Mastakim M, Bilung LM, Selamat J, Radu S. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. Meat science. 2009;83(1):57-61.

31. Ghovvati S, Nassiri M, Mirhoseini S, Moussavi AH, Javadmanesh A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control. 2009;20(8):696-9.

32. Ali ME, Hashim U, Dhahi TS, Mustafa S, Man YBC, Latif MA. Analysis of pork adulteration in commercial burgers targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. Food Anal Methods. 2012;5(4):784-94.

33. Kitpipit T, Chotigeat W, Linacre A, Thanakiatkrai P. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. Forensic science, medicine, and pathology. 2014;10(1):29-38.

34. Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. Analytical biochemistry. 2005 Apr 1;339(1):73-82. PubMed PMID: 15766713.

35. 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(9):1149-58.

36. Rojas M, González I, Pavón MÁ, Pegels N, Hernández PE, García T, et al. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (Struthio camelus) mislabelling in meat products from the retail market. Food Control. 2011;22(3-4):523-31.

37. Kitpipit T, Thanakiatkrai P, Chotigeat W. Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4(1):e364-e5.

38. Pangallo D, Chovanova K, Makova A. Identification of animal skin of historical parchments by polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Journal of Archaeological Science. 2010;37(6):1202-6.

39. Weissensteiner T, Nolan T, Bustin SA, Griffin HG, Griffin A. PCR technology: current innovations: CRC press; 2003.

40. Hasap L, Thanakiatkrai P, Singkhamanan K, Linacre A, Kitpipit T. Multiplex-direct PCR assay for foodborne pathogen identification: An application in forensic investigation. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4(1):e103-e4.

41. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry. 2014 11/15/;163(0):77-82.

42. Hedman J, Nordgaard A, Dufva C, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis. Analytical biochemistry. 2010;405(2):192-200.

43. Ali ME, Kashif M, Uddin K, Hashim U, Mustafa S, Man YBC. Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. Food Anal Methods. 2012;5(5):935-55.

44. Ali ME, Hashim U, Mustafa S, Man YBC. Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. Food Anal Methods. 2012;5(3):613-23.

45. สมพร ตั๊นสกุล. 2554. เทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ (Microbial Biotechnology) หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 91 หน้า. (เอกสารประกอบการสอน)

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

47. Köppel R, Ruf J, Rentsch J. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. European Food Research and Technology. 2011;232(1):151-5.

48. Köppel R, Ruf J, Zimmerli F, Breitenmoser A. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. European Food Research and Technology. 2008;227(4):1199-203.

49. Köppel R, Zimmerli F, Breitenmoser A. Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. European Food Research and Technology. 2009;230(1):125-33.

ภาคผนวก

Food Chemistry 163 (2014) 77–82

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products

Thitika Kitpipit, Kuangtiwa Sittichan, Phuvadol Thanakiatkrai *

Forensic Science Program, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 December 2013
Received in revised form 2 April 2014
Accepted 13 April 2014
Available online 24 April 2014

Keywords:
Multiplex PCR
Direct PCR
Meat species
Identification
Validation

ABSTRACT

This is the first time that direct PCR – DNA amplification without prior DNA extraction – was successfully developed and fully validated for rapid and economical simultaneous identification of six commonly consumed meat species. To achieve this, six species-specific primers were selected from previous reports and newly designed from the mitochondrial cytochrome *b* (cyt *b*), cytochrome oxidase I (COI), and 12s rRNA gene. The assay generated PCR products of 100, 119, 133, 155, 253, and 311 bp for pork, lamb/mutton, chicken, ostrich meat, horsemeat and beef, respectively. Validation showed that the assay is robust, rapid, economical, reproducible, specific, and sensitive down to 12,500 mitochondrial copy (equating to seven fg). It could be used with a variety of raw meats and products, including highly degraded and processed food samples. This proposed method will be greatly beneficial to the consumers, food industry, and law enforcement.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Unlisted, mislabeled, or fraudulent ingredients in food products is a serious problem and impacts humans in several ways. Several manufacturers have exploited consumers by adding or substituting ingredients in food products for cheaper ones to earn more profits (Moore, Spink, & Lipp, 2012). Certain ingredients in high demand could boost the sales of food products, and this serves as an incentive for mislabeling, as evidenced in the case of crocodile meat (Unajak et al., 2011). These occurrences negatively impact the health and safety of the consumers and the economy, as well as breach religious laws. Both national and international regulations are therefore issued to protect consumer rights; thus, a reliable technique for meat identification is needed by regulatory agencies.

There are a multitude of options available for species identification in raw meats and food products: proteins, lipid, volatile organic compounds, and DNA analyses (Ali et al., 2012). Among these, DNA-based techniques are reliable, robust, and rapid. High variations in nucleotide compositions between individuals and species enable differentiation and DNA withstands environmental degradation better than the other compounds (Che Man, Aida, Raha, & Son, 2007; Che Man, Mustafa, Khairil Mokhtar, Nordin, & Sazili, 2012; Rojas et al., 2010). Both nuclear and mitochondrial DNA have been used, for example, the nuclear DNA's porcine leptin gene, bovine beta-actin gene, turkey prolactin receptor (Köppel, Ruf, & Rentsch, 2010; Köppel, Ruf, Zimmerli, & Breitenmoser, 2008; Köppel, Zimmerli, & Breitenmoser, 2009), and the mitochondrial D-loop region, cytochrome *b*, cytochrome oxidase subunit I (COI), 16s rRNA, 12s rRNA, and NADH dehydrogenase subunit 5/6 genes (Ali, Hashim, Mustafa, & Che Man, 2011; Branicki, Kupiec, & Pawlowski, 2003; Che Man et al., 2007, 2012; Dalmasso et al., 2004; Fajardo, Gonzalez, Rojas, Garcia, & Martin, 2010; Unajak et al., 2011). These markers are used with several techniques, such as species-specific amplification (Linacre, 2006, 2009), real-time PCR (Köppel et al., 2008, 2009, 2010; Rojas et al., 2010), PCR–RFLP (Ali et al., 2011; Murugaiah et al., 2009), and sequencing (Ali et al., 2012). However, these methods are complicated and required purification of DNA from food products. DNA degradation from acidity regulation and heating process, as well as trace contamination, can also prevent successful detection (Köppel et al., 2008, 2009).

Direct PCR, the amplification of DNA directly from samples with no prior DNA extraction, was first proposed in the 1990s (Mercier, Gaucher, Feugeas, & Mazurier, 1990; Tjhie et al., 1994). With improved polymerase enzymes and PCR buffer in recent years (Hedman, Nordgaard, Rasmusson, Ansell, & Radstrom, 2009; Hedman et al., 2010, 2011; Kermekchiev, Kirilova, Vail, & Barnes, 2009; Zhang, Kermekchiev, & Barnes, 2010), direct PCR has been touted as a sensitive and robust technique, as well as a time-saver. Direct PCR possesses several advantages. First, it is rapid as the extraction and quantification step are bypassed. Second, it is more

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 565; fax: +66 74 446 681.
E-mail addresses: pthanakiatkrai@gmail.com, phuvadol.t@psu.ac.th (P. Thanakiatkrai).

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.062
0308-8146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

sensitive than conventional PCR (Linacre, Pekarek, Swaran, & Tobe, 2010; Swaran & Welch, 2012), as the process of DNA extraction has very low efficiency (16–30%) (Colussi, Viegas, Beltramo, & Lojo, 2009; Kishore, Reef Hardy, Anderson, Sanchez, & Buoncristiani, 2006). Lastly, it improves DNA analysis results from several types of biological sample, including trace, degraded, aged, and difficult samples (Kitpipit, Chotigeat, Linacre, & Thanakiatkrai, 2014; Linacre et al., 2010; Park, Kim, Yang, & Lee, 2008; Swaran & Welch, 2012). Diluting the samples in phosphate-buffered saline (PBS) increases the amplification success rate for various sample types (Kitpipit, Thanakiatkrai, & Chotigeat, 2013b; Kitpipit et al., 2014). This dilution protocol has been used in a recently published direct-triplex PCR assay for pork, lamb, and chicken and it has been shown to overcome inhibitors found in food products (Kitpipit, Sittichan, & Thanakiatkrai, 2013a); however, a larger multiplex that includes other commonly consumed meat, including another *haram* meat (horsemeat), will shorten and simplify the source identification process, as well as brings additional benefit the halal food industry.

Thus, the aim of the study was to develop a direct-hexaplex PCR assay for simultaneous identification of six commonly consumed meats (pork, lamb/mutton, chicken, ostrich meat, horsemeat, and beef). Using the dilution protocol for sample preparation, the assay was then fully validated for its specificity, reproducibility, sensitivity, and robustness.

2. Materials and methods

2.1. Meat samples

Raw meats of six species (pork – *Sus scrofa*, lamb/mutton – *Ovis aries*, chicken – *Gallus gallus*, ostrich meat – *Struthio camelus*, horsemeat – *Equus ferus caballus*, and beef – *Bos indicus*) commonly consumed worldwide were collected from morphological-verified samples and used. One hundred and fifteen food products, including raw frozen meats, cold cuts, instant frozen foods, street foods, and halal-certified foods were collected from local retailers and markets in five provinces (Songkhla, Pattalung, Krabi, Yala, and Pattani) of Southern Thailand. All samples were cut into small pieces using a sterile scalpel, kept in a sterile plastic bag, and stored at −20 °C to prevent DNA degradation.

2.2. Primer design

Cytochrome oxidase I subunit (COI) gene sequences of six target species and other nine possible meat species were downloaded from GenBank and aligned. Species-specific primers previously reported were checked for their specificity and new primers were also designed. The GenBank accession numbers for these sequences were AF034253.1, AF492350.1, AF492351.1, CK203026.1, CK203028.1, EF588275.2, EU755253.1, GU068049.1, HQ857210.1, HQ857212.1, JQ996232.1, KC461238.1, NC_001700.1, NC_002785.1, NC_005044.2, NC_005129.2, NC_006295.1, NC_009684.1, NC_014703.1, NC_015647.1, NC_015651.1, NC_016178.1, NC_018596.1, NC_020615.1, NC_020622.1, NC_020683.1, NC_011218.2, NC_012095.1, U20753.1, and Y12025.1.

Candidate primers were checked for their physical parameters – melting temperature, self-complementarity, and secondary structures – using Oligo Calc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html). Primers cross-reactivity was also inspected using AutoDimer (http://www.cstl.nist.gov/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm). Details of primers used in this study are shown in Table 1.

2.3. Direct multiplex amplification

All samples were prepared and amplified by the dilution protocol of direct PCR technique (Kitpipit et al., 2014): approximately 1 mm^2 punch of sample (from the inside of the specimen) was added to 20 μL of phosphate-buffered saline (PBS) and heated at 98 °C for 2 min. The mixed meat sample was prepared by pooling 1.5 μL of each meat pre-PCR dilution sample.

The PCRs were performed in a total volume of 20 μL, containing 10 μL Phire® Animal Tissue PCR Buffer (Thermo Scientific, Thailand), 1.0 unit Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Thailand), optimized concentrations of six primer pairs (Table 1), 1.5 μL supernatant of pre-PCR dilution samples (in PBS), and sterile water. Amplifications were performed using a T100™ Bio-Rad thermal cycler with the following PCR condition: initial denaturation at 98 °C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 98 °C for 5 s, annealing at 66 °C for 5 s, and extension at 72 °C for 25 s; and a final extension at 72 °C for 1 min. The reactions were stored at 4 °C until further analysis. A negative control was included with all sets of reactions to monitor for contamination.

2.4. DNA separation and detection

The PCR products were separated on a 2% low melting point gel electrophoresis. PCR products were stained using ethidium bromide and electrophoresis was run at 100 V for 30 min. The gels were visualized and photographed in a Bio-rad GelDoc 1000 gel documentation system (Bio-rad, USA).

2.5. Direct multiplex assay validation

The direct multiplex assay developed in this study was validated for its specificity, reproducibility, sensitivity, and robustness (food product testing). For the specificity test, the assay was cross-tested with all six target species and 13 possible domestic and wildlife meat species consumed in Asia: crocodile (*Crocodylus siamensis*), duck (*Anas platyrhynchos*), deer (*Cervidae* spp.), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), goose (*Anser domesticus*), buffalo (*Bubalus bubalis*), cat (*Felis catus*), dog (*Canis lupus familiaris*), muntjac (*Muntiacus muntjak*), elephant (*Elephas maximus*), tiger (*Panthera tigris*), bear (*Ursus malayanus*) and human (*Homo sapiens*). For the reproducibility test, 19 voucher target meat samples from different sources (five pork samples, two lamb/mutton samples, five chicken samples, two ostrich meat samples, two horsemeat samples and three beef samples) were tested with the assay. For the sensitivity test, quantified mitochondrial copies of the six target species were prepared following the method of Tobe and Linacre (2008). Five concentrations (100,000, 50,000, 25,000, 12,500, and 6250 mitochondrial copies/μL) were prepared by serial dilution and amplified by the assay to determine the minimum mitochondrial copy that can be detected. For robustness and real-world performance testing, the developed assay was used to test 115 food products, including 20 raw frozen meats, 17 cold cuts, 13 instant frozen foods, 27 street foods, and 38 halal-certified foods.

3. Results

3.1. The direct multiplex assay development

3.1.1. Singleplex amplification

The direct singleplex amplifications of all six species-specific primers used in this study were first performed using voucher meat samples. This was done to test the primers' efficiency and specificity and to evaluate the possibility of applying direct PCR for meat authentication. The result showed that direct PCR was

Table 1
Details of primer sequence, melting temperature, PCR product size, and reference are shown.

Meat species	Primer name	Sequences (5′–3′)	Gene	Final conc. (μM)	Product size	References
Pork	Sus-F1	5′-GAA AAA TCA TCG TTG TAC TTC AAC TAC A-3′	*cyt b*	2.0	100 bp	Lopez-Andreo, Lugo, Garrido-Pertierra, Prieto, and Puyet (2005)
	Sus-R1	5′-GGT CAA TGA ATG CGT TGT TGA T-3′		2.0		
Lamb	Ovi-F2	5′-GAA AAA CCA TCG TTG TCA TTC AAC T-3′	t-Glu –	1.8	119 bp	Lopez-Andreo et al. (2005)
	Ovi-R2	5′-AAA TAT TTG ATG GAG CTG GGA GA-3′	*cyt b*	1.8		
Chicken	Gal-F3	5′-AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA-3′	*cyt b*	0.8	133 bp	Zhang, Fowler, Scott, Lawson, and Slater (2007)
	Gal-R3	5′-GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A-3′		0.8		
Ostrich	Str -F4	5′-CCC TTT AAA GAC ATC TGG TAT TGT GAG-3′	12s rRNA	1.2	155 bp	Rojas et al. (2011)
	Str-R4	5′-TAA ATT GTA GGC TCT CTG GGG TTC-3′		1.2		
Horse	Equ-F5	5′-CGT TTG ATC TGT CCT TAT TAC GGC A-3′	COI	2.0	253 bp	This study
	Uni-R	5′-CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA-3′		2.0		
Cow	Bos-F6	5′-CAT CAA CTT CAT TAC AAC AAT TAT CAA CAT AAA G-3′	COI	1.0	311 bp	This study
	Uni-R	5′-CCG AAT GGT TCY TTT TTY CCY GAG TAG TA-3′		1.0		

successful in identifying meat species from raw meat samples. In these experiments, each species-specific primer pair produced PCR products only from its target species and generated the expected PCR products of 100, 119, 133, 155, 253, and 311 bp for pork (*Sus scrofa*), lamb/mutton (*Ovis aries*), chicken (*Gallus gallus*), ostrich meat (*Struthio camelus*), horsemeat (*Equus ferus caballus*) and beef (*Bos indicus*), respectively. No PCR product was observed from the negative controls. Direct amplification from a large sample size (>1 mm^2) could occasionally cause amplification failure; further dilution (1:10 to 1:100) of pre-PCR solution using sterile water resolved this problem (data not shown).

3.1.2. Multiplex amplification

The direct multiplex assay for simultaneous detection of the six meat species were successfully developed. Fig. 1 shows six different PCR fragments with sizes corresponding to the expected sizes of the six target meat species. No PCR fragment was observed from the negative control.

3.2. Direct multiplex assay validation

3.2.1. Specificity test

The developed direct multiplex assay was used to analyze six target species (pork, lamb/mutton, chicken, ostrich meat, horsemeat and beef) and 13 possible domestic and wildlife meat species (crocodile, duck, deer, rabbit, goose, buffalo, cat, dog, muntjac, elephant, tiger, bear and human) in order to examine the assay specificity. The result showed that the assay was highly specific to the targets: the expected PCR fragments were generated only from the target species as predicted, i.e. no cross-reaction from non-target species was found (data not shown).

3.2.2. Reproducibility test

The assay reproducibility was tested using 19 voucher meat samples (of the six targets) obtained from different sources. The expected PCR products were generated from all target meat samples, as shown in Fig. 2. This resulted in 100% accuracy in meat identification.

3.2.3. Sensitivity test

The direct multiplex assay was used to amplify five mtDNA concentrations to determine the assay sensitivity – the minimum mtDNA amount of each target meat species that could still be detected by the assay. The detectable mtDNA amounts for each target species were different (Table 2). PCR products of pork, lamb/mutton, chicken, and beef were detected from as low as 12,500 mtDNA copies. PCR products of ostrich meat and horsemeat were detected from 25,000 mtDNA copies and 50,000 mtDNA copies, respectively.

3.2.4. Application to commercial food products

The real-world use of the developed assay with commercial meats and food products was demonstrated. Table 3 shows the results from all food products. The result showed that the direct multiplex assay was robust and could be successfully applied; only three of 115 samples (2.6%) did not amplify. Approximately 25% of all samples (29 of 115) had meat species that were not listed as an ingredient. The falsification was found in all food product types – raw frozen meat, cold cut, instant frozen food, street food, and halal food. The highest number of falsification (64.7%) was found in cold cuts while raw frozen meats had the lowest percentage (5.0%). No pork was detected in halal-certified food.

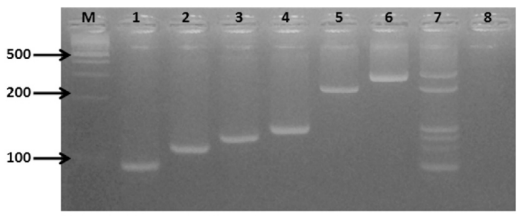


Fig. 1. Multiplex direct amplification of six target species separated on a 2% agarose gel. Lane M: 100 bp ladder, 1: pork (100 bp), 2: lamb/mutton (119 bp), 3: chicken (133 bp), 4: ostrich meat (155 bp), 5: horsemeat (253 bp), 6: beef (311 bp), 7: six target species mixed (pooled from pre-PCR dilution samples of six meats), and 8: negative control. Expected PCR products were detected in all lanes.

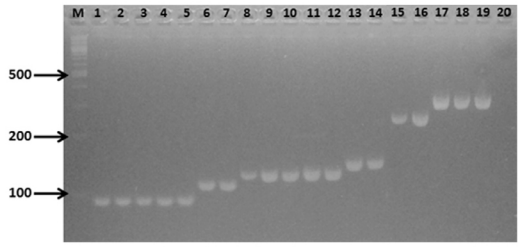


Fig. 2. Reproducibility test of the multiplex direct assay with 19 voucher meat samples. Lane M: 100 bp ladder, 1–5: pork (100 bp), 6,7: lamb/mutton (119 bp), 8–12: chicken (133 bp), 13,14: ostrich meat (155 bp), 15,16: horsemeat (253 bp), 17–19: beef (311 bp), 20: negative control. Expected PCR products were detected in all lanes.

Table 2
Sensitivity test of the multiplex direct assay. +++ stands for high intensity, ++ for medium intensity, + for low intensity, and – denotes band absence).

Meat species detection	mtDNA amount (copies)				
	100,000	50,000	25,000	12,500	6250
Pork	+++	++	+	+	–
Lamb/Mutton	+++	++	++	+	–
Chicken	+++	++	++	+	–
Ostrich meat	++	++	+	–	–
Horsemeat	++	+	–	–	–
Beef	+++	++	++	+	–

4. Discussion

The direct-multiplex PCR assay developed in this study could be completed in only 90 min, does not require expensive equipment (e.g. no real-time PCR instrument and no capillary electrophoresis), and saves DNA extraction time and cost. This is the first time that a direct-hexaplex PCR assay has been evaluated, successfully developed, and fully validated for simultaneous meat species identification from raw meats and food products.

We employed the Phire® Hot Start II DNA Polymerase and its proprietary buffer. Modified and novel polymerases have been shown to perform better than the traditional *Taq* polymerase (Hedman et al., 2009, 2010, 2011; Kermekchiev et al., 2009; Zhang et al., 2010). One mechanism of how this is achieved is the stronger polymerase-DNA bond, i.e. via the SSo-binding domain (Wang et al., 2004). Certain compounds, such as BSA and Tween-20, have also been shown to increase inhibitor tolerance when they are added to the PCR buffer (Kreader, 1996). Since the buffer is proprietary, its composition is unknown to the users. Additionally, the inhibitors would also have been diluted using the dilution protocol (Kitpipit et al., 2014). As the direct PCR procedure requires no extensive and lengthy pre-extraction and extraction step, this novel assay is therefore cost-effective and rapid. It addresses the drawbacks of conventional PCR-based methods previously reported.

The assay required a very small amount of meat sample (approximately 0.3–1.0 mm^2) to achieve a successful amplification. This illustrates that these trace amounts contain sufficient DNA for amplification. This sensitivity could be achieved as the direct PCR procedure requires no DNA extraction step, resulting in no DNA loss (Colussi et al., 2009; Linacre et al., 2010; Swaran & Welch, 2012). The optimal meat sample size found in this study corresponds to our previous experience with wildlife muscle samples, in which approximately one mm^2 yields the highest amplification success rate and PCR product using direct PCR (Kitpipit et al., 2014). Requiring small amount of samples is very beneficial for meat authentication as contamination or fraudulent ingredients could be in trace amounts. The direct amplification technique is therefore proved to provide a high chance of detecting falsifications, even in trace amounts.

Primers used for the assay produced small amplicons in the range of 100 to 311 bp, increasing the chance of detection from degraded/processed raw meats and food products. Because even traces of pork are *haram* (forbidden) for Muslims, the amplicon size for pork was deliberately chosen to be the smallest at 100 bp in order to maximize the chance of detecting pork. Previous reports have shown that amplicon size of less than 150 bp has a higher chance of survival in degraded samples (Ali et al., 2011, 2012; Hughes-Stamm, Ashton, & van Daal, 2011; Köppel et al., 2009; Senge, Madea, Junge, Rothschild, & Schneider, 2011). Thirty-eight halal food products were tested with the developed assay and none showed contamination from pork. The primers were designed from the cyt *b*, COI, and 12s rRNA genes in the mtDNA. This brings three benefits. Firstly, these genes contain high DNA variations among different species and low DNA variation among individuals of the same species, providing high confidence in meat species discrimination (Linacre, 2006; Tobe, Kitchener, & Linacre, 2010). In other words, the short amplicon length does not compromise specificity. Secondly, the approximately 3500 mitochondrial copies in a single skeletal muscle cell make the assay very robust and sensitive (Miller, Rosenfeldt, Zhang, Linnane, & Nagley, 2003). Lastly, the sequence data from cyt *b* and COI genes are available on DNA databases for many species, which enables additional comparisons using sequencing if needed. The species-specific primer technique employed here is better than barcoding because it is much faster

Table 3
Robustness test with commercial food products and falsification survey. The numbers of samples that contains the target species out of the total number of samples tested are shown, e.g. 11/16 under the chicken column in the cold cut with pork category means chicken were detected in 11 samples that should have had only pork. Fraud ratio for each category is calculated by dividing the number of samples with falsification by the total number of samples in that category. The bolded rows show different categories of samples and the total number of samples in that category.

Food products	No.	Multiplex 6 species						Fraud ratio (%)
		Pork	Mutton	Chicken	Ostrich	Horse	Cow	
Raw frozen meat	**20**							5.0
Pork	5	5/5	–	–	–	–	–	
Mutton	2	–	2/2	–	–	–	–	
Chicken	5	–	–	5/5	–	–	–	
Ostrich meat	3	1/3	–	–	2/3	–	–	
Horsemeat	2	–	–	–	–	2/2	–	
Beef	3	–	–	–	–	–	3/3	
Cold cut	**17**							64.7
with pork	16	15/16	–	11/16	–	–	–	
with beef	1*	–	–	–	–	–	–	
Instant frozen food	**13**							7.7
with pork	5	4/5	–	1/5	–	–	–	
with chicken	8*	–	–	7/8	–	–	–	
Street food	**27**							33.3
with pork	15	15/15	–	9/15	–	–	–	
with chicken	12	–	–	12/12	–	–	–	
Halal food	**38**							18.4
with chicken	30*	–	–	29/30	–	–	–	
with beef	8	–	2/8	5/8	–	–	1/8	

A minus (–) denotes no PCR product detected. An asterisk (*) denotes one sample did not yield any product for all six target species.

and cheaper. The results are easier to interpret, but it cannot be used for species not included in the multiplex. The six species selected are a combination of commonly eaten meats and two *haram* meats (horsemeat and pork), which will aid food control agencies around the world, particularly for halal foods. Comparing to our previously published triplex assay (Kitpipit et al., 2013a), the hexaplex in this study adds three more targets (including one more *haram* meat). The numbers of samples for specificity, reproducibility, and commercial products have all been increased, which results in additional confidence in the assay's results.

The proposed assay has two limitations. First, the assay cannot provide quantitative data, unlike real-time PCR (Köppel et al., 2010). Nonetheless, accurate quantification for real-time PCR could only be achieved when an appropriate reference material is used, as the matrix in food could interfere with the amplification process. In other words, serially diluted DNA from raw meats could not be used as a reference for DNA extracted from food samples, as there might be ingredients in the recipe that are co-extracted with the DNA and interferes with the quantification process (Köppel et al., 2008, 2009). The second limitation is the unequal amplification efficiency and sensitivity for the six species, but this same problem is encountered in all types of multiplex PCR assays (Ali et al., 2012).

The assay is fully validated for its accuracy, specificity, sensitivity, and applicability in analysis of food samples. The assay was found to provide 100% accuracy in the identification of the six meat species obtained from different sources. It is specific only to target meat species, indicating no chance of error or misidentification found. The assay is also extremely sensitive, being able to detect samples as little as 12,500 mtDNA copies or seven femtogram of mtDNA (equating to less than five muscle cells) (Tobe & Linacre, 2008), which makes it viable for thermally processed food samples. This sensitivity is comparable to published conventional and real-time singleplex and multiplex PCR assays, e.g. 300 cells (calculated from 1 ng of DNA from a 3 billion bp genome of cow) (Murugaiah et al., 2009), ten cells (calculated from 0.32 ng of DNA) (Köppel et al., 2008), and a single cell (calculated from 0.0035 ng of DNA) (Zhang, Fowler, Scott, Lawson, & Slater, 2007). Comparisons with some studies are difficult as they reported assay sensitivity in terms of percentages of a mixed sample. In addition, the optimized multiplex assay is illustrated to be robust enough to detect various meat fraudulent acts in real-world food samples. All these points reveal confidence in the use of the developed direct multiplex assay for the six-target meat identification from a variety of food samples.

5. Conclusion

This is the first time a direct-hexaplex PCR assay has been applied to meat species identification in raw meats and food products. The assay has been successfully developed and proven to be efficient in simultaneously identifying six commonly consumed meat species, which are pork, lamb/mutton, chicken, ostrich meat, horsemeat and beef. The assay has also been fully validated to meet the recommended standards in order to be used in real-world law enforcement. It is accurate, specific, sensitive, and applicable to detect adulterations and misbranding from a variety of meats and food product, including highly degraded or processed food samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the funding of Prince of Songkla University General Research Grant (SCI550384S) to P.T. and the Graduate Studies Research Grant, Prince of Songkla University to K.S. We also thank S. Wangtanaanurak and D. Kamkang for their help.

References

Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., & Che Man, Y. B. (2011). Swine-specific PCR–RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome b gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. *Food Analytical Methods, 5*(3), 613–623.

Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., & Che Man, Y. B. (2012). Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Analytical Methods, 5*(5), 935–955.

Branicki, W., Kupiec, T., & Pawlowski, R. (2003). Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Sciences, 48*(1), 83–87.

Che Man, Y. B., Aida, A. A., Raha, A. R., & Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control, 18*(7), 885–889.

Che Man, Y. B., Mustafa, S., Khairil Mokhtar, N. F., Nordin, R., & Sazili, A. Q. (2012). Porcine-specific polymerase chain reaction assay based on mitochondrial D-loop gene for identification of pork in raw meat. *International Journal of Food Properties, 15*(1), 134–144.

Colussi, A., Viegas, M., Beltramo, J., & Lojo, M. (2009). Efficiency of DNA IQ System® in recovering semen DNA from cotton swabs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2*(1), 87–88.

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. *Molecular and Cellular Probes, 18*(2), 81–87.

Fajardo, V., Gonzalez, I., Rojas, M., Garcia, T., & Martin, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology, 21*(8), 408–421.

Hedman, J., Dufva, C., Norén, L., Ansell, C., Albinsson, L., & Ansell, R. (2011). Applying a PCR inhibitor tolerant DNA polymerase blend in forensic DNA profiling. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3*(1), e349–e350.

Hedman, J., Nordgaard, A., Dufva, C., Rasmusson, B., Ansell, R., & Radstrom, P. (2010). Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis. *Analytical Biochemistry, 405*(2), 192–200.

Hedman, J., Nordgaard, A., Rasmusson, B., Ansell, R., & Radstrom, P. (2009). Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. *BioTechniques, 47*(5), 951–958.

Hughes-Stamm, S. R., Ashton, K. J., & van Daal, A. (2011). Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *International Journal of Legal Medicine, 125*(3), 341–348.

Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., & Barnes, W. M. (2009). Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research, 37*(5), e40.

Kishore, R., Reef Hardy, W., Anderson, V. J., Sanchez, N. A., & Buoncristiani, M. R. (2006). Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *Journal of Forensic Sciences, 51*(5), 1055–1061.

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*(1), 29–38.

Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2013a). Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 4*(1), e33–e34.

Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., & Chotigeat, W. (2013b). Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 4*(1), e364–e365.

Köppel, R., Ruf, J., & Rentsch, J. (2010). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology, 232*(1), 151–155.

Köppel, R., Ruf, J., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *European Food Research and Technology, 227*(4), 1199–1203.

Köppel, R., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology, 230*(1), 125–133.

Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology, 62*(3), 1102–1106.

Linacre, A. (2006). Application of mitochondrial DNA technologies in wildlife investigations — species identification. *Forensic Science Review, 18*, 1–8.

Linacre, A. (2009). *Forensic Science in Wildlife Investigations* (1st ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Linacre, A., Pekarek, V., Swaran, Y. C., & Tobe, S. S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics, 4*(2), 137–141.

Lopez-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry, 339*(1), 73–82.

Mercier, B., Gaucher, C., Feugeas, O., & Mazurier, C. (1990). Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Research, 18*(19), 5908.

Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W., & Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and

cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Research, 31*(11), e61.

Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science, 77*(4), R118–R126.

Murugaiah, C., Noor, Z. M., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., & Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science, 83*(1), 57–61.

Park, S. J., Kim, J. Y., Yang, Y. G., & Lee, S. H. (2008). Direct STR amplification from whole blood and blood- or saliva-spotted FTA without DNA purification. *Journal of Forensic Sciences, 53*(2), 335–341.

Rojas, M., Gonzalez, I., Pavon, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernandez, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 27*(6), 749–763.

Rojas, M., Gonzalez, I., Pavon, M. A., Pegels, N., Hernandez, P. E., Garcia, T., et al. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (Struthio camelus) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control, 22*(3–4), 523–531.

Senge, T., Madea, B., Junge, A., Rothschild, M. A., & Schneider, P. M. (2011). STRs, mini STRs and SNPs–a comparative study for typing degraded DNA. *Legal Medicine (Tokyo, Japan), 13*(2), 68–74.

Swaran, Y. C., & Welch, L. (2012). A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Science International: Genetics, 6*(3), 407–412.

Tjhie, J. H., van Kuppeveld, F. J., Roosendaal, R., Melchers, W. J., Gordijn, R., MacLaren, D. M., et al. (1994). Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology, 32*(1), 11–16.

Tobe, S. S., Kitchener, A. C., & Linacre, A. M. (2010). Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS ONE, 5*(11), e14156.

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 Science International: Genetics, 2*(4), 249–256.

Unajak, S., Meesawat, P., Anyamaneeratch, K., Anuwareepong, D., Srikulnath, K., & Choowongkomon, K. (2011). Identification of species (meat and blood samples) using nested-PCR analysis of mitochondrial DNA. *African Journal of Biotechnology, 10*(29), 5670–5676.

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 Research, 32*(3), 1197–1207.

Zhang, C. L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & 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*(9), 1149–1158.

Zhang, Z., Kermekchiev, M. B., & Barnes, W. M. (2010). Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *Journal of Molecular Diagnostics, 12*(2), 152–161.

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 (2013) e33–e34

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification

Thitika Kitpipit, Kuangtiwa Sittichan, Phuvadol Thanakiatkrai *

Forensic Science Program, Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 September 2013
Accepted 2 October 2013

Keywords:
Triplex
Direct PCR
Meat
Fraud identification

ABSTRACT

Unintentional contamination and fraudulent labeling of food, especially in halal-certified products, breach both religious and international laws. DNA-based methods are widely employed to identify trace amount of contaminants for law enforcement. Direct PCR has proved successful in the DNA analysis from degraded samples and PCR-inhibited samples, but it has never been applied to meat identification from food products. In this study, we aimed to develop a multiplex direct PCR assay for simultaneous identification of three commonly consumed meats without the need to extract DNA. Species-specific primers were designed from the mitochondrial DNA using the alignment of sequences available on GenBank. The assay was validated for its specificity, sensitivity, and usefulness in market sample analysis. The results showed that a highly specific and sensitive multiplex direct PCR assay was developed and provided the expected PCR fragment of approximately 100, 119, and 133 bp for pork (*Sus scrofa*), mutton (*Ovis aries*), and chicken (*Gallus gallus*), respectively. Thirty-nine market samples were tested and a small number of fraudulent labeling was detected. In conclusion, we developed a rapid and inexpensive test for three meat species. This cost- and time-saving assay could be easily adopted in the world food hubs, which are mostly third-world countries.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

With increasing consumption of ready-made food and continuous expansion of the food industry, identification of food ingredient is required by law in many countries [1]. This is to protect consumers from undue profit makers, for example, using materials that are sub-standard, breach religious laws, or as substitutes for more expensive ones. Constant developments of technique for the identification of meat and meat products are being made. At present, PCR techniques are common as they have high sensitivity and specificity [2].

Direct PCR is popular in microbiology and forensic DNA analysis. This method is rapid, economical and has reduced contamination rate because DNA extraction is omitted. Moreover, DNA extraction has low yield (16–30% of total DNA) [3,4]. Consequently, multiplex direct PCR to identify three types of meat – pork, mutton and chicken – was developed and validated in this study. This is the first multiplex direct PCR for meat identification.

2. Materials and methods

Authentic meat samples were bought as an entire body from retail markets to confirm their authenticity. All samples were cut into a small size and prepared for the direct amplification following our unpublished method using the Finnzyme Phire® Hotstart II DNA polymerase (Thermo Scientific, Germany). Three species-specific primers were modified from previous studies: *Sus scrofa* (100 bp) (Sus-F1 5′-GAA AAA TCA TCG TTG TAC TTC AAC TAC A-3′ and Sus-R1 5′-GGT CAA TGA ATG CGT TGT TGA T-3′) [5]; *Ovis aries* (119 bp) (Ovi-F2 5′-GAA AAA CCA TCG TTG TCA TTC AAC T-3′ and Ovi-R2 5′-AAA TAT TTG ATG GAG CTG TTA GA-3′) [5]; and *Gallus gallus* (133 bp) (Gal-F3 5′-AGC AAT TCC CTA CAT TGG ACA CA-3′ and Gal-R3 5′-GAT GAT AGT AAT ACC TGC GAT TGC A-3′) [6]. PCR products were separated and visualized on a 4% agarose gel.

This assay was validated for its specificity, sensitivity, reproducibility, and market sample testing. For the specificity test, the assay was tested with 10 commonly consumed meats: pork, mutton, chicken, beef, ostrich, crocodile, duck, buffalo, dog, and cat meat. For the reproducibility test, meats from five different sources were prepared and amplified. The sensitivity test was performed by amplifying three meat sizes – 0.3, 1.0, and 2.0 mm^2. Thirty-nine market samples were randomly selected from local markets and food stalls and tested with the assay.

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 565; fax: +66 74 446 681.
E-mail addresses: pthanakiatkrai@gmail.com, phuvadol.t@psu.ac.th (P. Thanakiatkrai).

1875-1768/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.016

Table 1
The result of the multiplex direct PCR assay on market samples. The numbers (1–6) indicate the sample number that showed a PCR product specific to each meat species.

Food products	No. of sample	Fraud ratio (%)	Triplex PCR		
			Pork	Mutton	Chicken
Raw frozen meat	15	0			
Pork	5		1, 2, 3, 4, 5	–	–
Mutton	5		–	1, 2, 3, 4, 5	–
Chicken	5		–	–	1, 2, 3, 4, 5
Instant frozen food	12	16.7			
With pork	4		1, 2, 3, 4	–	2, 4
With chicken	4		–	–	1, 2, 3, 4
With chicken (Halal)	3		–	–	1, 2, 3
With pork/chicken	1		1	–	1
Street food	12	33.3			
With pork	3		1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
With mutton	1		–	1	–
With chicken	2		1	–	1, 2
With chicken (Halal)	6		–	–	1, 2, 3, 4, 5, 6
Total	39	15.4	–	–	–

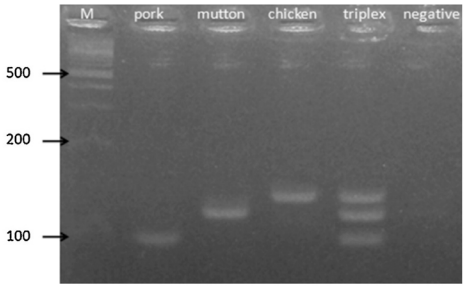


Fig. 1. Multiplex direct PCR result of developed assay. Lane M, ladder; lane 1, pork; lane 2, mutton; lane 3, chicken; lane 4, three meat mixed, and lane 5, negative.

3. Results and discussion

We successfully developed a multiplex direct PCR assay to detect three commonly eaten species. The expected PCR products of 100 bp (pork), 119 bp (mutton/lamb), and 133 bp (chicken) were generated (Fig. 1). Specificity of the assay was tested with 10 commonly consumed meats and no non-specific amplification was observed. The assay was highly sensitive – less than 0.3 mm^2 in meat size gave detectable PCR products for all three species. The assay's reproducibility was excellent as all tested samples produced the expected PCR products (data not shown). The test result of 39 market samples in both raw meat form and ready-to-eat products is shown in Table 1. The meat origins of all market meat samples were identified by the developed assay. We found contamination of unlisted ingredients in 15.4% of all products. The success in this study was attributed to the novel Phire® DNA polymerase, which is resistant to PCR inhibitors found in raw meat and food products, and the short PCR product size.

4. Conclusion

The obtained results showed that the multiplex direct PCR assay was developed successfully. The assay had high sensitivity and specificity. The result from the market samples test found that some products contained contaminants. This method is novel and saves analysis time and cost. The developed assay should benefit food safety agencies and aid law enforcement.

Role of funding

This study was supported by the Prince of Songkla University Research Fund (SCI550384S).

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

Authors acknowledge S. Wangtanaanurak and D. Kamkang for contributing samples.

References

[1] M.E. Ali, et al., Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics, Food Anal. Methods 5 (5) (2012) 935–955.
[2] M.A. Rodriguez, et al., PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures, J. Food Protect. 67 (2004) 172–177.
[3] R. Kishore, et al., Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48, J. Forensic Sci. 51 (2006) 1055–1061.
[4] A. Colussi, et al., Efficiency of DNA IQ System® in recovering semen DNA from cotton swabs, Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 2 (2009) 87–88.
[5] M. López-Andreo, et al., Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction, Anal. Biochem. 339 (2005) 73–82.
[6] C.-L. Zhang, et al., A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses, Food Control 18 (2007) 1149–1158.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล กึ่งทิวา สิทธิเชนทร์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510220019

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนวิจัยทั่วไปของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 200,000 บาท

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน (ถ้ามี)

Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry. 2014 11/15/;163(0):77-82.

Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2013;4(1):e33-e4.

Sittichan K. A multiplex direct PCR for meat identification in food products. Poster presentation at International Society for Forensic Genetics 2013 (ISFG 2013) Australia.