บททั่วไป

ในปัจจุบันชาวมุสลิมเป็นผู้บริโภคที่สำคัญกลุ่มหนึ่งในตลาดโลก เนื่องจากประชาชนโลกนับถือศาสนาอิสลามมากเป็นอันดับ 2 ซึ่งมีประมาณ 1,800 ล้านคน (นลินี โหมาศวิน, 2548) ซึ่งมูลค่าตลาดอาหารฮาลาลทั่วโลกมีกว่า 8 ล้านล้านบาทต่อปี แต่ไทยกลับมีการส่งออกได้ไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ (สิทธิพงศ์ จันทรดาเกต, 2548) ทั้งที่ไทยเองก็มีศักยภาพในการผลิตอาหารฮาลาลที่มีคุณภาพได้และอาหารฮาลาลยังถูกจัดให้อยู่ในนโยบายครัวไทยสู่ครัวโลกอีกด้วย หนึ่งในปัญหานี้คือ เทคนิควิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของกลุ่มอาหารฮารอมในการผลิตอาหารฮาลาล ซึ่งผิดต่อหลักศาสนาอิสลาม ได้แก่ เนื้อหมู ไขมันหมู หนังหมู และองค์ประกอบอื่นๆ ของหมู เป็นต้น โดยรายละเอียดของหลักเกณฑ์ในการตรวจสอบเพื่อรับรองอาหารฮาลาล ได้แก่ ตรวจสอบส่วนประกอบก่อนเข้าสู่ระบบการผลิต เช่น ส่วนผสมอาหาร สารปรุงแต่ง สี สารเติมระหว่างการผลิต อุปกรณ์การผลิต สารเร่ง สารทดแทน และอื่นๆ นอกจากนั้นยังรวมถึงกระบวนการผลิต วิธีการผลิต การเตรียมส่วนประกอบ เป็นต้น (นลินี โหมาศวิน, 2548)

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการตรวจหา DNA ของหมู โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณ DNA ของหมูที่ปนเปื้อนในอาหารเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเครื่องนี้สามารถลดเวลาและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบได้ครั้งละประมาณ 90 ตัวอย่าง ในเวลา 1 วัน ซึ่งในการวิจัยที่ผ่านมาสามารถยืนยันได้ว่า วิธี PCR ที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและไวต่อปฏิกิริยาสูงสามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ได้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเพียง 1 copy ก็ตาม (Saiki *et al.*,1988)

จากงานวิจัยที่กลุ่มผู้วิจัย ได้ดำเนินการไปแล้วในโครงการริเริ่ม พบว่าในการทดลองความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบจากไมโตคอนเดรียของหมู แล้วนำ PCR product ที่ได้หาลำดับ DNA แล้วเปรียบเทียบลำดับ DNA ของหมูกับ species อื่นๆ ได้แก่ ไก่ วัว แบคทีเรีย ยีสต์ และฟังไจ พบว่า primer มีความจำเพาะกับ DNA หมูเท่านั้น โดยให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อหมู โดยได้ทดสอบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบเพิ่มเติม ทั้งการเพิ่มปริมาณ DNA และการปรับสภาวะในปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันผลว่า primer มีความจำเพาะต่อ DNA หมูสูงมาก (Maharat *et al.*, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ต รวจสอบการปนเปื้อน DNA หมูในเนื้อสัตว์ในตัวอย่างหลายชนิดได้แก่ แกะ ไก่ แพะ คน หมูและหมูป่า พบว่าการใช้ primer นี้ให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่ได้จากหมูและหมูป่าเท่านั้น (Montiel-sosa *et al.*, 2000) เมื่อเปรียบเทียบความไวในการสกัด DNA โดยใช้บัฟเฟอร์ RSB และ QIAamp kit สามารถตรวจสอบ DNA ในปริมาณ 2% และ 0.5% ตามลำดับ และได้ตรวจสอบเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ DNA ยังสามารถนำไปตรวจสอบได้โดยวิธี PCR จากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณและได้แถบ DNA ขนาดที่เท่ากับเนื้อหมูสด ซึ่งเป็นข้อดีในการจำแนกชนิดของสัตว์ เนื่องด้วยวิธีการทางโปรตีนที่ใช้อยู่เดิมไม่สามารถตรวจสอบได้เมื่อโปรตีนผ่าน

ความร้อน และยังมีประโยชน์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ความร้อน เช่น เบคอน ไส้กรอกและแฮม เป็นต้น

การจำแนกชนิดของสัตว์โดยศึกษารูปแบบของโปรตีนในกล้ามเนื้อของสัตว์แต่ละชนิด เช่น วัว แกะ ม้า ควาย หมูและจิงโจ้ พบว่า การจำแนกชนิดของสัตว์ด้วยวิธีนี้วิเคราะห์ผลยากและมีข้อจำกัดคือโปรตีนสลายได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อนสูง (King *et al.*, 1982) ในปัจจุบัน ได้มีการตรวจสอบเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในระดับ DNA ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจ โดยวิเคราะห์ในส่วนของ mitochondrial DNA (mtDNA) เนื่องจาก mtDNA ยีน มีจำนวน 1,000 copies ต่อ cell และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในสัตว์ ซึ่งง่ายต่อการออกแบบ primer เพื่อความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา Matsunaga และคณะได้จำแนกชนิดสัตว์ 6 ชนิด (วัว หมู ไก่ แกะ แพะและม้า) ในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยออกแบบ forward primer ให้จำเพาะกับส่วนที่เป็น conserved DNA ใน mitochondrial DNA และ reverse primer ให้จำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิดซึ่งพบว่าสามารถตรวจสอบได้ในระดับถึง 0.25 ng ของเนื้อสัตว์ (Matsunaga *et al.*, 1999) S.Lahiff และคณะได้จำแนกชนิดสัตว์ ได้แก่ ไก่ หมูและวัว ด้วยเทคนิค PCR ในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์โดยทำการเปรียบเทียบวิธีสกัด 2 วิธีคือสกัดด้วย LSR buffer และการสกัดด้วย commercial kit การสกัด DNA ด้วย commercial kit สามารถตรวจสอบในระดับที่ต่ำกว่าการสกัดด้วย LSR buffer โดยสามารถตรวจสอบวัวในระดับต่ำที่ 1% ตรวจสอบไก่ในระดับต่ำที่ 5% และตรวจสอบหมูในระดับต่ำที่ 1% (Lahiff *et al.*, 2001) Montiel-Sosa และคณะในปี 2001 ได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของหมูในเนื้อสัตว์โดยจากการแยกชนิดของสัตว์ เช่น วัว ไก่ แกะ ห่าน หมู หมูป่าและกุน พบว่าให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากหมูและหมูป่าเท่านั้น และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อหมูในอัตราส่วน 5% ที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่น (J.F.Montiel-Sosa *et al.*, 2000) คณะผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบจากไมโตคอนเดรียของหมูพบว่า ให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อหมูเท่านั้นโดยตรวจสอบในระดับต่ำกว่า 0.5% และสามารถตรวจสอบได้ในเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที (Maharat *et al.*, 2005) นอกจากการจำแนกชนิดของสัตว์โดยใช้วิธี PCR ที่ศึกษาในส่วนของ mitochondrial DNA แล้วยังมีการจำแนกชนิดสัตว์โดยใช้ ส่วน genome คือส่วนของ repetitive element เนื่องจาก มีจำนวน 100,000 copies ต่อ cell โดยมีงานวิจัยที่ตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ และในผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ เช่น ไส้กรอก แฮมเบอเกอร์และไขมันจากสัตว์ โดยใช้วิธี PCR เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน repetitive element รวมกับสัตว์ชนิดอื่นด้วย เช่น ปลา และแพะ เป็นต้น ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อหมู และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อหมูในอัตราส่วน 0.005% ที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่น (Calvo *et al.*, 2001) ต่อมา Jerilyn และคณะได้จำแนกสัตว์ได้แก่ วัว หมู ไก่และสัตว์ฟันแทะ ด้วยเทคนิค PCR โดยทำการเพิ่มปริมาณDNAในส่วน repetitive element ในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนพบว่าสามารถตรวจสอบเนื้อวัวในระดับต่ำถึง 0.005%, เนื้อหมูในระดับต่ำถึง 0.0005% เนื้อไก่ในระดับต่ำถึง 0.05% และสัตว์ฟันแทะสามารถตรวจสอบในระดับต่ำถึง 0.0001% (Jerilyn .*et al.*, 2003) ในปี 2004

Jerilyn และคณะได้จำแนกสัตว์ในวงศ์สัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะ ม้า หมา แมว หนู หมูและกระต่าย ด้วยเทคนิค PCR โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน repetitive element โดยปริมาณDNAของสัตว์ที่จำแนกได้อยู่ระหว่าง 0.1 ng - 0.1 pg (Jerilyn . *et al.*, 2004)

ผลการวิจัยเบื้องต้นที่กล่าวควรนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาขยายเพิ่มการบริการ แต่จะต้องทำการศึกษาถึงขีดความสามารถของเทคนิค PCR ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล นอกจากนั้นในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมูในอาหาร โดยใช้ primer ในส่วน repetitive Element เพื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาทั้งสองส่วน เพื่อหา primer และสภาวะที่เหมาะสมเพื่อประสิทธิภาพการตรวจสอบที่ดีที่สุดโดยศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น

- ความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างที่ตรวจสอบ เพราะปฏิกิริยา PCR จะต้องมีความเป็นกรด-เบสที่พอเหมาะ และเพื่อให้ทราบถึงระดับ pH ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละประเภทมีความเป็นกรด-เบสต่างกัน
- ศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต ซึ่งอาจทำมาจาก pork-by-products ได้แก่ gelatin shortening collagen และ lard เป็นต้น (เอกสารการสอนชุดวิชาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2541) และ (http://www.toronto.ca/health) เนื่องจากในวัตถุดิบที่กล่าวมา ได้ผ่านกระบวนการผลิต และมีอัตราส่วนการปนเปื้อนของDNAหมูที่น้อยมาก โดยในการตรวจสอบจะต้องปรับสภาวะ PCR เช่น อุณหภูมิ ปริมาณสารต่างๆในปฏิกิริยาให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถนำเทคนิค PCR มาตรวจสอบดังกล่าวได้

ดังนั้นจึงใคร่ขอทุนสนับสนุนวิจัยนี้เพื่อมาศึกษาเพิ่มเติมและเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาไปสู่งานบริการต่อไป และเพื่อส่งเสริมการเป็นหน่วยงานร่วมในนิคมอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลในการให้การรับรองมาตรฐานอาหารฮาลาลและสร้างความมั่นใจในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแก่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล และสร้างความมั่นใจในการเลือกบริโภคอาหารฮาลาลที่มีขั้นตอนการผลิตถูกต้องตามบทบัญญัติในศาสนาอิสลาม ด้วยการนำวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยในการพิสูจน์และยืนยันสิ่งที่ต้องห้ามอย่างเป็นระบบ ให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ โดยวิเคราะห์ในส่วนของ mitochondrial DNA กับส่วน repetitive element
2. เพื่อศึกษาความเป็นกรด-เบส ที่มีผลต่อความถูกต้องของการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลโดยเทคนิค PCR
3. เพื่อศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิดเช่น ไส้กรอก, แฮม, ลูกชิ้น, แหนม เป็นต้น โดยเทคนิค PCR

4. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต ซึ่งอาจทำมาจากผลิตภัณฑ์จากหมู ได้แก่ gelatin, shortening, collagen และ lard เป็นต้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือ

1. Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P100 (20-100 µl) และ P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, Villiers-le-bel, France)
2. Automated DNA Sequence ABI 377 (Perkin-elmer, Boston, USA)
3. Vortex (Scientific industry, USA)
4. pH meter (Cyberscan, Eutech Cybernitech, Singapore)
5. Hot plate (Kika Labortechnik, Malaysia)
6. Balance (Precisa, Switzerland)
7. Microcentrifuge (National Labnet Co., Ltd, USA)
8. Thermal cycle 9700 (Gene Amp PCR System 9700 PE Applied Biosystems, USA)
9. Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)
10. Water Purification equipment (Barnstead/Thermolyne, Easypure RF, USA)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Pipette tip : 10 µl, 1,000 µl (Gilson, Villiers-le-bel, France)
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml และ 1.5 ml (Gilson, Villiers-le-bel, France)
3. Polypropylene conical tube : 15 ml (Elkay, Galway, Ireland)
4. Beaker : 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
5. Flask : 250, 500 และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
6. Reagent bottom : 100, 250, 500 และ 1,000 ml (Duran, USA)
7. Cylinder : 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ml (Pyrex,USA)
8. Thermometer (Precision, Germany)
9. Parafilm (American National Can, USA)
10. Stirring-magnetic bar
11. Sequence ABI 377 kit (Perkin-elmer, Boston, USA)
12. Combs(Bio-Rad, California, USA)

13. Electrophoresis chamber set (Bio-Rad, California, USA)

สารเคมี

1. Tris-HCl, pH 7.0 (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
2. PK (proteinase K) (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
3. Phenol-chloroform (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
4. Sodium acetate (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
5. Isoamyle alcohol (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
6. Master mix PCR (Eppendorf, Hamburg, Germany)
7. Primer β-actin F และ β-actin R, Pig F และ Pig R (QIAGEN, Hilden, Germany)
8. Ethidium bromide (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
9. Absolute ethanol (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
10. Bromphenol blue (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
11. Disodium ethylenediamine tetracetic acid : (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
12. Sodium chloride (USB, New Territories, Hong Kong)
13. Sodium dodecyl sulfate (Sigma, Citilink Warehouse, Singapore)
14. Sucrose (USB, New Territories, Hong Kong)
15. Tris base (USB, New Territories, Hong Kong)
16. 100 base pairs DNA ladder (Biolabs, Hercules, California, USA)
17. QIAquick DNA Mini Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

วิธีการทดลอง

1. **ศึกษาความเหมาะสมของ primer ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมู ในส่วน repetitive element**

   ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ เนื้อหมูสด เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนสูง ตัวอย่างที่ใช้เป็น negative control คือเนื้อไก่ เนื้อวัว

   1.1 ศึกษาความจำเพาะของ primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน **repetitive element** โดยทำการศึกษาในเนื้อสด สกัด DNA จากเนื้อหมูสด เนื้อไก่ เนื้อวัว ด้วย commercial kit (QIAamp kit, QIAGEN, Cologne, Germany) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง ตามขั้นตอน protocol kit โดยย่อคือ ชั่งเนื้อสัตว์ 25 มิลลิกรัม ใส่ proteinase K 20 ไมโครลิตรและใส่สารละลาย Lysis Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ ครึ่งชั่วโมง หลังจาก

นั้นใส่สารละลายใน Column แล้วล้างด้วย Washing Buffer 500 ไมโครลิตร แล้วElute DNA ด้วย Elution Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

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

1.1.2 ตรวจสอบขบวนการสกัด DNA โดยนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer

β-actin F (5'- CGGAACCGCTCATTGCC-3')

β-actin R (5'- TAGATGGGCAGTGGTGGGT-3')

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วย Master Mix PCR (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3.75 mM $Mg(OAc)_2$, 500 μM dNTP), 40 ng ของ DNA, 4.8 μM ของ primer β-actin F และ β-actin R ปริมาณสารละลายทั้งหมดคือ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เพิ่มปริมาณ DNAโดยเข้าเครื่อง thermal cycle ซึ่งรอบปฏิกิริยา ดังนี้

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
94 °C	5 นาที	1 รอบ
94 °C 45 °C 72 °C	30 วินาที 30 วินาที 60 วินาที	30 รอบ
72 °C	7 นาที	1 รอบ

หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

1.1.3 ตรวจสอบความจำเพาะของ primer ในส่วน repetitive element ต่อการตรวจสอบโดยใช้ตัวอย่าง เนื้อหมูสด โดยมีตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่ เนื้อวัว ซึ่งใช้ primer ดังนี้

Pig pre-1-F 5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′

Pig pre-1-R 5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′

โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียม

สารละลายในหลอดทดลอง ประกอบด้วย Master Mix PCR, 20 ng ของ DNA, 5.6 µM ของ primer Pig pre-1-F และ Pig pre-1-R ปริมาณสารละลายทั้งหมด คือ 25 ไมโครลิตร หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง thermal cycle ซึ่งได้ตั้งรอบปฏิกิริยา ดังตารางนี้

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
92 °C	3 นาที	จำนวน 1 รอบ
92 °C	20 วินาที	
50 °C	20 วินาที	จำนวน 30 รอบ
72 °C	30 นาที	

หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

1.1.4 ศึกษาความจำเพาะของ primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน repetitive element ตรวจสอบเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีโดยสกัด DNA จากเนื้อที่ผ่านความร้อน 120 องศาเซลเซียส เนื้อไก่ เนื้อวัว ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยมีปฏิกริยาเช่นเดียวกับการตรวจสอบหาดีเอ็นเอหมูในเนื้อสด หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

1.1.5 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จาก PCR productที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของหมูในส่วน Repetitive elementโดย DNA sequencing (Automated DNA Sequence ABI 377 (Perkin-elmer, Boston, USA))

เพื่อยืนยันชิ้น DNA ที่ทำการเพิ่มจำนวน โดยตัดแถบ DNA ที่ตำแหน่ง 161 คู่เบส แล้วทำให้ DNA บริสุทธิ์จาก gel และตกตะกอน DNA ด้วย 2 M Na-acetate และ Absolute Ethanol ตรวจสอบหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer รุ่น ABI Prism 377 แล้ว BLAST กับฐานข้อมูลใน GenBank เพื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก PCR Product

2. ศึกษาเปรียบเทียบความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ โดยใช้ primer ในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองดังนี้

- ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025%
- ตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 120 °C เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนต่าง เช่น 1 %, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04%

2.1 เปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

2.1.1 สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนคือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

2.1.2 เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยทุกตัวอย่างทำการตรวจหาความไวของปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer 3 ตัว ดังนี้

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*,2003) โดยมีลำดับเบสคือ

- β-actin f 5′CGGAACCGCTCATTGCC 3′
- β-actin r 5′TAGATGGGCACAGTGTGGGT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นโดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000)

- Pig f 5′AACCCTATGTACGTCGTGCAT 3′
- Pig r 5′ACCATTGACTGAATAGCACCT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3) เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อน โดยใช้ primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001)

- Pig pre-1-F 5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′
- Pig pre-1-R 5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2.2 ศึกษาเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 120 องศาเซลเซียส

โดยใช้ primerในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element ตามอัตราส่วนดังนี้คือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04%

2.2.1 สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ผ่านความร้อนสูงในอัตราส่วนคือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% จะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

2.2.2 สกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในอัตราส่วนคือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

2.2.3 เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยทุกตัวอย่างทำการตรวจหาความไวของปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer 3 ตัว ดังนี้

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*,2003) โดยมีลำดับเบสคือ

- β-actin f 5′CGGAACCGCTCATTGCC 3′
- β-actin r 5′TAGATGGGCACAGTGTGGGT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นโดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000)

- Pig f 5′AACCCTATGTACGTCGTGCAT 3′
- Pig r 5′ACCATTGACTGAATAGCACCT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3) เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อน โดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001)

- Pig pre-1-F 5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′
- Pig pre-1-R 5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3. ศึกษาความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างเนื้อหมูที่มีผลต่อการตรวจสอบ DNA หมู ด้วยวิธี PCR โดยตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีดังนี้

- เนื้อหมูดิบ
- เนื้อหมูที่ผ่านความร้อน
- เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ผ่านความร้อน
- เนื้อหมูผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ผ่านความร้อน

3.1 ศึกษาความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างเนื้อหมูที่มีผลต่อการตรวจสอบ ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยนำมาแช่ในสารละลายที่เป็นเบสโดยใช้สารละลาย NaOH ที่ pH ต่างๆ เช่น 8, 10, 12 ส่วนสารละลายที่เป็นกรดแช่ในสารละลาย HCl ที่ pH 2, 4, 6 มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.1.1 สกัด DNA จากตัวอย่างที่เตรียมโดยการนำไปแช่ในสารละลายความเป็นกรด-เบสดังกล่าว ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

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

3.1.3 เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยทุกตัวอย่างทำการตรวจหาความไวของปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer 3 ตัว ดังนี้

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*,2003) โดยมีลำดับเบสคือ

- β-actin f 5′CGGAACCGCTCATTGCC 3′
- β-actin r 5′TAGATGGGCACAGTGTGGGT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นโดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000)

- Pig f 5′AACCCTATGTACGTCGTGCAT 3′
- Pig r 5′ACCATTGACTGAATAGCACCT 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3) ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับ pH ต่างๆ โดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001)

- Pig pre-1-F 5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′
- Pig pre-1-R 5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′

โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากเข้าเครื่อง thermal cycle แล้วตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3.2 ศึกษาความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างเนื้อหมูที่มีผลต่อการตรวจสอบ ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและนำตัวอย่างไปแช่ในสารละลายที่เป็นเบส โดยใช้สารละลาย NaOH ที่ pH ต่างๆ เช่น 8, 10, 12 ส่วนสารละลายที่เป็นกรดแช่ในสารละลาย HCl ที่ pH 2, 4, 6 มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมู, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.2.1 โดยทำการสกัด DNA จากตัวอย่างที่เตรียม ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมู, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

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

3.2.3 เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยทุกตัวอย่างทำการตรวจหาความไวของปฏิกิริยา ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer 3 ตัว ดังนี้

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*, 2003) โดยมีลำดับเบสคือ โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นโดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) และ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001) โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3.3 ศึกษาความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้ primerในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element ตามอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01%, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% แล้วนำตัวอย่างตามอัตราส่วนดังกล่างมาแช่ในสารละลายที่เป็นเบสโดยใช้สารละลาย NaOH ที่ pH ต่างๆ เช่น 8, 10, 12 ส่วนสารละลายที่เป็นกรดแช่ในสารละลาย HCl ที่ pH 2, 4, 6 มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.3.1 สกัด DNA จากตัวอย่างที่เตรียมโดยการนำไปแช่ในสารละลายความเป็นกรด-เบสดังกล่าว ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.3.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่

ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีค่าความบริสุทธิ์ (A260/280) ระหว่าง 1.5-1.8 และปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*,2003) โดยมีลำดับเบสคือ โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่น โดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) และ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001) โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

3.4 ศึกษาความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียสโดยใช้ primerในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element ตามอัตราส่วนดังนี้คือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% แล้วนำตัวอย่างตามอัตราส่วนดังกล่างมาแช่ในสารละลายที่เป็นเบสโดยใช้สารละลาย NaOH ที่ pH ต่างๆ เช่น 8, 10, 12 ส่วนสารละลายที่เป็นกรดแช่ในสารละลาย HCl ที่ pH 2, 4, 6 มีตัวควบคุมเป็นบวกคือเนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

3.4.1 ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างที่เตรียมโดยการนำไปแช่ในสารละลายความเป็นกรด-เบสดังกล่าว ด้วย commercial kit (QIAgen kit) ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

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

1) สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et.*, 2003) โดยมีลำดับเบสคือ โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อที่ผ่านมา หลังจากนั้น ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA

ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

2) ตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นโดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) และ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมู ในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001) โดยสภาวะและปริมาณสารละลายดังที่กล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium Bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA)

4. เพื่อศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต โดยเทคนิค PCR ซึ่งอาจทำมาจาก pork-by-products

โดยตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีดังนี้

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

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ต่างๆ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

1. ขนมเจลาติน ตัวอย่างที่1		10. กุนเชียงไก่	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose	45%	- Chicken Meat	60%
- Sugar	40%	- Fat	30%
- Gelatin	7%	- กระเทียม	5%
		- น้ำตาล	3%
		- เกลือ	2%
2. ขนมเจลาติน ตัวอย่างที่2		11. กุนเชียงปลา	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose	45%	- fish	61.70%
- Sugar	40%	- Lard	15.80%
- Gelatin	5%	- น้ำตาล	15.67%
		- เกลือ	4.80%

3 ขนมเจลาติน ตัวอย่างที่ 3		12. กุนเชียงหมู	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Glucose	45%	- เนื้อหมู	85%
- กลูโคสไซรัป	39%	- น้ำมัน	5%
- Gelatin	10%	- เครื่องเทศ	5%
		- น้ำตาล	3%
		- เกลือ	2%
4. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1		13. ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Pork	60%	มีเนื้อหมูอบแห้ง	5%
- Red Curry poste	5%		
- coconut cream	28%		
- Egg plant	3%		
- Chilli	2%		
- sugar	1%		
5. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2		14. Gelatin ไก่ทำแห้ง	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- Pork	63%	ข้อเอ็นไก่	100%
- Red Curry poste	5%		
- coconut cream	28%		
- Chilli	2%		
- sugar	1%		
6. หมูยอ		15. Gelatin หมูทำแห้ง	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
- เนื้อหมู	90%	หนังหมู	100%
- เครื่องเทศ	4%		
- น้ำตาล	3%		
- เกลือ	3%		
7. ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1		16. นมผสม collagen ชนิดที่ I	
ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
มีเนื้อหมูอบแห้ง	1%	- นมถั่วเหลือง	88.8%

		- น้ำตาล - นมผงธรรมดา - ไขมันพืช - คอลลาเจน	7% 2.5% 1.7%
8. นมผสม collagen ชนิดที่ 2			
ส่วนประกอบ	ปริมาณ		
- นมถั่วเหลือง - น้ำตาล - นมผงธรรมดา - ไขมันพืช - คอลลาเจน	88.8% 7% 2.5% 1.7%		
9. รังนกผสมคอลลาเจน			
ส่วนประกอบ	ปริมาณ		
- ซอร์บิทอล - ไซลิทอล - คอลลาเจน - รังนก	12% 4% 1.4% 1.1%		

4.1 ในแต่ละตัวอย่างที่ตรวจสอบจะแบ่งชุดทดสอบ 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

1) ชุด ทดลองที่ 1 DNA จากผลิตภัณฑ์อาหารดังที่กล่าวข้างต้น

2) ชุดการทดลองที่ 2 เนื้อหมูผสมกับผลิตภัณฑ์อาหารดังที่กล่าวข้างต้น

เพื่อตรวจสอบว่าในแต่ละผลิตภัณฑ์มีสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือไม่ถ้ามีจะให้ผลเป็นลบทั้งสองชุดการทดลอง ถ้าไม่มีจะให้ผลบวกเฉพาะในชุดทดลองที่ 2 ในกรณีที่ตัวอย่างตรวจสอบเป็นลบ

4.1.1 สกัด DNA จากตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่

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

4.1.3 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด ด้วยเทคนิค PCR โดยทุกตัวอย่างเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer 3 คู่ดังนี้

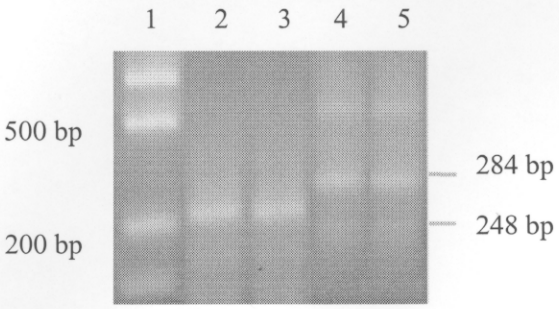
4.1.3.1 Primer สำหรับตรวจสอบการสกัด DNA (Bellis, *et al.*, 2003) โดยสภาวะและปริมาณสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยนำมาแยกแถบ DNA บน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นตรวจสอบผลภายใต้ UV

4.1.3.1 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*, 2001) เปรียบเทียบกับการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมู ในส่วน Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) โดยเตรียมสารละลายและสภาวะต่างๆ เหมือนการทดลองที่ผ่านมา แล้วเข้าเครื่อง PCR หลังจากนั้นตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยนำมาแยกแถบ DNA บน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นตรวจสอบผลภายใต้ UV

ผลการทดลอง

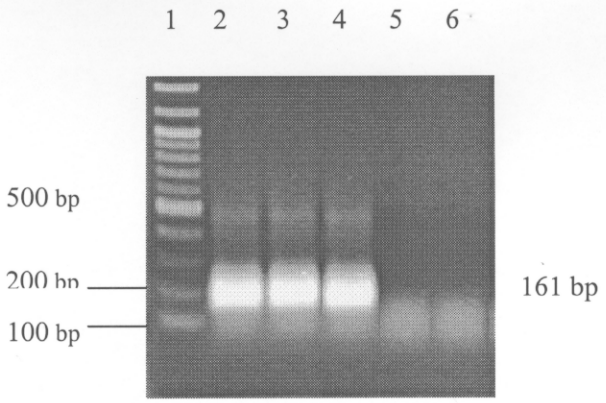
1. การศึกษาความเหมาะสมของ Primer ที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในส่วน repetitive element

1.1 การตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ primer β-actin F และ β-actin R ได้แถบดีเอ็นจากเนื้อไก่และเนื้อวัว มีขนาด 284 คู่เบส ส่วนเนื้อหมูได้แถบดีเอ็นเอมีขนาด 248 คู่เบส ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 1



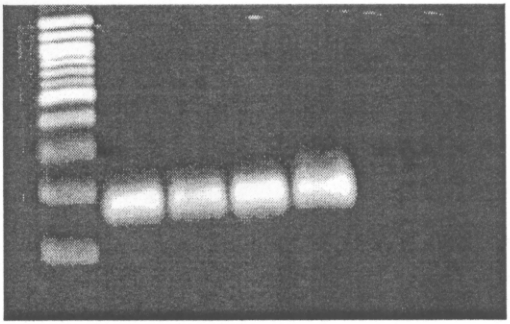
รูปที่ 1 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน β-actin โดย lane 1 EZ load marker, lane 2 เนื้อหมูสด, lane 3 เนื้อหมู 120 ^{O}C, lane 4 เนื้อไก่และ lane 5 เนื้อ วัว

1.2 ตรวจสอบความเหมาะสมของ primer ที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมู ในส่วน repetitive element โดยใช้ตัวอย่าง เนื้อหมูสด ตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่ เนื้อวัว หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อหมูสดเท่านั้น มีขนาด 161 คู่เบส สำหรับเนื้อไก่และเนื้อวัว ให้ผลเป็นลบ ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน Repetitive element โดย lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมู 1, lane 3 เนื้อหมู 2, lane 4 เนื้อหมู 3, lane 5 เนื้อไก่และ lane 6 เนื้อวัว

1.3 ตรวจสอบความเหมาะสมของ primer ที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมู ในส่วน repetitive element (PigpreF, PigpreR) โดยใช้ตัวอย่าง เนื้อหมูผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยมีตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่ เนื้อวัว หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยเทคนิค PCR พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เท่านั้น มีขนาด 161 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเนื้อหมูดิบ สำหรับเนื้อไก่และเนื้อวัว ให้ผลเป็นลบ ผลที่แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน Repetitive element โดย lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมูผ่านความร้อน 120°C , lane 3 เนื้อหมูผ่านความร้อน 120(C, lane 4 เนื้อหมูผ่านความร้อน 120 (C, lane 5 เนื้อหมู lane 6 เนื้อไก่และเนื้อวัว

1.4 การตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมู ในส่วน repetitive element (PigpreF, PigpreR) แล้ว BLAST เข้าสู่ฐานข้อมูลสากลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ DNA หมู 100% และได้ทำการบรรจุเข้าฐานข้อมูลสากล มีเลขทะเบียน คือ DQ648898

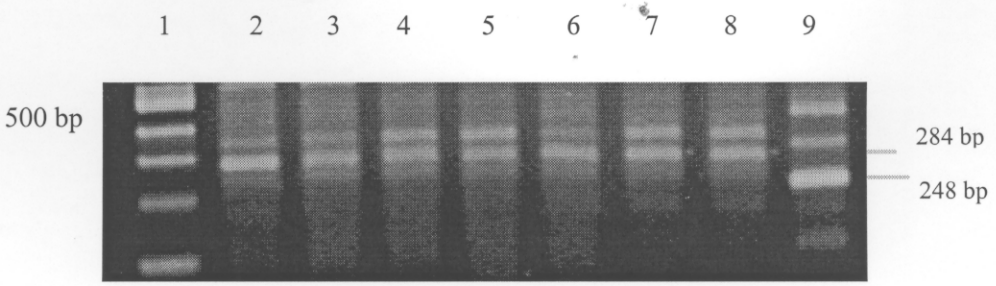
ตารางที่ 2 สรุปหัวข้อการวิจัยที่ 1 ศึกษาความเหมาะสมของ Primer ที่ใช้ในส่วน repetitive element

ตัวอย่าง	β-actin			Pigpre-1-F,R		
หมูสด	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผ่านความร้อนสูง	+	+	+	+	+	+
เนื้อไก่	+	+	+	-	-	-
เนื้อวัว	+	+	+	-	-	-

2. ศึกษาเปรียบเทียบความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์

2.1 ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

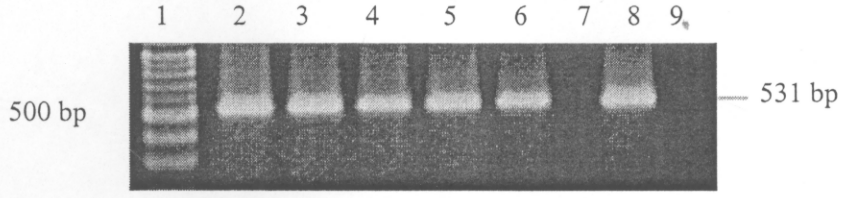
2.1.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่างๆ และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ หลังจากตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*, 2003) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 248 และ 284 คู่เบส ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน β-actin โดย lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%, lane 3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.005%, lane 4 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0025%, lane 5 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0010%, lane 6 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0005%, lane 7 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00025%, Lane 8เนื้อไก่ และlane 9 เนื้อหมู

2.1.2 ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยใช้ primer ในส่วน Mitochondrial DNA

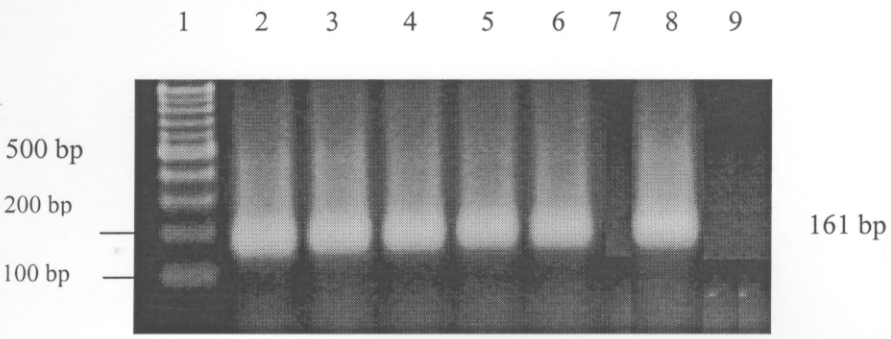
ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 531 คู่เบส โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.0005% ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer Pig F,R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%, lane 3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.005%, lane 4 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0025%, lane 5 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0010%, lane 6 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0005%, lane 7 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00025%, lane 8 เนื้อหมูและ lane 9 เนื้อไก่

2.1.3 ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer PigPre-1-F,R ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.0005% ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigPre-1-F,R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%, lane 3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.005%, lane 4 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0025%, lane 5 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0010%, lane 6 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0005%, lane 7 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00025%, lane 8 เนื้อหมูและ lane 9 เนื้อไก่

ตารางที่ 3 สรุปการเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาการตรวจสอบ

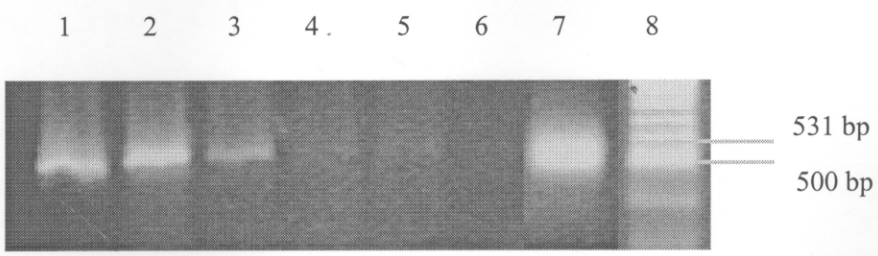
การตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้ primerในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element

ตัวอย่าง	β-actin			Pigpre-1-F,R			PigF,R		
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.005%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0025%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.001%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.0005%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.00025%	+	+	+	-	-	-	-	-	-

จากการทดลอง การเปรียบเทียบการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ primer ทั้งสองชนิดนี้ไม่แตกต่างกันโดย primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนทั้งในส่วน mitochondial DNA และในส่วน repetitive สามารถตรวจสอบระดับต่ำมากที่สุดที่ 0.0005% เท่ากัน

2.2 ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนโดยใช้ primer ในส่วน Mitochondrial DNA

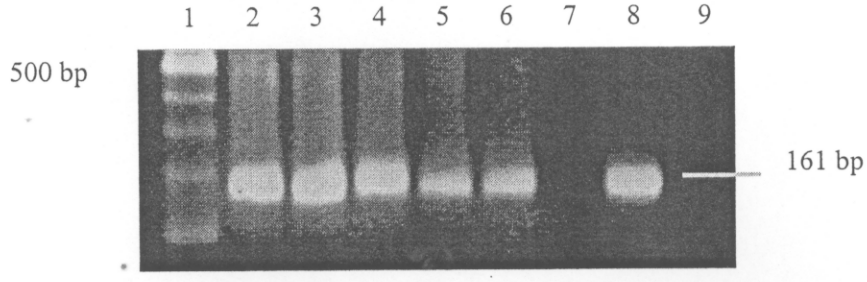
2.2.1 ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตรว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ได้ผ่านความร้อนอัตราส่วนดังนี้คือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 531 คู่เบส โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.0005% ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R ในเนื้อที่ผ่านความร้อน 120 °C lane 1 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 1%, lane 2 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.5%, lane 3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.2%, lane 4 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.1%, lane 5 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.05%, lane 6 เนื้อไก่ 0, lane 7 เนื้อหมูและ lane 8 100 bp DNA marker

2.2.2 ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในตัวอย่างที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยใช้ primer PigPre-1-F,R

ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความไวของการตรวจการปนเปื้อนเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อสัตรว์ชนิดอื่นในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% และมีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ หลังจากตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer PigPre-1-F,R ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมา แยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส โดยพบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.0005% ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigPre-1-F,R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 1%, lane 3 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.5%, lane 4 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.2%, lane 5 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.1%, lane 6 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.05%, lane 7 เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.04%, lane 8 เนื้อหมูและ lane 9 เนื้อไก่

จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วนของ Repetitive Element ในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูงพบว่าสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดที่ 0.05%

ตารางที่ 4 สรุปหัวข้อ 2.2 เปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ผ่านความร้อนสูงในอัตราส่วนคือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% โดยใช้ primer ในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element

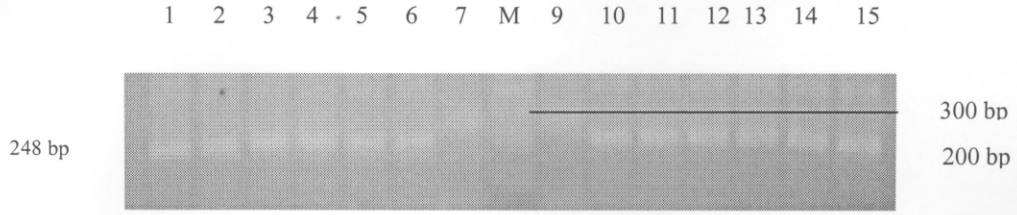
ตัวอย่าง	β-actin			Pigpre-1-F,R			PigF,R		
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.2%	+	+	+	+	+	+	-	-	-
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.1%	+	+	+	+	+	+	-	-	-
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.05%	+	+	+	+	+	+	-	-	-
เนื้อหมูผสมเนื้อไก่ 0.04%	+	+	+	-	-	-	-	-	-

ผลจากการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูงพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา Primer ที่ใช้ในการตรวจสอบในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2 % ซึ่งความไวของปฏิกริยาน้อยกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบในส่วนของ repetitive DNA พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีกว่า โดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดเพียง 0.05 % เท่านั้น ซึ่งprimer ที่

ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element มีความไวมากกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน mitochondrial DNA ถึง 4 เท่า

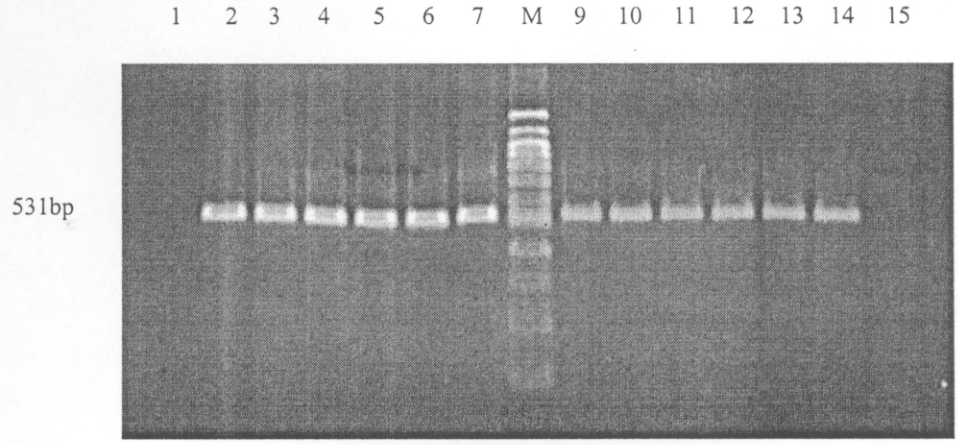
3. ผลการศึกษาความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างเนื้อหมูในเนื้อเนื้อหมูดิบ

3.1 ผลที่ได้จากการตรวจสอบขบวนการสกัดดีเอ็นเอโดยนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer β-actin (Bellis, *et al.*, 2003) ตรวจสอบ PCR product พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 248 คู่เบส ดังรูปที่ 9 ในทุกๆ pH ที่ทำการศึกษา



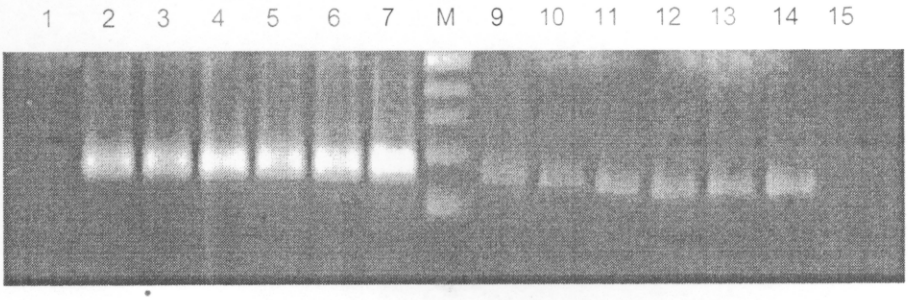
รูปที่ 9 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer β-actinF/R , lane 1-3 เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อน ในสารละลาย NaOH ที่ pH 12, 10 และ 8 ตามลำดับ, lane 4-6 เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อน ในสารละลาย HCl ที่ pH 6,4 และ 2 ตามลำดับ, lane 7 คือ เนื้อไก่ที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C, lane 8 100 bp DNA marker, lane 9 เนื้อไก่ที่ผ่านความร้อนที่ 120°C, lane 10-12 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย HCl ที่ pH 2,4 และ 6 ตามลำดับ, lane 13-15 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย NaOH ที่ pH 8, 10 และ 12 ตามลำดับ

3.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมู ในส่วน Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.*, 2000) ในตัวอย่างที่เป็นเนื้อหมูสดและเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 120°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตรวจสอบว่าเทคนิค PCR ที่ใช้การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมู สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ในระดับ pH ใดบ้าง โดยหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในทุกระดับ pH ซึ่งพบว่าระดับ pH ไม่ได้มีผลต่อการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูโดยเทคนิค PCR โดยแถบดีเอ็นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงจะมีลักษณะจางไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง ดังภาพที่ 10



รูปที่ 10 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF, R lane 1 ตัวควบคุมเป็นลบคือ เนื้อไก่, lane 2-4 เนื้อหมู ในสารละลาย NaOH ที่ pH 12, 10 และ 8 ตามลำดับ, lane 5-7 เนื้อหมู ในสารละลาย HCl ที่ pH 6,4 และ 2 ตามลำดับ, lane 8 100 bp DNA marker, lane 9-11 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย HCl ที่ pH 2,4 และ 6 ตามลำดับ, lane 12-14 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย NaOH ที่ pH 8, 10 และ 12 ตามลำดับ lane 15 ตัวควบคุมเป็นลบคือ เนื้อไก่ที่ผ่านความร้อนที่ 120°C

3.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNA หมู ในส่วน Primer ในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*, 2001) ในตัวอย่างที่เป็นเนื้อหมูสดและเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 120°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตรวจสอบว่าเทคนิค PCR ที่ใช้การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูโดยใช้ Primer ในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*, 2001) สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ในระดับ pH ใดบ้าง โดยหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอบน 1.5% agarose แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลที่ได้ภายใต้ รังสี UV จะได้แถบดีเอ็นเอมีขนาด 161 คู่เบส ในทุกระดับ pH ซึ่งพบว่าระดับ pH ไม่ได้มีผลต่อการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูโดยเทคนิค PCR โดยแถบดีเอ็นในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงจะมีลักษณะจางไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง ดังภาพที่ 11

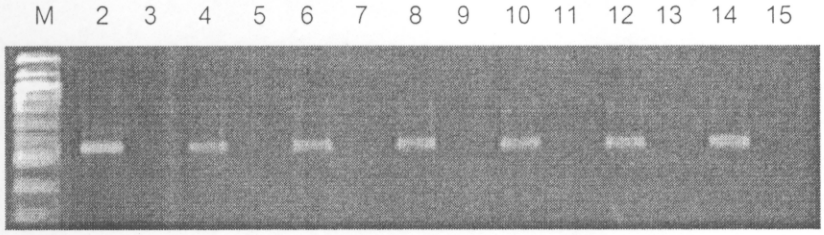


รูปที่ 11 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PrepigF/R lane 1 ตัวควบคุมเป็นลบคือ เนื้อไก่ที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C, lane 2-4 เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย NaOH ที่ pH 12, 10 และ 8 ตามลำดับ, lane 5-7 เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120° C ในสารละลาย HCl ที่ pH 6,4 และ 2 ตามลำดับ, lane 8 100 bp DNA marker, lane 9-11 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย HCl ที่ pH 2,4 และ 6 ตามลำดับ, lane 12-14 เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C ในสารละลาย NaOH ที่ pH 8, 10 และ 12 ตามลำดับ lane 15 ตัวควบคุมเป็นลบคือ เนื้อไก่ที่ผ่านความร้อนที่ 120°C

ผลการตรวจสอบ เมื่อตรวจหาดีเอ็นเอหมูด้วย primer ในส่วน repetitive Element จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบสในทุกๆระดับ pH และเห็นแถบดีเอ็นในตัวอย่างทั้งที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและตัวอย่างที่ผ่านความร้อน 120°C เป็นเวลา 15 นาทีได้ แต่พบว่าแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงจะมีลักษณะจางไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง จากการทดลองพบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอหมู ในระดับ pH ต่างๆได้ โดยสามารถใช้ primer ในส่วน repetitive element และ pimer ในส่วน mitochondrial DNA ได้

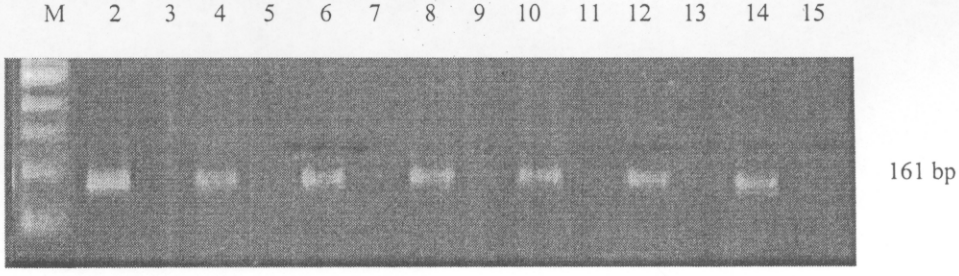
3.4 ผลจากการศึกษาความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยใช้ primerในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element ตามอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01%, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อไก่ ใช้ Primer สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000)

ผลที่ได้จากการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ primer ในส่วน mitochorn drial DNA ในตัวอย่างที่เนื้อสดที่ระดับ pH ต่างพบว่า ทุกระดับ pH สามารถตรวจสอบในระดับที่มีการปนเปื้อนของเนื้อหมูที่ 0.01% เท่านั้น ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C โดยใช้ primer PigF, R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 ตัวควบคุมเป็นบวกคือเนื้อหมู, lane 3 ตัวควบคุมเป็นลบคือเนื้อไก่, lane 4-5 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 2 ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.005% ตามลำดับ, lane 6-7 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 4 ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.005% ตามลำดับ, lane 8-9 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 6 ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.005% ตามลำดับ, lane 10-11 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 8 ที่ความเข้มข้น 0.01% และ 0.005% ตามลำดับ, lane 12-13 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.02% และ 0.01% ตามลำดับ, lane 14-15 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.02%และ 0.01% ตามลำดับ

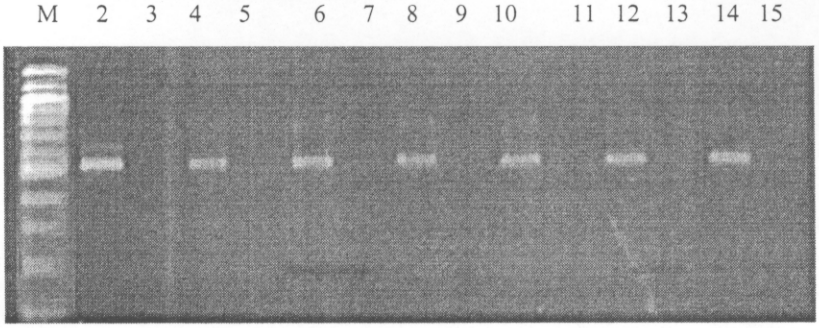
3.5 ผลจากการศึกษาความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีโดยใช้ primerในส่วนของ โดยใช้ primer PigPre-1-F,R ตามอัตราส่วนดังนี้คือ 0.01%, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% มีตัวควบคุมเป็นบวกคือ เนื้อหมูสด, ตัวควบคุมที่เป็นลบคือ เนื้อ ผลที่ได้จากการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ primer ในส่วน Repetitive element พบว่า ทุกระดับ pH สามารถตรวจสอบในระดับที่มีการปนเปื้อนของเนื้อหมูที่ 0.0005 % เท่านั้น ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C โดยใช้ primer PigPre-1-F,R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 ตัวควบคุมเป็นบวกคือเนื้อหมู, lane 3 ตัวควบคุมเป็นลบคือเนื้อไก่, lane 4-5 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 2 ที่ความเข้มข้น 0.0005% และ 0.0002% ตามลำดับ, lane 6-7 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 4 ที่ความเข้มข้น 0.0005% และ 0.0002% ตามลำดับ, lane 8-9 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 6 ที่ความเข้มข้น 0.0005% และ 0.0002% ตามลำดับ, lane 10-11 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 8 ที่ความเข้มข้น 0.0005% และ 0.0002% ตามลำดับ, lane 12-13 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.001% และ 0.0005% ตามลำดับ, lane 14-15 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.001% และ 0.0005% ตามลำดับ

ผลที่ได้จากการตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element ในตัวอย่างที่เนื้อสดที่ระดับ pH ต่างพบว่า ทุกระดับ pH สามารถตรวจสอบในระดับที่มีการปนเปื้อนของเนื้อหมูที่ 0.0005 % เท่านั้น ซึ่งพบว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element มีความไวในการตรวจสอบกว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNAหมูในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ถึง 20 เท่า

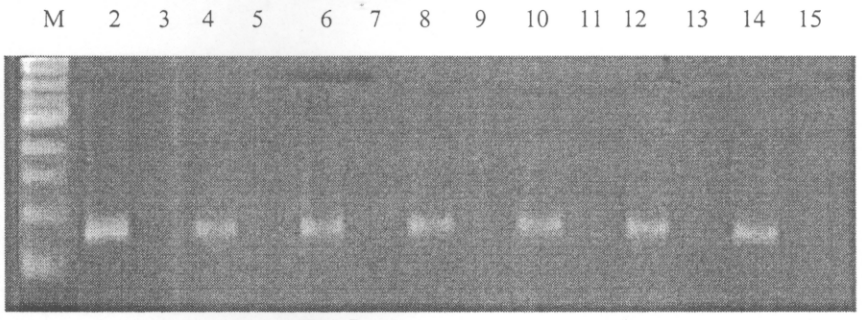
3.6 ผลการศึกษาความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ primer ในส่วนของ mitochondrial DNA ตรวจสอบการปนเปื้อนในอัตราส่วนดังนี้คือ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส พบว่า ทุกระดับ pH ได้โดยปริมาณที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ที่ 2.0% ในทุกๆ pH ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C โดยใช้ primer PigF, R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 ตัวควบคุมเป็นบวกคือเนื้อหมู, lane 3 ตัวควบคุมเป็นลบคือเนื้อไก่, lane 4-5 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 2 ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.1%

ตามลำดับ, lane 6-7 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 4 ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.1% ตามลำดับ, lane 8-9 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 6 ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.1% ตามลำดับ, lane 10-11 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 8 ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.1% ตามลำดับ, lane 12-13 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.2% ตามลำดับ, lane 14-15 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.2% ตามลำดับ

3.7 หลังจากตรวจสอบความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ระดับ pH ต่างๆ ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียสโดยใช้ primerในส่วนของ repetitive element หลังจากนั้นนำไปแยกแถบดีเอ็นเอ บน 1.5% agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสง UV ผลที่ได้จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบสในทุกๆ pH ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C โดยใช้ primer PigPre-1-F,R lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 ตัวควบคุมเป็นบวกคือเนื้อหมู, lane 3 ตัวควบคุมเป็นลบคือเนื้อไก่, lane 4-5 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 2 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.02% ตามลำดับ, lane 6-7 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 4 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.02% ตามลำดับ, lane 8-9 เนื้อหมูในสารละลาย HCl ที่ pH 6 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.02% ตามลำดับ, lane 10-11 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 8 ที่ความเข้มข้น 0.05% และ 0.02% ตามลำดับ, lane 12-13 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.05% ตามลำดับ, lane 14-15 เนื้อหมูในสารละลาย NaOH ที่ pH 10 ที่ความเข้มข้น 0.1% และ 0.05% ตามลำดับ

ตารางที่ 5 สรุปผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ระดับ pH ต่างๆ

Primer	เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigF, R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
PigPre-1-F,R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
β-actinF/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Primer	เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigF, R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
PigPre-1-F,R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
β-actinF/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Primer	เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ปริมาณดีเอ็นเอหมู	0.005%			0.005%			0.005%			0.005%			0.002%			0.002%			-			-		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigF, R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Primer	เนื้อหมูที่ไม่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ปริมาณดีเอ็นเอหมู	0.0002%			0.0002%			0.0002%			0.0002%			0.001%			0.001%			-			-		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigPre-1-F,R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Primer	เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ปริมาณดีเอ็นเอหมู	0.2%			0.2%			0.2%			0.2%			0.5%			0.5%			-			-		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigF, R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Primer	เนื้อหมูที่ผ่านความร้อนที่ 120°C																		ตัวควบคุมลบ			ตัวควบคุมบวก		
	pH 2			pH 4			pH 6			pH 8			pH 10			pH 12			เนื้อไก่			เนื้อหมู		
ปริมาณดีเอ็นเอหมู	0.05%			0.05%			0.05%			0.05%			0.1%			0.1%			-			-		
ครั้งที่	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PigPre-1-F,R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

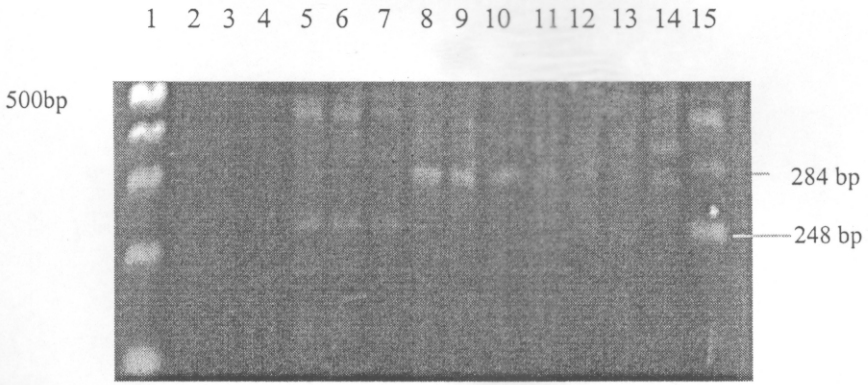
จากการศึกษาความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างเนื้อหมูที่มีผลต่อการตรวจสอบ DNA หมู ด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนเอ็นเอหมูในตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูงและผ่านความร้อนสูงที่ระดับ pH ต่าง เมื่อตรวจสอบในเนื้อหมูที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส ในทุกระดับ pHคือ pH2 pH4 pH6 Ph 8 pH 10 pH12 โดยผลการตรวจสอบที่ได้เหมือนกันเมื่อใช้ primer ในส่วน Repetitive element จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 161 คู่เบสในทุกระดับ pH

เมื่อศึกษาความไวของปฏิกริยา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับชนิดอื่นในอัตราส่วนต่างๆที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.05% ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อชนิดอื่นได้น้อยกว่าเมื่อตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน Repetitive element ซึ่งสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.002% เท่านั้น พบว่ามีความไวมากกว่า การตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer mitochondrial DNA ถึง 25 เท่า เมื่อศึกษาความไวของปฏิกริยาในตัวอย่างเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อชนิดอื่นที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.2% ซึ่งพบว่ามีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อชนิดอื่นได้น้อยกว่าเมื่อตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน Repetitive element ซึ่งสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำเพียง 0.05% เท่านั้น พบว่ามีความไวมากกว่า การตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer mitochondrial DNA ถึง 4 เท่า ผลที่ได้พบว่า primer ในส่วน Repetitive element สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมีความไวของปฏิกริยามากกว่า primer ในส่วน mitochondrial DNA

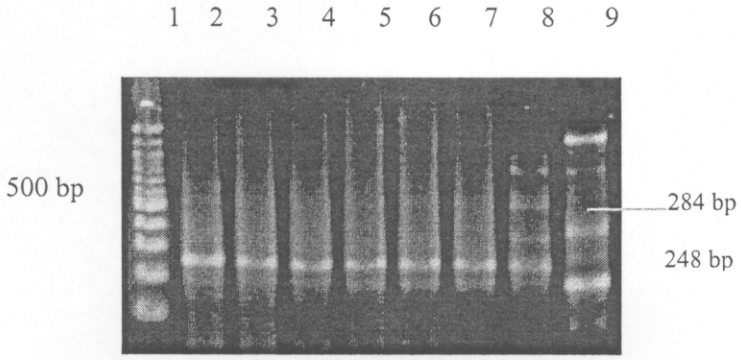
4. ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลและ รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต

4.1 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สำหรับตรวจสอบการสกัด DNA β-actin (Bellis, *et al.*,2003) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบผลการเพิ่ม

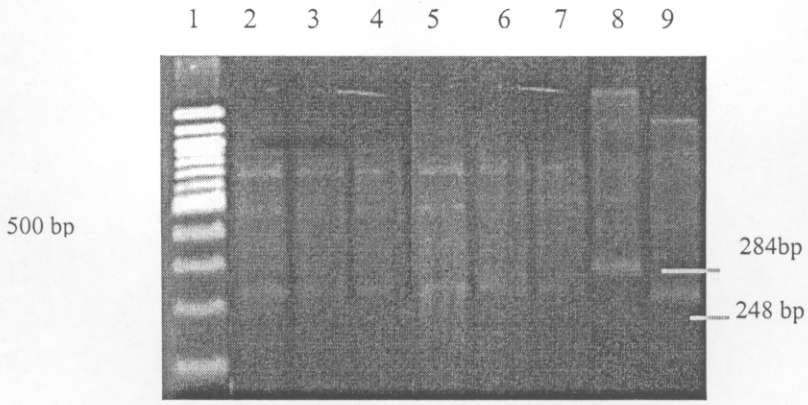
ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยนำมาแยกแถบ DNA บน 1.5 % agarose gel พบว่าในตัวอย่างบางประเภทเช่น gelatin จะไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นได้ แต่ในตัวอย่างอื่น สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้แต่ไม่ชัดเจนนัก ในตัวอย่าง กุนเชียงไก่ กุนเชียงปลา กุนเชียงหมู ฯลฯ แต่ในตัวอย่างที่ควบคุมที่มีเนื้อหมูผสมลงไปเพื่อตรวจสอบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิดมีสารยับยั้งขบวนการ PCR หรือไม่ พบว่าสามารถเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 248 คู่เบสได้ ดังรูปที่ 16, รูปที่ 17, รูปที่ 18, รูปที่ 19, รูปที่ 20



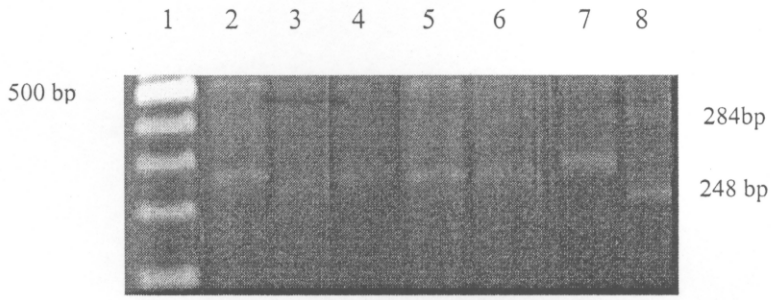
รูปที่ 16 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ ในส่วน β-actin Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 Gelatin ตัวอย่างที่ 1, Lane 3 Gelatin ตัวอย่างที่ 2, Lane 4 Gelatin ตัวอย่างที่ 3, Lane 5 Gelatin ตัวอย่างที่ 1 ผสมเนื้อหมู, Lane 6 Gelatin ตัวอย่างที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 7 Gelatin ตัวอย่างที่ 3ผสมเนื้อหมู, Lane 8 กุนเชียงไก่ (sample 1) , Lane 9 กุนเชียงปลา, Lane 10 กุนเชียงหมู,Lane 11 กุนเชียงไก่ (sample 1)ผสมเนื้อหมู , Lane 12 กุนเชียงปลาผสมเนื้อหมู, Lane 13 กุนเชียงหมูผสมเนื้อหมู , Lane 14 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 15 เนื้อหมูเป็น positive control



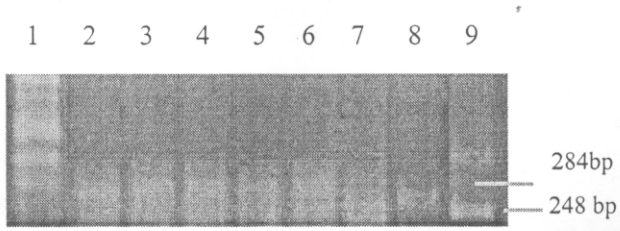
รูปที่ 17 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ ในส่วน β-actin Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1, Lane 3 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2, Lane 4 หมูยอ 3, Lane 5 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู 1, Lane 6 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 7 หมูยอผสมหมู, Lane 8 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control



รูปที่ 18 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ ในส่วน β-actin Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 ลูกชิ้นหมู, Lane 3 ซุปก้อนหมูชนิดที่ , Lane 4 ซุปหมูชนิดที่ 2, Lane 5 ลูกชิ้นหมูผสมเนื้อหมู, Lane 6 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 7 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 8 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control



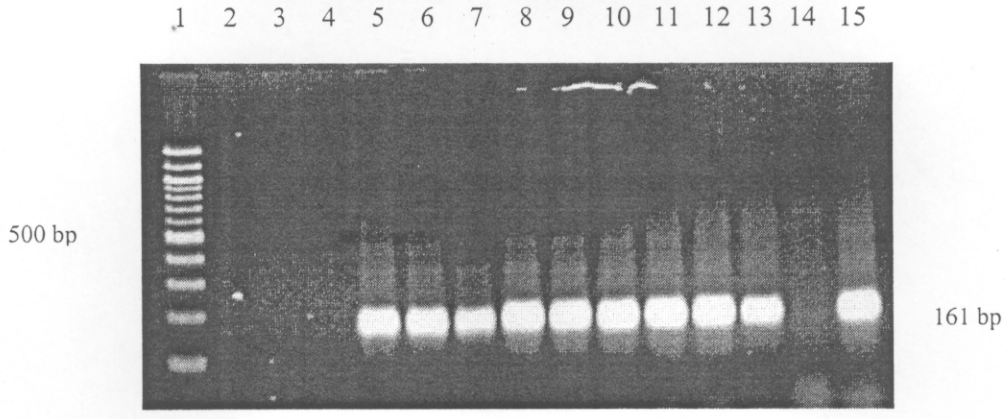
รูปที่ 19 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ ในส่วน β-actin Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 gellatin ไก่ทำแห้ง, Lane 3 gellatin หมูทำแห้ง, Lane 4 นมผสม collagen ชนิดที่ 1, Lane 5 gellatin ไก่ทำแห้งผสมเนื้อหมู, Lane 6 gellatin หมูทำแห้งผสมเนื้อหมู, Lane 7 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control



รูปที่ 20 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ ในส่วน β-actin Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 นมผสม collagen ชนิดที่ 1, Lane 3นมผสม collagen ชนิดที่ 2, Lane 4 รังนกผสม collagen, Lane 5นมผสม collagen ชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 6 นมผสม collagen ชนิดที่ 2ผสมเนื้อหมู, Lane 7 รังนกผสม collagen ผสมเนื้อหมู, Lane 8 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 9 เนื้อหมูเป็น positive control

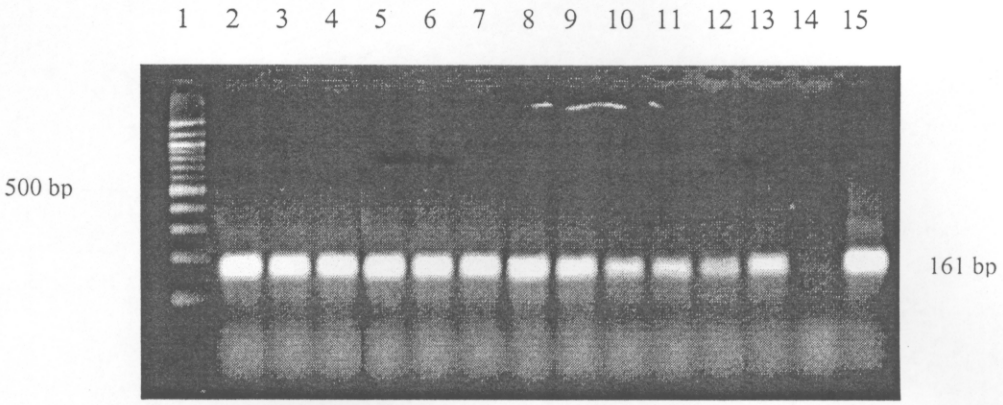
4.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,2001) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำมาแยกแถบ DNA บน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นตรวจสอบผลภายใต้ UV พบในตัวอย่างที่เป็นขนมที่มีส่วนผสมของ Gelatin (มีเครื่องหมายฮาลาล) ให้ผลเป็นลบ แต่ในตัวอย่างเดียวกันที่ได้ผสมเนื้อหมูลงไปด้วยสามารถตรวจสอบได้โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 161 คู่เบส แสดงว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบดังกล่าวไม่มีสารยับยั้งขบวนการ PCR แต่ให้ผลเป็นลบเนื่องจากว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของหมูเมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ในส่วน repetitive element สำหรับตัวอย่างที่เป็นกุนเชียงไก่ (ไม่มีเครื่องหมายฮาลาล) กุนเชียงปลา (ไม่มีเครื่อง

หมายฮาลาล) กุนเชียงหมูนั้น สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูได้ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอ สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 161 คู่เบส โดย PCR product ที่ได้ตรงกับขนาดของดีเอ็นเอหมูสดซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก สำหรับตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่จะไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 21



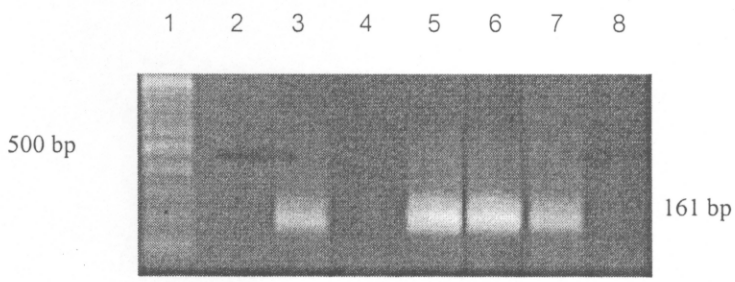
รูปที่ 21 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer Pigpre-1-F,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 Gelantin ชนิดที่ 1, Lane 3 Gelatin ชนิดที่ 2, Lane 4 Gelatin ชนิดที่ 3, Lane 5 Gelatin ชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 6 Gelatine ชนิดที่ 2ผสมเนื้อหมู, Lane 7 Gelatin ชนิดที่ 3ผสมเนื้อหมู, Lane 8 กุนเชียงไก่ , Lane 9 กุนเชียงปลา , Lane 10 กุนเชียงหมู,Lane 11 กุนเชียงไก่ผสมเนื้อหมู, Lane 12 กุนเชียงปลาผสมเนื้อหมู, Lane 13 กุนเชียงหมูผสมเนื้อหมู, Lane 14 เนื้อไก่เป็น Negative control และ Lane 15 เนื้อหมูเป็น positive control

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*, 2001) พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส ในตัวอย่างที่เป็น แกงเผ็ดหมู หมูยอ ซุปก้อนหมู ลูกชิ้นหมู โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดของ หมูสดซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก และในตัวอย่างเดียวกับที่ได้ผสมเนื้อหมูสดลงไปเพื่อตรวจว่ามีสารยับยั้งขบวนการ PCR หรือไม่ พบว่าให้ผลเป็นบวกเหมือนกัน แต่ให้ผลเป็นลบในตัวควบคุมที่เป็นลบ ดังรูปที่ 22



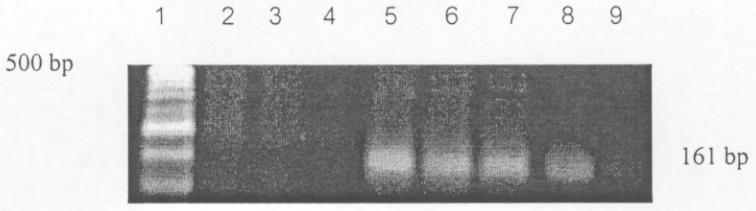
รูปที่ 22 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer Pigpre-1-F,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 แกงเผ็ดหมู ชนิดที่ 1, Lane 3 แกงเผ็ดหมู ชนิดที่ 2, Lane 4 หมูยอ, Lane 5 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 6 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู,Lane 7 หมูยอผสมเนื้อหมู, Lane 8 ซุปก้อนหมู, Lane 9 ลูกชิ้นหมู ชนิดที่ 1, Lane 10 ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 2, Lane 11 ซุปก้อนหมูผสมเนื้อหมู , Lane 12 ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 1 ผสมเนื้อหมู, Lane 13 ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 2ผสมเนื้อหมู, Lane 14 เนื้อไก่เป็น Negative control, Lane 15 เนื้อหมูเป็น positive control

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,)2001) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส ในตัวอย่างที่ได้จาก gelatin หมูที่ผ่านการทำแห้ง และในตัวอย่างที่ได้จาก gelatin หมูที่ทำแห้งที่ผสมเนื้อหมู ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวควบคุมที่เป็นบวก แต่ในตัวอย่างที่เป็น gelatin ไก่ให้ผลเป็นลบ เช่นเดียวกับตัวควบคุมที่เป็นลบ ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigpreF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 gelatinไก่ทำแห้ง 1, Lane 3 gelatin จากหมู ทำแห้ง, Lane 4 เนื้อไก่เป็น Negative control, Lane 5 gellatinไก่ทำแห้งผสมเนื้อหมู, Lane 6 gelatine จากหมูทำแห้งผสมเนื้อหมู, Lane 7 เนื้อหมูเป็น positive control และ lane 8 เนื้อไก่เป็น negative control

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วน repetitive element (Calvo, *et al.*,)2001) ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบสในตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจาก นมผสม collagen และในตัวอย่างที่ได้จากรังนกผสม collagen ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับตัวควบคุมที่เป็นลบ แต่จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบสในตัวอย่างที่ได้ตัวอย่างดังกล่าวที่ผสมกับเนื้อหมู เพื่อตรวจสอบสารที่ยับยั้งขบวนการ PCR ในตัวอย่างดังกล่าวซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวควบคุมที่เป็นบวก ดังรูปที่ 24

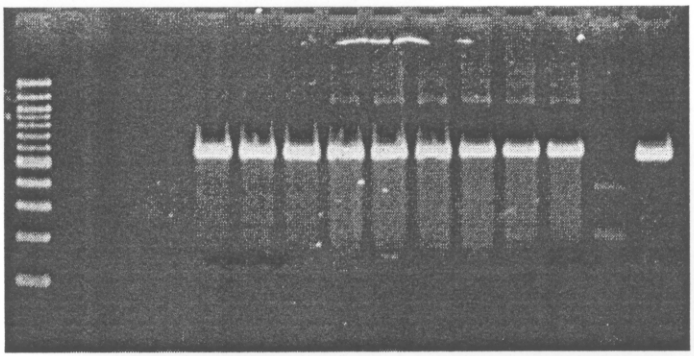


รูปที่ 24 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigpreF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 นมผสมcollagen 1, Lane 3 นมผสม collagen ชนิดที่ 2, Lane 4 รังนกผสม collagen Lane 5 นมผสมcollagen ชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู , Lane 6 นมผสม collagenชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 7 รังนกผสมเนื้อหมู, Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control และ Lane 9 เนื้อไก่เป็น Negative control

4.3 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมู ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำแยกแถบ DNA บน 1.5 % agarose gel ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย ethidium bromide หลังจากนั้นตรวจสอบผลภายใต้ UV พบในตัวอย่างที่เป็นขนมที่มีส่วนผสมของ Gelatin (มีเครื่องหมายฮาลาล) ให้ผลเป็นลบ แต่ในตัวอย่างเดียวกันที่ได้ผสมเนื้อหมูลงไปด้วยสามารถตรวจสอบได้โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส แสดงว่าตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบดังกล่าวไม่มีสารยับยั้งขบวนการ PCR แต่ให้ผลเป็นลบเนื่องจากว่า ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอของหมูเมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ในส่วนของ mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000) สำหรับตัวอย่างที่เป็นกุนเชียงไก่ (ไม่มีเครื่องหมายฮาลาล) กุนเชียงปลา (ไม่มีเครื่องหมายฮาลาล) กุนเชียงหมูนั้น สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูได้ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำมาแยกแถบดีเอ็นเอ สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 161 คู่เบส โดย PCR product ที่ได้ตรงกับขนาดของดีเอ็นเอหมูสดซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก สำหรับตัวควบคุมที่เป็นลบคือเนื้อไก่จะไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ ดังรูปที่ 25

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

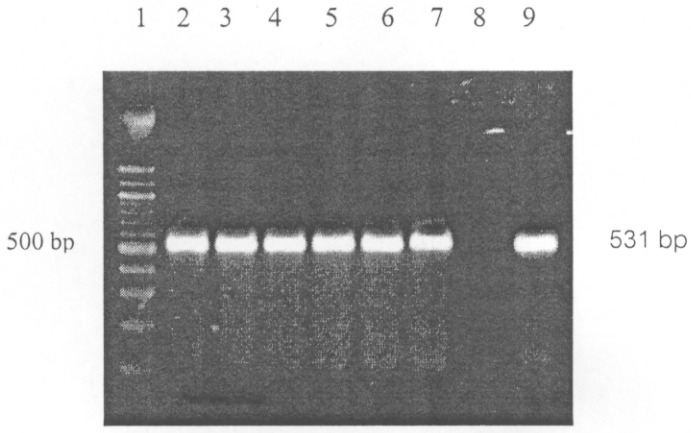
500 bp



531 bp

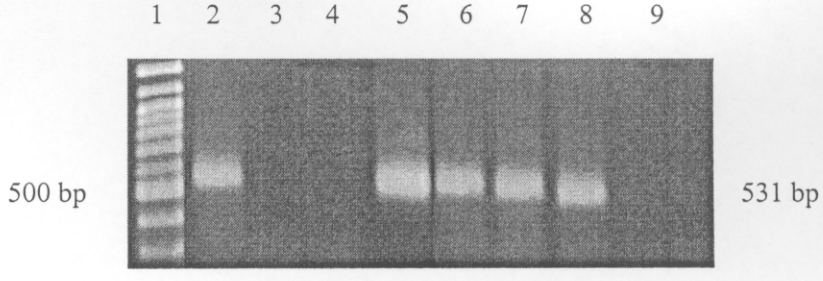
รูปที่ 25 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 Gelantine ชนิดที่ 1, Lane 3 Gelatine ชนิดที่ 2, Lane 4 Gelatine ชนิดที่ 3, Lane 5 Gelatine ชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 6 Gelatine ชนิดที่ 2ผสมเนื้อหมู, Lane 7 Gelatine ชนิดที่ 3 ผสมเนื้อหมู, Lane 8 กุนเชียงไก่ , Lane 9 กุนเชียงปลา, Lane 10 กุนเชียงหมู,Lane 11 กุนเชียงไก่ผสมเนื้อหมู, Lane 12 กุนเชียงปลาผสมเนื้อหมู,Lane 13 กุนเชียงหมูผสมเนื้อหมู, Lane 14 เนื้อไก่เป็น Negative control, Lane 15 เนื้อหมูเป็น positive control

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000) พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 531 คู่เบส ในตัวอย่างที่เป็น แกงเผ็ดหมู หมูยอ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดของ หมูสดซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก และในตัวอย่างเดียวกับที่ผสมเนื้อหมูสดลงไปเพื่อตรวจว่าสารยับยั้งขบวนการ PCR พบว่าให้ผลเป็นบวกเหมือนกัน แต่ให้ผลเป็นลบในตัวควบคุมที่เป็นลบ ดังรูปที่ 26

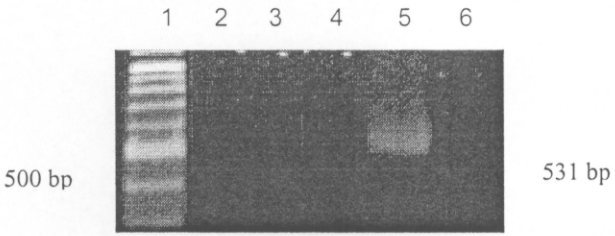


รูปที่ 26 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1, Lane 3 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2, Lane 4 หมูยอ, Lane 5 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1 ผสมเนื้อหมู, Lane 6 แกงหมูชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 7 หมูยอผสมเนื้อหมู,Lane 8 เนื้อไก่เป็น Negative control, Lane 9เนื้อหมูเป็น positive control

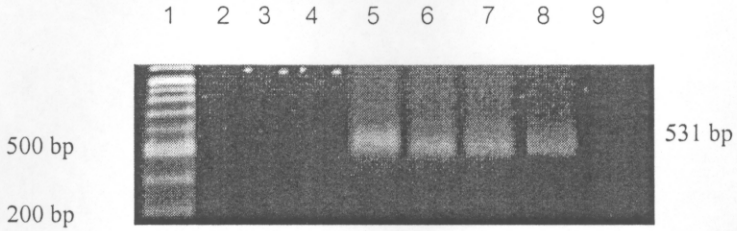
ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบ DNAหมูในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-sosa, *et al.,* 2000) พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 531 คู่เบส ในตัวอย่างที่ได้จาก ลูกชิ้นหมู โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับขนาดของ หมูสดซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก และในตัวอย่างเดียวกับที่ผสมเนื้อหมูสดลงไปเพื่อตรวจว่าสารยับยั้งขบวนการ PCR พบว่าให้ผลเป็นบวกเหมือนกัน แต่ให้ผลเป็นลบในตัวอย่างที่ได้จากซุปก้อนหมู gelatin ที่ได้จากข้อไก่ gelatin หมูที่ทำแห้ง นมที่ผสม collagen และ รังนกผสม collagen ดังรูปที่ 27 รูปที่ 28และรูปที่ 29



รูปที่ 27 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 ลูกชิ้นหมู, Lane 3 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1, Lane 4 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 2, Lane 5 ลูกชิ้นหมูผสมเนื้อหมู , Lane 6 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู, Lane 7 ซุปก้อนหมูชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู, Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control และ Lane 9 เนื้อไก่เป็น Negative control



รูปที่ 28 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 gelatinไก่ทำแห้ง 1, Lane 3 gelatinจากหมู ทำแห้ง, Lane 4 นมผสม collagen ชนิดที่ 1, Lane 5 เนื้อหมูเป็น positive controlและ Lane6 เนื้อไก่เป็น Negative control



รูปที่ 29 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigF,R Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 นมผสม collagen ชนิดที่ 2, Lane 3 นมผสม collagen ชนิดที่ 3, Lane 4 รังนกผสม collagen Lane 5 นมผสมcollagen ชนิดที่ 2 ผสมเนื้อหมู , Lane 6 นมผสม collagenชนิดที่ 3 ผสมเนื้อหมู, Lane 7 รังนกผสมเนื้อหมู, Lane 8 เนื้อหมูเป็น positive control และ Lane 9 เนื้อไก่เป็น Negative control

ตารางสรุปผลการทดสอบในหัวข้อวิจัยที่ 4,5

หัวข้อการวิจัยที่ 4,5 เพื่อศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด

ตัวอย่างที่ใช้	ผล PCRใช้ β-Actin			ผล PCR ใช้ pig F+R			ผล PCR ใช้ pigPre		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1. เจลาตินชนิดที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เจลาตินชนิดที่ 1ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. เจลาตินชนิดที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เจลาตินชนิดที่ 2ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. เจลาตินชนิดที่ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เจลาตินชนิดที่ 3ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. กุนเชียงไก่ (lard ที่ผสมในตัวอย่าง)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
กุนเชียงไก่ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. กุนเชียงปลา(lard ที่ผสมในตัวอย่าง)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
กุนเชียงปลาผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6. กุนเชียงหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
กุนเชียงหมูผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แกงเผ็ดหมูชนิดที่1ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8. แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แกงเผ็ดหมูชนิดที่2ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9. หมูยอ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
หมูยอผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10. ซุปก้อนหมูชนิดที่1	+	+	+	-	-	-	+	+	+
ซุปก้อนหมูผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10. ซุปก้อนหมูชนิดที่2	+	+	+	-	-	-	+	+	+
ซุปก้อนหมูผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11. ลูกชิ้นหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ลูกชิ้นหมู ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. เจลาตินแห้งจากไก่	+	+	+	-	-	-	-	-	-
เจลาตินแห้งจากไก่ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. เจลาตินหมูทำแห้ง	+	+	+	-	-	-	+	+	+
เจลาตินหมูผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14. นมผสมคอลลาเจนชนิดที่ 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
นมผสมคอลลาเจนชนิดที่ 1 ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15. นมผสมคอลลาเจนชนิดที่ 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
นมผสมคอลลาเจนชนิดที่ 2หมู ผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16. รังนกผสมคอลลาเจน	+	+	+	-	-	-	-	-	-
รังนกผสมคอลลาเจนผสมเนื้อหมู	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ผลการทดลองจากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต ซึ่งพบว่าในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น แกงเผ็ดหมู กุนเชียง ยอ ลูกชิ้น และ lard (ซึ่งเป็นไขมันในกุนเชียง) เมื่อตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA พบว่าให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส ในตัวอย่างข้างต้น ซึ่งให้ผลเหมือนกันคือสามารถตรวจสอบได้ในตัวอย่าง แกงเผ็ดหมู กุนเชียง ยอ ลูกชิ้นหมู และ lard เมื่อใช้ primer ในส่วนของ repetitive element จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส

ในตัวอย่างที่ไม่ได้บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเนื้อหมู และไม่มีเครื่องหมายฮาลาล แต่มีการปนเปื้อนเนื้อหมู เช่น กุนเชียงไก่ กุนเชียงปลา เมื่อตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCRใช้ primer ทั้งสองส่วนก็สามารถตรวจสอบให้ผลได้เหมือนกันเมื่อตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส ในตัวอย่างข้างต้น ซึ่งให้ผลเหมือนกันเมื่อใช้ primer ในส่วนของ repetitive element จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส

สำหรับตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อย เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร หรือเจลาตินจากเนื้อหมูที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้หรือให้ผลเป็นลบในตัวอย่างนั้นๆ แต่เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 161 คู่เบส พบว่าให้ผลเป็นบวกทั้งในตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างที่เป็นซุปก้อนและเจลาตินของหมูที่ผ่านการทำแห้ง โดย

Primer ในส่วน repetitive element ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนหมูในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของดีเอ็นเอหมูในปริมาณน้อยได้ดีกว่า primer ในส่วนของ mitochondrial DNA

ในตัวอย่างที่เป็นขนม อาหารเสริม นมที่ผสมเจลาติน ที่มีเครื่องหมายฮาลาล เมื่อใช้ primer β-Actin ซึ่งผลที่ได้ไม่ชัดเจน และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA และ primer ในส่วน repetitive element ซึ่งเป็น primer ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอหมูเท่านั้นพบว่าให้ผลเป็นลบทั้งสอง primer เนื่องจากในตัวอย่างดังกล่าวอาจไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมู หรือมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในระดับต่ำมากจนเทคนิค PCR ไม่สามารถตรวจสอบได้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองเมื่อสกัด DNA จากตัวอย่างที่ศึกษาได้แก่ หมู, ไก่และวัวซึ่งเป็นเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อน โดยนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ใช้ primer ในส่วนของ gene β-actin เพื่อเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพในการสกัด โดยให้ผลบวกทุกตัวอย่างซึ่ง PCR product ของ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อวัวและเนื้อไก่มีขนาด 284 คู่เบส แต่ในเนื้อหมูมี ขนาด 248 คู่เบส โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bellis และคณะซึ่งได้จำแนกชนิดของสัตว์หลายชนิดโดยศึกษาในส่วนของ gene หลาย gene และตรวจสอบผลการสกัด DNAโดยใช้ผลการเพิ่มปริมาณของ gene ในส่วน β-actin ซึ่งเป็นส่วนของ gene ที่มีความคล้ายคลึงกันมากในสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้แก่ หมู, แกะ, วัว, แพะ, เสือ, ม้า, แมว, ไก่, สุนัขและคน เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองเช่นเดียวกัน เมื่อทำการศึกษาจากตัวอย่างที่ผ่านความร้อน เช่น 120 องศาเซลเซียสแล้วนำมาตรวจสอบการสกัด พบว่าผลที่ได้จะไม่ค่อยชัดเจน และในตัวอย่างที่เป็น เจลาตินพบว่าจะไม่เห็นแถบ DNA ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูง หรือผ่านขบวนการผลิตต่างๆ มีผลให้ DNA ของตัวอย่างอาจเกิดการสลายและทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้

ในการตรวจสอบความเหมาะสมของ primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA หมูโดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA หมู ในส่วน repetitive element โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 161 คู่เบสและให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อหมูเท่านั้น ทั้งในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แต่ในเนื้อวัวและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo และคณะ ซึ่งได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA หมูในเนื้อสัตว์โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ DNA ในหมู ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีหลายชนิดได้แก่ แกะ, ไก่, แพะ, คน, หมูและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR แล้วนำมายืนยันผลผลิตที่ได้และตรวจสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้ โดยการตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี DNA sequencing และผลที่ได้นำเข้าสู่ฐานข้อมูลสากล เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ หมู ซึ่งเป็นการยืนยันผลของ PCR ว่าไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนมาจาก DNA ของสัตว์ชนิดอื่น แล้วทำการลงทะเบียนลำดับดีเอ็นเอที่ได้ลงในฐานข้อมูลสากลโดยเลขที่ทะเบียนคือ DQ648898

ในการศึกษาเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา โดยทำการเปรียบเทียบความไวปฏิกริยาของ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA ในส่วน repetitive element หมูที่ได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะมาแล้วข้างต้น กับ Primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในส่วน Mitochorndrial DNA ซึ่งได้ทำการศึกษาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยจะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 531 คู่เบส จากการศึกษาในโครงการวิจัยที่แล้ว ในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจสอบหาความไว

ของปฏิกิริยาในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากโดยสกัด DNA จากเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนตามอัตราส่วนคือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005%, 0.00025% พบว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูทั้งในส่วน repetitive element และ primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน Mitochordrial DNA มีความไวของปฏิกริยาเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.0005% ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ J.H.Calvo และคณะ ที่ทำการทดลองตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูผสมกับเนื้อวัวโดยสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอหมูที่มีปริมาณเพียง 0.005% โดย primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน repetitive element นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jerilyn A. และคณะที่ได้ทำการตรวจอสอบดีเอ็นเอหมูโดยออกแบบ primer ให้จำเพาะกับส่วน interspersed element สำหรับจำแนกชนิดของสัตว์โดยวิธี PCR พบว่าปริมาณที่น้อยที่สุดทีสามารถตรวจสอบได้เพียง 0.005% ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน เมื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ได้ศึกษาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อที่ผ่านความร้อน 120 °C นาน 15 นาทีตามอัตราส่วนดังนี้ 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04% สกัด DNA ด้วย commercial kit และตรวจสอบความไวของปฏิกริยา โดยใช้ primer ทั้งสองส่วน จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูงพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา Primer ที่ใช้ในการตรวจสอบในส่วน Mitochrondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2 % ซึ่งความไวของปฏิกริยาน้อยกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบในส่วนของ Repetitive DNA พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีกว่าโดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดเพียง 0.05 % เท่านั้น ซึ่ง primer ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element มีความไวมากกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน mitochorndial DNA ถึง 4 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ T. Matsunaga และคณะ โดยได้ทำการตรวจสอบชนิดของสัตว์ในเนื้อที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนโดยใช้เทคนิค PCR ใช้ primer ในส่วน Mitochorndrial DNA ได้รายงานเกี่ยวกับเนื้อที่ผ่านความร้อนจะมีผลต่อการตรวจสอบเนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเออาจเกิดการขาดออกจากกันได้ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน Mitochorndrial DNA ซึ่งจะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 531 คู่เบส ขนาดใหญ่กว่า ผลิตภัณฑ์PCR โดยใช้ primer ในส่วน repetitive Element ซึ่งมีขนาดเพียง 161 คู่เบส ทำให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ยากกว่า และจากงานวิจัยของ Ali Arslan และคณะได้ตรวจสอบชนิดสัตว์โดยตัวอย่างที่ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบลดลงเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจาก DNA มีการขาดออกจากกัน จากผลที่ได้ค้นพบว่าควรใช้ Primer ตรวจสอบในส่วนของ repetitive Element เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ผ่านความร้อนสูง

เมื่อทำการศึกษาความเป็นกรด-เบสมีผลต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูหรือไม่ผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูได้ทุก pH ที่ทำการทดลองคือ pH2 pH4 pH6 pH8 pH10 pH12 โดยให้ผลบวกในทุกๆ pH และสามารถใช้ primer เพื่อทำการตรวจสอบทั้งในส่วนของ Mitochorndrial DNA และใช้ primer ในส่วนของ repetitive Element ได้ทั้งในเนื้อหมูที่ผ่านความร้อนและเนื้อหมูสด เมื่อทำการตรวจสอบความไวของปฏิกริยาใน pH ต่างๆ โดยเปรียบเทียบความไวของ primer ในส่วน Mitochorndrial DNA และใช้ primer ในส่วนของ repetitive Element โดยแบ่งการตรวจสอบในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากโดยสกัด DNA จากเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูทั้งในส่วน repetitive element สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูได้ดีกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน Mitochordrial DNA ถึง 25 เท่า เมื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ที่ pH 2 pH4 pH6 pH8 pH10 pH12 โดยใช้ primer ทั้งสองส่วน จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูงที่ pH ต่างๆ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา Primer ที่ใช้ในการตรวจสอบในส่วน Mitochrondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2 % ซึ่งความไวของปฏิกริยาน้อยกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบในส่วนของ Repetitive DNA พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีกว่า โดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดเพียง 0.05 % เท่านั้น ซึ่งprimer ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอหมูโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element มีความไวมากกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน mitochorndial DNA ถึง 4 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ T. Matsunaga และคณะ โดยได้ทำการตรวจสอบชนิดของสัตว์ในเนื้อที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนโดยใช้เทคนิค PCR ใช้ primer ในส่วน Mitochorndrial DNA ได้รายงานเกี่ยวกับเนื้อที่ผ่านความร้อนจะมีผลต่อการตรวจสอบเนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเออาจเกิดการขาดออกจากกันได้ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน Mitochorndrial DNA ซึ่งจะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 531 คู่เบส ขนาดใหญ่กว่า ผลิตภัณฑ์PCR โดยใช้ primer ในส่วน repetitive Element ซึ่งมีขนาดเพียง 161 คู่เบส ทำให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ยากกว่าและเมื่อตัวอย่างผ่านการเตรียมที่ระดับ pH ต่างๆ มีผลต่อการสลายตัวของดีเอ็นเอที่ทำการตรวจสอบมากยิ่งขึ้น โดยจะเห็นความแตกต่างของระดับการตรวจสอบระหว่าง primer ในส่วน Mitochorndrial DNA และ primer ในส่วน repetitive element ซึ่ง primer primer ในส่วน Mitochorndrial DNA และในวิธีที่ทางด้านอื่น เนื่องจากการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ด้วยวิธีอื่นเช่น วิธีทางโปรตีน เมื่อตัวอย่างผ่านความร้อนสูงจะไม่สามารถตรวจสอบได้ เพราะโปรตีนเกิดการสลายตัวง่าย

ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารและตรวจสอบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น เจลาติน collagen และไขมันสัตว์ ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหาร ผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้ primer สำหรับ

ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในส่วน Mitochorndrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ทั้งสองชุดสำหรับตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบ เช่น แกงเผ็ดหมู กุนเชียง ยอ ลูกชิ้น หรือในตัวอย่างบางชนิดที่ไม่ได้บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเนื้อหมู และไม่มีเครื่องหมายฮาลาลแต่มีการปนเปื้อนเนื้อหมู เช่น กุนเชียงไก่ กุนเชียงปลา โดย primer ทั้งสองส่วนสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ให้ผลเหมือนกันซึ่งผลการวิจัยที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo ที่ตรวจสอบเนื้อหมู ไส้กรอก รวมทั้งไขมันหมู โดยให้ผลบวก ความไวในการตรวจสอบสำหรับเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน สามารถตรวจสอบได้ปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.005% ในตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อย และมีผสมสารอื่นๆลงในผลิตภัณฑ์ เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร หรือเจลาตินจากเนื้อหมูที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน Mitochorndial DNA พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้หรือให้ผลเป็นลบในตัวอย่างนั้นๆ แต่เมื่อใช้ primer ในส่วน Repetitive element ตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิต พบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมู ในตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อยและต้องผ่านขบวนการผลิตอื่นๆ เช่นซุปก้อนสำหรับปรุงอาหาร หรือเจลาตินจากเนื้อหมูที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว พบว่าสามารถตรวจสอบได้หรือให้ผลเป็นบวกในตัวอย่างนั้นๆ สำหรับตัวอย่างที่เป็นขนมหรืออาหารเสริมที่มีเครื่องหมายฮาลาล ที่ผสมเจลาตินให้ผลเป็นลบ อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นไม่มีดีเอ็นเอหมูปนเปื้อนก็ได้

เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนและไม่ได้ผ่านความร้อนได้ดี จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Primer ในส่วน Repetitive Element ให้ความไวในการตรวจสอบได้ดีกว่า primer ในส่วน mitochorn drial DNA เนื่องจากใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น เจลาติน และไขมันสัตว์ ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารได้ เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งวิธิการตรวจสอบการปนเปื้อนเจลาตินในวิธีการทางเคมีสามารถบอกได้เพียงว่าในส่วนผสมมีเจลาตินผสมอยู่หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ผลิตจากสัตว์ชนิดใด เนื่องจากว่าในปัจจุบันเจลาตินสามาถผลิตจากสัตว์หลายชนิด แต่เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบและบอกได้ว่าส่วนผสมที่ได้มีดีเอ็นเอหมูปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็วและถูกต้อง

ข้อเสนอแนะ

เทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ รวดเร็ว และแม่นยำในการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยต้องเลือกใช้ primer ที่จำเพาะและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถหา primer ที่เหมาะสมในการตรวจสอบได้ เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ในระดับต่ำ และสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่ยากต่อการตรวจสอบได้ เช่น เจลาตินที่ผ่านการทำแห้ง และซุปก้อน เนื่องจากว่าวิธีการตรวจสอบทางด้านอื่นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตอะไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ใน

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารที่ปนเปื้อนเนื้อหมูในปริมาณน้อย และในตัวอย่างที่ยากต่อการตรวจสอบได้ เพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อผู้บริโภค