

พัฒนาการตรวจหา DNA สุกในวัตถุดิบสำหรับการผลิตแคปซูลเจลาตินฮาลาล ด้วยเทคนิค PCR

Development of detection pork DNA in gelatin with PCR techniques

พจชนาด พัทบุรี
Pojchanad Pathaburee

บทคัดย่อ

การระบุชนิดสัตว์ต้องห้าม เช่น เนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการตรวจสอบอาหารฮาลาล นอกจากนี้วัตถุดิบเป็นส่วนผสม เช่น เจลาติน ซึ่งเป็นส่วนผสมที่สำคัญในอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ การผลิตแคปซูล ต้องระบุชนิดสัตว์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนจากสัตว์ต้องห้าม ในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาเนื้อสุกรผสมในวัตถุดิบสำหรับการผลิตแคปซูลเจลาตินฮาลาลด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อหา primer ที่มีความไว โดยเปรียบเทียบ primer ในส่วน repetitive element และ primer ในส่วน mitochondrial DNA ตรวจหา DNA สุกที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที พบว่าในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่เนื้อที่ผ่านความร้อนสูง primer ในส่วน repetitive element ให้ความไวการตรวจสอบได้ดีกว่าการตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ในระดับปริมาณ DNA ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.05% และสามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกในเจลาติน ผง แต่ primer ส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ในระดับปริมาณ DNA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.2% และให้ผลลบเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสุกรจากตัวอย่างเจลาตินผง

คำสำคัญ: เจลาติน ฮาลาล PCR

Abstrat

Identification types of forbidden animals, such as pork contaminated halal products is important in halal food. Gelatin is an important component of the pharmaceutical and health products industry. Production of capsule need to identify species of animal to check contamination This research

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University
* E-mail: pojchanad.j@psu.ac.th

aims to develop a method to detect DNA in pork, raw materials of gelatin capsules with Polymerase Chain Reaction technique (PCR). By comparing the primer in part mitochondrial DNA and repetitive element primer in pork mixed with chicken meat that has not been for heated and heat 121 °C 15 minutes. The results showed no difference in samples that are not heated. In meat heated 121 °C 15 minutes. Primer in mitochondrial DNA can be checked for DNA concentration is lowest 0.2% but primer In the repetitive element can be checked in levels of DNA concentration 0.05%. Efficiency in detecting contaminated DNA of pork gelatin powder. primer in repetitive element can detected, but the primer in mitochondrial DNA could not be verified.

Keywords: gelatin, Halal, PCR

หลักการและเหตุผล

ศาสนาอิสลามมีประชากรนับถือมากเป็นอันดับ 2 (ร้อยละ 23.2) ผลิตภัณฑ์อาหารหรือผลิตภัณฑ์ยาที่มีอัตราการขยายตัวอย่างมากโดยอาหารหรือผลิตภัณฑ์ยาต้องตามบทบัญญัติแห่งศาสนาอิสลามต้องใช้เจลาตินจากแหล่งที่ไม่ได้มาจากสุกร ได้แก่ วัว ปลา ไก่ เป็นต้น (<http://www.Toronto.ca/health>) ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนจากสัตว์ต้องห้ามเป็นสิ่งจำเป็น King et al. (1982) ได้จำแนกชนิดของสัตว์โดยศึกษารูปแบบของโปรตีนในกล้ามเนื้อของสัตว์แต่ละชนิด เช่น วัว แกะ ม้า กระบือ สุกรและจิ้งจอก พบว่าการจำแนกชนิดของสัตว์ด้วยวิธีนี้วิเคราะห์ผลยากและมีข้อจำกัดคือโปรตีนสลายได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อนสูง ต่อมา มีการนำเทคนิคการตรวจหา DNA ของสุกร โดย Saiki et al. (1988) ใช้หลักการเพิ่มปริมาณ DNA ของสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเครื่องนี้สามารถลดเวลาและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบได้ครั้งละประมาณ 90 ตัวอย่าง ในเวลา 1 วัน ซึ่งในการวิจัยที่ผ่านมาสามารถยืนยันได้ว่าวิธี PCR ที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ

เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และไวต่อปฏิกิริยาสูง สามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ได้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเพียง 1 copy การวิจัยของ Maharat et al. (2005) ในการทดลองความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบจากไมโทคอนเดรียของสุกร นำ PCR product ที่ได้หาลำดับ DNA พบว่า primer มีความจำเพาะกับ DNA สุกรเท่านั้น โดยให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อสุกร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Montiel-sosa et al. (2000) ที่ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรในเนื้อสัตว์ในตัวอย่างหลายชนิด ได้แก่ แกะ ไก่ แพะ คน สุกรและสุกรป่า พบว่าการใช้ primer นี้ให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่ได้จากสุกรและสุกรป่าเท่านั้น ในปัจจุบัน ได้มีการตรวจสอบเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในระดับ DNA ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจโดยวิเคราะห์ในส่วน of mitochondrial DNA (mtDNA) เนื่องจาก mtDNA ยีน มีจำนวน 1,000 copies ต่อ cell และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในสัตว์ ซึ่งง่ายต่อการออกแบบ primer เพื่อความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา Matsunaga et al. (1998) ได้จำแนกชนิดสัตว์ 6 ชนิด วัว สุกร ไก่ แกะ แพะและม้า ต่อมา Jerilyn et al. (2003) ได้

จำแนกสัตว์ ได้แก่ วัว สุกร ไก่และสัตว์ฟันแทะ ด้วยเทคนิค PCR โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน repetitive element ในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนพบว่าสามารถตรวจสอบเนื้อวัวในระดับต่ำถึง 0.005%, เนื้อสุกรในระดับต่ำถึง 0.0005% เนื้อไก่ในระดับต่ำถึง 0.05% และสัตว์ฟันแทะสามารถตรวจสอบในระดับต่ำถึง 0.0001% ในปี 2004 Jerilyn et al. (2004) ได้จำแนกสัตว์ในวงศ์สัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะ ม้า หมา แมว หนู สุกรและกระต่าย ด้วยเทคนิค PCR โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน repetitive element โดยปริมาณ DNA ของสัตว์ที่จำแนกได้อยู่ระหว่าง 0.1 ng - 0.1 pg โดยงานวิจัยนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไวการตรวจสอบและความใช้ได้ของการตรวจสอบการปนเปื้อนสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลและเพื่อตรวจสอบเจลาตินมีส่วนผสมของสุกรปลอมปนผลิตในอุตสาหกรรมยาเพื่อสร้างความมั่นใจในการเลือกบริโภคเจลาตินสำหรับผลิตภัณฑ์ยาในธุรกิจอาหารฮาลาล

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อหา Primer ที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาดีเอ็นเอของสุกรในเนื้อสัตว์
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุกรในตัวอย่างเจลาตินผง

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ศึกษา

1. ศึกษาความจำเพาะของ primer ใช้เนื้อสัตว์ 3 ชนิด ได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อวัว
2. ศึกษาความไวของ Primer ใช้เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วนต่าง ๆ

จำนวน 6 ความเข้มข้นคือ 0.01 %, 0.005%, 0.0025%, 0.001%, 0.0005% 0.00025% และเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ไม่ผ่านความร้อนสูง 121 °C เวลา 15 นาทีในอัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 6 ความเข้มข้นคือ 1 %, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.04%

3. ศึกษาความใช้ได้ของวิธีตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอของสุกรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และตัวอย่างเจลาตินแห้ง จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2 หมูยอ ซุปก้อนหมู ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 1 ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 2 เจลาตินจากไก่ เจลาตินจากสุกร

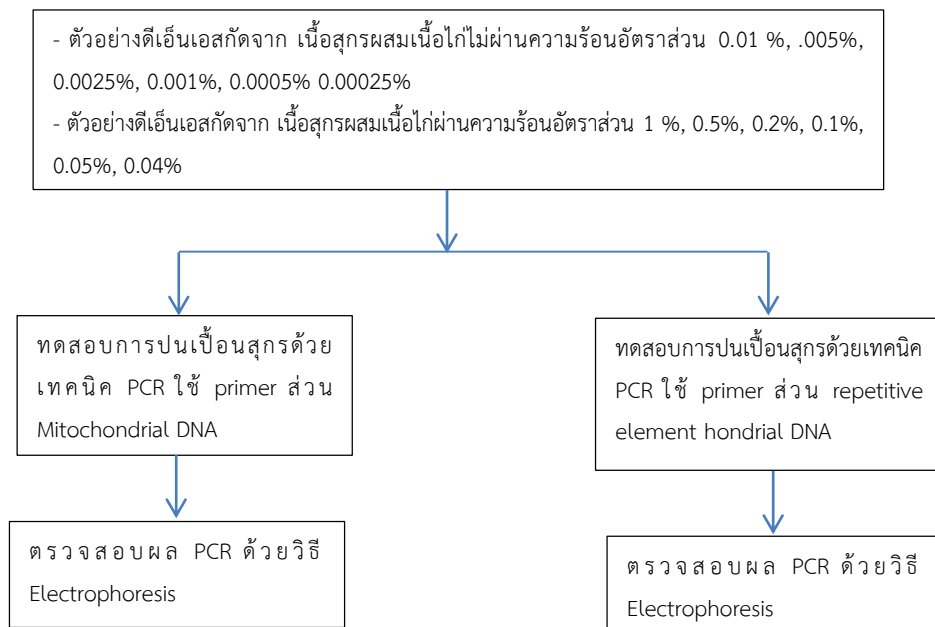
วิธีการ

1. ศึกษาความจำเพาะของ primer ตรวจหาดีเอ็นเอของสุกรในส่วน repetitive element และ primer ในส่วนของ Mitochondrial DNA โดยทดสอบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อวัว ทำการสกัด DNA จากเนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อวัว ด้วย commercial kit (QIAamp kit, QIAGEN, Cologne, Germany) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer 2 คู่ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสุกร คู่ที่หนึ่งและคู่ที่สองเป็น primer สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนสุกร โดย Pig pre-1-F GGATCCGG CATTGCCGTTAG และ Pig pre-1-R GTCTTTTTTT GCCA TTTCTTGG เป็น primer ที่จำเพาะกับสุกรในส่วน repetitive element primer ในส่วนของ Mitochondrial DNA (Montiel-rosa *et al.*, 2000) คือ Pig f 5'AACCTATGTA CGTCGTGCAT 3' และ Pig r 5'ACCATTGAC TGAATAG CACCT 3' เตรียมสารละลายในหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วย Master Mix PCR (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3.75 mM Mg(OAc)₂, 500 mM dNTP), 40 ng ของ DNA, 4.8 mM ของ primer ปริมาณสารละลายทั้งหมดคือ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเข้าเครื่อง

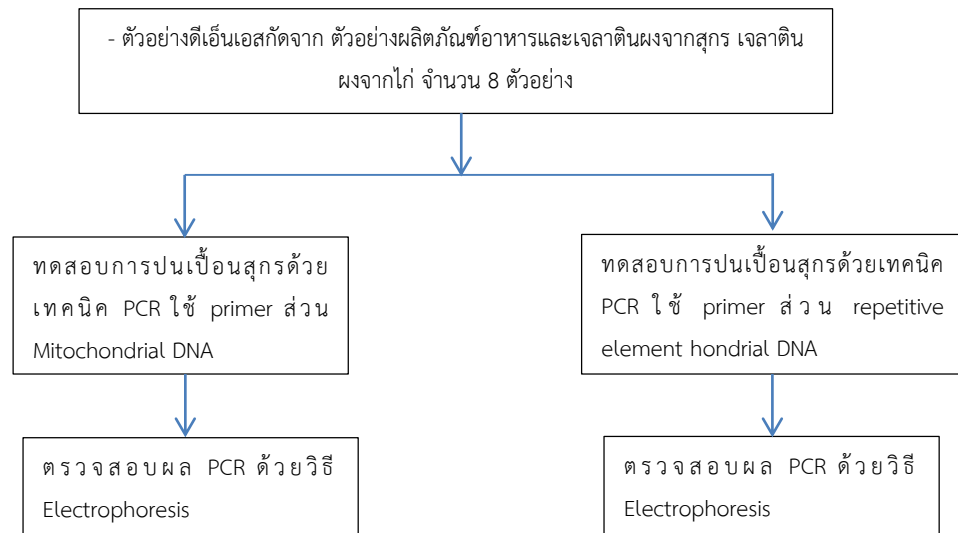
thermal cycle หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 % agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA) หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากส่วน repetitive element มาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยัน PCR product ที่ได้จากดีเอ็นเอสุกร สำหรับ PCR product จาก Mitochondrial DNA ได้ตรวจสอบนิวคลีโอ

ไทด์จากงานวิจัยที่ผ่านมาแล้ว (Maharat *et al.*, 2005)

2. เปรียบเทียบความไวการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร โดยใช้ primer ในส่วนของ mitochondrial DNA เปรียบเทียบกับ primer ส่วน repetitive element สำหรับทดสอบตัวอย่างเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและที่ผ่านความร้อน 121°C อัตราส่วนต่าง ๆ หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วทำการเพิ่มปริมาณสารด้วยเครื่อง PCR และตรวจสอบแถบ PCR product ด้วยวิธี Electrophoresis และถ่ายรูปที่ได้ตามแผนผังที่ 1



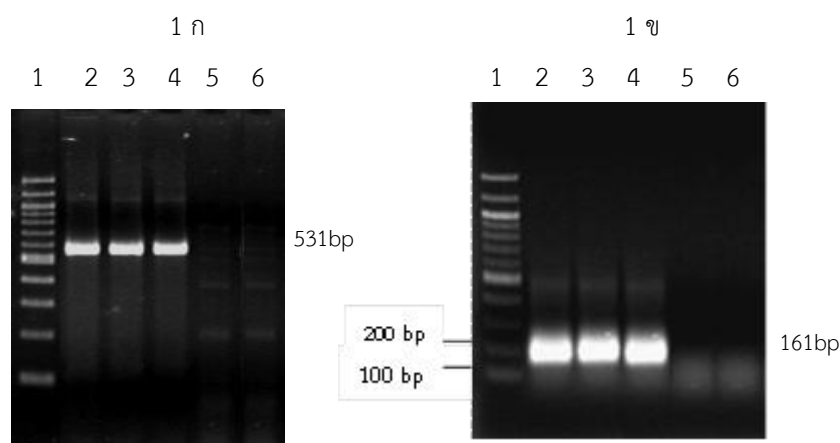
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจหาดีเอ็นเอของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารและเจลาตินผง จำนวน 8 ตัวอย่างตามแผนผังที่ 2



ผลการดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบความจำเพาะของ primer
 ตรวจหาดีเอ็นเอสุกร พบว่า primer ทั้งสองส่วนมีความจำเพาะสูงให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อสุกรเท่านั้น แต่ในดีเอ็นเอจากเนื้อไก่ เนื้อวัวให้ผล

เป็นลบคือไม่ปรากฏแถบ PCR product รูปที่ 1 ภาพ PCR product จาก primer ในส่วน Mitochondrial DNA และ primer ในส่วน Repetitive element



รูปที่ 1 PCR product จาก primer ในส่วน Mitochondrial DNA

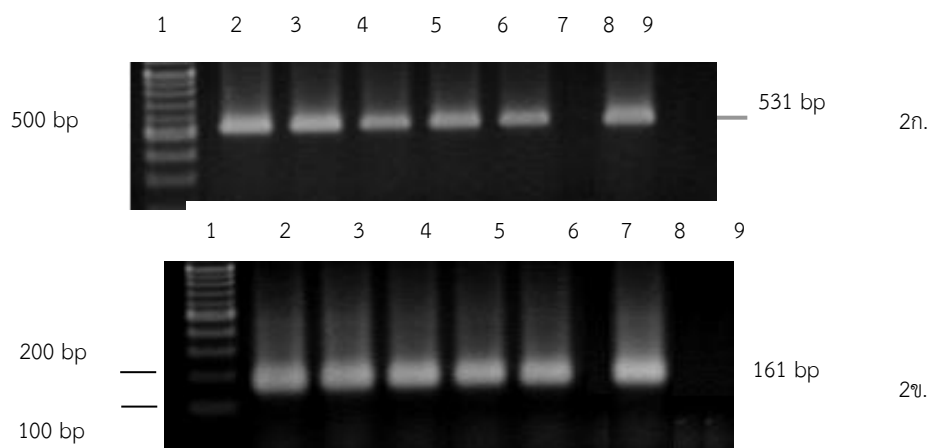
ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 531 คู่เบส (1 ก) โดย lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อสุกร 1, lane 3 เนื้อสุกร 2, lane 4 เนื้อสุกร 3, lane 5 เนื้อไก่และ lane 6 เนื้อ วัว สำหรับผลการเพิ่มปริมาณ DNA ใน

ส่วน Repetitive element (1 ข) โดย lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อสุกร 1, lane 3 เนื้อสุกร 2, lane 4 เนื้อสุกร 3, lane 5 เนื้อไก่และ lane 6 เนื้อ วัว

หลังจากนำ PCR product ที่ได้จากส่วน repetitive element ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยัน PCR product ที่ได้จากดีเอ็นเอสุกร ตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแล้ว BLAST เข้าสู่ฐานข้อมูลสากลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ DNA หมู 100% และได้ทำการบรรจุเข้าสู่ฐานข้อมูลสากล มีเลขทะเบียน คือ DQ648898 สำหรับ PCR product จาก Mitochondrial DNA ได้ตรวจสอบนิวคลีโอ

ไทด์จากงานวิจัยที่ผ่านมาแล้ว (Maharat et al., 2005)

2. เปรียบเทียบความไวของการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์
 พบว่าในเนื้อสุกรที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ตรวจสอบโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA และ ส่วน repetitive element ให้ความไวในการตรวจสอบเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดที่ 0.0005% ดังแสดงในรูปที่ 2

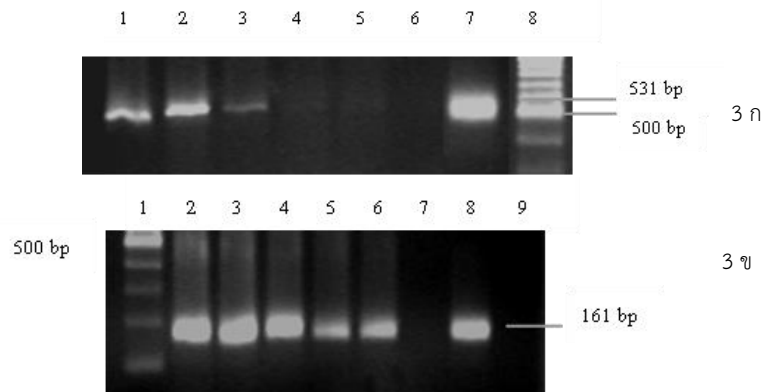


รูปที่ 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA จากเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

ในส่วน Mitochondrial DNA (2n.) lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.01%, lane 3 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.005%, lane 4 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.0025%, lane 5 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.0010%, lane 6 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.0005%, lane 7 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.00025%, lane 8 เนื้อสุกรและ lane 9 เนื้อไก่ ในส่วน repetitive element (2x.) lane 1 100 bp DNA marker, lane 2 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.01%, lane 3 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.005%, lane 4 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่

0.0025%, lane 5 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.0010%, lane 6 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.0005%, lane 7 เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 0.00025%, lane 8 เนื้อสุกรและ lane 9 เนื้อไก่

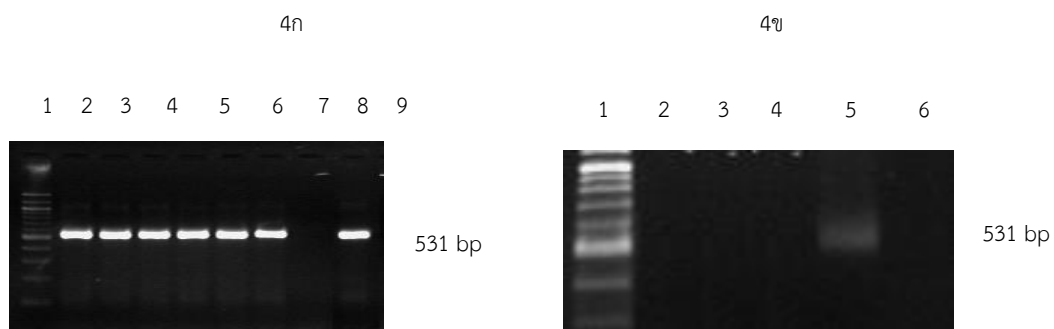
3. ศึกษาความไวในเนื้อสุกรผสมกับเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 121 °C 15 นาที
 พบว่า primer ส่วน mitochondrial DNA (Calvo, et al., 2001) ให้ผลบวกที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2% (3ก) สำหรับ primer ส่วน repetitive element ให้ความไวในการตรวจสอบเท่ากันโดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดที่ 0.05% (3ข) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูง

ในส่วน Mitochondrial DNA (3ก) 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 ผลการใช้ Primer ในส่วน repetitive element (3ข) 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 4. ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารรวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตเช่น เจลาติน สำหรับการตรวจสอบ DNA สุกรในส่วน Mitochondrial DNA ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวควบคุมที่เป็นบวก แต่ในตัวอย่างที่เป็นเจลาตินให้ผลเป็นลบ ดังรูปที่ 4



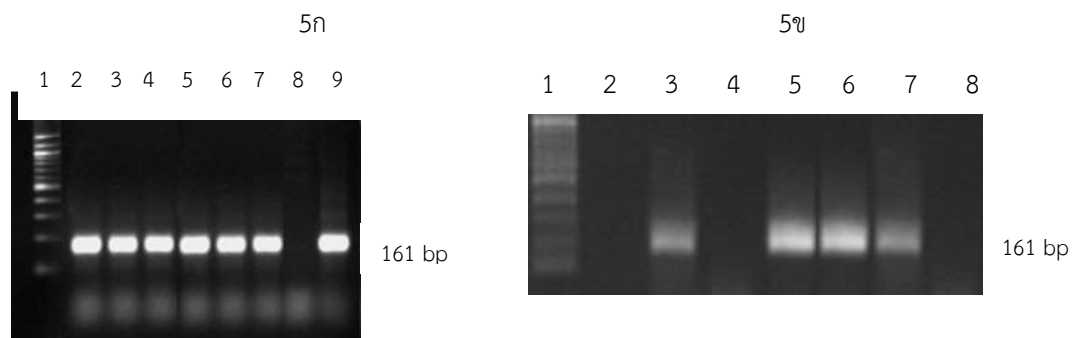
รูปที่ 4 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer

ส่วน Mitochondrial DNA (4ก.) Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 1, Lane 3

แกงเผ็ดหมูชนิดที่ 2, Lane 4 หมูยอ, Lane 5 ชุปก้อนหมู, Lane 6 ลูกชิ้นหมู, Lane 7 ลูกชิ้นหมูชนิดที่

2, Lane 8 เนื้อไก่, Lane 9 เนื้อหมู ภาพ (4ข) Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 เจลาตินไก่ทำแห้ง 1, Lane 3 เจลาติน จากสุกรทำแห้ง, Lane 4 เจลาติน จากสุกรทำแห้ง, Lane 5 เนื้อสุกรเป็น positive control และ Lane 6 เนื้อไก่เป็น Negative control สำหรับผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอ

เอสุกรโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวควบคุมที่เป็นบวก และในตัวอย่างเจลาตินจากสุกรให้ผลเป็นบวก แต่เจลาตินจากไก่ให้ผลเป็นลบดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PigpreF,R

แสดงผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ส่วน repetitive element (5ก.) Lane 1 100 bp DNA Marker, Lane 2 แก่งเห็ดหูหนูชนิดที่ 1, Lane 3 แก่งเห็ดหูหนูชนิดที่ 2, Lane 4 หมูยอ, Lane 5 ชุปก้อนหมู, Lane 6 ลูกชิ้นหมู, Lane 7 ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 2, Lane 8 เนื้อไก่, Lane 9 เนื้อหมู ภาพ (5ข) Lane 1

100 bp DNA Marker, Lane 2 เจลาตินไก่ทำแห้ง 1, Lane 3 เนื้อสุกร, Lane 4 เนื้อไก่เป็น Negative control, Lane 5 เจลาติน สุกกรทำแห้ง , Lane 6 เจลาติน สุกกรทำแห้ง, Lane 7 เจลาติน สุกกรทำแห้ง และ lane 8 เนื้อไก่เป็น negative control สรุปผลการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในด้วยเทคนิค PCR โดยใช้

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบความไวการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรโดยใช้ primer ในส่วนของ Mitochondrial DNA และ primer ในส่วน repetitive element

ตัวอย่างที่ใช้	ผล PCR ใช้ pig F+R (Mitochondrial DNA)	ผล PCR ใช้ pig Pre F+R (repetitive element)
สุกรผสมเนื้อไก่ที่ไม่ผ่านความร้อน 0.05%	(+)	(+)
สุกรผสมเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 121 °C 0.2%	(+)	(+)
สุกรผสมเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 121 °C 0.05%	(-)	(+)
แกล่งเห็ดหูหนูชนิดที่ 1	(+)	(+)
แกล่งเห็ดหูหนูชนิดที่ 2	(+)	(+)
หมูยอ	(+)	(+)
ชุบก้อนหมู	(+)	(+)

ตัวอย่างที่ใช้	ผล PCR ใช้ pig F+R (Mitochondrial DNA)	ผล PCR ใช้ pig Pre F+R (repetitive element)
ลูกชิ้นหมู	(+)	(+)
ลูกชิ้นหมูชนิดที่ 2	(+)	(+)
เจลาตินสุกรแห้ง	(-)	(+)
เจลาตินไก่แห้ง	(-)	(-)

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรโดยผลบวกคือสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนสุกรแสดงเครื่องหมาย (+) ผลลบคือไม่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนสุกร (-)

การอภิปรายผลการวิจัย

primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุกร ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA สุกร ในส่วน repetitive element โดย PCR product ที่ได้มีขนาด 161 คู่เบสและให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อสุกรเท่านั้น ทั้งในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อสุกรที่ผ่านความร้อน 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แต่ในเนื้อวัวและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo et al. (2001) และคณะ ซึ่งได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรในเนื้อสัตว์โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ DNA ในสุกร ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีหลายชนิดได้แก่ แกะ, ไก่, แพะ, คน, สุกรและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ PCR แล้วนำมายืนยันผลผลิตที่ได้และตรวจสอบความจำเพาะของ primer ที่ใช้ โดยการตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี DNA sequencing และผลที่ได้นำเข้าสู่ฐานข้อมูลสากล เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสุกร ซึ่งเป็นการยืนยันผลของ PCR ว่าไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนมาจาก DNA ของสัตว์ชนิดอื่น แล้วทำการลงทะเบียนลำดับดีเอ็นเอที่ได้ลงในฐานข้อมูลสากลโดยเลขที่ทะเบียนคือ DQ648898 เมื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาใน

เนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ได้ศึกษาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในเนื้อที่ผ่านความร้อน 121 °C นาน 15 นาที จากผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนสูงพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา primer ที่ใช้ในการตรวจสอบในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2 % ซึ่งความไวของปฏิกิริยาน้อยกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบในส่วนของ repetitive DNA พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีกว่า โดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดเพียง 0.05 % เท่านั้น primer ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอสุกรโดยใช้ primer ในส่วน repetitive element มีความไวมากกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอสุกรในส่วน mitochondrial DNA ถึง 4 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ T. Matsunaga et al. (1998) และคณะได้ทำการตรวจสอบชนิดของสัตว์ในเนื้อที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนโดยใช้เทคนิค PCR ใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA ได้รายงานเกี่ยวกับเนื้อที่ผ่านความร้อนจะมีผลต่อการตรวจสอบเนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเออาจเกิดการขาดออกจากกันได้ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้ primer ในส่วน mitochondrial DNA ซึ่งจะให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR คือ 531 คู่เบส ขนาดใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ primer ในส่วน repetitive

element ซึ่งมีขนาดเพียง 161 คู่เบส ทำให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ยากกว่า และจากงานวิจัยของ Ali et al. (2006) และคณะได้ตรวจสอบชนิดสัตว์โดยตัวอย่างที่ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบลดลงเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจาก DNA มีการขาดออกจากกัน จากผลที่ได้ค้นพบว่าควรใช้ primer ตรวจสอบในส่วนของ repetitive element เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรที่ผ่านความร้อนสูง เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา primer ที่ใช้ในการตรวจสอบในส่วน mitochondrial DNA สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 0.2 % ซึ่งความไวของปฏิกิริยาน้อยกว่า primer ที่ใช้ตรวจสอบในส่วนของ Repetitive DNA โดยสามารถตรวจสอบได้ระดับต่ำสุดเพียง 0.05 % มีความไวมากกว่าถึง 4 เท่า โดยจะเห็นความแตกต่างของระดับการตรวจสอบระหว่าง primer ในส่วน mitochondrial DNA และ primer ในส่วน repetitive element เมื่อตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านความร้อนสูงหรือขบวนการที่ซับซ้อน ซึ่ง primer ในส่วน mitochondrial DNA และในวิธีทางด้านอื่น เช่น วิธีทางโปรตีนเมื่อตัวอย่างผ่านความร้อนสูงจะไม่สามารถตรวจสอบได้ เพราะโปรตีนเกิดการสลายตัวง่าย การตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตพบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ในตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อยและต้องผ่านขบวนการผลิตอื่น ๆ เช่นเจลาตินจากเนื้อสุกรที่ผ่านการทำแห้งมาแล้ว พบว่า primer ส่วน repetitive element สามารถตรวจสอบได้หรือให้ผลเป็นบวกในตัวอย่างนั้น ๆ

การสรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

สรุปคือเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนและไม่ได้ผ่านความร้อนได้ดี จากการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่า primer ในส่วน repetitive element ให้ความไวในการตรวจสอบได้ดีกว่า primer ในส่วน mitochondrial DNA เนื่องจากใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในเจลาตินผง ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารได้ เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนเจลาตินในวิธีการทางเคมีสามารถบอกได้เพียงว่าในส่วนผสมมีเจลาตินผสมอยู่หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ผลิตจากสัตว์ชนิดใด เนื่องจากว่าในปัจจุบันเจลาตินสามารถผลิตจากสัตว์หลายชนิด แต่เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบและบอกได้ว่าส่วนผสมที่ได้มีดีเอ็นเอสุกรปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็วและถูกต้องซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็วและถูกต้องโดยเทคนิค PCR สามารถพัฒนาต่อยอดให้มีความไวที่ดีขึ้นโดยส่วนของยีนที่ศึกษาสามารถนำไปออกแบบ Probe เปลี่ยนเป็นระบบ Real time PCR ซึ่งจะให้ความไวดีกว่าและเวลาตรวจสอบเร็วขึ้นได้

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อนและไม่ได้ผ่านความร้อนได้ดี จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า primer ในส่วน Repetitive Element ให้ความไวในการตรวจสอบได้ดีกว่า primer ในส่วน mitochondrial DNA เนื่องจากใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น เจลาติน และไขมันสัตว์

ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารได้ เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนเจลาตินในวิธีการทางเคมีสามารถบอกได้เพียงว่าในส่วนผสมมีเจลาตินผสมอยู่หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ผลิตจากสัตว์ชนิดใด เนื่องจากว่าในปัจจุบันเจลาตินสามารถผลิตจากสัตว์หลายชนิด แต่เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบและบอกได้ว่าส่วนผสมที่ได้มีดีเอ็นเอสุกรปนเปื้อนอยู่หรือไม่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ali, A., O.Irfan, I., Mehmet C. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Sci.*, 72 326-330.

Calvo, J.H., Zaragoza, P., and Osta, R. (2001). in processed food amplification of a new specific DNA fragment: J. *Anim.Sci.* 2001. 79: 2108-2112.

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

Jerilyn ,A W., David, A H., Dale J H., Bridget A

A., Anders M E., Jaiprakash S., Sudhir K S. and Mark, A B. (2004). Quantitative PCR for DNA identification base on genome-specific interspersed repetitive element. *Anal. Biochem.* 83: 518-527.

King, N.L. and Kruth, L. (1982). Analysis of Raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *J Food Sci.* 47(5): 1608-12.

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

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

Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Shibata, K., Yamada, T., Shinmura, Y. (1998). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay: *Meat Sci.*, 51: 43-148.

Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncaies, P., Lopez-Perez, M.J. and Perez-Martos, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of

pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. J Agric Food Chem. 48(7): 2829-32.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, Muylis, K.B. and Relish, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239(4839): 487-91.

<http://www.toronto.ca/health>. Guide to Understanding Halal Foods is produced by Toronto Public Health, 2004.