นิพนธ์ต้นฉบับ

พัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอหมูจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จารุณี มหารัตน์[1] เอื้อมนัส อินทรผาด[2] และ พจชนาถ จันทรัศมี[3]

Abstract

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

The polymerase chain reaction (PCR) was used to determine pig DNA fragment in meat mixture using specific oligonucleotide primer having 10-30 bp in size to amplify the DNA fragment. Firstly, the β-actin F and the β-actin R primers were used to identify DNA extraction process in beef, pork and chicken. The 284 bp DNA fragment was obtained from beef and chicken meat and 248 bp was amplified from pork. Secondly, pig F and pig R primers for pork were used as the PCR amplifier which resulted in 531 bp DNA fragment from pork; however, it gave negative results for beef and chicken meat. Finally, the obtained nucleotide sequence was compared with AF535163 in the GenBank database and homology was 98%. This work was also submitted to GenBank and obtained an accession number of AY621117.

A comparison between the sensitivity of the commercial kit (QIAamp kit) and the RSB lysis buffer for the DNA extraction process was carried out by mixing pork with chicken meat at ratios of 1:1, 1:5, 1:10,

---

Molecular Biology Unit, Research Equipment Service, Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

---

[1]วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพ), นักวิทยาศาสตร์ [2]วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ), นักวิทยาศาสตร์ [3]วท.ม.(ชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์), นักวิทยาศาสตร์ งานชีวโมเลกุล ฝ่ายบริการเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: charunee.m@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 28 ตุลาคม 2547 รับลงพิมพ์ 24 มีนาคม 2548

1:50, 1:150 and 1:200. QIAamp kit gave the best results at the smallest ratio of 0.5% (1:200), while the RSB lysis buffer gave good results at the ratio of 2% (1:50). This indicated that the QIAamp kit had a higher sensitivity than the RSB lysis buffer. Lastly, a determination of pork DNA fragment from heated pork at 121ºC for 15 min. using the Pig F and Pig R primers for pork were done. The result was similar to that obtained from the fresh pork at 531 bp DNA fragment.

Key words : Pork DNA and PCR

บทคัดย่อ

จารุณี มหารัตน์ เอื้อมนัส อินทรผาด และ พจชนาถ จันทรัศมี

พัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอหมูจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(5) : 993-1002

ผลการศึกษาการตรวจหาดีเอ็นเอหมูโดยใช้วิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารเริ่มซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ประมาณ 10-30 คู่เบส ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอที่สนใจ จากการใช้สารเริ่มเบต้าแอคตินเอฟ (β-actin F) และเบต้าแอคตินอาร์ (β-actin R) เพื่อตรวจสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิธีพีซีอาร์ของเนื้อวัวและเนื้อไก่ มีขนาด 284 คู่เบส และเนื้อหมู มีขนาด 248 คู่เบส และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอหมูโดยใช้สารเริ่มพิกเอฟ (pig F) และพิกอาร์ (pig R) ที่ออกแบบจากไมโตคอนเดรียหมู พบว่าผลิตภัณฑ์จากวิธีพีซีอาร์ของเนื้อหมู มีขนาด 531 คู่เบส โดยให้ผลเป็นลบในเนื้อวัวและเนื้อไก่ และจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อหมูด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) แล้วเทียบกับฐานข้อมูลสากลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับดีเอ็นเอหมู เลขทะเบียน AF535163 98% และลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สู่ฐานข้อมูลได้หมายเลข AY261117

เมื่อเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาในการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอระหว่างชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp kit) และบัฟเฟอร์อาร์เอสบี (reducing sample buffer: RSB) ของเนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ ในอัตราส่วน 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:150 และ 1:200 พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและบัฟเฟอร์อาร์เอสบี สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอหมูที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1:200 และ 1:50 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอหมูจากเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความแตกต่างจากการตรวจสอบจากเนื้อหมูสด

อุตสาหกรรมการผลิตอาหารฮาลาลเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ ได้แก่ เบคอน แฮม เจลาติน ไส้กรอกและเนื้อบด เป็นต้น อาจมีการปนเปื้อนหรือผสมระหว่างเนื้อสัตว์ต่างชนิดกัน ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาจไม่เป็นไปตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม ดังนั้นการตรวจสอบเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์หรือการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ต้องสงสัยว่ามีการปนเปื้อนจากเนื้อหมูหรือไม่ จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับผู้บริโภคที่นับถือศาสนาอิสลาม

ที่ผ่านมาวิธีที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนจากเนื้อหมูในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ คือ ตรวจสอบทางโปรตีนเฉพาะในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ การตรวจสอบโดยวิธีไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing: IEF) (King and Kruth, 1982) และตรวจการตกตะกอนในเนื้อวุ้น (agar gel immunodiffusion: AGID) (Berger *et al*., 1988) ซึ่งปฏิกิริยามีความไวและความจำเพาะ แต่จะไม่เหมาะสมในกรณีที่สัตว์เป็นสปีชีส์ใกล้เคียงกัน และโปรตีนสลายได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อนสูง ในปัจจุบัน การตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อหมูในอาหารระดับดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเนื้อหมูที่ปนเปื้อนในอาหารเพียงเล็กน้อยได้ด้วยวิธี PCR (Ursing and Arnason, 1998) สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของหมู

ได้ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเพียง 1 สำเนา (Saiki *et al*., 1988) โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้สารเริ่มที่ออกแบบให้จำเพาะกับไมโตคอนเดรียหมูส่วนดีลูพ (D-loop) ตำแหน่ง 15592-16124 (Bellis *et al*., 2003) ซึ่งการวิจัยในไมโตคอนเดรียมีข้อดีคือ ในหนึ่งเซลล์มีจำนวนยีนไมโตคอนเดรียถึงหนึ่งพันสำเนา ซึ่งเพิ่มความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณจากปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกทำให้เสียสภาพจากความร้อน รวมทั้งในฐานข้อมูลมีการรายงานลำดับเบสสิ่งมีชีวิตหลายชนิดซึ่งมีข้อมูลมากเพียงพอในการสืบค้น และสามารถระบุชนิดสัตว์อย่างจำเพาะได้ในกรณีที่มีเนื้อสัตว์หลายชนิดผสมกัน และสุดท้ายสามารถแยกพันธุ์สัตว์ภายในกลุ่มสปีชีส์เดียวกันในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหมูได้ ซึ่งจากที่ผ่านมามีการรายงานว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูได้ในเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อซึ่งได้รับความร้อนในกรรมวิธีการแปรรูปอาหาร เช่น เบคอน แฮม เจลาตินและไส้กรอกได้ (Montiel-Sosa *et al*., 2000)

ในการศึกษาครั้งนี้ เป้าหมายหลักคือ ตรวจสอบความจำเพาะของสารเริ่มต่อดีเอ็นเอหมูที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและผ่านความร้อนสูง รวมทั้งดีเอ็นเอหมูในส่วนผสมเนื้อที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งในเมืองไทยวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนเนื้อสัตว์โดยวิธี PCR ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก จึงควรมีการวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นงานบริการต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เนื้อสด ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อไก่และเนื้อวัว ที่ซื้อมาจากตลาดสด และนำมาสับให้ละเอียด สำหรับตัวอย่างเนื้อหมูผ่านความร้อนโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, SS245, Tomy, Tokyo, Japan) ที่อุณหภูมิ 121ºC เป็นเวลา 15 นาที และตัวอย่างเนื้อหมูผสมกับเนื้อไก่ในอัตราส่วน 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:150 และ 1:200 โดยแยกอุปกรณ์ในการเตรียมและจัดเก็บตัวอย่างในหลอดพลาสติกแยกหลอด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

ตรวจสอบความจำเพาะของสารเริ่มกับตัวอย่างเนื้อหมูที่ยังไม่ผ่านความร้อนและผ่านความร้อนแล้วเปรียบเทียบกับเนื้อไก่และเนื้อวัว โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAamp kit, QIAGEN, Cologne, Germany) ดังนี้ เนื้อ 0.25 กรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ AL 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56ºC จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์แล้วล้างดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ AW 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นชะดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ AE 200 ไมโครลิตร

และเปรียบเทียบความไวของการสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp kit และการใช้บัฟเฟอร์ RSB (reducing sample buffer) (Montiel-sosa *et al*., 2000) ในตัวอย่างเนื้อหมูผสมกับเนื้อไก่ที่อัตราส่วนต่างๆ ข้างต้น โดยเตรียมเนื้อ 0.5 กรัม ละลายด้วยบัฟเฟอร์ RSB (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM NaCl และ 25 mM EDTA) 500 ไมโครลิตร เติม 25% SDS (sodium dodecyl sulphate) 20 ไมโครลิตร และ Proteinase K (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยวิธี phenol/chloroform/isoamyl alcohol (24:25:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย sodium acetate 3 โมลาร์ และ absolute ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารแบบถาดหลุม (microplate reader, PowerWaveX, Bio-tek, Vermont, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280) ระหว่าง 1.5-1.8 และปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ตรวจสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้สารเริ่ม β-actin F (5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3') และ β-actin R (5'-TAGATGGGCACAGTGTGGGT-3') (Bellis *et al*., 2003) เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Master Mix PCR (125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3.75 mM $Mg(OAc)_2$, 500 μM dNTP) (Eppendorf, Hamburg, Germany) 8 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม และสารเริ่ม 4.8 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันแล้วเข้าเครื่อง thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin-Elmer, Norwalk, USA) ซึ่งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ อุณหภูมิก่อนปฏิกิริยา PCR 94ºC เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ

ประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้ 94ºC เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการทำให้สารเริ่มที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน อุณหภูมิที่ใช้ 45ºC เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา 72ºC เป็นเวลา 7 นาที

ตรวจสอบดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ด้วยวิธี PCR โดยใช้สารเริ่มที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอหมู คือ pig F (5'-AACCCTATGTACGTCGTGCAT-3') และ pig R (5'-ACCATTGACTGAATAGCACCT-3') (Montiel-sosa *et al*., 2000) เตรียมสารละลายในหลอดทดลอง ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย master mix PCR 8 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม สารเริ่ม 5.6 ไมโครโมลาร์ ผสมให้เข้ากันแล้วเข้าเครื่อง thermal cycler ซึ่งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ อุณหภูมิก่อนปฏิกิริยา PCR 92ºC เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ และปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว อุณหภูมิ 92ºC เป็นเวลา 20 วินาที ขั้นตอนการทำให้สารเริ่มที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน อุณหภูมิที่ใช้ 45ºC เป็นเวลา 20 วินาที ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 30 นาที สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบตรวจสอบโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 80 นาโนกรัมและ 100 นาโนกรัม และปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนการทำให้สารเริ่มที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน เพื่อยืนยันการตรวจสอบทั้งปริมาณและสภาวะในการทดสอบ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอริซิส โดยนำมาแยกบน agarose gel 1.5% ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ เป็นเวลา 40 นาที ใน 1X บัฟเฟอร์ TBE แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวีและบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ (gel documentation, Gel Doc 1000, Bio-Rad)

สกัดแถบดีเอ็นเอจากเจลที่ตำแหน่ง 531 คู่เบส แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 2 โมลาร์ sodium acetate และ absolute ethanol ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำมาทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร โดยเติม dye PCR master mix (ABI Prism BigDye terminator sequencing ready reaction, Applied Biosystem, CA, USA) 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และสารเริ่ม pig F 1.6 พิคโคโมล ผสมให้เข้ากันแล้วเข้าเครื่อง thermal cycler ซึ่งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ โดยใช้อุณหภูมิก่อนปฏิกิริยา PCR 96ºC เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ และปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว อุณหภูมิ 96ºC เป็นเวลา 10 วินาที ขั้นตอนการทำให้สารเริ่มที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน อุณหภูมิ 45ºC เป็นเวลา 5 วินาที ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นตกตะกอนโดยใช้ sodium acetate และ absolute ethanol แล้วทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (ABI Prism 377, automated DNA sequencer, Applied Biosystem, CA, USA)

ผลการทดลอง

1. ความจำเพาะของสารเริ่มในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

1.1 การตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ RSB และ QIAamp kit พบว่าให้ผลที่เหมือนกัน ซึ่งจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารเริ่ม β-actin F และ β-actin R ได้แถบดีเอ็นเอจากเนื้อไก่และเนื้อวัว มีขนาด 284 คู่เบส ส่วนเนื้อหมู มีขนาด 248 คู่เบส ผลที่ได้แสดงใน Figure 1

1.2 การตรวจสอบความจำเพาะจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้สารเริ่ม pig F และ pig R พบว่าได้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อหมูเท่านั้น มีขนาด 531 คู่เบส แสดงใน Figure 1 และจากการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อวัวและเนื้อไก่ ทั้งการเพิ่มปริมาณและปรับสภาวะยังยืนยันให้ผลเป็นลบ ผลที่ได้แสดงใน Figure 2

1.3 การตรวจสอบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอหมูโดยใช้สารเริ่ม pig F และนำผลที่ได้มา

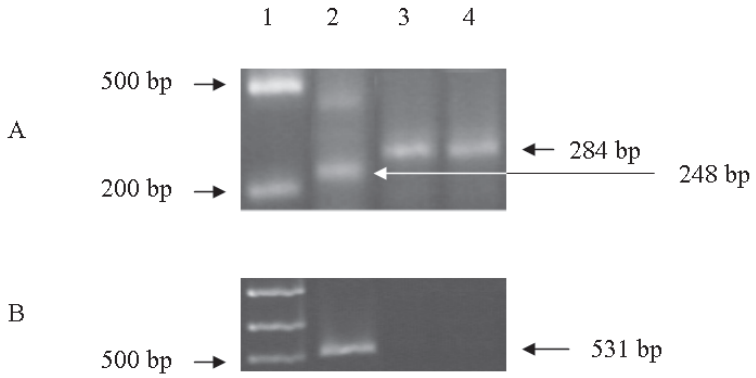

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the three fresh meats. (A) PCR products using β-Actin F and β-Actin R primer (B) PCR products using pig F and pig R primer. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: pork, lane 3: beef and lane 4: chicken.

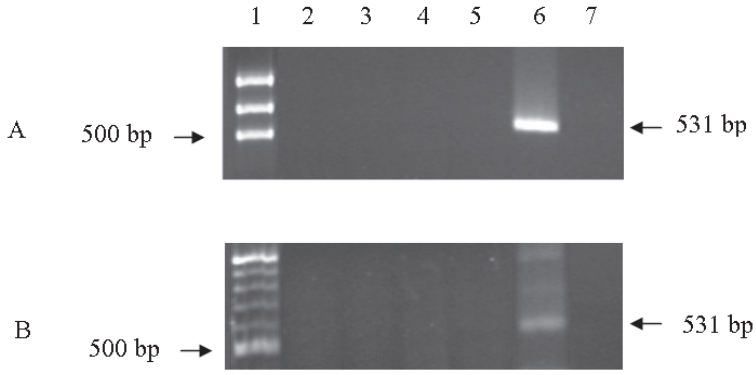

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified from negative samples using pig F and pig R primer. (A) PCR products of different quantity negative samples. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: 80 ng beef DNA, lane 3: 100 ng beef DNA, lane 4: 80 ng chicken DNA, lane 5: 100 ng chicken DNA, lane 6: positive control (40 ng pork DNA), lane 7: negative control (40 ng chicken).
(B) PCR products of different annealing temperature conditions. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: chicken DNA at 44ºC, lane 3: chicken DNA at 47ºC. lane 4: beef DNA at 44ºC, lane 5: beef DNA at 47ºC, lane 6: positive control (pork DNA at 45ºC), lane 7: negative control (chicken DNA at 45ºC).

เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลเลขทะเบียน AF535163 ใน GenBank โดยใช้โปรแกรมบลาสท์ (basic local alignment search tool: BLAST) พบว่ามีความเหมือน 98% ซึ่งเป็นการยืนยันว่าไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนมาจากดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น โดยเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คือ AY621117 ผลที่ได้แสดงใน Figure 3

2. การตรวจสอบความจำเพาะของสารเริ่มในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน

ปฏิกิริยา PCR ของดีเอ็นเอของเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121ºC เป็นเวลา 15 นาที เมื่อใช้สารเริ่ม pig F และ pig R พบว่าให้ผลบวกและได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 531 คู่เบส ผลที่ได้แสดงใน Figure 4

```
                    *       200         *       220         *       240
AY621117 : --------------------TAGCATGC-CATANTATT---TAATATN-CATGGT-CATAT :   35
AF535163 : TTGCTAGTCCCCATGCATATAAGCATGTACATACTATTATTAATATTACATAGTACATAT :  240
                                AGCATG  CATACTATT  TAATATT CAT GT CATAT

                    *       260         *       280         *       300
AY621117 : TATTATTGATCG-ACATAGCACATATCATGTCAAATAACNCCAGGTCAACATGCATATCA :   94
AF535163 : TATTATTGATCGTACATAGCACATATCATGTCAAATAACTCCAG-TCAACATGCATATCA :  299
           TATTATTGATCG ACATAGCACATATCATGTCAAATAACTCCAG TCAACATGCATATCA

                    *       320         *       340         *       360
AY621117 : CCACCACTAGATCACGAGCTTAACTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAG :  154
AF535163 : CCACCACTAGATCACGAGCTTAACTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAG :  359
           CCACCACTAGATCACGAGCTTAACTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAG

                    *       380         *       400         *       420
AY621117 : GGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAAACCGTGGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAAC :  214
AF535163 : GGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAAACCGTGGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAAC :  419
           GGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAAACCGTGGGGGTTTCTATTGATGAACTTTAAC

                    *       440         *       460         *       480
AY621117 : ANGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTA :  274
AF535163 : AGG-CATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTA :  478
           AGG CATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTTCCCCTTA

                    *       500         *       520         *       540
AY621117 : AATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACACAATAACTGAGGTT :  334
AF535163 : AATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACACA-TAACTGAGGTT :  537
           AATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACACA TAACTGAGGTT

                    *       560         *       580         *       600
AY621117 : TCATACATTTGGTATTTTTTAATTTTTGGGGATGCTTANACTCAGCCATGGCCGTCAAAG :  394
AF535163 : TCATACATTTGGTATTTTTTAATTTTTGGGGATGCTTAGACTCAGCCATGGCCGTCAAAG :  597
           TCATACATTTGGTATTTTTTAATTTTTGGGGATGCTTAGACTCAGCCATGGCCGTCAAAG

                    *       620         *       640         *       660
AY621117 : GCCCTAACACAGTCAAATCAATTGTAGCTGGACTTCATGGAACTCATGATCCGGCACCGA :  454
AF535163 : GCCCTAACACAGTCAAATCAATTGTAGCTGGACTTCATGGAACTCATGATCCGGCAC-GA :  656
           GCCCTAACACAGTCAAATCAATTGTAGCTGGACTTCATGGAACTCATGATCCGGCAC GA

                    *       680         *       700         *       720
AY621117 : CAAATCCAAACAAGGTGCTATTCAAGTCAATGGTAAT------------------------ :  491
AF535163 : CAA-TCCAAACAAGGTGCTATTCA-GTCAATGGTTACGGGACATAACGTGCGTACACGCG :  714
           CAA TCCAAACAAGGTGCTATTCA GTCAATGGT A
```

Figure 3. Nucleotide sequence alignment between mtDNA sequence of AF621117 obtained from this work and sequence retrieve from GenBank accession number AF535163.

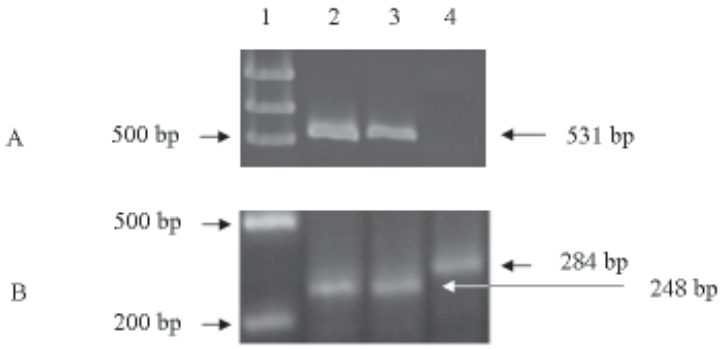

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from fresh and heated meat. (A) PCR products using pig F and pig R primer. (B) PCR products using β-actin F and β-actin R primer. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: heated pork (at 121ºC, 15 min), lane 3: fresh pork and lane 4: negative control (chicken).

3. ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา

ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา พบว่า การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAamp kit สามารถตรวจหาดีเอ็นเอหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ได้ในระดับต่ำถึง 0.5% (1:200) ผลที่ได้แสดงใน Figure 5 ส่วนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ RSB สามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูที่ผสมในเนื้อไก่ได้ในระดับต่ำเพียง 2% (1:50) ผลที่ได้แสดงใน Figure 6 และผลการเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยาระหว่างการสกัดดีเอ็นเอด้วย QIAamp kit กับบัฟเฟอร์ RSB แสดงใน Table 1

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้สารเริ่ม β-actin F และ β-actin R ที่ออกแบบจากส่วนหนึ่งของยีน β-actin ซึ่งพบมากในสิ่งมีชีวิต (Bellis *et al*., 2003) เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละการทดลอง ทั้งการทดลองสกัดด้วยบัฟเฟอร์ RSB และ QIAamp kit ในตัวอย่างหมูที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและผ่านความร้อน ตัวอย่างหมูผสมกับไก่ โดยมีตัวควบคุมที่เป็นลบคือ ไก่และวัว พบว่าได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ และไม่มีการปนเปื้อนใน

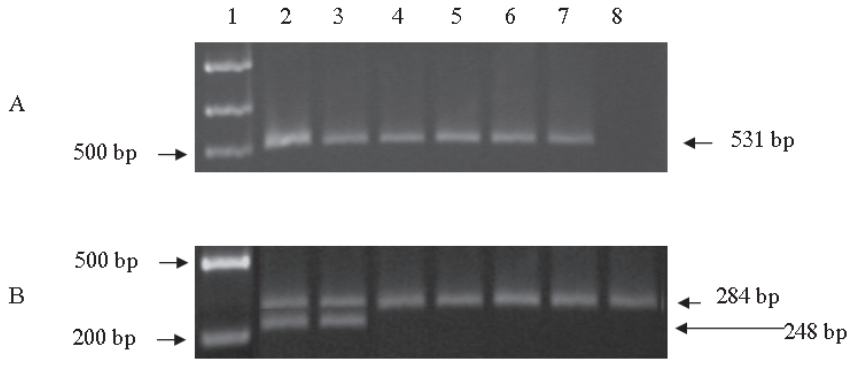

Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from mixed meats (pork and chicken at different ratio) following DNA extraction with the QIAamp kit. (A) PCR products using pig F and pig R primer. (B) PCR products using β-actin F and β-actin R primer. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: 1:1, lane 3: 1:5 , lane 4: 1:10, lane 5: 1:50, lane 6: 1:150, lane 7: 1:200 and lane 8: negative control (chicken).

Table 1. A comparison between the sensitivity of the commercial kit and the RSB lysis buffer for DNA extraction process was carried out by mixing pork with chicken meat at ratios of 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:150 and 1:200 .

Pork:Chicken Ratio	Commercial kit	RSB lysis buffer
1:1	+	+
1:5	+	+
1:10	+	+
1:50	+	+
1:150	+	-
1:200	+	-
Positive control (fresh pork)	+	+
Negative control (fresh chicken)	-	-

ระหว่างการทดลอง นอกจากนั้น ผลที่ได้จากการตรวจสอบตัวอย่างหมูผสมกับไก่ในอัตราส่วนต่างๆ โดยใช้สารเริ่มชนิดนี้ พบว่ามีผลิตภัณฑ์ทั้งหมูและไก่เฉพาะที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ซึ่งอัตราส่วนที่เหลือมีผลิตภัณฑ์เฉพาะไก่เท่านั้น เนื่องด้วยปริมาณเนื้อหมูเริ่มต้นมีปริมาณน้อยมาก

ในการทดลองความจำเพาะของสารเริ่ม pig F และ pig R ที่ออกแบบจากไมโตคอนเดรียของหมู จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของหมูกับสปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ ไก่ วัว แบคทีเรีย ยีสต์ และฟังไจ พบว่าสารเริ่มมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอหมูเท่านั้น ตามที่แสดงใน Figure 7 จากการทำปฏิกิริยา PCR พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อหมูเท่านั้น โดยได้ทดสอบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบเพิ่มเติมทั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการปรับสภาวะในปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันผลว่าสารเริ่มมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอหมูสูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ในตัวอย่างหลายชนิด ได้แก่ แกะ ไก่ แพะ คน หมูและหมูป่า พบว่าการใช้สารเริ่มนี้ให้ผลบวกเฉพาะดีเอ็นเอที่ได้จากหมูและหมูป่าเท่านั้น (Montiel-sosa *et al*., 2000)

จากการตรวจสอบเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121ºC เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปตรวจสอบได้โดยวิธี PCR ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณและได้แถบดีเอ็นเอขนาดที่เท่ากับเนื้อหมูสด ซึ่งเป็นข้อดีในการจำแนกชนิดของสัตว์ เนื่องด้วยวิธีการทางโปรตีนที่ใช้อยู่เดิมไม่สามารถตรวจสอบได้เมื่อโปรตีนผ่านความร้อน และยังมีประโยชน์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ความร้อน เช่น เบคอน ไส้กรอกและแฮม เป็นต้น

วิธี PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ ในการทดลองนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความไวในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ RSB และ QIAamp kit สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอในปริมาณ 2% และ 0.5% ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีบัฟเฟอร์ RSB และ QIAamp kit สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอในปริมาณ 5% และ 1% ตามลำดับ (Lahiff *et al*., 2001) ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ คือ การสกัดด้วย QIAamp kit เนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และปริมาณที่สูงกว่า รวมทั้งมีความสะดวกและรวดเร็วกว่าการใช้สารเคมีที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ

สรุปและข้อเสนอแนะ

วิธี PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ รวดเร็ว และแม่นยำในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิต โดยต้องเลือกใช้สารเริ่มที่จำเพาะและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ จากการ

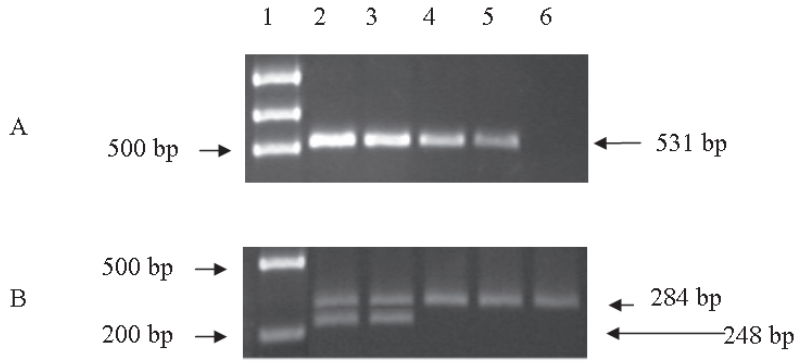

Figure 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from mixed meats (pork and chicken at different ratios) following DNA extraction with RSB lysis buffer. (A) PCR products using pig F and pig R primer. (B) PCR product using β-actin F and β-actin R primer. Lane 1: EZ load DNA marker, lane 2: 1:1, lane 3: 1:5, lane 4: 1:10, lane 5: 1:50 and lane 6: negative control (chicken).

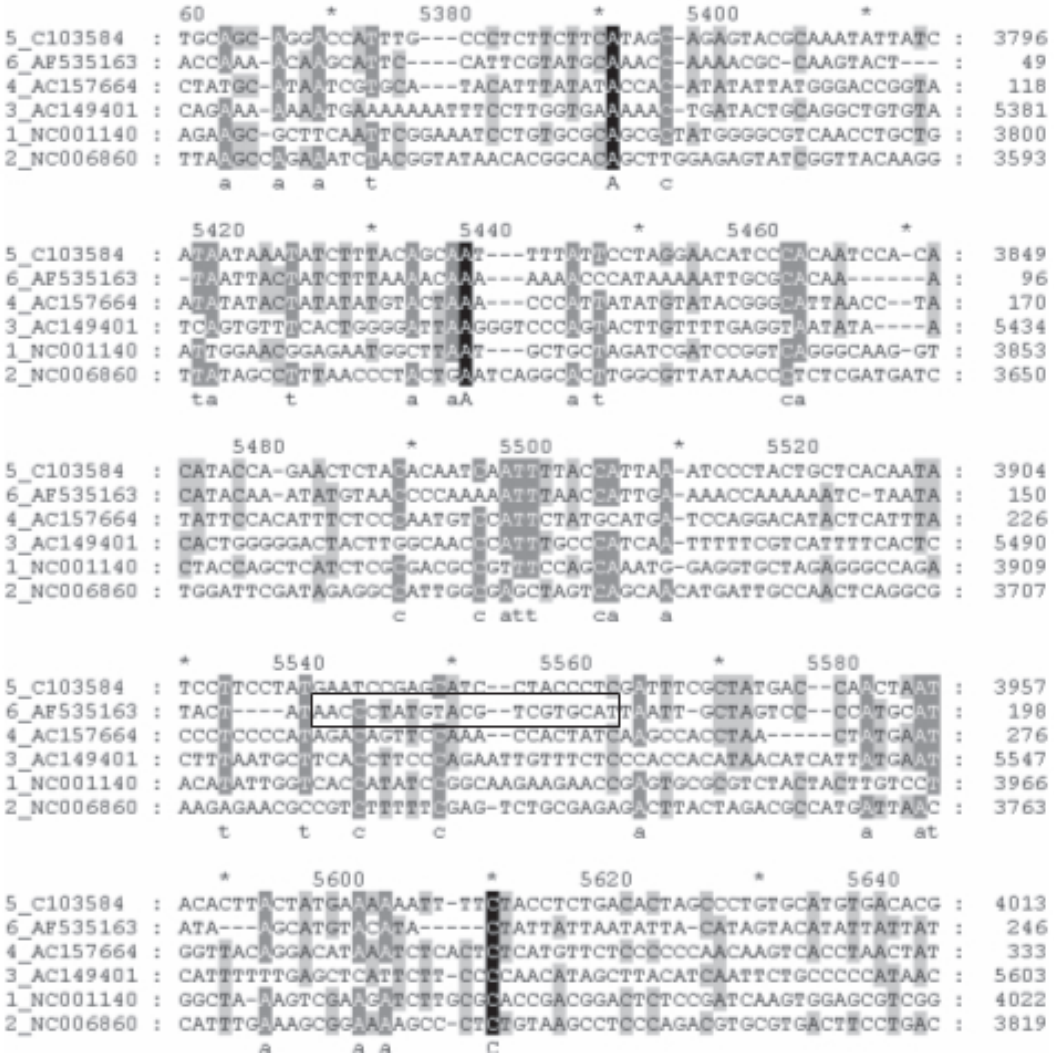

Figure 7. Nucleotide sequence alignment among yeast genome (NC001140), fungi genome (AC149401), bacteria genome (NC006860), chicken mtDNA (AC157664), cow mtDNA (C103584) and pig mtDNA (AF535163). The closed box indicates sequence of pig F primer that specific with pig nucleotide sequence only.

เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในการตรวจสอบเนื้อหมูที่ผสมในเนื้อสัตว์ชนิดอื่น พบว่าการใช้ QIAamp kit ดีกว่าวิธีบัฟเฟอร์ RSB โดยสามารถตรวจสอบในระดับต่ำถึง 0.5% (1:200) ในขณะที่วิธีบัฟเฟอร์ RSB สามารถตรวจสอบในระดับต่ำเพียง 2% (1:50) และวิธี PCR ยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบเนื้อหมูที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยใช้ความร้อนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2547 ประเภททุนริเริ่มโครงการ และขอบคุณ รศ.ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา และนางสาวอลิษา หนักแก้ว ในการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ด้าน bioinformatics

เอกสารอ้างอิง

Bellis, C., Ashton, K.J., Freney, L., Blair, B. and Griffiths, L.R. 2003. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Sci. Inter. 134: 99-108.

Berger, R., Mageu, K., Schwab, B., Johnston, R. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988, 71: 406-409

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., 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.

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, Muyllis, K.B. and Relish, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239(4839): 487-91.

Ursing, B.M. and Arnason, U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). J. Mol Evol. Sep; 47(3): 302-6.