การตรวจสอบสารพันธุกรรมของพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์

นิจรดา ย๊ะหมื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ นิจรดา ย๊ะหมื่น ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ ถนนแก้ว)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงตา จุลศิริกุล)

.....กรรมการ
(ดร.สลิล ชั้นโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้โอกาสและกรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิจัย เป็นกำลังใจและเป็นแรงผลักดันให้ข้าพเจ้าได้มีแรงบันดาลใจ จัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ทั้งในด้านเนื้อหาและองค์ความรู้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งและขอขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อบุญส่ง ย๊ะหมื่น และคุณแม่กิมสุย ย๊ะหมื่น ที่เป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือ พร้อมทั้งสนับสนุนส่งเสริมการศึกษาจนสำเร็จการศึกษาด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณนางสาวจีรนันท์ ธรรมณวโสพส นางสาวหยาดเพชร โอเจริญ นางสาวอาทิตยา คำแก้ว นายสันติ สวนลา นางสาวน้ำอ้อย ใจแสน นายยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และนางสาวศิวาพร คำดี ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล BS 3109 ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แทนกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

นิจรดา ย๊ะหมื่น

56910047: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: เรียลไทม์พีซีอาร์/ บริเวณ ITS1/ ยีน *psa*A

นิจรดา ย๊ะหมื่น: การตรวจสอบสารพันธุกรรมของพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปด้วยเทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ (VERIFICATION OF PLANT DNA IN PROCESSED MEAT PRODUCTS BY REAL-TIME PCR) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D. 52 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

การตรวจสอบการปลอมปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป โดยทำการศึกษาบริเวณ ITS1 (Internal Transcribed Spacer1) ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (514-520 คู่เบส) และยีน *psa*A (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1) ขนาดประมาณ 190 คู่เบส (192-193 คู่เบส) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (conventional PCR) ทดสอบกับพืชจำนวน 4 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากพืชประเภทแป้ง 4 ตัวอย่าง เนื้อของสัตว์ 3 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป 25 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 2 บริเวณให้ผลบวกอย่างจำเพาะกับกลุ่มตัวอย่างของพืช และแป้ง แต่ให้ผลลบที่ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์กับตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งหมด เมื่อศึกษาบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิค SYBR Green Real-time PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับกลุ่มพืชและแป้งของพืช โดยสามารถตรวจพบการปนพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ซึ่งมีความไวที่ทดสอบได้กับดีเอ็นเอของพืชหรือแป้งในปริมาณต่ำสุด คือ 0.001% (5×10^{-4} นาโนกรัม) ดังนั้น เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในบริเวณยีน *psa*A นี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์ของพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

56910047: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: REAL-TIME/ ITS1/ *psa*A gene

NITRADA YAMEUN: VERIFICATION OF PLANT DNA IN PROCESSED MEAT PRODUCTS BY REAL-TIME PCR. ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D. 52 P. 2017.

The adulteration of plants or plant products in processed meat products was investigated. The amplified approximately 500-bp (514-520-bp) ITS1 (Internal transcribed spacer1) and approximately 190-bp (192-193-bp) *psa*A fragments were analyzed by conventional PCR. Four plants, four starchs, three meat and 25 processed meat samples were tested. The PCR results of ITS1 and *psa*A of all plant and starch samples were specifically positive, but only from meat samples were negative. The solely *psa*A gene was subsequently conducted by SYBR Green real-time PCR and successfully applied to plants and plant products. The minimum amount of DNA detectable by this real-time PCR technique was 0.001% (5×10^{-4} nanograms), making the developed real-time PCR assay based on *psa*A gene available and efficient option for detecting plants and plant products adulteration in processed meat products.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

สมมติฐานของการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

การตรวจสอบการปลอมปนในผลิตภัณฑ์อาหาร 4

จีโนมพืช 5

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ 7

การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโทรโฟริซีส 10

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR) 10

SYBR Green สารเรืองแสงที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR 11

การวิเคราะห์ค่า T_m ด้วยวิธี melting curve 12

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

3 วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์ 15

สารเคมี 16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3 วิธีดำเนินการวิจัย
การเตรียมตัวอย่าง 17
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 18
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาควบคุมยีน 18S *rRNA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 19
การโคลนชิ้นส่วนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A
เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m 20
การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม 20
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 21
การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยปฏิกิริยา
real-time PCR 21
การเตรียมดีเอ็นตัวอย่างเพื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยา real-time PCR 21
การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ใช้ในการทดสอบ 21
การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ด้วยเทคนิค real-time PCR 22
การระบุความแตกต่างของผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ 23
4 ผลการวิจัย
4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 24
4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิค real-time PCR 25
4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 30
4.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิค real-time PCR 31
การทดสอบประสิทธิภาพและความไวของปฏิกิริยา real-time PCR 34
การตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค real-time PCR 36
5 อภิปรายและสรุปผล
อภิปรายผลการทดลอง 39
สรุปผลการผลการทดลอง 41
ข้อเสนอแนะ 42
บรรณานุกรม 43
ภาคผนวก ก 50
ประวัติย่อของผู้วิจัย 52

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และยีน *psa*A 18

3-2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และยีน *psa*A 18

3-3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 18S *rRNA* 19

3-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 18S *rRNA* 19

3-5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา real-time PCR 22

3-6 ขั้นตอนของปฏิกิริยา real-time PCR 22

4-1 ค่า T_m บริเวณ ITS1 ของตัวอย่างพืชและแป้ง 25

4-2 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ในบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างพืช 4 ชนิด และแป้ง 4 ชนิด 28

4-3 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psa*A ของตัวอย่างพืชและแป้ง 32

4-4 ค่า T_m บริเวณยีน *psa*A ของตัวอย่างพืชและแป้ง 34

4-5 ค่า Ct ของปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณยีน *psa*A ของสารละลายดีเอ็นเอผสมระหว่างข้าวโพดกับหมูในสัดส่วนร้อยละ 0.001-100 36

4-6 การตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค real-time PCR (ยีน *psa*A) 37

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 นิวเคลียร์จีโนม 6

2-2 บริเวณ Internal transcribed spacer1 ที่อยู่ระหว่าง ยีน 18S *rRNA* และยีน 5.8S *rRNA* 6

2-3 แผนที่คลอโรพลาสต์จีโนมของยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) 8

2-4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 9

2-5 กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยา real-time PCR 11

2-6 การตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR Green I Dye 12

4-1 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และบริเวณยีนควบคุม 18S *rRNA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 24

4-2 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1ของพืชและแป้ง 27

4-3 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1 29

4-4 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณยีน *psa*A และบริเวณยีนควบคุม 18S *rRNA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 30

4-5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psa*A ของพืชและแป้ง 31

4-6 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ *psa*A 33

4-7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบ (Cycle number) ของปฏิกิริยา real-time PCR กับ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอร้อยละ 0.001-100 แสดงค่า log (log concentration) 35

4-8 ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) กับจำนวนรอบ (cycle) ในปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณยีน *psa*A 35

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารถูกพัฒนาคุณภาพและรูปแบบเพื่อจูงใจและดึงดูดให้ผู้บริโภคได้เลือกซื้อสินค้ามากขึ้น จึงส่งผลให้มีการผลิตของปลอมเลียนแบบของแท้เพื่อขายในราคาที่เทียบเท่าหรือถูกกว่าของแท้ และมีการปลอมปนผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อความได้เปรียบในการแข่งขัน และเพิ่มพูนกำไรจากการขายในราคาสินค้าของแท้ลักษณะรูปแบบของอาหารปลอมนั้นเป็นไปได้หลายรูปแบบ อาทิ การปลอมปน การทำเลียนแบบ การผลิตสินค้าที่ด้อยคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน และการติดฉลากลวง เป็นต้น (บังอร บุญชู, นิกาพร ชนะคช และกมลกาญจน์ จิญกาญจน์ 2557) และผู้บริโภคเองให้ความสำคัญกับคุณภาพของอาหารที่จะใช้รับประทานเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะส่วนประกอบของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตซึ่งอาจมีผลต่อผู้บริโภคในด้านสุขภาพ เช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์แปรรูป อาทิ ไส้กรอกไก่ ลูกชิ้นหมู ที่จะมีการใช้แป้งจากพืชเป็นองค์ประกอบในการผลิตรวมไปถึงผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจำพวกนมจากสัตว์ที่อาจจะมีการปลอมปนหรือผสมวัตถุดิบจากพืชซึ่งอาจจะก่อให้เกิดอาหารแพ้กับกลุ่มผู้บริโภคที่ไวต่อการแพ้อาหาร นอกจากนี้ยังมีกฎระเบียบเกี่ยวกับฉลากผลิตภัณฑ์อาหารมีการกำหนดให้ระบุส่วนผสมที่ถูกต้องบนฉลากผลิตภัณฑ์

ในการตรวจสอบพืชที่ปนอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อสัตว์นั้นไม่สามารถที่จะใช้วิธีการตรวจสอบที่พิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้จำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมบนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจสอบพืชปลอมปนในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ โดยใช้ข้อความพันธุกรรมของพืชจำนวน 2 บริเวณ คือ 1) บริเวณ ITS1 (internal transcribed spacer 1) ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรปรวนสูง (Jobes & Thien, 1997) อยู่ในนิวเคลียร์จีโนมที่มีการนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างในวงศ์พืชหลายวงศ์ (family) เช่น วงศ์ถั่ว Leguminosae (Varela et al., 2004; Goel, Raina, & Ogihara, 2002) วงศ์แตง Cucurbitaceae (Jobst, King, & Hemleben, 1998) และวงศ์มะละกอ Caricaceae (Kyndt et al., 2005) เป็นต้น และ 2) ยีน *psa*A (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1) ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มของพืชมีความเหมือนกันมากหรือเป็นแบบอนุรักษ์ (Santabarbara et al., 2005) ซึ่ง *psa*A เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่ 1 (Photosystem I; PS I)

อยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนม โดยการใช้เทคนิค real-time PCR ที่มีความไวสูง ใช้ระยะเวลาทดสอบสั้น และใช้สารเรืองแสงติดตามปฏิกิริยา จึงสามารถติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาและสามารถกำหนดจุดเก็บสัญญาณเพื่อนำมาวิเคราะห์ในภายหลังได้ รวมถึงในปฏิกิริยาของ real-time PCR จะสามารถวิเคราะห์ค่า T_m (melting temperature) ด้วยวิธี melting curve analysis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์อุณหภูมิที่ทำให้ร้อยละ 50 ของดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยค่า T_m นี้แปรผันตรงกับจำนวนของลำดับเบส GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น (วีรพงศ์ ลุลิตานนท์, 2551) ดังนั้นค่า T_m จึงถูกนำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำมาจากพืชและสัตว์ ในขณะที่เทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (conventional polymerase chain reaction) และ/หรือ พีซีอาร์ร่วมกับเทคนิค RFLP (Restriction fragment length polymorphism) เป็นการนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ยังมีข้อเสียกล่าวคือวิเคราะห์ผลผลิตภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) ซึ่งใช้เวลานาน และมีความไวน้อย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พัฒนาวิธีการตรวจสอบพืชและแป้งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปด้วยเทคนิค real-time PCR โดยศึกษาจากบริเวณ ITS1 และบางส่วนของยีน *psa*A

สมมติฐานของการวิจัย

1) จะสามารถเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบางส่วนของยีน *psa*A ซึ่งมีความจำเพาะกับพืชได้ด้วยเทคนิค real-time PCR

2) จะสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชและสัตว์ได้ โดยค่า T_m (melting temperature) ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบของ melting curve ด้วยเทคนิค real-time PCR

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้วิธีการตรวจสอบการปลอมปนพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสัดส่วนขององค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีการระบุฉลาก และไม่ได้ระบุฉลาก ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

ขอบเขตการวิจัย

ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากตัวอย่างพืชที่นิยมนำไปแปรรูปเป็นแป้ง 4 ชนิด คือ ข้าวสาลี (*Triticum vulgare* Vill.) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) และมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* L.) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพืช 4 ชนิด คือ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด แป้งถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลัง ตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่นิยมใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร 3 ชนิด คือ หมู (*Sus scrofa domesticus* L.) ไก่ (*Gallus gallus* L.) และวัว (*Bos Taurus* L.) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ขายตามห้างสรรพสินค้าหรือตลาดทั่วไป ทั้งที่มีการระบุสัดส่วนขององค์ประกอบ และที่ไม่ได้ระบุในฉลาก ได้แก่ ไส้กรอก แฮม ลูกชิ้น หมูยอ และกุนเชียง เป็นต้น อย่างน้อยประเภทละ 5 ตัวอย่าง นำมาสกัดเป็นจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 (Internal transcribed spacer 1) และบางส่วนของยีน *psa*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (conventional PCR) และเทคนิค real-time PCR ที่ใช้ SYBR green ในการทดสอบและวิเคราะห์ค่า T_m ด้วยวิธีการวิเคราะห์ melting curve

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจสอบการปลอมปนในผลิตภัณฑ์อาการ

ปัจจุบันการตรวจสอบส่วนประกอบในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่แปรรูปรวมไปถึงการประเมินความถูกต้องนั้นเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ เนื่องจากผู้บริโภคให้ความสำคัญกับคุณภาพของอาหารที่จะรับประทานเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะส่วนประกอบของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิต ซึ่งอาจมีผลต่อผู้บริโภคในด้านสุขภาพที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงในผู้ที่ไวต่อการแพ้อาหาร เช่น การแพ้ถั่วเหลืองหรือผลิตภัณฑ์จากถั่ว และการแพ้เนื้อวัวหรือน้ำนมวัวทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ (Lipp, Brodmann, Pietsch, Pauwels, & Anklam, 1999; Fiocchi, Restani, & Riva, 2000; Poms, Anklam, & Kuhu, 2004; Abdullah, Radu, Hassan, & Hashim, 2006) โดยการตรวจสอบหาปริมาณของอาหารกับรายละเอียดของข้อมูลที่ปรากฏอยู่บนฉลากเป็นเรื่องที่สำคัญ เนื่องจากฉลากของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการระบุชนิด และส่วนประกอบอาจไม่ตรงกับความเป็นจริง ดังนั้นการตรวจสอบและการปลอมปนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารอย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญมาก

การตรวจสอบการปลอมปนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารนั้นทำได้หลายเทคนิค เช่น การระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Fajardo et al., 2008) ที่วิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Hsieh, Sheu, & Bridgman, 1997; Sheu & Hsieh, 1998) เช่น เทคนิค Immunosorbent assay หรือ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Jones & Patterson, 1985; Dincer, Spearow, Cassens, & Greaser, 1987) รวมถึงเทคนิคทางเคมี เช่น เทคนิค HPLC (high-performance liquid chromatography) (Gratzfeld-Huesgen & Schein, 2002) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้ไม่สามารถตรวจผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปหรือปรุงสุกได้ เนื่องจากเมื่อผ่านความร้อนโปรตีนซึ่งเป็นโมเลกุลเป้าหมายของการตรวจสอบจะเสียสภาพได้ง่ายในขณะที่ดีเอ็นเอซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นสารชีวภาพที่มีความเสถียรสูงกว่าโปรตีน (Anguita, Metin, Garci, Morales, & Haza, 1996) จะสามารถใช้ในการตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูปหรือปรุงสุกและเสียสภาพได้

ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคพีซีอาร์ (conventional PCR) ที่มีการใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหาร (Che-man, Aida, Raha, & Som, 2007; Kesmen, Sahin, & Yotim, 2007) แต่มีข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน เนื่องจากต้องวิเคราะห์ผลผลิตภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส มีความไวน้อย และยังมีปัญหาเรื่องผลบวกเท็จหรือ

การปนเปื้อนที่เกิดขึ้นได้ง่าย นอกจาก นั้นแล้วยังมีเทคนิค PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymerase) ที่นำไปใช้จำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ โดยตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Murugaiah et al., 2009) ไม่สามารถจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ได้ทุกชนิด และเทคนิคนี้ยังไม่สามารถใช้วิเคราะห์กับผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพหรือมีขนาดสั้นได้ ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจสอบอาหาร เนื่องจากมีความไว ใช้ระยะเวลาทดสอบสั้น และสามารถติดตามการดำเนินของปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสงจึงไม่จำเป็น ต้องวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยามาใช้ตรวจสอบการปลอมปนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารกันอย่างแพร่หลาย (Martin et al., 2009; Rojas et al., 2011; Demirhan, Ulca, & Senyava, 2012; Safdar & Absiyanik, 2013)

จีโนมพืช (plant genome)

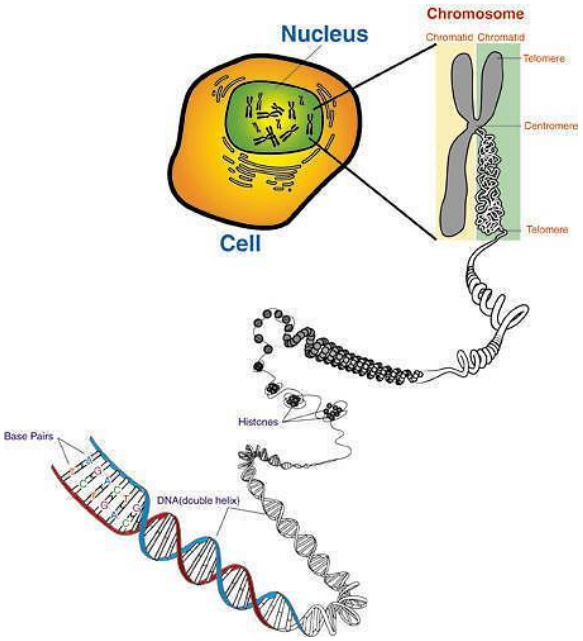
จีโนมพืช หมายถึง สารพันธุกรรมทั้งหมดของพืชซึ่งบรรจุอยู่ในเซลล์ ประกอบด้วย นิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) และออร์กาแนลจีโนม (organelle genome) ซึ่งออร์กาแนลจีโนมแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ คลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) หรือคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ และไมโทคอนเดรียจีโนม (mitochondrial genome) หรือไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยจีโนมครอบคลุมดีเอ็นเอทั้งหมดที่เป็นยีน ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ใช้ในการทำงานของเซลล์และดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ในจีโนมประมาณ 95% ซึ่งยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

นิวเคลียร์จีโนม เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสของพืชมีลักษณะเป็นเส้นอัดเรียงตัวกันเป็นโครโมโซม (ภาพที่ 2-1) ซึ่งนิวเคลียร์จีโนมเป็นองค์ประกอบที่ใหญ่ที่สุดในจีโนมได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง ขนาดของนิวเคลียร์จีโนมแปรผันมากในสิ่งมีชีวิตต่างกันได้เป็นหมื่นเท่า ในพืชพบได้ตั้งแต่ 10 ถึง 125,000 เมกะเบส (Hawkins, Grover, & Wendel, 2008) สาเหตุที่ต่างกันมากส่วนใหญ่เกิดจากจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy) ของพืชที่ต่างกัน (Bennetzen, Ma, & Devos, 2005) ซึ่งดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีส่วนที่นิยมใช้สร้างเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของพืช (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

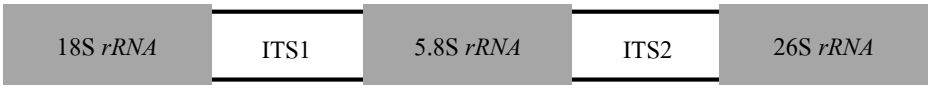
ไรโบโซมดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) จะจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ (repeat unit) เป็นพัน ๆ หน่วยซ้ำ ในจีโนมพืชครอบคลุมประมาณ 10% ของดีเอ็นเอทั้งหมด (Hemleben, Jobst, & King, 1998) หน่วยซ้ำของไรโบโซมดีเอ็นเอแยกออกจากกันโดย intergenic spacer (IGS) แต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยส่วนที่ถูกถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ เริ่มตั้งแต่ส่วน external transcribed

spacer (ETS) ถัดมาเป็นยีน 18S *rRNA*, ITS1, ยีน 5.8S *rRNA*, ITS2 และสุดท้ายเป็นยีน 26S *rRNA* ซึ่งในพืชพบได้ตั้งแต่ 25S *rRNA* ถึง 28S *rRNA* (สุชาดา สุขหร่อง, 2553) โครงสร้างไรโบโซมดีเอ็นเอในพืช แสดงดังภาพที่ 2-2

บริเวณ ITS (Internal Transcribed spacer) มี 2 บริเวณ คือ ITS1 จะอยู่ระหว่างยีน 18S *rRNA* และ ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8S *rRNA* และ 5.8S *rRNA* และ 26S *rRNA* บริเวณ ITS นั้นมีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยทั่วไปแต่ละส่วนของบริเวณ ITS1 และ ITS2 จะยาวไม่เกิน 300 คู่เบส (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)



ภาพที่ 2-1 นิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome)
(ที่มา: ณิชนันทน์ โภชนุกุล, 2550)



ภาพที่ 2-2 บริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)ที่อยู่ระหว่างยีน 18S *rRNA* และยีน 5.8S *rRNA* (ดัดแปลงมาจาก: สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

คลอโรพลาสต์จีโนม มีลักษณะเป็นวงแหวนเกลียวคู่ขนาดประมาณ 120-220 กิโลเบส (Gebhardt, Schmidt, & Schneider, 2005) ยีนส่วนใหญ่เป็นยีนที่สร้างโปรตีนเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ประกอบด้วยส่วนของชุดซ้ำแบบกลับ (inverted repeat) 2 ชุด ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกประการ แต่เรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามบนโมเลกุลดีเอ็นเอเดียวกัน คลอโรพลาสต์จีโนมมีลักษณะทางพันธุกรรมถ่ายทอดผ่านทางแม่เช่นเดียวกับไมโทคอนเดรียลจีโนม ตัวอย่างแผนที่ยีนในคลอโรพลาสต์จีโจมแสดงดังภาพที่ 2-3 ซึ่งกลุ่มของยีนที่สร้างโปรตีนเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และกระบวนการฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) สามารถพบได้ทั้งในนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ เนื่องจากมีการทำงานร่วมกันระหว่างออร์กาแนลต่าง ๆ แต่ละยีนต่างกันตรงการผลิตโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ (enzyme subunit) ที่ต่างกัน เช่น ยีน *psa* (polypeptide subunits of photosystem I), *psb* (polypeptide subunits of photosystem II), *pet* (polypeptide subunits of cytochrome b_6f complex) *atp* (polypeptide subunits of ATP synthase) และ *rps* (ribosomal protein) เป็นต้น

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction or PCR)

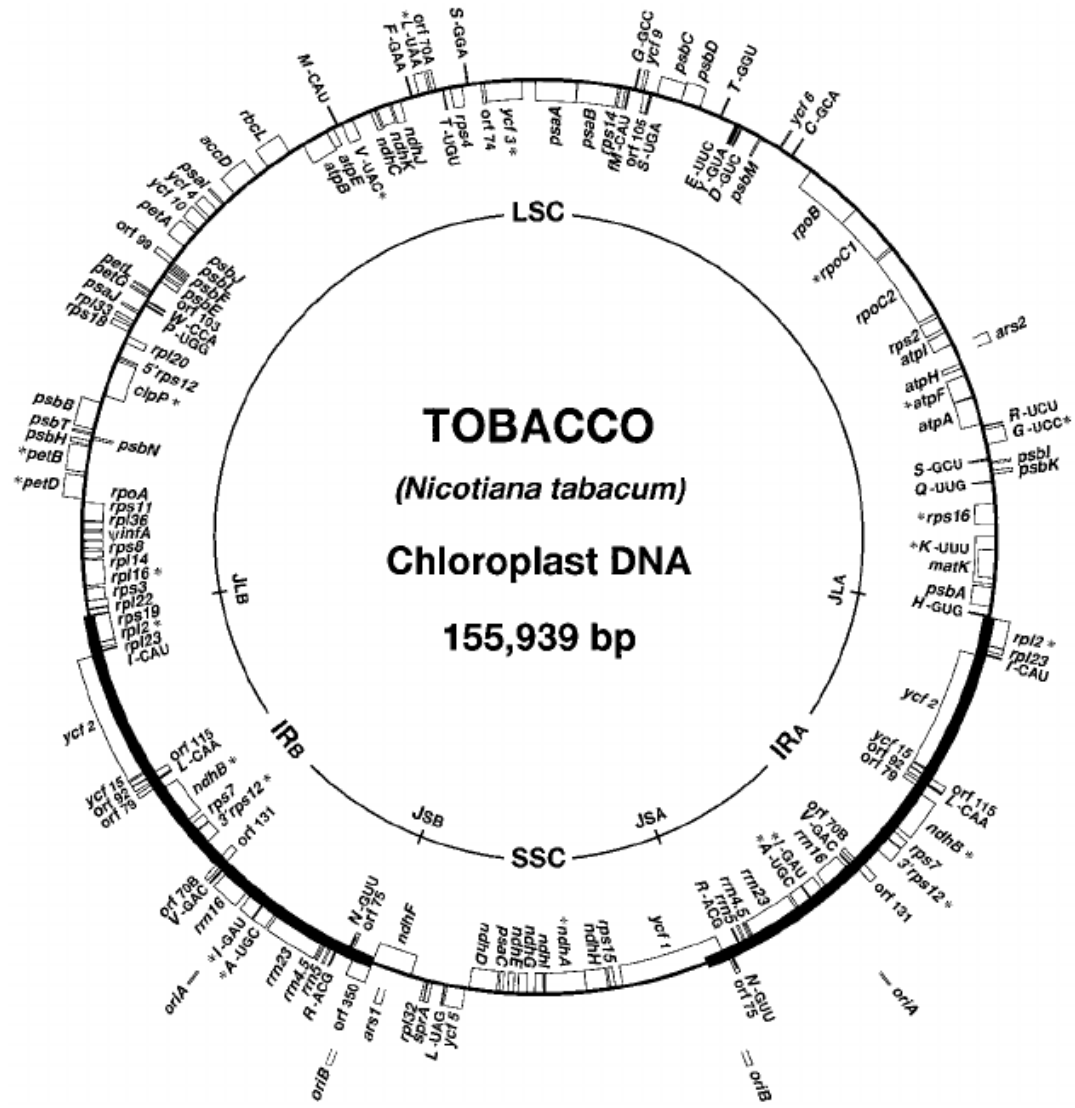
ปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล (molecular biology) ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือ DNA ในหลอดทดลอง จากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อยจนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล ปฏิกิริยาพีซีอาร์คิดค้นพัฒนาขึ้นโดย Mullis (1990) ตั้งแต่นั้นมาได้มีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการเพื่อให้เกิดประโยชน์ และการประยุกต์ใช้งานได้มากขึ้น (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

องค์ประกอบสำคัญในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1) ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ

2) ไพรเมอร์ (primers) เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายสั้น ๆ มีจำนวน 2 สายที่ใช้เริ่มต้นสร้างดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ โดยมีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 5’ และปลาย 3’ ซึ่งมีขนาดยาวประมาณ 18-24 คู่เบส

3) Thermostable DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ เอนไซม์มีการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อนสูงถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน เช่น *Taq* DNA polymerase ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดในการทำพีซีอาร์มาตรฐาน มี 5’-3’ exonuclease แต่ไม่มี 3’-5’ exonuclease ซึ่งเป็น proofreading activity



ภาพที่ 2-3 แผนที่คลอโรพลาสต์จีโนมของยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.)
(ที่มา: Wagasigi, Sugita, Tsudzuki, & Sugiura, 1998)

4) บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารละลายที่มีการควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ *Taq* DNA polymerase ประกอบด้วย KCl, Tris-HCl (pH 8.3 ที่อุณหภูมิห้อง) และ $MgCl_2$

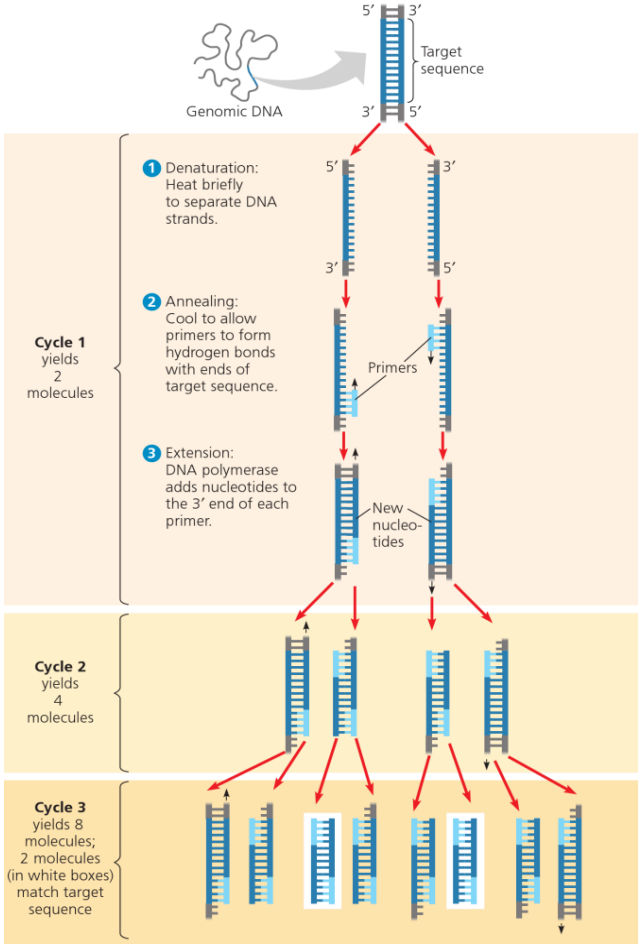
5) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynulcleotide triphosphate; dNTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ภายในหลอดทดลองจะเกิดต่อเนื่องซ้ำ ๆ กันเป็นวงจนลูกโซ่จำนวน 20-30 รอบ ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 2-4) ตามลำดับ ดังนี้

1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่แบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายดีเอ็นเอสายคู่ให้ได้สายเดี่ยวสองสาย

2) ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมา และขึ้นอยู่กับค่า T_m ของดีเอ็นเอ เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับดีเอ็นเอสายแม่แบบสายเดี่ยวบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (complementary)

3) ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อทีละตัวในทิศทาง 5’ ไป 3’ อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส (หนูเดือน เมืองแสน, 2552)



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์
(ที่มา: Dhurba, 2015)

การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโทรโฟริซีส

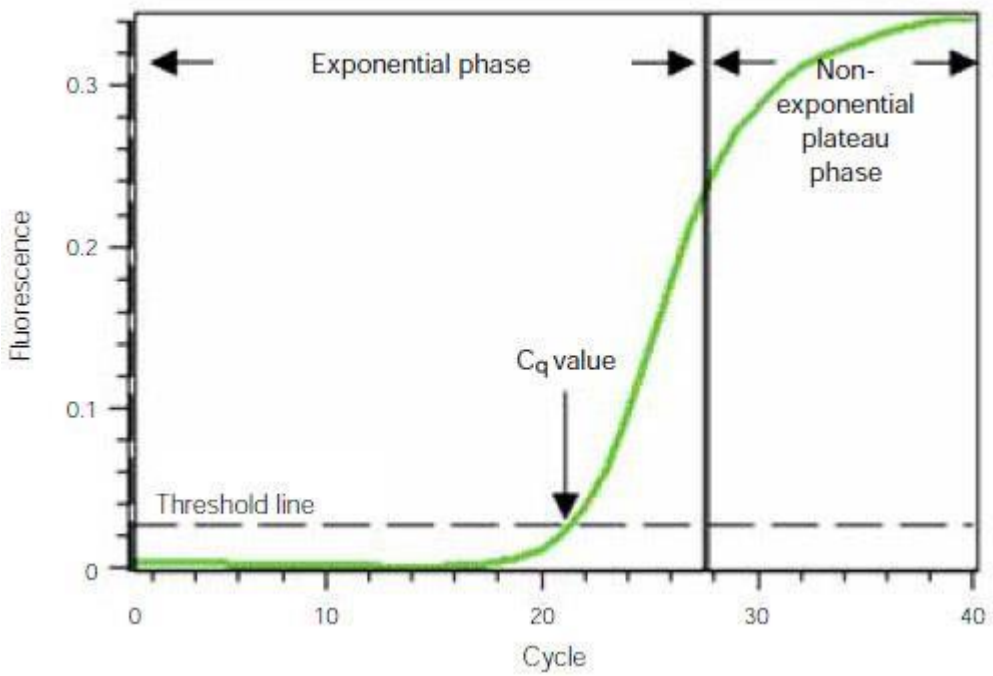
การทำเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าหรืออิเล็กโทรโฟริซีสอาศัยหลักการของอนุภาคที่มีประจุ โดยอนุภาคที่มีประจุสุทธิแตกต่างกันจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก และเทคนิคนี้นอกจากแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ยังสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอได้ ทำโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมาทำการแยกควบคู่กันไปกับตัวอย่างดีเอ็นเอ โดยมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ สารที่ต้องแยกตัวกลางสำหรับให้อนุภาคเคลื่อนผ่าน บัฟเฟอร์เพื่อทำให้ครบวงจรไฟฟ้า และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) การใช้อะกาโรสเจลดีเอ็นเอควรมีขนาดมากกว่า 200 คู่เบส (นวลฉลี เวชประสิทธิ์, 2549)

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR)

เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR หรือ Quantitative PCR, qPCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม โดยมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescence หรือ fluorochrome) ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันทีโดยไม่ต้องรอให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้นก่อน เทคนิค real-time PCR สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยาในแต่ละรอบ ทำให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจริงจากค่าของ exponential phase ที่ได้จากการเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, 2551) กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์แสดงดังภาพที่ 2-5

ข้อดีของเทคนิค real-time PCR

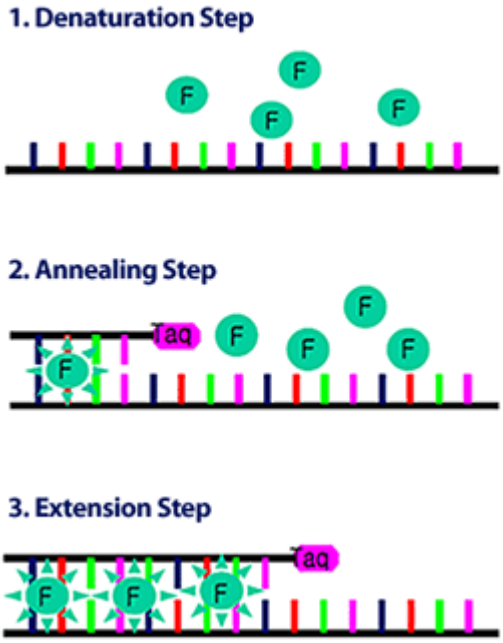
1) สามารถติดตามผลของปฏิกิริยาได้ขณะเกิดขึ้นจริง
2) ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา จึงได้ผลลัพธ์เร็วขึ้น
3) การทำงานในแต่ละรอบปฏิกิริยามักจะเร็วกว่าเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม
4) วัดการเพิ่มจำนวนได้มากถึง 10^{10} เท่า (wide dynamic range)
5) สามารถตรวจยืนยันผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting curve
6) สำหรับงานด้านอาร์เอ็นเอ (RNA) จะใช้ปริมาณตั้งต้นของอาร์เอ็นเอน้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1,000 เท่า
7) ค่าใช้จ่ายไม่ได้แพงกว่าการทำพีซีอาร์แบบดั้งเดิม ยกเว้นค่าอุปกรณ์



ภาพที่ 2-5 กราฟแสดงผลจากปฏิกิริยา real-time PCR
(ที่มา: Bio-rad, n.d.)

SYBR Green สารเรืองแสงที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR

SYBR-Green I Dye: เป็นสารเรืองแสงที่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งร่องขนาดเล็ก (minor groove) ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ ในช่วงกระบวนการ denature ของปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR-Green ยังไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการ annealing และ extension สี SYBR-Green จะแทรกตัวเข้าไปจับกับสายคู่ของดีเอ็นเอและเปล่งแสงในช่วงคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร เมื่อรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์กลับมาถึงช่วงกระบวนการ denature อีกครั้ง SYBR-Green จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ ทำให้การเรืองแสงลดลง (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-6 การตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR-Green I Dye
(ที่มา: Bioneer, n.d.)

การวิเคราะห์ค่า T_m ด้วยวิธี melting curve

การวิเคราะห์ melting curve ใช้เพื่อวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น มักทำทันทีหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา real-time PCR โดยกำหนดให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง 95 องศาเซลเซียส และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา จะพบว่าสัญญาณค่อย ๆ ลดลง เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยว ค่าของอุณหภูมิที่ทำให้ร้อยละ 50 ของดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างฉับพลัน เรียกว่าค่า T_m (melting temperature) ซึ่งมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอแต่ละสาย เนื่องจากค่า T_m นี้แปรผันตรงกับจำนวนของลำดับเบส GC (%GC content) และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากผลผลิตที่ปนเปื้อนได้ เมื่อนำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ที่แต่ละอุณหภูมิ มาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง dF/dT (derivative fluorescence/ derivative temperature) กับอุณหภูมิจะได้เป็น peak ของผลผลิตดีเอ็นเอแต่ละสาย ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส) ในขณะที่ non-specific product หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นการวิเคราะห์

melting curve ของผลผลิตพีซีอาร์จึงมักใช้เพื่อยืนยันว่าเป็นผลผลิตที่ต้องการ ทำให้ไม่จำเป็นต้องมีการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (อโณทัย โภคาธิกรณ์, 2549)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เทคนิค real-time PCR เป็นเทคนิคที่ความไว มีความจำเพาะสูง ใช้ระยะเวลาในการทดสอบสั้น และไม่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบผลผลิตสุดท้ายภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส เนื่องจากเทคนิคนี้มีการติดตามการดำเนินของปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสง และสามารถบอกความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิมนั้นไม่สามารถทำได้ ปัจจุบันมีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น 1) ด้านการแพทย์ ที่มีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจสอบและระบุสายพันธุ์ของเชื้อปรสิต *Plasmodium* spp. ด้วยสารเรืองแสง SYBR Green โดยศึกษาบริเวณยีน 18S *rRNA* พบว่าจากการวิเคราะห์ melting curve สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อปรสิตได้ 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ *P. malariae* มีค่า T_m เท่ากับ 73.5 ถึง 75.5 องศาเซลเซียส, *P. falciparum* มีค่า T_m เท่ากับ 75.5 ถึง 77.5 องศาเซลเซียส, *P. ovale* มีค่า T_m เท่ากับ 77.5 ถึง 79.0 องศาเซลเซียส และ *P. vivax* มีค่า T_m เท่ากับ 79.0 ถึง 81.0 องศาเซลเซียส (Mangold et al., 2005) 2) ด้านการเกษตร ที่นำเทคนิค real-time PCR ไปใช้ในการตรวจคุณภาพของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนในดินด้วยสาร SYBR Green (Wallenstein & Vilgalys, 2005) รวมถึงการหาปริมาณการทำงานของยีนในโปรคาริโอต (procaryotes) ในดิน (Sharma et al., 2007) เป็นต้น และ 3) ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งมีการนำเทคนิคนี้มาให้ในการตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดโดยสามารถระบุการปนเปื้อนและระบุปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นและปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ทำจากสัตว์ มีรายงานการตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูในเจลาติน (gelatin) และในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีการใช้เจลาตินในอาหารฮาลาล (halal) โดยศึกษาบริเวณยีน *cytochrome* b (*cyt*b) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับหมู ความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ร้อยละ 1 (Demirhan et al., 2012) มีรายงานการตรวจสอบและระบุปริมาณเนื้อหมูในผลิตภัณฑ์ของเนื้อสัตว์ปีกแปรรูปซึ่งใช้สาร SYBR Green เช่นกัน โดยศึกษาบริเวณยีน *cyt*b เช่นเดียวกัน และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ กลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) เช่น ศึกษาบริเวณยีน 18S *rRNA* ที่มีขนาด 140 คู่เบส สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหมูและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้จากการวิเคราะห์ค่า T_m โดยหมูค่า T_m เท่ากับ 83.5 องศาเซลเซียส และสิ่งมีชีวิตอื่นมีค่า T_m เท่ากับ 87.5 องศาเซลเซียส มีความไวในการตรวจสอบอยู่ที่ร้อยละ 0.1 (Soares, Amaral, Oliverira, & Mafra, 2013) เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจหาเพศของหมูในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งสามารถตรวจสอบเพศของหมูที่เป็นเพศผู้ได้ ซึ่งความ

ไวที่สามารถตรวจสอบได้คือ ร้อยละ 0.1 (Abdulmawjood, Krischek, Wicke, & Klein, 2012) นอกจากนั้นแล้วยังมีการตรวจสอบการปลอมปนเนื้อหมูในลูกชิ้น โดย real-time PCR ที่ใช้ TaqMan probe ศึกษาบริเวณยีน *cyt*b ที่มีขนาด 109 คู่เบส ซึ่งความไวที่สามารถตรวจสอบการปลอมปนเนื้อหมูในลูกชิ้นเนื้อวัวได้ที่ระดับร้อยละ 0.01 (Ali et al., 2012) เป็นต้น

ในปัจจุบันเทคนิค real-time PCR ถูกนำมาใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากสัตว์หลายชนิด รวมถึงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากพืชด้วย เช่น รายงานการตรวจสอบการปลอมปนของพืชในผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากถั่วเลนทิลส์ (*Len culinaris*) โดยถั่วเลนทิลส์นั้นเป็นถั่วที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่อมนุษย์ มีโปรตีนสูง อุดมไปด้วยกรดอะมิโน มีเส้นใยอาหาร และไขมันต่ำ จึงทำให้ถั่วเลนทิลส์มีราคาที่สูง ซึ่งสามารถตรวจพบการปลอมปน *Vicia sativa* ในถั่วเลนทิลส์ที่อัตราส่วน 1:100 ได้ (Bosmali, Ganopoulos, Madesis, & Tsaftaris, 2012) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Madesis, Ganopoulus, Anagnostis, and Tsaftaris (2012) ที่สามารถตรวจสอบการปลอมปนของพืชสกุล *Lupinus* spp. ในแป้งถั่วเหลืองได้ที่อัตราส่วน 1:100 เช่นเดียวกัน และยังสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนถั่วเหลือง GM ในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปจากพืชต่างๆ ซึ่งสามารถตรวจปริมาณการปลอมปนของถั่วเหลือง GM ได้ต่ำสุด (มีความไวสูงสุด) ที่ระดับ 0.1% (ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, อัญชลี ศรีสุวรรณ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, 2548) นอกจากนั้นแล้วยังมีการตรวจปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลืองผสมกับเนื้อวัวในปริมาณต่ำสุดได้เท่ากับร้อยละ 0.001 (Safdar & Abasiyanik, 2013) และได้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่า T_m แบบ High resolution melting (HRM) ในการตรวจสอบกลูเตน (gluten) ของข้าวสาลี (*Triticum* spp.) ที่อยู่ในซีเรียล (cereals) โดยศึกษาบริเวณที่เรียกว่า agglutinin isolectin A (Tri a 18) ซึ่งโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ในข้าวสาลีที่มีขนาด 125 คู่เบส (Martin-Fernandez et al., 2016)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1) ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

2) ทิปและทิปกรองขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3) หลอดทดลองขนาด 0.2, 0.6, 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร

4) ใบมีดผ่าตัด กรรไกร และปากคีบ

5) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Tanita, Japan)

6) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ (Prestige Medical, England)

7) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Gibthai, Thailand)

8) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Micrpcentrifuge) (GeneReach, Taiwan)

9) เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Speed vacuum concentrator) รุ่น SC 110 (Savant, USA)

10) เครื่องไมโครเวฟ (LG)

11) เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Thermal cycler) (Biometra, USA)

12) เครื่อง real-time PCR รุ่น StepOnePlus™ (Thermo Scientific, USA)

13) เครื่อง NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

14) ตู้อบความร้อนแห้ง (Major Science, Taiwan)

15) ชุดแยกดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า รุ่น Powerpac Basic (Bio-Rad, Singapore)

16) ชุดอุปกรณ์ gel documentation (syngene international Ltd., England)

17) ตู้ปลอดเชื้อ (MICROTECH, Thailand)

เครื่องแก้ว และวัสดุที่ใช้ทดลอง ทำให้ปราศจากเอนไซม์ nuclease โดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1) Agarose (SeaKem, USA)

2) Absolute ethanol (Merk, Germany)

3) Tris-base (Invitrogen™life Technologies, USA)

4) Ethidium bromide (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)

5) EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid)

6) Nuclease free water (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)

7) Boric acid

8) 6X Loading dye (Fermentas, USA)

9) ชุดสกัดสำเร็จรูป SP Plant DNA Kit (Omega bio-tek, USA)

10) ชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A.®Stool DNA Kit (Omega bio-tek, USA)

11) ชุดสกัดสำเร็จรูป GMO Food DNA Extraction Kit (TIANGEN, China)

12) 75% Ethanol

13) 100% Isopropanol

14) Proteinase K (21.5 mg/mL)

15) Ribonuclease A (10 mg/mL)

16) Protein precipitation solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5)

17) 2X PCR mastermix gotaq green (Promega, USA)

18) 2X maxima SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, USA)

19) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (0.5 µg/ml)

การเตรียมตัวอย่าง

1) ตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช 4 ชนิด คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับพืช SP Plant DNA Kit (Omega bio-tek, USA) ทำตามขั้นตอนในคู่มือ ส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพืช คือ แป้ง 4 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมัน และแป้งถั่วเหลืองใช้ชุดสำเร็จ E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (Omega bio-tek, USA) โดยทำตามขั้นตอนในคู่มือ จากนั้นตรวจเช็คปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop™ 2000/2000c spectrophotometer พร้อมทั้งปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดให้เท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ด้วย nuclease free water และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2) ตัวอย่างเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อสัตว์ 3 ชนิด คือ เนื้อของหมู ไก่ และวัว ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้เนื้อสัตว์ 30 มิลลิกรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเติมสารละลาย cell lysis (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเติม RNase A (4 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Protein precipitation solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่แล้วเติม 100% isopropanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยวิธี air-dried แล้วละลายด้วย nuclease free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างด้วยเครื่อง NanaDrop spectrophotometer ปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

3) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ทำการเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ผลิตมาจากเนื้อหมูประเภทไส้กรอก แฮม ลูกชิ้น หมูยอ และกุนเชียง ซื้อจากห้างสรรพสินค้าหรือตลาดทั่วไปที่มีและไม่มีการระบุสัดส่วนขององค์ประกอบอย่างน้อยประเภทละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอทำด้วยชุดสกัดอาหารสำเร็จรูป GMO Food DNA Extraction Kit (TIANGEN, China) ตามคำขั้นตอนในคู่มือ

พร้อมปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมดให้เท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ผสมสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร แสดงในตารางที่ 3-1 และขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงในตารางที่ 3-2 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรเจลอิเล็กโทรโฟริซีส

ตารางที่ 3-1 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และยีน *psa*A

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1) 2X PCR mastermix gotaq green	10
2) primer_L (10 µM)	0.4
3) primer_R (10 µM)	0.4
4) Nuclease free water	8.2
5) Genomic DNA (50 นาโนกรัม)	1
รวม	20

ตารางที่ 3-2 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และยีน *psa*A

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)	
Step 1 : Pre-denaturation	94	120	
Step 2 : Denaturation	94	30	35 รอบ
Annealing	58	30	
Extension	72	30	
Step 3 : Final extension	72	300	

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาควบคุมบริเวณยีน 18S *rRNA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 18S *rRNA* ผสมสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร แสดงในตารางที่ 3-3 และขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงในตารางที่ 3-4 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส

ตารางที่ 3-3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 18S *rRNA*

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1) 2X PCR mastermix gotaq green	10
2) 18S 157L (10 µM)	0.4
3) 18S 157R (10 µM)	0.4
4) Nuclease free water	8.2
5) Genomic DNA (50 นาโนกรัม)	1
รวม	20

ตารางที่ 3-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 18S *rRNA*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)	
Step 1 : Pre-denaturation	94	120	
Step 2 : Denaturation	94	30	35 รอบ
Annealing	60	30	
Extension	72	30	
Step 3 : Final extension	72	300	

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า T_m

นำผลผลิตพีซีอาร์ (ของพืช) มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector (Promege, USA) ปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 2X Rapid ligation buffer T4 DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, pGEM®-T Easy Vector ปริมาตร 0.7 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (3U/µg) ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 0.6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงใน competent cells *E. coli* DH5 alpha ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมนี้ส่งถ่ายเข้าสู้ *E.coli* โดยการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลาจึงนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที และทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม SOC medium ปริมาตร 175 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นแบ่งทรานฟอร์แมนท์ปริมาตร 100 และ 50 ไมโครลิตร กระจายบนผิวหน้าอาหารแข็งผสมยาปฏิชีวนะ Amplicilin ความเข้มข้น 50 ug/ml และ X-gal ความเข้มข้น 40 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวโดยแตะด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงไปในสารผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 14 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2X gotaq green master mix จำนวน 7 ไมโครลิตร, 10 µM ของ primer_L และ primer_R สายละ 0.4 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย nuclease free water ให้ครบ 14 ไมโครลิตร แล้วทำ replica plate โดยการแตะโคโลนีสีขาวแล้วจุ่มลงในสารผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วเขี่ย (streak) ลงบนอาหารแข็ง LB ทำซ้ำกับโคโลนีสีขาวอื่น ๆ เมื่อครบทุกโคโลนีที่เลือกแล้ว นำจานอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด Presto™Mini Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan) โดยทำตามคำแนะนำในคู่มือ นำสารผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนของยีนและบริเวณเป้าหมายส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท 1st Base Labotarories Sdn Bdh (Malaysia) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลของพืชชนิดอื่นที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)

การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยปฏิกิริยา real-time PCR

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ตัวอย่างพืช 4 ชนิด คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง แป้ง 4 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมัน และแป้งถั่วเหลือง และตัวอย่างเนื้อของสัตว์ 3 ชนิด คือ หมู วัว และไก่

การเตรียมดีเอ็นเอตัวอย่างเพื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยา real-time PCR

ทำการทดสอบเฉพาะดีเอ็นเอของข้าวโพดและของหมู โดยนำสารละลายดีเอ็นเอของข้าวโพด และหมูที่ได้จากการสกัดที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาผสมกันในสัดส่วนเป็นร้อยละ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 10:90, 1:99, 0.1:99.9, 0.01:99.99, 0.001:99.999 และ 0:100 ตามลำดับ โดยปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นทุกตัวอย่างที่ใช้ในปฏิกิริยาเท่ากัน คือ 50 นาโนกรัม

การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ผลิตมาจากเนื้อหมูประเภทไส้กรอก แฮม ลูกชิ้น หมูยอ และกุนเชียง จากห้างสรรพสินค้าหรือตลาดทั่วไปที่มีและไม่มีการระบุสัดส่วนขององค์ประกอบอย่างน้อยประเภทละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ที่ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดอาหารสำเร็จรูป GMO Food DNA Extraction Kit (TIANGEN, China) ตามคำแนะนำของบริษัท พร้อมปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมดให้เท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ด้วยเทคนิค real-time PCR

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างโดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากันที่ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ผสมสารในปฏิกิริยา real-time PCR ปริมาตรรวมเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-3 และขั้นตอนของปฏิกิริยา real-time PCR แสดงในตารางที่ 3-4 โดยทำการศึกษาอย่างละ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3-5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา real-time PCR

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1) 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix	7.5
2) primer_L (10 µM)	0.2
3) primer_R (10 µM)	0.2
4) Genomics DNA	1
5) Nuclease free water	6.1
รวม	15

ตารางที่ 3-6 ขั้นตอนของปฏิกิริยา real-time PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วินาที)
Step1 : pre-denaturation	50	120
Step2 : Denaturation	95	600
Annealing	60	20 (45 รอบ)
Extension	72	30
Step3 : Melting curve analysis	60-95	วัดสัญญาณเรืองแสงทุก ๆ 0.3 วินาที

การระบุความแตกต่างของผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์

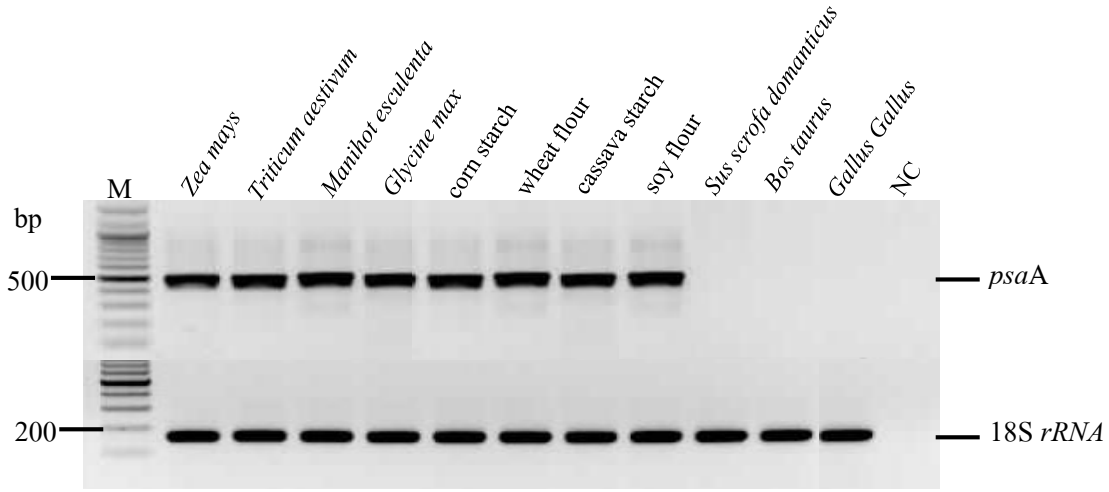
ทำการระบุความแตกต่างของผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า T_m จากรูปแบบของ melting curve และพิจารณาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ลำดับเบสร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชบางชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และยีน *psa*A ของตัวอย่างทั้งหมด จากนั้นทำการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 โดยเลือกโมเดลที่ให้ค่า Bayesian Information Criterion (BIC) ต่ำสุด

บทที่ 4
ผลการวิจัย

บริเวณ ITS1 (Internal transcribed spacer1)

4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS1 พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้เฉพาะกลุ่มตัวอย่างพืชและแป้งจากพืช คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และแป้งมันสำปะหลัง ได้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ส่วนตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ หมู วัว และไก่ นั้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกกับยีนควบคุมภายใน 18S *rRNA* เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS1 และบริเวณยีนควบคุมภายใน 18S *rRNA* จากตัวอย่างพืช คือ ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ตัวอย่างแป้ง 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งสาลี (wheat flour) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour) ตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ เนื้อหมู (*Sus scrofa domanticus*) เนื้อวัว (*Bos Taurus*) และเนื้อไก่ (*Gallus Gallus*) เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus, NC = Negative control)

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิค real-time PCR

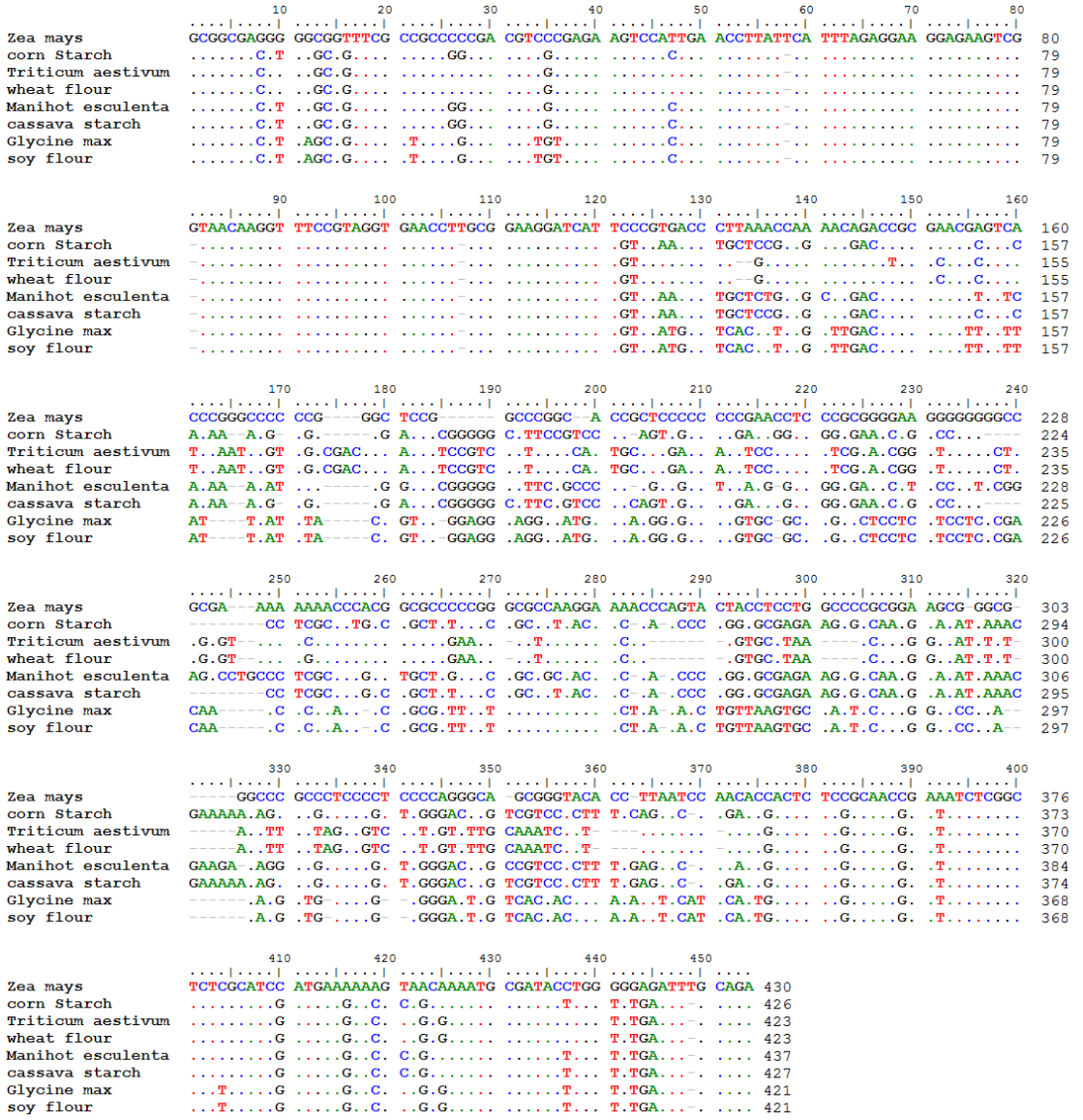
เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชจำนวน 4 ชนิด คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ตัวอย่างแป้ง 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง เนื้อเยื่อสัตว์ 3 ชนิด คือ เนื้อของหมู วัว และไก่ มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาพิจารณารูปแบบของ melting curve และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า T_m พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกกับกลุ่มตัวอย่างพืชและแป้งเท่านั้น แต่บางครั้งของการทำปฏิกิริยาซ้ำผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏแถบไม่จำเพาะขึ้นด้วย บริเวณ ITS1 จึงไม่ถูกนำไปใช้ต่อในขั้นตอนของการทดสอบความไวในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-1 ค่า T_m บริเวณ ITS1 ของตัวอย่างพืชและแป้ง

ตัวอย่าง	ค่า T_m			ค่า $T_m \pm$ SD
	1	2	3	
ข้าวโพด (*Zea mays*)	89.90	89.91	89.90	89.87±0.07
แป้งข้าวโพด (corn starch)	89.16	89.16	89.60	89.31±0.25
ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	87.37	87.23	87.12	87.27±0.07
แป้งข้าวสาลี (wheat flour)	87.22	87.08	87.22	87.17±0.07
มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*)	90.34	90.21	90.21	90.25±0.06
แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch)	90.20	90.19	90.36	90.25±0.08
ถั่วเหลือง (*Glycine max*)	87.36	87.21	87.36	87.32±0.08
แป้งถั่วเหลือง (soy flour)	87.23	87.08	87.08	87.13±0.07

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา real-time PCR และวิเคราะห์ค่า T_m พบว่ากลุ่ม 1) ข้าวโพด-แป้งข้าวโพด 2) ข้าวสาลี-แป้งสาลี 3) มันสำปะหลัง-แป้งมันสำปะหลัง และ 4) ถั่วเหลือง-แป้งถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 1) 89.87±0.07, 89.31±0.25 2) 87.27±0.07, 87.17±0.07 3) 90.25±0.06, 90.25±0.08 และ 4) 87.32±0.08, 87.13±0.07 ตามลำดับ ซึ่งค่า T_m ของพืชและแป้งแต่ละชนิดที่ได้นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-1)

แต่เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ข้าวโพด แป้งข้าวโพด ข้าวสาลี แป้งสาลี มันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และแป้งถั่วเหลือง มีขนาดเท่ากับ 515, 518, 516, 515, 514, 517, 514 และ 514 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2 แสดงเพียง 421-430 คู่เบส) และพบว่าข้าวโพด-แป้งข้าวโพด ข้าวสาลี-แป้งสาลี มันสำปะหลัง-แป้งมันสำปะหลัง แต่ละคู่ทดสอบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ยกเว้นเฉพาะถั่วเหลือง-แป้งถั่วเหลืองที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ดังแสดงเป็นค่า genetic distance ในตารางที่ 4-2 ที่ข้าวโพด-แป้งข้าวโพด ข้าวสาลี-แป้งสาลี และมันสำปะหลัง-แป้งมันสำปะหลัง มีค่าเท่ากับ 0.421, 0.005 และ 0.062 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-2 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของข้าวโพด (*Zea mays*) แป้งข้าวโพด (corn starch) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แป้งสาลี (wheat flour) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour)

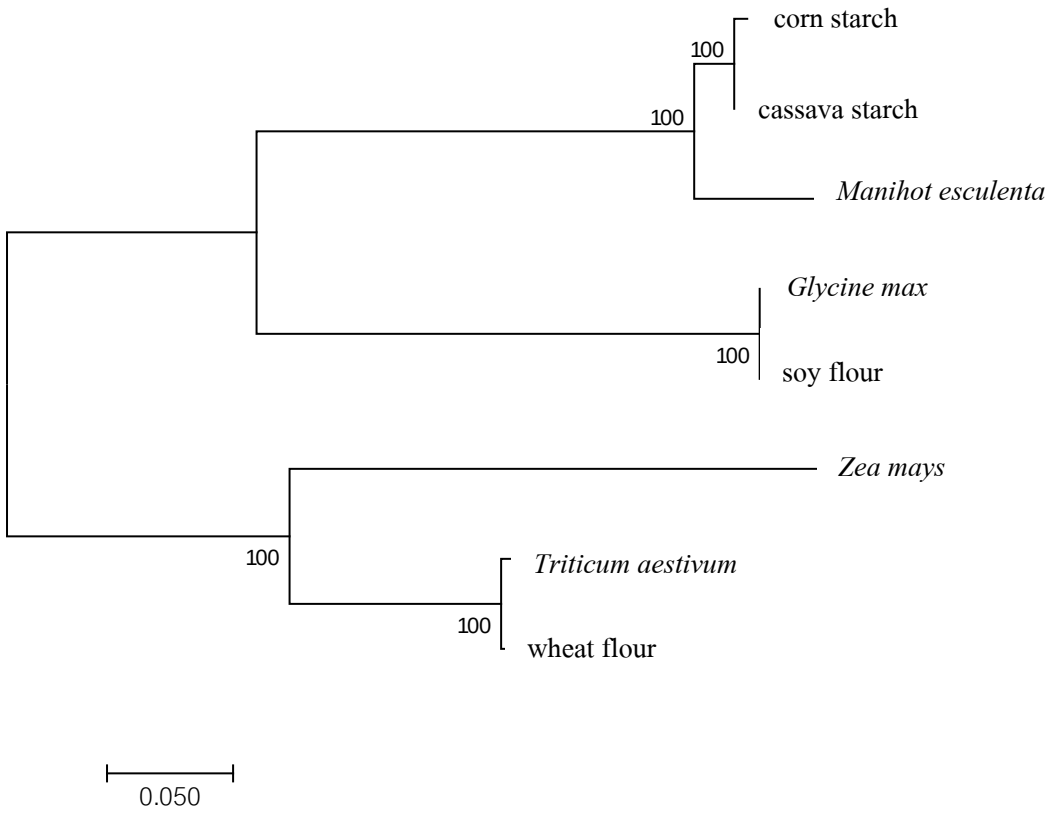
ตารางที่ 4-2 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ในบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างพืช 4 ชนิด และแป้ง 4 ชนิด

samples	1	2	3	4	5	6	7	8
1. *Zea mays*	0.000							
2. corn starch	0.421	0.000						
3. *Triticum aestivum*	0.250	0.367	0.000					
4. wheat flour	0.247	0.367	0.005	0.000				
5. *Manihot esculenta*	0.426	0.068	0.385	0.385	0.000			
6. cassava starch	0.412	0.005	0.359	0.359	0.062	0.000		
7. *Glycine max*	0.439	0.318	0.376	0.376	0.315	0.310	0.000	
8. soy flour	0.439	0.318	0.376	0.376	0.315	0.310	0.000	0.000

หมายเหตุ ☐ = เปรียบเทียบระหว่างพืชและแป้งของพืชชนิดนั้น ๆ

1. *Zea mays* = ข้าวโพด
2. corn starch = แป้งข้าวโพด
3. *Triticum aestivum* = ข้าวสาลี
4. wheat flour = แป้งสาลี
5. *Manihot esculenta* = มันสำปะหลัง
6. cassava starch = แป้งมันสำปะหลัง
7. *Glycine max* = ถั่วเหลือง
8. soy flour = แป้งถั่วเหลือง

โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Tamura 3-parameter



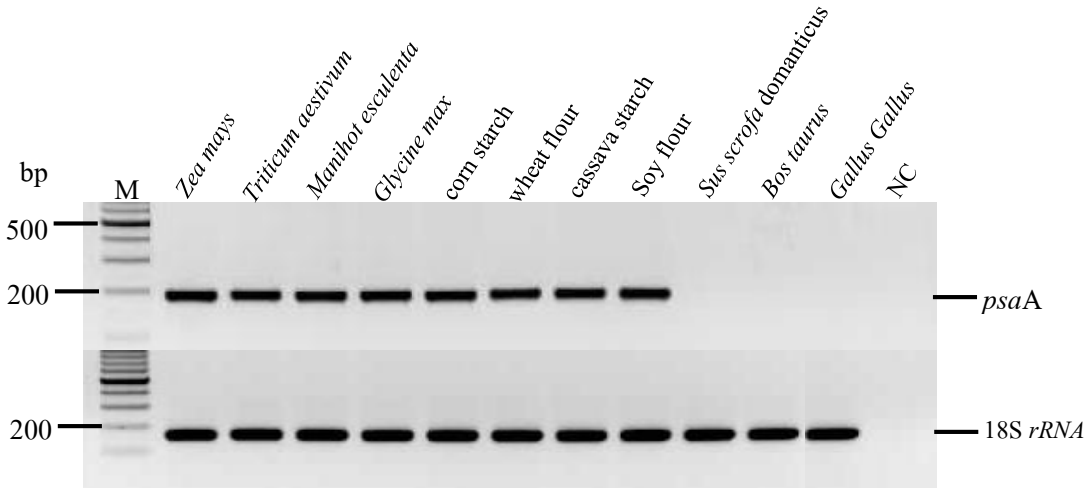
ภาพที่ 4-3 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของข้าวโพด (*Zea mays*) แป้งข้าวโพด (corn starch) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แป้งสาลี (wheat flour) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Tamura 3-parameter สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

หมายเหตุ ตัวเลข 0.05 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง
ตัวเลขบนกิ่ง (%) คือ ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

บริเวณยีน *psa*A (Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1)

4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะกับตัวอย่างในกลุ่มของพืชและแป้ง คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และแป้งมันสำปะหลัง ได้ผลผลิตขนาดประมาณ 190 คู่เบส ส่วนตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ หมู วัว และไก่ นั้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกกับยีนควบคุมภายใน 18S *rRNA* เท่านั้น (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-4 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *psa*A และยีนควบคุมภายใน 18S *rRNA* จากข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ตัวอย่างแป้งจากพืช 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งสาลี (wheat flour) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และแป้งถั่วเหลือง (*soy* flour) ตัวอย่างเนื้อสัตว์ คือ เนื้อหมู (*Sus scrofa domanticus*) เนื้อวัว (*Bos Taurus*) และเนื้อไก่ (*Gallus Gallus*) เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus, NC = Negative control)

4.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิค real-time PCR

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะกับกลุ่มพืช คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง และตัวอย่างแป้ง 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง และทำปฏิกิริยากับกลุ่มของเนื้อสัตว์เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิตไปวิเคราะห์และยืนยันผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *psa*A ได้อย่างจำเพาะกับตัวอย่างพืชและแป้ง (ไม่ได้แสดงผล) และเมื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *psa*A ของตัวอย่างพืชและแป้ง 4 ชนิด ขนาดไม่เท่ากัน โดยข้าวโพด มันสำปะหลัง และถั่วเหลืองมีขนาดเท่ากับ 193, 192 และ 192 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4-4 แสดงเพียง 150 คู่เบส) วิเคราะห์เปรียบเทียบกับตัวอย่างทั้งหมดมีตำแหน่งแตกต่างกัน 16/150 ตำแหน่ง ยกเว้นข้าวโพด-แป้งข้าวโพดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันซึ่งค่า genetic distance แสดงในตารางที่ 4-4 โดยคู่ของข้าวสาลี-แป้งสาลี มันสำปะหลัง-แป้งมันสำปะหลัง และถั่วเหลือง-แป้งถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 0.014, 0.063 และ 0.013 ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ค่า T_m ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าค่า T_m ของกลุ่ม 1) ข้าวโพด แป้งข้าวโพด 2) ข้าวสาลี แป้งสาลี 3) มันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลัง และ 4) ถั่วเหลือง แป้งถั่วเหลือง มีค่า T_m เท่ากับ 1) 77.33 ± 0.09, 77.79 ± 0.09 2) 76.64 ± 0.01, 77.64 ± 0.09 3) 77.31 ± 0.09, 77.30 ± 0.09 และ 4) 76.63 ± 0.01, 77.09 ± 0.00 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ภาพที่ 4-5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psa*A ของข้าวโพด (*Zea mays*) แป้งข้าวโพด (corn starch) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แป้งสาลี (wheat flour) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour) (แสดงเพียง 150 คู่เบส)

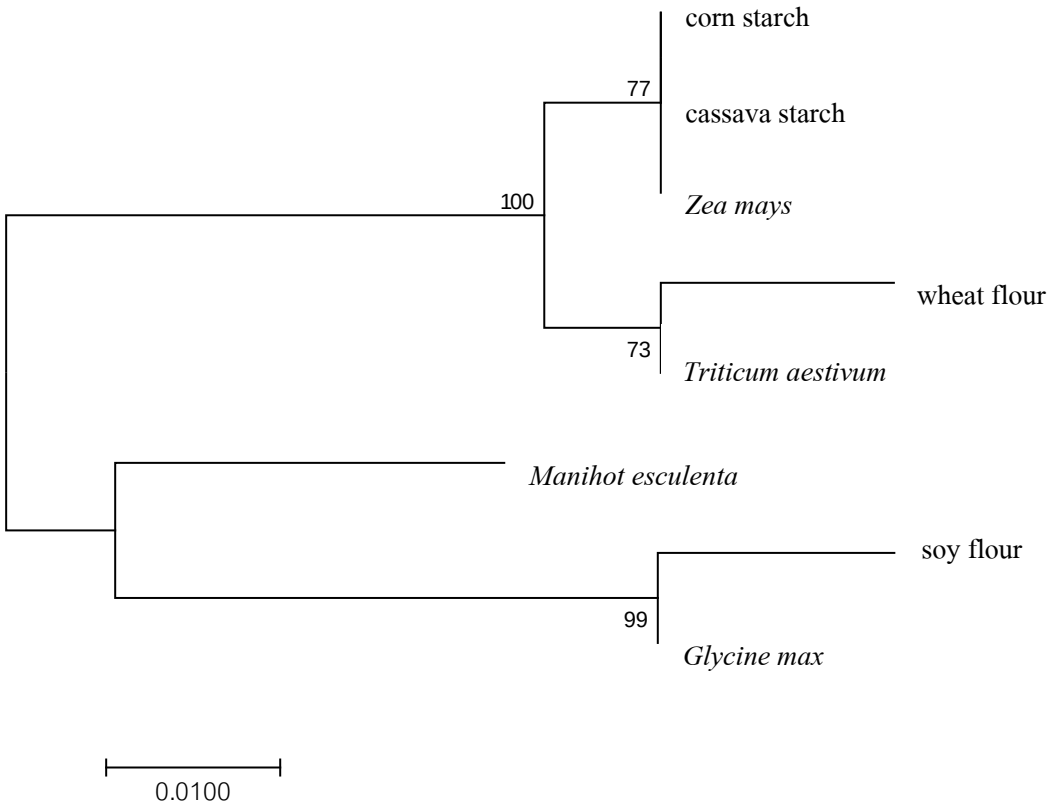
ตารางที่ 4-3 ระยะห่างพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *psa*A ของตัวอย่างพืชและแป้ง

samples	1	2	3	4	5	6	7	8
1. *Zea mays*	0.000							
2. corn starch	0.000	0.000						
3. *Triticum aestivum*	0.014	0.014	0.000					
4. wheat flour	0.027	0.027	0.014	0.000				
5. *Manihot esculentus*	0.063	0.063	0.063	0.079	0.000			
6. cassava starch	0.000	0.000	0.014	0.027	0.063	0.000		
7. *Glycine max*	0.070	0.070	0.070	0.086	0.048	0.070	0.000	
8. soy flour	0.078	0.078	0.078	0.093	0.055	0.078	0.013	0.000

หมายเหตุ ☐ = เปรียบเทียบระหว่างพืชและแป้งของพืชชนิดนั้น ๆ

1. *Zea mays* = ข้าวโพด
2. corn starch = แป้งข้าวโพด
3. *Triticum aestivum* = ข้าวสาลี
4. wheat flour = แป้งสาลี
5. *Manihot esculenta* = มันสำปะหลัง
6. cassava starch = แป้งมันสำปะหลัง
7. *Glycine max* = ถั่วเหลือง
8. soy flour = แป้งถั่วเหลือง

โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Tamura 3-parameter



ภาพที่ 4-6 แผนภูมิต้นไม่แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน *psa*A ของข้าวโพด (*Zea mays*) แป้งข้าวโพด (corn starch) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แป้งสาลี (wheat flour) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Tamura 3-parameter สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

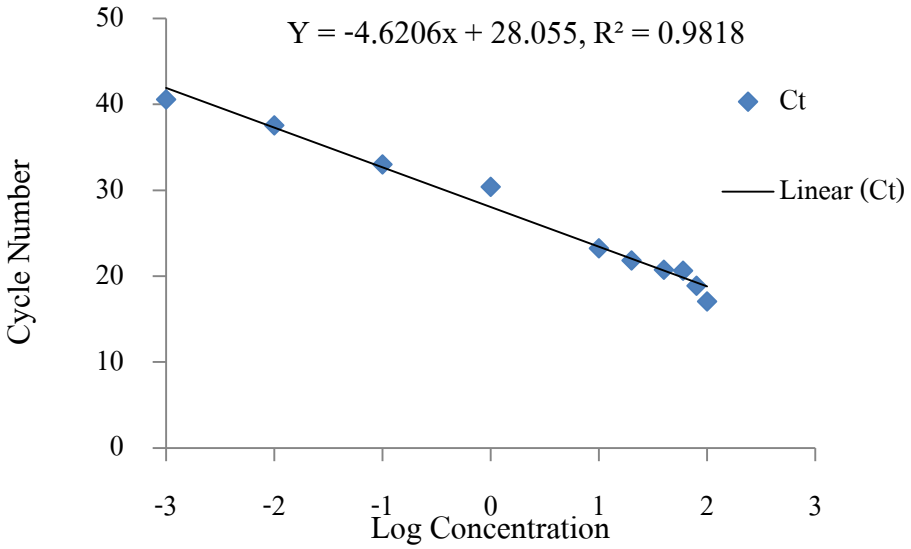
หมายเหตุ ตัวเลข 0.05 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง
ตัวเลขบนกิ่ง (%) คือ ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

ตารางที่ 4-4 ค่า T_m บริเวณยีน *psa*A ของตัวอย่างพืชและแป้ง

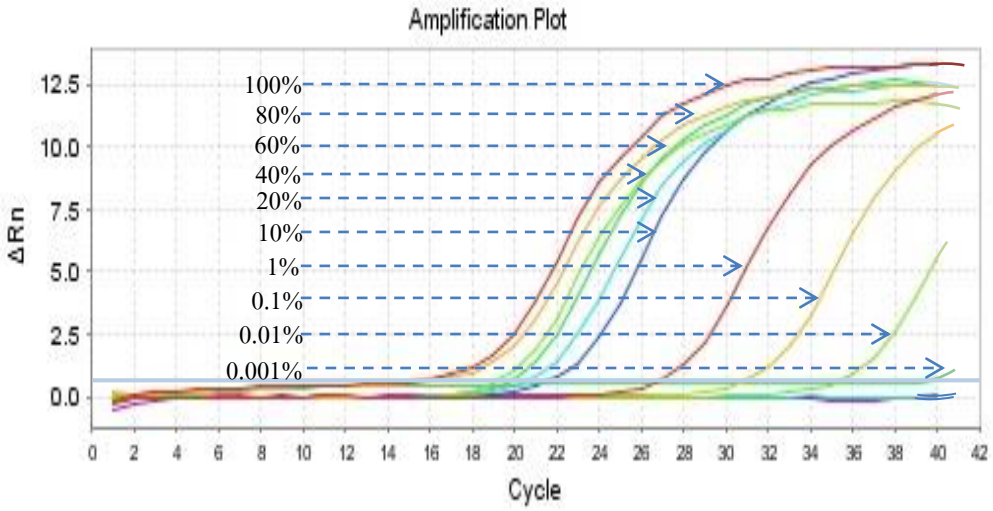
ตัวอย่าง	ค่า T_m			ค่า $T_m \pm$ SD
	1	2	3	
ข้าวโพด (*Zea mays*)	77.41	77.35	77.23	77.33 ± 0.09
แป้งข้าวโพด (corn starch)	77.84	77.84	77.69	77.79 ± 0.09
ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*)	76.65	76.64	76.74	76.64 ± 0.01
แป้งข้าวสาลี (wheat flour)	77.69	77.69	77.54	77.64 ± 0.09
มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*)	77.21	77.33	77.38	77.31 ± 0.09
แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch)	77.25	77.25	77.39	77.30 ± 0.09
ถั่วเหลือง (*Glycine max*)	77.63	77.63	76.64	76.63 ± 0.01
แป้งถั่วเหลือง (soy flour)	77.09	77.09	77.09	77.09 ± 0.00

การทดสอบประสิทธิภาพและความไวของปฏิกิริยา real-time PCR

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้พืช คือ ข้าวโพด และเนื้อสัตว์ คือ หมู นำดีเอ็นเอมาผสมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความไว โดยผสมดีเอ็นเอในสัดส่วนเป็นร้อยละ 100:0, 80:20, 60:40, 20:80, 10:90, 1:99, 0.1:99.9, 0.01:99.99, 0.001:99.999 และ 0:100 นำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR แล้วนำค่า Ct ของความเข้มข้นของดีเอ็นเอระดับต่าง ๆ มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาด้วยสมการ $Y= -4.6206x + 28.055$ ได้กราฟมาตรฐาน ค่า $R^2 = 0.9818$ แสดงว่าปฏิกิริยา real-time PCR ในการศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิภาพมากร้อยละ 98.18 (ภาพที่ 4-5) และตรวจสอบพืชได้ในปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด ซึ่งเป็นค่าความไวของปฏิกิริยาที่ร้อยละ 0.001 ดังแสดงในตารางที่ 4-5



ภาพที่ 4-7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบ (Cycle number) ของปฏิกิริยา real-time PCR กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอร้อยละ 0.001-100 แสดงค่า log (log concentration)



ภาพที่ 4-8 ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) กับจำนวนรอบ (cycle) ในปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณยีน *psa*A ที่มีขนาดประมาณ 190 คู่เบส ของสารละลายดีเอ็นเอผสมระหว่างข้าวโพดและหมูในสัดส่วนร้อยละ 0.001-100

ตารางที่ 4-5 ค่า Ct ของปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณยีน *psa*A ของสารละลายดีเอ็นเอผสมระหว่างข้าวโพดกับหมูในสัดส่วนร้อยละ 0.001-100

ปริมาณดีเอ็นเอผสม (%)		ค่า Ct
ข้าวโพด	หมู	
100	0	17.07 ± 2.50
80	20	18.89 ± 1.20
60	40	20.62 ± 0.76
40	60	20.74 ± 0.30
20	80	21.83 ± 0.30
10	90	23.26 ± 0.12
1	99	30.41 ± 0.22
0.1	99.9	33.02 ± 0.23
0.01	99.99	37.57 ± 0.22
0.001	99.999	40.58 ± 0.90
0	100	-

การตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค real-time PCR

เมื่อสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ผลิตมาจากเนื้อหมูประเภทไส้กรอก แฮม ลูกชิ้นหมูยอ และกุนเชียง จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่าปฏิกิริยา real-time PCR ให้ผลบวกกับกลุ่มตัวอย่างที่ระบุว่ามีพืชและ/หรือแป้งของพืชเป็นส่วนประกอบจำนวน 15 ใน 16 ตัวอย่าง (หมายเลข 1, 3, 5, 7, 9, 11-18, 21 และ 23-25; ตารางที่ 4-6) ส่วนกลุ่มที่ไม่มีการระบุว่ามีพืชและ/หรือแป้งของพืชเป็นส่วนประกอบบนฉลากนั้นมีจำนวน 9 ตัวอย่าง แต่ปฏิกิริยา real-time PCR ให้ผลบวกเพียงจำนวน 7 ตัวอย่าง (หมายเลข 2, 4, 6, 10, 19, 20 และ 22; ตารางที่ 4-6) และมี 3 ตัวอย่าง ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาใน real-time PCR (หมายเลข 3, 8 และ 9) แต่ทั้งนี้หมายเลข 8 เป็นตัวอย่างที่มีการระบุว่ามีพืช (ถั่วเหลือง) และแป้ง (แป้งสาลี) เป็นส่วนประกอบ แต่ปฏิกิริยา real-time PCR ให้ผลลบ ดังแสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 การตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยเทคนิค real-time PCR (ยีน *psa*A)

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	ประเภทระบุ (พืช)	ค่า Tm	ผลการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา real-time PCR
	ประเภทลูกชิ้น			
1	MB 1	✓	77.39 ± 0.15	✓
2	MB 2	✗	77.84 ± 0.26	✓
3	MB 3	✗	ND	✗
4	MB 4	✗	77.64 ± 0.31	✓
5	MB 5	✓	77.53 ± 0.09	✓
	ประเภทแฮม			
6	HAM 1	✗	76.79 ± 0.15	✓
7	HAM 2	✓	76.89 ± 0.09	✓
8	HAM 3	✓	ND	✗
9	HAM 4	✗	ND	✗
10	HAM 5	✗	77.59 ± 0.17	✓
	ประเภทหมูยอ			
11	MY 1	✓	76.84 ± 0.09	✓
12	MY 2	✓	77.53 ± 0.09	✓
13	MY 3	✓	76.64 ± 0.09	✓
14	MY 4	✓	77.24 ± 0.15	✓
15	MY 5	✓	76.64 ± 0.09	✓

หมายเหตุ 2, 4, 6, 10, 19, 20 และ 22 = ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ระบุส่วนประกอบของพืช แต่ปฏิกิริยาให้ผลบวก

8 = ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุส่วนประกอบของพืช แต่ปฏิกิริยาให้ผลลบกับ

ND = not detectable

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	ประเภทระบุ (พืช)	ค่า Tm	ผลการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา real-time PCR
	<u>ประเภทไส้กรอก</u>			
16	SS 1	✓	76.94 ± 0.09	✓
17	SS 2	✓	77.38 ± 0.09	✓
18	SS 3	✓	77.09 ± 0.00	✓
19	SS 4	✗	76.64 ± 0.09	✓
20	SS 5	✗	77.38 ± 0.15	✓
	<u>ประเภทแฮม</u>			
21	GC 1	✓	77.38 ± 0.15	✓
22	GC 2	✗	77.53 ± 0.09	✓
23	GC 3	✓	77.53 ± 0.09	✓
24	GC 4	✓	76.79 ± 0.09	✓
25	GC 5	✓	76.79 ± 0.09	✓

หมายเหตุ 2, 4, 6, 10, 19, 20 และ 22 = ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่<u>ไม่</u>ระบุส่วนประกอบของพืช แต่ปฏิกิริยาให้ผลบวก

8 = ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุส่วนประกอบของพืช แต่ปฏิกิริยาให้ผลลบกับ

ND = not detectable

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

การระบุชนิดของส่วนประกอบบนฉลากในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีความสำคัญต่อผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการประกอบการตัดสินใจเลือกซื้อและบริโภค เนื่องจากผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไวต่อการแพ้อาหาร เช่น ในกลุ่มผู้บริโภคที่แพ้ถั่วหรือผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น แป้ง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกทดสอบพืช 4 ชนิด คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง ตัวอย่างแป้งผลิตภัณฑ์ของพืชดังกล่าวทั้ง 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลืองที่นิยมนำมาใช้ประกอบเป็นอาหาร และกลุ่มตัวอย่างเนื้อสัตว์ 3 ชนิด คือ เนื้อหมู วัว และไก่ ที่นิยมบริโภคและนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร คือ ไส้กรอก แฮม ลูกชิ้น หมูยอ และกุนเชียง โดยศึกษาข้อความพันธุกรรม 2 บริเวณ คือ 1) ITS1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนระหว่างชนิดและมีการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชหลายชนิด (Jobes & Thien, 1997) อยู่ในนิวเคลียร์จีโนมและ 2) ยีน *psa*A ในคลอโรพลาสต์จีโนมซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สามารถพบได้ในพืชทุกชนิด และยังเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบอนุรักษ์ (Santabarbara et al., 2005) ทั้งสองบริเวณนี้มีจำนวนซ้ำ (copy number) มากหลายร้อยถึงหลายพันชุดต่อหนึ่งเซลล์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีเพียงเล็กน้อยหรือตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปแล้วที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยหรือเสียสภาพได้

จากผลการศึกษาเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ของบริเวณ ITS1 ที่มีขนาด 514-520 คู่เบส ให้ผลบวกกับตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชทั้งหมด (ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง และถั่วเหลือง) และดีเอ็นเอของแป้งทั้งหมด (แป้งสาลี แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง) แต่ไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ทั้งของหมู วัว และไก่ เมื่อวิเคราะห์ค่า T_m ของตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนได้บริเวณ ITS1 นั้น พบว่าค่า T_m ที่ได้ของพืชและแป้งของพืชชนิดนั้น ๆ มีความสอดคล้องกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสาลี/แป้งสาลีออกจากถั่วเหลือง/แป้งถั่วเหลือง เมื่อพิจารณาจากค่า T_m ได้ และพบว่าพืชและแป้งของพืชนั้น ๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แตกต่างหรือแตกต่างกันน้อยมาก อนึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแป้งข้าวโพดมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแป้งมันสำปะหลัง โดยมีค่าระยะห่างทาง

พันธุกรรมเพียง 0.005 เท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าแป้งข้าวโพดที่นำมาทดสอบนั้นมีการปลอมปนของแป้งมันสำปะหลังทั้งที่ฉลากระบุไว้ว่าแป้งข้าวโพด 100%

บริเวณ ITS1 ที่นำมาศึกษามีความจำเพาะในกลุ่มพืช โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดและมันสำปะหลังออกจากข้าวสาลีกับถั่วเหลืองได้ แต่ด้วยการพบว่าปฏิกิริยา real-time PCR ในบริเวณ ITS1 (ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1_L/ITS1_R) ในการศึกษาครั้งนี้ทำได้ค่อนข้างยากกับพืชและแป้ง จำเป็นต้องทำผลผลิตพีซีอาร์ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตัดออกจากเจลก่อนจึงนำไปวิเคราะห์ผลต่อไปได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาที่บริเวณยีน *psa*A ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่ 1 (photo system I; PS I) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบอนุรักษ์ (Santabarbara et al., 2005) ซึ่งสามารถที่จะนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้กับกลุ่มของพืชเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ซึ่งผลการทดสอบพบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกอย่างจำเพาะกับพืชและแป้งของพืชชนิดนั้น ๆ โดยมีขนาดประมาณ 190 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า T_m ของยีน *psa*A แสดงให้เห็นว่าค่า T_m ระหว่างชนิดของพืชมีค่าไม่ต่างกันมากนัก ซึ่งสอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ที่มีความแตกต่างกัน 17/150 ตำแหน่ง (ไม่รวมไพรเมอร์) (ภาพที่ 4-6) ดังนั้นบริเวณยีน *psa*A จึงสามารถที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบกลุ่มพืชได้อย่างจำเพาะ (แยกออกจากกลุ่มสัตว์) และตรวจสอบการปลอมปนของพืชในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปได้ แต่จะไม่สามารถบอกว่าได้ว่าเป็นพืชชนิดใด

ในการทดสอบความไวของปฏิกิริยา real-time PCR ในบริเวณยีน *psa*A โดยใช้ดีเอ็นเอผสมระหว่างข้าวโพดและหมูในสัดส่วนเป็นร้อยละ 100:0, 80:20, 60:40, 20:80, 10:90, 1:99, 0.1:99.9, 0.01:99.99, 0.001:99.999 และ 0:100 โดยใช้ real-time PCR ที่ใช้ SYBR Green พบว่าปฏิกิริยามีความไวสูงสุดที่สามารถตรวจสอบพืชได้ที่ร้อยละ 0.001 โดยมีดีเอ็นเอเท่ากับ 5×10^{-4} นาโนกรัม ซึ่งมีรายงานการใช้เทคนิค real-time PCR ซึ่งใช้ Evagreen ที่มีความจำเพาะกว่า SYBR Green (Safdar and Abasiyanik, 2013) โดยวิเคราะห์ในบริเวณยีน *lectin* ที่ผู้วิจัยนำมาใช้ตรวจดีเอ็นเอของถั่วเหลืองผสมกับของเนื้อวัวในปริมาณต่ำสุดได้เท่ากับร้อยละ 0.001 เช่นเดียวกัน แต่ในปริมาณดีเอ็นเอ 9×10^{-4} นาโนกรัม และการศึกษาครั้งนี้มีความไวสูงกว่าที่รายงานโดย Ali et al. (2012) ที่ตรวจสอบการปลอมปนของเนื้อหมูในลูกชิ้นด้วยเทคนิค real-time PCR ที่ใช้ TaqMan probe ที่มีความไวของปฏิกิริยาอยู่ที่ร้อยละ 0.01 และเมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค real-time PCR ที่ใช้ SYBR green และในการศึกษาครั้งนี้ได้ค่า $R^2 = 0.9818$ หรือเท่ากับ 98% ซึ่งค่า R^2 (R-Squared) ที่ยอมรับได้นั้นควรมีค่า ≥ 0.98 (Broeders et al., 2014) ดังนั้นเทคนิค real-time PCR ที่ใช้ SYBR Green และบริเวณยีน *psa*A ในการศึกษาครั้งนี้มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับและ/หรือดีกว่าเทคนิค real-time PCR ที่ Safdar and Abasiyanik (2013) และ

Ali et al. (2012) ทดสอบ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากบริเวณยีน *psa*A มีขนาดที่สั้น และเป็นบริเวณอนุรักษ์ซึ่งง่ายต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

การตรวจสอบพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น แป้งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ขายตามห้างสรรพสินค้าหรือตลาดทั่วไปทั้งที่มีการระบุองค์ประกอบ และที่ไม่ได้ระบุในฉลากจำนวน 5 ประเภท คือ ไส้กรอก แฮม ลูกชิ้น หมูยอ และกุนเชียง รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่าปฏิกิริยา real-time PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบให้ผลบวกกับกลุ่มตัวอย่างที่ระบุว่ามีพืชและ/หรือแป้งของพืชเป็นส่วนประกอบจำนวน 15 ใน 16 ตัวอย่าง (คิดเป็น 93.75%) ส่วนกลุ่มที่ฉลากไม่ระบุว่ามีพืชและ/หรือแป้งเป็นส่วนประกอบนั้นนำมาทดสอบจำนวน 9 ตัวอย่าง โดยปฏิกิริยา real-time PCR ให้ผลบวกจำนวน 7 ตัวอย่าง (คิดเป็น 77.77%) แสดงว่าผลิตภัณฑ์นี้มีส่วน ประกอบที่ไม่ตรงตามฉลาก ซึ่งมีพืชหรือแป้งของพืชเป็นส่วนประกอบ และมีเพียง 2 ตัวอย่าง (หมายเลข 3 และ 9; ตารางที่ 4-6) ที่ตรงตามฉลาก แต่การทดสอบครั้งนี้ปฏิกิริยา real-time PCR ให้ผลลบพบ 1 ตัวอย่างที่ระบุว่ามีถั่วเหลือง และแป้งข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบ (หมายเลข 8) อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีส่วนประกอบของพืชหรือแป้งของพืชเป็นส่วนผสมน้อยกว่าความไวที่ปฏิกิริยา real-time PCR ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจสอบได้

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณ ITS1 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 514-520 คู่เบส และบริเวณยีน *psa*A มีขนาด 192-193 คู่เบส ที่มีความจำเพาะกับกลุ่มตัวอย่างพืชและแป้งเท่านั้น

2. ค่า T_m บริเวณ ITS1 ของพืชและแป้งแต่ละชนิด มีความสอดคล้องกัน

3. บริเวณ ITS1 ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ ITS1_L/ITS1_R ในปฏิกิริยา real-time PCR นั้นยังไม่เหมาะสมที่จะนำไป ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพและความไวของปฏิกิริยา เนื่องจากทำซ้ำได้ยากและเพิ่มจำนวนได้ไม่สม่ำเสมอในกลุ่มพืชและแป้ง

4. ปฏิกิริยา real-time PCR บริเวณยีน *psa*A สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในกลุ่มของพืชและแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า T_m อยู่ในช่วง 76-77 องศาเซลเซียส

5. สามารถใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้ SYBR Green dye บริเวณยีน *psa*A ตรวจสอบพืชและการปลอมปนของพืชในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้จำนวน 22 ตัวอย่าง จากทั้งหมดจำนวน 25 ตัวอย่าง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบคิดเป็น 88% ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปทั้งหมดที่สุ่มตรวจ

6. ปฏิกิริยา real-time PCR ที่ทดสอบได้มีความไวสูงสุดที่สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอได้ต่ำสุดที่ร้อยละ 0.001

ข้อเสนอแนะ

ควรที่จะพัฒนาหรือออกแบบไพรเมอร์และ/หรือดีเอ็นเอโพรบที่มีความจำเพาะในบริเวณ ITS1 หรือร่วมกับเทคนิค real-time PCR ที่ใช้ TaqMan probe เพื่อที่จะเพิ่มศักยภาพในการบ่งชี้ชนิดของพืชและแป้งเพิ่มเติมแยกออกจากกลุ่มสัตว์ได้ชัดเจน เพื่อจะที่นำไปใช้ในการตรวจสอบปลอมปนพืชและแป้งและบ่งชี้ชนิดในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไปได้

บรรณานุกรม

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, อัญชลี ศรีสุวรรณ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. (2548). การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสาเร็จรูป. *กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*, 118-136.

ณิชนันทน์ โภชนุกุล. (2550). *นิวเคลียร์ดีเอ็นเอและโครโมโซม.* เข้าถึงได้จาก www.gotoknow.org/posts/87643.

นวลฉวี เวชประสิทธิ์. (2549). *หลักการพื้นฐานและปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

บังอร บุญชู, นิกาพร ชนะคช และกมลกาญจน์ จิญกาญจน์. (2557). ระวังอาหารปลอม. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 194*, 7-9.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. (2551). *พื้นฐาน Real-time polymerase Chain Reation*. เข้าถึงได้จาก http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/%BE%D7%E9%B9%B0%D2%B9_Real_Time_PCR_June_08.pdf.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาสตร์และเทคโนโลยี. (2548). *สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์.* กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

สุชาดา สุขหร่อง. (2553). *ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 68.

หนูเดือน เมืองแสน. (2552). *คู่มือการทำวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล.* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อโณทัย โภคาธิกรณ์. (2549). Basic Real-time PCR. เข้าถึงได้จาก medinfo.psu.ac.th/pr/pr2006/Pr20061005_RealTime.doc.

Abdullah, T., Radu, S., Hassan, Z., & Hashim, J. K. (2006). Detection of genetically modified soya in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food chemistry, 98*, 575-579.

Abdulmawjood, A., Krischek, C., Wicke, M., & Klein, G. (2012). Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real-time PCR. *Meat Science, 91*, 272-276.

Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Che-Man, Y. B., Dhahi, Th. S., Kashir, M., Uddin, M. K., & Hamid, S. B. A. (2012). Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase. *Meat Science, 91*, 454-459.

Anguita, G., Metin, R., Garci, T., Morales, P., & Haza, A. I. (1996). Immunostick ELISA for Detection of Cow's Milk in Ewe's Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody Against Bovine β-Kazein. *Journal of Food Protection*, *59*, 436- 437.

Bennetzen, J. L., Ma, J., & Devos, K. M. (2005). Mechanisms of recent genome size variation in flowering plant. *Annals of Botany, 95*, 127-132.

Bioneer. (n.d.). *About qPCR detection*. เข้าถึงได้จาก http://eng. bioneer.com/products/gene expression/qPCRArrayService-detection.aspx.

Bio-rad. (n.d.). *Real-time PCR*. เข้าถึงได้เข้าจาก http://eng.bioneer.com/products/geneexpression/ qPCRArrayService-detection.aspx.

Bio-search technologies. (2013). *Fluorescent Primer Probe Based Chemistries.* เข้าถึงได้จาก http://technologyinscience.blogspot.com/2013/12/real-time-pcr-qpcr-fluorescent-primer.html.

Bosmali, I., Ganopoulos, I., Madesis, P., & Tsaftaris, A. (2012). Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with high resolution melting (HRM) analysis for food forensic uses: A case study on lentils (*Lens culinaris*). *Food Research International, 46,* 141-147.

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Tavernier, I., Mazzara, M., Roosens, N., & Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology, 37,* 115-126.

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

Demirhan, Y., Ulca, P., & Senyava, H. Z. (2012). Detection of porcine DNA in gelatin and gelatin-containing processed food products-Halal/Kosher authentication. *Meat Science, 90*, 686-689.

Dhuraba, G. (2015). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*: *Principle, Procedure, Components, Types and Applications*. เข้าได้ถึงจาก http://laboratory info.com / polymerase-chain-reaction-pcr/.

Dincer, B., Spearow, J. L., Cassens, R. G., & Greaser, M. L. (1987). The effect of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Science, 20*, 253-267.

Fajardo, V., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Hernandez, P. E., Garcia, T., & Martin, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (Cervus elaphus), fallow deer (Dama dama), and roe deer (Capreolus caplreolus) in meat mixture. *Meat Science, 79*, 289-298.

Fiocchi, A., Restani, P., & Riva, E. (2000). Beef allergy in children. *Nutrition, 16*, 454-457.

Gebhardt, C., Schmidt, R., & Schneider, K. (2005). Plant genome analysis: The state of the Art. *International Review of Cytology, 247*, 223-284.

Goel, S., Raina, S. N., & Ogiharat, Y. (2002). Molecular Evolution and Phylogenetic Implications of Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA in the Phaseolus-Vigna Complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 22*(1), 1-19.

Gratzfeld-Huesgen, A., & Schein, A. (2002). The Application of HPLC in Food Analysis. *Food safety magazine*, n.p.

Hawkins, J. S., Grover, C. E., & Wendel, J. F. (2008). Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science*, *174*, 557-562.

Hemleben, V., Jobst, J., & King, K., (1998). Molecular evolution of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaeae. *Molecular Phylogenetics And Evolution, 9*, 204-219.

Hsieh, Y-H. P., Sheu, S. C., & Bridgman, R. C. (1997). Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *Food protection*, *61*, 476-481.

Jobes, D. V., & Thien, L. B., (1997). A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (*rRNA*) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*, 326-334.

Jones, S. J., & Patterson, R. L. S., (1985). Double-antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Science, 15*, 1-13.

Jopst, J., King, K., & Hemleben, V. (1998). Molecular Evolution of the Internal Transcribed Spacers (ITS1 and ITS2) and Phylogenetic Relationships among Species of the Family Cucurbitaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 9*(2), 204-219.

Kesmen, Z., Sahin, F., & Yotim, H. (2007). PCR assay for identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science, 77*, 649-653.

Kyndt, T., Droogenbroeck, B. V. Romeijn-Peeters, E., Romero-Motochi, J. P., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., Damme, P. V., & Gheysen, G. (2005). Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution, 37*, 442-459.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International, 82*, 923-928.

Madesis, P., Ganopoulos, I., Anagnostis, A., & Tsaftaris, A. (2012). The application of Bar-HRM (Barcode DNA-high resolution melting) analysis for authenticity testing and guantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification. *Food Control, 25*, 576-582.

Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S .C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., Peterson, L. R., & Kaul, K. (2005). *Journal of Clinical Microbiology, 43*(5), 2435-2440.

Martín-Fernández B, Costa J, de-Los-Santos-Álvarez N, López-Ruiz B, Oliveira M. B., & Mafra I. (2016). High resolution melting analysis as a new approach to discriminate gluten-containing cereals. *Food Chemistry, 211*, 383-391.

Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., González, I., & Martín, R. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science, 82*, 252-259.

Mhalanga, M. M., & Sanjay, T. (2006). Using tRNA-linked molecular beacons to image cytoplasmic mRNAs in live cell. *Nature Protocals*, *1*, 1392-1398.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American, 262*(4), 56-61.

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

Poms, R. E., Anklam, E., & Kuhn, M. (2004). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International, 87*, 1391-1397.

Richard, L. (2009). *Food Safety Watch*. เข้าถึงได้จาก http://www. foodsafetywatch.org/wp-content/uploads/2013/03/Revolution-pic-3.gif.

Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Hernández, P. E. García, T., & Martín, R. (2011). Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (Tetrao urogallus). *Forensic Science International*, *210*(1-3), 133-138.

Safdar, W., & Abasiyanik. (2013). Development of fast multiplex real-time PCR assays based on Evagreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages. *Food research International, 54,* 1652-1656.

Santabarbara, S., Kuprov, L., Fairclough, W. V., Purton, S., Hore, P. J., Heathcote, P., & Evanz, M. C. (2005). Bidirectional eletrotransfer in photosystem I: detetmination of two distances between P700+ and A1-in spin-correlated radical pairs. *Biochemistry*, *44*(6), 2119-2128.

Sharma,s., Radl, V., Hai, Brigitte., Kloos, Karin., Fuka, M. M., Engel, M., Schauss, K., & Schloter, M. (2007). Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods, 68*, 445-452.

Sheu, S-C., & Hsieh, Y-H. P. (1998). Production and partial characterization of monoclonal antibody specific to cooked poultry meat. Meat Science, *50*, 315-326.

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science, 94*, 155-120.

Varela, E. S., Lima, J. P. M. S., Galdino, A. S., Pinto, L. S., Bezerra, W. M., Nunes, E. P., Alves, M. A. O., & Grangeiro, T. B. (2004). Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry, 65*, 59-69.

Wagasugi, T. J., Sugita, M., Tsudzuki, T., & Sugiura, M. (1998). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome. *Plant Molecular Biology Reporter*, *16*(3), 231-241.

Wellenstein, M. D., & Vilgalys, R. J. (2005). Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. *Pedobiologia, 49*, 665-672.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวิธีการเตรียม

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

เตรียมปริมาตร 50 µg 100 reaction

Stock 100 bp DNA ladder (0.5 µg/µl)	50	ไมโครลิตร
TE buffer	200	ไมโครลิตร
6X Orange DNA loading dye	20	ไมโครลิตร
6X DNA loading dye	30	ไมโครลิตร

2. 1X SB buffer (เตรียมสารละลายปริมาตร 1,000 ml)

NaOH	8	กรัม
Boric acid	45	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียม 1% (w/v) agarose gel ปริมาตร 35 มิลลิลิตร

ชั่ง agarose	0.35	กรัม
1X SB buffer	35	กรัม

ละลาย agarose ใน 1X SB buffer ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟแล้วนำไปผ่านน้ำพออุ่น จากนั้นเติม ethidium bromide ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เทลงถาด รอเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที