175505

นทินี พงษ์พรรฦก : การตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ (DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ; 45 หน้า. ISBN 974-17-0718-5

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอบนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหาร สนองตอบต่อความต้องการของผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไม่รับประทานเนื้อสุกร โดยสกัดดีเอ็นเอจากอาหาร แล้วนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอสุกรที่อาจปนเปื้อน จากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis การทดลองได้แยกทดสอบอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เนื้อสุกร กลุ่มที่ 2 อาหารที่มีโปรตีน ≥ 25% กลุ่มที่ 3 อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต ≥ 50% และกลุ่มที่ 4 อาหารที่มีไขมัน ≥ 30% โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ วิธีมาตรฐาน, วิธีสกัดด้วย CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), วิธีสกัดด้วย Urea และวิธีสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen™ พบว่า วิธีที่เหมาะสมกับอาหารกลุ่มที่ 1 และ 2 คือวิธีมาตรฐาน วิธีที่เหมาะสมสำหรับอาหารกลุ่มที่ 3 คือ การสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB และการสกัดดีเอ็นเอด้วย Urea เหมาะกับอาหารกลุ่มที่ 4 การสกัดดีเอ็นเอด้วย kit สำเร็จรูป แม้จะให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่า แต่ค่าใช้จ่ายสูง สำหรับการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารนั้น ได้จากการออกแบบหาไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ DNA clone ที่พบเฉพาะในสุกรเท่านั้น โดยการสืบค้นข้อมูลใน DNA data bank เพื่อตรวจหาโคลนที่เฉพาะเจาะจงของสุกรจาก growth hormone gene แต่ไม่พบ ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จึงออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่พบแสดงออกในกล้ามเนื้อของสุกร 3 clone (Z98771, Z98802 และ Z98813) เมื่อนำมาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสุกรโดย PCR พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากโคลน Z98813 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 450 นิวคลีโอไทด์ คู่ไพรเมอร์นี้ไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์อื่นยกเว้นเนื้อสุกร โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR คือ annealing temperature 45°C และ $MgCl_2$ 2.08 mM เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจสอบ DNA สุกรปนเปื้อนได้น้อยที่สุด 705 ng และตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ถึงร้อยละ 1 และเมื่อนำมาตรวจสอบในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสุกร พบว่าสามารถตรวจสอบได้

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

175505

##4172315823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : PCR / PORK

NATINEE PONGPANLUK : DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 45 pp. ISBN 974-17-0718-5

DNA determination technique based on DNA amplification with Polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect the swine contaminated in foods for consumers that can not to consume swine and swine products. The technique begins with the extraction of DNA from food materials, amplification of swine DNA fragments that may be contaminated in foods and evaluation of the results by gel electrophoresis. The food materials were divided into 4 groups : 1. pork 2. foods containing protein $\geq$ 25% 3. foods containing carbohydrate $\geq$ 50% and 4. foods containing lipid $\geq$ 30%. DNA was then extracted with 4 methods : Standard method, CTAB method, Urea method and extract with Qiagen™ kit. The results showed that the standard method was suitable for the first and second group of food materials. CTAB method could be used for the third group and Urea method was used for the fourth group because with presence of urea, lipid could be clarified apart. Qiagen™ kit extraction resulted in pure DNA but too high in cost consumption. Determination of swine DNA fragments that contaminated in food began with primer design for swine specific DNA clone only. By querying DNA sequences from DNA data bank for swine growth hormone genes and skeletal muscle genes (Z98802, Z98771, and Z98813) several paired-primers were designed. The test on DNA amplification revealed that primer 813 was only primer enable to amplification swine DNA product specifically and yielded DNA products of 450 nucleotide bases. This paired-primer do not specific with DNA from other species except swine. And when determined in contaminated samples, swine DNA can be detected with PCR condition of annealing temperature 45°C and $MgCl_2$ 2.08 mM. And at least 705 ng of swine DNA and 1% of swine contaminated in mixed animal fresh were detected by this technique. This technique could be applied to detect swine contaminated in other foods.

Department.....Food technology..... Student's signature....Natinee Pongpanluk.....

Field of study.....Food technology.....Advisor's signature.....Romanee Sanguandeekul

Academic year.....2001.....Co-advisor's signature.....