P-ISSN 2586-9000
E-ISSN 2586-9027
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2565) หน้า [63-73]

พัฒนาการตรวจหาการปนเปื้อน Porcine DNA ในเจลาตินและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ Taq Man probe

Development of Detection Porcine DNA in Gelatin and Halal Food Products using Real-Time Polymerase Chain Reaction Based on Taqman Probe

นางพจชนาถ พัทบุรี*
สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 9000
Pojchanad Pathaburee*
Office Of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Songkhla 90110
Received 27 February 2021; Received in revised from 13 May 2021; Accepted 27 September 2021

บทคัดย่อ

การระบุชนิดสัตว์ต้องห้ามเช่น สุกรที่ปนเปื้อนในอาหารเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการตรวจสอบอาหารฮาลาล การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ โดยให้ผลบวกเฉพาะในเนื้อสุกรเท่านั้น แต่ในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นให้ผลเป็นลบ ความไวของปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ในเนื้อดิบ และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในเนื้อสุกรที่ผ่านอุณหภูมิสูง เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และในเจลาตินพบว่า มีประสิทธิภาพที่ดี สามารถตรวจสอบให้ผลบวก ในการผลิตภัณฑ์ที่ยากต่อการตรวจสอบ เช่น ผง gelatin ที่ผลิตจากสุกรและผลิตภัณฑ์ปรุงรส เช่น ซุปก้อน ได้

คำสำคัญ: อาหารฮาลาล; DNA ของสุกร; Real-time PCR

Abstract

Identification of prohibited animals, such as pork contaminated in food, is necessary for halal food inspection. This study uses the real-time PCR technique, with positive results only in pork meat but negative result in other meats. The sensitivity of real-time PCR can be made at the lowest intensity of 0.001 % for porcine DNA in raw meat and 0.01 % in high-temperature pork meat. For

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** pojchanad.j@psu.ac.th **doi:**

detection of porcine DNA contamination in meat products and raw materials used in production, it was found that the method was effective to detect porcine contamination in the production of hard-to-detect products such as gelatin powders made from pork, and seasoning products such as soup cubes.

Keywords: Halal food; Porcine DNA; Real-time PCR

1. บทนำ

การตรวจสอบการปนเปื้อนของฮารอมในการผลิตอาหารฮาลาลซึ่งผิดต่อหลักศาสนาอิสลาม ได้แก่ เนื้อสุกร ไขมันสุกร หนังสุกร และองค์ประกอบอื่นๆ ของสุกร โดยปัจจุบันรายละเอียดของหลักเกณฑ์ในการตรวจสอบเพื่อรับรองอาหารฮาลาลเป็นการตรวจสอบเฉพาะส่วนประกอบก่อนเข้าสู่ระบบการผลิต เช่น ส่วนผสมอาหาร สารปรุงแต่ง สี สารเติมระหว่างการผลิต อุปกรณ์การผลิต สารเร่ง สารทดแทน และอื่นๆ นอกจากนั้นมีเพียงการตรวจสอบกระบวนการผลิต วิธีการผลิต และการเตรียมส่วนประกอบ เป็นต้น งานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA สุกร ซึ่งเป็นสัตว์ต้องห้ามตามหลักศาสนาอิสลามมีการตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบทางด้านโปรตีนด้วยการแยกแถบโปรตีนของสัตว์แต่ละชนิด [4] แต่เนื่องจากโปรตีนมีการสลายง่ายเมื่อผ่านความร้อน นอกจากนี้การจำแนกชนิดสัตว์โดยใช้หลักการเพิ่มปริมาณ DNA ของสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารเพียงเล็กน้อยด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งใช้เวลาน้อยและมีความแม่นยำในการตรวจสอบ [13] โดย primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุกรออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ DNA ของสุกรให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อสุกรเท่านั้น แต่ในเนื้อวัว เนื้อหมูและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ [6-8] นอกจากเทคนิค PCR แล้วในปัจจุบันมีการใช้ เทคนิค Real-time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ได้นิยมนำมาใช้โดยสามารถตรวจสอบสุกร สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในส่วนของไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ [3, 5, 11, 10, 14] และจำแนกชนิดสัตว์จากผลิตภัณฑ์จากน้ำนม [15] สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรด้วยเทคนิค Real-time PCR เพื่อความสะดวกรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย โดยใช้ primer ในส่วน repetitive element จากงานวิจัย Calvo และคณะ [1] ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาความจำเพาะของ primer หลังจากได้ PCR product แล้วนำมาตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยนำมาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพจาก agarose gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation 1000 (Bio-Rad, California, USA) หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากส่วน repetitive element หาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยัน PCR product แล้วทำการลงทะเบียนลำดับดีเอ็นเอที่ได้ลงในฐานข้อมูลสากลโดยเลขที่ทะเบียนคือ DQ648898 (Maharat และคณะ 2005) งานวิจัยนี้ได้ออกแบบ probe ในส่วน repetitive element เพิ่ม โดยใช้ program primer 3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบการปนเปื้อนได้มากกว่าการตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ด้วยเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม และไม่เกิด cross amplification กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีความสะดวกและรวดเร็วกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ไม่มีสารเคมีที่สลายตัวยากต้องกำจัด โดยศึกษาในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และเจลาตินแห้งซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมยาและเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยากต่อการระบุชนิดสัตว์เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผ่านกระบวนการและความร้อนสูง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษา

1) เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วน เช่น 1 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์, 0.01 เปอร์เซ็นต์, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0001 เปอร์เซ็นต์

2) เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 120 °C เป็นเวลา 15 นาทีในอัตราส่วน เช่น 1 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์ 0.01 เปอร์เซ็นต์, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0001 เปอร์เซ็นต์

3) เจลาตินและผลิตภัณฑ์อาหาร

3.1) เจลาตินแห้งจากสุกร

3.2) เจลาตินแห้งจากไก่

3.3) ขนมและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป จำนวน 13 ตัวอย่าง

4) ตัวอย่างควบคุมที่เป็นบวกได้แก่ ตัวอย่างเนื้อสุกร สกัดดีเอ็นเอเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 100, 50, 30, 15, 5 และ 2.5 pg

5) ตัวควบคุมที่เป็นลบ คือ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อปลา

2.1 ตรวจสอบความจำเพาะของ primer และ probe สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนสุกร

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เป็นบวกโดยชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดตัวอย่าง Miniprep DNA purification Kit (TAKARA, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Multimode microplate reader วัดปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและปรับปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100, 50, 30,15, 5 และ 2.5 pg/ul พร้อมทั้งตัวอย่างควบคุมที่เป็นลบ คือ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อปลา นำมาทดสอบต่อด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer [1] และ probe ที่ออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ โดยใช้โปรแกรม Primer3 Plus ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

Table 1 Sequence of nucleotides primer [1] and probe

Primer	Primer Sequence	Tm (°C)
Pig pre-1-F	5′ GGATCCGGCATTGCCGTTAG 3′	52
Pig pre-1-R	5′ GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG 3′	52
Pig probe	5′(FAM)-CTAGCCTGGGAACCTCCATA-(TAMRA) -3′	51

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเตรียมสารละลายในหลอดทดลองดังนี้ TaqMan Master Mix PCR (Applied Biosystems) 10 ul, 200 nM ของ primer และ probe, 50 ng ของ DNA ปริมาณสารละลายทั้งหมด 25 ไมโครลิตร หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้ว เข้าเครื่อง Real-time PCR (Applied Biosystems 7300) ซึ่งได้ตั้งรอบปฏิกิริยาคือ 50°C เวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ 95°C เวลา 10 นาที 1 รอบ ต่อด้วย 95°C เวลา 15 วินาทีและ 60°C 60 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยทำปฏิกิริยา 2 ซ้ำ ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot และให้ค่า Ct ในตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบจะไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence

2.2 ศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรโดยใช้เทคนิค Real-time PCR

1. เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์, 0.01 เปอร์เซ็นต์, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0001 เปอร์เซ็นต์

2. เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 120 °C เวลา 15 นาทีในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์, 0.01 เปอร์เซ็นต์, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0001 เปอร์เซ็นต์

โดยการเตรียมคือชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิกรัมจากเนื้อหมู 0.1 กรัมส่วนผสมเนื้อไก่ 10 กรัม (1 เปอร์เซ็นต์) สับบดให้ละเอียด ดึงเนื้อที่สับบด 1 กรัมมาผสมกับเนื้อไก่ 10 กรัม (0.1 เปอร์เซ็นต์) สับบดให้ละเอียด ทำจนได้อัตราส่วน 0.0001 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อที่ผ่านความร้อน 120°C เวลา 15 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดตัวอย่าง Miniprep DNA purification Kit (TAKARA, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Multimode microplate reader วัดปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและปรับปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้สารละลายตามตารางการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับ Real-time PCR หลังจากผสมสารละลายต่างๆ แล้วเข้าเครื่อง Real-time PCR ตรวจสอบผลที่ได้จะปรากฏสัญญาณ Fluorescence ในกราฟ Amplification plot

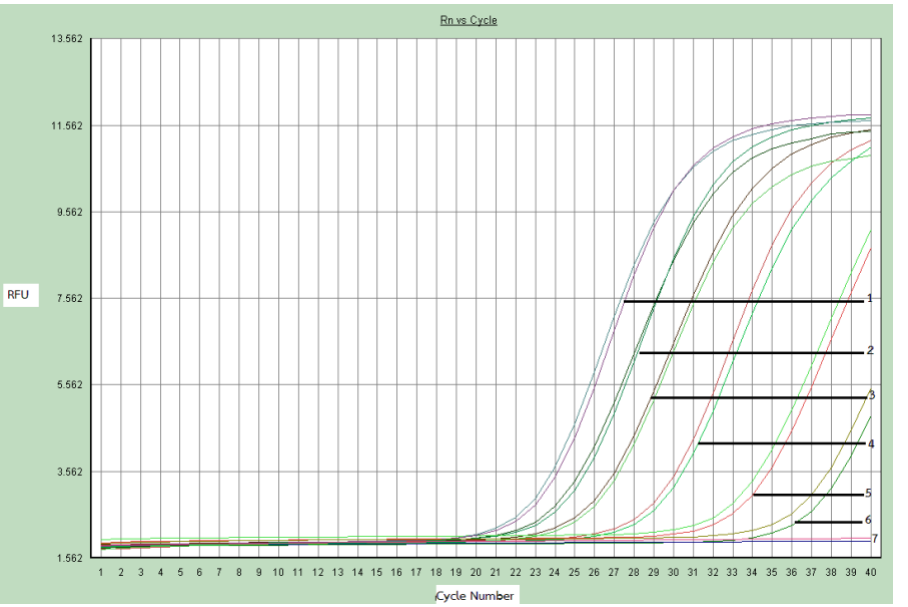
3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจสอบการปนเปื้อนสุกรในเจลาตินและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ต่างๆ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ ข้าวเกรียบปลาทอด, รังนกบรรจุขวด, ลูกชิ้นปลา, รังนก, ไส้อั่ว, ขนมเจลาติน 1, ขนมเจลาติน 2, ขนมเจลาติน 3, ขนมเจลาติน 4, ขนมเจลาติน 5, เครื่องดื่มผสมเจลาติน, ซุปก้อนหมูชนิดที่ 1, ซุปก้อนหมูชนิดที่ 2, เจลาตินสุกรแห้งจากสุกร, เจลาตินไก่แห้ง

สกัดดีเอ็นเอโดยชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดตัวอย่าง Mini prep DNA purification Kit (TAKARA, USA) ดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Multimode micro plate reader วัดปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและปรับปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัด DNA จากตัวอย่าง นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ primer และ probe ตามสภาวะการทดสอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ตรวจสอบความจำเพาะของ primer และ probe ในการตรวจสอบ DNA สุกรเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 100, 50, 30, 15, 5, 2.5 pg และตัวอย่างควบคุมที่เป็นลบคือดีเอ็นเอจากไก่ ปลา วัว นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Real time PCR พบว่าให้ผลบวกโดยจะปรากฏสัญญาณ Fluorescence เฉพาะในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสุกรเท่านั้น สำหรับตัวอย่างปลา ไก่ และวัว ไม่ปรากฏสัญญาณ Fluorescence ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 1

A



B

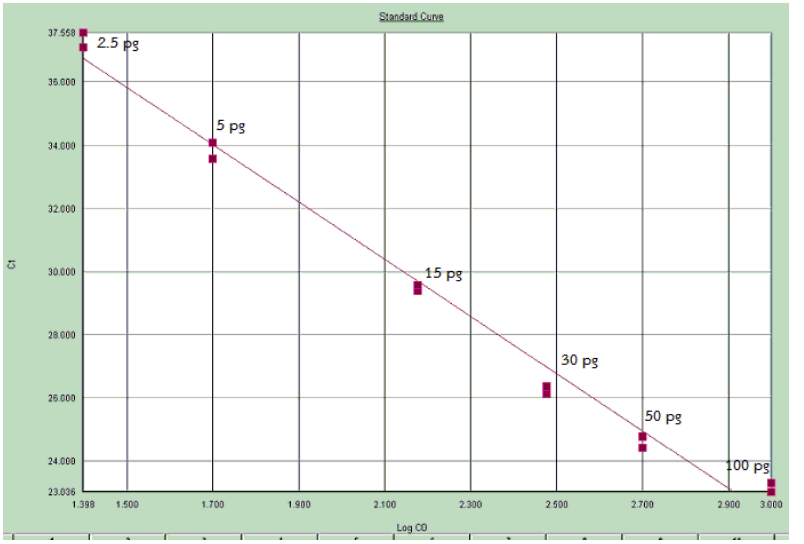
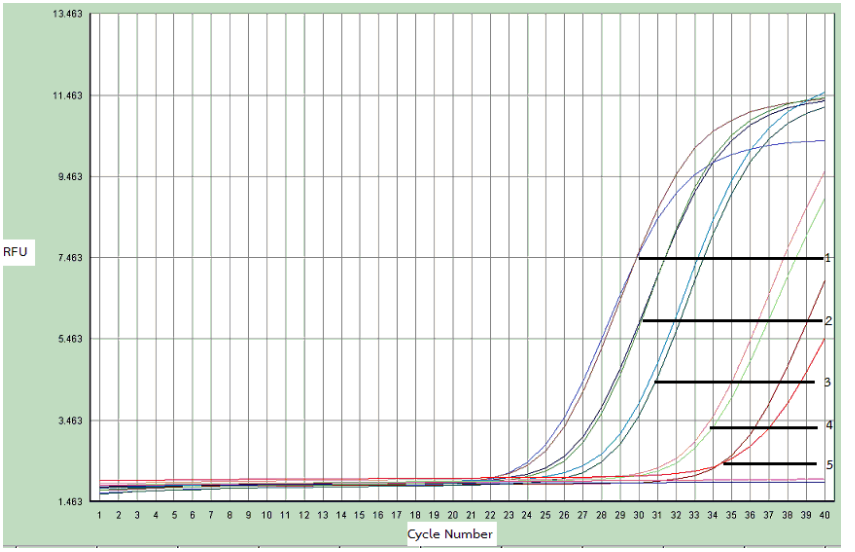


Figure 1 Amplification curves of DNA control at series of porcine DNA (A) The relationship of porcine DNA control (pg) and (cycle) (B) 1= 100 2=50 3=30 4=15 5=5 6=2.5 Other species, chicken, beef, and fish, provided only the background (7)

3.1 ศึกษาขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกร โดยใช้เทคนิค Real-time PCR

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรผสมเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ในอัตราส่วนต่างๆ หลังจากสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าสามารถตรวจสอบระดับต่ำสุดที่ 0.001 เปอร์เซ็นต์ สัญญาณ Fluorescence แสดงในกราฟ Amplification Plot ดังรูปที่ 2A และ 2B

2A



2B

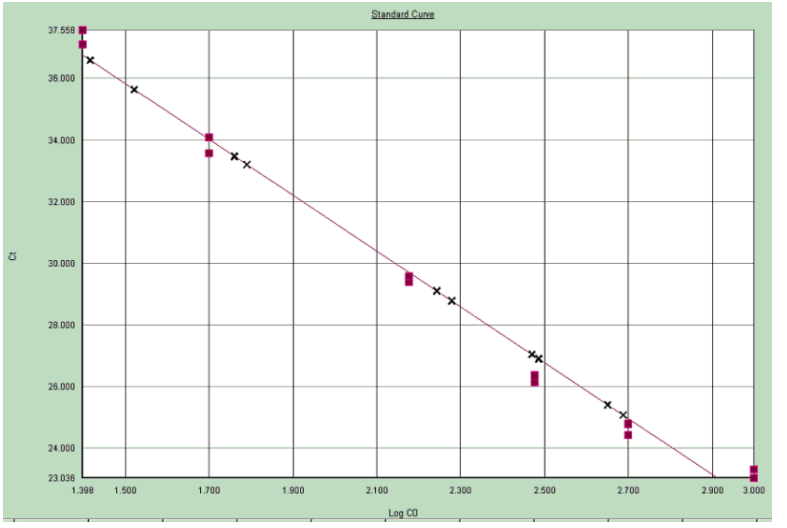
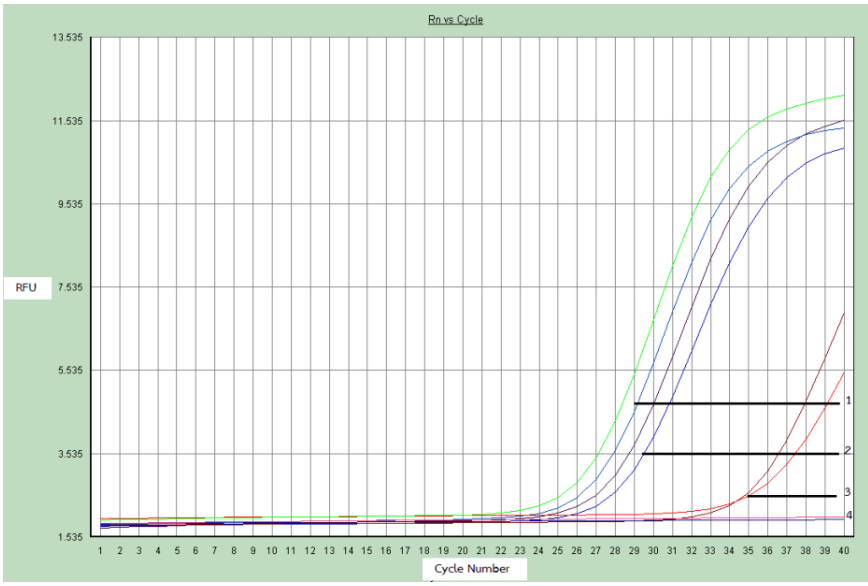


Figure 2 Amplification plot of sensitivity at series contaminated of porcine DNA in raw meat (2A) The relationship of porcine DNA control (pg) and (cycle) (2B) 1=10% 2=% 3=0.1% 4=0.01% 5=0.001% Other species, chicken, beef, and fish, provided only the background

ผลการตรวจสอบ เนื้อหมูที่ผสมกับเนื้อไก่ที่ผ่านความร้อน 120°C เวลา 15 นาทีในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์, 0.01 เปอร์เซ็นต์, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0001 เปอร์เซ็นต์ สามารถตรวจสอบระดับการปนเปื้อนระดับต่ำสุดที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 3A และ 3B สำหรับตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อวัว ไม่พบสัญญาณ

3A



3B

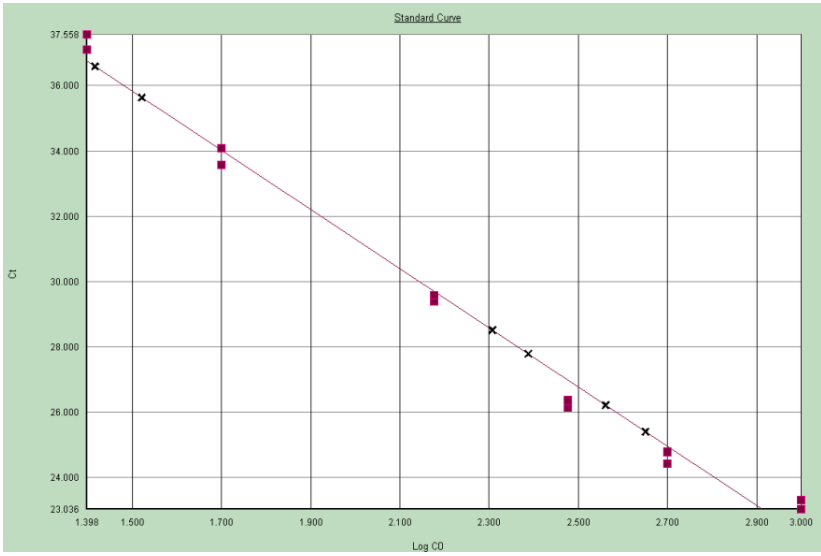
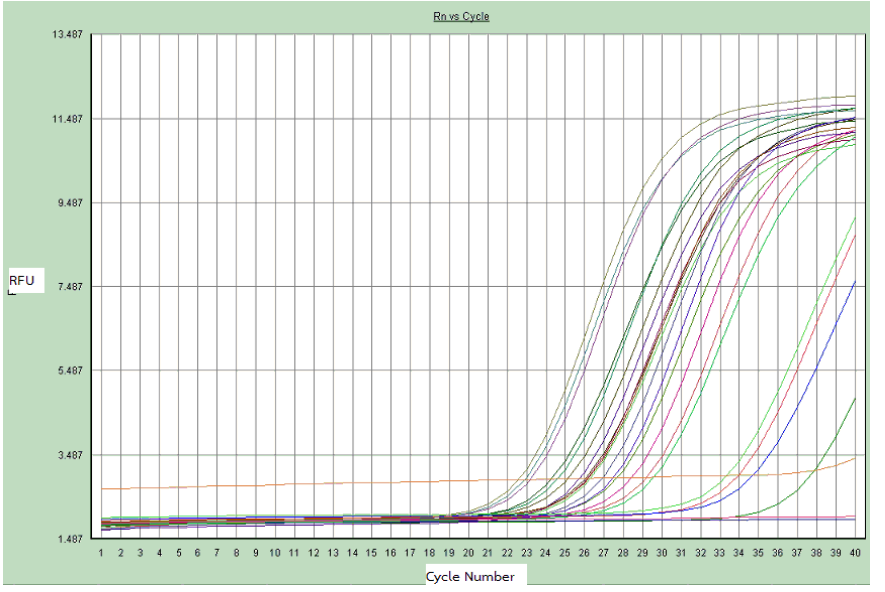


Figure 3 Amplification plot of sensitivity at series contaminated of porcine DNA in heat meat (3A) The relationship of pork DNA control (pg) and (cycle) (3B) 1=1% 2=0.1% 3=0.01% 4=Other species, chicken and beef provided only the background

3.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในเจลาตินและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล

ศึกษาความใช้ได้ของวิธีตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรในเจลาตินและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลแต่ละชนิด โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะสำหรับการตรวจสอบ DNA สุกร พบว่าในตัวอย่างที่บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากสุกรเช่น ไส้อั่วสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรได้ ตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อย เช่น ซุปก้อนสำหรับปรุงอาหารพบว่าสามารถตรวจสอบได้ ทั้งนี้ตัวอย่างที่ยากต่อการทดสอบเช่น เจลาตินผงจากสุกรและเจลาตินผงจากไก่ สามารถตรวจสอบระบุเป็นเจลาตินจากสุกรให้ผลบวกเฉพาะเจลาตินที่ผลิตจากสุกรแต่ในเจลาตินแห้งจากไกให้ผลเป็นลบและเมื่อได้ทดสอบในตัวอย่างที่เป็นขนมที่มีส่วนผสมของ Gelatin ที่ไม่มีเครื่องหมายฮาลาล พบว่าให้ผลเป็นบวก เช่น ในตัวอย่างขนมเจลาตินที่ 1 เนื่องจากในตัวอย่างดังกล่าวอาจมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรดังรูปที่ 4

4A



4B

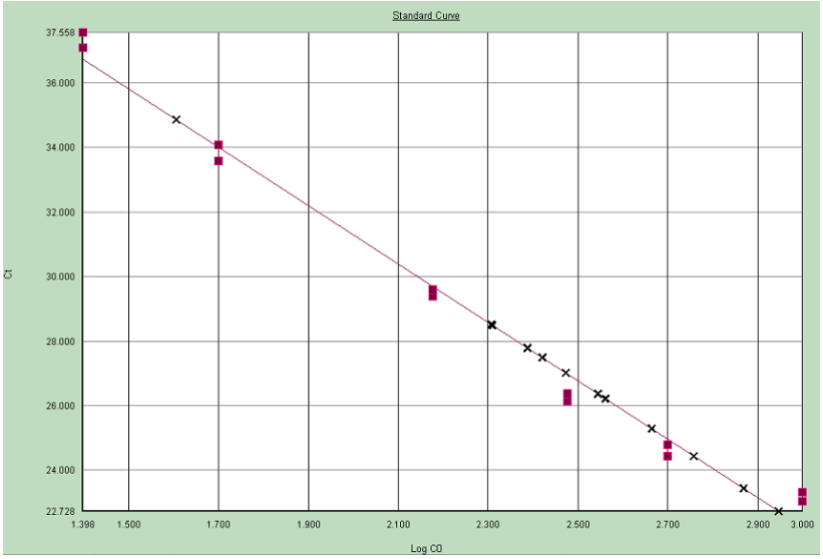


Figure 4 Amplification plot of porcine DNA contamination in halal food products (4A). The relationship of pork DNA control (pg) and (cycle) (4B) 1= fried fish cracker (-), 2= bird's nest 1(-), 3= fish ball(+), 4= bird's nest 2 (-), 5= sausage (+), 6= jelly dessert 1 (+), 7= jelly dessert 2 (-), 8= jelly dessert 3 (-), 9= jelly dessert 4(-), 10= jelly dessert 5(-), 11= beverages(-), 12= pork soup cube 1(+), 13= pork soup cube 2(+), 14= dried gelatin from pork(+), 15= dried gelatin from chicken(-)

4. อภิปรายผลการวิจัย

การตรวจสอบความเหมาะสมของ primer และ probe ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA สุกรโดยใช้ primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ Genomic DNA สุกร ในส่วน repetitive element ให้ผลบวกเฉพาะ DNA ที่สกัดได้จากเนื้อสุกรเท่านั้น ทั้งในเนื้อที่ไม่ได้ผ่านความร้อนและเนื้อหมูที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที แต่ในเนื้อวัวและเนื้อไก่ให้ผลเป็นลบ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo และคณะ (2001) [1] ซึ่งได้ตรวจสอบการปนเปื้อน DNA สุกรในเนื้อสัตว์โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อ DNA ในสุกร ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีหลายชนิด ได้แก่ แกะ, ไก่, แพะ, คน, หมูและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohd และคณะ (2012) ที่สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรโดยใช้เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรได้ระดับต่ำเพียง 0.0001 นาโนกรัมได้ การตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรที่ไม่ได้ผ่านความร้อน Miguel และคณะ (2005) ได้ตรวจสอบเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวโดยความไวที่สามารถตรวจสอบได้ปริมาณที่น้อยที่สุดที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาในเนื้อสัตว์ที่ผ่านความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.0001 เปอร์เซ็นต์ [9] จากงานวิจัยของ Ali Arslan และคณะ (2007) ได้ตรวจสอบชนิดสัตว์โดยตัวอย่างที่ศึกษาเป็นตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบลดลงเมื่อมีการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจาก DNA มีการขาดออกจากกัน [2] แต่

สำหรับ Primer และ probe ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ขนาดเล็กจะสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรที่ผ่านความร้อนสูงได้ โดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนระดับที่น้อยที่สุดเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอหมูในผลิตภัณฑ์อาหารและตรวจสอบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น เจลาติน และไขมันสัตว์ ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหาร ในตัวอย่างที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบ เช่น ไส้อั่ว หรือในตัวอย่างบางชนิดที่ไม่ได้บ่งชี้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเนื้อสุกร และไม่มีเครื่องหมายฮาลาลแต่มีการปนเปื้อนเนื้อสุกร เช่น ลูกชิ้นปลา ซึ่งผลการวิจัยที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ J.H.Calvo ที่ตรวจสอบเนื้อหมู ไส้กรอก รวมทั้งไขมันหมู [1] ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Rene Koppel และคณะ (2008) พบว่าการตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ในตัวอย่างที่ผ่านความร้อนสูงโดยใช้เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ [12] การตรวจสอบการปนเปื้อนเจลาตินในวิธีการทางเคมีสามารถบอกได้เพียงว่าในส่วนผสมมีเจลาตินผสมอยู่หรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเจลาตินที่ผลิตจากสัตว์ชนิดใด เนื่องจากว่าในปัจจุบันเจลาตินสามาถผลิตจากสัตว์หลายชนิด แต่เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบและบอกได้ว่าส่วนผสมที่ได้มีดีเอ็นเอสุกรปนเปื้อนอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ผลที่รวดเร็วและถูกต้อง

5. สรุปผลการวิจัย

เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ในระดับต่ำและพบว่าสามารถตรวจหาการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ในตัวอย่างที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนประกอบแต่มีปริมาณน้อยและต้องผ่านกระบวนการผลิตที่ทำให้ตรวจสอบได้ยาก เช่น เจลาติน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ขนมเจลาติน หรือแคปซูลยา โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Real-time PCR สามารถตรวจสอบเจลาตินแห้งจากสุกรได้และตรวจสอบขนมที่มีเจลาตินผสมได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตรวจสอบแคปซูลยา ขนมเจลาติน หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ เพื่อตรวจสอบการปลอมปนสุกรในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อความมั่นใจของผู้บริโภค

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบการวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททุนทั่วไป ขอขอบคุณสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

7. References

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

[2] Ilhak, I. and Arslan, A., (2007), Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique Turk, J. Vet. Anim. Sci. 31(3): 159-163.

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

[4] 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): 1608-1612.

[5] Lahiff, S., Glennon, M., Brien, L., Lyng, J., Smith, T., (2001), Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM), Mol Cell Probes. 15(1): 27-35.

[6] Laube, I.S., Butschke, A., Zagon, J., Schauzu, M., Kroh, L., (2003), Method for detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. International Journal of Food Science and Technology. 38: 111-118.

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

[8] Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Shibata, K., Yamada, T., (1998), A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, Meat Sci. 51: 143-148.

[9] Miguel, A.R., Teeresa, G., Isabel, G., Pablo, E.H., (2005), TagMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures, Meat Science. 70: 113-120.

[10] Mohd, H.M. and YusopShuhaimi, M., (2012), Detection of Raw Pork Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by Molecular Beacon Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction, Food Analytical Methods. 5: 422-429.

[11] Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncaies, P. and Lopez-Perez M.J., (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): 2829-2832.

[12] Rene, K., Jug, R. and Franziska, Z., (2008), Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey, Eur Food Res Technol. 227: 1199-1203.

[13] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf S.J., Higuchi R., (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science. 239(4839): 487-491.

[14] Ursing, B.M. and Arnason, U., (1998), The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (Sus scrofa), J Mol Evol. 47(3): 302-306.

[15] Zhang, C.L., Mark, R.F., Nigel, W.S., Graham, L. and Adrian, S., (2007), A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milk and cheeses, J Food Control. 18: 1149-1158.