

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณอินตรอนของยีนโกรทฮอร์โมนสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อน  
ดีเอ็นเอของหมูในอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยวิธีพีซีอาร์  
Development of DNA Marker of Growth Hormone Intron for the Detection of  
Contaminated Porcine DNA in Halal Food and Food Products by PCR Method

ชุตตา บุญภักดี<sup>1\*</sup>, วราภรณ์ ทองยอด<sup>2</sup>, นุชจรินทร์ แก้วกล้า<sup>1</sup>, ธนอมศักดิ์ บุญภักดี<sup>3</sup>  
Chuta Boonphakdee<sup>1\*</sup>, Waraporn Thongyod<sup>2</sup>, Nutcharin Kleawkla<sup>1</sup>, Thanomsak Boonphakdee<sup>3</sup>

Received: June 11, 2022

Revised: September 11, 2022

Accepted: October 15, 2022

## บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเนื้อหมูในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อความเชื่อมั่นของผู้บริโภคอาหารฮาลาล งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูที่ปนเปื้อนในอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหารด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งการตรวจวัดการปนเปื้อนด้วยวิธีมาตรฐานอื่นมีข้อจำกัดด้านความไว และขั้นตอนการทดสอบที่ใช้ระยะเวลานาน โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณอินตรอนของยีนโกรทฮอร์โมน (growth hormone; GH) ขนาด 105 คู่เบส เมื่อทำการทดสอบการใช้ได้ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างเนื้อของสัตว์ 4 ชนิด คือ เนื้อวัว (*Bos taurus*) เนื้อหมู (*Sus scrofa domestica*) เนื้อหมูป่า (*Sus scrofa*) และเนื้อไก่ (*Gallus gallus*) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนผสม 5 ตัวอย่าง คือ หมูหยอง หมูยอ แฮม ไส้กรอกหมู และกุนเชียง และแบ่งจากพืช 1 ตัวอย่าง คือ ข้าวโพด (*Zea mays*) ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความจำเพาะให้ผลบวกมีแถบดีเอ็นเอขนาด 105 คู่เบส กับตัวอย่างของเนื้อหมู เนื้อหมูป่า และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเนื้อหมูทั้ง 5 ตัวอย่าง แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างอื่นที่ทดสอบ ยกเว้นในเนื้อวัวและตัวอย่างที่มีเนื้อวัวผสมโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอนอกเป้าหมายขนาดประมาณ 270 และ 1,100 คู่เบส เมื่อทดสอบความไวของวิธีพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อผสมระหว่างเนื้อวัวกับเนื้อหมูในอัตราส่วนที่มีเนื้อหมูร้อยละ (w/w) 50, 25, 5, 1 และ 0.1 (25, 12.5, 2.5, 0.5

และ 0.05 นาโนกรัม ตามลำดับ) พบว่าวิธีพีซีอาร์มีความไวให้ผลบวกกับเนื้อผสมที่มีอัตราส่วนของเนื้อหมูต่ำสุดร้อยละ 0.1 (0.05 นาโนกรัม) และเมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอผสมของวัวกับของหมูในอัตราส่วนที่มีดีเอ็นเอของหมูร้อยละ (v/v) 50, 25, 5, 1, 0.1 และ 0.01 (25, 12.5, 2.5, 0.5, 0.05 และ 0.005 นาโนกรัม ตามลำดับ) พบว่าวิธีพีซีอาร์มีความไว โดยให้ผลบวกกับดีเอ็นเอผสมที่มีดีเอ็นเอของหมูต่ำสุด ร้อยละ 0.01 (0.005 นาโนกรัม) เมื่อตรวจสอบอาหารฮาลาลจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าวิธีพีซีอาร์ให้ผลบวกกับอาหารฮาลาล 2 ตัวอย่าง เครื่องหมายดีเอ็นเอและวิธีพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความไว ใช้งานง่าย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูในอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหารได้

**คำสำคัญ:** การปนเปื้อน เครื่องหมายดีเอ็นเอ เนื้อหมู พีซีอาร์ อาหารฮาลาล

## ABSTRACT

Pork contamination in food and food products is a major concern affecting consumer confidence in halal foods. This work aims to develop a DNA marker for detecting contaminated porcine DNA in halal food and food products using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method to amplify growth hormone (GH) intron, 105 base pairs, in which other standardized methods are limited in their sensitivities and long testing process. When validating the developed

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

DNA marker, 4 meat sources: beef (*Bos taurus*), pork (*Sus scrofa domestica*), wild boar (*Sus scrofa*), and chicken (*Gallus gallus*), 1 plant starch: maize (*Zea mays*), and 5 pork-based products: fragrance pork floss, Vietnamese sausage, ham, pork sausage, and Chinese sausage were examined. The PCR results showed positive given a 105-bp DNA band on pork, wild boar, and all pork-based products, but no amplified products in other tested samples except for beef and mixed beef samples, where two off-target DNA bands were present at approximately 270 and 1,100 bp. The PCR sensitivity was additionally conducted using beef-pork binary admixtures in different pork percentages (w/w) at 50, 25, 5, 1, and 0.1 (25, 12.5, 2.5, 0.5, and 0.05 ng, respectively). The results showed high sensitivity, detecting as low as 0.1% (0.05 ng). The PCR sensitivity was also performed using a mixture of bovine and porcine DNAs in various percentages (v/v) of porcine DNA: 50, 25, 5, 1, 0.1, and 0.01 (25, 12.5, 2.5, 0.5, 0.05, and 0.005 ng, respectively). The results enabled the detection of as little as 0.01% (0.005 ng) of porcine DNA. The pork derivatives in 5 halal foods were also investigated. The PCR gave positive results in 2 halal foods. Thus, the DNA marker and PCR method developed in this study are highly sensitive, easy to use, and can apply to detecting porcine DNA presence in halal foods and food products.

**Keywords:** contamination, DNA marker, pork, PCR, halal food

## บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญอย่างมากกับคุณภาพของอาหารและความถูกต้องของข้อมูลบนฉลากโภชนาการ สำหรับการตัดสินใจเลือกซื้ออาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการบริโภค โดยเฉพาะวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารนั้นอาจปนเปื้อน มีการปลอมปน หรือใช้ส่วนผสมของเนื้อสัตว์บางชนิดที่ไม่ตรงกับข้อมูลที่ปรากฏบนฉลาก ทำให้ส่งผลกระทบต่อลักษณะที่ไม่เป็นธรรมต่อผู้บริโภคหรือผู้ใช้ประโยชน์ เช่น ผู้บริโภคอาหารเจหรืออาหารมังสวิรัตที่ไม่รับประทานเนื้อสัตว์ทุกชนิด หรือ บทบัญญัติทางศาสนาอิสลามเกี่ยวกับอาหารฮาลาล มีข้อห้าม (ฮารอม) ประการหนึ่ง คือ การบริโภคสัตว์จำพวก หมู หมูป่า สุนัข หรือสัตว์ที่กินเนื้อเป็นอาหารประเภทที่มีเขี้ยวและกรงเล็บ ดังนั้นอาหารฮาลาลจึงต้องไม่มีองค์ประกอบหรือสิ่งเจือปน ตลอดจนในกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอนต้องไม่มีการปนเปื้อนด้วยดีเอ็นเอของสัตว์ดังกล่าว และยังพบการหลอกลวงใช้เครื่องหมายรับรองฮาลาลบนฉลากโภชนาการ โดยมีองค์ประกอบของเนื้อสัตว์ต้องห้ามปนอยู่ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะเนื้อหมูที่เป็นเนื้อสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ประกอบอาหาร และเพื่อช่วยเพิ่มกลิ่นและรสสัมผัสมากขึ้น ดังนั้นวิธีการตรวจสอบอย่างละเอียดตั้งแต่วัตถุดิบ ขั้นตอนการเตรียม การผลิต คลังสินค้า ตลอดจนการขนส่งสำหรับอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลจึงมีความสำคัญยิ่งสำหรับชาวมุสลิม [1, 2, 3] ในปัจจุบัน ประชากรมุสลิมทั่วโลกมีมากกว่า 1.6 พันล้านคน ดังนั้น ความต้องการบริโภคอาหารฮาลาลจึงส่งผลให้การส่งออกอาหารฮาลาลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากรายงานแนวโน้มตลาดอาหารฮาลาลทั่วโลกในปี พ.ศ. 2561 มีมูลค่ากว่า 1,369 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ สำหรับประชากรในประเทศไทยพบว่ามีผู้นับถือศาสนาอิสลามเป็นอันดับที่ 2 ของประเทศ คิดเป็นร้อยละ 4.6 ของประชากรทั้งประเทศหรือเท่ากับร้อยละ 0.2 ของประชากรโลก [4]

เทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนและปลอมปนเนื้อสัตว์ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่ง

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวักซ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

สามารถตรวจสอบอาหารดิบที่ยังไม่ผ่านการปรุงสุก ได้แก่ วิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) แต่วิธีนี้ความไวจะลดลงเมื่อนำมาใช้กับอาหารที่แปรรูปและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านความร้อนหรือมีกระบวนการทำหลายขั้นตอน เนื่องจากโปรตีนธรรมชาติถูกทำลายให้เสียสภาพ และมีข้อจำกัดที่ขั้นตอนการทำใช้ระยะเวลาสั้น [5, 6] และวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิมหรือที่เรียกกันทั่วไปว่า พีซีอาร์ (conventional polymerase chain reaction; PCR) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความนิยม มีข้อดีกว่าวิธีการวิเคราะห์โปรตีนที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้อย่างจำเพาะ ใช้ตรวจสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างตั้งต้นที่มีอยู่ปริมาณน้อย และจากเนื้อเยื่อที่เสียสภาพได้โดยยังคงประสิทธิภาพของความแม่นยำ มีความไว และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (real-time PCR หรือ quantitative real time PCR) ที่ปัจจุบันเครื่องมือวิเคราะห์ยังคงมีราคาแพงแต่ใช้หลักการทำงานพื้นฐานด้านพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในหลอดทดลองได้เช่นกัน [7, 8]

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยทำการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ สามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของหมู (*Sus scrofa domestica*) แยกความแตกต่างออกจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูที่ยังคงอยู่ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียสภาพและปนเปื้อนหรือปลอมปนในอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหาร โดยศึกษาในบริเวณอินทรอน (intron) ของยีนโกรทฮอร์โมน (growth hormone gene) ซึ่งยีนโกรทฮอร์โมนพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป แต่ไม่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เพิ่มขนาดและจำนวนของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยควบคุมการเจริญของกระดูกที่เป็นแกนหลักของร่างกาย [9] ทั้งนี้ ยีนโกรทฮอร์โมนในสัตว์มีกระดูกสันหลังแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกัน พบได้ตั้งแต่ 1.5-12 กิโลเบส [10] จากการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่ายีนโกรทฮอร์โมนของปลาแซลมอน (*Salmo salar*;

GenBank accession no. M21573) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*; M84774) ไก่ (*Gallus gallus*; D10484) แพะ (*Capra hircus*; GU355689) แกะ (*Ovis aries*; DQ450146) กวางแดง (*Cervus elaphus*; AM049993) และวัว (*Bos taurus*; M57764) มีขนาดเท่ากับ 4,397, 2,361, 3,901, 1,772, 4,796, 2,100 และ 2,856 คู่เบส ตามลำดับ สำหรับของหมู (*Sus scrofa domestica*; M17704) และของหมูป่า (*S. scrofa*; CP071563) มีขนาดเท่ากัน คือ 2,231 คู่เบส โครงสร้างของยีนประกอบด้วย 5 แอ็กซอน และ 4 อินทรอน โดยอินทรอนเป็นบริเวณที่แทรกระหว่างแอ็กซอนที่ไม่สามารถถอดรหัส (non-coding sequence) เป็น messenger RNA (mRNA) เพื่อสร้างเป็นโปรตีนได้ เหมือนกับบริเวณของแอ็กซอน ทั้งนี้ผลจากการที่คณะผู้วิจัยทำการศึกษานำร่องเทียบเคียงลำดับเบสของยีนโกรทฮอร์โมนของหมูกับของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นดังกล่าวข้างต้น พบว่าบริเวณอินทรอนที่ 3 มีลำดับเบสที่ต่างกัน บริเวณอินทรอนนี้ จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูได้อย่างจำเพาะ

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์ อาหารฮาลาล และผลิตภัณฑ์อาหาร

ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อสดของสัตว์ 4 ชนิด คือ เนื้อวัว (*Bos taurus*) เนื้อหมู (*Sus scrofa domestica*) เนื้อหมูป่า (*Sus scrofa*) และเนื้อไก่ (*Gallus gallus*) โดยซื้อมาจากห้างสรรพสินค้าแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ใช้ตัวอย่างแยกชนิดๆ ละ 4 กรัม (ทำ 3 ซ้ำ) และเตรียมเนื้อผสมระหว่างเนื้อวัวกับเนื้อหมูเพื่อทดสอบความไวและความแม่นยำของวิธีพีซีอาร์ ทุกตัวอย่างมีน้ำหนักสุทธิ 4 กรัม โดยมีอัตราส่วนผสมของเนื้อหมูร้อยละ (w/w) 50, 25, 5, 1 และ 0.1 โดยตัดเนื้อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักเนื้อหมูเท่ากับ 2, 1, 0.2, 0.04 และ 0.004 กรัม นำมารวมกับเนื้อวัว น้ำหนัก 2, 3, 3.8, 3.96 และ 3.996 กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำเนื้อผสมแต่ละตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติมน้ำสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS, pH

\*Corresponding author e-mail: chuta@bua.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

7.4 sterilize-filtered) (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง OmniTH Tissue Homogenizer (Omni International, USA) โดยใช้โพรบพลาสติกแบบใช้แล้วทิ้ง (Omni Tip™ Disposable generator probes) ความเร็วระดับ 1 (5,000 รอบ/นาที) นาน 30 วินาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ในขั้นตอนการทดสอบอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหาร ทำโดยเลือกซื้อตัวอย่างอาหารในห้างสรรพสินค้าแห่งเดียวกันกับตัวอย่างเนื้อสัตว์ข้างต้น โดยสุ่มตัวอย่างอาหารฮาลาล จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ ซุป ไช้ผสมผักโขม แกงมัสมั่นไก่กระป๋อง ปลากระป๋อง หอยลายกระป๋อง และไก่ข้าวโอ๊ต และผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุว่ามีส่วนประกอบของเนื้อหมู จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ หมูหยอง หมูยอ แฮม ไส้กรอกหมู และกุนเชียง แต่ละตัวอย่างนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งน้ำหนัก 4 กรัม (ทำ 3 ซ้ำ) ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยวิธีเช่นเดียวกันกับเนื้อสัตว์ที่กล่าวมาข้างต้น และใช้ตัวอย่างนอกกลุ่มเป็นแป้งสำเร็จทำจากพืช 1 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด (*Zea mays*) ที่นิยมใช้ประกอบอาหารและเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์อาหาร จากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดไปสกัดแยกดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

## 2. การสกัดแยกดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ อาหารฮาลาล และผลิตภัณฑ์อาหารที่เตรียมไว้ข้างต้น มาสกัดดีเอ็นเอโดยทำตามขั้นตอนที่มีการรายงานไว้แล้ว [11] ดังนี้ ซึ่งน้ำหนักแต่ละตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม แยกใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย cell lysis buffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl; pH 8.0, 25 mM EDTA; pH 8.0, 0.5% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่นที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติมน้ำ Ribonuclease A (4 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำละลาย Protein precipitation

solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl; pH 7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ และเติม isopropanol ความเข้มข้น ร้อยละ 100 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกแล้วเติม ethanol ความเข้มข้น ร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกเหลือตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งด้วยวิธี vacuum drying นาน 1 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย nuclease free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ส่วนการสกัดดีเอ็นเอจากแป้งข้าวโพด ใช้น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จ SP Plant DNA Kit ตามวิธีที่รายงานโดยบริษัท Omega Bio-Tek (USA) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกตัวอย่างด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) เลือกใช้เฉพาะดีเอ็นเอที่มีค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย nuclease free water ให้เท่ากับ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

## 3. การเตรียมดีเอ็นเอผสม

เพื่อทดสอบความไวและความแม่นยำของวิธีพีซีอาร์ ทำการเตรียมดีเอ็นเอผสมโดยนำดีเอ็นเอของวัวและของหมูจากที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 100 มาปรับความเข้มข้นใหม่ เท่ากับ 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วผสมกัน ปริมาณสุทธิเท่ากับ 50 นาโนกรัม เท่ากันทุกตัวอย่าง โดยปรับอัตราส่วนของดีเอ็นเอหมูเป็นร้อยละ (% v/v) เท่ากับ 50, 25, 5 และ 1 วิธีการเตรียมคือใช้ดีเอ็นเอของหมู : ดีเอ็นเอของวัว เท่ากับ 5:5, 2.5:7.5, 0.5:9.5 และ 0.1:9.9 ไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนการเตรียมดีเอ็นเอผสมที่มีดีเอ็นเอของหมูร้อยละ 0.1 และ 0.01 เตรียมโดยใช้ดีเอ็นเอของหมู

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

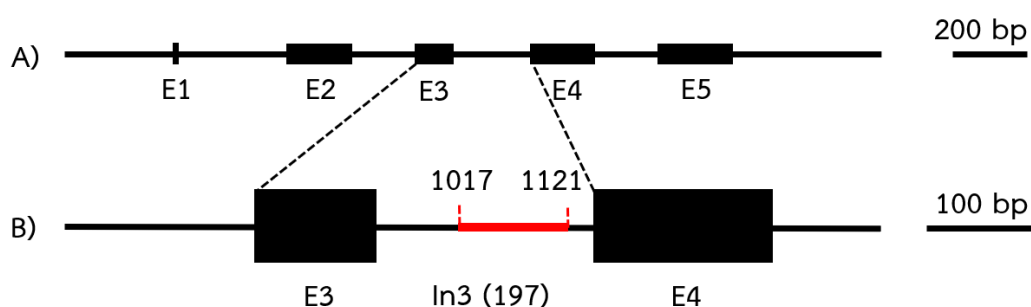
<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

และของวุ้น เจือจางด้วย nuclease free water ก่อนนำมาปรับความเข้มข้นใหม่เท่ากับ 0.5 และ 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วน 0.1:9.99 และ 0.01:9.99 ไมโครลิตร ตามลำดับ

#### 4. การออกแบบไพรเมอร์และการทำพีซีอาร์

นำข้อมูลลำดับเบสของยีนโกรทฮอร์โมนของหมูที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (accession

no. M17704) มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อบริเวณอินทรอนที่ 3 ตำแหน่งลำดับเบสที่ 1,017-1,121 ขนาดเท่ากับ 105 คู่เบส (Figure 1) โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<https://primer3.org>) ได้คู่ไพรเมอร์ GH105L (5'-GGGCCTCCCTCTTCCTAAG-3') และ GH105R (5'-ACCACCCCGCCCTCT-3') จากนั้นทำการส่งลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปส่งเคราะห์กับบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia)



**Figure 1** Schematic diagram of complete growth hormone (GH) gene structure and the target amplified region in *Sus scrofa domestica*. The gene diagram is drawn to scale, with a total length of 2,231 bp retrieved from GenBank (accession no. M17704). (A) The domestic pig complete GH gene structure comprises 5 exons and 4 introns. Black boxes represent exons. (B) Partial GH gene structure of the domestic pig corresponding to the 105-bp intron (positions 1017-1121; red line) examined in this study.

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ GH105L และไพรเมอร์ GH105R ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ สารผสม 2X GoTaq® Green Master Mix (PCR reaction buffer (pH 8.5), 400 µM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polymerase) (Promega, USA) และเติม nuclease free water ให้ครบปริมาตร พีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน Pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส 20 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที ทำซ้ำจำนวนทั้งหมด 35 รอบ และ Final Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบใน agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นร้อยละ 1 เปรียบเทียบ

กับดีเอ็นเอมาตรฐาน VC 100 bp Plus DNA Ladder (250 นาโนกรัม, 5 ไมโครลิตร) (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia) โดยใช้สารละลาย 1X TBE buffer (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, and 2 mM EDTA; pH 8.3) ภายใต้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง InGenius gel documentation (Syngene International Ltd., USA)

#### ผลการทดลอง และวิจารณ์

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ อาหารฮาลาล และผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกตัวอย่งนั้นมีความบริสุทธิ์และคุณภาพดี สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นของปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เมื่อ

\*Corresponding author e-mail: chuta@bua.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

วิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี วัดค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 ได้เท่ากับ 1.8-1.9 ซึ่งหากค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 บ่งชี้ได้ว่าสารละลายดีเอ็นเอมีโปรตีนปะปนแต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้วัดค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/230 ซึ่งหากมีค่าน้อยกว่า 1.8 จะบ่งชี้ได้ว่าการปนเปื้อนของสารประกอบอินทรีย์ในสารละลายดีเอ็นเอที่อาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้มีประสิทธิภาพลดลงได้

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่เพื่อนำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมในบริเวณอินทรอนที่ 3 ของยีนโกรทฮอร์โมนของหมู (*S. scrofa domesticus*) ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ได้คู่ไพรเมอร์ GH105L และ GH105R (forward primer และ reverse primer ตามลำดับ) โดยเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์คู่นี้อีกครั้ง โดยนำลำดับเบสของไพรเมอร์และบริเวณอินทรอนที่ศึกษา ไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า ลำดับเบสเหมือนกันกับบริเวณอินทรอนที่ 3 ของยีนโกรทฮอร์โมนของหมูและของหมูป่าตามที่ย่อแบบไว้ (Figure 2) มีค่า % Identity เท่ากับ 100 (E-value =  $1e-45$ ) ทั้งนี้ เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสของยีนโกรทฮอร์โมนบริเวณเดียวกันของกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังที่บริโภคได้โดยไม่ขัดต่อบัญญัติของศาสนาอิสลามและที่สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank (เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2565) เช่น ปลานิล ปลาแซลมอน ไก่แพะ แกะ วัว และกวางแดง ร่วมกับของหมู หมูป่า และลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้งสองข้าง มาจัดเรียงเปรียบเทียบความเหมือน (multiple sequence alignment) พบว่า ไพรเมอร์ GH105L มีลำดับเบสเชิงอนุรักษ์ที่เหมือนกับของแพะ แกะ และกวางแดง มีค่า % Identity เท่ากับ 89.47 แต่ไพรเมอร์ GH105R มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อหมูและหมูป่า (species-specific reverse primer) มีค่า % Identity เท่ากับ 100 ส่วนไพรเมอร์ GH105R พบว่ามีลำดับเบสบางส่วนที่เทียบเคียงได้กับของแพะ แกะ หรือกวางแดง โดยมีค่า

% Identity สูงสุดเท่ากับ 60 เมื่อเทียบกับของกวางแดง และลดลง (% Identity = 26.67) เมื่อเทียบกับของวัว ทั้งนี้ พบความแตกต่างมากขึ้นเป็นลำดับเมื่อเทียบเคียงกับของปลานิล ปลาแซลมอน และไก่ (Figure 2)

เมื่อทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อสัตว์และจากพืช พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อสัตว์ในกลุ่มของหมูได้อย่างจำเพาะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 105 คู่เบส เท่ากันกับที่ออกแบบไพรเมอร์ไว้ (Figure 3) (ยืนยันขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีการอ่านลำดับเบส แต่ไม่ได้รายงานผลในครั้งนี้) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลบวกในดีเอ็นเอที่สกัดมาจากตัวอย่างเนื้อของหมูและของหมูป่า ทั้งนี้ หมูป่าถูกจัดไว้เป็นต้นสายพันธุ์หรือบรรพบุรุษของหมู ดังนั้นข้อมูลพันธุกรรมในบริเวณอินทรอนของยีนโกรทฮอร์โมนโดยเฉพาะบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับไม่แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นสัตว์ต่างชนิดย่อยกัน (subspecies) จึงให้ผลบวกของแถบดีเอ็นเอขนาด 105 คู่เบส เท่ากัน แต่ในสัตว์ต่างชนิด ลำดับเบสบริเวณนี้มีความแตกต่างกัน [10, 12-13] ซึ่งยืนยันผลการทดสอบได้จากที่ไม่พบผลผลิตพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอนอกกลุ่มที่นำมาทดสอบ คือ ไก่ และของแป้งข้าวโพด แต่อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่ออกแบบในครั้งนี สามารถเกิด cross-amplification เข้าจับได้กับบางบริเวณบนสายดีเอ็นเอของวัว ปรากฏผลบวกของแถบดีเอ็นเอนอกเป้าหมายแต่มีขนาดไม่เท่ากับ 105 คู่เบส คือประมาณ 270 คู่เบส (แถบจาง) และ 1,100 คู่เบส (แถบเข้ม) (Figure 3) ซึ่งคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้อาจใช้ประโยชน์ได้เพิ่มเติมสำหรับการตรวจสอบความจำเพาะกับดีเอ็นเอของวัว หรือเมื่อใช้ดีเอ็นเอของวัวเป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive DNA control) ดังที่แถบดีเอ็นเอนอกเป้าหมายนี้ปรากฏชัดเข้มมากขึ้นกับเนื้อผสมที่มีส่วนผสมของเนื้อวัวมากกว่าร้อยละ 50 (Figure 4) หรือทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อปรับลดการเกิด cross-amplification ในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของกลุ่มสัตว์นอกเป้าหมาย เช่น เพิ่มอุณหภูมิของขั้นตอน Annealing ให้สูงจากเดิมที่ใช้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 วินาที

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

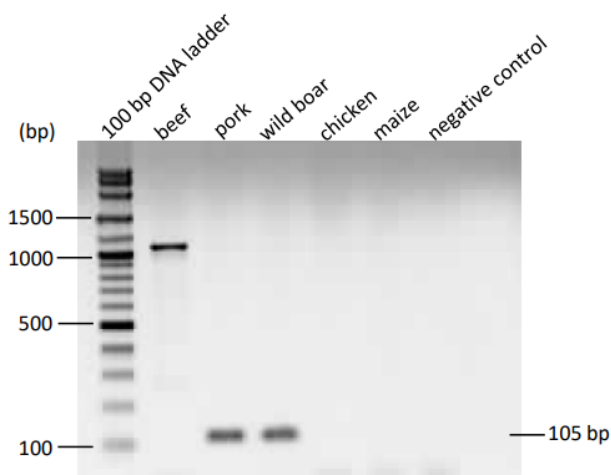
<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์เข้าจับอย่างจำเพาะมากขึ้น ทั้งนี้ มีรายงานการวิจัยที่นำข้อความพันธุ์กรรมบางส่วนของยีนโกรทฮอร์โมนไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น เช่น บริเวณอินทรอนที่ 1 และ 2 ของยีนโกรทฮอร์โมนของปลา croaker (*Larimichthys crocea*) พบตำแหน่ง SNPs

หลายตำแหน่ง จึงใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตอบสนองการเจริญเติบโต เพื่อประโยชน์ทางด้านการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงสายพันธุ์ในปลากลุ่มนี้ [12] แต่ปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้เพื่อตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิต



**Figure 2** Primer sequences and their target regions on growth hormone (GH) intron. Open boxes indicate the positions of forward primer (GH105L) and species-specific reverse primer (GH105R; reverse-complement sequence) with 100%-identical sequences to *Sus scrofa domestica* (M17704) and *Sus scrofa* (CP071563). Other sequences retrieved from GenBank are aligned, and the alignment shows a variety of different sequences; *Ovis aries* (DQ450146), *Capra hircus* (GU355689), *Cervus elaphus* (AM049993), *Bos taurus* (M57764), *Oreochromis niloticus* (M84774), *Salmo salar* (M21573), and *Gallus gallus* (D10484).



**Figure 3** Detection of a species-specific 105-bp porcine DNA (pork and wild boar) stained with ethidium bromide in 1 % agarose gel. The amplification of non-target DNA, approximately 270 and 1,100 bp, was detected in raw beef. However, no amplicons were produced from chicken, maize, and negative control (no DNA template). Electrophoresis was performed for 45 min at 75 V in a 1XTBE buffer. VC 100 bp Plus DNA (250 ng) was used as a DNA marker.

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวักซ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431



เมื่อทำการทดสอบการใช้ได้และความไวของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อผสมระหว่างเนื้อวัวกับเนื้อหมูในอัตราส่วน 50:50, 75:25, 95:5, 99:1 และ 99.9:0.1 (ปริมาณต่ำสุดที่นำเนื้อมาผสมได้) และใช้ในรูปแบบของดีเอ็นเอผสมระหว่างดีเอ็นเอของวัวกับของหมูในอัตราส่วน 50:50, 75:25, 95:5, 99:1, 99.9:0.1 และ 99.99:0.01 พบว่าวิธีพีซีอาร์ให้ผลบวกกับทุกตัวอย่างที่ทดสอบวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบได้ในปริมาณเนื้อผสมหมูในอัตราส่วนต่ำสุดร้อยละ 0.1 (Figure 4) และดีเอ็นเอของหมูที่ผสมต่ำสุดร้อยละ 0.01 (Figure 5) ซึ่งเป็นอัตราส่วนต่ำสุดที่ทำการทดสอบในครั้งนี้ จะเห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอและวิธีพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ [13] โดยใช้ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีนโกรทฮอร์โมนของหมูเช่นกัน แต่ไม่ใช่บริเวณอินทรอนที่ 3 โดยรายงานผลการทดสอบกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ผลผลิตพีซีอาร์จำเพาะมีขนาดใกล้เคียงกับที่ศึกษาครั้งนี้ คือ 108 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบเนื้อหมูที่ปนอยู่กับเนื้อวัวทั้งแบบเนื้อสดและเนื้อที่ผ่านความร้อนต้มสุก พบว่าตรวจสอบดีเอ็นเอของหมูได้ต่ำกว่าร้อยละ 2

ทั้งนี้ งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของหมู โดยใช้ยีนต่างๆ เช่น *12S rRNA*, *cytochrome b*, *ATPase* หรือบริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรียลิงจีโอ เนื่องจากไมโทคอนเดรียลิงจีโอมีข้อได้เปรียบกว่าการศึกษาในนิวเคลียสลิงจีโอที่มีจำนวนสำเนาหลายพันชุดต่อเซลล์ ดังนั้นดีเอ็นเอที่เสถียรภาพเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ สามารถนำมาเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองได้ง่าย แต่มีข้อด้อยที่ข้อความพันธุกรรมบางบริเวณพบว่าเป็นแบบอนุรักษ์ในระดับชนิดในสัตว์กลุ่มหนึ่ง แต่อาจพบความแปรปรวนมากภายในชนิดของสัตว์กลุ่มอื่น [14-16] แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีพีซีอาร์ด้วยยีนโกรทฮอร์โมนที่อยู่ในนิวเคลียสลิงจีโอที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ กับบริเวณของ D-loop ในไมโทคอนเดรียลิงจีโอที่มีรายงานศึกษามาก่อนว่าตรวจพบดีเอ็นเอของหมูปนกับดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ในระดับต่ำสุด คือ ร้อยละ (v/v)

0.1 [16] จะเห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นนี้มีประสิทธิภาพมากกว่าและใกล้เคียงกับวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ที่ใช้ความจำเพาะของโพรบชนิด *hydrolysis probe* ร่วมกับไพรเมอร์ที่เข้าจับในบริเวณยีน *cytochrome b* ซึ่งตรวจดีเอ็นเอของหมูในตัวอย่างได้ถูกต้องทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอหมูต่ำสุดประมาณร้อยละ 0.001-0.01 [17]

ผลการทดสอบการใช้ได้ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนโกรทฮอร์โมนด้วยวิธีพีซีอาร์กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและอาหารฮาลาลที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า โดยสุ่มเลือกผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบ จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ หมูยอกุนเชียง ไส้กรอก แฮม และหมูหยอง และอาหารฮาลาล 5 ตัวอย่าง คือ ซุปไข่ผสมผักโขม แกงมัสมั่นไก่กระป๋อง ปลากระป๋อง หอยลายกระป๋อง และโจ๊กข้าวโอ๊ต ผลการทดสอบพบว่าวิธีพีซีอาร์มีความจำเพาะสูง ให้ผลบวกของแถบดีเอ็นเอขนาด 105 คู่เบส ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีส่วนประกอบของเนื้อหมูทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (Figure 6) ทั้งนี้ในตัวอย่างไส้กรอกหมู พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จางกว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปชนิดอื่นที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนผสม (Figure 6; pork sausage) อาจเนื่องมาจากตัวอย่างไส้กรอกหมูที่นำมาศึกษาซึ่งใช้น้ำหนักเนื้อสุก 4 กรัม เท่ากับตัวอย่างอื่นๆ นั้น มีส่วนผสมของไขมันหรือวัตถุดิบอื่น เช่น โซเดียมไนไตรต์ ในปริมาณมาก หรืออาจใช้ไส้เทียมที่เป็นโปรตีนคอลลาเจนจากหนังสัตว์เป็นส่วนประกอบ จึงอาจมีไขมัน โปรตีนคอลลาเจน หรือไนไตรต์ เป็นต้น คงเหลือตกค้างอยู่ในดีเอ็นเอที่ขจัดออกไม่หมดในขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ ส่งผลให้ลดประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ [18] และการตรวจพบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายในอาหารฮาลาล จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ แกงมัสมั่นไก่กระป๋อง และปลากระป๋อง แต่ไม่มีผลผลิตจากอาหารฮาลาลชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (Figure 7) อาจเป็นไปได้ที่มีดีเอ็นเอของหมูปนเปื้อนในกระบวนการผลิต เช่น ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ การใช้เครื่องมือ หรือภาชนะบรรจุ เป็นต้น

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

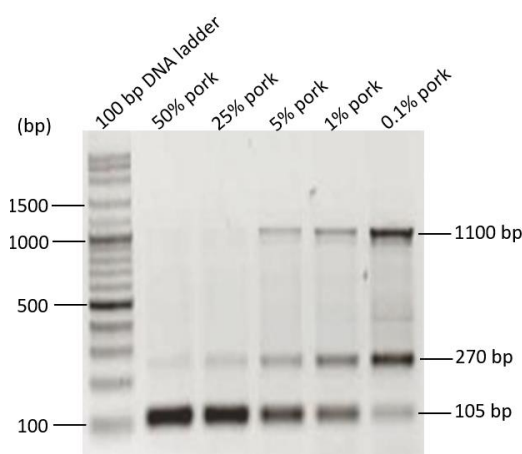
<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431



อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันประสิทธิภาพด้านความแม่นยำและความไวของเทคนิคพีซีอาร์และความจำเพาะของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้ ควรมีการวิจัยต่อยอดเพิ่มเติมกับชนิดและจำนวนตัวอย่างของเนื้อสัตว์ อาหารฮาลาล และผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลายมากขึ้น โดยเฉพาะเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีส่วนผสมของเนื้อแพะ แกะ และกวาง เป็นต้น ซึ่งไพรเมอร์อาจเข้าจับได้กับบางส่วนบนสายดีเอ็นเอ และหากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเท่ากับหรือใกล้เคียงกับของหมู คือ 105 คู่เบส จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้เกิดการแปรผลผิดพลาดได้ รวมทั้งควรเพิ่มการทดสอบเทียบเคียงกับวิธีพีซีอาร์ที่ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) ที่จะตรวจวัดสารพันธุกรรมของหมูในเชิงปริมาณได้ถูกต้องและแม่นยำ

วิธีพีซีอาร์สามารถนำมาใช้ตรวจสอบอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารได้แม้มีดีเอ็นเอเสียสภาพและ

คงเหลืออยู่น้อย ซึ่งเกิดจากกระบวนการผลิตและขั้นตอนการแปรรูปอาหาร อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในงานอื่น เช่น ทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อระบุตัวลักษณะ หรือตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดัดแปลงพันธุกรรมได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบเคียงกับเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในยุคปัจจุบันซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการใช้สารเรืองแสงเพื่อติดตามปฏิกิริยาที่กำลังดำเนินอยู่จะใช้เวลาตรวจสอบสั้นกว่า และถูกพัฒนาให้มีความจำเพาะและความไวมากขึ้น ดังตัวอย่าง [19] ใช้บริเวณยีน *cytochrome b* ขนาด 119 คู่เบส ร่วมกับ TaqMan® probe สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของวัวได้อย่างจำเพาะ และมีความไวแม้มีดีเอ็นเอในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปในระดับต่ำที่ร้อยละ (w/w) 0.002 เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิมที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ แต่เทคนิคพีซีอาร์มีข้อดีที่วิธีการทำง่าย ใช้เครื่องมือสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีราคาถูก และปฏิกิริยาพีซีอาร์สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์



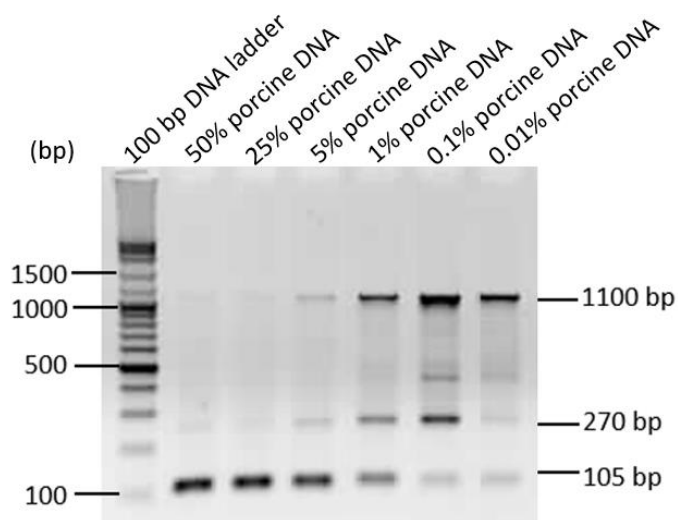
**Figure 4** Detection of a species-specific 105-bp porcine DNA of pork in beef meat stained with ethidium bromide in 1 % agarose gel. Beef-pork binary admixtures in different pork percentages (w/w) at 50, 25, 5, 1, and 0.1 (25, 12.5, 2.5, 0.5, and 0.05 ng, respectively) were examined, where decreasing intensity represents the decreasing pork concentration. Off-target DNA bands, approximately 270 and 1,100 bp, were present in mixed beef-pork samples, where increasing intensity represents the increasing beef concentration. Electrophoresis was performed for 45 min at 75 V in a 1XTBE buffer. VC 100 bp Plus DNA (250 ng) was used as a DNA marker.

\*Corresponding author e-mail: chuta@bua.ac.th

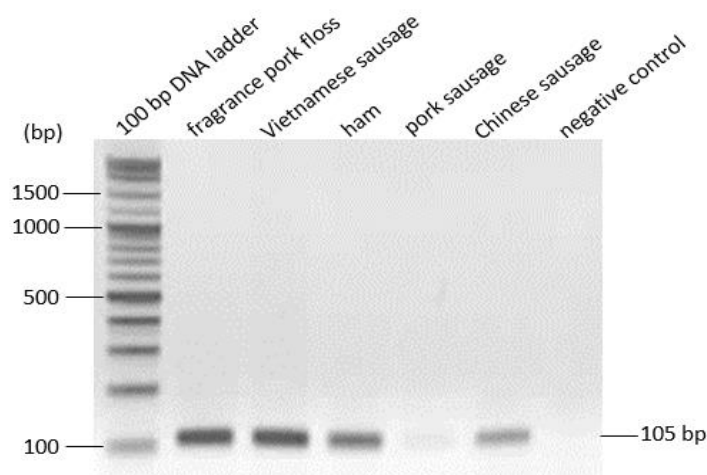
<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวช คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431



**Figure 5** Detection of a species-specific 105-bp porcine DNA at different concentrations stained with ethidium bromide in 1 % agarose gel. Bovine-porcine DNA binary admixtures in different porcine DNA percentages (v/v) at 50, 25, 5, 1, 0.1, and 0.01 (25, 12.5, 2.5, 0.5, 0.05, and 0.005 ng, respectively) were examined. Decreasing DNA band intensity represents reducing porcine DNA in a bovine-porcine mixture. Off-target DNA bands, approximately 270 and 1,100 bp, were present in mixed bovine-porcine DNAs, where increasing intensity represents the increasing bovine DNA concentration. Electrophoresis was performed for 45 min at 75 V in a 1XTBE buffer. VC 100 bp Plus DNA (250 ng) was used as a DNA marker.



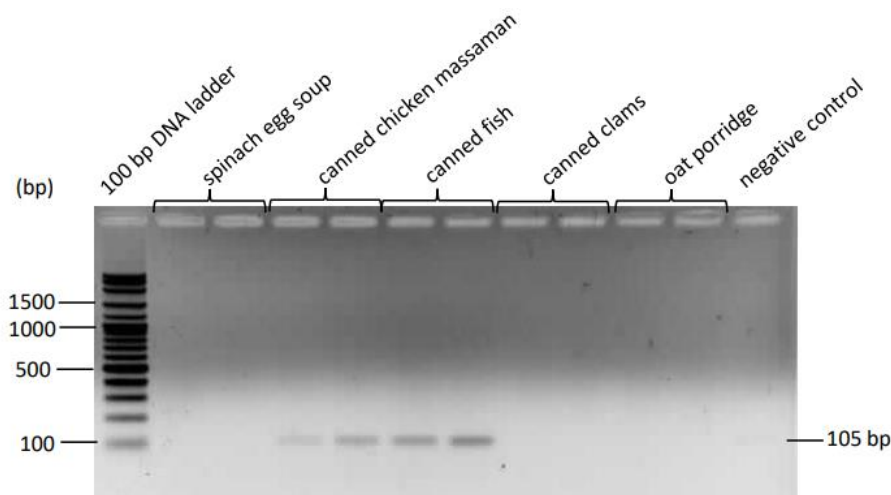
**Figure 6** Detection of a specific 105-bp porcine DNA stained with ethidium bromide in 1 % agarose gel. The amplicons were present on all pork-based products (fragrance pork floss, Vietnamese sausage, ham, pork sausage, and Chinese sausage), but no amplified products in the negative control (no DNA template). Electrophoresis was performed for 45 min at 75 V in a 1XTBE buffer. VC 100 bp Plus DNA (250 ng) was used as a DNA marker.

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกซ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431



**Figure 7** Detection of a specific 105-bp porcine DNA taken from halal foods and food products. The amplicons were present in 2 halal foods; canned chicken massaman curry and canned fish. Each sample was processed in duplicate. Electrophoresis was performed for 45 min at 75 V in a 1XTBE buffer. VC 100 bp Plus DNA (250 ng) was used as a DNA marker.

## สรุปผล

คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากบริเวณอินทรอนของยีนไมโทคอนเดรียของหมู ขนาด 105 คู่เบส ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนดีเอ็นเอของหมูและของหมูป่าในอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหารได้ ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและมีความไว สามารถทำซ้ำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่ายโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง โดยวิธีพีซีอาร์ให้ผลบวกที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส วิธีพีซีอาร์มีความไวสูง ตรวจสอบได้กับเนื้อผสมที่มีเนื้อหมูต่ำสุดร้อยละ (w/w) 0.1 (0.05 นาโนกรัม) และกับดีเอ็นเอผสมที่มีดีเอ็นเอของหมูต่ำสุดร้อยละ (v/v) 0.01 (0.005 นาโนกรัม) และเมื่อทำการศึกษาเพื่อยืนยันการใช้ได้ของเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้โดยทดสอบกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและอาหารฮาลาลที่มีจำหน่ายในห้างสรรพสินค้า จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าวิธีพีซีอาร์ให้ผลบวกทั้งหมดกับผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีเนื้อหมูเป็นส่วนประกอบ และพบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอหมูในอาหารฮาลาล จำนวน 2 ตัวอย่าง ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอและวิธีพีซีอาร์ที่

พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบอาหารฮาลาลและผลิตภัณฑ์อาหารที่มีดีเอ็นเอของหมูปนเปื้อนได้

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-pérez M.J. and Pérez-Martos, A. (2000). Direct and highly species specific detection of pork meat and fat in meat product by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2829-2832.
- [2] Lubis, H.N., Mohd-Naim, N.F., Alizul, N.N. and Ahmed, M.U. (2016). From market to food plate: Current trusted technology

\*Corresponding author e-mail: chuta@bua.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

- and innovations in halal food analysis. Trends in Food Science & Technology. 58: 55-68. doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.024.
- [3] Ren, Y., Li, X., Liu, Y., Yang, L., Cai, Y., Quan, S. and Chen, S. (2017). A novel quantitative real-time PCR method for identification and quantification of mammalian and poultry species in foods. Food Control. 76: 42-51. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.01.003.
- [4] National Statistical Office, Ministry of Digital Economy and Society. (2017). Statistical Yearbook Thailand 2017. [Online] Available from <http://service.nso.go.th/nso/nsopublish/pubs/e-book/SYB-2021/index.html>. [Accessed June 30, 2022] (in Thai).
- [5] Jones, S.J. and 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.
- [6] Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G. and 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.
- [7] Paiva-Cavalcanti, M., Regis-da-Silva, C.G. and Gomes, Y.M. (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection: a mini-review. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 16(4): 537-542.
- [8] Zdeňková, K., Akhatova, D., Fialová, E., Krupa, O., Kubica, L., Lencová, S. and Demnerová, K. (2018). Detection of meat adulteration: use of efficient and routine-suited multiplex polymerase chain reaction-based methods for species authentication and quantification in meat products. Journal of Food and Nutrition Research. 57(4): 351-362.
- [9] Carrel, A.L. and Allen, D.B. (2000). Effects of growth hormone on body composition and bone metabolism. Endocrine. 12(2): 163-172. doi:10.1385/ENDO:12:2:163.
- [10] Ma, Q., Liu, S.F., Zhuang, Z.M., Lin, L., Sun, Z.Z., Liu, C.L., Ma, H., Su, Y.Q. and Tang, Q.S. (2012). Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Gene. 493(1): 92-104.
- [11] Meeker, N.D., Hutchinson, S.A., Ho, L. and Trede, N.S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. Huntsman Cancer Institute. 43: 610-614.
- [12] Ni, J., You, F., Xu, J., Xu, D., Wen, A., Wu, Z., Xu, Y. and Zhang, P. (2012). Single nucleotide polymorphisms in intron 1 and intron 2 of *Larimichthys crocea* growth hormone gene are correlated with growth traits. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 30(2): 279-285.
- [13] Meyer, R., Candrian, U. and Luthy, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. Journal of AOAC International. 77: 617-622.

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431

- [14] Intalaw, S., Poopat, L. and Poopat, T. (2012). Identification of *Sus domestica*'s DNA by analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. Forensic medicine Journal 4(3): 304-311. (in Thai) Report. 10:2052. doi: 10.1038/s41598-020-59010-6.
- [15] Che Man, Y.B., Mustafa, S., Mokhtar, N.F.K., Nordin, R. and Sazili, A.Q. (2012). Porcine-specific polymerase chain reaction assay based on mitochondrial D-loop gene for identification of pork in raw meat. International Journal of Food Properties. 15: 134-144.
- [16] Che Man, Y.B., Aida, A.A., Raha, A.R. and Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. Food Control. 18: 885-889.
- [17] Jitnupong, W., Rungmee, S., Penchan, N. and Thalungraung, W. (2011). Pork detection method by real time PCR. In Kasetsart University, (ed). Proceedings of 49<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry, pp 665-672. February 1-4, 2011. Bangkok, Thailand (in Thai).
- [18] Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology. 113(5): 1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- [19] Chen, X., Lu, L, Xiong, X., Xiong, X. and Liu, Y. (2020). Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products. Scientific

\*Corresponding author e-mail: chuta@buu.ac.th

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยมหิตลไวกวัก คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

<sup>3</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 201431