การพัฒนาการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์เนื้อสัตว์ใน หมู ไก่ วัว ควาย และสุนัข โดยการตรวจสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR

นิตยา พันธุ์บัว ปวีณา พานิชกุล และจุรีภรณ์ บุณยวงศ์วิโรจน์
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้พัฒนาการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction สำหรับตรวจหายีนจำเพาะของ หมู (Porcine) ไก่ (CR-LINE) และสุนัข (canis-mitochondria D-loop segment) และวิธี Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของ Cytochrome b ขนาด 359 bp แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะของ หมู ไก่ วัวควาย โดยเฉพาะกรณีวัวและควายที่ตรวจด้วย Cytochrome b จะต้องตรวจยืนยันต่อไปด้วยยีน Bovine specific (CA) เสมอ การทดสอบความไวและความจำเพาะของการตรวจจากดีเอ็นเอ ของหมู และไก่ และวัวควาย และสุนัขจากยีนทุกชนิดพบว่าให้ผล specificity และ sensitivity เป็น 100% และเมื่อนำวิธีตรวจวิเคราะห์ไปใช้ในการตรวจการปลอมปนของเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกลูกชิ้น พบว่าสามารถตรวจพบการปลอมปนของเนื้อสัตว์อื่นในอาหารได้ แสดงว่าวิธีตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธี PCR ที่เลือกใช้มีประสิทธิภาพดีสามารถใช้ตรวจชนิดเนื้อสัตว์ได้

บทนำ

อาหารมีส่วนประกอบต่างๆ จากวัตถุดิบหลายชนิดใช้ในการผลิต การที่จะทราบได้ว่าส่วนประกอบที่ใช้เป็นไปตามที่ระบุไว้หรือจดแจ้งไว้ในฉลากหรือสูตรของอาหารนั้น ได้มีวิธีการตรวจพิสูจน์ที่เรียกว่า Food Authenticity เริ่มจากการตรวจสอบไปที่สายพันธุ์ของพืชหรือสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต เพื่อป้องกันการปนปลอมทั้งโดยตั้งใจและโดยบังเอิญ การตรวจสอบนี้เนื่องมาจากความต้องการทั้งในด้านความเชื่อทางศาสนา เช่น การตรวจอาหารฮาลาล รวมทั้งเหตุผลทางสาธารณสุข[1] อาหารประเภทเนื้อสัตว์มีราคาสูงและมีโอกาสปลอมปนได้ง่ายเมื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกชิ้น ไส้กรอก หมูยอ ไก่ยอ นอกจากนี้การตรวจพิสูจน์เนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารได้เริ่มมีความสำคัญแพร่หลาย สาเหตุเนื่องจากการเกิดโรควัวบ้าในปี 1986 ทำให้มีการเฝ้าระวังกันมากขึ้น[2] นอกจากนี้ในต่างประเทศความต้องการทราบชนิดที่แท้จริงของเนื้อสัตว์แต่ละประเภทเกิดจากราคาเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน บางชนิดมีราคาสูงมาก อีกทั้งเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้บริโภคอาหารตามที่ต้องการซื้อจริง ป้องกันการหลอกลวงผู้บริโภคในกรณีที่สินค้าไม่ตรงกับที่ระบุในฉลาก การตรวจพิสูจน์ชนิดของเนื้อสัตว์มีหลายวิธีการทั้งการตรวจองค์ประกอบของสารเคมีโปรตีนและสารพันธุกรรม วิธีที่นิยมใช้ตรวจคือวิธี ELISA เป็นการตรวจโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกแต่ไม่เหมาะกับการตรวจในตัวอย่างที่มีกระบวนการผลิตที่ใช้ความร้อนสูง

Accepted for publication, 15 July 2008

เพราะโปรตีนถูกทำลาย ในขณะที่วิธีการตรวจสารพันธุกรรมโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และวิธี Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) เป็นวิธีการตรวจสารพันธุกรรมที่จำเพาะของสัตว์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กลงที่จำเพาะกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การตรวจดีเอ็นเอนี้เป็นวิธีหนึ่งที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง[3] ในปัจจุบันนิยมใช้การตรวจสารพันธุกรรมโดยมีการผลิตชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อตรวจชนิดของสัตว์ออกมาจำหน่ายแล้ว แต่ยังมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ในการตรวจสารพันธุกรรมของหมู วัว ไก่ และสุนัขในอาหารเพื่อใช้ตรวจสอบอาหารโดยไม่ต้องใช้ชุดทดสอบซึ่งมีต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างสูง

ตลาดการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะในประเทศทางยุโรปและอเมริกา เริ่มมีความต้องการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอาหารว่ามีการปนปลอมของเนื้อสัตว์ต่างจากที่แจ้งไว้ในฉลากมากขึ้น การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้จะเป็นประโยชน์สามารถช่วยผู้ประกอบการผลิตอาหาร ผู้ส่งออกสินค้า ผู้บริโภคที่นับถือศาสนาที่แตกต่างกันและมีข้อกำหนดในการบริโภคที่แตกต่างกัน เช่น ผู้บริโภคที่รับประทานอาหารเจ ผู้บริโภคที่รับประทานอาหารฮาลาล ได้ทราบชนิดอาหารที่แท้จริง อีกทั้งยังเป็นการช่วยผู้บริโภคที่มีอาการภูมิแพ้จากเนื้อสัตว์บางชนิดสามารถทราบได้ว่าอาหารที่บริโภคมีสารที่ผู้บริโภคแพ้ปะปนอยู่ด้วยหรือไม่

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

หมู (เนื้อหมู ตับ ม้าม ไส้อ่อน ของหมู) 30 ตัวอย่าง วัว (เนื้อวัว ตับวัว) 30 ตัวอย่าง ไก่ (เนื้อไก่ ตับไก่) 30 ตัวอย่าง และหมึก (หมึกกล้วย หมึกกระดอง หมึกสาย) 10 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนมกราคม-กรกฎาคม 2549 ลูกชิ้นเนื้อและลูกชิ้นหมู 10 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกันยายน 2550 และสุนัข (เนื้อสุนัขและเลือดสุนัข) 6 ตัวอย่าง จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

เก็บตัวอย่างที่วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ -20˚C ตลอดช่วงการทดสอบ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Thermal cycler PTC200, Centrifuge ขนาด 50 มล. และ 1.5 มล., UV Spectrophotometer ที่ 260 และ 280 nm, ชุดถ่ายภาพเจล, Electrophoresis chamber, Heat block, wizard column, Pipette ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร, 1-20 ไมโครลิตร, 10-100 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร, 100-1000 ไมโครลิตร พร้อม filter tips, thin wall PCR tube ขนาด 0.2 มล., Reaction tube ขนาด 0.6, 1.5, 2.0 มล. และ thermal paper

สารเคมี

Extraction buffer, wizard resin., proteinase K, guanidine HCl, Tris HCl, Isopropanol, chloroform, PCR reagent, agarose gel, ethidium bromide, enzyme restriction คือ *Alu* I, *Hinf* I, *Hae* III และ *Dra*III.

วิธีตรวจวิเคราะห์

การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนที่ได้โดย gel electrophoresis และการตรวจยืนยันผลโดยวิธี enzyme restriction มีขั้นตอนดังนี้

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ 4 ชนิด คือ หมู (เนื้อหมู ตับหมู ม้ามหมู ไส้หมู) วัว ควาย (เนื้อวัว ตับวัว) ไก่ (เนื้อไก่ เครื่องในไก่) ชนิดละ 30 ตัวอย่าง หมึก (หมึกกล้วย หมึกกระดอง หมึกสาย) 10 ตัวอย่าง และสุนัข (เนื้อสุนัข และเลือดสุนัข) 6 ตัวอย่าง และลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นเนื้อจำนวน 10 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยทำตามวิธีสกัดดีเอ็นเอจาก ISO 21571: 2005 Foodstuffs-Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Nucleic acid extraction[2] จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ที่ได้ด้วย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260/280 nm

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

เพื่อตรวจหา หมู ไก่ วัว และสุนัขในตัวอย่าง ดังนี้

- เจือจางดีเอ็นเอที่ได้ในปริมาณ 25 ng/µl ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะแต่ละชนิดของสัตว์ที่ต้องการทดสอบโดยวิธี PCR โดยปฏิบัติตามวิธีที่ระบุใน PCR protocol 2nd edition.(3)
- ทำการตรวจหาดีเอ็นเอ ของหมู ไก่ วัว และสุนัข โดยใช้ primer, PCR mixture และ time-temperature condition (5-8) ดังตารางที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 1 ขนาดของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบตามชนิดของเนื้อสัตว์

ชนิด	DNA region	Primer	ขนาดของ PCR product/base pair (bp)
หมู ไก่ วัว ควาย และสุนัข	cyt b	CYTb1-f : 5' - CCA TCC AAC ATC TCA gCA TgA TgA AA-3' CYTb2-r : 5' - gCC CCT CAg AAT gAT ATT TgT CCT CA - 3'	359
หมู	Porcine	Porc f : 5' - ggA TCC ggC ATT gCC gTT Ag-3' Porc-r : 5' - gTC TTT TTT TgC CAT TTC TTg g-3'	171
ไก่	CR-LINE	CR1-f: 5' - ATA gAA TCA TAg AAT ggC CTg-3' CR2-r: 5' - TTT TCA CAC AgA ggg Tgg Tg-3'	201
สุนัข	Canis D-loop	CanisD F: 5' - TCC Agg TAA ACC CTT CTT - 3' CanisD R: 5' - TAC gAg CAA ggg TTg ATg g - 3'	213
วัว ควาย	CA	CA03-f : 5'- CTC CCg Agg gAT gCg TCC TAg g - 3' CA04-r : 5' - TTC TgC TCC CCT AAC CAC ATC CC - 3'	130

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ PCR mixture ที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

PCR mixture	*Cytb1/CA* Concentration	Porc Concentration	CR Concentration	k-9 Concentration
10x buffer + 15 mM $MgCl_2$	1x	1x	1x	1x buffer
25 mM $MgCl_2$	2.0 mM	1.5 mM	2.0 mM	2 mM
Enchancing agent	100 ng BSA	0.1%Triton-x	1000 ng BSA	-
5 mM dNTP	0.4 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
10 µM primer-1	1.0 µM	0.4 µM	0.3 µM	0.2 µM
10 µM primer-2	1.0 µM	0.4 µM	0.3 µM	0.2 µM
5U/µl DNA taq polymerase	1 U	0.5 U	0.5 U	0.5 U
DNA template	50ng	50ng	50ng	50ng

ตารางที่ 3 time-temperature PCR condition ของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบแต่ละชนิดโดยใช้เครื่อง ThermalCycler MJ PTC-200

PCR mixture	Time-temp for PCR amplification			
	Cytb1/ CA Concentration	Porc Concentration	CR Concentration	k-9 Concentration
- DNA denaturation	94°C for 10 min	94°C for 10 min	94°C for 10 min	94°C for 10 min
- Amplification				
- denature (40 cycles)	94 °C for 5s	94 °C for 5s	94 °C for 5s	94 °C for 5s
- annealing (40 cycles)	53 °C for 30s	53 °C for 30s	53 °C for 30s	53 °C for 30s
- extension (40 cycles)	72 °C for 40s	72 °C for 40s	72 °C for 40s	72 °C for 40s
- Final extension	72 °C for 3 min	72 °C for 3 min	72 °C for 3 min	72 °C for 3 min
- Cooling phase	4 °C forever	4 °C forever	4 °C forever	4 °C forever

การตรวจสอบ PCR-product โดยวิธี gel electrophoresis

นำ PCR-product ที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis (2% agarose in 1xTAE, 100V ~ 30 นาที) เพื่อทราบขนาดของ PCR-product ตามที่ระบุใน Molecular cloning. A Laboratory Manual 3rd edition.[9] ตรวจสอบขนาดเทียบกับตารางที่ 1

การตรวจสอบยืนยัน PCR-product โดยวิธี enzyme restriction โดยวิธี gel electrophoresis (4 % agarose in 1xTAE, 100V ~ 30-45 นาที)[9] PCR product ของ Cyt b ตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Alu* I, *Hinf* I, *Hae* III และ CA ใช้ restriction enzyme DraIII

การทดสอบหาค่า sensitivity และ specificity ของการตรวจเนื้อสัตว์แต่ละชนิด

ทดสอบความไว (sensitivity) ของ primer ที่ใช้ตรวจดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดโดยทดสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 50 ng/rxn กับ primer ต่าง ๆ ดังนี้

- Cyt b ทดสอบในหมู (เนื้อหมู ตับ ม้าม ไส้อ่อน ของหมู)/ไก่ (เนื้อไก่ เครื่องใน ของไก่) และเนื้อวัว ตับวัว ทำการทดสอบชนิดละ 30 ตัวอย่าง
- porcine ทดสอบในเนื้อหมู ตับ ม้าม ไส้อ่อน ของหมู ทำการทดสอบ 30 ตัวอย่าง
- CR ทดสอบในเนื้อไก่ และเครื่องในไก่ ทำการทดสอบ 30 ตัวอย่าง
- CA ทดสอบในเนื้อวัว และเครื่องในวัว ทำการทดสอบ 30 ตัวอย่าง
- canis D-loop ทดสอบในเนื้อสุนัข เลือดของสุนัข ทำการทดสอบ 6 ตัวอย่าง

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer Cyt b/porcine/CR/canis D-loop ที่ใช้ตรวจดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดโดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng/rxn แต่ละ primer ทดสอบในหมู (เนื้อ ตับ ม้าม ไส้อ่อน) 30 ตัวอย่าง/ไก่ (เนื้อ เครื่องใน) 30 ตัวอย่าง/วัว ควาย (เนื้อ ตับ ของวัว) 30 ตัวอย่าง/สุนัข (เนื้อและเลือด) 6 ตัวอย่าง และปลาหมึก 10 ตัวอย่าง

การทดสอบการใช้วิธีตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอหมู วัว ควาย ไก่ และสุนัขในตัวอย่างอาหาร

ทดสอบโดยใช้ตัวอย่างลูกชิ้นที่จำหน่ายในท้องตลาดที่ระบุในฉลากเป็นลูกชิ้นเนื้อวัวและเนื้อหมู จำนวน 10 ตัวอย่าง

ผล

การวิเคราะห์ยีนเพื่อตรวจสอบชนิดของสัตว์จำพวก หมู วัว ควาย และไก่ โดยตรวจยีน Cytb ขนาด 359 bp ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดในการแปรผลคือ *Alu* I, *Hinf* I และ Hae III โดยที่ ดีเอ็นเอของหมูจะถูกย่อยด้วย *Alu* I ได้ดีเอ็นเอขนาด 244 และ 115 bp เมื่อย่อยด้วย *Hae* III ได้ดีเอ็นเอ 3 ชิ้นส่วนขนาด 153 bp 132 bp และ 74 bp และไม่ถูกย่อยด้วย *Hinf* I สำหรับวัว ควายเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ได้ดีเอ็นเอขนาด 190 bp และ 169 bp เมื่อย่อยด้วย *Hinf* I ได้ดีเอ็นเอขนาด 198 bp และ 117 bp และเมื่อย่อยด้วย *Hae* III ได้ดีเอ็นเอขนาด 285 bp และ 74 bp สำหรับไก่จะไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Alu* I แต่เมื่อย่อยด้วย *Hinf* I ได้ดีเอ็นเอ 3 ชิ้นส่วนขนาด 188 bp 161 bp และ 10 bp และเมื่อย่อยด้วย *Hae* III ได้ดีเอ็นเอขนาด 159 bp 126 bp และ 74 bp

ในกรณีของวัว ควาย เมื่อตรวจด้วย cytb แล้วยังต้องตรวจยืนยันด้วยยีน CA ที่ขนาด 130 bp และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* III จะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 65 bp จึงแปลผลว่าเป็นวัว ควายได้ ส่วนการตรวจยีนจำเพาะของหมู ไก่ และสุนัขด้วยยีน porcine ยีน CR-LINE และ Canis D-loop จะได้ขนาดดีเอ็นที่ 171 bp 201 bp และ 213 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 1-2)

ทดสอบหาความไวและความจำเพาะของการตรวจยีนแต่ละชนิด คำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\%\text{specificity} = \frac{\text{ผลลบจริง} \times 100}{(\text{ผลบวกปลอม} + \text{ผลลบจริง})}$$

$$\%\text{Sensitivity} = \frac{\text{ผลบวกจริง} \times 100}{(\text{ผลบวกจริง} + \text{ผลลบปลอม})}$$

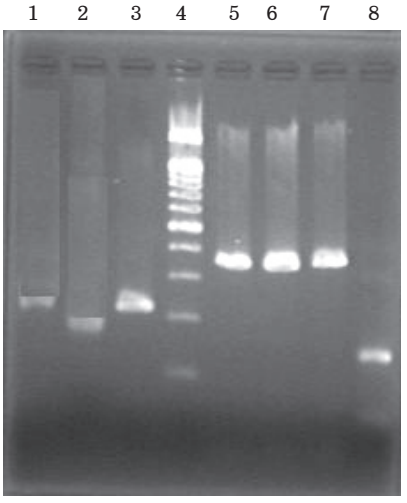
พบว่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบยีนทุกชนิดถึง Cyt b, Porcine, CR-LINE และ Canis D-Loop ได้ผลเป็น 100% (ตารางที่ 5)

ผลการตรวจดีเอ็นเอ หมู วัว ควาย ไก่ และสุนัขในตัวอย่างลูกชิ้น 10 ตัวอย่าง พบว่ามีการปะปนของเนื้อสัตว์หลายชนิดในบางตัวอย่าง และพบว่าการระบุฉลากไม่ตรงกับที่ตรวจพบดีเอ็นเอแต่ไม่พบการปลอมปนของเนื้อสุนัขในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 การแปรผลการตรวจชนิดของเนื้อสัตว์โดยวิธี PCR และ PCR-RFLP

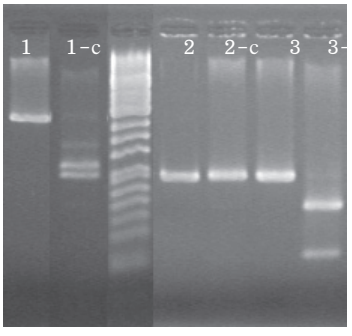
DNA region	ขนาด PCR product(bp)	Enzyme restriction	DNA fragment form restriction (bp)	ชนิดของสัตว์ที่ตรวจพบ
		Alu I	244, 115 bp	หมู
		Hinf I	359	
		Hae III	153, 132, 74	
		Alu I	190, 169	วัว ควาย*
cyt b	359	*Hinf* I	198, 117	
		Hae III	285, 74	
		Alu I	359	
		Hinf I	188, 161, 10	
		Hae III	159, 126, 74	
Porcine	171	-		หมู
CR-LINE	201	-		ไก่
Canis D-loop	213	-		สุนัข
CA	130	*Dra* III	65, 65	วัว ควาย

* เป็นการตรวจเบื้องต้น ต้องตรวจยืนยันผลต่อด้วยยีน CA

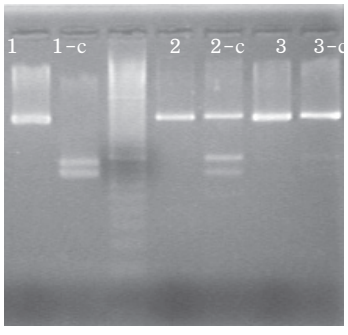


Lanel 1 CR (ไก่)
Lanel 2 pork (หมู)
Lanel 3 K-9 (สุนัข)
Lanel 4 100 bp DNA ladder
Lanel 5 Cyt b (ไก่)
Lanel 6 Cyt b (หมู)
Lanel 7 Cyt b (วัว)
Lanel 8 CR (วัว)

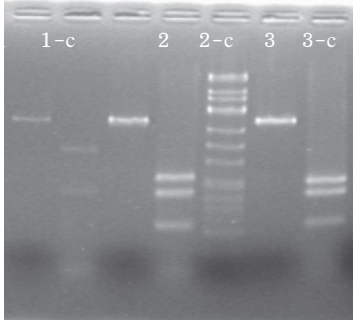
ภาพที่ 1 ผลของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ primer จำเพาะสำหรับเนื้อไก่ หมู สุนัข วัว ควาย โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder



Primer : Cyt-b
Sample : 1 = beef, 2 = chicken, 3 = pork
Digested with : *Alu* I = 1-c, 2-c, 3-c



Primer : Cyt-b
Sample : 1 = chicken, 2 = beef, 3 = pork
Digested with : *Hinf* I = 1-c, 2-c, 3-c



Primer : Cyt-b
Sample : 1 = beef, 2 = chicken, 3 = pork
Digested with : *Hae* III = 1-c, 2-c, 3-c

ภาพที่ 2 ผลของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ primer Cyt-b สำหรับเนื้อสัตว์แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ตารางที่ 5 ผลการหา sensitivity และ specificity ของยีนที่ตรวจสอบตามชนิดของเนื้อสัตว์ (ต่อ)

ชนิดของยีน	เนื้อสัตว์ที่ใช้ทดสอบ	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ	จำนวนตัวอย่างที่แสดงผล		Specificity/ sensitivity
			ผลบวก	ผลลบ	
Cyt b	หมู (เนื้อ ตับ ม้าม ไส้อ่อน)	30	30	0	Spec = 100%
	ไก่ (เนื้อ เครื่องใน)	30	30	0	Sens = 100%
	วัว ควาย (เนื้อ ตับ ของวัว)*	30	30	0	
	ปลาหมึก	10	0	10	
Porcine	หมู (เนื้อ ตับ ม้าม ไส้อ่อน)	30	30	0	Spec = 100%
	ไก่ (เนื้อ เครื่องใน)	30	0	30	Sens = 100%
	วัว ควาย (เนื้อ ตับ ของวัว)	30	0	30	
	สุนัข (เนื้อ เลือด)	6	0	6	
	ปลาหมึก	10	0	10	
CR	หมู (เนื้อ ตับ ม้าม ไส้อ่อน)	30	0	30	Spec = 100%
	ไก่ (เนื้อ เครื่องใน)	30	30	0	Sens = 100%
	วัว ควาย (เนื้อ ตับ ของวัว)	30	0	30	
	สุนัข (เนื้อ เลือด)	6	0	6	
	ปลาหมึก	10	0	10	
CanisD-LOOP	หมู (เนื้อ ตับ ม้าม ไส้อ่อน)	30	30	0	Spec = 100%
	ไก่ (เนื้อ เครื่องใน)	30	0	30	Sens = 100%
	วัว ควาย (เนื้อ ตับ ของวัว)	30	0	30	
	สุนัข (เนื้อ เลือด)	6	0	6	
	ปลาหมึก	10	0	10	

* ต้องตรวจยืนยันด้วย CA แล้วให้ผลบวก

ตารางที่ 6 ผลการตรวจลูกชิ้นเนื้อและลูกชิ้นหมูด้วย primer PORC, CR, K9 และ Cytochrome b

No. ชนิด	Primer ที่ใช้ตรวจ						
	PORC	CR	K9	Cytochrome b			
				Beef	Pork	Chicken	Canine
ลูกชิ้นเนื้อ	−	−	+	+	+	−	−
ลูกชิ้นเนื้อ*	+	+	−	−	+	+	−
ลูกชิ้นเนื้อ	+	+	−	+	+	+	−
ลูกชิ้นเนื้อ	−	+	−	+	−	+	−
ลูกชิ้นเนื้อ	−	−	−	+	−	−	−
ลูกชิ้นหมู	+	+	−	−	+	+	−
ลูกชิ้นหมู	+	+	−	−	+	+	−
ลูกชิ้นหมู	+	+	−	−	+	+	−
ลูกชิ้นหมู	+	+	−	−	+	+	−
ลูกชิ้นหมู	+	−	−	−	+	−	−

หมายเหตุ ตัวอย่างระบุเป็นลูกชิ้นเนื้อ แต่ตรวจดีเอ็นเอไม่พบจากวัว ควาย พบดีเอ็นเอของหมูและไก่

วิจารณ์

จากการพัฒนาวิธีการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารโดยวิธี PCR และ PCR-RFLP สามารถตรวจหา DNA จำเพาะของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดได้ โดยพบว่า การใช้ยีน cytochrome b ตรวจหาเนื้อหมู เนื้อไก่ และวัว ควาย สามารถใช้ตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีความไวและความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ 100% แต่การตรวจหา วัว ควาย ต้องตรวจยืนยันด้วยยีน CA เสมอ ถ้าผลของยีน Cyt b เป็นผลบวกแต่ CA เป็นผลลบจะไม่สามารถแปรผลว่าเป็นดีเอ็นเอจาก วัว ควาย ได้ ทั้งนี้

การใช้ Cyt b ยังไม่สามารถแยกวัวและควายได้ โดย Cyt b เป็น mitochondria DNA ที่สามารถพบได้ในสัตว์ การแยกชนิดจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (enzyme restriction) ตรงนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเพื่อแยกชิ้นส่วน DNA ให้มีขนาดเล็กลงแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งปกติ Cyt b DNA นี้ตรวจชนิดสัตว์ได้มากกว่า 22 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ[8]

ส่วนยีนจำเพาะของหมู ไก่ และสุนัขคือ Porcine, CR-LINE และ canis D-loop ให้ผล specificity และ sensitivity เป็น 100% เช่นกัน แสดงว่า primer ทั้งสามมีประสิทธิภาพเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ได้ดี คือไม่มีผลบวกปลอมจากสัตว์ที่ไม่จำเพาะกับ primer และไม่มีผลลบปลอมจากสัตว์ที่จำเพาะกับ primer นั้น จะเห็นได้ว่าการตรวจหมู และไก่ สามารถตรวจได้ด้วยยีน Cyt b (395 bp) และยีน Porcine, CR-LINE ขนาด 171 และ 201 bp ตามลำดับ แต่ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ใช้ความร้อนสูงจะมีการทำลายดีเอ็นเอจึงมีโอกาสได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และบริสุทธิ์ได้ยาก[11] ดังนั้นการใช้ Cyt b ตรวจในอาหารแปรรูปจึงยากกว่ายีน Porcine, CR-LINE ซึ่งมีขนาดสั้นกว่า ถ้าอาหารที่ตรวจมีดีเอ็นเอที่ไม่ถูกทำลายให้แตกหัก การใช้ Cyt b ก็จะสะดวก เพราะ primer เดียวสามารถตรวจสอบเนื้อสัตว์ได้หลายชนิดแต่การตรวจโดยวิธี PCR-RFLP ต้องเพิ่มขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงต้องใช้เวลาในการตรวจเพิ่ม ดังนั้นจึงขึ้นกับผู้ตรวจที่จะเลือก primer ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบการตรวจลูกชิ้นที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อทดสอบว่าวิธีการตรวจนี้สามารถตรวจหาการปะปนของเนื้อสัตว์ในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตมาแล้วได้ โดยพบว่ามีการปะปนของเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่ไม่ตรงกับที่ระบุในฉลาก คือการปะปนของเนื้อไก่และหมูในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อ ซึ่งโดยทั่วไปลูกชิ้นเนื้อหมายถึงผลิตจาก วัว ควาย แต่ในกรณีนี้ฉลากไม่ได้ระบุว่าลูกชิ้นเนื้อเป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ชนิดใด (ตารางที่ 6) แต่ไม่พบการปลอมปนเนื้อสุนัขแสดงว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์สามารถใช้ตรวจในอาหารที่มีการปะปนกันของเนื้อสัตว์ได้จริง ทั้งนี้ต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของดีเอ็นเอในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นต่อไปเพื่อรองรับชนิดของอาหารที่ผลิตจากเนื้อสัตว์อื่น รวมทั้งควรมีการสำรวจการปลอมปนเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ ทั้งการปะปนโดยไม่ตั้งใจหรือการปลอมปน เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค อีกทั้งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจในเชิงปริมาณเพื่อดูการปะปนซึ่งมีความสำคัญที่ต้องพัฒนาต่อไปอีกเช่นกัน

สรุป

การพัฒนาการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ชนิดของสัตว์โดยวิธีการตรวจสารพันธุกรรมเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถแยกชนิดของเนื้อสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม สามารถ

ใช้ตรวจอาหารได้ และสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจพิสูจน์อาหารจากเนื้อสัตว์หรือพืชชนิดอื่นที่หลากหลายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณสำนักวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้งบประมาณสนับสนุนในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้ ขอขอบคุณนางสาวจันทร์ฉาย แจ้งสว่าง อดีตผู้อำนวยการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุนในการพัฒนางาน นางสาวปิยนาถ ลีวิวัฒน์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9 ชช ส่วนมาตรฐานอาหาร ที่ช่วยประสานงาน และจัดหาสารควบคุมในการตรวจวิเคราะห์รวมทั้งเจ้าหน้าที่ผู้ร่วมงานทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Lees M. Food authenticity and traceability, New York: CRC Press; 2003 : p.34-40.
2. Yesilbag K, Kalkan A. Detection of central nervous system tissue as BSE specified risk material in meat products in Turkey. Food Control 2005; 16 : 11-13.
3. ISO 21571: 2005 Foodstuffs- Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction. 2005.
4. Bartlett MS. John and Stirling D., PCR protocol 2nd ed. New Jersey : Humana Press; 2003 : 89-9.
5. J.H. Calvo, P. Zaragoza, and R. Osta: Technical note : A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. J. Anim. Sci. 2001; 79 : 2108-12.
6. Gao H, Xu B, Liang C, Zhang Y, and Zhu L. Polymerase Chain Reaction Method to Detect Canis Materials by Amplification of Species-Specific DNA Fragment. AOAC 2004; 87(5) : 1195-9.
7. Tajima K, Enishi O, Amari M, Mitsumori M, Kajikawa H, Kurihara M, et al. PCR detection of DNAs of Animal Origin in Feed by Primers Based on Sequences of Short and Long Interspersed Repetitive Elements, Biosci. Biotechnol. Biochem 2002; 66 (10) : 2247-50.
8. Meyer R, HÖfelein C, LÜthy J, and Candrian U. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis : A Simple Method for Species Identification in Food. J AOAC Int. 1995; 82(4) : 1524-51.
9. Sambrook J. and Russell D.W. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001 : p. 5.2-17, 5.61-70.
10. Lipp M, Anklam E, Broadmann P, Pietsch K, Pauwels J. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. Food Control 1999; 10 : 379-383.
11. Mayer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 1999; 10 : 391-399.

The Development of Meat DNA Authentication in Pork Chicken, Cattle and Dog by Polymerase

Nittaya Phunbua Paveena Panichakul and Jureeporn Bunyawongvirot

Bvreau of Quality and Sajety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthabari 11000, Thailand.

ABSTRACT Meat authenticity identification from food ingredient was developed by Polymerase Chain Reaction method. The specific genes from pork (porcine), chicken (CR-LINE), and dog (canis mitochondria D-loop segment) were determined by PCR method. The PCR-RFLP was determined by using 359 bp of cytochrome b and then followed by specific enzyme restriction method to identify the specific DNA of pork, chicken, and cattle. The cattle DNA must be further confirmed by bovine specific gene (CA). The results of specificity and sensitivity of all detected genes from pork, chicken, cattle, and dog were 100%. And this identification can be used for meat ball identification. Then this identification method had effectiveness for meat authenticity identification.

Key words : Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism