

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล  
โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชั้นสูง



นายอาณัฐ เต๋นยิ่งโยชน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF FORBIDDEN ANIMAL DETECTION IN HALAL FOOD PRODUCTS  
BY USING HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS TECHNIQUE

Mr. Anat Denyinghot



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชุดสูง
โดย	นายอาณัฐ เต๋นยั้งโยชน์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ตะห์ลัน

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ตะห์ลัน)  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิมจงใจรัก)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร.มงคล เวสารัชเวศย์)

อำนวยการดำเนินงาน : การพัฒนาวิธีการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชัดสูง (DEVELOPMENT OF FORBIDDEN ANIMAL DETECTION IN HALAL FOOD PRODUCTS BY USING HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร.สุวิมล กิรติพิบูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.วินัย ดะห์ลัน, หน้า.

เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชัดสูง (High resolution melting analysis: HRMA) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีศักยภาพสูงในการตรวจระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างจำเพาะเจาะจงและรวดเร็วโดยอาศัยหลักการวิเคราะห์หาค่าจุดหลอมเหลว (Melting Temperature, Tm) ของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex HRMA สำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาลพร้อมกันจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ สุนัข ลิง หนู แมว และลา จากดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามและตัวอย่างอาหารทางการค้า โดยเริ่มจากการคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อสัตว์ทั้ง 6 ชนิดจากยีนที่ตั้งอยู่บนไมโทคอนเดรีย ซึ่งยีนเหล่านี้มีความจำเพาะสูงต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ จากนั้นทดสอบความจำเพาะ ความไวและความน่าเชื่อถือของไพรเมอร์ ทั้งในแบบไพรเมอร์เดี่ยว (Singleplex HRMA) และไพรเมอร์รวม (Multiplex HRMA) พบว่า ไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงในการระบุชนิดของสัตว์ต้องห้ามถูกต้อง 100% ในการทดสอบความไวพบว่าระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสัตว์ต้องห้าม คือ 0.02 นาโนกรัม ยกเว้นสุนัขที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 0.002 นาโนกรัม ยิ่งไปกว่านั้นรูปแบบ Melting peak และค่า Tm ยังมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทำให้สามารถระบุสัตว์แต่ละชนิดได้ง่ายขึ้น สำหรับการศึกษาความน่าเชื่อถือ ได้ทดลองใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนในลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามในอัตราส่วน 10 % และ 1 % รวมทั้งตรวจผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม พบว่าสามารถระบุชนิดของสัตว์ต้องห้ามได้ถูกต้อง 100% เช่นกัน จากนั้นนำเทคนิคที่พัฒนาได้มาตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าที่วางจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 260 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนสุนัข 2 ตัวอย่างและเมื่อนำผลไปเทียบกับเทคนิคตรวจวัดตามมาตรฐาน ให้ผลที่สอดคล้องกัน ดังนั้นเทคนิค HRMA จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและสามารถใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนในอาหารและประกันคุณภาพด้านฮาลาลให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมได้และนับเป็นครั้งแรกของประเทศไทยที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลได้สำเร็จ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5672243023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: HALAL FOOD / FORBIDDEN ANIMAL / MULTIPLEX HRMA / SPECIES IDENTIFICATION / AUTHENTICATION

ANAT DENYINGHOT: DEVELOPMENT OF FORBIDDEN ANIMAL DETECTION IN HALAL FOOD PRODUCTS BY USING HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS TECHNIQUE. ADVISOR: PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WINAI DAHLAN, Ph.D., pp.

High resolution melting analysis (HRMA) has been considered as a high potential technique for rapid and specific identifying the living organisms based on the characteristics of melting temperature ( $T_m$ ), which are specific to their DNA profiles. Hence, this research was aimed to develop the multiplex HRMA technique for detecting the contamination of 6 forbidden animals in halal foods consisting of pigs, dogs, rats, cats, monkeys, and donkeys from standard DNA and commercial products. First, selection and primer design were conducted on mitochondrial gene which represents a high specificity to 6 targeted animals. Then, specificity, sensitivity and reliability tests of the designated primers were evaluated both of Singleplex and Multiplex HRMA. The results showed that the primers had a high specificity for identifying the targeted forbidden animals with 100% accuracy. For the sensitivity test, it demonstrated that the limit of detection of this technique was sensitive down to 0.02 ng, except that of pig identification (0.002 ng). Moreover, the melting peak and  $T_m$  of HRM profile of the targeted animals produced uniquely different plots that were easily distinguished for each species in this study. For reliability, the artificial meat balls (10 % and 1 % with forbidden animal meats) and commercial products contained with beef and other forbidden meats were tested. It also found that this technique could be used to detect the aforementioned animals with 100% accuracy. In order to carry out the analysis of commercial food products, 260 products of Thailand were used to screen by multiplex HRMA. This method revealed that two samples were contaminated with pigs' DNA in the examined products. Therefore, the HRMA could be used as a high-potential technique for detecting the forbidden animals contaminated in foods and representing the quality assurance of Islamic consumers. To the best our knowledge, this is the first report of successful application of multiplex HRMA for detecting the forbidden animal in Thailand's halal industries.

Department: Food Technology

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กิริติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรประภา อิ่มจงใจรัก และ ดร.มงคล เวสารัชชเวศย์ ที่กรุณา รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้งบประมาณ สนับสนุนงานวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอขอบพระคุณ ฝ่ายวิจัยและพัฒนา เครือเบทาโกร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและองค์ความรู้ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ในการทำวิจัย รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำด้านเทคนิค

ขอขอบพระคุณ คุณจิรพิพรรธ แพรวไพศาล ที่เป็นพี่เลี้ยง ให้คำแนะนำ สิ่งที่เป็นประโยชน์ ตั้งแต่การวางแผนวิจัยจนถึงอภิปรายผลการทดลอง ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย กองพันสัตว์ต่าง กรมการทหารบก และบริษัทอ็อบรอฮิมแอนด์บีฟ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เนื้อสัตว์และเลือดสัตว์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆเพื่อนๆน้องๆ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	11
สารบัญภาพ .....	13
บทที่ 1 .....	18
บทนำ.....	18
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	18
1.2 สมมุติฐานงานวิจัย .....	20
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	20
1.4 ขอบเขตงานวิจัย .....	21
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	21
บทที่ 2 .....	22
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	22
2.1 ฮาลาลในมิติเศรษฐกิจ.....	22
2.1.1 สภาพตลาดอาหารฮาลาลโลก.....	23
2.1.2 การส่งออกอาหารฮาลาลของไทย .....	24
2.2 ฮาลาลในมิติทางศาสนา .....	25
2.2.1 อาหารหะรอม (ต้องห้าม) ตามหลักนิติศาสตร์อิสลาม .....	26
2.3 มาตรฐานและการผลิตอาหารฮาลาล.....	27
2.3.1 มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์.....	28

2.3.2	มาตรฐานฮาลาลประเทศไทย.....	32
2.4	การพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	37
2.4.1	เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Chromatography techniques).....	37
2.4.2	เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology techniques).....	38
2.4.3	เทคนิคทางดีเอ็นเอ (DNA based techniques).....	39
2.5	เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-Time PCR ).....	40
2.5.1	หลักการ Real-Time PCR.....	40
2.5.2	การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในงานด้านต่างๆ.....	41
2.5.3	การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล.....	43
2.6	มัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ (Multiplex Real-time PCR).....	44
2.7	เทคนิคการวิเคราะห์การละลายแบบแยกชัดสูง (High Resolution Melting Analysis (HRMA)) (วีระพงศ์ ลุฬิตานนท์, 2557).....	46
2.7.1	หลักการเทคนิค HRMA.....	47
2.7.2	การประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในงานด้านต่างๆ.....	48
2.7.3	การประยุกต์ใช้เทคนิค HRM กับอุตสาหกรรมอาหาร.....	50
บทที่ 3	.....	52
ระเบียบแบบแผนการทดลอง.....	.....	52
3.1	สารเคมี และอุปกรณ์.....	52
3.2	ตัวอย่างสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ.....	54
3.3	การเตรียมลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สำหรับทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค.....	55
3.4	การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ หรือเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit.....	57
3.5	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit.....	58



3.6 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer.....	59
3.7 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์ต้องห้าม....	59
3.8 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Singleplex HRMA.....	62
3.9 การทดสอบความจำเพาะ ของเทคนิค Singleplex HRMA .....	63
3.10 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Singleplex HRMA .....	64
3.11 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Multiplex HRMA.....	64
3.12 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA .....	65
3.13 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Multiplex HRMA.....	66
3.14 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดเนื้อสัตว์ ต้องห้ามด้วยวิธีการจำลองการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร .....	66
3.14 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม .....	66
3.15 การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า .....	67
3.16 สถานที่และระยะเวลาที่ทำวิจัย.....	67
บทที่ 4 .....	68
ผลการทดลองและอภิปราย .....	68
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เลือดสัตว์และตัวอย่างอาหาร .....	68
4.2 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์ต้องห้าม....	72
4.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Singleplex HRMA.....	82
4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Singleplex HRMA .....	91

4.5 การทดสอบความไว หรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Singleplex HRMA .....	96
4.6 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Multiplex HRMA .....	98
4.7 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA.....	105
4.8 การทดสอบความไว หรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Multiplex HRMA.....	110
4.9 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้าม ด้วยวิธีการจำลองการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร .....	115
4.10 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม .....	122
4.11 การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า ...	124
บทที่ 5 .....	128
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	128
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	128
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	130
.....	131
รายการอ้างอิง .....	131
ภาคผนวก ก.....	139
รายละเอียดน้ำยา PCR Master mix.....	139
ภาคผนวก ข.....	140
การผลิตลูกชิ้นเนื้อวัว.....	140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	141

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าการค้าอาหารโลก ปี พ.ศ. 2555-2560.....	22
ตารางที่ 2 แสดงสรุปแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควบคุมและทดสอบ ความจำเพาะ.....	55
ตารางที่ 3 แสดงการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามสูตรที่ไม่มีการ ผสมเครื่องเทศ.....	56
ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามสูตรที่มี เครื่องเทศและวัตถุดิบอื่นๆเป็นองค์ประกอบ .....	56
ตารางที่ 5 แสดงลำดับชุดของไพรเมอร์เทียบกับชุดไพรเมอร์มา .....	61
ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Singleplex HRMA.....	63
ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Multiplex HRMA .....	65
ตารางที่ 8 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสัตว์ต้องห้ามและสัตว์ฮาลาล จำนวนสัตว์ละ 5 ตัวอย่าง สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง .....	69
ตารางที่ 9 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สูตรที่ไม่มีการผสมเครื่องเทศและสูตรที่ผสมเครื่องเทศ จำนวนสูตรละ 5 ตัวอย่าง.....	70
ตารางที่ 10 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างลูกชิ้นและไส้กรอกทาง การค้า มีเนื้อสัตว์ต้องห้ามเป็นองค์ประกอบจำนวน 10 ตัวอย่าง .....	71
ตารางที่ 11 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ วางขายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 260 ตัวอย่าง .....	71
ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่คัดเลือกและออกแบบใหม่ เพื่อนำมาคัดเลือกอีกครั้ง เพื่อหาคู่ที่เหมาะสมที่สุดของสัตว์แต่ละชนิดเพื่อใช้ในการสร้าง Tm Construction ของการ ตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA.....	73
ตารางที่ 13 แสดง รายละเอียดคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด.....	81
ตารางที่ 14 แสดงช่วงค่า Tm และค่า Tm เฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิดจากการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA .....	83

ตารางที่ 15 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามที่ทำนายไว้ด้วยโปรแกรม เทียบกับที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis ให้ผลที่สอดคล้องกัน.....	88
ตารางที่ 16 แสดงการทดสอบความจำเพาะ (Specificity test) ของเทคนิค Singleplex HRMA ...	92
ตารางที่ 17 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Singleplex HRMA ของลา แมว สุกร.....	93
ตารางที่ 18 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Singleplex HRMA ของหนูนา สุนัข ลิง ...	94
ตารางที่ 19 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์ฮาลาล แต่ละชนิดจำนวน 5 ตัวอย่าง .....	95
ตารางที่ 20 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอสัตว์ต้องห้ามที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Singleplex HRMA.....	96
ตารางที่ 21 แสดงช่วงค่า Tm และค่า Tm เฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิดจากการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA.....	99
ตารางที่ 22 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA ของลา แมว สุกร .....	105
ตารางที่ 23 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA ของหนู สุนัข ลิง .....	106
ตารางที่ 24 แสดงการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค multiplex HRMA ของสัตว์ฮาลาลอื่นๆ .	107
ตารางที่ 25 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอสัตว์ต้องห้ามที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA.....	110
ตารางที่ 26 แสดงผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม .....	116
ตารางที่ 27 แสดงผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสัตว์ต้องห้าม ให้ผลบวกเฉพาะสุกร .....	123
ตารางที่ 28 แสดงจำนวนตัวอย่างอาหารทางการค้าที่นำมาตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้าม	125

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 เครื่องตรวจ HRMA รุ่น HR-1 ของบริษัท Idaho Technology .....	47
ภาพที่ 2 แสดงลำดับพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของลา ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์.....	62
ภาพที่ 3 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลาที่ คัดเลือกจากงานของ Zülal Kesmen .....	74
ภาพที่ 4 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลาที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์ลาในงานวิจัย .	74
ภาพที่ 5 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ Ali .....	75
ภาพที่ 6 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ Matgorzata N. ....	75
ภาพที่ 7 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ N. KUROSE .....	76
ภาพที่ 8 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สุกรที่ คัดเลือกจากงานของ Ali .....	76
ภาพที่ 9 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนูนาที่ คัดเลือกจากงานของ I. Martín ไม่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ .....	77
ภาพที่ 10 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนูนาที่ คัดเลือกจากงานของ ชาญ วรธนะไกวล์ .	78
ภาพที่ 11 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนูนาที่ คัดเลือกจากงานของ Yanita.I.W .....	78
ภาพที่ 12 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สุนัขที่คัดเลือกจากงานของ Ali ค่า Tm เท่ากับ 81.92 °C.....	79
ภาพที่ 13 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สุนัขที่ดัดแปลงจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 84.88 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์สุนัขในงานวิจัย .....	79
ภาพที่ 14 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลิงที่คัดเลือกจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 85.34°C.....	80
ภาพที่ 15 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลิงที่ดัดแปลงจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 87.39 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์ลิงในงานวิจัย.....	80
ภาพที่ 16 แสดง Tm Construction ของการตรวจวัดการเปื้อนสัตว์ต้องห้าม .....	81
ภาพที่ 17 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของลา.....	83
ภาพที่ 18 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของแมว .....	84

ภาพที่ 19 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสุกร .....	84
ภาพที่ 20 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของหนูนา ....	85
ภาพที่ 21 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสุนัข .....	85
ภาพที่ 22 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของลิง .....	86
ภาพที่ 23 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์ ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด มีรูปแบบ Melting peaks และค่า Tm ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน .....	87
ภาพที่ 24 แสดง Melting curves ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA สัตว์ ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด .....	87
ภาพที่ 25 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของลาที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 94.8 คู่เบส .....	88
ภาพที่ 26 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของแมวที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 83.1 คู่เบส .....	89
ภาพที่ 27 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของสุกรที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 149.6 คู่เบส .....	89
ภาพที่ 28 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของหนูนาที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 219.7 คู่เบส .....	90
ภาพที่ 29 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของสุนัขที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 139.4 คู่เบส .....	90
ภาพที่ 30 แสดง ขนาดขึ้นส่วนดีเอ็นเอของลิงที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 168.7 คู่เบส .....	91
ภาพที่ 31 แสดง amplification curve ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม .....	97
ภาพที่ 32 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ของไพรเมอร์ สัตว์ต้องห้าม กับดีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด หลังปรับสภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด .....	98
ภาพที่ 33 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอ ควบคุมของลา ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง .....	99

ภาพที่ 34 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของแมว ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง.....	100
ภาพที่ 35 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสุกร ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง.....	100
ภาพที่ 36 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของหนูนา ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง.....	101
ภาพที่ 37 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสุนัข ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง.....	101
ภาพที่ 38 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของลิง ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง.....	102
ภาพที่ 39 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ เดี่ยวของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด.....	102
ภาพที่ 40 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ของไพรมอร์ สัตว์ต้องห้าม กีบตีเอ็นเอเดี่ยวเทียบกับตีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด .....	103
ภาพที่ 41 แสดง ขนาดขึ้นส่วนตีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามที่วัดได้ด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis.....	103
ภาพที่ 42 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 2 ชนิด ได้แก่ สุกรและสุนัข.....	108
ภาพที่ 43 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 2 ชนิด ได้แก่ สุกรและหนู.....	108
ภาพที่ 44 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 3 ชนิด ได้แก่ สุกร หนูนา สุนัข .....	109
ภาพที่ 45 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กีบตีเอ็นเอ ควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 5 ชนิด ได้แก่ แมว สุกร หนูนา สุนัข และลิง.....	109
ภาพที่ 46 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่ สามารถตรวจวัดตีเอ็นเอของ ลาได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม.....	111

ภาพที่ 47 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ แมวได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม .....	112
ภาพที่ 48 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ สุนัขได้ต่ำสุดที่ 0.002 นาโนกรัม .....	112
ภาพที่ 49 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของหนูนาได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม.....	113
ภาพที่ 50 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ สุนัข ได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม .....	113
ภาพที่ 51 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ ลิง ได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม .....	114
ภาพที่ 52 แสดงตัวอย่างลูกชิ้นผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สูตรที่ไม่มีเครื่องเทศและสูตรที่มีเครื่องเทศ .	115
ภาพที่ 53 แสดง ผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับสูตรควบคุม เนื้อวัว 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย.....	116
ภาพที่ 54 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกรสูตรไม่มีเครื่องเทศ ....	117
ภาพที่ 55 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัขสูตรไม่มีเครื่องเทศ....	117
ภาพที่ 56 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมวสูตรไม่มีเครื่องเทศ ....	118
ภาพที่ 57 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนูนาสูตรไม่มีเครื่องเทศ .	118
ภาพที่ 58 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อแมว สูตรไม่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA .....	119
ภาพที่ 59 แสดงผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับสูตรควบคุมที่พบว่าไม่มีการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย .....	119
ภาพที่ 60 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกรสูตรที่มีเครื่องเทศ .....	120
ภาพที่ 61 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัขสูตรที่มีเครื่องเทศ .....	120
ภาพที่ 62 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมวสูตรที่มีเครื่องเทศ .....	121
ภาพที่ 63 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนูนา สูตรที่มีเครื่องเทศ .	121



ภาพที่ 64 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อแมว สูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA.....	122
ภาพที่ 65 แสดง Melting peaks ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสุกร.....	123
ภาพที่ 66 แสดง Melting peak ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่พบการปนเปื้อนสุกร เทียบกับ Positive control ของสัตว์ต้องห้าม ซึ่งสอดคล้องกับ Positive control ของสุกร.....	125
ภาพที่ 67 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและตรวจวัดด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์ วิทยาศาสตร์ ฮาลาล ซึ่งใช้เทคนิค Real-Time PCR.....	126
ภาพที่ 68 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและตรวจวัดด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์ วิทยาศาสตร์ ฮาลาล ซึ่งใช้เทคนิค Real-Time PCR.....	126



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

“ฮาลาล” เป็นคำจากภาษาอาหรับแปลว่า อนุมัติ หมายความว่า สิ่งของหรือการกระทำ การผลิต การให้บริการหรือการจำหน่ายใดๆ ที่ไม่ขัดแย้งต่อบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม อาหารฮาลาล จึงหมายถึงอาหารที่เป็นที่อนุมัติสำหรับผู้บริโภคมุสลิมโดยต้องปราศจากการปนเปื้อนสิ่งที่ไม่ขัดแย้งกับหลักการในศาสนาอิสลาม (Nakyinsige et al., 2012) เมื่อวิเคราะห์ภาพรวมประชากรโลกในปัจจุบัน ผู้นับถือศาสนาอิสลาม เป็นหนึ่งในเชื้อชาติที่ใหญ่และกำลังเติบโตอย่างรวดเร็วที่สุด โดยประชากรมุสลิมมีมากถึง 1.8 พันล้านคนหรือคิดเป็นร้อยละ 23 ของประชากรโลก และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 1.9 พันล้านคนหรือร้อยละ 25 ในปี 2563 และ 2.2 พันล้านคนหรือร้อยละ 26.4 ในปี 2573 (นุซนาตร นัศรุลอม, 2558) จำนวนประชากรมุสลิมที่เพิ่มขึ้นทำให้ความต้องการอาหารฮาลาลเพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจุบัน ตลาดอาหารฮาลาลมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เห็นได้จากมูลค่าการค้าของอาหารฮาลาลโลกต่อปีเฉลี่ย อยู่ที่ประมาณ 650 พันล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (Forum, 2011)นอกจากนั้นผู้บริโภคที่มองหาอาหารฮาลาลไม่ได้มีเฉพาะชาวมุสลิมแต่รวมถึงผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีหลักการผลิตที่เป็นเลิศ มีความปลอดภัยสูง ซึ่งสิ่งดังกล่าวถือเป็นจุดแข็งและจุดขายที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ฮาลาล

ประเทศไทยมีศักยภาพสูงในการผลิตอาหารป้อนตลาดโลก ซึ่งตลาดอาหารฮาลาลเป็นหนึ่งในตลาดที่ประเทศไทยมุ่งหวังจะเข้าไปเพิ่มส่วนแบ่งในตลาดสำคัญนี้ แต่อย่างไรก็ตามความซับซ้อนของกระบวนการผลิตอาหารทางอุตสาหกรรมสมัยใหม่สิ่งที่เกี่ยวข้องเนื่องจากอาหารเปลี่ยนสภาพจากต้นกำเนิดเป็นอย่างมาก อีกทั้งผู้ผลิตอาหารส่วนใหญ่ไม่ใช่มุสลิม อาจยังไม่เข้าใจถึงหลักฮาลาล นิยมผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบหลากหลายภายในสถานที่ผลิตเดียวกัน (วินัย ดะห์ลัน, 2556)ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลที่ผ่านมาจำนวนไม่น้อยเกิดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมอยู่บ่อยครั้งทั้งที่เกิดจากความไม่รู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากการจงใจโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เนื่องจากต้นทุนการผลิต ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ ยังมีราคาสูง ผู้ผลิตส่วนใหญ่จึงพยายามที่จะลดต้นทุนการผลิตโดยการปลอมปนเนื้อสัตว์ราคาถูกในผลิตภัณฑ์เนื้อคุณภาพดี เช่นการปลอมปนเนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อม้า เนื้อหมู เนื้อสุนัขในผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว (Ali et al., 2015) การกระทำดังกล่าวเข้าข่ายการหลอกลวงผู้บริโภคที่ต้องการอาหารที่ถูกต้องตามฉลาก ซึ่งอาจส่งผลเสียตามมาสำหรับผู้บริโภคที่มีอาการแพ้ เช่นการแพ้โปรตีนในเนื้อสัตว์บางชนิด (Ganopoulos et al., 2013) หรือผู้บริโภคที่มีข้อจำกัดทางด้านศาสนา เช่นผู้บริโภคมุสลิม ซึ่งการปนเปื้อนเนื้อสัตว์หรือ

วัตถุประสงค์ที่มีองค์ประกอบจากสัตว์ต้องห้ามตามมาตรฐานฮาลาล จึงเป็นสิ่งที่ต้องเฝ้าระวังเป็นอย่างมาก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2550) (วินัย ตะห์ลัน, 2556) นอกจากนี้ ยังส่งผลต่อการควบคุมโรคระบาดบางชนิดที่มากับเนื้อสัตว์อีกด้วย เช่นโรคฉี่หนู กาฬโรค ที่มีหนูเป็นสัตว์พาหะ โรคพิษสุนัขบ้า ที่มาจากสุนัข เป็นต้น (Ali et al., 2012)

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามโดยเฉพาะสัตว์ต้องห้ามจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ผู้บริโภคมุสลิมและผู้บริโภคทั่วไปเกิดความมั่นใจในผลิตภัณฑ์ที่ระบุรายละเอียดตามฉลากเพื่อได้รับการคุ้มครองสิทธิของผู้บริโภคเอง ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภค พ.ศ.2541 ปัจจุบันจึงมีเทคนิคมากมายถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนหรือบ่งชี้ชนิดของสัตว์ในอาหาร ซึ่งเทคนิคที่ได้รับความนิยมคือเทคนิคทางดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงทนต่อความร้อนมากและตรวจวัดได้ทั้งในเนื้อดิบหรือเนื้อที่ผ่านความร้อน และตรวจได้ในกรณีที่มีความผันแปรของดีเอ็นเอในระดับสายพันธุ์ อีกทั้งมีความไวและมีความจำเพาะสูง (พรพิมล มะหะหมัด, 2549) ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชัดสูง (High resolution melting analysis ; HRMA) เป็นการวิเคราะห์ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR โดยวิเคราะห์หาค่าจุดหลอมเหลว (Melting Temperature,  $T_m$ ) ของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ตรวจวัดระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างจำเพาะเจาะจงและรวดเร็ว (Iacumin et al., 2015) การตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA นี้เริ่มจากการทำ Real-Time PCR ต่อบริเวณของยีนเป้าหมายที่สนใจในการวิเคราะห์ โดยมีการเติมสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีความอิ่มตัวสูง (Saturation dye) ลงในหลอด PCR ในช่วงการเตรียมปฏิกิริยาก่อนเริ่มทำ Real-Time PCR เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการทำ Real-Time PCR ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR จะถูกวิเคราะห์ต่อในระบบปิดที่มีการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดปฏิกิริยา จากอุณหภูมิประมาณ  $50^{\circ}\text{C}$  ไปถึง  $95^{\circ}\text{C}$  และมีการบันทึกการเรืองแสงตลอดเวลา เมื่ออุณหภูมิค่อยเพิ่มขึ้นไปจนถึงค่า  $T_m$  ของผลผลิตปฏิกิริยา สายดีเอ็นเอจะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ทำให้สีเรืองแสงหลุดออกจากสายดีเอ็นเอและค่าการเรืองแสงลดลง โดยอุณหภูมิ ณ จุดหลอมละลายของดีเอ็นเอ ที่  $50\%$  เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับเป็นตัวแทนค่าอุณหภูมิ ณ จุดหลอมละลายของดีเอ็นเอสายคู่เส้นนั้นๆ ซึ่งสามารถแสดงผลค่าของ  $T_m$  ได้หลายรูปแบบ เช่น Melting peak, Melting curve, หรือ Difference curve โดยแต่ละรูปแบบมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์และการแปลผลแตกต่างกันออกไป (Druml & Cichna-Markl, 2014) จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าเทคนิค HRMA มีความไวและมีความจำเพาะเจาะจงสูง มีการประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในงานต่างๆมากมาย เช่น งานการตรวจพิสูจน์หรือตรวจแยกเชื้อจุลินทรีย์ Cheng และคณะ (2006) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย 25 สายพันธุ์ เริ่มจากการทำ PCR ต่อยีน 16S rRNA แล้วตามด้วยการวิเคราะห์ HRMA ซึ่ง

พบว่า สามารถตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 9 สายพันธุ์อย่างชัดเจนจากกราฟชนิด Difference curve ส่วนที่เหลืออีก 16 สายพันธุ์ สามารถแยกออกได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะ Difference curve (J. C. Cheng et al., 2006) งานการตรวจหารูปแบบพันธุกรรม (Genotyping) สุวิมล กীরติพิบูลและคณะ (2015) ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจหารูปแบบพันธุกรรมเพื่อจัดกลุ่ม เชื้อ *Salmonella* ที่พบในโรงงานอุตสาหกรรม (Keeratipibul et al., 2015) นอกจากนั้นยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในงานประกันคุณภาพอาหาร Sakaridis และคณะ (2013) ได้ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อกระป๋องในผลิตภัณฑ์ที่ระบุเนื้อสัตว์ไว้ตามฉลาก (I. Sakaridis et al., 2013) นอกจากนั้น Xanthopoulou และคณะ (2016) ได้ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการบ่งชี้ชนิดของชาสมุนไพร 9 ชนิด (Xanthopoulou et al., 2016)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาเทคนิค HRMA ในการตรวจวัดการปนเปื้อนและบ่งชี้สัตว์ต้องห้ามที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารฮาลาล 6 ชนิด ได้แก่ สุกร สุนัข ลิง หนู แมวและลา รวมถึงทดสอบความจำเพาะ ความไวและความน่าเชื่อถือ ทั้งในแบบไพรเมอร์เดี่ยว (Singleplex) และไพรเมอร์รวม (Multiplex) กับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามและตัวอย่างอาหาร

## 1.2 สมมุติฐานงานวิจัย

เทคนิค HRMA สามารถแยกความแตกต่างของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดได้โดยใช้ค่า Melting Temperature ( $T_m$ ) หรือรูปแบบ Melting peak ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถนำเทคนิค HRMA ไปประยุกต์ใช้จริงได้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าได้

## 1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค HRMA สำหรับการตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารฮาลาล 6 ชนิด ได้แก่ สุกร สุนัข ลิง หนู แมวและลา
2. เพื่อทดสอบความจำเพาะและความไวของเทคนิคในการตรวจวัดสัตว์ต้องห้าม ทั้งแบบ Singleplex HRMA และ Multiplex HRMA
3. เพื่อทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิคในการตรวจวัดการปนเปื้อนตัวอย่างอาหารที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามและตัวอย่างทางการค้าที่สัตว์ต้องห้ามเป็นส่วนผสม
4. เพื่อนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในตัวอย่างอาหารทางการค้า เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและประกันคุณภาพอาหารฮาลาล
5. เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับมาตรฐานฮาลาลของประเทศไทยในอนาคตได้

#### 1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง
2. เก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง
3. คัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่เฉพาะเจาะจงต่อสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค HRMA
4. หาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด รวมถึงทดสอบความจำเพาะและความไวในการตรวจวัดสัตว์ต้องห้าม ทั้งแบบ Singleplex HRMA และ Multiplex HRMA
5. ทดสอบความเชื่อถือของเทคนิคในการตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในตัวอย่างอาหารที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามและตัวอย่างทางการค้าที่สัตว์ต้องห้ามเป็นส่วนผสม
6. ประยุกต์ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้ในการตรวจวัดตัวอย่างอาหารทางการค้า
7. สรุปผลการทดลอง

#### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาล 6 ชนิด ได้แก่ สุนัข สุกร สุนัข ลิง หนู แมว และลา ทั้งแบบ Singleplex HRMA ของสัตว์แต่ละชนิด และ แบบ Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดพร้อมกันได้ทั้ง 6 ชนิด
2. สามารถนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้าม ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารฮาลาลได้
3. สามารถต่อยอดงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดกับสัตว์ชนิดอื่นๆได้
4. ผู้บริโภคมุสลิมได้รับความคุ้มครองได้รับประทานอาหารที่ถูกต้องตามบทบัญญัติศาสนา
5. ผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลของประเทศไทยได้รับความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้นเนื่องจากมีระบบประกันคุณภาพอาหารฮาลาลที่มีประสิทธิภาพสูง
6. ผู้บริโภคทั่วไปได้รับความคุ้มครองได้รับประทานอาหารที่ถูกต้องตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ฮาลาลในมิติเศรษฐกิจ

ตลาดการค้าอาหารโลกเป็นตลาดที่มีมูลค่าสูงมากและมีแนวโน้มเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมูลเหตุสำคัญมาจากประชากรที่มีจำนวนเพิ่มขึ้น จากปัจจุบันที่มีอยู่ 7 พันล้านคน จะเพิ่มเป็น 9 พันล้านคนภายในปี พ.ศ. 2593 อย่างไรก็ตามทิศทางการเปลี่ยนแปลงมีการแปรผันขึ้นลงตามเหตุปัจจัยในแต่ละปีที่มีความแตกต่างกัน ในปี พ.ศ. 2559 - 2560 คาดว่ามูลค่าการค้าจะสูงถึง 1.58 ล้านล้านเหรียญสหรัฐฯ และ 1.69 ล้านล้านเหรียญสหรัฐฯ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากเศรษฐกิจโลกที่อยู่ในเกณฑ์ดี ประกอบกับหลายๆ ประเทศประสบภัยธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความต้องการสินค้าอาหารเพื่อการบริโภคและสำรองเก็บไว้มีมากยิ่งขึ้น ซึ่งสินค้าอาหารของไทยยังคงเป็นที่ต้องการของตลาดโลกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สถาบันอาหาร, 2557)

ปี พ.ศ.	มูลค่าการค้าอาหารโลก (ล้านเหรียญสหรัฐฯ)
2555	1,260,385
2556	1,330,425
2557	1,367,288
2558f	1,488,087
2559f	1,584,087
2560f	1,690,932

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าการค้าอาหารโลก ปี พ.ศ. 2555-2560

ที่มา Globe Trade Atlas & UNComtrade หมายเลขเหตุ f ตัวเลขพยากรณ์

อุตสาหกรรมอาหารฮาลาลมีแนวโน้มจะทวีความสำคัญต่อการส่งออกอาหารของไทยมากขึ้นเป็นลำดับ เนื่องจากตลาดอาหารฮาลาลเป็นตลาดที่มีขนาดใหญ่ทั้งในแง่ของจำนวนประชากรมุสลิมโลกและในแง่ของรายได้ที่เกิดจากอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลกระทั่งสร้างเป็น “เศรษฐกิจฮาลาล” (Halal economy) ที่มีการประมาณการณ์ไว้ว่าเฉพาะการบริโภคอาหารฮาลาลทั่วโลกมีมูลค่าเชิงเศรษฐกิจสูงถึง 7.2 แสนล้านเหรียญสหรัฐฯต่อปีเมื่อรวมเข้ากับธุรกิจฮาลาลอื่นๆ เช่น เครื่องอุปโภคฮาลาล ผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมและการแพทย์ฮาลาล การท่องเที่ยวฮาลาล การเงินการธนาคารฮาลาล

การขนส่งและการบริหารจัดการฮาลาล ฯลฯ มูลค่าของเศรษฐกิจฮาลาลในโลกจะขยายตัวสูงถึง 3.2 ล้านล้านเหรียญสหรัฐต่อปี

ความศรัทธาในศาสนาที่สามารถสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจได้ในระดับมหาศาลเช่นนี้ส่งผลให้ประเทศต่างๆ ทั้งที่เป็นมุสลิมและมีไม่มุสลิมรวมถึงประเทศไทยพากันให้ความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์และบริการฮาลาลมากขึ้น ในกรณีของประเทศไทยได้กลายเป็นยุทธศาสตร์สำคัญในนโยบายของรัฐบาลชุดต่างๆ ไปแล้ว โดยประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศจำนวนน้อยในโลกที่มีรายได้จากการส่งออกสูงถึงร้อยละ 50 ของผลผลิตมวลรวมของชาติ นอกจากนี้ยังมีรายได้จำนวนมหาศาลจากการท่องเที่ยว ทั้งสองส่วนนี้ล้วนมีตลาดมุสลิมเป็นตลาดสำคัญอันเป็นตลาดที่ประเทศไทยให้ความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายหลังการถดถอยทางเศรษฐกิจในโลกตะวันตกที่เคยเป็นตลาดสำคัญของประเทศไทย ด้วยเหตุผลดังกล่าวฮาลาลทั้งผลิตภัณฑ์และบริการตลอดจนการท่องเที่ยวจึงเป็นยุทธศาสตร์การจัดการรายได้สำคัญเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทยต่อไป

### 2.1.1 สภาพตลาดอาหารฮาลาลโลก

ตลาดฮาลาลโลกมีแนวโน้มที่จะเติบโตขึ้นอย่างต่อเนื่องจากประชากรมุสลิมทั่วโลก ซึ่งเป็นกลุ่มบริโภคอาหารฮาลาล มีจำนวนประมาณ 1,800 ล้านคน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 23 ของประชากรโลก จำนวนประชากรมุสลิมมีอัตราการเติบโตอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนร้อยละ 30 ของประชากรทั้งโลกภายในปี 2568 ส่งผลให้ตลาดผลิตภัณฑ์ฮาลาลมีแนวโน้มเติบโตตามไปด้วย กลุ่มประเทศสมาชิกองค์การความร่วมมืออิสลาม (Organization of Islamic Cooperation: OIC) เป็นตลาดใหญ่ของอาหารฮาลาลที่ประกอบไปด้วยประเทศต่าง ๆ 57 ประเทศ ครอบคลุมประเทศต่าง ๆ ในหลายภูมิภาค ได้แก่ ตะวันออกกลาง เอเชียกลาง เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา และยุโรปนอกจากนั้น ตลาดฮาลาลยังครอบคลุมถึงประเทศที่ไม่ใช่มุสลิม แต่มีมุสลิมอาศัยอยู่จำนวนมาก ซึ่งก็คือเป็นตลาดที่มีศักยภาพในการส่งออกอาหารฮาลาลที่สำคัญเช่นกัน ได้แก่ ประเทศจีน อินเดีย และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ฮาลาลไม่จำกัดอยู่เฉพาะผู้บริโภคที่เป็นมุสลิมเท่านั้น กลุ่มผู้บริโภคทั่วไปที่ไม่ใช่มุสลิมแต่เน้นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยคำนึงถึงความสะอาดปลอดภัยตามหลักโภชนาการ ได้หันมาบริโภคอาหารฮาลาลมากขึ้น จนทำให้มียอดความต้องการบริโภคอาหารฮาลาลสูงถึงประมาณ 6.6 แสนล้านเหรียญสหรัฐ ต่อปี และมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยร้อยละ 4 ต่อปี ซึ่งนับเป็นจำนวนเงินมหาศาล (ศราวดี อารีย์, 2557)

แต่ปัจจุบันในแต่ละปีประเทศไทยส่งออกอาหารฮาลาลเพียงร้อยละ 0.1 ของมูลค่าอาหารฮาลาลโลกหรือประมาณ 6,000 ล้านบาทเท่านั้นหากพิจารณาจากมูลค่าการนำเข้าสินค้าของประเทศในกลุ่ม OIC จะพบว่าประเทศมุสลิมเหล่านี้นำเข้าอาหารในรูปแบบของสัตว์และเนื้อสัตว์จากกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วส่วนใหญ่ ซึ่งผู้ส่งออกสินค้าอาหารฮาลาลรายใหญ่ที่สุดของโลกขณะนี้ คือ ออสเตรเลีย

ตามด้วยบราซิล อาร์เจนตินา แคนาดา อินเดีย นิวซีแลนด์ อังกฤษและสหรัฐอเมริกา โดยออสเตรเลียส่งสินค้าฮาลาลไปขายกว่า 70 ประเทศทั่วโลก ในขณะที่บราซิลครองตลาดตะวันออกกลาง ตุรกีและยุโรป สำหรับประเทศอื่นในเอเชียที่เริ่มให้ความสนใจอย่างจริงจังในการเจาะตลาดสินค้าฮาลาลในเอเชียและตลาดโลก คือ มาเลเซีย ซึ่งตั้งเป้าเป็นศูนย์กลางฮาลาลนานาชาติ สิงคโปร์ ประกาศวิสัยทัศน์เป็นศูนย์กลางผลิตอาหารฮาลาล ในขณะที่บรูไนลงนามสัญญาร่วมกับออสเตรเลียเป็นผู้ผลิตอาหารให้โลกมุสลิม และประเทศจีนตั้งเป้าเป็นผู้ส่งออกอาหารฮาลาล โดยได้ร่วมกับประชาคมยุโรป จัดทำระบบการตรวจสอบเพื่ออนุมัติให้บริษัทของจีนสามารถส่งสินค้าอาหารฮาลาลไปขายในยุโรปได้ ส่วนผู้ส่งออกของประเทศอินเดียกำลังเร่งเพื่อให้ได้ตรารับรองฮาลาลและใบรับรองมาตรฐาน HACCP และ ISO เพื่อเป็นใบเบิกทางในการส่งออกสินค้าฮาลาล (ศราวุฒิ อารีย์, 2557)

### 2.1.2 การส่งออกอาหารฮาลาลของไทย

ประเทศไทยนั้นถือเป็นผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารที่สำคัญของโลกประเทศหนึ่ง ปัจจัยสนับสนุนที่ทำให้ศักยภาพในการผลิตอาหารส่งออกได้แก่ แหล่งวัตถุดิบอาหารในประเทศและประสิทธิภาพในการผลิตอาหารจนเป็นที่ยอมรับในตลาดโลก ซึ่งเกื้อหนุนให้ไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรและอาหารเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ในรายการสินค้าหลายรายการ ได้แก่ สินค้าประมง (กุ้งและปลา) ไข่ ข้าว และสับปะรดกระป๋อง อย่างไรก็ตาม การส่งออกอาหารฮาลาลของไทยยังมีสัดส่วนค่อนข้างน้อย (ไม่ถึงร้อยละ 1) เมื่อเทียบกับมูลค่าส่งออกอาหารทั้งหมดของไทยและส่วนแบ่งตลาดอาหารฮาลาล ของไทยในตลาดโลกค่อนข้างต่ำเช่นกัน ศักยภาพในการผลิตอาหารของไทยและตลาดอาหารฮาลาลของโลกที่มีแนวโน้มเติบโตได้ดี เป็นปัจจัยสนับสนุนให้การส่งออกอาหารฮาลาลไทยมีโอกาสขยายตัวในตลาดโลกได้อีกมาก ผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลส่งออกที่สำคัญของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ อาหารแช่แข็ง อาหารทะเลแปรรูป ผักผลไม้สด ผักผลไม้กระป๋อง และแปรรูป ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ซอสปรุงรสต่าง ๆ อาหารสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน เป็นต้น ส่วนเนื้อสัตว์ประเภทอื่น ๆ เช่น เนื้อวัว แพะ แกะ ไทยยังส่งออกไม่มากนัก ดังนั้นการส่งออก “อาหารฮาลาล” เป็นสินค้าความหวังในการเปิดตลาด โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศมุสลิม ซึ่งเป็นประเทศที่มีศักยภาพด้านการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ

อย่างไรก็ตามประเทศไทยไม่ใช่ประเทศมุสลิม และผู้ผลิตอาหารส่วนใหญ่ยังไม่ใช่มุสลิมอีกทั้งยังไม่เข้าใจหลักการฮาลาลที่ชัดเจน การสร้างความรู้และความเข้าใจในหลักการฮาลาลเบื้องต้น เพื่อให้ผู้ผลิตอาหารตระหนักและเฝ้าระวังการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามที่อาจปนหรือผสมไปในอาหารฮาลาลทั้งที่เกิดจากการรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากการจงใจก็ตาม ดังนั้นระบบประกันคุณภาพด้านอาหารฮาลาล เช่นระบบการตรวจวัดการปนเปื้อน หรือระบบการทวนสอบ หรือมาตรฐานฮาลาลเป็น



สิ่งที่จำเป็นต้องพัฒนาควบคู่ไปกับการส่งเสริมการส่งออกอาหารฮาลาลของประเทศไทย เพื่อให้อาหารฮาลาลประเทศไทยเป็นที่ยอมรับในตลาดโลกมากยิ่งขึ้น (วินัย ตะห์ลัน, 2558)

## 2.2 ฮาลาลในมิติทางศาสนา

“ฮาลาล” เป็นคำภาษาอาหรับอ่านว่า “หะลาล” มีความหมายว่า อนุมัติ อนุญาต เมื่อนำคำนี้มาใช้กับศาสนาจึงมีความหมายว่าสิ่งที่ศาสนาอนุมัติ อนุญาตให้อุปโภค บริโภคและปฏิบัติได้ ซึ่งตรงข้ามกับคำว่า “หะรอม” หมายถึง ห้าม ไม่เป็นที่อนุมัติ เช่นเดียวกัน เมื่อนำคำว่าหะรอมมาใช้กับศาสนา จึงหมายถึงสิ่งที่ศาสนาห้ามหรือสิ่งที่ศาสนาไม่อนุมัติ ไม่อนุญาตให้อุปโภค บริโภคและห้ามปฏิบัติ ซึ่งฮาลาลนั้นเป็นส่วนหนึ่งในบทบัญญัติอิสลามครอบคลุมตั้งแต่อาหาร สิ่งที่มีใช้อาหาร บริการที่พึงใช้และพฤติกรรมที่พึงปฏิบัติ ปรากฏอยู่ในคัมภีร์อัลกุรอานอันเป็นพระดำรัสของพระเจ้า (อัลลอฮ์) ชาวมุสลิมเชื่อว่าสิ่งที่พระเจ้าอนุมัติให้อุปโภคบริโภคต้องเป็นสิ่งที่มิมีประโยชน์ต่อร่างกาย ขณะเดียวกันสิ่งใดที่พระเจ้าไม่อนุมัติให้อุปโภคบริโภค สิ่งนั้นย่อมเป็นสิ่งที่ไม่มีประโยชน์และเป็นโทษต่อร่างกายเช่นกัน ฮาลาลจึงเป็นวิถีในการดำเนินชีวิตของชาวมุสลิมซึ่งสอดคล้องกับหลักศรัทธาในศาสนาอิสลาม

อาหารฮาลาลตามหลักการของอิสลามได้แก่ อาหารที่มีองค์ประกอบส่วนผสม กระบวนการผลิตและการได้มาที่ถูกต้องตามบทบัญญัติอิสลาม จึงให้ความสำคัญตั้งแต่ขั้นตอนการคัดเลือกวัตถุดิบ จนเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต ซึ่งวัตถุดิบนั้นต้องไม่มีสิ่งปนเปื้อนและเป็นสิ่งที่สะอาดตามบัญญัติอิสลามด้วย โดยผ่านการล้างนำเอาสิ่งที่ศาสนาถือว่าสกปรกออกไปอย่างถูกวิธี และผ่านกระบวนการปรุงที่สะอาดถูกต้อง กระบวนการในการผลิตและการบรรจุภัณฑ์ตลอดจนการขนส่งผลิตภัณฑ์ต้องสะอาด ถูกสุขลักษณะ ทั้งนี้ด้วยเงื่อนไขที่ว่าสินค้าที่ผลิตขึ้นนั้น ต้องฮาลาลและมีความปลอดภัยอันเป็นสิ่งที่ถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลามที่กำหนดไว้ในคัมภีร์อัลกุรอานให้มุสลิมบริโภคอาหาร “ฮาลาล” และ “ตอยยิบ” นั่นคือไม่มีสิ่งหะรอมปนเปื้อน เป็นอาหารที่ดี ปลอดภัยต่อสุขภาพทั้งทางร่างกาย จิตใจ สังคมและจิตวิญญาณ (Lubis et al., 2016)

ตลาดอาหารฮาลาลเป็นตลาดที่มีศักยภาพในการเติบโต เนื่องจากประชากรมุสลิมที่มากถึง 1.8 พันล้านคน และแนวโน้มประชากรมุสลิมที่เพิ่มขึ้นทำให้ความต้องการอาหารฮาลาลสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นผู้ที่ประสงค์จะทำธุรกิจด้านอาหารฮาลาลจำเป็นต้องเข้าใจความสำคัญของอาหารฮาลาลที่มีต่อวิถีชีวิตของมุสลิม หากขาดความเข้าใจหรือรู้เท่าไม่ถึงการณ์แล้ว ส่งผลให้การผลิตอาหารฮาลาลมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามลงในกระบวนการผลิต กลายเป็นการละเมิดสิทธิของผู้บริโภคมุสลิมก็เป็นได้

## 2.2.1 อาหารหะรอม (ต้องห้าม) ตามหลักนิติศาสตร์อิสลาม

### 2.2.1.1 ซากสัตว์บกและสัตว์ปีก

สัตว์บกและสัตว์ปีกแม้ฮาลาลสำหรับมุสลิมในการบริโภคแต่ด้วยเงื่อนไขว่าต้องเชือดตามศาสนบัญญัติอิสลามเท่านั้น หากสัตว์ตายโดยไม่ผ่านการเชือดอย่างถูกต้อง เนื้อสัตว์ย่อมเป็นนญิส (สิ่งสกปรก) และต้องห้ามต่อการบริโภค เรื่องนี้อิสลามมีเหตุผลอย่างครบถ้วนในการห้ามดังกล่าว เนื่องจากมนุษย์เป็นผู้มีเกียรติ การบริโภคอาหารเช่นเนื้อสัตว์จำเป็นต้องรับรู้สภาพของสัตว์ก่อนตาย โดยอิสลามกำหนดว่าก่อนตายจากการเชือดสัตว์ต้องไม่เป็นโรค และตายจากการเชือดเท่านั้น (วินัยดะห์ลัน, 2556) กรณีที่สัตว์ตายมาก่อน อาจเป็นผลมาจากการเป็นโรคหรือเกิดปัญหาจากกรณีอื่นซึ่งนำพิษภัยมาสู่สุขภาพของผู้บริโภคได้ (Jahangir et al., 2016)

### 2.2.1.2. เลือดที่ไหลรินจากการเชือด (Flowing blood)

อิสลามกำหนดว่าเลือดที่ได้จากการเชือดเป็นนญิสและหะรอมหากบริโภค ทั้งนี้เนื่องจากการบริโภคเลือดเป็นการหลู่เกียรติยศของมนุษย์อีกทั้งเลือดยังอุดมไปด้วยสารพิษที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ โดยมีเหตุผลทางการแพทย์ที่รับรู้ยู่ว่าเลือดเป็นแหล่งของสารพิษหลายชนิดที่ร่างกายพยายามกำจัดออกจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นอาหาร

### 2.2.1.3 เนื้อและส่วนต่างๆของสุกร

อิสลามกำหนดว่าสุกรเป็นสัตว์สกปรก จึงห้ามการบริโภคเนื้อสุกร โดยคำว่าเนื้อในภาษาอาหรับตามที่กำหนดในคัมภีร์อัลกุรอาน หมายถึงส่วนของสุกรที่มีน้ำปนอยู่จึงครอบคลุมทุกส่วนของสุกรด้วย อันตรายจากสุกรนี้สอดคล้องกับรายงานทางการแพทย์ยุคใหม่ว่า เนื้อสุกรมีเชื้อโรคและปรสิตบางชนิดชุกช่อนอยู่ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่นมีรายงานผู้ป่วยที่หูหนวก ตาบอด หรือเสียชีวิตจากการกินเนื้อสุกรอันเป็นผลของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus suis* ที่สามารถติดต่อกันและก่อโรคได้ (Zoonoses) เชื่อดังกล่าวพบได้แม้ในสุกรปกติเกือบทุกตัว โดยจะฝังตัวอยู่ในต่อมทอลซิลของสุกรโดยไม่ก่อโรคใดๆ แต่เมื่อใดก็ตามที่ร่างกายของสุกรอ่อนแอ ป่วยด้วยโรคใดๆ ที่กดภูมิคุ้มกัน เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะเพิ่มจำนวนขึ้นกระทั่งก่อปัญหาต่อมนุษย์ได้ นอกจากนี้ยังพบเชื้อโรคอื่นๆ อีกมากมายที่มีเนื้อสุกรเป็นพาหะ เช่น พยาธิเม็ดสาคุ หรือพยาธิตัวตีตหมู โรคทริคิโนซิส เป็นต้น (Kongklieng et al., 2013)

### 2.2.1.4 สัตว์ที่พลีกรรมต่อผู้อื่นหรือพระเจ้าอื่นที่มีไข่อัลลอฮ์ (ช.บ.)

อิสลามกำหนดว่าสรรพสิ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ของมวลมนุษย์ เป็นต้นว่าเนื้อสัตว์ฮาลาลเป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งนี้ด้วยเงื่อนไขว่าจำเป็นต้องเชือดด้วยพระนามของอัลลอฮ์ (ช.บ.) เพื่อเป็นการให้เกียรติต่อสัตว์ที่ถูกเชือดและเพื่อเกียรติของผู้เชือดตลอดจนผู้บริโภคเนื้อสัตว์เอง

การฆ่าหรือเชือดสัตว์ด้วยนามอื่นที่มีใช้อัลลอฮ์ (ช.บ.) เป็นการไม่ให้เกียรติต่อทั้งสัตว์ ผู้เชือดสัตว์และผู้บริโภคเนื้อสัตว์ ดังนั้นเนื้อสัตว์ที่ได้ย่อมหะรอมต่อการบริโภค (Aghwan et al., 2016)

#### 2.2.1.5 เนื้อสัตว์บก และสัตว์ปีกบางชนิด

อิสลามห้ามการบริโภคสัตว์บกขนาดเล็กและสัตว์เลื้อยคลานทั้งหมด เช่น มด แมลงวัน ตัวงู แมลงที่กินมูลสัตว์ งู หนอน ตัวเรือด เหา จิ้งหรีด จิ้งจก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสัตว์ที่มีเหล็กในและมีพิษ เช่น ผึ้ง ต่อ แตน แมงป่อง เป็นต้น ยกเว้นตั๊กแตน เม่น แอ้ หนูจิ้งโจ้ ส่วนหนอนในน้ำส้ม และหนอนผลไม้ที่รับประทานไปพร้อมกับน้ำส้มหรือพร้อมผลไม้ ศาสนาให้อภัย กรณีหะรอมนั้น ได้แก่ นกแก้ว นกยูง แร้ง นกบุงอซเซห์ (นกเหยี่ยวขนาดเล็ก) นกคุดตอพ (นกหลังดำท้องขาวอาศัยตามบ้านเรือน) ค้างคาว นกที่ใช้จอยปากและกรงเล็บในการล่าเหยื่อ เช่น นกเหยี่ยว นกอินทรี นกเค้าแมว นกฮูก และนกฮูกไปซึ่งในประวัติศาสตร์เป็นนกเลี้ยงของนบิสุไลมานซึ่งได้ห้ามไว้ (Smith, 2016)

#### 2.2.1.6 เครื่องดื่มและของเหลวหะรอม

เครื่องดื่มที่หะรอมห้ามการบริโภค ประกอบด้วยสิ่งที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ได้แก่ ยาพิษ สิ่งที่เป็นพิษ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ นมจากสัตว์ที่ห้ามรับประทานเนื้อ ยกเว้นนมมนุษย์ที่ถือว่าสะอาด นอกจากนี้ยังมีของเหลวที่ปนเปื้อนพิษโดยไม่สามารถทำความสะอาดได้ เช่น น้ำส้มและน้ำมันของเหลวกลุ่มหนึ่งที่อิสลามห้ามคือสุราและเครื่องดื่มมึนเมาทั้งหลายรวมทั้งทุกสิ่งที่ทำให้มึนเมา กรณีหลังนี้อิสลามแนะนำให้หลีกเลี่ยงให้ไกล โดยคำว่ามึนเมานี้ ได้แก่ อาการพินเฟือน ควบคุมสติไม่ได้ ขาดความขี้คิด

นอกจากหัวข้อที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีสิ่งต้องห้ามและสิ่งที่ไม่อนุมัติให้มุสลิมสามารถเลือกบริโภคและอุปโภคได้อีกมาก ซึ่งได้รวบรวมไว้ในหัวข้อต่อไปคือเรื่องมาตรฐานอาหารฮาลาล กำหนดไว้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินงานด้านการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องตามหลักการของศาสนาอิสลาม

### 2.3 มาตรฐานและการผลิตอาหารฮาลาล

การผลิตอาหารฮาลาลที่ถูกต้องลักษณะและเป็นไปตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามมีความสำคัญต่อผู้บริโภค ทั้งผู้บริโภคมุสลิมและผู้บริโภคทั่วไป ๆ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในแง่การส่งออก เนื่องจากประชากรมุสลิมทั่วโลกมีจำนวนมากและขยายตัวค่อนข้างเร็ว ส่งผลให้ธุรกิจและการค้าอาหารฮาลาลเติบโตอย่างก้าวกระโดดกระทั่งมีมูลค่ามหาศาล ขณะเดียวกันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีด้านการผลิตอาหารพัฒนาก้าวหน้าไปมาก โดยผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหารจำนวนมากทั้งที่เป็นมุสลิมและมีมุสลิมยังขาดความเข้าใจความต้องการของผู้บริโภคมุสลิม ปัญหาการปนเปื้อนวัตถุดิบที่ไม่ฮาลาลตลอดจนปัญหาของอุบัติการณ์ของ

โรคถือกำเนิดใหม่ที่เกี่ยวกับสัตว์ เช่น โรควัวบ้า ไข้หวัดนก ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ได้สร้างความกังวลให้แก่ผู้บริโภคมุสลิม (Nakyinsige et al., 2012) รวมถึงประสบปัญหาการตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากไม่มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีกระบวนการผลิตถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลาม และถูกสุขลักษณะปลอดภัยปราศจากการปนเปื้อนต่อการบริโภคหรือไม่ (Ali et al., 2012) ประกอบกับนโยบายของรัฐบาลที่ต้องการผลักดันให้ประเทศไทยเป็นครัวโลก ผู้ประกอบการไทยจึงจำเป็นต้องสร้างความมั่นใจ และดำเนินการให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภคและเป็นไปตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม ดังนั้นการผลิตอาหารฮาลาลระดับอุตสาหกรรม จะต้องแยกสถานที่ผลิตอย่างชัดเจนกับอาหารที่ไม่ฮาลาล ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมการผลิต กระบวนการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวมถึงมีการตรวจสอบอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตทุกขั้นตอน ทั้งนี้เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดในเรื่องของความสะอาด และต้องมีมาตรฐานในระดับสากล เพื่อที่จะทำให้อาหารฮาลาลไทยสามารถแข่งขันได้ในระดับโลก การรับรองฮาลาลแก่ผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลจึงเกิดขึ้นในหลายประเทศเป็นผลมาจากความกังวลและความต้องการของผู้บริโภคดังกล่าว การรับรองฮาลาลดำเนินการโดยหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ทั้งหมดบริหารจัดการโดยองค์กรในศาสนาอิสลามหรือโดยมุสลิม ความจำเป็นในการกำหนดมาตรฐานอาหารฮาลาลเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคมุสลิมที่มีอยู่ทั่วโลก รวมถึงการกำหนดกระบวนการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องเริ่มเกิดขึ้นในช่วงกลาง ค.ศ 1980 เกิดเป็นมาตรฐานฮาลาลสหประชาชาติหรือฮาลาลโคเด็กซ์ ในปี ค.ศ.1997 (พ.ศ.2540) กระทั่งกลายเป็นต้นแบบในการสร้างมาตรฐานอาหารฮาลาลของประเทศและกลุ่มประเทศต่างๆ ทั่วโลกในเวลาต่อมา

### 2.3.1 มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์

อาหารฮาลาล นอกเหนือจากเป็นอาหารที่มุสลิมบริโภคได้อย่างถูกต้องตามหลักศาสนาแล้ว อาหารฮาลาลยังต้องครอบคลุมถึงอาหารที่ปลอดภัยต่อการบริโภคของมุสลิมด้วย ด้วยเหตุนี้ คณะกรรมการวิชาการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศที่มีชื่อว่า Codex Alimentarius Commission (CAC) หรือเรียกกันสั้นๆว่า “โคเด็กซ์” เป็นคณะทำงานร่วมทางด้านอาหารระหว่างองค์การอนามัยโลก (World Health Organization หรือ WHO) และองค์การอาหารและเกษตร (Food and Agriculture Organization หรือ FAO) แห่งสหประชาชาติ มีประเทศที่เป็นภาคีสมาชิกของหน่วยงานในช่วงเวลาการจัดทำมาตรฐานฮาลาลจำนวน 162 ประเทศและในปี พ.ศ. 2542 เพิ่มมาเป็น 165 ประเทศ โคเด็กซ์จึงเป็นองค์กรระหว่างประเทศที่มีบทบาทสำคัญในการวางมาตรฐานและการควบคุมอาหาร ตลอดจนสภาวะการณ์ด้านการค้าของตลาดโลกที่กำลังเปลี่ยนแปลง การทำงานของโคเด็กซ์มีเป้าหมายเพื่อจัดระเบียบ ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารทั่วโลกมีมาตรฐานอย่างเดียวกัน ทำให้ง่ายต่อการควบคุม และเป็นที่ยอมรับของประเทศต่าง ๆ

ประเทศไทยโดย สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) ในฐานะหน่วยงานผู้แทนโคเด็กซ์ได้ถอดความมาตรฐานฮาลาล โคเด็กซ์ จัดทำเป็นมาตรฐานฮาลาลสำหรับประเทศไทยขึ้นในปี พ.ศ.2541 เรียกว่า “ข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการใช้คำว่าฮาลาล” (มอก.1701-2541) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 1701-2541 ซึ่งรับเอกสาร Codex Alimentarius: General Guideline for use of the Term "Halal" (CAC GL-24/1997) มาใช้ในระดับเหมือนกันทุกประการ (Identical) โดยใช้ Codex Alimentarius ดังกล่าวฉบับภาษาอังกฤษเป็นหลักโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (วินัย ตะห์ลัน, 2556)

### ข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล"

คณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) ยอมรับว่าอาจมีความแตกต่างเล็กน้อยทางด้านความคิดในการแปลความหมายของสัตว์ที่ฆ่าถูกกฎ และ สัตว์ที่ฆ่าไม่ถูกกฎตามกฎหมายว่าด้วยการฆ่าสัตว์ของศาสนาอิสลาม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างด้านแนวคิดของสำนักคิดทางศาสนาอิสลาม (Islamic Schools of Thought) ดังนั้นข้อแนะนำทั่วไปเหล่านี้ จะขึ้นอยู่กับการศึกษาของพนักงานเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องของประเทศผู้นำเข้า อย่างไรก็ตามใบรับรองที่ออกโดยพนักงานเจ้าหน้าที่เกี่ยวกับศาสนาอิสลาม (religious authorities) ของประเทศผู้ส่งออก ควรได้รับการยอมรับในหลักการจากประเทศผู้นำเข้า เว้นแต่ประเทศผู้นำเข้าให้เหตุผลความจำเป็นสำหรับความต้องการเฉพาะอย่างอื่น

#### 1. ขอบข่าย

1. ข้อแนะนำนี้เสนอมาตรการในการดำเนินการสำหรับการใช้คำ ฮาลาล (Halal) อดอ้าง (Claim) บนฉลากอาหาร
2. ข้อแนะนำนี้ใช้ปฏิบัติสำหรับใช้คำ ฮาลาล และคำอื่นที่เทียบเท่า ในการอดอ้างตามที่กำหนดในมาตรฐานทั่วไปสำหรับการแสดงฉลากของอาหารบรรจุหีบห่อ (General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods) และรวมถึงการใช้เครื่องหมายการค้า ชื่อยี่ห้อ และชื่อทางด้านธุรกิจ
3. ข้อแนะนำนี้ต้องการให้เป็นส่วนเสริมของร่างข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการอดอ้างฉบับแก้ไข (Draft Revision of the Codex General Guidelines on Claims) และไม่สามารถใช้แทนข้อห้ามใดๆ ในร่างข้อแนะนำดังกล่าว

#### 2. คำนิยาม

อาหารฮาลาล (Halal Food) หมายถึง อาหารที่ได้รับอนุญาตตามบทบัญญัติศาสนาอิสลาม และควรมีคุณสมบัติครบถ้วน ดังนี้

1. ไม่ประกอบด้วยหรือไม่บรรจุสิ่งใดที่ไม่ถูกต้องตามบทบัญญัติศาสนาอิสลาม
2. ต้องไม่ถูกเตรียม แปรรูป ขนส่ง หรือเก็บรักษา โดยใช้เครื่องมือหรือสิ่งอุปกรณ์ที่ไม่ได้ปลอดจากสิ่งผิดบทบัญญัติศาสนาอิสลาม
3. ต้องไม่อยู่ในขั้นตอนการเตรียม การแปรรูป การขนส่ง หรือการเก็บรักษา โดยสัมผัสโดยตรงกับอาหารที่ไม่ถูกเกณฑ์ข้อ 1. และ 2. นอกจากข้อ 1 ข้างต้น อาหารฮาลาล สามารถเตรียม แปรรูป หรือเก็บรักษา
4. ในบริเวณที่แยกออกจากกัน หรือสายการผลิตที่แยกจากกัน ภายในสถานที่ผลิตเดียวกันกับการผลิตอาหารที่ไม่เป็นฮาลาล จัดหามาตรการที่จำเป็นที่ควรดำเนินการเพื่อป้องกันการสัมผัสกันระหว่างอาหารฮาลาลกับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาล
5. โดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการใช้กับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาล โดยจัดหาวิธีการล้างทำความสะอาดที่เหมาะสมตามข้อกำหนดของศาสนาอิสลามที่สามารถสังเกตเห็นได้

### 3. เกณฑ์กำหนดสำหรับการใช้คำฮาลาล

#### ● อาหารที่ถูกต้องตามกฎหมาย

คำว่า ฮาลาล จะใช้สำหรับอาหารที่ได้พิจารณาแล้วว่าถูกต้องตามกฎหมาย ภายใต้บทบัญญัติศาสนาอิสลามจะถือว่าแหล่งอาหารทั้งหมดถูกต้องตามกฎหมาย ยกเว้นแหล่งอาหารต่อไปนี้ รวมทั้งผลิตภัณฑ์และสิ่งที่ได้จากแหล่งอาหารดังกล่าว ซึ่งได้รับการพิจารณาว่า ไม่ถูกต้องตามกฎหมาย

1. อาหารที่ได้จากสัตว์ เช่น หมูและหมูป่า สุนัข งู และลิง สัตว์กินเนื้อเป็นอาหารที่มีเขี้ยวและกรงเล็บ เช่น สิงโต เสือ หมี และสัตว์อื่นที่คล้ายกัน นกกินเหยื่อที่มีกรงเล็บ เช่น นกอินทรี นกแร้ง และนกที่คล้ายกันอื่นๆ สัตว์ทำลาย เช่น หนู ตะขาบ แมลงป่อง และสัตว์ที่คล้ายกันอื่นๆ สัตว์ที่ห้ามฆ่าในศาสนาอิสลาม เช่น มด ผึ้ง และนกหัวขวาน สัตว์ที่น่ารังเกียจโดยทั่วไป เช่น เห็บ หมัด ไร เหา แมลงวัน หนอน และสัตว์ที่คล้ายกันอื่นๆ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ จระเข้ และสัตว์ที่คล้ายกันอื่นๆ ล่อ และลาที่เป็นสัตว์เลี้ยง สัตว์น้ำที่มีพิษและเป็นอันตรายทุกชนิด สัตว์อื่นๆ ที่ไม่ได้ฆ่าถูกต้องตามกฎหมายศาสนาอิสลาม เลือด (โลหิต)
2. อาหารที่ได้จากพืช - พืชที่มีพิษและเป็นอันตราย ยกเว้นเมื่อสารพิษและอันตรายได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
3. เครื่องดื่ม - เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มทุกชนิดที่มีพิษและอันตราย
4. วัตถุเจือปนอาหาร - วัตถุเจือปนอาหารมีที่มาจากทั้ง 3 แหล่งคือ สัตว์ พืช และเครื่องดื่มข้างต้น

- **วิธีการฆ่าสัตว์**

สัตว์บกที่ฆ่าถูกต้องตามกฎศาสนาอิสลาม การฆ่าควรต้องดำเนินการให้เป็นตามข้อกำหนดสุขลักษณะที่ดีของเนื้อสดที่โคเด็กซ์แนะนำ (Codex Recommended Code of Hygienic Practice for Fresh Meat) และตามข้อกำหนดต่อไปนี้

1. คนฆ่าสัตว์ ควรต้องเป็นมุสลิม ผู้ยึดมั่นในหลักการศาสนาอิสลามอย่างเคร่งครัด และมีความรู้ในวิธีการฆ่าสัตว์ตามหลักของศาสนาอิสลาม
2. สัตว์ที่ถูกฆ่า – ควรถูกต้องตามกฎของศาสนาอิสลาม, ควรเป็นสัตว์ที่ยังมีชีวิต หรือเชื่อว่ายังมีชีวิต ณ เวลาที่ฆ่าสัตว์นั้น, ก่อนที่จะฆ่าสัตว์แต่ละตัวควรต้องกล่าวคำว่า "บิสมิลลา" (ในนามของอัลเลาะห์พระผู้เป็นเจ้า) อย่างทันทีทันใด
3. อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการฆ่า ควรต้องมีความคม และไม่ยกออกจากตัวสัตว์ในระหว่างการฆ่า
4. การฆ่า ควรต้องตัดหลอดเลือด หลอดอาหาร เส้นเลือดแดงใหญ่ และเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอให้ขาด

- **การเตรียม การผลิต การบรรจุหีบห่อ การขนส่งและการเก็บรักษา**

อาหารทุกชนิดควรเตรียม แปรรูป บรรจุหีบ ขนส่ง และเก็บรักษาในลักษณะที่เป็นไปตามข้อกำหนดของค่านิยามข้างต้น และเป็นไปตามหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหารของโคเด็กซ์ (Codex General Principles on Food Hygienic) และมาตรฐานอาหารของโคเด็กซ์เรื่องอื่นที่เกี่ยวข้อง

#### 4. ความต้องการเพิ่มเติมในเรื่องฉลาก

1. เมื่ออ้างว่าอาหารเป็นฮาลาล คำว่าฮาลาล หรือคำที่เทียบเท่า ควรปรากฏบนฉลากอาหาร
2. ตามร่างข้อแนะนำทั่วไปเกี่ยวกับการอ้างบนฉลาก ฉบับแก้ไข (Draft Revision of the Codex General Guidelines on Claims) การอ้าง ฮาลาล ไม่ควรใช้ในทางที่อาจทำให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารที่คล้ายคลึงกัน หรืออ้างว่าอาหารฮาลาลมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่า หรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ

### 2.3.2 มาตรฐานฮาลาลประเทศไทย

มาตรฐานอาหารฮาลาลของประเทศไทยถือกำเนิดขึ้นนับแต่การประกาศใช้มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ มอก. 1701-2541 ข้อเสนอแนะทั่วไปสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล" ในปี พ.ศ.2541 อย่างไรก็ตาม การได้มาของมาตรฐานดังกล่าวสืบเนื่องมาจากมาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ซึ่งเกิดก่อนการจัดโครงสร้างการบริหารคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย (คกอท.) ตามพระราชบัญญัติการบริหารองค์กรในศาสนาอิสลาม พ.ศ.2540 จึงเสมือนเป็นการประกาศฝ่ายเดียว ผู้จัดทำ (ภาครัฐ) มิได้ปฏิบัติ ขณะที่ผู้ปฏิบัติ (คกอท.) มิได้จัดทำ นอกจากนี้งานมาตรฐานอาหารยังย้ายจากกระทรวงอุตสาหกรรมไปยังกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีการจัดตั้งสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ขึ้นในปี พ.ศ. 2545 มาตรฐานฮาลาลประเทศไทยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช.8400-2550 “อาหารฮาลาล”

##### 1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานอาหารฮาลาลนี้ครอบคลุม การจัดหาวัตถุดิบ การจัดเตรียม กระบวนการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา การนำเสนอและการจัดจำหน่าย การรักษาความปลอดภัยของอาหาร และการแสดงเครื่องหมายและฉลาก

1.2 อาหารฮาลาลที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานนี้จะต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของศาสนาบัญญัติอิสลาม กฎหมายและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยอาหารและการแสดงเครื่องหมายและฉลาก

1.3 เนื่องจากการตีความบทบัญญัติอิสลามของนิกายและสาขานิกาย อาจมีบางส่วนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้น ประเทศผู้ส่งออกและประเทศผู้นำเข้าหรือผู้ประกอบการค้าของทั้งสองประเทศควรมีข้อตกลงระหว่างกันให้ชัดเจน

##### 2. นิยาม

2.1 ฮาลาล หรือหะลาล (Halal) หมายถึง สิ่งของหรือการกระทำใดๆ ซึ่งได้รับการอนุญาตตาม ศาสนบัญญัติอิสลาม

2.2 นญิส (Najis) หมายถึง สิ่งสกปรกตามศาสนบัญญัติอิสลาม ซึ่งมี 3 ประเภท ได้แก่ นญิสชนิดเบา (มุกคือฟะพะฮะฮ) นญิสชนิดปานกลาง (มุตะวัสสิฎฎะฮ) และนญิสชนิดหนัก (มุกซ็อลละเฮะฮ) รวมถึงอาหารที่ปนเปื้อนหรือสัมผัสกับนญิส เว้นแต่จะได้ออกนญิสนั้นออกไปแล้ว (ตามภาคผนวก ค)

2.3 อัล-กุรอาน หมายถึง คัมภีร์ในศาสนาอิสลามที่อัลลอฮ์ (ซุบะฮานะฮูวะตะอะลา) ทรงประทานให้ศาสดามูฮัมมัด (ศ็อลลัลลอฮูอะลัยฮิวะสัลลัม) เป็นธรรมนูญสูงสุดของศาสนาอิสลาม



2.4 อัล-ซุนนะห์ หมายถึง แบบฉบับจากศาสดามูฮัมมัด (คือลัทธิล่อลวงอะลีย์ฮะลัลัม) ทั้งทางด้านวจนะ การปฏิบัติ การยอมรับ และถือเป็นบทบัญญัติรองจากอัล-กุรอาน

2.5 อัล-อิจมะห์ หมายถึง ความเห็นพ้องต้องกันหรือมติเอกฉันท์ หรือการที่ผู้ที่มีความสามารถวิเคราะห์หาข้อกำหนดจากตัวบทอัล-กุรอาน หรืออัล-ซุนนะห์ได้เองเห็นพ้องต้องกันในการตีความศาสนบัญญัติอิสลาม

2.6 อัล-กียาส หมายถึง การนำเอาสิ่งหนึ่งไปเปรียบเทียบกับสิ่งหนึ่ง เช่น เกิดเหตุการณ์หนึ่งขึ้นนักการศาสนาจะทำการเปรียบเทียบเหตุการณ์นั้นกับอัล-กุรอานหรืออัล-ซุนนะห์หรืออัล-อิจมะห์ หรือเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นคล้ายคลึงกันเพื่อการตีความทางศาสนา

2.7 ศาสนบัญญัติอิสลาม (Islamic law) หมายถึง บทบัญญัติที่มุสลิมต้องถือปฏิบัติ โดยยึดตัวบทจากคัมภีร์อัล-กุรอาน อัล-ซุนนะห์ อัล-อิจมะห์ และอัล-กียาส ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันตามแนวทางในสาขานิกาย (มัซฮับ) ชาฟีอีหรือฮานาฟีหรือมาลิกีหรือฮัมบาลีขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศที่จะนำแนวทางนี้ไปใช้ปฏิบัติว่ายึดถือในแนวทางใด

2.8 อาหารฮาลาล (Halal food) หมายถึง อาหารที่ได้รับอนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม รวมถึงสิ่งอื่นที่มีความหมายเช่นเดียวกันและมีคุณสมบัติครบถ้วน ตามข้อกำหนดในมาตรฐานฉบับนี้

### 3. เกณฑ์กำหนดสำหรับการใช้คำ “ฮาลาล”

#### 3.1 อาหารที่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม

ตามศาสนบัญญัติอิสลามถือว่าแหล่งอาหารทั้งหมดเป็นที่อนุญาต ยกเว้นแหล่งอาหารรวมทั้งผลิตภัณฑ์และสิ่งที่ได้จากแหล่งอาหาร ต่อไปนี้

- 3.1.1 สุกกร หมูป่า และสุนัข
- 3.1.2 งูและลิง
- 3.1.3 สัตว์กินเนื้อเป็นอาหารที่มีเขี้ยวและกรงเล็บ เช่น สิงโต เสือ หมี และสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
- 3.1.4 นกล่าเหยื่อที่มีกรงเล็บ เช่น นกอินทรี นกแร้ง และนกอื่นๆที่คล้ายกัน
- 3.1.5 สัตว์ทำลาย เช่น หนู ตะขาบ แมลงป่อง และสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
- 3.1.6 สัตว์ที่ห้ามฆ่าในศาสนาอิสลาม เช่น มด ผึ้ง และนกหัวขวาน
- 3.1.7 สัตว์ที่น่ารังเกียจโดยทั่วไป เช่น เหย็บ หมัด ไร เหา แมลงวัน หนอน และสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
- 3.1.8 สัตว์ที่อาศัยอยู่ได้ทั้งบนบกและในน้ำ เช่น กบ จระเข้ เต่าและสัตว์อื่นๆที่คล้ายกัน
- 3.1.9 ลาและฟอที่เป็นสัตว์เลี้ยงใช้งาน

- 3.1.10 สัตว์น้ำที่มีพิษหรือเป็นอันตรายทุกชนิด เว้นแต่พิษหรืออันตรายดังกล่าวได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
- 3.1.11 สัตว์บก สัตว์ปีก สัตว์ประเภทนกที่ไม่ได้ถูกเชือดถูกต้องตามศาสนบัญญัติอิสลาม
- 3.1.12 เลือดที่มาจากการเชือดหรือไหลออกจากร่างกาย
- 3.1.13 อาหารที่ได้จากพืชที่มีพิษหรือทำให้มีนเมาหรือเป็นอันตราย เว้นแต่เมื่อสารดังกล่าวได้ถูกกำจัดออกระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว
- 3.1.14 อาหารและเครื่องดื่มที่ก่อให้เกิดความมีนเมา
- 3.1.15 เครื่องดื่ม แร่ธาตุจากธรรมชาติ และวัตถุเคมีทุกชนิดที่เป็นพิษและก่อให้เกิดอันตราย
- 3.1.16 อาหารและเครื่องดื่มที่มีส่วนประกอบอาหารที่ได้จากการตัดแปรพันธุกรรม (Genetically Modified Organism: GMO) จากสารพันธุกรรมของสัตว์ที่ไม่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลาม
- วัตถุเจือปนอาหารหรือส่วนผสมอาหารที่มาจากแหล่งข้างต้นตั้งแต่ 3.1.1 – 3.1.16
- 3.2 การเชือดสัตว์
- 3.2.1 การเชือดสัตว์ที่อนุญาตตามศาสนบัญญัติอิสลามต้องแยกออกจากสัตว์ที่ไม่อนุญาตอย่างเด็ดขาดตามหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้
- 3.2.1.1 การเชือดต้องกระทำโดยมุสลิมผู้ศรัทธาและมีความรู้ความเข้าใจในวิธีการเชือดสัตว์ตามศาสนบัญญัติอิสลาม
- 3.2.1.2 สัตว์ที่จะทำการเชือดต้องเป็นสัตว์ที่อนุญาตให้ใช้เป็นอาหารได้ตามศาสนบัญญัติอิสลาม
- 3.2.1.3 สัตว์จะต้องมีชีวิต ณ เวลาที่เชือด
- 3.2.1.4 การเชือดต้องตัดหลอดลม หลอดอาหาร เส้นเลือดแดงใหญ่ และเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอให้ขาดในคราวเดียว หากมีความจำเป็นจะต้องรีบดำเนินการเชือดซ้ำก่อนสัตว์ตาย
- 3.2.1.5 ก่อนที่จะเชือดสัตว์ต้องกล่าวคำว่า “บิสมิลลา อัลลอฮุอักบร” หรือ “บิสมิลลาฮิรเราะฮมานิรเราะฮีม”
- 3.2.1.6 การเชือดให้ใช้เฉพาะมีดหรือเครื่องมือที่คมและไม่ควรยกออกจากลำคอสัตว์ขณะทำการเชือด สัตว์จะต้องตายเพราะการเชือด โดยไม่ทรมาน
- 3.2.2 ไม่ควรทำให้สัตว์สลบหรือหมดสติก่อนการเชือด (Stunning) เว้นแต่กรณีที่เป็นจำเป็น การกระทำดังกล่าวต้องเป็นไปตามที่กำหนดไว้ในภาคผนวก.ของมาตรฐาน

3.2.3 ไม่ควรเชือดสัตว์ปีกโดยใช้เครื่องเชือดกล เว้นแต่กรณีที่เป็น การกระทำ ดังกล่าวต้องเป็นไปตามที่กำหนดไว้ในภาคผนวก ข

3.3 การจัดเตรียม การผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา

3.3.1 อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตจะฮาลาลได้ต่อเมื่อเข้าเงื่อนไขดังต่อไปนี้

3.3.1.1 อาหารต้องไม่มีส่วนประกอบที่มาจากสัตว์ซึ่งไม่อนุญาต หรือมาจากสัตว์ที่ เชือดไม่เป็นไปตาม ศาสนบัญญัติอิสลาม

3.3.1.2 ไม่มีองค์ประกอบตามข้อ 3.1

3.3.1.3 อาหารต้องจัดเตรียม การผ่านกระบวนการผลิต การเก็บรักษาหรือการ ขนส่ง โดยใช้อุปกรณ์ที่ไม่มีปนเปื้อนฮาลาลและเป็นไปตามข้อ 3.3.3

3.3.1.4 ในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง อาหารเหล่านั้นจะต้องแยกออกจาก อาหารอื่นๆที่ไม่มีคุณสมบัติตามข้อ 3.3.1.1-3.3.1.3 ข้างต้น หรือจากสิ่งที่เป็นฮาลาล

3.3.2 ในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง วัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตและผลิตภัณฑ์ อาหารฮาลาลจะต้องแยกออกจากอาหารอื่นๆที่ไม่มีคุณสมบัติตามข้อ 3.3.1.1-3.3.1.3 หรือมี มาตรการที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งที่เป็นฮาลาล

3.3.3 กรณีการใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการใช้กับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาลมาก่อน ต้องล้างทำความสะอาดตามศาสนบัญญัติอิสลาม ตามข้อ 3.4

3.3.4 เครื่องมือ ภาชนะ เครื่องจักรและอุปกรณ์การผลิตอาหารฮาลาลต้องไม่ทำมาจากวัสดุที่เป็นฮาลาล หรือต้องไม่มีส่วนประกอบของฮาลาลตามศาสนบัญญัติอิสลาม

3.3.5 กรณีที่มีการเปลี่ยนสายการผลิตอาหารที่ปนเปื้อนฮาลาลชนิดหนึ่ง มาผลิตอาหารฮาลาล สายการผลิตนั้นจะต้องได้รับการล้างและชำระตามศาสนบัญญัติอิสลาม ขั้นตอนการปฏิบัตินี้ จะต้องอยู่ภายใต้การดูแลและทวนสอบผลการล้างโดยองค์กรทางศาสนาอิสลาม เมื่อได้มีการ เปลี่ยนสายการผลิตมาสู่การผลิตอาหารฮาลาลแล้วต้องผลิตอาหารฮาลาลเท่านั้น หากมีการ เปลี่ยนสายการผลิตไปสู่การผลิตอาหารที่ปนเปื้อนฮาลาลชนิดหนึ่ง จะไม่อนุญาตให้ กลับมาสู่การผลิตอาหารฮาลาลอีก

3.4 การชำระล้างฮาลาล

เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง หรือปนเปื้อนฮาลาลทุกชนิดไม่ว่า จะมองเห็นหรือไม่ต้องกำจัดด้วยวิธีล้างทำความสะอาดที่ระบุไว้ในศาสนบัญญัติอิสลาม มีวิธี ปฏิบัติดัง ภาคผนวก ค

3.5 สุขลักษณะอาหาร

อาหารทุกชนิดควรเตรียม ผลิต บรรจุ ผ่านกระบวนการบรรจุ ขนส่ง และเก็บรักษา ตาม ศาสนบัญญัติอิสลามและกฎหมายที่เกี่ยวข้องหรือตามหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหาร

โครงการมาตรฐานอาหารเอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ (Codex General Principles on Food Hygiene) และมาตรฐานอาหารของโครงการมาตรฐานอาหาร เอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ เรื่องอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

### 3.6 บรรจุภัณฑ์และการบรรจุ

3.6.1 บรรจุภัณฑ์ต้องฮาลาล และไม่เป็นวัตถุที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และไม่ทำมาจากสิ่งทีประกาศว่าเป็นนอญิสตามศาสนาบัญญัติอิสลาม

3.6.2 กระบวนการบรรจุต้องกระทำในพื้นที่ที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนนอญิสและปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะ

### 3.7 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ วิธีการนำเสนอ การโฆษณา และการจัดจำหน่าย

ต้องแยกผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล ที่ต้องการเก็บรักษา การนำเสนอ และการจัดจำหน่ายออกจากผลิตภัณฑ์ที่ไม่ฮาลาลหรือควรแสดงเครื่องหมาย “ฮาลาล” หรือ “ฮาลาลฮะยี” (เชือดถูกต้องตามศาสนาบัญญัติอิสลาม) ตามแต่กรณี จำแนกในทุกขั้นตอนของการดำเนินงาน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปะปนหรือปนเปื้อนจากสิ่งที่ไม่ฮาลาล

### 3.8 การแสดงเครื่องหมายและฉลาก

อาหารฮาลาลให้มีข้อกำหนดฉลากเพิ่มเติมดังนี้

3.8.1 วัสดุที่เป็นฉลากและสัมผัสโดยตรงกับผลิตภัณฑ์อาหาร ต้องไม่เป็นวัสดุที่เป็นนอญิสหรือมีส่วนประกอบที่เป็นนอญิสหรือปนเปื้อนนอญิส และไม่เป็นวัสดุที่มีอันตรายต่อสุขภาพ

3.8.2 อาหารที่จะกล่าวอ้างว่าเป็นอาหารฮาลาล ต้องแสดงคำว่าฮาลาล (Halal) หรือข้อความอื่นที่เทียบเท่า เช่น ฮาลาลฮะยี หรือเครื่องหมายที่ได้รับการยอมรับจากหน่วยรับรองบนฉลากอาหาร

3.8.3 การกล่าวอ้างว่าเป็นอาหารฮาลาลต้องไม่กระทำในลักษณะที่ก่อให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหาร และไม่ทำให้เกิดความเข้าใจผิดเกี่ยวกับการได้รับการรับรองฮาลาล หรือทำให้เข้าใจว่าอาหารฮาลาล มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ

ถึงแม้ประเทศไทยจะมีมาตรฐานฮาลาลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องตามหลักการศาสนาอิสลาม แต่ก็พบผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลที่ผ่านมาจำนวนไม่น้อยเกิดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมอยู่บ่อยครั้งทั้งที่เกิดจากความรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากการจงใจ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในอาหารฮาลาลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

## 2.4 การพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหาร

ความซับซ้อนของกระบวนการผลิตอาหารทางอุตสาหกรรมสมัยใหม่ส่วนใหญ่พัฒนาขึ้นโดยผู้ที่ขาดความเข้าใจความต้องการของผู้บริโภคมุสลิมก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามตามศาสนบัญญัติอิสลามเข้าสู่ผลิตภัณฑ์อาหารที่จำหน่ายให้แก่ผู้บริโภคมุสลิมอยู่บ่อยครั้ง จากการตรวจสอบของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าเฉพาะสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีการใช้เอนไซม์จากสุกรมีมากถึง 186 ตัวนำไปใช้ผลิตอาหารมากกว่าพันรายการ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2556) นอกจากนี้การปลอมปนเนื้อสัตว์ต้องห้ามเพื่อทดแทนเนื้อสัตว์ที่ราคาแพงกว่าด้วยเนื้อสัตว์ราคาถูกก็พบอยู่บ่อยครั้ง เช่นการปลอมปนเนื้อสุกร เนื้อม้า เนื้อหนูและเนื้อสุนัข ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อวัว (ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2556) เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและประกันคุณภาพของอาหารฮาลาลรวมถึงการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีของประเทศในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนจึงมีความจำเป็น ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในอาหารฮาลาล โดยเฉพาะการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (พรพิมล มะหะหมัด, 2549)

พัฒนาการในการตรวจวัดการปนเปื้อนและปลอมปนผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการจำแนกชนิดของสัตว์ต่างชนิดออกจากกัน ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์จากอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องดังตัวอย่างต่อไปนี้

### 2.4.1 เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Chromatography techniques)

เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคหนึ่งที่ยิยมใช้ในการจำแนกชนิดของสัตว์ ซึ่งอาจจะตรวจวัดจากโปรตีน กรดไขมัน หรือจากสารประกอบระเหย (von Bargen et al., 2014) จากงานวิจัยที่ผ่านมาใช้เครื่อง Gas chromatography- Mass spectrometry (GC-MS) ร่วมกับเครื่อง Electronic nose ในการตรวจวัดสารประกอบระเหยสำคัญเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อสุกรและสัตว์อื่นๆ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสุกรและสัตว์อื่นๆ ได้ โดยสารประกอบระเหยสำคัญเป็นตัวชี้บ่งในสุกรคือ Heptanol ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันของกรดไขมัน ในงานวิจัยนี้สรุปผลโดยใช้สถิติ PCA ในการจัดกลุ่มแยกความแตกต่าง (Nurjuliana et al., 2011) อีกรงานวิจัยหนึ่ง S.Soncin และคณะ (2007) ได้ตรวจวัดหาสารประกอบระเหยสำคัญในเนื้อสัตว์ 3 ชนิดได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อเป็ด เนื้อห่าน เพื่อใช้เป็นวิธีในการแยกความแตกต่างของสัตว์แต่ละชนิดในการตรวจรับวัตถุดิบเนื้อสัตว์ โดยใช้เทคนิค Headspace Solid Phase Micro extraction (SPME) วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง GC-MS คอลัมน์ที่ใช้คือ DB-WAX จากผลการทดลองพบว่ามีสารประกอบระเหยสำคัญที่ให้กลิ่นรสแตกต่างกัน ซึ่งสุกรและเป็ดมีสัดส่วนสารประกอบระเหยคล้ายคลึงกันแต่ความ

เข้มข้นต่างกัน สารประกอบระเหยตัวที่ให้กลิ่นรสที่สำคัญในเนื้อสุกรคือ 3-hydroxy-2-butanone เป็นสารกลุ่มคีโตน เกิดจากการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัว นอกจากนี้สารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีความโดดเด่นในเนื้อสุกรเช่น 1-hexanol และ 3-methyl-1-butanol ในขณะที่สารประกอบระเหยตัวที่โดดเด่นในเนื้อเป็ดคือ 1-hexanol เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการรีดักชันของอัลดีไฮด์ สำหรับเนื้อห่านสารประกอบระเหยที่สำคัญคือคาร์บอนไดซัลไฟด์ เป็นสารกลุ่มที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าสัตว์ต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อสีและกลิ่นรสที่แตกต่างกัน ซึ่งใช้การจัดกลุ่มสารระเหยที่วิเคราะห์ได้ในการแยกความแตกต่างซึ่งอาศัยโปรแกรมทางสถิติขั้นสูงในการวิเคราะห์ข้อมูล อีกทั้งเทคนิคนี้ยังมีปัจจัยที่รบกวนระบบอยู่หลายปัจจัยด้วยกัน (Soncin et al., 2007) อีกเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับของเทคนิคทางโครมาโทกราฟี คือการตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัดเป็น Tandem Mass Spectrometer ในการตรวจวัดการปนเปื้อนของเนื้อม้าและเนื้อสุกร ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวฮาลาล โดยเริ่มจากสกัดโปรตีนและย่อยด้วยกรดเพื่อวิเคราะห์หาสายเปปไทด์ที่เฉพาะเจาะจงของสัตว์ทั้งสามชนิดซึ่งจะใช้เป็น Biomarker ในการแยกความแตกต่าง โดยดูจากเส้นกราฟ Electrochemical profile ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อม้าได้ที่ระดับการปลอมปนที่ 0.55 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อสุกรที่ระดับการปลอมปนที่ 0.13 เปอร์เซ็นต์ (von Bargen et al., 2013) จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยที่ผ่านมาของเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ส่วนใหญ่ทดลองกับตัวอย่างอาหารที่เป็นเนื้อดิบยังไม่ได้ผ่านการแปรรูปอาหาร และมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ค่อนข้างยุ่งยาก ดังนั้นเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ยังไม่เหมาะสมกับการตรวจวัดเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปทางอาหารได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้ามีส่วนประกอบและวัตถุดิบหลากหลายชนิดที่อาจเกิดการรบกวนการตรวจวัดได้

#### 2.4.2 เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology techniques)

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนหรือใช้จำแนกชนิดของสัตว์ต้องห้ามเช่น เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีหาโปรตีนแอนติเจนโดยอาศัยหลักการการเกิดอันตรปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างโปรตีนกับโปรตีน จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ ในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ยังไม่ผ่านการปรุงสุก ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวได้ในปริมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์และเมื่อนำเนื้อสุกรไปผสมกับเนื้อสัตว์อื่นๆ พบว่าสามารถตรวจวัดเนื้อสุกรและเนื้อสุกรผสมกับเนื้ออื่นที่ความเข้มข้น 10 กรัม/กิโลกรัม และพบว่าเมื่อนำเนื้อผสมนี้ไปผ่านความร้อนแล้วความสามารถในการตรวจก็ลดลง

(Ayaz et al., 2006) อีกรงานวิจัย Adam T และคณะ (2017) ได้เปรียบเทียบด้านความไวและความจำเพาะของเทคนิค ELISA และเทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจวัดเพื่อบ่งชี้ชนิดของเนื้อสัตว์ในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ตัวอย่างไส้กรอก เนื้อกระป๋องและอาหารสัตว์ เริ่มจากเก็บตัวอย่างอาหารที่มีเนื้อสุกรและเนื้อวัวผสมอยู่ในอัตราส่วนต่างๆ จากการทดลองพบว่าเทคนิค Real-Time PCR สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรต่ำสุดได้ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์และตรวจวัดเนื้อวัวต่ำสุดที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เทคนิค ELISA สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรต่ำสุดได้ที่ 10 เปอร์เซ็นต์และตรวจวัดเนื้อวัวต่ำสุดที่ 1 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าเทคนิค ELISA มีปัญหาในการตรวจวัดสำหรับอาหารที่ผ่านการปรุงสุกด้วยอุณหภูมิสูงๆ รวมถึงอาหารที่ผ่านการแปรรูปหลายขั้นตอน เนื่องจากโปรตีนไม่สามารถทนความร้อนสูงได้ ปริมาณที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างจึงมีปริมาณต่ำ ทำให้ความไวและความจำเพาะในการตรวจวัดลดลง (Perestam et al., 2017)

จากข้อจำกัดที่กล่าวมา ดังนั้นเทคนิคนี้จึงไม่เป็นที่นิยมในการตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาล เพราะในการตรวจวัดอาหารฮาลาลต้องการความแม่นยำ ความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจงที่สูง การตรวจวิเคราะห์โดยใช้ดีเอ็นเอเป็นแหล่งตรวจวัดพบว่ามีข้อดีกว่าหลายประการ เนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงทนความร้อนมากกว่าโปรตีนและสามารถตรวจวัดได้ในเนื้อผสม อีกทั้งมีความไวและความจำเพาะสูง (Cai et al., 2012)

### 2.4.3 เทคนิคทางดีเอ็นเอ (DNA based techniques)

พัฒนาการการใช้ดีเอ็นเอในการตรวจวัด เริ่มแรกจะใช้เทคนิค DNA hybridization ซึ่งมีข้อเสียเนื่องจากใช้เวลานานในการติดฉลากโพรบ ต่อมาจึงพัฒนาใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) โดยเทคนิค PCR จะใช้ไพรเมอร์ สายสั้นๆ ของลำดับเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Rahman et al., 2014) และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเป็นเทคนิค Multiplex PCR โดยรวมไพรเมอร์ มากกว่า 2 คู่ขึ้นไปเพื่อใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่หลายเป้าหมาย อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR เวลาตรวจวัดปริมาณผลผลิตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดลงด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งมีความยุ่งยาก อาจเกิดการปนเปื้อนได้ และใช้เวลาในการตรวจสอบนาน (Kitpipit et al., 2014) เทคนิค Real-Time PCR จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับนิยมนิยมมากกว่า มีงานวิจัยที่ผ่านมาประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการจำแนกหรือบ่งชี้การปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในอาหารฮาลาลไว้มากมาย ดังที่จะได้กล่าวต่อไป

## 2.5 เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-Time PCR )

เทคนิค Real-Time PCR จัดเป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม (Conventional PCR) ความสำเร็จของ Real-time PCR เกิดมาจากการพัฒนาเทคโนโลยีที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนของการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยาในสารละลาย โดยการใช้ตัวตรวจตามที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง (Fluorochromes) และส่วนของการพัฒนาเครื่อง Real-Time PCR ประกอบด้วย เครื่อง PCR ที่ถูกตรวจวัดด้วยรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง และส่วนที่เป็นตัวตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจากผลผลิตปฏิกิริยาดังกล่าว ในหลอดปฏิกิริยา ซึ่งสัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปยังหน่วยประมวลผลเพื่อทำการรายงานการตรวจวิเคราะห์ออกมา เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค Real-Time PCR กับเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมพบว่า เทคนิคใหม่มีความสะดวก รวดเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำที่สูงกว่า แต่ข้อได้เปรียบเหล่านี้ล้วนได้มาจากหลักการการเรียนรู้ การปรับปรุงพัฒนาที่มีรากฐานมาจากเทคนิคแบบดั้งเดิมแทบทั้งสิ้น (วีระพงษ์ ลุติตานนท์, 2557)

### 2.5.1 หลักการ Real-Time PCR

เทคนิค Real-Time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะโดยใช้หลักการเดียวกับหลักการ PCR แบบดั้งเดิม ส่วนการวัดผลผลิตปฏิกิริยา Real-time PCR สามารถตรวจวัดผลผลิตเกิดขึ้นตามสภาพจริง ณ เวลาจริง การตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยา สามารถทำได้จากการใช้เทคนิคการตรวจตามผลผลิตที่สามารถก่อดัชนีสัญญาณการเรืองแสงที่ตรวจวัดได้ ซึ่งมีกันอยู่หลายแบบได้แก่

#### 2.5.1.1 การใช้สีที่มีคุณสมบัติเกาะติดกับดีเอ็นเอสายคู่

สีที่มีคุณสมบัติเกาะติดกับดีเอ็นเอสายคู่อย่างไม่จำเพาะมีหลายตัว (DNA Binding dye) เช่น Ethidium bromide, YO-PRO, SYBR Green I, หรือ BEBO ฯลฯ แต่สีที่นิยมใช้ในงาน Real-time PCR มากที่สุด คือ สี SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (Excite) ด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมจะมีการคายพลังงาน (Emission) ออกมาในรูปแบบของแสงในช่วงคลื่น ( $\lambda$ ) ยาวขึ้น ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real-time PCR ในขั้นตอนของการ Annealing และ Extension ปริมาณสีที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่สร้างขึ้นใหม่จะมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นและสูงสุดในช่วงท้ายของขั้นตอน Extension และเมื่อเข้าสู่ขั้นตอน Denaturation สายดีเอ็นเอแยกจากกัน ทำให้สีถูกปลดปล่อยจากสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้การเรืองแสงลดลง ดังนั้นการบันทึกค่าความเข้มการเรืองแสงในระบบนี้เกิดขึ้นในรอบ ในช่วงสุดท้ายของขั้นตอน Extension ซึ่งปริมาณความเข้มของการเรืองแสง จะแปรผันตามปริมาณของผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่เพิ่มขึ้น



แม้ว่าการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่เป็นแบบไม่จำเพาะ คือ สามารถจับได้ทั้งผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่จำเพาะและไม่จำเพาะรวมถึงไพเมอร์-ไดเมอร์ (Primer-dimer) แต่ก็มีวิธีที่สามารถแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากไพเมอร์-ไดเมอร์หรือผลผลิตปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะออกจากผลผลิตปฏิกิริยาที่จำเพาะได้ โดยการใช้การเปรียบเทียบค่าอุณหภูมิหลอมเหลวหรือ Melting Temperature (Tm) โดยค่า Tm เป็นค่าอุณหภูมิที่ 50% ของดีเอ็นเอสายคู่ที่แยกจากกัน ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่จำเพาะสำหรับดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่ และแปรผันโดยตรงกับลำดับเบส ปริมาณ %GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น (Pereira et al., 2017)

#### 2.5.1.2 การใช้ตัวตรวจตามติดฉลากสีเรืองแสง

ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงสุดในการทำ Real-Time PCR เช่น ต้องการบ่งชี้ผลผลิตปฏิกิริยาที่จำเพาะมากกว่าการใช้ค่า Tm ในระบบใช้สี SYBR Green I หรือต้องการบ่งชี้การกลายพันธุ์ชนิด Point mutation ในดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งไม่สามารถกระทำได้โดยการใช้สี SYBR Green I ในกรณีเหล่านี้จำเป็นต้องใช้ตัวตรวจตามที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และติดฉลากสีเรืองแสงในการตรวจหา สีเรืองแสงที่ใช้ติดฉลากเข้ากับสายของตัวตรวจตามที่จำเพาะจะประกอบด้วยสี 2 ชนิด เมื่อมีการกระตุ้น (Excite) ด้วยแสงจากเครื่อง Real-Time PCR สีเรืองแสงชนิดแรกๆ ที่เรียกว่า สีตัวให้ (Donor dye) จะปลดปล่อย (Emit) พลังแสงในช่วงคลื่นที่ยาวขึ้นไปกระตุ้นสีเรืองแสงชนิดที่สอง ที่เรียกว่า สีตัวรับ (Acceptor dye) ให้มีการถูกกระตุ้นและปลดปล่อยพลังงานออกมา ปฏิกิริยาการถ่ายทอดพลังงานในลักษณะเช่นนี้เรียกว่า Fluorescent Resonance Transfer หรือ FRET สำหรับการตรวจสัญญาณจากปฏิกิริยา FRET อาจวัดจากพลังงานแสงที่คายจากสีตัวให้หรือสีตัวรับก็ได้ ขึ้นกับชนิดของตัวตรวจตามที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สำหรับการติดฉลากสีเรืองแสงเข้ากับตัวตรวจตามเพื่อสามารถตรวจจับสัญญาณเรืองแสงที่เกิดจากปฏิกิริยา FRET สามารถทำได้หลายลักษณะดังนี้คือ ตัวตรวจตามชนิด Hybridization probes ตัวตรวจตามชนิด Hydrolysis Probes (Taqman® Probes) หรือตัวตรวจตามชนิด Molecular Beacons ซึ่งในการเลือกใช้ตัวติดนี้ก็จะขึ้นอยู่กับลักษณะงานที่ประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR (วีระพงศ์ ลูจิตานนท์, 2557)

#### 2.5.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในงานด้านต่างๆ

จากความสำเร็จและข้อได้เปรียบของเทคนิค Real-Time PCR ไม่ว่าจะเป็นเรื่องความสะดวกและง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตปฏิกิริยาที่ให้รายละเอียดได้มากกว่าโดยใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าและรวดเร็วกว่า และที่สำคัญมีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือกว่า (Kesmen et al., 2013) ทำให้เทคนิค Real-Time PCR ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานมากมายตัวอย่างเช่น

2.5.2.1 การตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว (Rapid diagnosis) เนื่องจากการทำ Real-Time PCR มีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อมกับการตรวจวัด ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจวัดเหมือน PCR แบบดั้งเดิม จึงใช้เวลาในการตรวจที่สั้นกว่า จึงเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่เพาะเลี้ยงไม่ได้หรือเพาะเลี้ยงยาก ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน ซึ่งช่วยให้แพทย์สามารถให้การวินิจฉัยและการรักษาได้อย่างถูกต้องและทันที่ที่ Sven Poppert และคณะ (2005) ได้ใช้เทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจแยกหาสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งส่วนใหญ่สามารถเกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย การแยกสาเหตุว่ามาจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียหรือกลุ่มไวรัส โดยทั่วไปสามารถใช้อาการทางคลินิกร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการพื้นฐาน แต่ถ้าโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบเกิดจากไวรัส ซึ่งสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อในกลุ่ม *Herpesviruses* การตรวจโดยใช้เทคนิค Real-Time PCR จะสามารถใช้การตรวจแยกเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ได้อย่างรวดเร็ว และทำให้แพทย์สามารถให้การดูแลรักษาได้อย่างถูกต้องมีประสิทธิภาพ (Poppert et al., 2005)

2.5.2.2 การตรวจวัดเชิงปริมาณ ในปัจจุบันความต้องการในการตรวจวัดเชิงปริมาณมีมากขึ้น ทำให้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR มาตรวจวัดเชิงปริมาณอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง งานตรวจวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ เช่น การประยุกต์ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดเพื่อใช้ในการทำนายโรคและติดตามการรักษา การตรวจหา Minimal residual disease ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว สำหรับงานด้านอื่นมักเป็นการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน และ Non-coding RNA ฯลฯ (Schuler & Dolken, 2006)

2.5.2.3 การตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR โดย Melting curve จากที่ได้กล่าวข้างต้น ดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่มีค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ( $T_m$ ) ที่ต่างกัน โดยความแตกต่างจะแปรผันโดยตรงกับลำดับเบส ปริมาณ %GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ นั้น ดังนั้น จึงสามารถนำค่า  $T_m$  ของผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR มาประยุกต์ใช้ในงานมากมาย เช่น ใช้จำแนกผลผลิตปฏิกิริยาต่างชนิดในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันออกจากกัน ตลอดจนการประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดต่างสายพันธุ์ การหาการกลายพันธุ์ หรือการตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) โดยเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่าเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRMA) เป็นต้น ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในหัวข้อ 2.7

### 2.5.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค Real-Time PCR กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาล

จากความสามารถของเทคนิค Real-Time PCR ผูกกับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามของผู้บริโภคชาวมุสลิม เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและการประกันคุณภาพของอาหารฮาลาล หน่วยงานต่างๆ ด้านมาตรฐานอาหารฮาลาลรวมถึงนักวิจัยในหลายประเทศได้ใช้เทคนิค Real-Time PCR เป็นฐานในการพัฒนาการตรวจวัดการปนเปื้อน เนื่องจากความจำเพาะและความไวของเทคนิค Real-Time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้ ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์ได้ (Cai et al., 2012)

Dooley J.J. และคณะ (2009) ใช้เทคนิค Real-Time PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 12S rRNA พบว่าสามารถจำแนกเนื้อสุกรจาก เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อแพะ เนื้อไก่ เนื้อไก่งวง เนื้อเป็ด และเนื้อห่าน และสามารถบอกปริมาณของเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในเนื้อผสมได้ โดยที่สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรปนเปื้อนที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมีความไวในการตรวจวัดเนื้อสุกรในเนื้อสุกรผสมกับเนื้อวัวที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.5 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับกับ Miju Kim และคณะ (2016) ใช้ TaqMan Real-Time PCR ในการตรวจวัดเนื้อสุกรที่ผสมในเนื้อวัวและเนื้อไก่อวมถึงประยุกต์ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสุกรในตัวอย่างอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความไวสำหรับการตรวจวัดในเนื้อผสมอยู่ที่ช่วง 0.1 เปอร์เซ็นต์ และความไวในการตรวจวัดสำหรับอาหารแปรรูปที่ 0.1 พิโคกรัม (Kim et al., 2016) อีกรงานวิจัยหนึ่ง Hassan A. Al-Kahtani และคณะ (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพในการตรวจวัดเนื้อสุกรระหว่างเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมกับเทคนิค Real-Time PCR โดยการผสมเนื้อสุกรลงในเนื้อสัตว์อื่นๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อไก่ เนื้ออูฐ เนื้อกระต่าย เนื้อแพะและเนื้อแกะ ผสมที่อัตราส่วน 0%, 1%, 5%, 10% และ 20% ซึ่งพบว่าความไวในการตรวจวัดของเทคนิค Real-Time PCR อยู่ที่ 0.00001 นาโนกรัม ขณะที่ความไวในการตรวจวัดด้วยเทคนิค PCR ตรวจวัดได้ต่ำสุดเพียง 0.1 นาโนกรัม ซึ่งเทคนิค Real-Time PCR มีความไวกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมถึง 10,000 เท่า (Al-Kahtani et al., 2017)

## 2.6 มัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ (Multiplex Real-time PCR)

Multiplex Real-time PCR เป็นการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าหนึ่งเป้าหมายพร้อมกันในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันแบบเรียลไทม์ ถึงแม้ว่าการปรับสภาวะของ Multiplex Real-time PCR มีความยุ่งยากกว่าการทำ Real-Time PCR ต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงเป้าหมายเดียว หรือที่เรียกว่า ซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ (Singleplex PCR) แต่ในสถานการณ์และเงื่อนไขความต้องการหลายด้าน เทคนิค Multiplex Real-time PCR ก็เป็นสิ่งที่จำเป็นและสามารถให้คำตอบที่ดีกว่า มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือกว่า ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิค Multiplex Real-time PCR ไปประยุกต์ใช้ในงานหลายสาขาโดยเฉพาะอย่างยิ่งงานทางด้านจุลชีววิทยา ได้มีการนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรค ไม่ว่าจะเป็นเชื้อไวรัส แบคทีเรีย ปรสิท สำหรับงานด้านพันธุศาสตร์ ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการขาดหายของยีน การกลายพันธุ์และ polymorphisms ยกตัวอย่างเช่น ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยทางห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณของตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย เช่น ชิ้นเนื้อ biopsy น้ำไขสันหลัง ฯลฯ ในขณะที่แพทย์ผู้รักษามักมีความต้องการในการตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมายหลายชนิด อาทิเช่น ต้องการตรวจเชื้อที่อาจเป็นสาเหตุของความเจ็บไข้ของผู้ป่วย ซึ่งมีเชื้อที่อยู่ในข่ายต้องสงสัยหลายชนิด หรือต้องตรวจวิเคราะห์ยีนในหลายตำแหน่งหรือหลายยีน ฯลฯ ดังนั้น Multiplex Real-time PCR จึงเหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิทยาศาสตร์หลายสาขา ไม่ว่าจะเป็นงานวิจัยหรืองานตรวจประจำก็ตาม (Poppert et al., 2005)

สำหรับการประยุกต์ใช้ Multiplex Real-time PCR สำหรับตรวจวัดเพื่อจำแนกชนิดของสัตว์หรืองานตรวจวัดด้านฮาลาล Multiplex Real-time PCR เริ่มมีบทบาท เนื่องจากสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจมากกว่าหนึ่งเป้าหมายในเวลาเดียวกัน กรณีที่มีการปนเปื้อนหรือต้องการจำแนกสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป รวมถึงสามารถเพิ่มตัวควบคุมภายในเข้าไปในระบบ นอกจากนี้ในการตรวจวัดก็ใช้ปริมาณตัวอย่างตรวจที่น้อยกว่า ลดปริมาณน้ำยา เวลา ค่าใช้จ่าย และแรงงานที่ใช้ในการตรวจ ซึ่งช่วยให้สามารถรองรับปริมาณการตรวจในจำนวนมากได้ อีกทั้งยังลดการปนเปื้อนในงาน PCR (Hossain et al., 2017) เนื่องจากจำนวนครั้งของการดูดถ่ายตัวอย่าง ส่วนประกอบของน้ำยา PCR Master mix เพื่อการทดสอบลดลง ซึ่งส่งผลให้โอกาสการเกิดผลบวกเท็จลดลงด้วย ส่วนข้อด้อยที่สำคัญที่สุดของเทคนิค Multiplex Real-time PCR คือ มีความลำบากและความยุ่งยากในการปรับสภาวะการทำในระบบ Multiplex ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อยีนเป้าหมายทุกยีน

ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR ในงานจำแนกชนิดของสัตว์ในตัวอย่างอาหาร Muhammad Safdar และ Yasmeen Junejo (2016) ได้ใช้ Multiplex Real-time PCR โดยรวมไพรเมอร์ของสัตว์ 5 ชนิดและพืช 1 ชนิด รวมเป็น 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ม้า

แกะ สัตว์ปีก วัว สุกร และถั่วเหลือง เพื่อทดสอบว่าในตัวอย่างอาหารมีส่วนประกอบของเนื้อสัตว์หรือพืชอะไรบ้าง เป็นการทวนสอบความถูกต้องของฉลากอาหารตามที่ระบุไว้และตรวจการปนเปื้อนสุกรในตัวอย่างอาหาร โดยเกณฑ์ในการจำแนกชนิดจะดูที่ขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาและค่า  $T_m$  ที่ออกแบบให้อุณหภูมิห่างกันอย่างชัดเจน และพบว่าในการศึกษาครั้งนี้ความไวในการตรวจวัดสัตว์และพืชแต่ละชนิดอยู่ที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (Safdar & Junejo, 2016)

A. Iwobi และคณะ (2017) ตรวจวัดเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนเนื้อสุกรในเนื้อวัวที่อัตราส่วนต่างๆ โดยรวมไพรเมอร์ของสุกร 3 คู่ เข้าด้วยกันและปรับสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด พบว่าความสามารถไวในการตรวจวัดสูงสุดอยู่ที่ 20 เท่าของจีโนมต่อมิลลิลิตร อีกรงานวิจัยหนึ่งของ A. Iwobi ใช้ Multiplex Real-time PCR ในการตรวจวัดปริมาณต่ำสุดของการผสมเนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อสุกรในเนื้อวัวสับและนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปตรวจวัดในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้รวมไพรเมอร์และโพรบของสัตว์ทั้ง 4 ชนิดเข้าด้วยกัน พร้อมปรับสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัด โดยพบว่าความสามารถในการตรวจวัดสัตว์แต่ละชนิดต่ำสุดที่ 10 เท่าของจีโนมต่อมิลลิลิตร (Iwobi et al., 2017)

จากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ารูปแบบการทำ Multiplex Real-time PCR สามารถทำได้เป็น 3 รูปแบบด้วยกันคือ 1. การทำ Multiplex Real-time PCR โดยวิเคราะห์ค่า melting temperature ( $T_m$ ) ที่แตกต่างกันของผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ซึ่งการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า  $T_m$  ของผลผลิตปฏิกิริยา สามารถใช้ SYBR Green I หรือใช้ตัวตรวจตามที่จำเพาะในการตรวจวัดได้ 2. การทำ Multiplex Real-time PCR โดยใช้ตัวตรวจตามที่มีค่าจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละเป้าหมาย ซึ่งตัวตรวจตามที่จำเพาะต่อแต่ละเป้าหมายทำการติดฉลากด้วยสีเรืองแสงที่แตกต่างกัน (multicolor probes) และ 3. การทำ Multiplex Real-time PCR โดยใช้ค่า  $T_m$  ร่วมกับการใช้ตัวตรวจตามที่ติดสีเรืองแสงที่แตกต่างกัน ในลักษณะรูปแบบเช่นนี้ ทำให้ความสามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจได้จำนวนมากชนิดกว่าสองแบบแรก (วีระพงษ์ ลุกลิตานนท์, 2557)

แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้ตัวตรวจตาม คือ จำเป็นต้องมีการติดฉลากและการแยกความแตกต่างถูกจำกัดอยู่ที่บริเวณลำดับเบสของตัวตรวจตามเท่านั้น ในขณะที่การใช้ SYBR Green I ก็มีข้อจำกัดเช่นกัน โดยกรณีการวิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันน้อย เช่น ตัวอย่างที่เป็น SNP มักไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำ melting curve เส้นกราฟที่ได้มักไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างในลำดับเบสที่มีเพียงเล็กน้อยได้ เป็นเหตุให้มีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ melting curve ให้มีรายละเอียดที่สูงขึ้นที่เรียกว่า High Resolution Melting Analysis (HRMA) หรือการวิเคราะห์การละลายแบบแยกชัดสูง (Druml & Cichna-Markl, 2014)

## 2.7 เทคนิคการวิเคราะห์การละลายแบบแยกชัดสูง (High Resolution Melting Analysis (HRMA)) (วีระพงศ์ ลุติตานนท์, 2557)

การพัฒนาเทคนิค HRMA จนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เป็นผลมาจากการคิดค้นปัจจัยที่สำคัญ 2 ปัจจัย คือ สีเรืองแสงและเครื่องตรวจวิเคราะห์ รวมถึงโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์ข้อมูล

สำหรับสีเรืองแสงที่ใช้สำหรับเทคนิค HRMA เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ที่มีความอิ่มตัวสูง (Saturation dye) สาเหตุที่ต้องใช้สีประเภทนี้เพราะในการทำ HRMA จำเป็นต้องใช้สีเรืองแสงในระดับความเข้มข้นที่สูง เพื่อให้สีสามารถเกาะเข้ากับดีเอ็นเอสายคู่ทั้งหมดในปฏิกิริยาในลักษณะอิ่มตัว (Amaral et al., 2017) ถ้าสีมีปริมาณการเกาะที่ไม่อิ่มตัว ในช่วงการทำ HRMA จะมีสีหลุดออกจากดีเอ็นเอสายคู่ที่มีค่า  $T_m$  ต่ำกว่าไปเกาะจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีค่า  $T_m$  สูงกว่า ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณแสงจากดีเอ็นเอสายคู่ที่มีค่า  $T_m$  ต่ำกว่าได้ และไม่สามารถแยกแยะกลุ่มผลผลิตปฏิกิริยาที่มีค่า  $T_m$  แตกต่างกันอย่างน้อยมากหรือไม่แตกต่างกันเลย แต่มีลักษณะรูปร่างของ Melting curve ที่ต่างกัน (Klomtong et al., 2016) เช่น กรณีการตรวจหา SNP ในตัวอย่างดีเอ็นเอ เป้าหมายที่มีลักษณะเป็น Heterozygotes ซึ่งในกรณีเช่นนี้ ถ้าใช้สี SYBR Green I จะไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของผลผลิตปฏิกิริยาที่มีมากกว่าหนึ่งชนิด โดยแต่ละชนิดของผลผลิตปฏิกิริยา มีความแตกต่างระหว่างกันแค่หนึ่งเบสเท่านั้น และไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ SYBR Green I ได้ เนื่องจาก SYBR Green I ที่มีความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งปฏิกิริยา PCR ได้ (Song et al., 2017) ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามในการหาสีเรืองแสงตัวใหม่ประเภท Saturating dye ที่สามารถใช้ในความเข้มข้นสูง เพื่อให้เกิดการเกาะเข้ากับสายดีเอ็นเออย่างอิ่มตัวโดยไม่ยับยั้งทั้งปฏิกิริยา PCR ซึ่งสีเรืองแสงประเภทนี้ที่ค้นพบและนำมาใช้ในเทคนิค HRMA ก็คือ LCGreen ในปัจจุบันยังมีสีเรืองแสงชนิดอื่นสำหรับใช้ในงาน HRMA เช่น LCGreen® Plus ของบริษัท Biofire Diagnostics Syto9® ของบริษัท Life Technologies (ปัจจุบัน ถูกซื้อโดยบริษัท Thermo Fisher) EvaGreen® ของบริษัท Biotium และ LightCycler® 480 ResoLight Dye ของบริษัท Roche ฯลฯ (Amaral et al., 2017)

ส่วนเครื่องตรวจ HRMA มีทั้งที่ใช้สำหรับการตรวจ HRMA โดยเฉพาะ และที่เป็นเครื่อง Real-Time PCR โดยมีการผนวกส่วนของการตรวจ HRMA เข้าไปในตัวเครื่องด้วย เครื่องแต่ละรุ่น แต่ละบริษัทแม้จะสามารถใช้ในการตรวจ HRMA ได้ แต่คุณสมบัติในด้านความละเอียดสำหรับการตรวจวิเคราะห์แยกแยะ รวมถึงความถูกต้องแม่นยำมีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปเครื่องที่ตรวจ HRMA เพียงอย่างเดียวมักมีความละเอียดถูกต้องแม่นยำในการตรวจวัดได้ดีกว่าเครื่อง Real-Time PCR ที่ผนวกการตรวจ HRMA ยกตัวอย่างเช่น เครื่องตรวจ HRMA รุ่น HR-1 ของบริษัท Idaho

Technology เป็นเครื่องที่มีความสามารถในการตรวจ HRMA ได้ละเอียดสูงสุดในบรรดาเครื่องตรวจ HRMA ที่มีอยู่ในตลาด (Ganopoulos et al., 2013) โดยเครื่องมีอัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิอยู่ที่  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{วินาที}$  และมีการเก็บบันทึกข้อมูล 200 ครั้ง/ $1^{\circ}\text{C}$  ทำให้สามารถเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล HRMA ที่มีความละเอียดสูงได้ในเวลาอันรวดเร็วเพียง 5.8 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง แม้ว่าเครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจได้ครั้งละหนึ่งตัวอย่างก็ตาม สำหรับเครื่อง Real-Time PCR ที่ผนวกกับการตรวจ HRMA เครื่องแต่ละรุ่นแต่ละผู้ผลิตมีรายละเอียดและคุณสมบัติการทำงานการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน เช่น เครื่อง Rotor-Gene 6500 HRM Real-time PCR ของบริษัท Corbett (ปัจจุบันเป็นของบริษัท QIAGEN แล้ว) มีอัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิอยู่ที่  $0.006^{\circ}\text{C}/\text{วินาที}$  และมีการเก็บบันทึกข้อมูล 10 ครั้ง/ $1^{\circ}\text{C}$  ใช้เวลาการทำ HRMA ประมาณ 97 นาทีต่อตัวอย่าง ในขณะที่เครื่อง LightCycler 480 ของบริษัท Roche มีอัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิอยู่ที่  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{วินาที}$  และมีการบันทึกข้อมูล 10 ครั้ง/ $1^{\circ}\text{C}$  ใช้เวลาในการทำ HRMA ที่ 6.3 นาทีต่อตัวอย่าง สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เครื่อง LightCycler 480 ซึ่งมีคุณสมบัติและขีดความสามารถเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามได้



ภาพที่ 1 เครื่องตรวจ HRMA รุ่น HR-1 ของบริษัท Idaho Technology เป็นเครื่องที่มีความสามารถในการตรวจ HRMA ได้ละเอียดสูงสุดในบรรดาเครื่องตรวจ HRMA ที่มีอยู่ในตลาด

### 2.7.1 หลักการเทคนิค HRMA

เทคนิค HRMA เป็นการวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature -  $T_m$ ) ของผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่จะมีค่า  $T_m$  ที่ต่างกัน โดยความแตกต่างจะแปรผันโดยตรงกับลำดับเบส ปริมาณ %GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่

การตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA เป็นการวิเคราะห์แบบระบบปิดหลังจากการทำ Real-Time PCR โดยมีการเติมสีประเภท saturation dye ลงไปในหลอดปฏิกิริยาช่วงการเตรียม PCR Master

mix เทคนิค HRMA มีการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดปฏิกิริยา จากอุณหภูมิประมาณ 50°C ไปถึง 95°C และมีการบันทึกสารเรืองแสงตลอดเวลา เมื่ออุณหภูมิค่อยเพิ่มขึ้นไปจนถึงค่า  $T_m$  ของผลผลิตปฏิกิริยา สายดีเอ็นเอจะแยกออกจากกัน ทำให้สีเรืองแสงหลุดออกจากสายดีเอ็นเอและค่าการเรืองแสงลดลง สำหรับ Melting curve ของ HRMA เป็นเส้นกราฟที่สร้างจากค่าความเข้มการเรืองแสง กับค่าอุณหภูมิ โดยทั่วไป ใช้ทั้งค่า  $T_m$  และรูปร่างของเส้นกราฟ ซึ่งสามารถแสดงผลค่าของ  $T_m$  ได้หลายรูปแบบ เช่น Melting peaks, derivative plot, หรือ difference plot โดยแต่ละรูปแบบมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์และการแปลผลแตกต่างกันออกไป มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แยกแยะรูปแบบทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Pereira et al., 2017)

## 2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในงานด้านต่างๆ

### 2.7.2.1 การตรวจหารูปแบบพันธุกรรม (Genotyping)

เทคนิค HRMA ก่อนมีการใช้สีประเภท Saturation dye เริ่มจากการนำ HRMA มาประยุกต์ใช้ด้วยการติดฉลากสีเรืองแสงที่ตัวไพรเมอร์ และใช้ในการหารูปแบบพันธุกรรมของยีน ซึ่งพบว่า การทำ HRMA ที่ใช้ไพรเมอร์ติดฉลากสีเรืองแสงสามารถนำมาใช้ในการแยกแยะรูปแบบพันธุกรรมของยีนได้ทั้งที่เป็นแบบ homozygous และ heterozygous ซึ่งสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ก็คือต้องพยายามออกแบบให้ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR มีขนาดที่สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ เนื่องจากความไวของการตรวจแยกแยะจะสูง เมื่อผลผลิตปฏิกิริยามีขนาดสั้น อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดสำคัญของเทคนิค HRMA โดยที่ใช้ไพรเมอร์ที่ฉลากสีเรืองแสงก็คือ การออกแบบไพรเมอร์ต้องให้อยู่คร่อมบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบส ซึ่งข้อจำกัดนี้ได้หมดไปเมื่อมีการนำสีจำพวก Saturation dye มาใช้ ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

สุวิมล กิรติพิบูลและคณะ (2015) ใช้เทคนิค HRMA ร่วมกับ MLVA (Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis) ในการตรวจหารูปแบบพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella Typhimurium* โดยเก็บตัวอย่างเชื้อ 117 ตัวอย่าง จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โรงงานฆ่าสัตว์ ตลาดสดและมือพนักงาน ซึ่งสามารถจำแนกได้ 43 รูปแบบพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ผลจากรูปแบบ Derivative plot และ Difference plot ที่แตกต่างกัน (Keeratipibul et al., 2015)



### 2.7.2.2 การตรวจแยกชนิดเชื้อจุลินทรีย์

เทคนิค HRMA สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการตรวจพิสูจน์หรือตรวจแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจุบันได้เริ่มมีการใช้เทคนิค HRMA อย่างแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องใช้ตัวตรวจตาม โดยให้ผลถูกต้อง แม่นยำเทียบเท่าวิธีมาตรฐาน

ในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย Cheng และคณะ (2006) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย 25 สายพันธุ์ เริ่มจากการทำ PCR ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ต่อยีน 16S rRNA แล้วตามด้วยการตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA ซึ่งพบว่า สามารถตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 9 สายพันธุ์อย่างชัดเจนจากกราฟชนิด Melting peaks ส่วนที่เหลืออีก 16 สามารถแยกออกได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะ Melting peaks (J. C. Cheng et al., 2006; Magnino et al., 2009) ส่วน Odell และคณะ (2009) ได้นำเทคนิค HRMA มาใช้ในการพิสูจน์เชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย (mycobacteria) โดยการทำ PCR ยีน Heat shock protein 65 ตามด้วยเทคนิค HRMA ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจพิสูจน์แยกเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium chelonae-abscessus* group ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อมัยโคแบคทีเรียประเภทโตเร็ว ประกอบด้วยเชื้อ *M.chelonae*, *M.abscessus* และ *M.immunogenum* ซึ่งเชื่อดังกล่าวทำการตรวจแยกทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปได้ยาก แต่การตรวจแยกเชื้อในกลุ่มนี้มีความจำเป็นมาก เนื่องจากเชื้อแต่ละตัวมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน การได้ผลพิสูจน์เชื้อที่แน่นอนช่วยให้แพทย์สามารถให้การรักษาได้อย่างถูกต้อง

เทคนิค HRMA สำหรับการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไวรัส ปรานทิพย์ อุทัยวัตรและคณะ (2015) ใช้เทคนิค HRMA ในการจำแนกเชื้อไวรัส *Human Papillomavirus* (HPV) เป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูก ในการทดลอง เริ่มจากการทดสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปากมดลูก เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ของเชื้อด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน E6/E7 ของ HPVs ตรวจแยกชนิดเชื้อ โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างขนาดของผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR และ %GC ในยีนเป้าหมาย ซึ่งเทคนิค HRMA ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 90 นาที จากการประเมินเทคนิค HRMA ด้านความไวและความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย พบว่าเทคนิค HRMA มีความไวในการตรวจหาเชื้อ HPV type 16, 58 ที่ 104 copies และ HPV type 18, 45 ที่ 103 copies ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างสายพันธุ์ โดยสรุปแล้ว เทคนิค HRMA นี้ สามารถตรวจแยกเชื้อได้ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง

### 2.7.2.3 การกรดตรวจหาการกลายพันธุ์และการแปรผันลำดับเบส

เทคนิค HRMA มีข้อได้เปรียบโดยสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงแค่หนึ่งเบสรวมถึงการเพิ่ม (insertion) หรือการขาดหาย (deletion) ของเบสได้ จากข้อได้เปรียบของการวิเคราะห์ HRMA ที่เหนือเทคนิคอื่น ทำให้ในปัจจุบันเทคนิค HRMA เริ่มเป็นที่

นิยมใช้ในงานการกราดตรวจหาการกลายพันธุ์ เนื่องจากขั้นตอนการทำ HRMA ไม่จำเป็นต้องนำตัวอย่างผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ไปผ่านกระบวนการเพิ่มเติม รวมถึงต้นทุนการตรวจวัดที่ต่ำกว่าเทคนิคอื่น นอกจากนี้การตรวจวัดด้วย HRMA ไม่มีผลกระทบต่อสภาพและคุณสมบัติของผลผลิตปฏิกิริยา ดังนั้นจึงสามารถนำผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA ไปทำการตรวจพิสูจน์ต่อโดยการหาลำดับเบสได้ด้วยเทคนิค DNA Sequencing (วิระพงศ์ ลูติ ตานนท์, 2557)

### 2.7..3 การประยุกต์ใช้เทคนิค HRM กับอุตสาหกรรมอาหาร

จากความสำเร็จและศักยภาพข้างต้นของเทคนิค HRMA ปัจจุบันเทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิทยาศาสตร์ในหลายแขนง สำหรับอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ประยุกต์ใช้เพื่อประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อทวนสอบการปลอมปนหรือการแทนที่ของวัตถุดิบที่ไม่ระบุไว้ในฉลาก Klomtong K และคณะ (2016) ได้พัฒนาเทคนิคตรวจสอบการปลอมปนเนื้อกระป๋องในเนื้อโค เริ่มวิจัยโดยเก็บตัวอย่างจากเลือดและเนื้อเยื่อจากโคและกระป๋องทั้งหมด 29 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน cytochrome b ของโคและกระป๋องด้วยเทคนิค HRMA ได้ผลผลิตปฏิกิริยา ที่ขนาด 472 คู่เบสและ 124 คู่เบส ตามลำดับ จากผลการทดสอบ พบว่าสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของโคและกระป๋องที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1 พิโคกรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ Melting peak พบว่ามีรูปแบบที่แตกต่างกัน และยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคและกระป๋องได้โดยมี ดูจากค่า  $T_m$  เฉลี่ยที่ต่างกัน คือ  $82.40 \pm 0.4$  °C และ  $79.80 \pm 0.2$  °C ตามลำดับ ในการตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนของดีเอ็นเอกระป๋องในดีเอ็นเอโค พบว่าสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนดีเอ็นเอกระป๋องในดีเอ็นเอโคได้ที่ระดับตั้งแต่ 0.1% ถึง 40% ดังนั้นเทคนิค HRMA จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความไวสูงสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเนื้อกระป๋องและเนื้อวัวได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดการปลอมปนเนื้อสัตว์อื่นในผลิตภัณฑ์จากเนื้อโคได้ (Klomtong et al., 2016)

Sakaridis และคณะ (2013) ได้ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อกระป๋องในผลิตภัณฑ์ที่ระบุเนื้อสัตว์ไว้ตามฉลาก ได้แก่ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว เนื้อสุกร เนื้อแพะและเนื้อแกะ รวมถึงการทดสอบขีดความสามารถในการตรวจวัดโดยทำการผสมเนื้อกระป๋องลงไปในตัวอาหารที่สัดส่วนต่างๆ เริ่มต้นโดยการทำ PCR ยีนบริเวณ 12S rRNA และ 18S rRNA และวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค HRMA ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่ความยาว 220 คู่เบส และ 70 คู่เบส ตามลำดับ สามารถตรวจวัดการปลอมปนเนื้อกระป๋องในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆได้โดยดูจากค่า  $T_m$  ที่จำเพาะต่อกระป๋องสำหรับความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ระดับ 0.1 % ถึง 50 % อีกรงานวิจัยหนึ่งของ Sakaridis และคณะ ในปีเดียวกัน (Ioannis Sakaridis et al., 2013) ได้ใช้เทคนิค HRMA ในการตรวจสอบการปนเปื้อน

น้ำนมโคในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำนมกระป๋อง เช่น ซีส โยเกิร์ต ครีม เนย ในการทดลองนี้สำหรับ กระป๋องได้ออกแบบไพโรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน 12S rRNA ส่วนโคอกแบบไพโรเมอร์ที่จำเพาะ เจาะจงต่อยีน D-loop หลังจากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Duplex HRMA เมื่อทำการวิเคราะห์ Melting peaks พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคและกระป๋องได้โดยมีค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนน้ำนมโคในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำนมกระป๋องที่ระดับต่ำสุด 1 % ได้ (I. Sakaridis et al., 2013)

You และคณะ (2013) ได้ใช้ Multiplex HRMA ในการแยกเนื้อกวจากเนื้อสัตว์ 6 ชนิด ได้แก่เนื้อวัว เนื้อแพะ เนื้อม้า เนื้อลา เนื้อสุกร และเนื้อไก่ โดยออกแบบไพโรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ สัตว์แต่ละชนิด เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่ความยาว แตกต่างกันสอดคล้องกับที่ทำนายไว้ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ Melting peaks พบว่าสัตว์แต่ละชนิดมี Melting peaks ที่แตกต่างกัน โดยสามารถบ่งชี้สัตว์แต่ละชนิดได้ (You et al., 2013)

นอกจากนี้เทคนิค HRMA ยังถูกนำมาประยุกต์สำหรับการจำแนกชนิดของพืชสำหรับ อุตสาหกรรมอาหาร Xanthopoulou (2016) และคณะ ได้ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการ บ่งชี้ชนิดของชาสมุนไพร 9 ชนิด วัตถุประสงค์เพื่อเป็นการระบุแหล่งที่มาของชาเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค เนื่องจากมีการปลอมปนประเภทชาอยู่บ่อยครั้ง เริ่มต้นจากการออกแบบไพโรเมอร์จากยีน ITS2 ออกแบบให้มีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ที่ต่างกัน รวมถึง ค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งค่า  $T_m$  ที่ แตกต่างกันทำให้สามารถระบุประเภทของชาทั้ง 9 ชนิดได้ (Xanthopoulou et al., 2016)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า เทคนิค HRMA เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการ ตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมได้ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหารูปแบบพันธุกรรมและการกลายพันธุ์ การกราด ตรวจการกลายพันธุ์และการแปรผันในลำดับเบส รวมถึงการตรวจวัดการปนเปื้อน การบ่งชี้ชนิด การ ตรวจสอบย้อนกลับ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เทคนิค HRMA จัดเป็นเทคนิคที่มีความสะดวก ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน รวดเร็วมีความยืดหยุ่นในการ ประยุกต์ใช้ ค่าใช้จ่ายถูก และที่สำคัญคือ มีความถูกต้องแม่นยำสูงเทียบเท่าหรือสูงกว่าวิธีการอื่น ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติของเครื่องตรวจวิเคราะห์ HRMA รวมถึงโปรแกรมตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ด้วย

จากข้อได้เปรียบหลายประการของเทคนิค HRMA นี้ ทางผู้วิจัยจึงเห็นศักยภาพของเทคนิค ดังกล่าว จึงนำมาศึกษาและพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ครั้งแรกกับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลของประเทศไทย ในการตรวจวัดการปนเปื้อนและบ่งชี้สัตว์ต้องห้าม 6 ชนิดที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารฮาลาล ได้แก่ สุกร สุนัข ลิง หนู แมว ลา นอกจากนี้ยังทดสอบ ความจำเพาะความไว และความเชื่อถือได้ของ เทคนิคในการตรวจวัดการปนเปื้อนเพื่อนำเทคนิคที่พัฒนาได้ไปใช้เป็นเครื่องมือในการประกันคุณภาพ มาตรฐานอาหารฮาลาลของประเทศไทยต่อไปรวมถึงใช้คุ้มครองผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการบริโภค อาหารที่ถูกต้องตามฉลากอาหารที่ระบุไว้

## บทที่ 3

### ระเบียบแบบแผนการทดลอง

#### 3.1 สารเคมี และอุปกรณ์

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNeasy Blood & Tissue Kit ) (QIAGEN, Germany)
  - สารละลายบัฟเฟอร์ ATL
  - สารละลาย Proteinase K
  - สารละลาย RNase
  - สารละลาย Absolute EtOH
  - สารละลายบัฟเฟอร์ AW1
  - สารละลายบัฟเฟอร์ Aw2
  - สารละลายบัฟเฟอร์ AE
  - สารละลายบัฟเฟอร์ PBS
  - DNeasy mini spin column & หลอดเก็บสารละลาย (Collection tube)
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร(Wizard® Genomic DNA Purification Kit, USA )
  - สารละลาย Cell Lysis
  - สารละลาย Nuclei Lysis Solution
  - สารละลายตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation)
  - สารละลาย DNA Rehydration
  - สารละลาย RNase A
  - สารละลาย Iso-propanol
  - สารละลาย 70% ethanol
  - สารละลาย Proteinase K (20 mg/ml in water)
3. PCR Master Mix
  - 2XQIAGEN Multiplex PCR (Qiagen, Hilden, Germany)
  - Forward primer (10  $\mu$ M) ของสั้ตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด
  - Reverse primer (10  $\mu$ M) ของสั้ตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด
  - 20x LightCycler®480 ResoLight dye (Roche, Germany)

- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบในสภาพจริง LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Germany)
4. เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ shaking incubator (Eppendorf, Germany)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Micro centrifuge) (Tony Micro ONE, Japan)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Tomy Tx-201, Japan)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet CLASS II) (Nuair, USA)
8. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balance) (Pioneer, ohaus, USA)
9. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ (Laboratory freezer (-20)) (Thermo, Germany)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (G-560E Vortex Genie 2, USA)
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Nanodrop 2000c (Thermo, Germany)
12. เครื่องวัดขนาดดีเอ็นเอ QIAxcel Capillary Electrophoresis system (Qiagen, Hilden, Germany)
13. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Autopipett)
14. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microcentrifuge tube)
15. เครื่องปั่นอาหาร (Otto, Thailand)
16. อุปกรณ์เครื่องครัว เช่น ช้อน ส้อม มีด เขียง เป็นต้น
17. อุปกรณ์เครื่องแก้วอื่นๆ

## ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

### 3.2 ตัวอย่างสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

- 3.2.1 ตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุม (DNA control) ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ สุนัข (*Sus scrofa*) สุนัข (*Canis lupus familiaris*) ลิง (*Macaca fascicularis*) หนูนา (*Rattus argentiventer*) แมว (*Felis catus*) และลา (*Equus asinus*) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้มีตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่เป็นเลือด เก็บตัวอย่างจากตลาดหรือห้างสรรพสินค้าทั่วไป รวมถึงขอความอนุเคราะห์จากหน่วยงานราชการ ได้แก่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย กองพันสัตว์ต่าง กรมการทหารบก เป็นต้น เก็บตัวอย่างจำนวนชนิดละ 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเลือกเอาตัวอย่างมาตัวอย่างละ 100 กรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งบด (pestle) จากนั้นเก็บใส่ถุงถนอมอาหารที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือด บีบตัวอย่างมาแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป ทั้งนี้ได้รวบรวมตัวอย่างและแหล่งที่มาไว้ในตารางที่ 3
- 3.2.2 ตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ฮาลาล 4 ชนิด ได้แก่ ไก่ (*Gallus gallus*) ม้า (*Equus caballus*) แพะ (*Capra aegagrus*) และแกะ (*Ovis aries*) เพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity test) เก็บตัวอย่างที่เป็นเนื้อสัตว์และตัวอย่างที่เป็นเลือด จำนวนสัตว์ชนิดละ 5 ตัวอย่าง
- 3.2.3 ตัวอย่างลูกชิ้นเนื้อวัว ที่มีการผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.4 ตัวอย่างลูกชิ้นและไส้กรอกทางการค้าที่มีเนื้อสัตว์ต้องห้ามเป็นส่วนผสมจำนวน 10 ตัวอย่าง
- 3.2.5 ตัวอย่างอาหารทางการค้าวางขายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 260 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างอาหารออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 100 ตัวอย่าง กลุ่มเครื่องปรุงรสและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 65 ตัวอย่าง กลุ่มขนมอบกรอบและซ็อกโกแลต 50 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 25 ตัวอย่าง และกลุ่มผลิตภัณฑ์จากนม 20 ตัวอย่าง

ชนิดสัตว์	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่มา
สุกร ( <i>Sus scrofa</i> )	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดสามย่าน ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
สุนัข ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	เนื้อเยื่อ และเลือด	คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ.กรุงเทพฯ
ลิง ( <i>Macaca fascicularis</i> )	เนื้อเยื่อ และเลือด	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย จ.กรุงเทพฯ
หนูนา ( <i>Rattus argentiventer</i> )	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดในจังหวัดอยุธยา
แมว ( <i>Felis catus</i> )	เนื้อเยื่อ และเลือด	คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ.กรุงเทพฯ
ลา ( <i>Equus asinus</i> )	เลือด	กองพันสัตว์ต่างกรมการทหารบก จ.เชียงใหม่
ไก่ ( <i>Gallus gallus</i> )	เนื้อเยื่อ	ตลาดสดสามย่าน ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ
ม้า ( <i>Equus caballus</i> )	เลือด	กองพันสัตว์ต่างกรมการทหารบก จ.เชียงใหม่
แพะ ( <i>Capra aegagrus</i> )	เลือด	องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย จ.กรุงเทพฯ
แกะ ( <i>Ovis aries</i> )	เนื้อเยื่อ	ห้างสยามพารากอน จ.กรุงเทพฯ

ตารางที่ 2 แสดงสรุปแหล่งที่มาของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควบคุมและทดสอบความจำเพาะ


### 3.3 การเตรียมลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สำหรับทดสอบความน่าเชื่อถือของเทคนิค

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกเนื้อสัตว์ต้องห้ามมาทดลอง 4 ชนิดได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อหนูนาและเนื้อแมว การผลิตเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม แบ่งออกเป็น 2 สูตร

- 3.3.1 สูตรที่ไม่มีการผสมเครื่องเทศ เตรียมโดยดัดแปลงจากสูตรของ Ali, M. E และคณะ ซึ่งผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนผสมของเนื้อวัว แบ่งข้าวโพดและน้ำกลั่น ดังแสดงในตารางที่ 3 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นอาหาร (otto, ประเทศไทย) หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด เมื่อเสร็จแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอ (Ali et al., 2012)
- 3.3.2 สูตรที่มีเครื่องเทศและวัตถุดิบอื่นๆเป็นองค์ประกอบ เตรียมโดยดัดแปลงจากสูตรของ Mahfujur Rahman ซึ่งผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดวัตถุดิบแสดงในตารางที่ 4 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นอาหาร (otto, ประเทศไทย) หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด เมื่อเสร็จแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอ (Rahman et al., 2014)

สูตรการผลิต	ควบคุม	ผสมเนื้อสุกร		ผสมเนื้อสุนัข		ผสมเนื้อหมู		ผสมเนื้อแมว		ผสม 3 ชนิด สุกร/สุนัข/แมว
		10%	1%	10%	1%	10%	1%	10%	1%	
เนื้อวัว (กรัม)	100	90	99	90	99	90	99	90	99	96
สัตว์ต้องห้าม (กรัม)	-	10	1	10	1	10	1	10	1	4
แป้งข้าวโพด (กรัม)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
น้ำกลั่น (มล.)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ตารางที่ 3 แสดงการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สูตรที่ไม่มีการผสมเครื่องเทศ



วัตถุดิบที่ใช้	สูตร ควบคุม	ผสมเนื้อสุกร		ผสมเนื้อสุนัข		ผสมเนื้อหมู		ผสมเนื้อแมว		ผสม 3 ชนิด สุกร/สุนัข/แมว
		10%	1%	10%	1%	10%	1%	10%	1%	
เนื้อวัว (กรัม)	100	90	99	90	99	90	99	90	99	96
สัตว์ต้องห้าม (กรัม)	-	10	1	10	1	10	1	10	1	4
แป้งข้าวโพด (กรัม)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
หัวหอมใหญ่สับ (กรัม)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
กระเทียมผง (กรัม)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
พริกไทยดำ (กรัม)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
น้ำตาล (กรัม)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
เกลือ (กรัม)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
น้ำมันพืช (กรัม)	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28
น้ำปลา (กรัม)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
น้ำกลั่น (มล.)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามสูตรที่มีเครื่องเทศและวัตถุดิบอื่นๆเป็นองค์ประกอบ



### 3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ หรือเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit

นำเนื้อสัตว์หรือเลือดสัตว์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.2.1 และ ข้อ 3.2.2 มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ(DNA template) สำหรับเป็นดีเอ็นเอควบคุมและสำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Blood & Tissue Kit ซึ่งเริ่มจากการชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 25-30 มิลลิกรัม หรือปิเปตตัวอย่างเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL 180 ไมโครลิตร เพื่อย่อยเนื้อเยื่อทำให้เซลล์แตก สำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือดปิเปตสารละลาย PBS เพื่อปรับ pH เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อย่อยโปรตีน เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างที่เป็นเนื้อ และ 10 นาทีสำหรับตัวอย่างที่เป็นเลือด เมื่อครบเวลา เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย absolute EtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายผสมจากหลอดตัวอย่างลงใน DNeasy mini spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้ง ย้าย DNeasy mini spin column ลงหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลาย AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนสารละลายทิ้ง นำ DNeasy mini spin column ย้ายลง หลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่อีกครั้ง เติมสารละลาย AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนสารละลายทิ้ง นำ DNeasy mini spin column ย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อชะล้างดีเอ็นเอที่เกาะอยู่บริเวณเมมเบรนของ DNeasy mini spin column ให้ตกลงมา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสกัดเสร็จสิ้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA

### 3.5 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหารด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างลูกชิ้นในข้อ 3.2.3 และตัวอย่างอาหารทางการค้าในข้อ 3.2.4 และ 3.2.5 ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard® Genomic DNA Purification Kit ตามเอกสารแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เริ่มจากบดตัวอย่างอาหารในถุงถนอมอาหารที่สะอาดจนละเอียด ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile deionize water) 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 2 นาที เพื่อกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีอยู่มากในอาหาร จากนั้นชั่งตัวอย่างอาหารหนัก 25-30 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนสารละลาย Nuclei lysis 600 ไมโครลิตร ใช้แท่งบดที่สะอาด บดตัวอย่างจนละเอียดอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมนสารละลาย Proteinase K 17.5 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมนสารละลาย RNase 3 ไมโครลิตร เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมนสารละลาย Protein precipitation 200 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอนโปรตีน เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ปิดฝาเฉพาะส่วนใสใสลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมนสารละลาย Isopropanol 600 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและตากดีเอ็นเอ ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้แห้งเร็วขึ้น เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชะล้าง ดีเอ็นเอด้วยสารละลาย DNA Rehydration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA

### 3.6 การวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer

เมื่อสกัดดีเอ็นเอเสร็จสิ้นจากนั้นวัดปริมาณและตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี สเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) โดยใช้เครื่อง Nanodrop 2000c เริ่มจากการทำความสะอาดแท่นวัด (Pedestal) ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและใช้กระดาษ Kimwipes เช็ดทำความสะอาดทั้งแท่นวัดและฝาปิด หลังจากนั้นหยดสารละลาย Blank ซึ่งจะใช้สารละลายที่ดีเอ็นเอที่ต้องการวัดละลายอยู่เช่นสารละลายบัฟเฟอร์ AE หรือสารละลาย DNA Rehydration เช็ดทำความสะอาด หลังจากนั้นปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการวัด 2 ไมโครลิตร วัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) ซึ่งค่าที่วัดได้จะถูกคำนวณอัตโนมัติและแสดงผลที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ สามารถประเมินความบริสุทธิ์ได้จาก อัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}$  กับ  $A_{280}$

- อัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}$  กับ  $A_{280}$  อยู่ในช่วงระหว่าง 1.65-2.00 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นสายคู่บริสุทธิ์ สามารถนำไปทำปฏิกิริยา Real time-PCR ต่อไปได้
- อัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}$  กับ  $A_{280}$  มากกว่า 2.00 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้มีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่
- อัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}$  กับ  $A_{280}$  น้อยกว่า 1.65 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้มีโปรตีน หรือฟีนอลปะปนอยู่

หลังจากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา Real-Time PCR

### 3.7 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์ต้องห้าม

การคัดเลือกไพรเมอร์เริ่มจากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง หลังจากนั้นสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดได้แก่ สุนัข (*Sus scrofa*) สุนัข (*Canis lupus familiaris*) ลิง (*Macaca fascicularis*) หนูนา (*Rattus argentiventer*) แมว (*Felis catus*) และลา (*Equus asinus*) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกยีนที่ตั้งอยู่บนไมโทคอนเดรีย เช่น Cytochrome b (Cytb), NADH dehydrogenase 5 (ND5) , ATPase subunit 6 (ATP6) และ 16S rRNA (16S) ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ และมีจำนวนมาก (High copy number) ในแต่ละเซลล์รวมถึงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดี (Bottero & Dalmaso, 2011)

จากนั้นนำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของยีนเหล่านั้นในสัตว์แต่ละชนิดจากฐานข้อมูล GenBank มาวิเคราะห์และคัดเลือกเพื่อหาลำดับพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์เพื่อสร้างชุดไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 รวมถึงหาค่า  $T_m$  และขนาดผลผลิตปฏิกิริยา ของสัตว์แต่ละชนิดด้วยโปรแกรม  $T_m$  Utilities กรณีสัตว์ชนิดใดมีค่า  $T_m$  ใกล้เคียงกันหรือซ้อนทับกันก็ทำการดัดแปลงเพิ่ม

ลด ลำดับเบสเพื่อเพิ่มหรือลดอุณหภูมิค่า Tm จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้กับสัตว์หรือพืชชนิดอื่นโดยทำการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST แบบออนไลน์บนฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>)

การออกแบบไพรเมอร์ใหม่ของสัตว์ต้องห้ามสำหรับการศึกษาในครั้งนี้คือลา (*Equus asinus*) โดยเลือกใช้ข้อมูลลำดับเบสบนยีน 16S rRNA (Accession no. KT 182635) ซึ่งถูกนำมา align กับฐานข้อมูล 16S rRNA ของลาในฐานข้อมูล GenBank ข้อมูลดังกล่าวที่ 2 โดยใช้ Clustal W เพื่อจะค้นหาตำแหน่งที่มีความจำเพาะภายในลา ซึ่งจะได้ชุดไพรเมอร์ดังตาราง จากนั้นนำชุดไพรเมอร์ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงเปรียบเทียบกับ 16S rRNA ของม้าเนื่องจากสัตว์สองชนิดนี้มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมซึ่งกันและกัน รวมถึงตรวจสอบความจำเพาะกับสัตว์หรือพืชชนิดอื่นโดยเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST แบบออนไลน์บนฐานข้อมูล NCBI

หลังจากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่คัดเลือกและออกแบบไว้และนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในปฏิกิริยา Real-Time PCR สำหรับคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดเพื่อสร้าง Tm Construction ของ Multiplex HRAM

accession	start	end	strand	sequence info
X97337	1113	2692	+	Equusasinus complete mitochondrial genome
KT829588	1	1580	+	Equusasinus isolate 1 breed Yunnan donkey 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
KT829590	1	1580	+	Equusasinus isolate 2 breed Dezhou donkey 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
KT829596	1	1580	+	Equusasinus isolate 2 breed Yunnan donkey 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
KT829594	1	1580	+	Equusasinus isolate 3 breed Dezhou donkey 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
KT829592	1	1580	+	Equusasinus isolate 3 breed Yunnan donkey 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
KT182635	7991	9570	+	Equusasinus mitochondrion, complete genome
AP012271	1112	2692	+	Equusasinussomalicus mitochondrial DNA, almost complete genome
KM881681	1112	2690	+	Equusasinussomalicus mitochondrion, partial genome
JX312721	1111	2688	+	Equusburchelliichapmani isolate 6381 mitochondrion, complete genome
JX312733	1112	2690	+	Equusburchelliiquagga isolate QUAGGA mitochondrion, complete genome
KM881680	1111	2688	+	Equusburchelliiquagga mitochondrion, partial genome
HQ439476	1113	2693	+	Equuscaballus breed Kustanai mitochondrion, complete genome
HQ439480	1113	2693	+	Equuscaballus breed Noriker mitochondrion, complete genome
HQ439463	1113	2693	+	Equuscaballus breed Norwegian Fjord mitochondrion, complete genome
KC202970	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I10 mitochondrion, complete genome
KC202971	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I11 mitochondrion, complete genome
KC202972	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I12 mitochondrion, complete genome
KC202973	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I13 mitochondrion, complete genome
KC202974	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I14 mitochondrion, complete genome
KC202975	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I15 mitochondrion, complete genome
KC202976	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I16 mitochondrion, complete genome
KC202977	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I2 mitochondrion, complete genome
KC202978	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I3 mitochondrion, complete genome
KC202979	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I4 mitochondrion, complete genome
KC202980	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I5 mitochondrion, complete genome
KC202981	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I6 mitochondrion, complete genome
KC202982	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I7 mitochondrion, complete genome
KC202983	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I8 mitochondrion, complete genome
KC202984	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype I9 mitochondrion, complete genome
KC203023	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype M2 mitochondrion, complete genome
KC203024	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype M3 mitochondrion, complete genome
KC203025	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype M4 mitochondrion, complete genome
KC203026	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype M5 mitochondrion, complete genome
KC203027	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype M6 mitochondrion, complete genome
KC203028	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype N1 mitochondrion, complete genome
KC203029	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype N2 mitochondrion, complete genome
KC203030	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype N3 mitochondrion, complete genome

KC203031	1114	2692	+	Equuscaballus haplotype N4 mitochondrion, complete genome
JN398414	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 39_Irn11 mitochondrion, complete genome
JN398415	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 40_Irn10 mitochondrion, complete genome
JN398416	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 41_CsP04 mitochondrion, complete genome
JN398417	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 42_Trk01 mitochondrion, complete genome
JN398435	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 60_Akt05 mitochondrion, complete genome
JN398436	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 61_CsP05 mitochondrion, complete genome
JN398437	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 62_Mrm01 mitochondrion, complete genome
JN398438	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 63_Fre01 mitochondrion, complete genome
JN398439	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 64_Cly01 mitochondrion, complete genome
JN398440	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 65_EnS01 mitochondrion, complete genome
JN398441	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 66_Sad01 mitochondrion, complete genome
JN398442	1115	2693	+	Equuscaballus isolate 67_Exm01 mitochondrion, complete genome
JN398443	1114	2692	+	Equuscaballus isolate 68_And02 mitochondrion, complete genome
JQ340094	1114	2692	+	Equuscaballus isolate AAPP108 mitochondrion, complete genome
JQ340097	1114	2692	+	Equuscaballus isolate AAPP134 mitochondrion, complete genome
JQ340098	1114	2692	+	Equuscaballus isolate AAPP159 mitochondrion, complete genome
JQ340170	1114	2692	+	Equuscaballus isolate AAPP166 mitochondrion, complete genome
JQ340099	1114	2692	+	Equuscaballus isolate AAPP185 mitochondrion, complete genome
HQ439496	1113	2693	+	Equuscaballus isolate D breed Welsh Pony mitochondrion, complete genome
KT368728	1114	2692	+	Equuscaballus isolate Horse_Yakutia_Horse2 mitochondrion, complete genome
KT368730	1114	2692	+	Equuscaballus isolate Horse_Yakutia_Yak1 mitochondrion, complete genome
KT985979	1114	2693	+	Equuscaballus isolate HUK1 mitochondrion, partial genome
KT985980	1114	2692	+	Equuscaballus isolate HUK2 mitochondrion, partial genome
KF038159	1115	2693	+	Equuscaballus isolate Jeju01 mitochondrion, complete genome
KF038160	1115	2693	+	Equuscaballus isolate Jeju02 mitochondrion, complete genome
KF038161	1115	2693	+	Equuscaballus isolate Jeju03 mitochondrion, complete genome
KT368741	1114	2692	+	Equuscaballus isolate Mongolian_horse_KB7754 mitochondrion, complete genome
JQ340107	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN8830 mitochondrion, complete genome
GU734784	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN8987 mitochondrion, complete genome
JQ340120	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN9018 mitochondrion, complete genome
JQ340134	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN9330 mitochondrion, complete genome
JQ340136	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN9343 mitochondrion, complete genome
JQ340140	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN9400 mitochondrion, complete genome
JQ340143	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TN9480 mitochondrion, complete genome
JQ340148	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TNDM12 mitochondrion, complete genome
JQ340151	1113	2691	+	Equuscaballus isolate TNIn14 mitochondrion, complete genome
JQ340155	1114	2692	+	Equuscaballus isolate TNJA8 mitochondrion, complete genome
KJ917258	1114	2693	+	Equuscaballus isolate W00009 mitochondrion, partial genome
KJ917270	1114	2693	+	Equuscaballus isolate W00322 mitochondrion, partial genome
KJ917275	1114	2693	+	Equuscaballus isolate W00501 mitochondrion, partial genome
KJ917291	1114	2693	+	Equuscaballus isolate W02002 mitochondrion, partial genome
KJ917298	1114	2693	+	Equuscaballus isolate W02512 mitochondrion, partial genome
AP013088	1114	2692	+	Equuscaballus mitochondrial DNA, complete genome, isolate: MO2
AP013092	1114	2692	+	Equuscaballus mitochondrial DNA, complete genome, isolate: MO6
AP013098	1114	2692	+	Equuscaballus mitochondrial DNA, complete genome, isolate: PR3
AP013100	1114	2692	+	Equuscaballus mitochondrial DNA, complete genome, isolate: TH1
JX312725	1111	2687	+	Equusgrevyi isolate 6390 mitochondrion, complete genome
JX312723	1111	2687	+	Equusgrevyi isolate G42 mitochondrion, complete genome
JX312722	1111	2687	+	Equusgrevyi isolate G51 mitochondrion, complete genome
JX312728	1112	2689	+	Equushemionuskulan isolate Ehemionus mitochondrion, complete genome
HM118851	1111	2690	+	Equushemionus mitochondrion, complete genome
JX312730	1111	2688	+	Equushemionusonager isolate O91 mitochondrion, complete genome
JX312732	1111	2688	+	Equus kiang isolate K32 mitochondrion, complete genome
JX312731	1111	2688	+	Equus kiang isolate K41 mitochondrion, complete genome
JX312734	1113	2692	+	Equusovodovi isolate ACAD2304 mitochondrion, complete genome
KT368742	1114	2692	+	Equusprzewalskii isolate Przewalski_horse_KB7713_S8524_Viola mitochondrion, complete genome
KT368743	1114	2692	+	Equusprzewalskii isolate Przewalski_horse_KB7848_S8528_Vjuga mitochondrion, complete genome
AP013094	1114	2692	+	Equusprzewalskii mitochondrial DNA, complete genome, isolate: NOUMA1
JX312719	1112	2689	+	Equus zebra hartmannae isolate H21 mitochondrion, complete genome
JX312717	1112	2689	+	Equus zebra isolate 1023 mitochondrion, complete genome
JX312718	1112	2689	+	Equus zebra isolate 1041 mitochondrion, complete genome

ตารางที่ 5 แสดงลำดับชุดของไพรเมอร์เทียบกับชุดไพรเมอร์ม้า

AP012271 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KM881681 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 X97337 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT182635 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT829588 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT829590 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT829592 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT829594 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT829596 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 AP013094 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 HQ439463 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 HQ439480 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT368742 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KT368743 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 HQ439476 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 HM118851 (533) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312731 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312730 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312732 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312728 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312717 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312718 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312719 (532) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312721 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 KM881680 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312733 (533) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312722 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312723 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA  
 JX312725 (531) GAAAGCGTTC AAGCTCAACGCTCAGC CATCTTAAATCCAAATATAGACTCGACTAACTCCTAAATCTATACTGGACTATTCTATCAGCATAGAGCAATAATGTTAATATGAGTAA

ภาพที่ 2 แสดงลำดับพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของลา ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

### 3.8 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Singleplex HRMA

การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Singleplex HRMA คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 เป้าหมายด้วยเทคนิค Real-Time PCR และตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาด้วยเทคนิค HRMA

ในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้าม เริ่มจากการนำไพรเมอร์ที่ผ่านการประเมินผลและคัดเลือกจากข้อ 3.7 เตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด จากข้อ 3.2.1 ได้แก่ สุนัข สุนัข ลิง หนูนา แมว และลา เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสัตว์แต่ละชนิดบนยีนไมโทคอนเดรีย โดยทำแยกชนิดของสัตว์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งในปฏิกิริยา PCR Master mix ประกอบด้วย 2XQIAGEN Multiplex PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด 0.5 ไมโครลิตร ResoLight dye ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตรและ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 6.8 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร รายละเอียดการเตรียม PCR Master mix ดังแสดงในตารางที่ 6 หลังจากนั้นเปิด PCR Master mix 18 ไมโครลิตร ลงใน Light Cycler® 480 Multiwell plate ปิดดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ส่วน Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LightCycler® 480 Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ LightCycler 1.5.1 ดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ เริ่มต้น (Pre incubation) 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม Amplification จำนวนรอบทั้งหมด 27 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม HRMA ซึ่งเป็นการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม Cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ Melting peaks และค่า Tm ด้วยโปรแกรม Gene scanning หลังจากนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลอง นำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาดที่ทำนายไว้

#### เตรียม PCR Master mix ดังตารางต่อไปนี้

สารเคมี	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา ( $\mu\text{L}$ )	ความเข้มข้นสุดท้าย ( $\mu\text{M}$ )
2XQIAGEN Multiplex PCR	10.0	
Forward primer of each species (10 $\mu\text{M}$ )	0.50	0.25
Reverse primer of each species (10 $\mu\text{M}$ )	0.50	0.25
ResoLight dye	0.75	0.75
Deionized water	6.25	
20 ng of genomic DNA	2.00	
Total	20.0	

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Singleplex HRMA

### 3.9 การทดสอบความจำเพาะ ของเทคนิค Singleplex HRMA

ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สังเคราะห์ทั้งหมดทั้ง 6 คู่ โดยจะทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามชนิดอื่นๆ ทั้ง 6 ชนิดและทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์ฮาลาลอื่นอีก 4 ชนิดจากข้อ 3.2.2 ได้แก่ ไก่ ม้า แพะ และแกะ สภาวะและการตั้งค่าโปรแกรมที่ใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 3.8

หากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองมีความจำเพาะ จะให้ผลบวกเฉพาะกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น ไม่พบปฏิกิริยาข้ามระหว่างชนิดของสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เป้าหมาย (Cross reaction)

### 3.10 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Singleplex HRMA

เจือจางดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 7 ระดับดังนี้ 50 นาโนกรัม 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม และ 0.0002 นาโนกรัม จากนั้นทดสอบความไว ของเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์แต่ละชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ สภาวะและการตั้งค่าโปรแกรมที่ใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 3.8

### 3.11 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Multiplex HRMA คือการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าหนึ่งเป้าหมายพร้อมกันในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันด้วยเทคนิค Real-Time PCR และตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาด้วยเทคนิค HRMA

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบ Singleplex HRMA จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดแบบ Multiplex HRMA ทดสอบความสามารถในการตรวจวัดชนิดของสัตว์ต้องห้ามพร้อมกันทั้ง 6 ชนิดใน 1 ปฏิกิริยา เตรียม PCR Master mix ตามตารางที่ 7 หลังจากนั้นปิเปต PCR Master mix ปริมาตร 18 ไมโครลิตรลงใน Light Cycler® 480 Multiwall plate ปิเปตดีเอ็นเอแม่แบบ 2 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นดีเอ็นเอรวม (DNA mix) โดยการผสมดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดเข้าด้วยกันที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม สำหรับ Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ Positive control จะใช้ดีเอ็นเอสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LightCycler® 480 Real-Time PCR

ตั้งค่าโปรแกรมในซอฟต์แวร์ เช่นเดียวกันกับการตรวจวัดแบบ Singleplex ดังนี้ โปรแกรมแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Pre incubation) 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที โปรแกรม Amplification จำนวนรอบทั้งหมด 27 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้นแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denature) 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ขั้นไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension) 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม HRMA ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 40 องศาเซลเซียส 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกที่ 65 องศาเซลเซียส และสุดท้ายตั้งค่าโปรแกรม Cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที



เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ประมวลผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบความจำเพาะของ Melting peaks และค่า Tm ด้วยโปรแกรม Gene scanning เทียบกับ Singleplex HRMA หลังจากนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลอง นำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาดที่ทำนายไว้

สารเคมี	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (μM)
2x QIAGEN Multiplex PCR	10.0	-
ลา forward primer (10 μM)	0.50	0.25
ลา reverse primer (10 μM)	0.50	0.25
แมว forward primer (10 μM)	0.375	0.1875
แมว reverse primer (10 μM)	0.375	0.1875
สุกร forward primer (10 μM)	0.375	0.1875
สุกร reverse primer (10 μM)	0.375	0.1875
หนูนา forward primer (10 μM)	0.1875	0.09375
หนูนา reverse primer (10 μM)	0.1875	0.09375
สุนัข forward primer (10 μM)	0.25	0.125
สุนัข reverse primer (10 μM)	0.25	0.125
ลิง forward primer (10 μM)	0.50	0.25
ลิง reverse primer (10 μM)	0.50	0.25
ResoLight dye	0.75	0.75
Deionized water	2.875	-
20 ng of genomic DNA	2.00	-
Total	20.0	-

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีและส่วนประกอบในปฏิกิริยาแบบ Multiplex HRMA

### 3.12 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA

ทดสอบความจำเพาะของ Multiplex HRMA ที่รวมไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามไว้ 6 คู่ จะทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามชนิดอื่นๆ ทั้ง 6 ชนิด โดยเริ่มทดสอบตั้งแต่ใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายของสัตว์ต้องห้าม 1 ชนิดและเพิ่มขึ้นทีละ 1 ชนิด จนครบ 6 ชนิด (DNA Mix) รวมถึงทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์อื่นอีก 4 ชนิดได้แก่ ไก่ ม้า แพะ และแกะ

### 3.13 การทดสอบความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Multiplex HRMA

เจือจางดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 7 ระดับดังนี้ 50 นาโนกรัม 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม และ 0.0002 นาโนกรัม จากนั้นทดสอบความไว ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ที่รวมไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามไว้ 6 คู่ กับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด สภาวะและการตั้งค่าโปรแกรมที่ใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 3.11

### 3.14 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้าม ด้วยวิธีการจำลองการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร

ศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิคที่พัฒนาได้โดยการจำลองการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามในผลิตภัณฑ์อาหาร ในการทดลองครั้งนี้ใช้ลูกชิ้นเนื้อวัวเป็นตัวอย่างอาหารสำหรับการทดสอบ เริ่มต้นจากการเตรียมลูกชิ้นเนื้อวัวและผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามลงไปในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามข้อ 3.3 ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สามารถตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามได้ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ (Razzak et al., 2015) หลังจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit ตามข้อ 3.4 ซึ่งเป็นชุดสกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างอาหาร และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ตามข้อ 3.11 สามารถคำนวณความถูกต้องของเทคนิคได้จากสมการนี้ (Filipiak & Hasiow-Jaroszewska, 2016)

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ} + \text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100 \%$$

### 3.14 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม

เก็บตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสัตว์ต้องห้าม เช่นสุกร ตามข้อ 3.2.4 หลังจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit ตามข้อ 3.4 และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ตามข้อ 3.11 สามารถคำนวณความถูกต้องของเทคนิคได้จากสมการนี้

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ} + \text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100 \%$$

### 3.15 การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA โดยการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารที่วางจำหน่ายทางการค้าภายในประเทศไทย ทั้งตัวอย่างที่มีการรับรองเครื่องหมายฮาลาลและไม่มีการรับรองเครื่องหมายฮาลาล สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่วางขายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 260 ตัวอย่าง ตามข้อ 3.2.5 แบ่งตัวอย่างอาหารออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 100 ตัวอย่าง เครื่องปรุงรสและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 65 ตัวอย่าง ขนมอบกรอบและช็อกโกแลต 50 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 25 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากนม 20 ตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit ตามข้อ 3.4 และนำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ตามข้อ 3.11

### 3.16 สถานที่และระยะเวลาที่ทำวิจัย

#### 3.16.1 สถานที่

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ 254 อาคารวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 11-13 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่

จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10330

ห้องปฏิบัติการฝ่ายวิจัยและพัฒนา เครือเบทาโกร

ที่อยู่ 139 หมู่ 9 ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

#### 3.16.1 ระยะเวลาที่ทำวิจัย

เริ่มทำวิจัย เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปราย

#### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เลือดสัตว์และตัวอย่างอาหาร

ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจะไม่ได้อยู่เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อิสระ แต่จะรวมตัวอยู่กับโปรตีนฮิสโตนและโปรตีนที่ไม่ใช่ฮิสโตน เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของโครมาติน นอกจากนี้ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และอาร์เอ็นเอ ดังนั้นหลักการในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะเริ่มตั้งแต่การทำให้เซลล์แตกตัว ย่อยโปรตีน และอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นทำความสะอาดดีเอ็นเอและตกตะกอนดีเอ็นเอ (Hellberg & Morrissey, 2011)

สำหรับงานวิจัยนี้การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และเลือดสัตว์ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการทดลอง สกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kit โดยเตรียมเนื้อสัตว์และเลือดของสัตว์ต้องห้าม ทั้ง 6 ชนิดได้แก่สุกร สุนัข หนูนา แมว ลิงและลา รวมถึงสัตว์ฮาลาลชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ได้แก่ ไก่ ม้า แพะและแกะ จำนวนสัตว์ชนิดละ 5 ตัวอย่าง หลังจากสกัดดีเอ็นเอเสร็จนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer จากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.71-2.01 แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัด สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA ต่อไปได้ (Yalcinkaya et al., 2017) สำหรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ อยู่ในช่วง 20-259 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงอยู่ในตารางที่ 9 นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างที่สกัดจากเนื้อสัตว์ให้ปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดจากเลือด เนื่องจากตัวอย่างจากเลือดในช่วงการเก็บตัวอย่างได้ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น EDTA รวมถึงบางตัวอย่างไม่ได้สกัดทันทีอาจเกิดการแข็งตัว (clot) ทำให้สารเคมีต่างๆที่ใส่ลงไปเพื่อตกตะกอนโปรตีนหรือตกตะกอนดีเอ็นเอเข้าทำปฏิกิริยาได้ไม่เต็มที่ (Song et al., 2017) ซึ่งสาเหตุที่สัตว์บางชนิดใช้ตัวอย่างที่เป็นเลือดในการสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากผู้วิจัยหาตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อได้ไม่ครบทั้ง 5 ตัวอย่างเช่น ลิง ส่วนลาและม้านั้นผู้วิจัยหาตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อไม่ได้ จึงมีความจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่เป็นเลือด ซึ่งขอความอนุเคราะห์มาจากกองพันสัตว์ต่าง กรมการทหารบก แต่อย่างไรก็ดีปริมาณความเข้มข้นจากตัวอย่างที่เป็นเลือดก็เพียงพอที่จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kit ถือว่ามีประสิทธิภาพและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้ได้

ตัวอย่างที่เป็นอาหารในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ตัวอย่างลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม ตัวอย่างลูกชิ้นและไส้กรอกทางการค้าที่มีเนื้อสัตว์ต้องห้ามเป็นส่วนผสม และตัวอย่างอาหารทางการค้าทั่วไป สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดจากตัวอย่างอาหาร Wizard® Genomic DNA Purification Kit ซึ่งก่อนสกัดจะบดตัวอย่างอาหารในถุงนอนอาหารที่สะอาดจนละเอียดและล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดสารรบกวนการตรวจวัด ซึ่งมีอยู่มากในอาหารเช่น เครื่องเทศ ไขมัน หรือเครื่องปรุงรสต่างๆ เป็นต้น จากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.65-2.00 แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ สำหรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอนั้น อยู่ในช่วงตั้งแต่ 53-245 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งปริมาณที่สกัดได้ค่อนข้างสูง ทั้งนี้ ตัวอย่างอาหารส่วนใหญ่จะต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน เช่น ต้ม นึ่ง ผัด อบ เผา ย่างและการฆ่าเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร Wizard® Genomic DNA Purification Kit มีศักยภาพสูงสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอาหาร ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบการปนเปื้อนในอาหารฮาลาลอย่างศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์ เลือกใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

สัตว์ต้องห้ามและสัตว์ฮาลาล ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ช่วงค่าการดูดกลืนแสง A280/260
สุกร ( <i>Sus scrofa</i> )	64.1-154.5	1.81- 1.95
สุนัข ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	34.9-182.5	1.77-2.01
ลิง ( <i>Macaca fascicularis</i> )	21.4-54.1	1.79-1.85
หนูนา ( <i>Rattus argentiventer</i> )	55.5-153.8	1.71-1.86
แมว ( <i>Felis catus</i> )	33.1-151.9	1.78-1.93
ลา ( <i>Equus asinus</i> )	20.7-24.6	1.80-1.85
ไก่ ( <i>Gallus gallus</i> )	184.1-259.1	1.81- 1.87
ม้า ( <i>Equus caballus</i> )	26.9-40.2	1.80-1.85
แพะ( <i>Capra aegagrus</i> )	22.6-25.2	1.79-1.88
แกะ ( <i>Ovis aries</i> )	215.5-59.0	1.81-1.91

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสัตว์ต้องห้ามและสัตว์ฮาลาล จำนวนสัตว์ละ 5 ตัวอย่าง สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง

รายละเอียดตัวอย่าง	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ช่วงค่าการดูดกลืน แสงA280/260
ลูกชิ้นเนื้อวัวสูตรควบคุม % + ไม่มีเครื่องเทศ	71.6-125.4	1.72-1.90
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 1% + ไม่มีเครื่องเทศ	105.0-117.9	1.77-1.85
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 10 % + ไม่มีเครื่องเทศ	79.5-165.2	1.81-1.92
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 1 % + ไม่มีเครื่องเทศ	88.9-201.8	1.91-2.00
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 10 % + ไม่มีเครื่องเทศ	59.5-124.9	1.65-1.99
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 1 % + ไม่มีเครื่องเทศ	52.9-112.6	1.90-1.98
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 10 % + ไม่มีเครื่องเทศ	48.1-60.6	1.89-2.00
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 1 % + ไม่มีเครื่องเทศ	56.2-99.3	1.78-1.74
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 10 % + ไม่มีเครื่องเทศ	90.7-145.2	1.82-1.93
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อ 3 ชนิด สุกร/สุนัข/แมว 1 % + ไม่มีเครื่องเทศ	62.7-95.0	1.78-1.92
ลูกชิ้นเนื้อวัวสูตรควบคุม + มีเครื่องเทศ	64.5-112.1	1.84-1.91
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 1 % + มีเครื่องเทศ	51.5-159.2	1.75-1.89
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 10 % + มีเครื่องเทศ	71.6-151.3	1.87-1.93
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 1 % + มีเครื่องเทศ	53.2-126.7	1.97-2.00
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 10 % + มีเครื่องเทศ	51.7-158.3	1.75-1.95
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 1 % + มีเครื่องเทศ	51.6-118.2	1.93-1.97
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 10 % + มีเครื่องเทศ	66.3-58.6	1.76-1.98
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 1 % + มีเครื่องเทศ	56.8-105.5	1.87-1.90
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 10 % + มีเครื่องเทศ	52.9-99.4	1.88-1.93
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อ 3 ชนิด สุกร/สุนัข/แมว 1 % + มีเครื่องเทศ	56.3-85.1	1.86-1.99

ตารางที่ 9 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เอ็นเอที่สกัดได้จากลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สูตรที่ไม่มีการผสมเครื่องเทศและสูตรที่ผสมเครื่องเทศ จำนวนสูตรละ 5 ตัวอย่าง

ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครลิตร/นาโนกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง A280/260
ลูกชิ้นหะรอม 1	57.7	1.79
ลูกชิ้นหะรอม 2	68.0	1.80
ลูกชิ้นหะรอม 3	53.1	1.74
ลูกชิ้นหะรอม 4	138.3	1.65
ลูกชิ้นหะรอม 5	167.9	1.67
ไส้กรอกหะรอม 1	56.3	1.69
ไส้กรอกหะรอม 2	56.7	1.84
ไส้กรอกหะรอม 3	189.2	1.83
ไส้กรอกหะรอม 4	76.2	1.83
ไส้กรอกหะรอม 5	109.5	1.80

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างลูกชิ้นและไส้กรอกทางการค้า มีเนื้อสัตว์ต้องห้ามเป็นองค์ประกอบจำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหาร	จำนวน	ช่วงความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ช่วงค่าการดูดกลืนแสง A280/260
ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป	100	64.1-176.5	1.77- 1.98
เครื่องปรุงรสและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร	65	74.9-245.2	1.67-2.00
ขนมอบกรอบและซ็อกโกแลต	50	57.8-156.5	1.85-1.95
ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่	25	68.6-134.5	1.71-2.00
ผลิตภัณฑ์จากนม	20	66.8-134.8	1.88-1.99

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารทางการค้าที่วางขายในห้างสรรพสินค้าและตลาดทั่วไป จำนวน 260 ตัวอย่าง

จากการศึกษาของ Burhanettin Yalçinkaya และคณะ (2017) ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัด ดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ 10 วิธี ได้แก่ วิธี Tris-EDTA วิธี CTAB วิธี สกัดด้วยด่าง (Alkaline) วิธีสกัดด้วย Urea วิธีสกัดด้วยเกลือ ชุดสกัดสำเร็จรูป Guanidinium GuSCN ชุดสกัดสำเร็จรูป Wizard® ชุดสกัดสำเร็จรูป Qiagen ชุดสกัดสำเร็จรูป Zymogen และชุด สกัดสำเร็จรูป Genespin พบว่ามี 2 ชุดสกัดที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือ ชุดสกัด Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) และชุดสกัด DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) ซึ่งพบว่า มีงานวิจัยหลายงานที่ผ่านมาใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป 2 ชุดนี้ ซึ่งเป็นที่ยอมรับมากในปัจจุบัน

#### 4.2 การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอแม่แบบของสัตว์ต้องห้าม

หลังจากการออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับใช้ในงานแล้ว สิ่งสำคัญอีกประการก็คือ การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จากฐานข้อมูลของ Genbank โดยการนำข้อมูลลำดับเบส ของไพรเมอร์ไปเปรียบเทียบกับวิเคราะห์กับข้อมูลในฐานข้อมูลว่า ยีนอื่นมีลำดับเบสคู่สมกับไพรเมอร์ หรือไม่มีและมียีนน้อยเพียงใด โดยการใช้โปรแกรม Nucleotide basic local alignment tools (BLAST) เพื่อให้มั่นใจว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบและคัดเลือกมา มีความจำเพาะต่อยีนที่สนใจเท่านั้นการใช้โปรแกรม BLAST จัดเป็นขั้นตอนการคัดกรองที่สะดวกรวดเร็วและจำเป็นต้องทำก่อนการนำไพรเมอร์มาใช้งานจริง (Sarri et al., 2014)

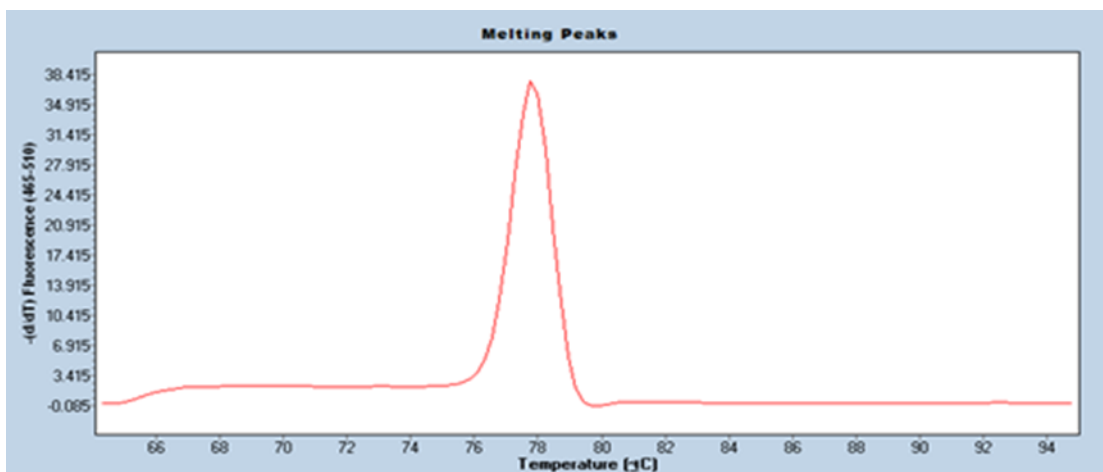
ในการศึกษาครั้งนี้ ไพรเมอร์ได้ถูกคัดเลือกหรือดัดแปลงมาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้รวมถึง ออกแบบใหม่ ซึ่งรวบรวมไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดดังตารางที่ 12 ไพรเมอร์ เหล่านี้ผ่านการทดสอบว่ามีความจำเพาะแล้วทั้งสิ้น ด้วยโปรแกรม BLAST แบบออนไลน์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบเพิ่มปริมาณกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ซึ่งเกณฑ์ ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้เป็นตัวแทนของสัตว์แต่ละชนิดคือจะต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ได้ มีความจำเพาะ มี Melting peaks ที่เป็น peak เดียวชัดเจน รวมถึงค่า  $T_m$  จะต้องไม่ซ้อนทับกัน กับสัตว์ชนิดอื่นซึ่งค่า  $T_m$  สำหรับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทำ Multiplex ควรห่างกันประมาณ 1.5-2 องศาเซลเซียส (Qiu et al., 2015)



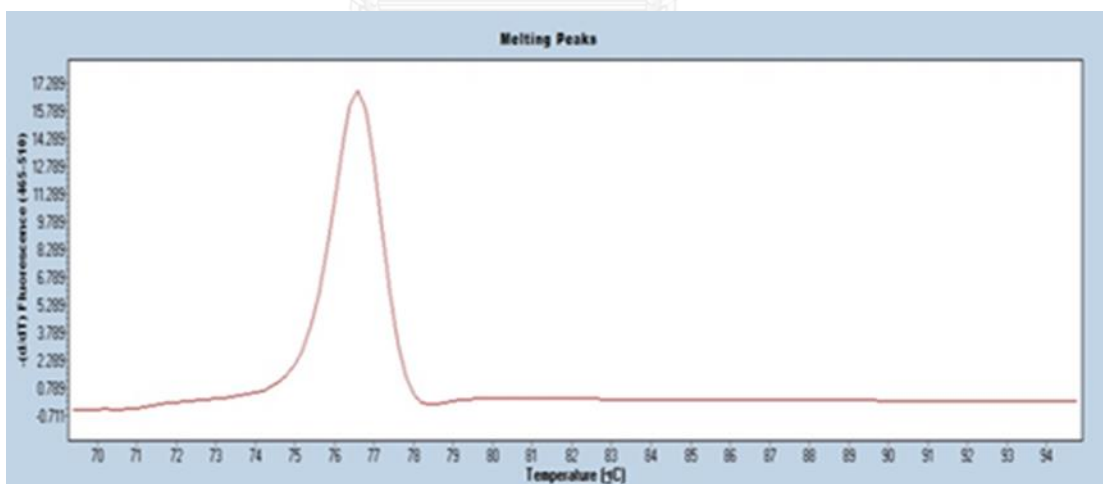
สัตว์ดองห้าม	ชื่อไพรเมอร์	ยื่นเป้าหมาย	ลำดับเบส (5' to 3')	Tm °C	หมายเหตุ
ลา	NDS-DKF	16S	TTCAAGCTCAACGTCACACA	76.90	ออกแบบใหม่
	NDS-DKR		GCTTCTATGTGTCGATAGAATAGTCC		
ลา	K-F	ND2	TGCTAGCCTCATTATCAGTAT	78.80	Zülal Kesmen et al., 2014
	K-R		GTGATGAGGATACGTGCT		
แมว	Cat-F	Cytb	GGAATAATGTTTCGACCACTAAGC	85.72	Ali et al., 2015
	Cat-R		TGCCTGAGATGGGTATTAGGAT		
แมว	CAT-FC-4-F	Cytb	TTATGGCTGAATCATCCGATATT	78.87	N. KUROSE et al., 2005
	CAT-FC-5-R		CCGTCCCACATGTATGTACAGG		
แมว	CAT-F3	Cytb	TTATGGCTGAATCATCCGATATT	79.12	Matgorzata N., 2009
	CAT-R2		CCGTCCCACATGTATGTACAGG		
สุกร	Pig-F	ND5	CCATCCCAATTATAATCAACTC	80.41	Ali et al., 2015
	Pig-R		TGATTATTTCTGGCCTGTGTGT		
หนู	Cytb42-F	Cytb	TAACCACTCCTTCATCGACCTT	83.29	Yanita.IW et al., 2015
	Cytb42-R		CCCCGTTGGCGTGTAAATA		
หนู	12SpRM-F	12S rRNA	AAATCCCACTTATATGTGAAAATTCATTGT		I. Martín et al., 2007
	12SpRM-R		TGGGCTTAGCTATCGTCGATCAT		
หนู	Ra Inner-F	Cytb	GATATTTACACCCAACGGG		วิชาญ วรธรรม ไกรวัล et al., 2013
	Ra Inner-R		GATTACGGTGGCTCCTCAA		
สุนัข	Do <sub>g</sub> -F	ATP6	TGGCTCTAGCCGTTTCGATTA	81.92	Ali et al., 2015
	Do <sub>g</sub> -R		AAGGCAACAGCAAATTCAGG		
สุนัข	Mo-do <sub>g</sub> -F	ATP6	GAGGTGCGGAAGCGAGGGGGGGCTCTAGCCGTTTCGAT	84.88	ตีตแปลงจาก Ali et al., 2015
	Mo-do <sub>g</sub> -R		GTGATAAAAGCTGTGGTCCG		
ลิง	Monkey-F	ND5	TGAGACCTCCAACAAATACTAGC	85.34	Ali et al., 2015
	Monkey-R		CTCTATGGCAGAAGGTAGTCAG		
ลิง	Mo-Monkey-F	ND5	GAGACTCTGAGCGGCTGCTGGAGGTGCGAAAGCGGAGGGGCGGG	87.39	ตีตแปลงจาก Ali et al., 2015
	Mo-Monkey-R		CCTCCAACAAATACTAGCC		
			TCTATGGCAGAAGGTAGT		

ตารางที่ 12 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่คัดเลือกและออกแบบใหม่ เพื่อนำมาคัดเลือกอีกครั้งเพื่อหาคู่ที่เหมาะสมที่สุดของสัตว์แต่ละชนิดเพื่อใช้ในการสร้าง Tm Construction ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA

ลาได้ออกแบบใหม่จากยีน 16S rRNA และคัดเลือกจากงานของ Zülal Kesmen และคณะ (2014) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่าทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ แต่ลาที่คัดเลือกมานั้นมีค่า  $T_m$  เท่ากับ  $78.80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ภาพที่ 3) ไปซ้อนทับกับช่วงค่า  $T_m$  ของแมว จึงทำให้เลือกใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่เป็นตัวแทนของไพรเมอร์ลา ซึ่งมีค่า  $T_m$  เท่ากับ  $76.90\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ภาพที่ 4)

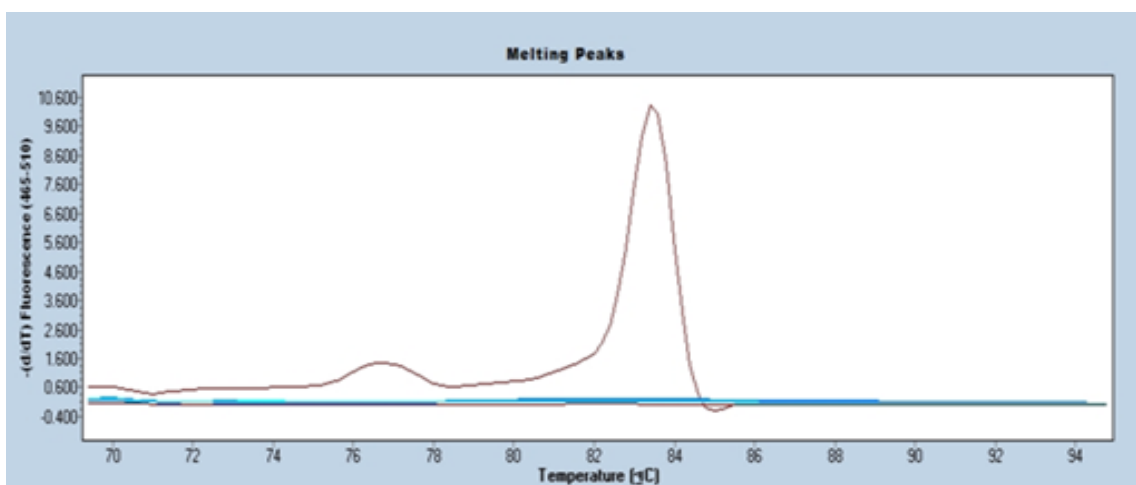


ภาพที่ 3 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลาที่ คัดเลือกจากงานของ Zülal Kesmen และคณะ มีค่า  $T_m$  เท่ากับ  $78.80\text{ }^{\circ}\text{C}$

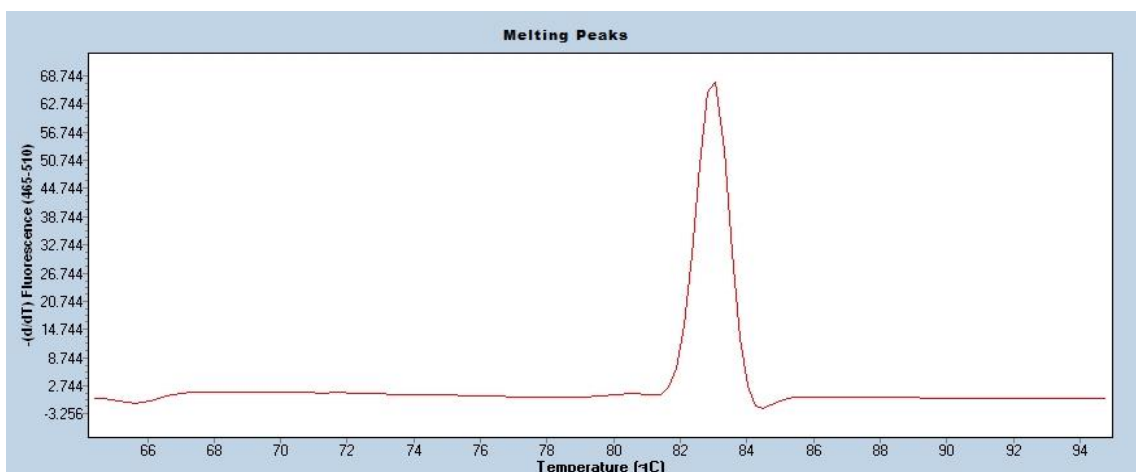


ภาพที่ 4 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลาที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์ลาในงานวิจัยนี้ มีค่า  $T_m$  เท่ากับ  $76.90\text{ }^{\circ}\text{C}$

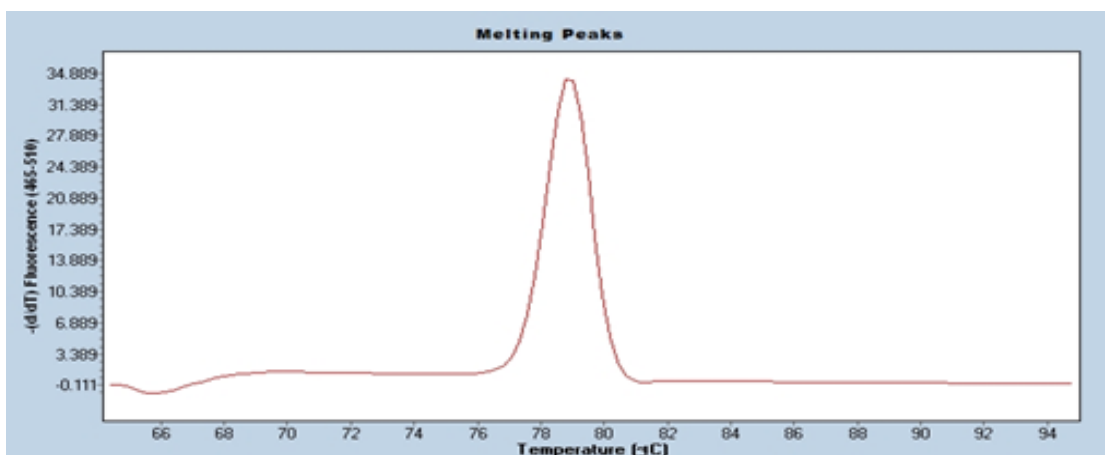
สำหรับแมว ได้เลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คู่ จากงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) Matgorzata N. และคณะ (2009) และจาก N. KUROSE และคณะ (2005) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่าทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ แต่ไพรเมอร์แมวของ Ali นั้นให้ Melting peaks ที่มี 2 peak (ภาพที่ 5) ซึ่งไม่เหมาะสมกับการนำมาทำ Multiplex HRMA เพราะอาจไปซ้อนทับกับสัตว์ชนิดอื่นได้ (X. Cheng et al., 2014) ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ของ Matgorzata N. ให้ Melting peaks ที่สวยแต่ค่า Tm อยู่ในช่วงของหนู (ภาพที่ 6) จึงทำให้เลือกคู่ไพรเมอร์ของ N. KUROSE เป็นตัวแทนของไพรเมอร์แมว ที่ให้ค่า Tm เท่ากับ 79.12 °C (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 5 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ Ali และคณะ มีค่า Tm เท่ากับ 82.95 °C

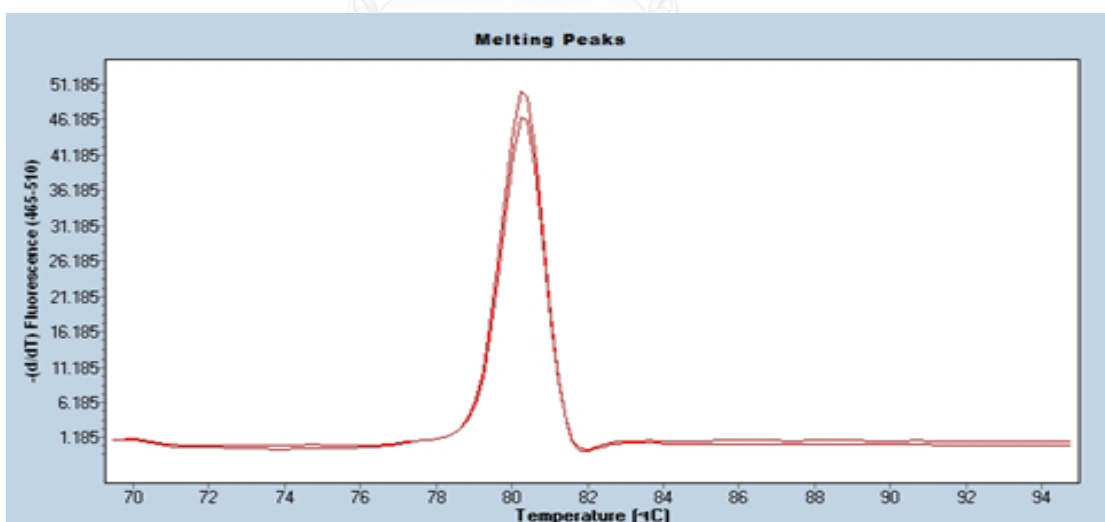


ภาพที่ 6 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ Matgorzata N. และคณะ มีค่า Tm เท่ากับ 83.25 °C



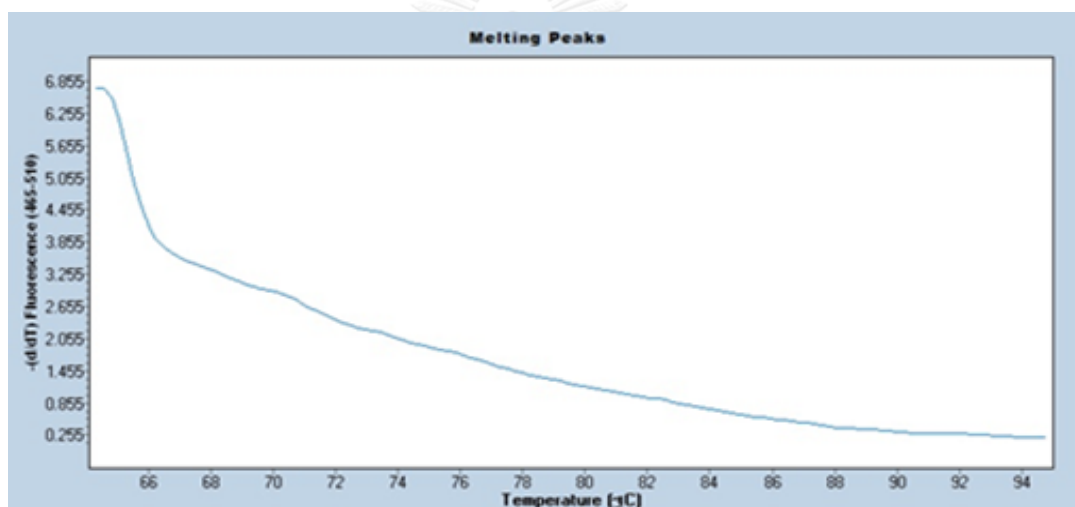
ภาพที่ 7 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์แมวที่ คัดเลือกจากงานของ N. KUROSE และคณะ มีค่า  $T_m$  เท่ากับ 79.12 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์แมวในงานวิจัยนี้

สุกรนั้นได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ 1 คู่บนยีน ND5 จากงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) สาเหตุที่เลือกคู่นี้เนื่องจากมีงานวิจัยต่างๆ มากมายที่ผ่านมา ได้ใช้ไพรเมอร์สุกรคู่นี้ของ Ali เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงอีกทั้งความไวในการตรวจวัดก็สูงด้วย (Ali et al., 2015) (Kitpipit et al., 2014) และเมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่าให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานไว้ในเรื่องความไวและความจำเพาะ มีค่า  $T_m$  ที่ 80.41 °C (ภาพที่ 8)

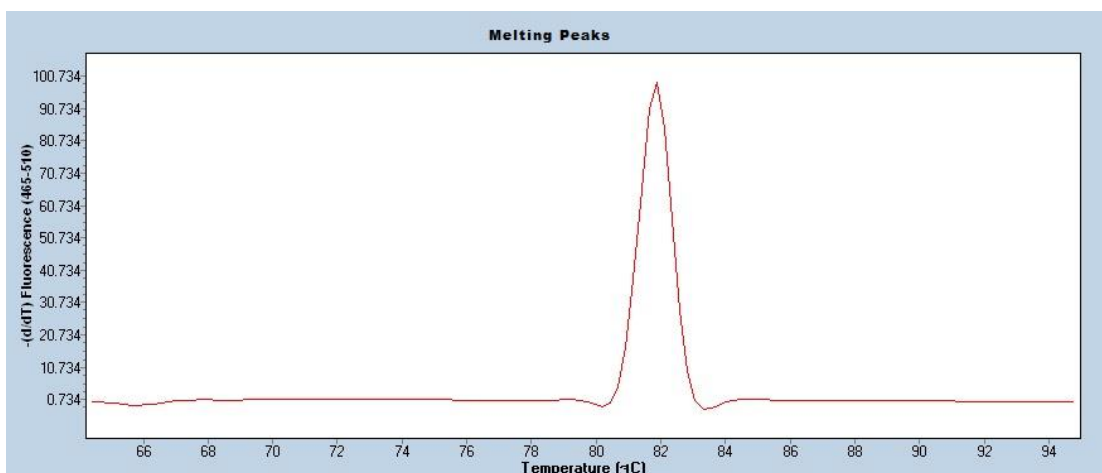


ภาพที่ 8 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สุกรที่ คัดเลือกจากงานของ Ali และคณะ มีค่า  $T_m$  เท่ากับ 80.41 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์สุกรในงานวิจัยนี้

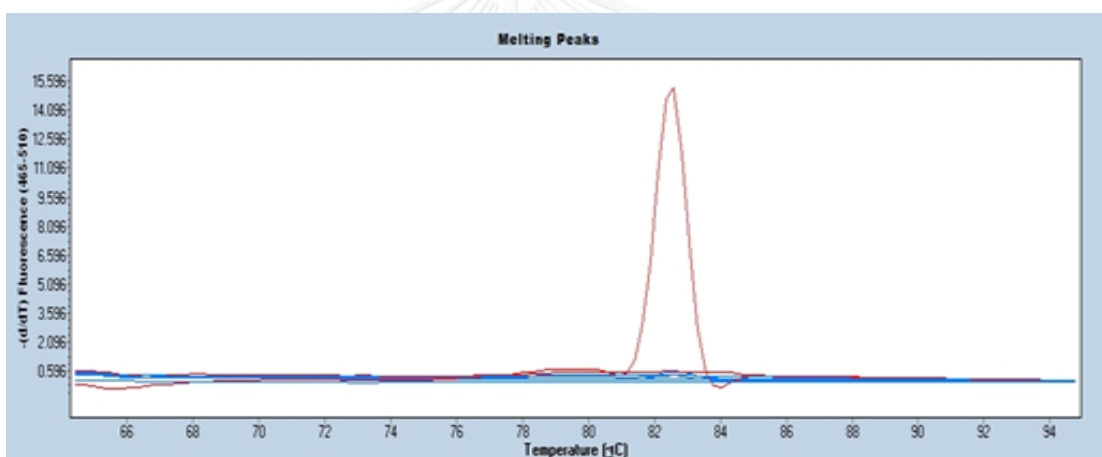
หนูนา ได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ 3 คู่จากงานวิจัยของ I. Martí n และคณะ (2007) ชาญ วรธนะไกว้ล และคณะ (2013) และจาก Yanita W และคณะ (2015) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่า คู่ไพรเมอร์หนูนาของ I. Martí n ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ (ภาพที่ 9) เมื่อนำไปทดสอบลำดับเบสของไพรเมอร์พบว่าไพรเมอร์คู่นี้ออกแบบมาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหนูนาออร์เวย์ (*Rattus norvegicus*) ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการตรวจวัดการปนเปื้อนของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) ขณะที่คู่ไพรเมอร์ของวิชาญ วรธนะไกว้ล และ Yanita.I.W สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ มีรูปแบบ Melting peaks ที่เป็น peak เดี่ยวชัดเจน โดยมีค่า Tm อยู่ที่ 81.84 °C (ภาพที่ 10) และ 83.20 °C (ภาพที่ 11 ) ตามลำดับ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกคู่ไพรเมอร์ของ Yanita.I.W ไปใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์หนูนาเนื่องจากให้ค่า Tm ที่ไม่ซ้อนทับกับสัตว์ชนิดอื่น ซึ่งคู่ไพรเมอร์ของ วิชาญ วรธนะไกว้ล ค่า Tm ไปซ้อนทับกับช่วงค่า Tm ของสุกร



ภาพที่ 9 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนูนาที่ คัดเลือกจากงานของ I. Martí n ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

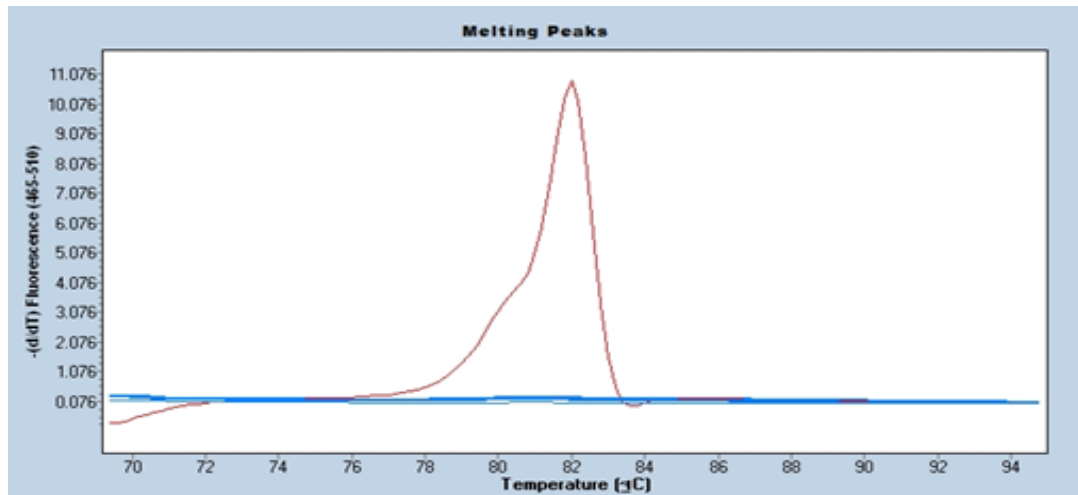


ภาพที่ 10 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนุณาที่ คัดเลือกจากงานของ ชาญ วรธนะไกววัล  
ค่า  $T_m$  เท่ากับ 81.84  $^{\circ}\text{C}$

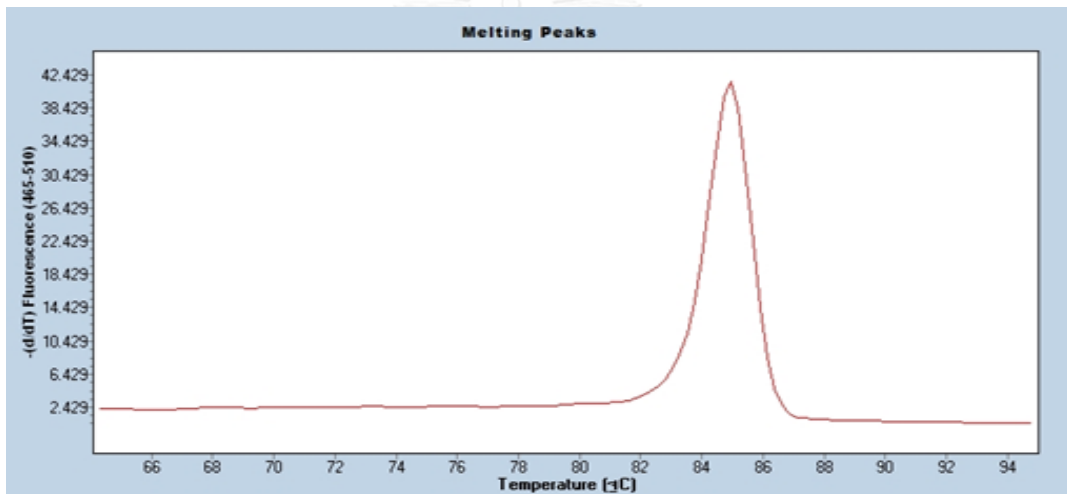


ภาพที่ 11 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์หนุณาที่ คัดเลือกจากงานของ Yanita.I.W  
มีค่า  $T_m$  เท่ากับ 83.20  $^{\circ}\text{C}$  ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์หนุณา

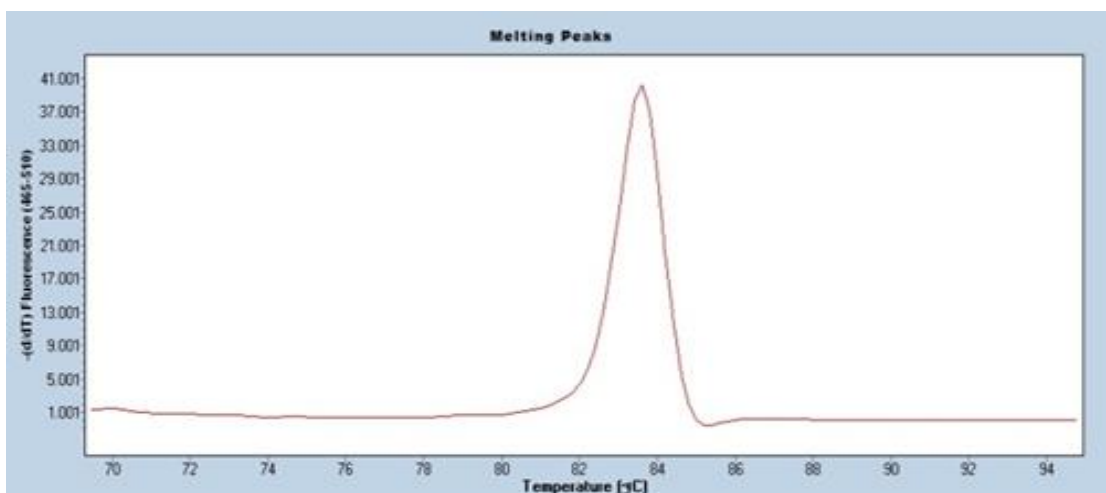
สุนัขได้เลือกคู่ไพรเมอร์จากยีน ATP6 จากงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่า รูปแบบ Meting peaks ไม่เป็น Peak เดี่ยวที่ชัดเจน และอุณหภูมิค่า  $T_m$  ไปซ้อนทับกับหนุ (ภาพที่ 12) จึงได้ทำการปรับปรุงลำดับเบสของไพรเมอร์ใหม่ (Primer modification) จึงได้ Meting peaks ใหม่ที่เป็น peak เดี่ยวชัดเจน มีค่า  $T_m$  ที่แยกห่างจากค่า  $T_m$  ของหนุ (ภาพที่ 13) เช่นเดียวกับลิง ได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Singleplex HRMA พบว่า รูปแบบ Meting peaks เป็น peak เดี่ยวที่ชัดเจน แต่ค่า  $T_m$  ไปซ้อนทับกับสุนัข (ภาพที่ 14) จึงได้ปรับปรุงลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ใหม่จนได้ค่า  $T_m$  ที่แยกจากสุนัขชัดเจน คือ 87.39  $^{\circ}\text{C}$  (ภาพที่ 15)



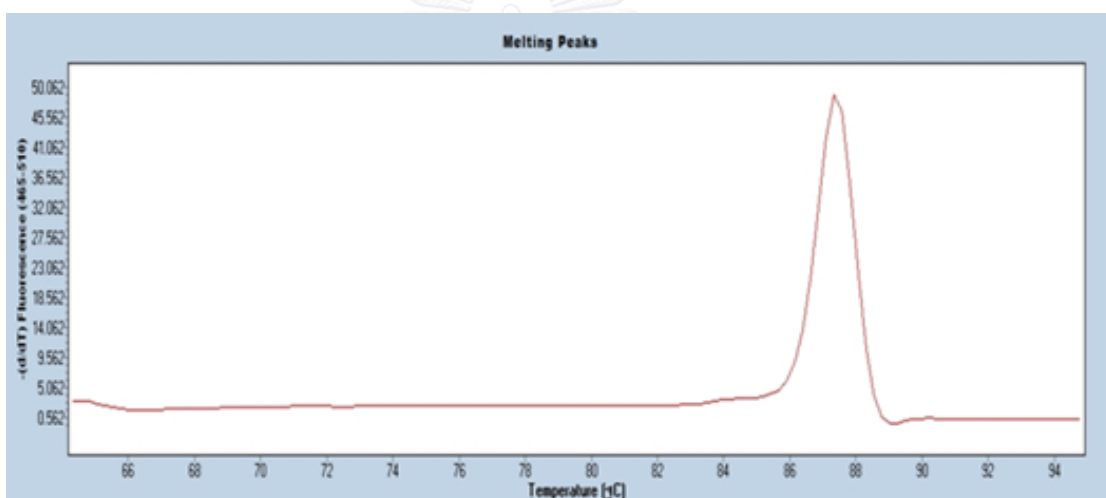
ภาพที่ 12 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สั้นที่คัดเลือกจากงานของ Ali ค่า Tm เท่ากับ 81.92 °C



ภาพที่ 13 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์สั้นที่ดัดแปลงจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 84.88 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์สั้นในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 14 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลิงที่คัดเลือกจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 85.34°C



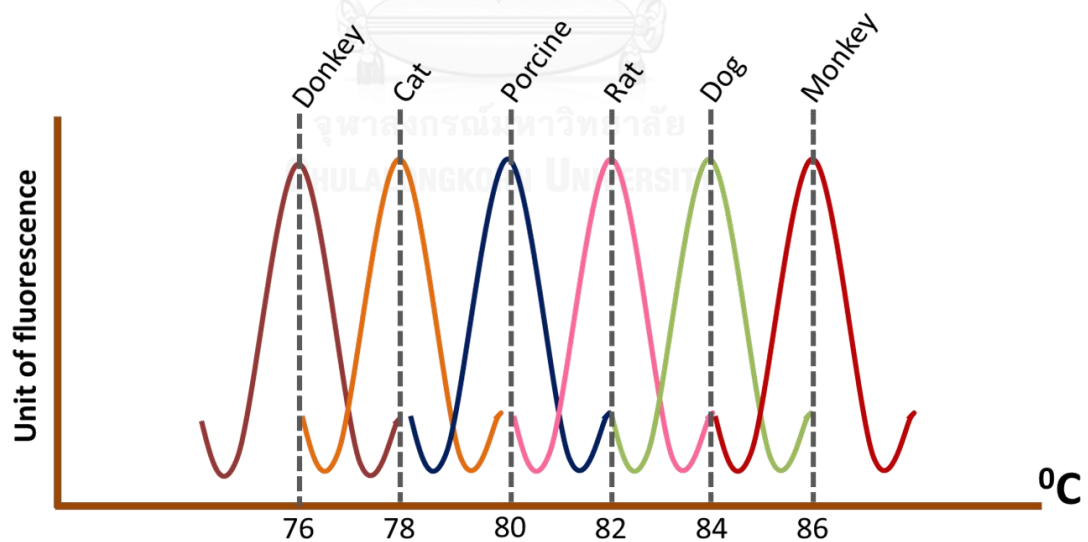
ภาพที่ 15 แสดง Melting peaks ของไพรเมอร์ลิงที่ตัดแปลงจากงานของ Ali ค่า Tm อยู่ที่ 87.39 °C ซึ่งเป็นคู่ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของไพรเมอร์ลิงในงานวิจัยนี้

รายละเอียดของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นตัวแทน 6 คู่ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แสดงในตารางที่ 13 และเมื่อนำมาทำ Tm มาสร้าง Tm Construction สำหรับการตรวจวัดแบบ Singleplex HRMA และ multiplex HRMA จะได้ดังภาพที่ 16



สัตว์ต้องห้าม	ชื่อไพรเมอร์	ยีน เป้าหมาย	ลำดับเบส (5' to 3')	Tm °C เฉลี่ย	ขนาดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ
ลา	NDS-DKF	16S	TTCAAGCTCAACGTCACACA	77.00	93 คู่เบส
	NDS-DKR		GCTTCTATGTGTCGATAGAATAGTCC		
แมว	CAT-FC-4-F	Cytb	TTATGGCTGAATCATCCGATATT	79.29	79 คู่เบส
	CAT-FC-5-R		CCGTCACATGTATGTACAGG		
สุกร	Pig-F	ND5	CCATCCCAATTATAATATCCAATC	81.26	144 คู่เบส
	Pig-R		TGATTATTTCTGGCCTGTGTGT		
หนู	Cytb42-F	Cytb	TAACCACTCCTTCATCGACCTT	83.23	218 คู่เบส
	Cytb42-R		CCCCGTTGGCGTGAATA		
สุนัข	Mo-dog-F	ATP6	GAGGTGCGGAAGCGGAGGGGGGGCTAGCCGTTTCGAT	85.56	138 คู่เบส
	Mo-dog-R		GTGATAAAGCTGTGGTCG		
ลิง	Mo-Monkey-F	ND5	GAGACTCTGAGCGGCTGCTGGAGGTGCGGAAGCGGAGGGGGGGCC	87.19	167 คู่เบส
			TCCAACAATACTAGCC		
	Mo-Monkey-R		TCTATGGCAGAAGGTAGT		

ตารางที่ 13 แสดง รายละเอียดไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด



ภาพที่ 16 แสดง Tm Construction ของการตรวจวัดการเป็นสัตว์ต้องห้าม

โดยทั่วไป โพรเมอร์ขนาดความยาวในช่วง 18-24 เบส มีความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำ PCR มาตรฐานทั่วไปได้ดี สำหรับแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่ลำดับเบสที่มีความอนุรักษ์ (Conserved sequences) ไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรม (Genetic variation) การใช้โพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นกว่า 18 เบสนั้นมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากอาจเกิดการเพิ่มขยายปริมาณแบบไม่จำเพาะได้ง่าย ในกรณีที่เพิ่มความยาวของโพรเมอร์ให้ยาวกว่า 24 เบส พบว่าไม่ค่อยมีปัญหาในการทำ PCR โดยความจำเพาะของการ PCR จะแปรผันตามความยาวของโพรเมอร์ โดยความจำเพาะจะเพิ่มขึ้น 4 เท่าทุกหนึ่งเบสที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการเข้าเกาะติด (anneal) กับแม่พิมพ์ โพรเมอร์ที่มีขนาดยาวขึ้น มีอัตราเร็วในการเข้าเกาะติดช้ากว่าโพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นกว่า ส่วนโพรเมอร์ที่มีขนาดยาวมากกว่าโพรเมอร์มาตรฐานมักมีขนาดในช่วง 28-35 เบส และใช้ในกรณีตัวอย่างแม่พิมพ์ ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมมาก ในงานวิจัยนี้โพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดไม่เกิน 35 เบส ยกเว้นโพรเมอร์ที่มีการดัดแปลงเพิ่มลำดับเบส จึงทำให้โพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะสูง (วีระพงศ์ ลุสิตานนท์, 2557)

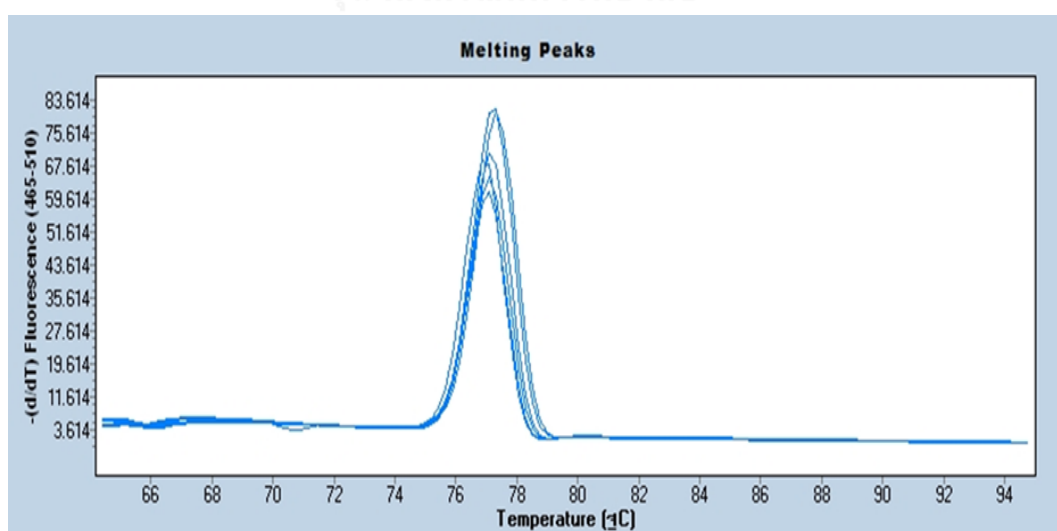
#### 4.3 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Singleplex HRMA

หลังจากได้ตัวแทนคู่โพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดจากลำดับเบสบนยีนไมโทคอนเดรีย ซึ่งลาใช้ยีนบน *16S rRNA* หนูนาและแมวใช้ยีน *Cytochrome b* สุกรและลิงใช้ยีน *NADH dehydrogenase 5* ส่วนสุนัขใช้ยีน *ATPase subunit 6* นำมาตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA แยกชนิดของสัตว์ โดยเตรียมดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด ชนิดละ 5 ตัวอย่าง และทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) โดยทดลองห่างจากวันเดิม 1 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจง โดยประมวลผลจาก Melting Peaks และค่า  $T_m$  ซึ่งสัตว์แต่ละชนิดมีค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนี้ ลา ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 76.32-77.33 องศาเซลเซียส แมว ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 76.32-77.33 องศาเซลเซียส 78.65-79.39 องศาเซลเซียส สุกร ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 80.57-81.60 องศาเซลเซียส หนูนา ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 82.57-83.40 องศาเซลเซียส สุนัข ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 84.99-85.71 องศาเซลเซียส และลิง ค่า  $T_m$  อยู่ที่อุณหภูมิ 86.66-87.49 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 14 และภาพที่ 17-22

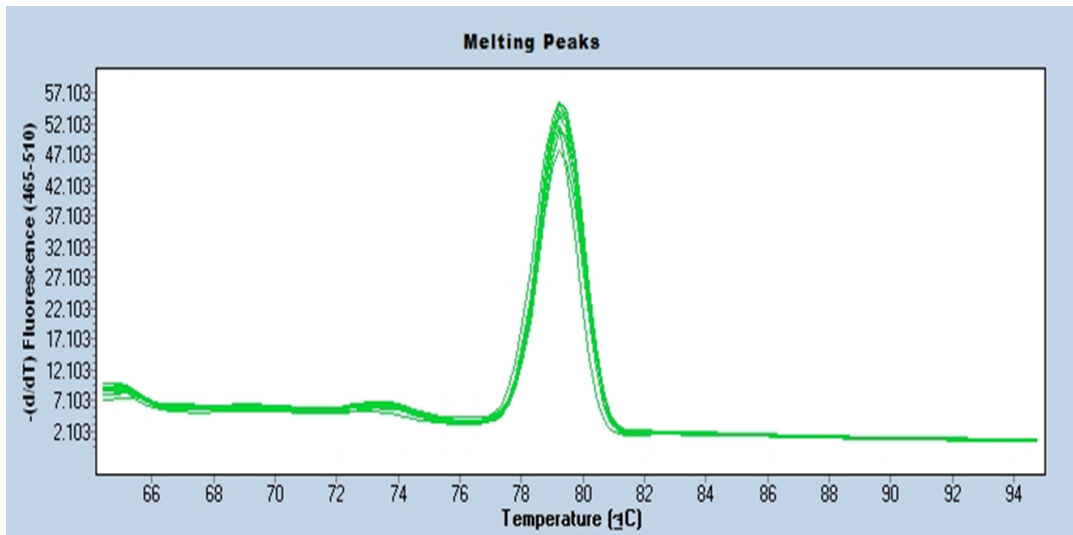
สัตว์ต้องห้าม	ช่วงค่า Tm °C	ค่า Tm °C เฉลี่ย
ลา	76.32-77.33	77.00 ± 0.31°C
แมว	78.65-79.39	79.29 ± 0.19°C
สุกร	80.57-81.60	81.26 ± 0.23°C
หนูนา	82.57-83.40	83.23 ± 0.22°C
สุนัข	84.99-85.71	85.52 ± 0.17°C
ลิง	86.66-87.49	87.19 ± 0.25°C

ตารางที่ 14 แสดงช่วงค่า Tm และค่า Tm เฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิดจากการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA

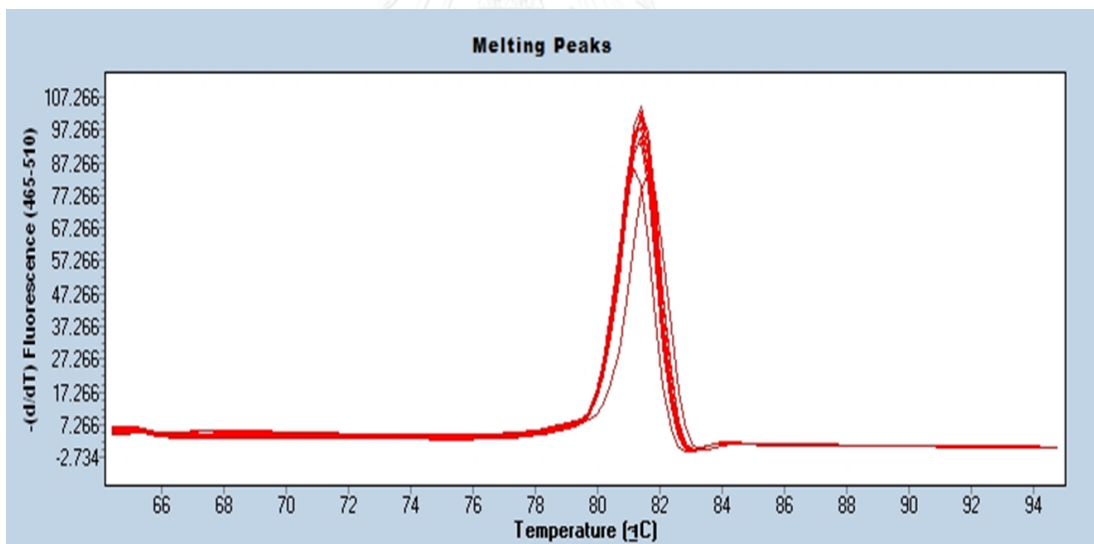
จากตารางที่ 14 จะเห็นว่า ค่า Tm ของสัตว์แต่ละชนิดทั้ง 5 ตัวอย่างที่แตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากความผันแปรของลำดับพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่างในสัตว์ชนิดนั้นๆ ซึ่งเทคนิค HRMA นั้นให้ผลที่ค่อนข้างละเอียดเพียงแค่ลำดับเบสที่แตกต่างกันเพียงแค่ 1 เบสก็ส่งผลให้ค่า Tm แตกต่างกันได้ ซึ่งความละเอียดในข้อนี้เป็นผลมาจากการใช้สีฟลูออเรสเซนต์ที่มีความอิมิตสูง (วีระพงศ์ ลุติตานนท์, 2557) สาเหตุที่ต้องใช้สีประเภทนี้เพราะ ต้องการให้สีสามารถเกาะเข้ากับดีเอ็นเอสายคู่ทั้งหมดในปฏิกิริยาในลักษณะอิมิต ดังนั้นเพื่อต้องการให้ผลการทดลองมีความแม่นยำในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ตัวอย่างสัตว์แต่ละชนิดจำนวน 5 ตัวอย่างเพื่อหาช่วงค่า Tm ของสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะต้องไม่เกิน 1 องศาเซลเซียส ของสัตว์ชนิดนั้นๆ (Iacumin et al., 2015)



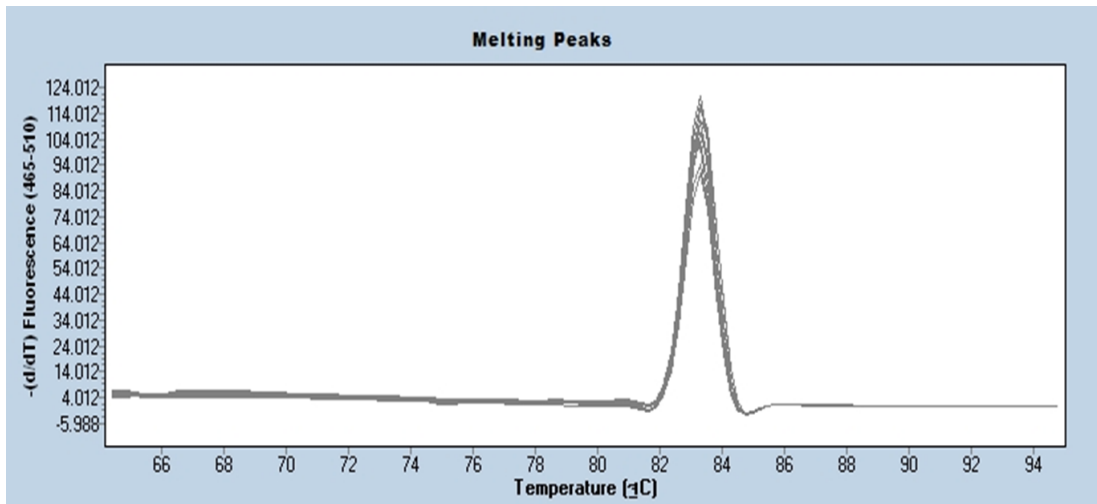
ภาพที่ 17 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของลา จำนวน 5 ตัวอย่าง



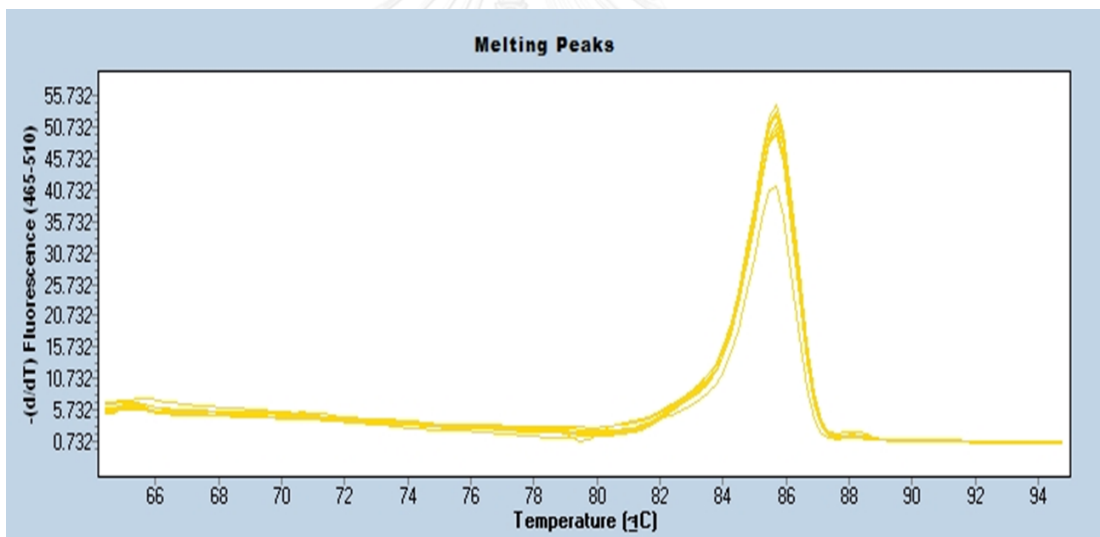
ภาพที่ 18 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของแมว จำนวน 5 ตัวอย่าง



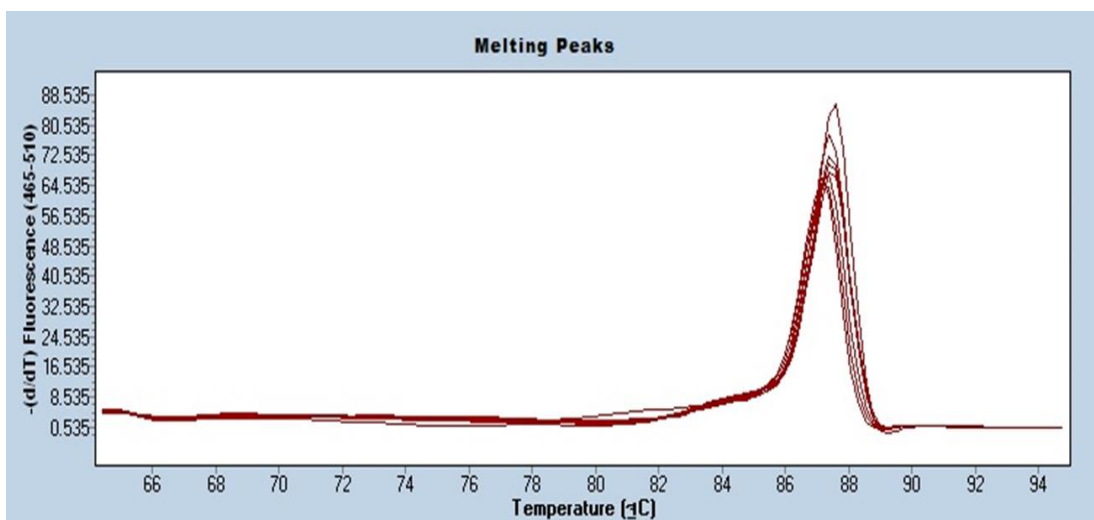
ภาพที่ 19 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสุกร จำนวน 5 ตัวอย่าง



ภาพที่ 20 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของหนุณา จำนวน 5 ตัวอย่าง

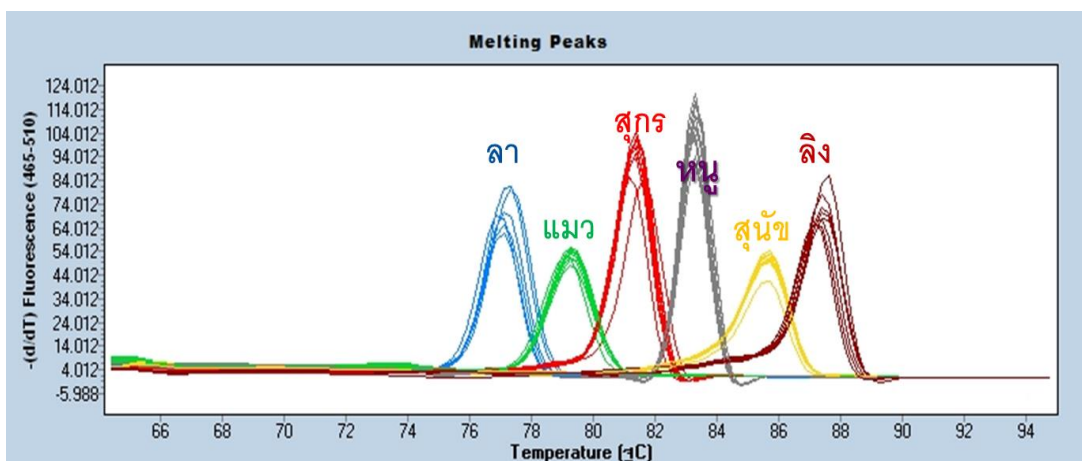


ภาพที่ 21 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสุนัข จำนวน 5 ตัวอย่าง

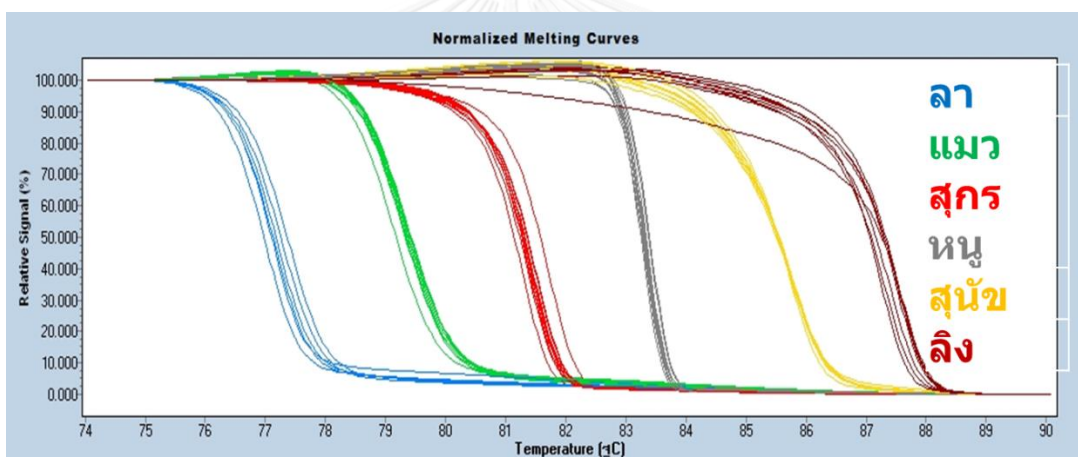


ภาพที่ 22 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสิ่ง  
จำนวน 5 ตัวอย่าง

หนึ่งวิธีในการประเมินผลของเทคนิค HRMA ในงานวิจัยนี้จะใช้การเปรียบเทียบค่าอุณหภูมิหลอมละลายหรือ Melting Temperature ( $T_m$ ) โดยค่า  $T_m$  เป็นค่าอุณหภูมิที่ 50% ของดีเอ็นเอสายคู่ที่แยกจากกัน ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่จำเพาะสำหรับดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่และแปรผันโดยตรงกับลำดับเบส ปริมาณ %GC และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่นั้น การหาค่า  $T_m$  สามารถวิเคราะห์ได้จาก Melting curves (ดูภาพที่ 24) ที่สร้างขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาลิ้นสุดลง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ Melting curves เพื่อหาค่า  $T_m$  ทำได้ไม่แม่นยำ โดยทั่วไปจะมีการเปลี่ยน Melting curves ให้เป็นกราฟ Melting peaks ซึ่งสามารถใช้ในการหาค่า  $T_m$  ให้สะดวกและถูกต้องแม่นยำกว่าการใช้ Melting curves โดยการสร้างเส้นกราฟ Melting peaks จะพบว่าผลผลิตปฏิกิริยาที่แตกต่างกันจะมี Melting peaks ที่แยกจากกัน จะมากหรือน้อยขึ้นกับความแตกต่างของค่า  $T_m$  ของผลผลิตปฏิกิริยานั้น (วีระพงศ์ ลุติตานนท์, 2557) ดังแสดงในภาพที่ 23 จะเห็นได้ว่าสัตว์แต่ละชนิดมีค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อแสดงผลในรูปแบบ Melting peaks การที่สัตว์แต่ละชนิดมีค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกันยังส่งผลต่อการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA อีกด้วย กล่าวคือโอกาสที่ค่า  $T_m$  ของสัตว์แต่ละชนิดจะซ้อนทับกันก็ต่ำจึงทำให้ความจำเพาะในการตรวจวัดสูง (Ohshima et al., 2017) อย่างไรก็ตามข้อดีเหล่านี้ล้วนแล้วมาจากการคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 23 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด มีรูปแบบ Melting peaks และค่า Tm ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน



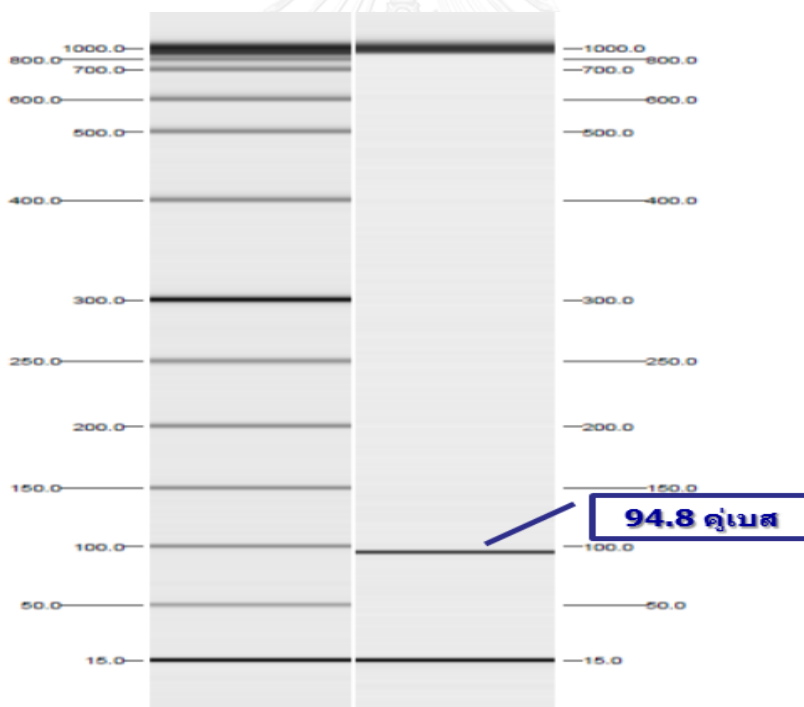
ภาพที่ 24 แสดง Melting curves ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA สัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด

หลังจากนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง นำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้ มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาดที่ทำนายไว้ พบว่าค่าที่วัดได้กับค่าที่ทำนายไว้สอดคล้องกัน ซึ่ง ลา วัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 94.8 คู่เบส แมววัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 83.1 คู่เบส สุกร วัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 149.6 คู่เบส หนูวัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 219 คู่เบส สุนัขวัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 139.4 และลิงวัดขนาดชิ้นส่วนได้ที่ 168.7 ดังแสดงในตารางที่ 15 ยิ่งเป็นการยืนยันความถูกต้องและความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้เป็นตัวแทนของสัตว์ต้องห้ามสำหรับตรวจวัดการปนเปื้อน

ชนิดสัตว์ต้องห้าม	ขนาดชิ้นส่วนที่ทำนายไว้ (คู่เบส)	ขนาดชิ้นส่วนที่วัดได้จริง(คู่เบส)
ลา	93	94.8
แมว	79	83.1
สุกร	144	149.6
หนูนา	218	219.7
สุนัข	138	139.4
ลิง	167	168.7

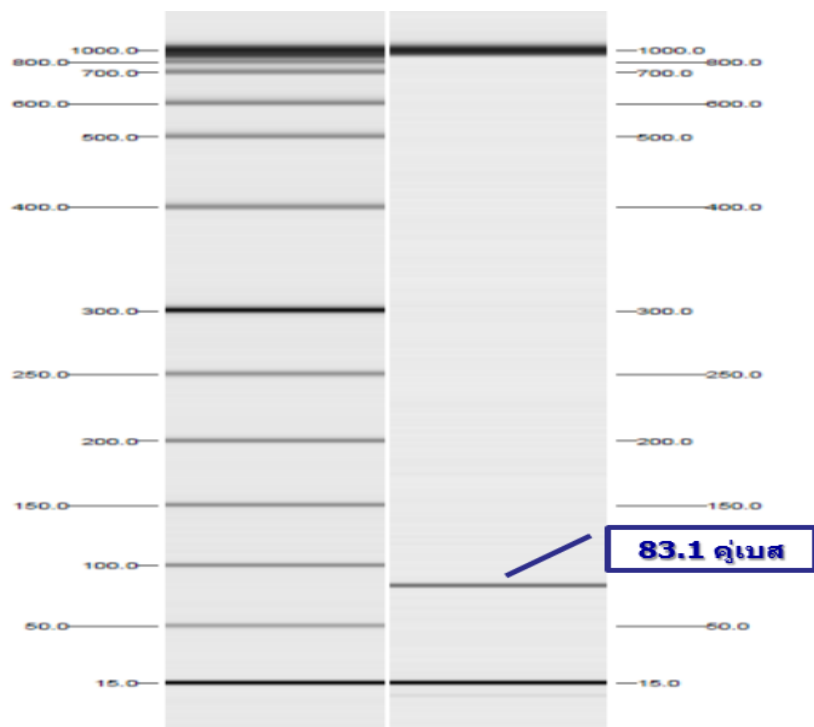
ตารางที่ 15 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามที่ทำนายไว้ด้วยโปรแกรม เทียบกับที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis ให้ผลที่สอดคล้องกัน

ผลแสดงขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis แสดงในภาพที่ 25-30

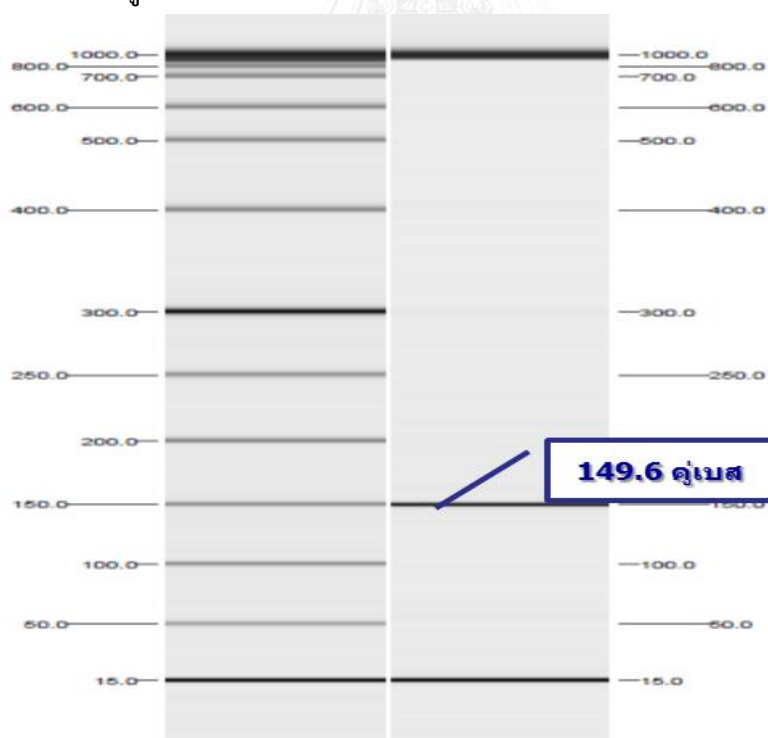


ภาพที่ 25 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลาที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 94.8 คู่เบส

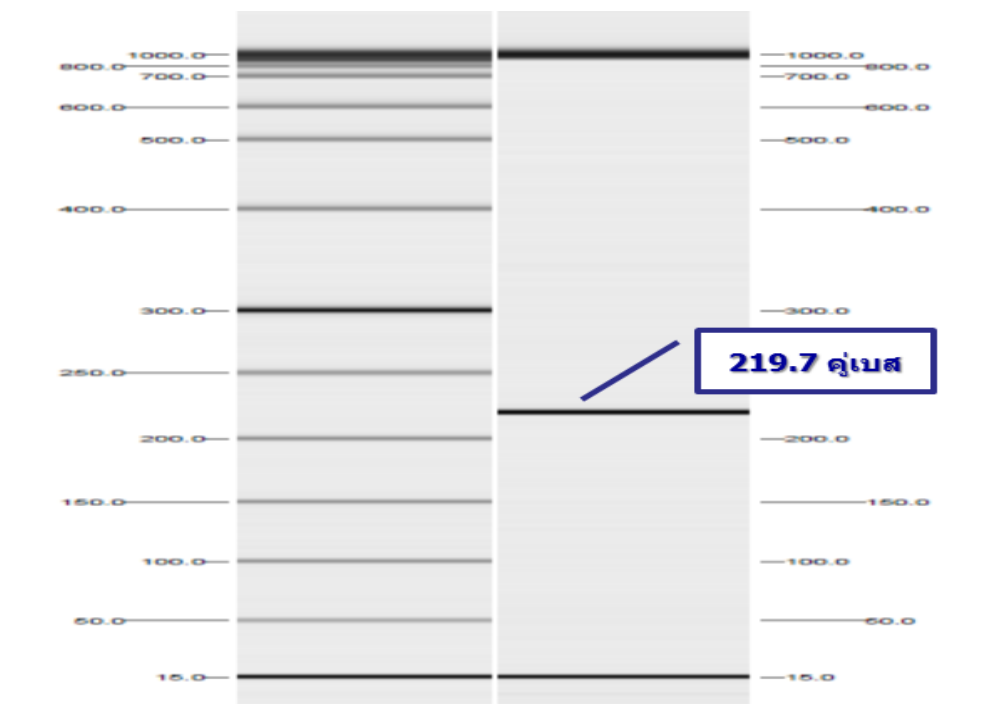




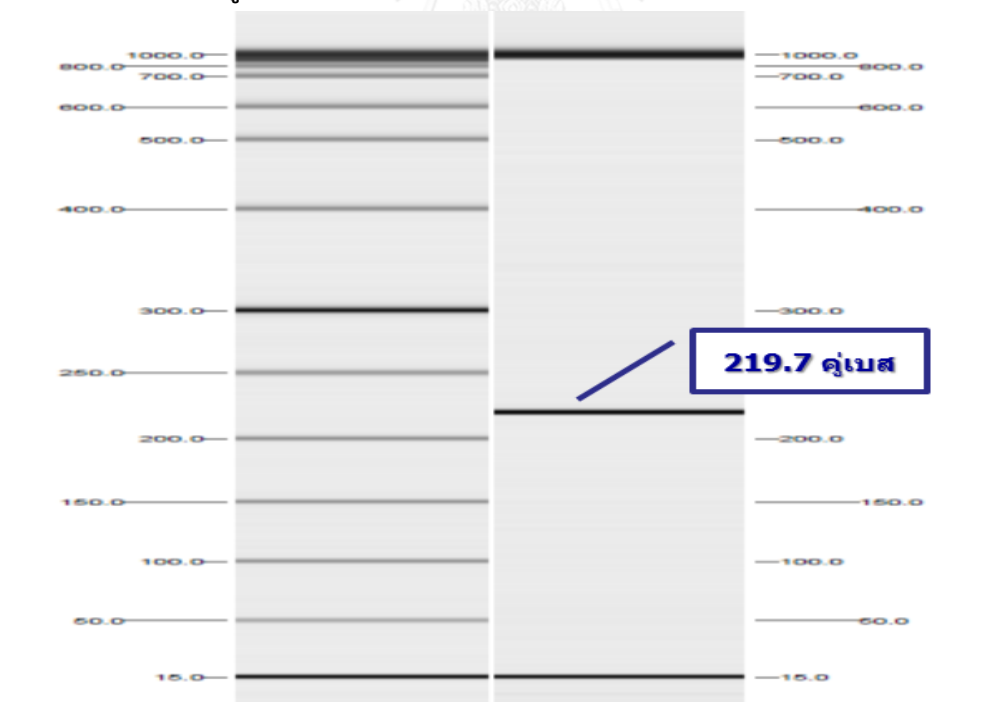
ภาพที่ 26 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแมวที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 83.1 คู่เบส



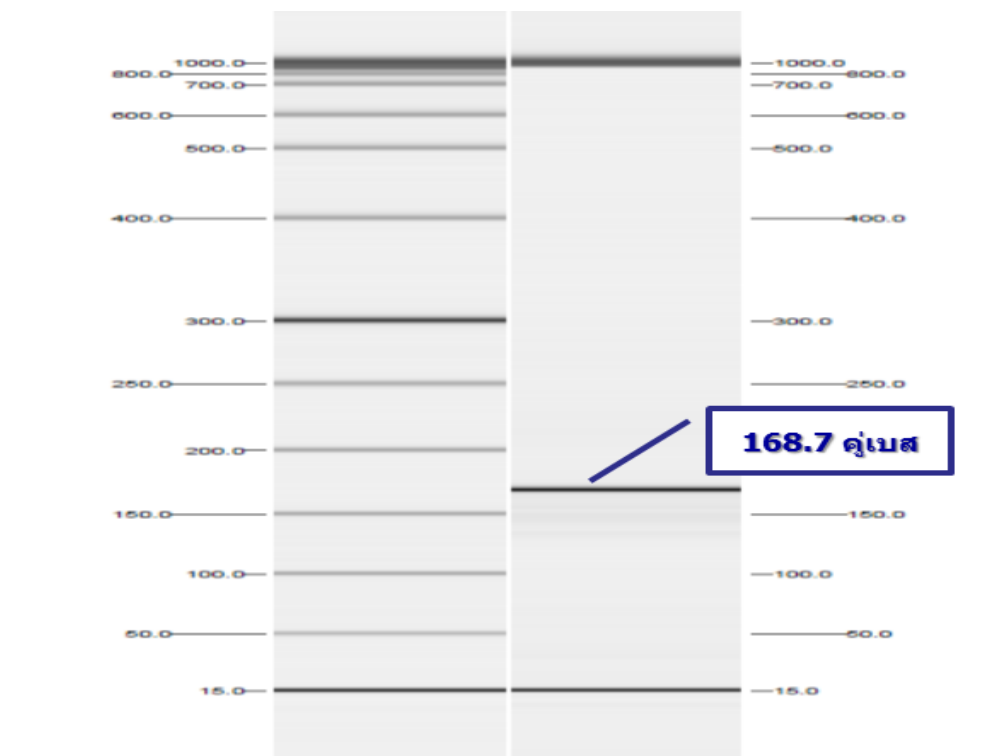
ภาพที่ 27 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสุกรที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 149.6 คู่เบส



ภาพที่ 28 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของหนูนที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 219.7 คู่เบส



ภาพที่ 29 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสุนัขที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 139.4 คู่เบส



ภาพที่ 30 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลิงที่วัดได้จริงด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis วัดขนาดได้ที่ 168.7 คู่เบส

#### 4.4 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Singleplex HRMA

ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 คู่ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามชนิดอื่นๆ ทั้ง 6 ชนิดและทดสอบกับดีเอ็นเอของสัตว์ฮาลาลอีก 4 ชนิด ได้แก่ ไก่ ม้า แพะ และแกะ จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดมีความจำเพาะให้ผลบวกกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น แสดงในตารางที่ 16

ไพรเมอร์ลา ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอแมว ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอหนูนา ดีเอ็นเอสุนัข ดีเอ็นเอลิง ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ไพรเมอร์แมว ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอลา ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอหนูนา ดีเอ็นเอสุนัข ดีเอ็นเอลิง ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ไพรเมอร์สุกร ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอแมว ดีเอ็นเอลา ดีเอ็นเอหนูนา ดีเอ็นเอสุนัข ดีเอ็นเอลิง ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ไพรเมอร์หนูนา ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอแมว ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอลา ดีเอ็นเอสุนัข ดีเอ็นเอลิง ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ไพรเมอร์สุนัข ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอแมว ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอหนูนา ดีเอ็นเอลา ดีเอ็นเอลิง ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ไพรเมอร์ลิง ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับ ดีเอ็นเอแมว ดีเอ็นเอสุกร ดีเอ็นเอหนูนา ดีเอ็นเอสุนัข ดีเอ็นเอลา ดีเอ็นเอไก่ ดีเอ็นเอม้า ดีเอ็นเอแพะ ดีเอ็นเอแกะ

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 คู่ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะ 100 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ต่อยอดเป็น Multiplex HRMA

ชนิดสัตว์ต้องห้ามและสัตว์ฮาลาล	Singleplex HRMA					
	ลา- 16S	แมว- Cytb	สุกร- ND5	หนู- Cytb	สุนัข- ATP6	ลิง - ND5
สุกร ( <i>Sus scrofa</i> )	-	-	+	-	-	-
สุนัข ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	-	-	-	-	+	-
ลิง ( <i>Macaca fascicularis</i> )	-	-	-	-	-	+
หนูนา ( <i>Rattus argentiventer</i> )	-	-	-	+	-	-
แมว ( <i>Felis catus</i> )	-	+	-	-	-	-
ลา ( <i>Equus asinus</i> )	+	-	-	-	-	-
ไก่ ( <i>Gallus gallus</i> )	-	-	-	-	-	-
ม้า ( <i>Equus caballus</i> )	-	-	-	-	-	-
แพะ ( <i>Capra aegagrus</i> )	-	-	-	-	-	-
แกะ ( <i>Ovis aries</i> )	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 16 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ (Specificity test) ของเทคนิค Singleplex HRMA

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

- สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียว ทั้ง 5 ตัวอย่างของสัตว์แต่ละชนิด ดังแสดงในตาราง

ชนิดสัตว์	Singleplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ลา 1	+	-	-	-	-	-
ลา 2	+	-	-	-	-	-
ลา 3	+	-	-	-	-	-
ลา 4	+	-	-	-	-	-
ลา 5	+	-	-	-	-	-
แมว 1	-	+	-	-	-	-
แมว 2	-	+	-	-	-	-
แมว 3	-	+	-	-	-	-
แมว 4	-	+	-	-	-	-
แมว 5	-	+	-	-	-	-
สุกร 1	-	-	+	-	-	-
สุกร 2	-	-	+	-	-	-
สุกร 3	-	-	+	-	-	-
สุกร 4	-	-	+	-	-	-
สุกร 5	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 17 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค Singleplex HRMA ของลา แมว สุกร จำนวน 5 ตัวอย่าง

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

- สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

ชนิดสัตว์	Singleplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
หนูนา 1	-	-	-	+	-	-
หนูนา 2	-	-	-	+	-	-
หนูนา3	-	-	-	+	-	-
หนูนา 4	-	-	-	+	-	-
หนูนา 5	-	-	-	+	-	-
สุนัข 1	-	-	-	-	+	-
สุนัข 2	-	-	-	-	+	-
สุนัข 3	-	-	-	-	+	-
สุนัข 4	-	-	-	-	+	-
สุนัข 5	-	-	-	-	+	-
ลิง 1	-	-	-	-	-	+
ลิง 2	-	-	-	-	-	+
ลิง 3	-	-	-	-	-	+
ลิง 4	-	-	-	-	-	+
ลิง 5	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 18 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค Singleplex HRMA ของหนูนา สุนัข ลิง จำนวน 5 ตัวอย่าง

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

- สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

ชนิดสัตว์	Singleplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ไก่ 1	-	-	-	-	-	-
ไก่ 2	-	-	-	-	-	-
ไก่ 3	-	-	-	-	-	-
ไก่ 4	-	-	-	-	-	-
ไก่ 5	-	-	-	-	-	-
ม้า 1	-	-	-	-	-	-
ม้า 2	-	-	-	-	-	-
ม้า 3	-	-	-	-	-	-
ม้า 4	-	-	-	-	-	-
ม้า 5	-	-	-	-	-	-
แพะ 1	-	-	-	-	-	-
แพะ 2	-	-	-	-	-	-
แพะ 3	-	-	-	-	-	-
แพะ 4	-	-	-	-	-	-
แพะ 5	-	-	-	-	-	-
แกะ 1	-	-	-	-	-	-
แกะ 2	-	-	-	-	-	-
แกะ 3	-	-	-	-	-	-
แกะ 4	-	-	-	-	-	-
แกะ 5	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 19 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์ฮาลาลแต่ละชนิด จำนวน 5 ตัวอย่าง

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ - สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

#### 4.5 การทดสอบความไว หรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Singleplex HRMA

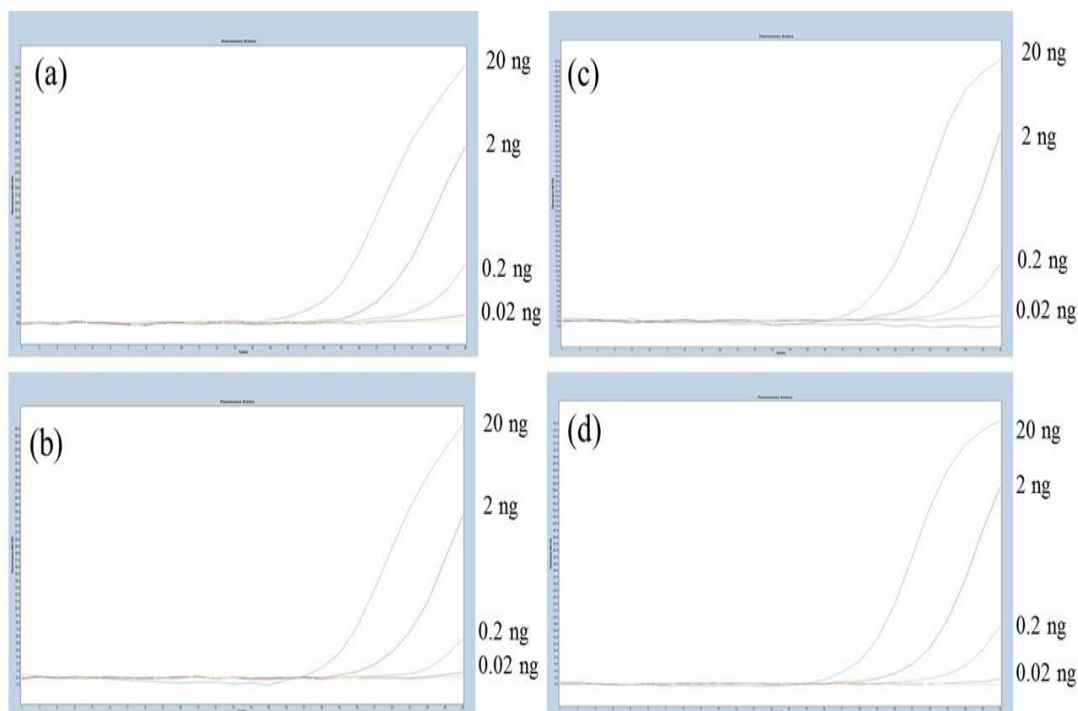
เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ จากนั้นทดสอบความไวของเทคนิค Singleplex HRMA ต่อดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด โดยเจือจางดีเอ็นเอของลา แมว สุนัข หนูนา สุนัข และลิงด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันทั้งสิ้น 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 50 นาโนกรัม 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม และ 0.0002 นาโนกรัม แล้วตรวจวัดด้วยเทคนิค Singleplex HRMA

พบว่าเทคนิค Singleplex HRMA ของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดให้ผลดังนี้ ไพรเมอร์ลา ตรวจวัดดีเอ็นเอลาได้ที่ 5 ระดับทดสอบ คือ ระดับ 50 นาโนกรัม ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม ไพรเมอร์แมวตรวจวัดดีเอ็นเอแมวได้ที่ 5 ระดับทดสอบเช่นกัน คือ ระดับ 50 นาโนกรัม ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม ไพรเมอร์สุนัข ตรวจวัดดีเอ็นเอสุนัขได้ที่ 5 ระดับทดสอบ คือ ระดับ 50 นาโนกรัม ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม ไพรเมอร์หนูนา ตรวจวัดดีเอ็นเอหนูนาได้ที่ 5 ระดับทดสอบ คือ ระดับ 50 นาโนกรัม ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม ไพรเมอร์ลิง ตรวจวัดดีเอ็นเอลิงได้ที่ 5 ระดับทดสอบ คือ ระดับ 50 นาโนกรัม ระดับ 20 นาโนกรัม ระดับ 2 นาโนกรัม ระดับ 0.2 นาโนกรัม และตรวจวัดได้ระดับต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม (ตารางที่ 20 และภาพที่ 31)

Singleplex HRMA	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng)					
	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002
ลา	+	+	+	+	-	-
แมว	+	+	+	+	-	-
สุนัข	+	+	+	+	+	-
หนู	+	+	+	+	-	-
สุนัข	+	+	+	+	-	-
ลิง	+	+	+	+	-	-

ตารางที่ 20 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอสัตว์ต้องห้ามที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Singleplex HRMA





ภาพที่ 31 แสดง amplification curve ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เทคนิค Singleplex HRMA สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดได้ที่ต่ำสุด 0.02 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ยกเว้นสุกรที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 0.002 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

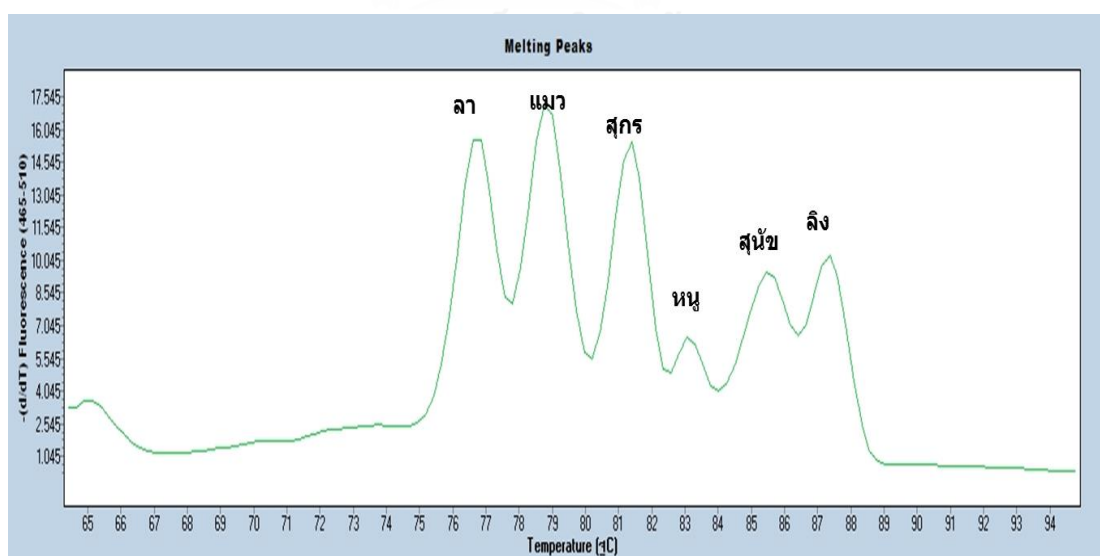
สำหรับลา ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Kesmen และคณะ (2007) สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอลาได้ต่ำสุดที่ 0.1 นาโนกรัม และงานวิจัยของ You และคณะ (2014) ที่ตรวจวัดได้ถึง 0.0001 นาโนกรัม แต่  $T_m$  ของลาจากงานของ You นั้นซ้อนทับกับ  $T_m$  ของม้าในงานวิจัยเดียว ซึ่งไม่เหมาะกับการทำ Multiplex เพราะอาจทำให้ผลที่ได้ประเมินผลคลาดเคลื่อน (You et al., 2013)

แมว สุกร หนู สุนัข ลิง นั้นให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนี้ของผู้ที่ออกแบบไพรเมอร์ แต่อย่างไรก็ตามการประเมินผลของเทคนิค HRMA ในงานวิจัยนี้ ให้ผลที่สะดวกรวดเร็วและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้อยกว่า ซึ่งงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้าม ได้แก่ สุกร สุนัข หนู แมว ลิง ความไวอยู่ช่วง 0.01-0.02 นาโนกรัม แต่การประเมินผลของ Ali จะช้ากว่าเนื่องจากใช้ CE ในการตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน อาจยังไม่เหมาะสมกับงานตรวจด้านฮาลาลที่ต้องความแม่นยำและความรวดเร็ว

#### 4.6 การตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

เทคนิค Multiplex HRMA เป็นการรวมไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดเข้าด้วยกันและเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายทุกตัวเกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ไพรเมอร์ที่ใช้ต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย รวมถึงมีค่า  $T_m$  ที่ใกล้เคียงกันโดยห่างกันที่ 1.5- 2 องศาเซลเซียส เพื่อให้สามารถใช้ตั้งค่าโปรแกรมการทำ Multiplex HRMA เดียวกันได้ (Iwobi et al., 2017) ซึ่งจากผลการทดลองในส่วน ของ Singleplex จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้มีความจำเพาะและความไวในการตรวจวัดสูง อีกทั้งยังมีค่า  $T_m$  ที่ห่างกัน ทำให้โอกาสที่  $T_m$  จะซ้อนทับกันต่ำ ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะตรวจพร้อมกันแบบ Multiplex ได้

จากผลการทดลองโดยรวมไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่เข้าด้วยกันและนำไปทดสอบกับดีเอ็นเอรวม (DNA Mix) ที่ผสมดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 20 นาโนกรัม เข้าด้วยกัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ระดับเท่ากันในทุกคู่จาก Singleplex HRMA จะเกิดการแข่งขันแย่งชิงของคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายของสัตว์แต่ละชนิดและไพรเมอร์แต่ละคู่ ทำให้ Melting peaks ที่ได้ไม่เป็น Peak เดียวที่ชัดเจน จึงปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ใหม่แต่ละคู่ เพื่อให้จะให้ไพรเมอร์แต่ละคู่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างเท่าเทียมกัน จนกระทั่งได้ผลการทดลองที่ยอมรับได้คือสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ทุกชนิดได้พร้อมกันใน 1 ปฏิกิริยา และมี Melting peaks ของแต่ละสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดแยกออกจากกันอย่างชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 32

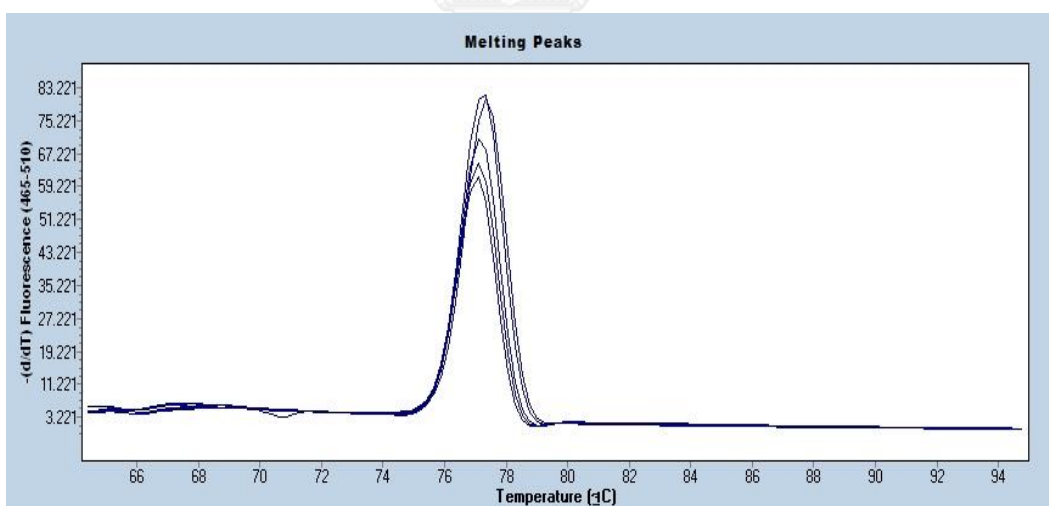


ภาพที่ 32 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ของไพรเมอร์สัตว์ต้องห้ามกับดีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด หลังปรับสภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด

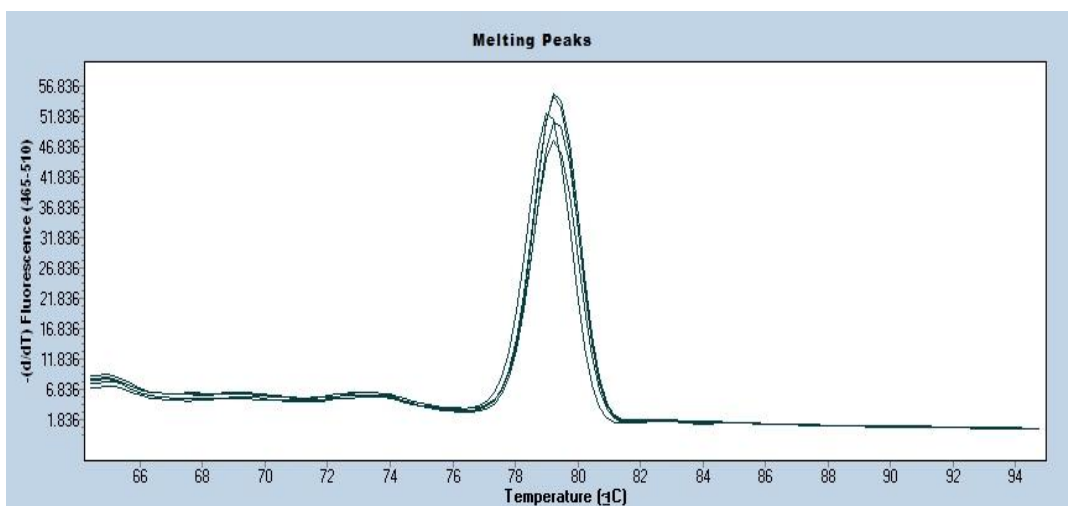
หลังจากนั้นนำสถานะของ Multiplex HRMA ที่ได้มาตรวจวัดกับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้าม แต่ละชนิด ชนิดละ 5 ตัวอย่าง และทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) โดยทดลอง ห่างจากวันเดิม 1 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่า Multiplex HRMA สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ของสัตว์เป้าหมายได้ โดยมีรูปแบบ Melting peak และค่า Tm สอดคล้องกับคล้อยกับการตรวจวัด ด้วยเทคนิค Singleplex ดังแสดงในตารางที่ 21 และภาพที่ 33-ภาพที่ 40

สัตว์ต้องห้าม	ช่วงค่า Tm °C	ค่า Tm °C เฉลี่ย
ลา	77.06-77.33	77.17 ± 0.10°C
แมว	79.15-79.39	79.32 ± 0.09°C
สุกร	80.57-81.40	80.83 ± 0.36°C
หนูนา	83.12-83.17	83.15 ± 0.02°C
สุนัข	84.89-85.91	85.44 ± 0.49°C
ลิง	86.92-87.35	87.11 ± 0.17°C

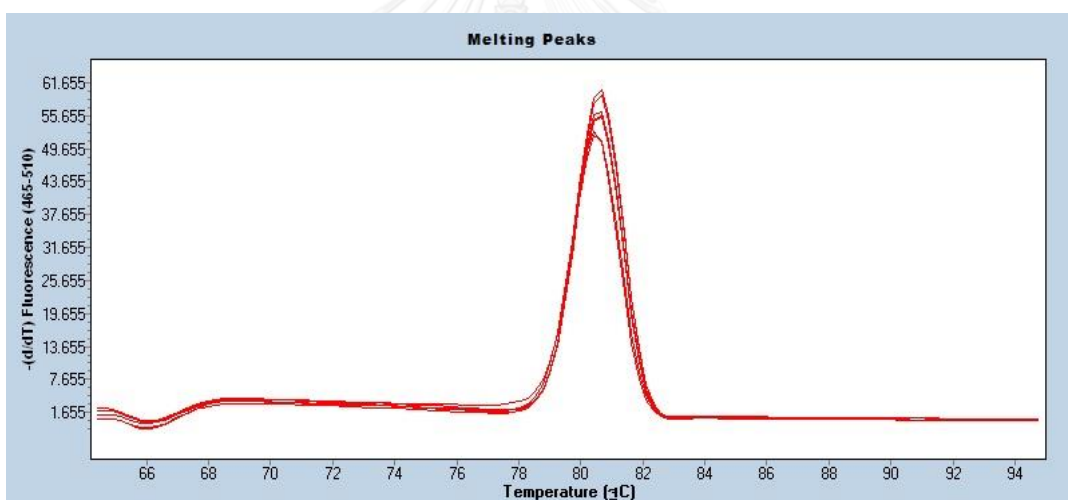
ตารางที่ 21 แสดงช่วงค่า Tm และค่า Tm เฉลี่ยของสัตว์แต่ละชนิดจากการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA



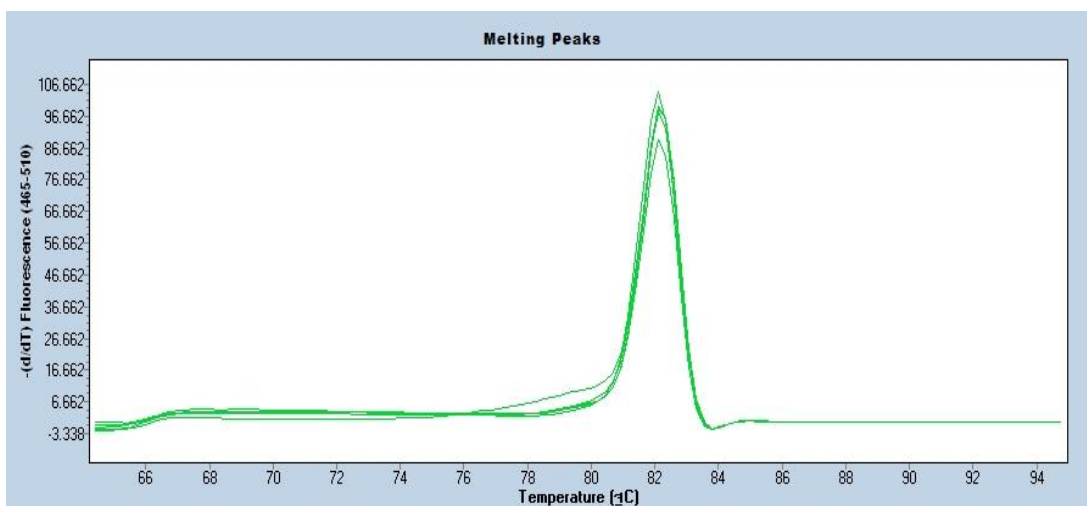
ภาพที่ 33 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของลา ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง



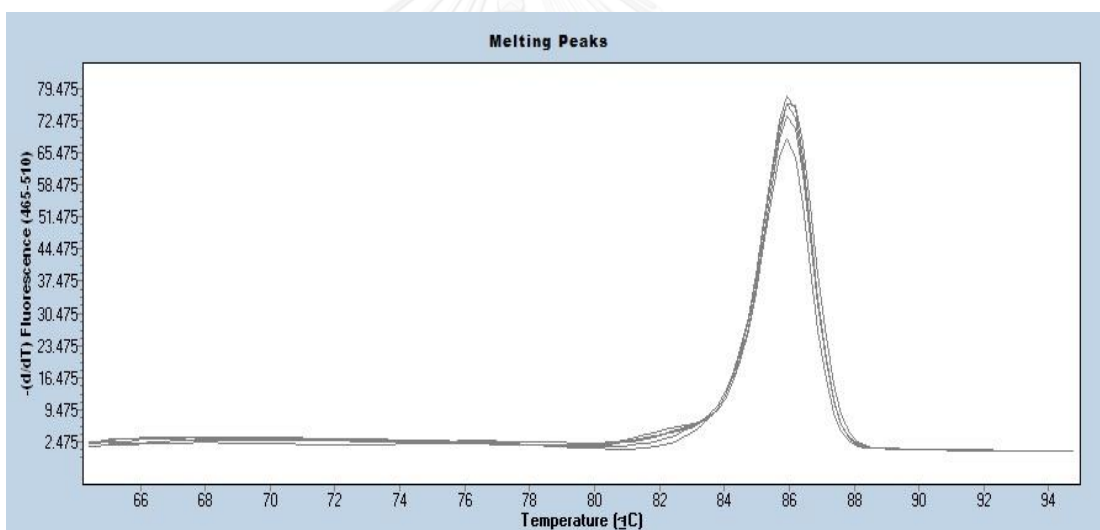
ภาพที่ 34 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของ  
แมว ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง



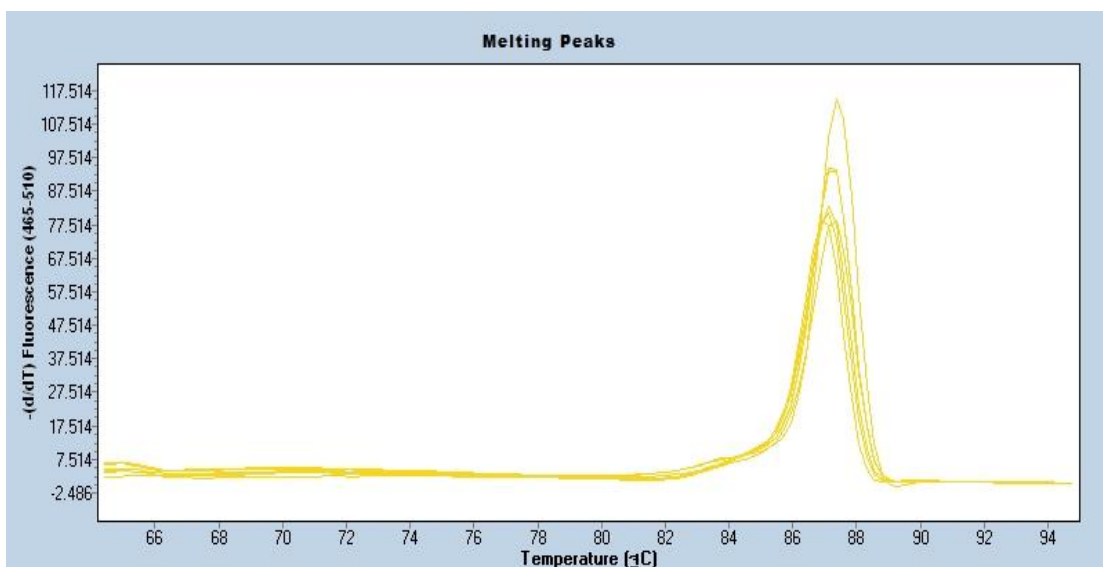
ภาพที่ 35 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของ  
สุกร ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง



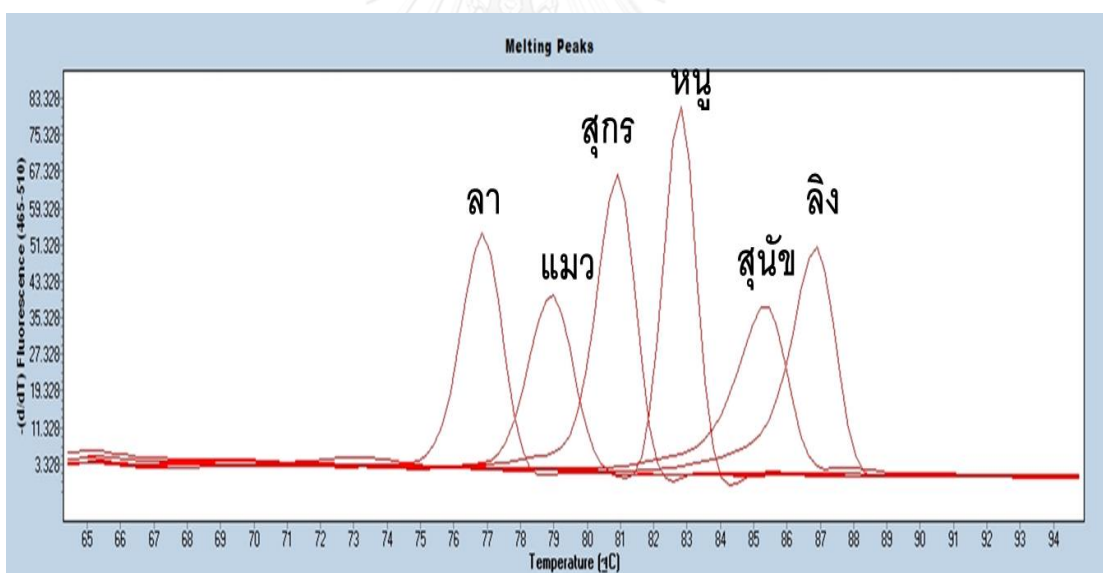
ภาพที่ 36 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของหนูนา ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง



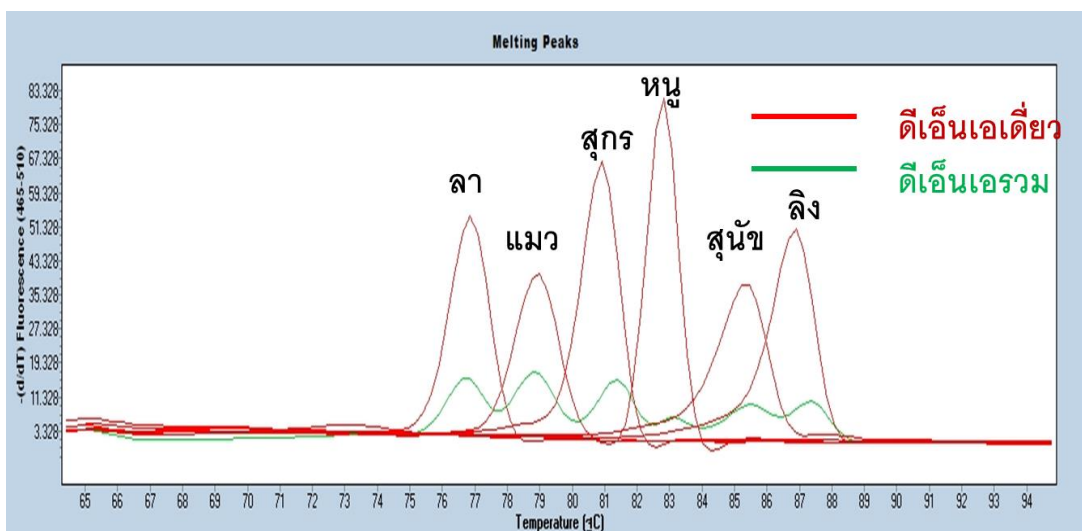
ภาพที่ 37 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของสุนัข ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง



ภาพที่ 38 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของลิง ทดลองจำนวน 5 ตัวอย่าง

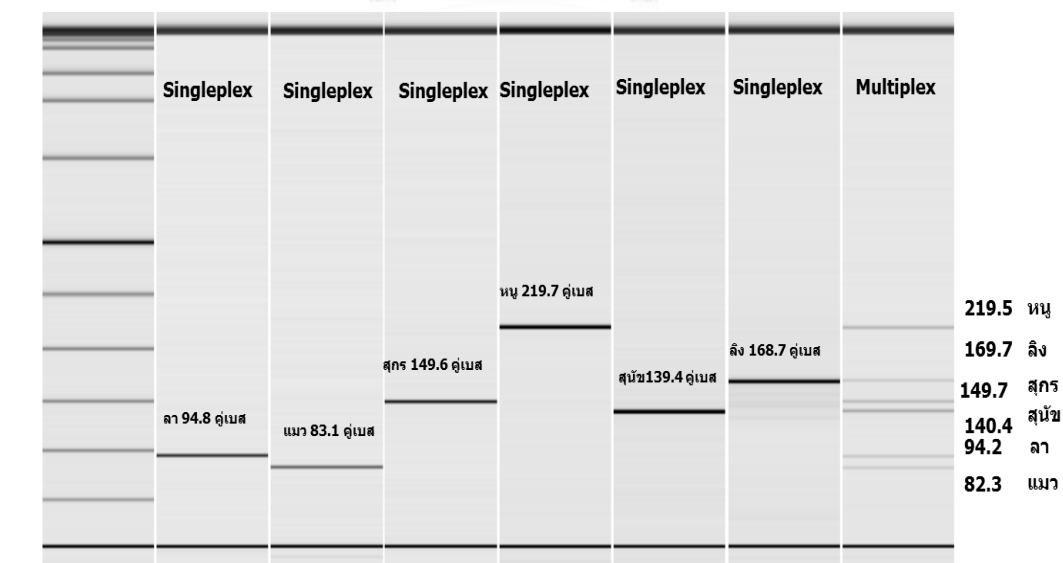


ภาพที่ 39 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอเดี่ยวของสัตว์ ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด



ภาพที่ 40 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ของไพรเมอร์สัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ให้ผลที่สอดคล้องกันกับดีเอ็นเอเดี่ยวเทียบกับดีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ให้ผลที่สอดคล้องกัน

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า Multiplex HRMA สามารถตรวจวัดได้ทั้งในกรณีดีเอ็นเอเดี่ยวและดีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ให้ค่า Tm และรูปแบบ Melting peaks ที่สอดคล้องกัน ยืนยันผลการทดลองอีกครั้งด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis ผลที่ได้สอดคล้องกัน ยิ่งตอกย้ำถึงความจำเพาะของไพรเมอร์ที่เลือกใช้



ภาพที่ 41 แสดง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอรวมของสัตว์ต้องห้ามที่วัดได้ด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis

ในการทำ Multiplex HRMA การออกแบบไพรเมอร์จัดเป็นสิ่งที่มีความสำคัญที่สุด เช่นเดียวกับ Singleplex HRMA เนื่องจากในงาน Multiplex HRMA ปฏิบัติการการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ เป้าหมายทุกตัวเกิดขึ้นหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน ดังนั้น การออกแบบไพรเมอร์จำเป็นต้องเลือกชุดไพรเมอร์ทั้งหมดให้มีค่า  $T_m$  ที่ใกล้เคียง โดยควรมี %GC ประมาณ 40-60% เพื่อให้สามารถใช้ตั้งค่าโปรแกรมการตรวจวัดเดียวกันได้ นอกจากนี้ยังต้องระมัดระวังการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์กับไพรเมอร์ การเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์จากการจับกันเองของเบสคู่สม 2-3 เบสบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ ฯลฯ (วิระพงศ์ ลุติตานนท์, 2557) แม้ว่าการเกิดปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวไม่เกิดในขั้นตอนของการตรวจวัด แต่ก็สามารถเกิดในช่วงการเตรียมปฏิกิริยา ในปัจจุบัน Multiplex HRMA นำมาใช้สำเร็จรูปสำหรับงาน Real-Time PCR ไม่ว่าจะแบบ Singleplex หรือ Multiplex ที่ผลิตจากบริษัททั้งหลายจึงใช้ระบบ hot start ทั้งหมด เนื่องจากการใช้ระบบ hot start ช่วยป้องกันการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ รวมถึงการเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์ อย่างไรก็ตาม ต้องระลึกเสมอว่าการใช้ระบบ hot start ไม่สามารถป้องกันการเกิดปฏิสัมพันธ์ของไพรเมอร์ได้อย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในการตรวจวัดแบบ Multiplex HRMA ซึ่งมีไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ โอกาสของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ และการเกิดไพรเมอร์-ไดเมอร์จะสูงขึ้น (Jilberto et al., 2017) อย่างไรก็ตามแม้จะทำได้พยายามออกแบบไพรเมอร์ให้เป็นไปตามข้อกำหนดทั้งหลาย และผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมออกแบบเพื่อลดปฏิสัมพันธ์ของไพรเมอร์แล้วก็ตาม เมื่อมาทดสอบจริงปัญหาเหล่านี้ก็ยังสามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งเมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ จึงมีความจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์ในบางคู่

เมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบอื่นในการทำ Multiplex HRMA ในปัจจุบัน ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการ Multiplex และ Singleplex แทบทั้งหมดไม่มีความจำเป็นต้องปรับส่วนประกอบอื่นเลย ยกเว้น อาจมีเพียงการปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากทางบริษัทที่ผลิตได้ทำการปรับส่วนประกอบให้เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว ซึ่งแตกต่างจากในอดีตที่เริ่มมีการนำมัลติเพล็กซ์พีอาร์แบบดั้งเดิมมาใช้ ซึ่งยังคงยึดในปริมาณ และอัตราส่วนของส่วนประกอบอื่นของน้ำยามาตรฐานที่ใช้ในการทำ Singleplex แล้วจึงค่อยปรับส่วนประกอบอื่นในน้ำยาเพื่อให้มีความเหมาะสมมากขึ้นสำหรับการทำ Multiplex ยกตัวอย่างเช่น การใช้ Multiplex PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน Dystrophin จำนวน 9 ตำแหน่งโดย Chamberlain และคณะ ได้มีการปรับความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase เพิ่มขึ้น 4-5 เท่าของความเข้มข้นมาตรฐานที่ใช้กับ Singleplex เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการเพิ่มสารจำพวกที่เรียกว่า Betaine ลงในปฏิกิริยา Multiplex PCR ซึ่งพบว่าได้ผลดี ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีกลไกในการช่วยใน ปฏิกิริยาด้วยกันหลายกลไก เช่น อาจช่วยในการป้องกันการหยุดสร้างสายดีเอ็นเอจากการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอแม่แบบในช่วงการ Extension โดยสายเหล่านี้อาจทำหน้าที่



เป็น Destabilizing agents ช่วยสลายโครงสร้างทุติยภูมิ หรือ อาจทำหน้าที่เป็นตัวเพิ่มความเสถียร (Osmoprotectants) ของตัวเอนไซม์ DNA polymerase ในขั้นตอน Denaturation ของการทำ PCR ซึ่งการศึกษาในอดีตที่ผ่านมาเหล่านี้ เป็นพื้นฐานสำคัญที่ทำให้บริษัทเหล่านี้ได้นำมาใช้ในการปรับส่วนประกอบอื่นในปฏิกิริยาให้มีความเหมาะสมครอบคลุม สำหรับการตรวจวัดแบบ Singleplex และแบบ Multiplex (Reed & Wittwer, 2004)

#### 4.7 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA

การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดและดีเอ็นเอสัตว์ฮาลาลอีก 4 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า Multiplex HRMA ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายเท่านั้น ซึ่งมีความจำเพาะ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบความจำเพาะแบบ Singleplex ดังแสดงในตารางที่ 22- ตารางที่ 24

ชนิดสัตว์	Multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หมู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ลา 1	+	-	-	-	-	-
ลา 2	+	-	-	-	-	-
ลา 3	+	-	-	-	-	-
ลา 4	+	-	-	-	-	-
ลา 5	+	-	-	-	-	-
แมว 1	-	+	-	-	-	-
แมว 2	-	+	-	-	-	-
แมว 3	-	+	-	-	-	-
แมว 4	-	+	-	-	-	-
แมว 5	-	+	-	-	-	-
สุกร 1	-	-	+	-	-	-
สุกร 2	-	-	+	-	-	-
สุกร 3	-	-	+	-	-	-
สุกร 4	-	-	+	-	-	-
สุกร 5	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 22 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค Multiplex HRMA ของลา แมว สุกร จำนวน 5 ตัวอย่าง

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ - สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

ชนิดสัตว์	Multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
หนูนา 1	-	-	-	+	-	-
หนูนา 2	-	-	-	+	-	-
หนูนา 3	-	-	-	+	-	-
หนูนา 4	-	-	-	+	-	-
หนูนา 5	-	-	-	+	-	-
สุนัข 1	-	-	-	-	+	-
สุนัข 2	-	-	-	-	+	-
สุนัข 3	-	-	-	-	+	-
สุนัข 4	-	-	-	-	+	-
สุนัข 5	-	-	-	-	+	-
ลิง 1	-	-	-	-	-	+
ลิง 2	-	-	-	-	-	+
ลิง 3	-	-	-	-	-	+
ลิง 4	-	-	-	-	-	+
ลิง 5	-	-	-	-	-	+

ตารางที่ 23 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค Multiplex HRMA ของหนู สุนัข ลิง จำนวน 5 ซ้ำ

หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

- สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

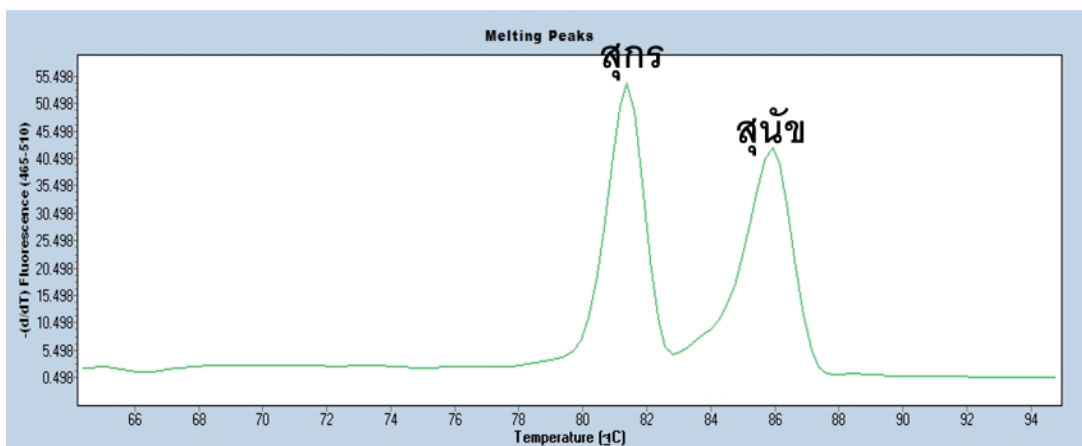
ชนิดสัตว์	multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ไก่ 1	-	-	-	-	-	-
ไก่ 2	-	-	-	-	-	-
ไก่ 3	-	-	-	-	-	-
ไก่ 4	-	-	-	-	-	-
ไก่ 5	-	-	-	-	-	-
ม้า 1	-	-	-	-	-	-
ม้า 2	-	-	-	-	-	-
ม้า 3	-	-	-	-	-	-
ม้า 4	-	-	-	-	-	-
ม้า 5	-	-	-	-	-	-
แพะ 1	-	-	-	-	-	-
แพะ 2	-	-	-	-	-	-
แพะ 3	-	-	-	-	-	-
แพะ 4	-	-	-	-	-	-
แพะ 5	-	-	-	-	-	-
แกะ 1	-	-	-	-	-	-
แกะ 2	-	-	-	-	-	-
แกะ 3	-	-	-	-	-	-
แกะ 4	-	-	-	-	-	-
แกะ 5	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 24 แสดงการทดสอบ ความจำเพาะ ของเทคนิค multiplex HRMA ของสัตว์ฮาลาลชนิดอื่นๆ จำนวน 5 ซ้ำ

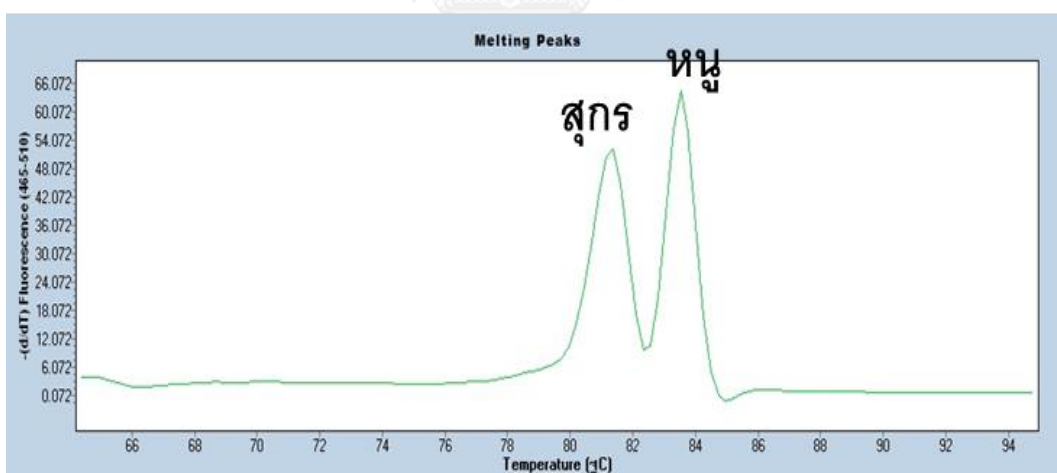
หมายเหตุ + สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

- สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้

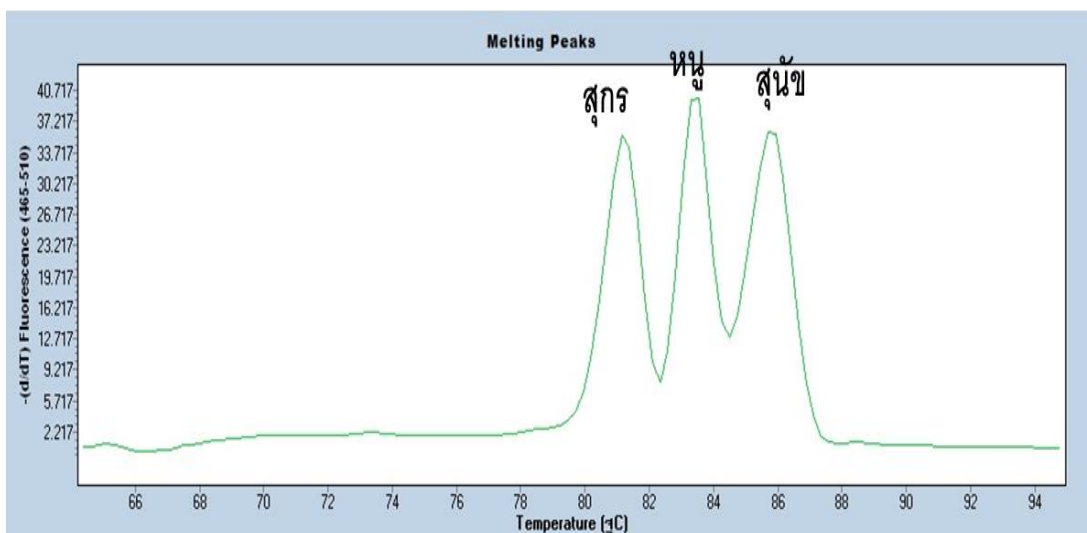
นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความถูกต้อง โดยรวมดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามมากกว่า 1 ชนิดและตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ผลการทดลองให้ผลบวกทุกการทดลอง สอดคล้องกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผสมลงไป แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของไพรเมอร์



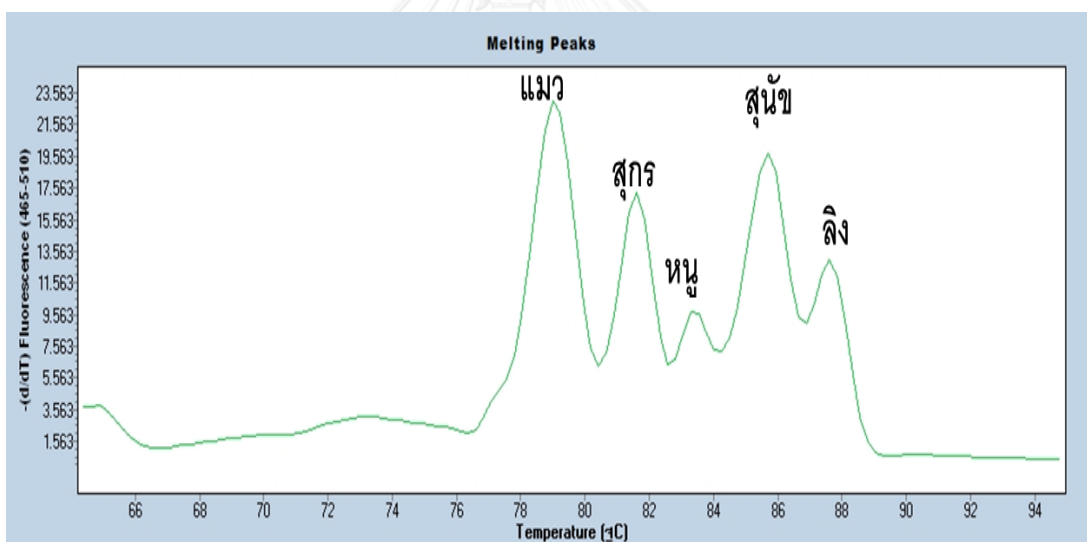
ภาพที่ 42 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 2 ชนิด ได้แก่ สุกรและสุนัข



ภาพที่ 43 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของสัตว์ต้องห้าม 2 ชนิด ได้แก่ สุกรและหนู



ภาพที่ 44 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของ สัตว์ต้องห้าม 3 ชนิด ได้แก่ สุกกร หนูนา สุนัข



ภาพที่ 45 แสดง Melting peaks ของการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับดีเอ็นเอควบคุมของ สัตว์ต้องห้าม 5 ชนิด ได้แก่ แมว สุกกร หนูนา สุนัข และลิง

#### 4.8 การทดสอบความไว หรือความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจวัดได้ ของเทคนิค Multiplex HRMA

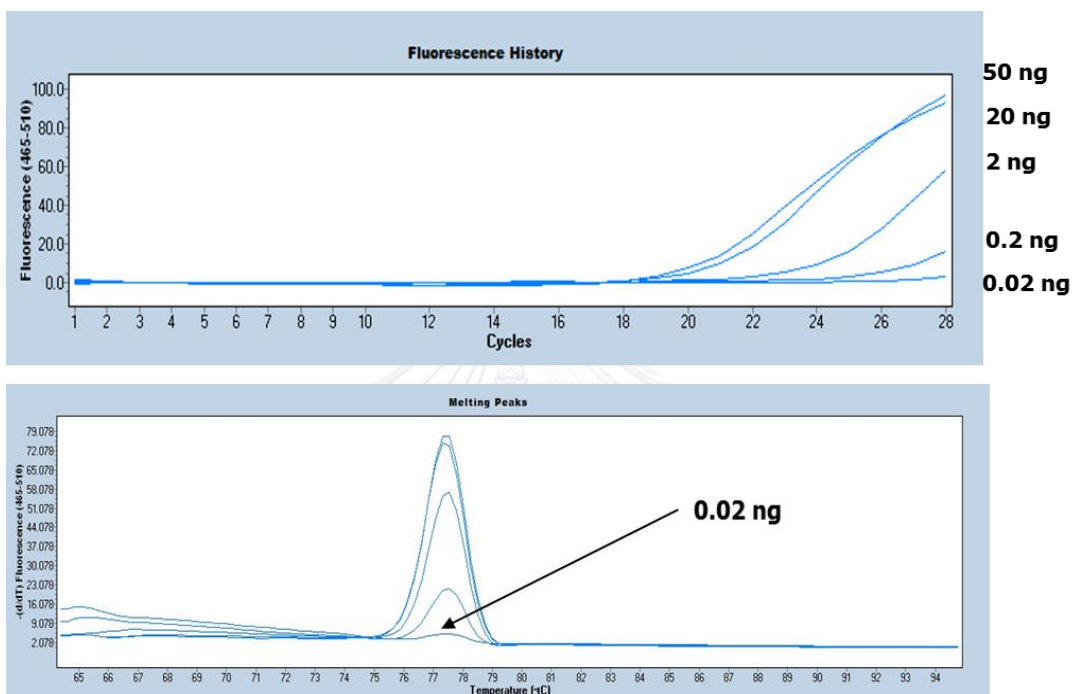
การทดสอบความไวแบบ Multiplex HRMA ได้เจือจางดีเอ็นเอของลา แมว สุนัข หนู สุนัข และลิงด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นแตกต่างกันทั้งสิ้น 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 50 นาโนกรัม 20 นาโนกรัม 2 นาโนกรัม 0.2 นาโนกรัม 0.02 นาโนกรัม 0.002 นาโนกรัม 0.0002 นาโนกรัม แล้วทดสอบด้วยปฏิกิริยา Multiplex HRMA ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบของเทคนิค Singleplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม ยกเว้น สุนัขที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 0.002 นาโนกรัม ดังแสดงในตารางที่ 25 และภาพที่ 46 – ภาพที่ 51

Multiplex HRMA	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng)					
	20	2	0.2	0.02	0.002	0.0002
ลา	+	+	+	+	-	-
แมว	+	+	+	+	-	-
สุนัข	+	+	+	+	+	-
หนู	+	+	+	+	-	-
ลิง	+	+	+	+	-	-

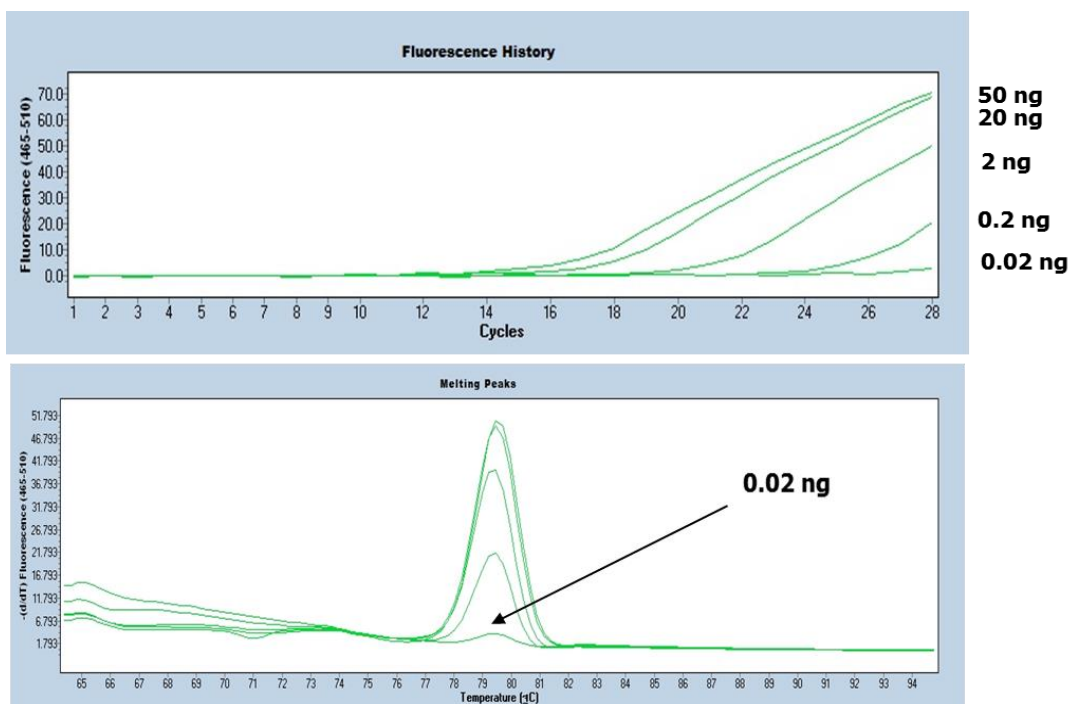
ตารางที่ 25 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอสัตว์ต้องห้ามที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานเกี่ยวกับความไวหรือความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของ Multiplex ไว้มากมาย Matsunga และคณะ (1999) ใช้ Multiplex PCR ตรวจวัด วัช สุนัข ไก่ แพะ แกะ ม้า ซึ่งตรวจวัดได้ที่ 0.25 นาโนกรัม Di pinto และคณะ (2005) ใช้ Multiplex PCR ตรวจวัดม้า และสุนัข ความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.25 นาโนกรัม นอกจากนี้ Zha และคณะ (2010) ใช้ Multiplex PCR ตรวจวัด วัช ไก่ แพะ สุนัข ความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.02-0.5 นาโนกรัม Ali และคณะ (2015) ตรวจวัดสัตว์ต้องห้าม 5 ชนิดได้แก่ สุนัข สุนัข ลิง หนู แมว ด้วย Multiplex PCR ซึ่งความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ 0.01-0.02 นาโนกรัม อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ยกตัวอย่างมานั้นส่วนใหญ่ตรวจวัดผลผลิตปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis หรือการใช้ CE ซึ่งใช้เวลานานมากกว่า และมีโอกาสปนเปื้อนขณะทำการทดลองได้ สำหรับ Multiplex HRMA ในการทดลองนี้ให้ผลที่รวดเร็วไม่ต้องใช้ Gel Electrophoresis ลดระยะเวลาในการตรวจวัดได้ เมื่อเทียบกับงานลักษณะ

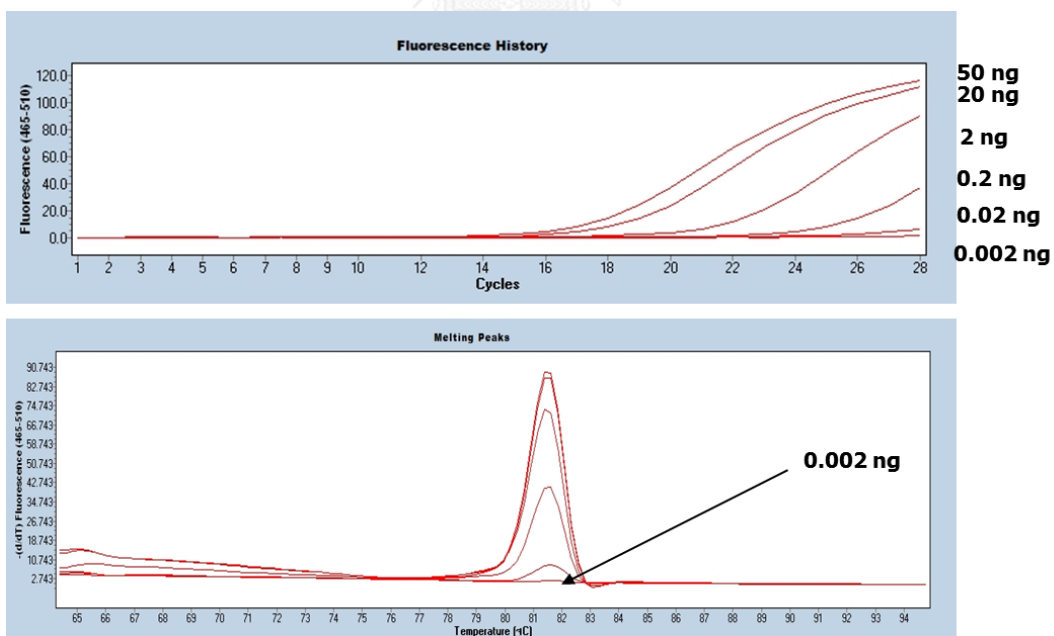
เดียวกันของ HRMA Sakaridis และคณะ (2013) ได้ตรวจวัดบ่งชี้ชนิดสัตว์ 5 ชนิด กระบือ วัว สุกร แกะ แพะ รายงานว่าเทคนิค HRMA มีความสะดวกในการประมวลผล ใช้ Melting peaks ในการแยกความแตกต่างได้ ความไวในการตรวจวัดสูง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ต่ำสุดถึง 0.01 นาโนกรัม นอกจากนี้ Ganopoulos และคณะ (2013) ใช้ HRMA ตรวจวัดการปนเปื้อนดีเอ็นเอ วัว แกะและแพะ ในผลิตภัณฑ์ ชีสจากน้ำนมกระบือ ซึ่งตรวจวัดได้ต่ำสุดที่อัตราผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 46 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ ลาได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม

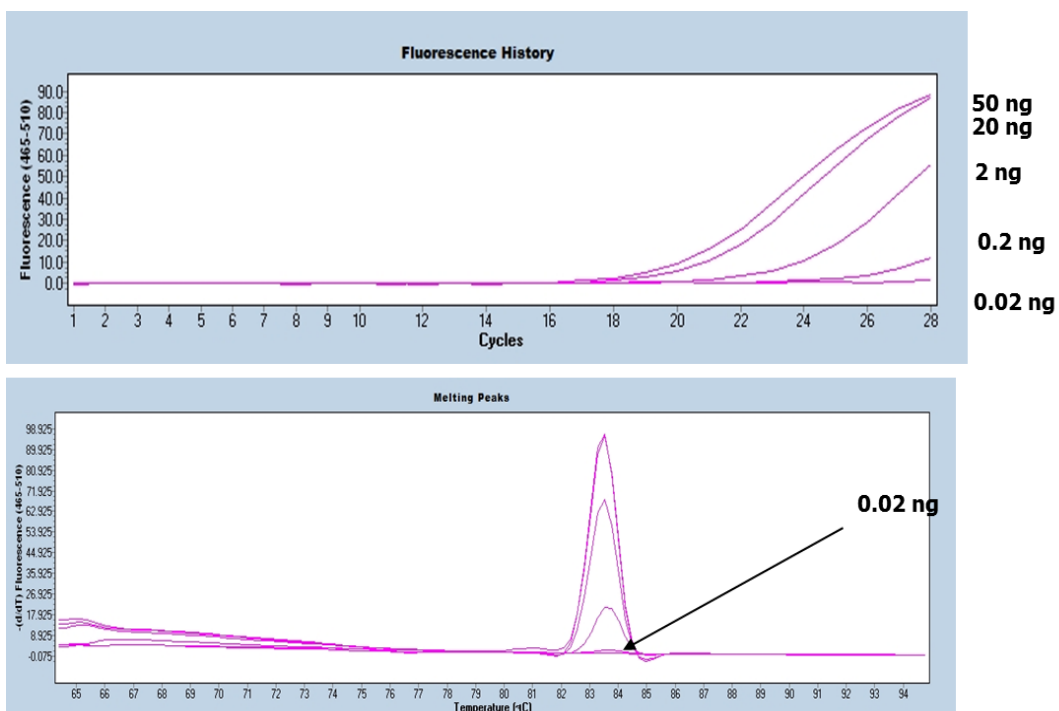


ภาพที่ 47 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ measles ได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม

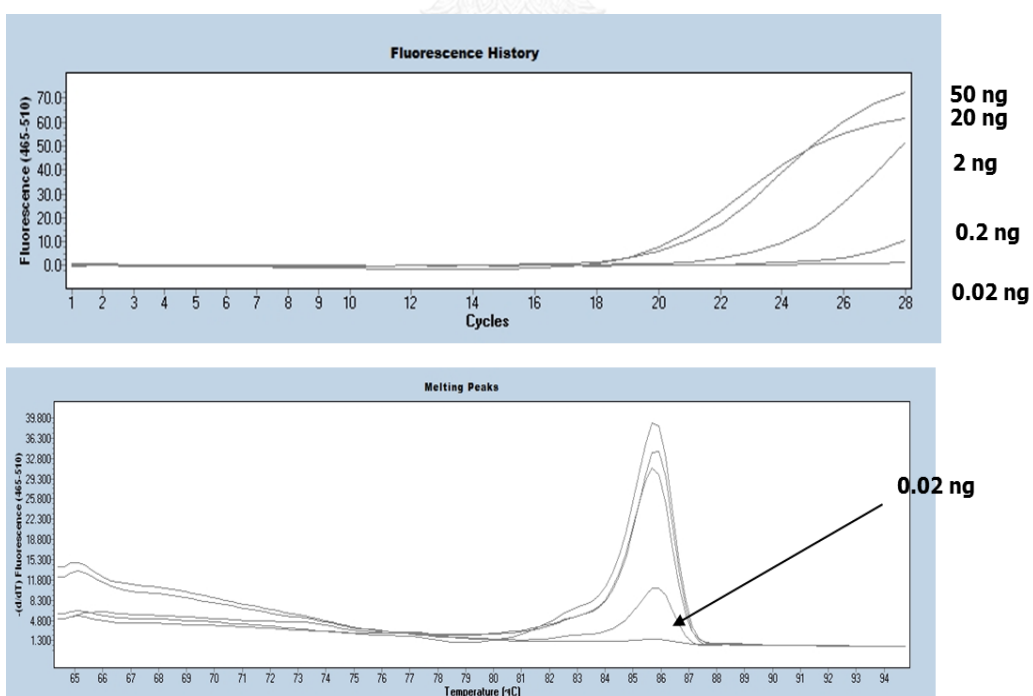


ภาพที่ 48 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ dengue ได้ต่ำสุดที่ 0.002 นาโนกรัม

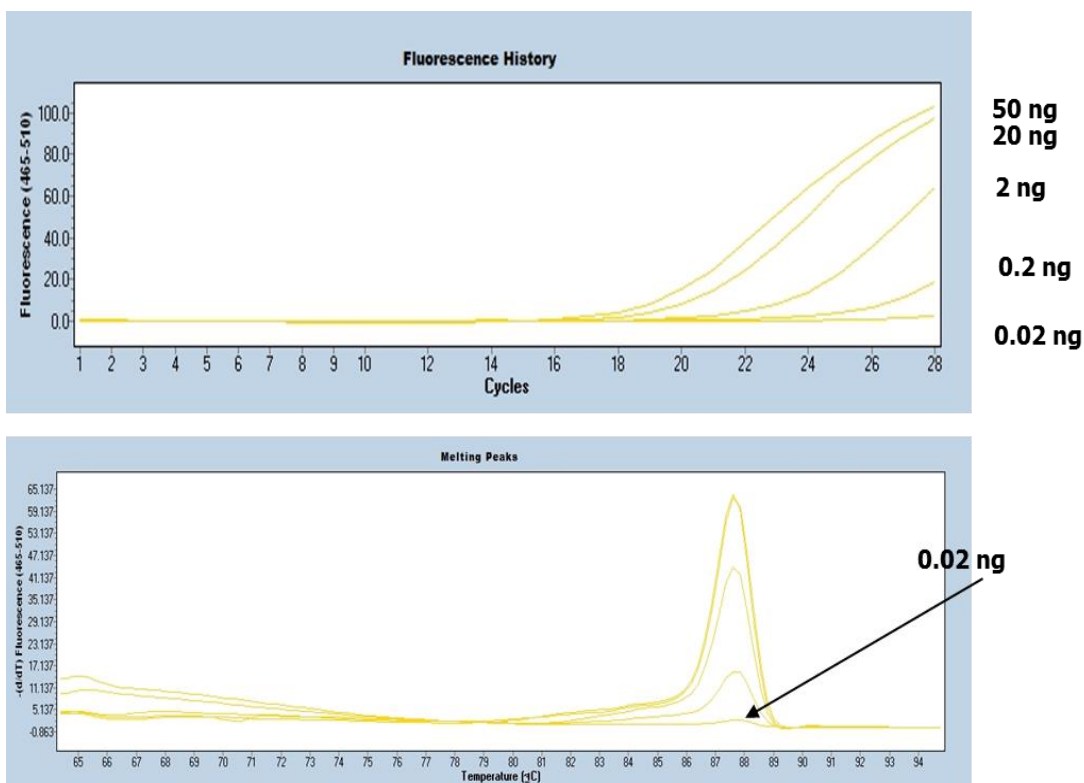




ภาพที่ 49 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของหนูนาได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม



ภาพที่ 50 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ สุนัข ได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม



ภาพที่ 51 แสดง Amplification curves และ Melting peaks ของเทคนิค Multiplex HRMA ที่สามารถตรวจวัดดีเอ็นเอของ ลิง ได้ต่ำสุดที่ 0.02 นาโนกรัม

จะเห็นได้ว่าความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดได้ คือ 0.02 นาโนกรัม ยกเว้นสุกรที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 0.002 นาโนกรัม ซึ่งการศึกษาในอนาคต สามารถปรับปรุงคุณภาพความไวในการตรวจวัดได้ เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ของสัตว์แต่ละชนิด การเพิ่มรอบ (cycle) ในการทำปฏิกิริยา รวมถึงการเลือกตำแหน่งยีนใหม่ของไพรเมอร์ที่มีจำนวนมากในแต่ละเซลล์ (high copy number) แต่อย่างไรก็ตามในการปรับปรุงคุณภาพนั้นต้องปรับสภาวะใหม่ในการทดลอง เพื่อไม่ให้เกิด ไพรเมอร์-ไดเมอร์ หรือทดสอบความจำเพาะของยีนที่เลือกใหม่อีกครั้ง

#### 4.9 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้าม ด้วยวิธีการจำลองการปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร

การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ได้เตรียมลูกชิ้นเนื้อวัว 2 สูตรคือ สูตรที่ไม่มีเครื่องเทศและสูตรที่มีเครื่องเทศและวัตถุดิบอื่นๆ เป็นส่วนผสม ซึ่งผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม 4 ชนิด ได้แก่ ผสมเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อหนู และเนื้อแมว ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ วัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ และนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ผลการทดลองพบว่าให้ผลบวกกับดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายในทุกตัวอย่าง ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสูตรควบคุมที่ไม่มีการผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม ดังแสดงในตารางที่ 26 และเมื่อวิเคราะห์รูปแบบ Melting peaks และค่า  $T_m$  เทียบกับดีเอ็นเอควบคุมของสุกร สุนัข หนู แมว ที่ใส่ลงไปในปฏิกิริยาเพื่อใช้เป็น Positive control พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกัน สามารถระบุการปนเปื้อนเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อหนูและเนื้อแมวที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นเนื้อวัว ทั้งอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ ได้ ทั้ง 2 สูตร (แสดงในภาพที่ 53-64) ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ Ali และคณะ (2015) Md. Abdur Razzak และคณะ (2015) ที่ตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามในลูกชิ้นเนื้อวัวที่อัตราส่วนผสม 1 เปอร์เซ็นต์

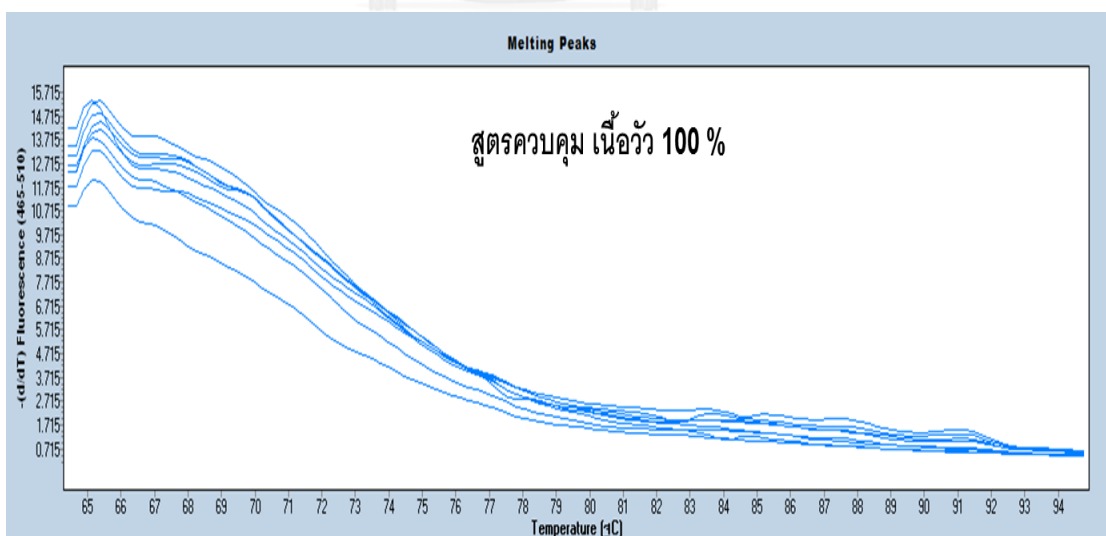
ดูตัวอย่างลูกชิ้นได้ที่ภาพที่ 52



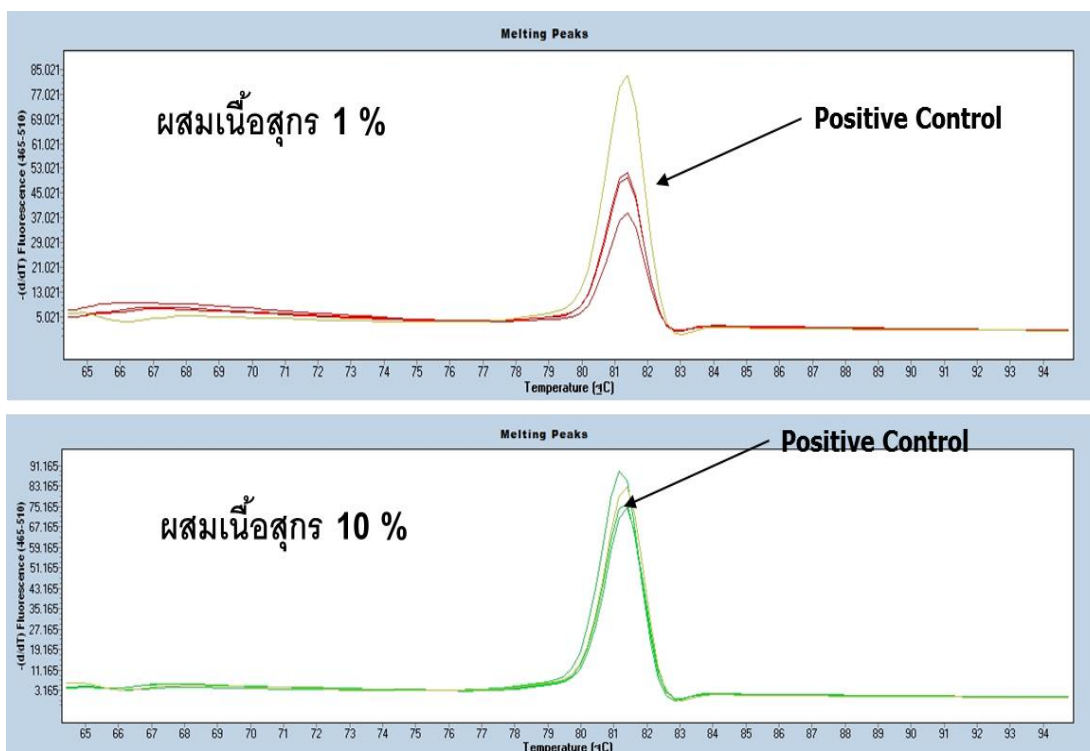
ภาพที่ 52 แสดงตัวอย่างลูกชิ้นผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม สูตรที่ไม่มีเครื่องเทศและสูตรที่มีเครื่องเทศ

ตัวอย่างอาหาร	Multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ลูกชิ้นเนื้อวัวสูตรควบคุม	-	-	-	-	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 1 %	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร 10 %	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 1 %	-	-	-	-	+	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัข 10 %	-	-	-	-	+	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 1 %	-	-	-	+	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหนู 10 %	-	-	-	+	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 1 %	-	+	-	-	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมว 10 %	-	+	-	-	-	-
ลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อ 3 ชนิด	-	+	+	-	+	-
สุกร/สุนัข/แมว 1 %	-	-	-	-	-	-

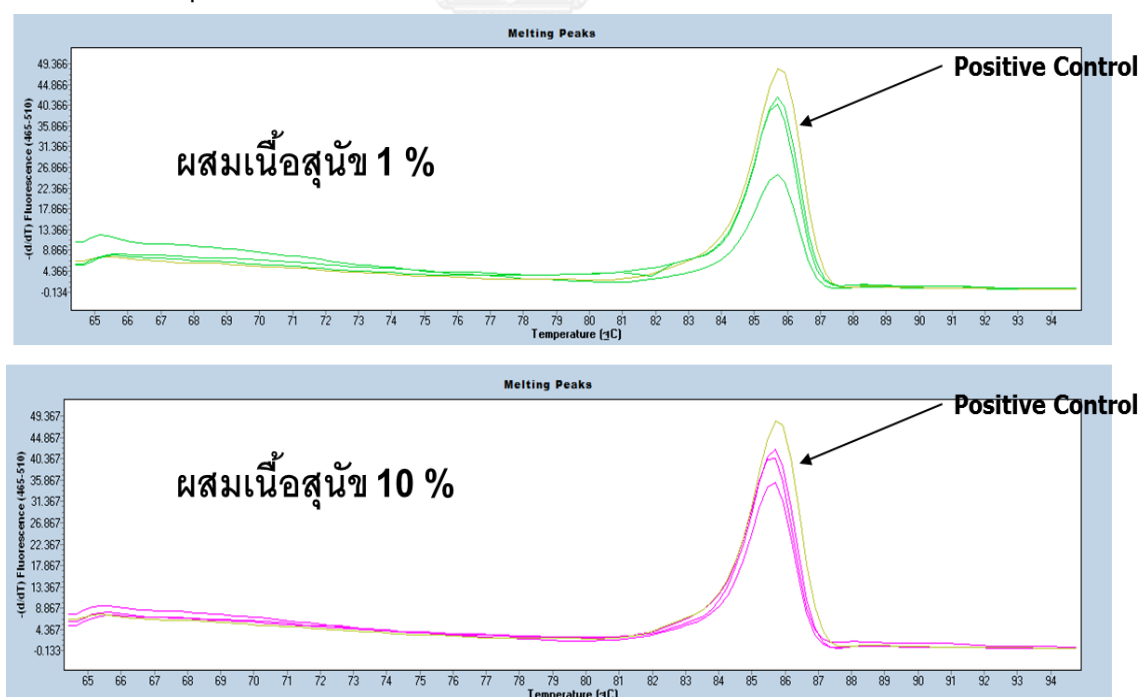
ตารางที่ 26 แสดง ผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA ลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้าม ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะกับดีเอ็นเอสัตว์เป้าหมาย ผลถูกต้อง 100 %



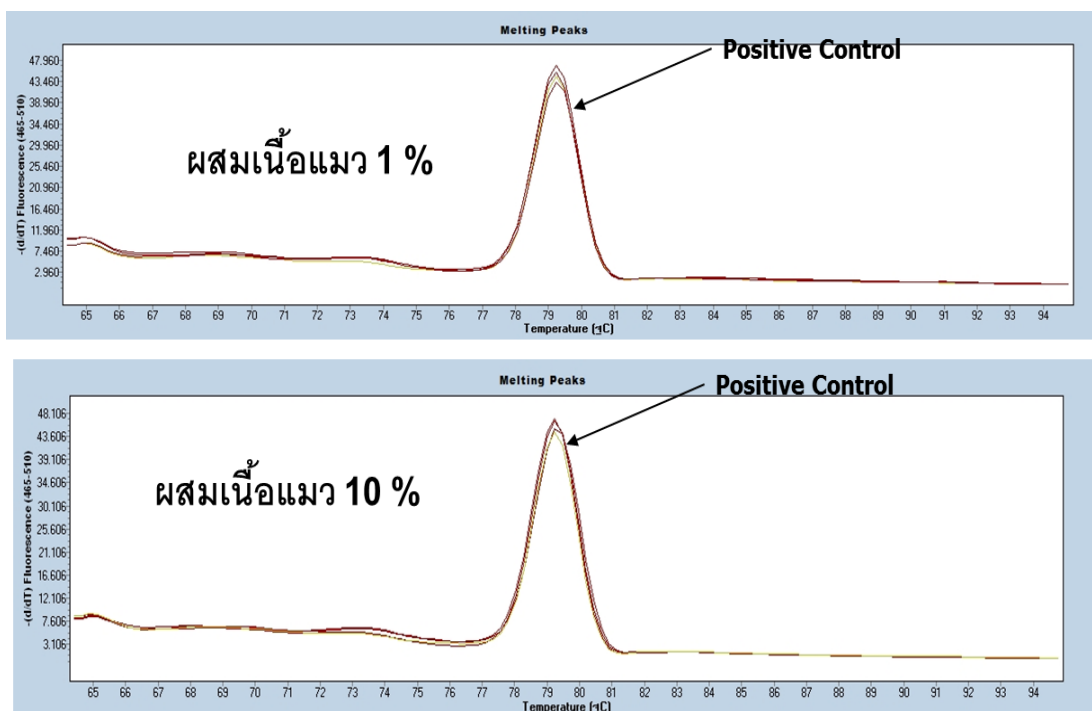
ภาพที่ 53 แสดง ผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับสูตรควบคุม เนื้อวัว 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย



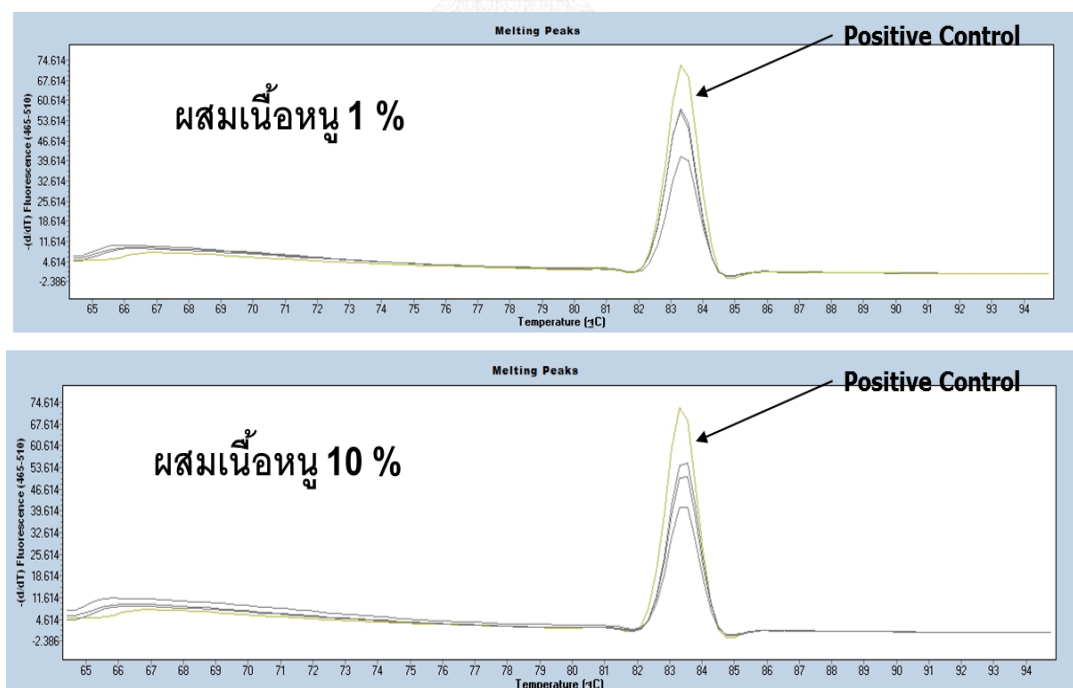
ภาพที่ 54 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกรสูตรไม่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA



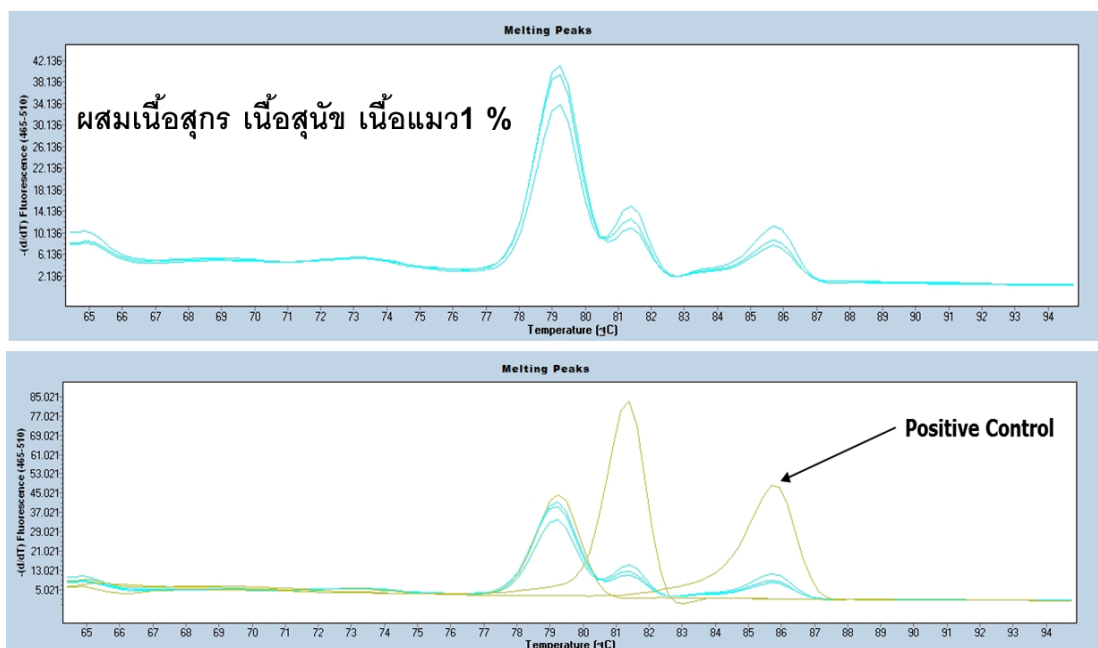
ภาพที่ 55 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุนัขสูตรไม่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA



ภาพที่ 56 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนือแมวสูตรไม่มีเครื่องเทศ  
ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

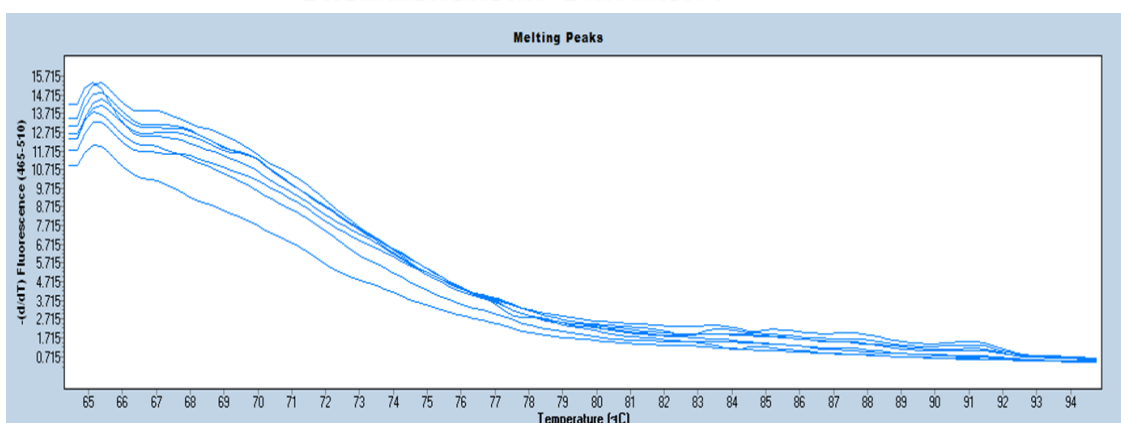


ภาพที่ 57 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนือหนุสูตรไม่มีเครื่องเทศ  
ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

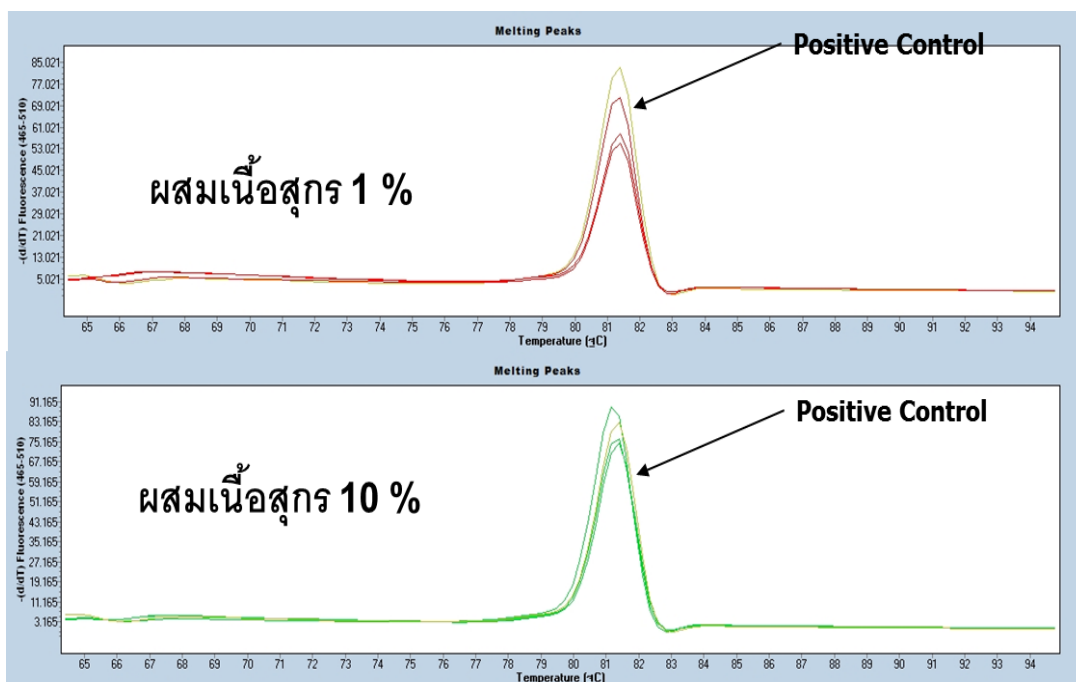


ภาพที่ 58 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อแมว สูตรไม่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

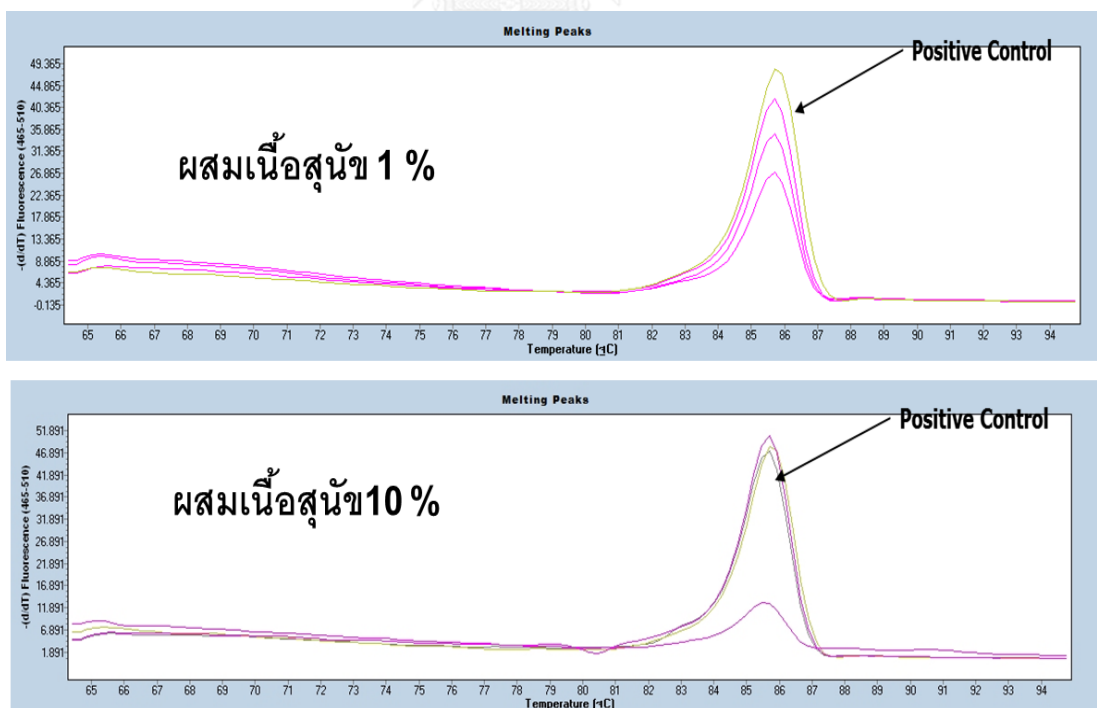
สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสัตว์ ต้องห้ามสูตรที่มีเครื่องเทศ ให้ผลที่สอดคล้องกับสูตรที่ไม่มีเครื่องเทศ คือสามารถตรวจวัดเนื้อสัตว์ต้องห้ามถูกต้อง 100 % จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถของชุดสก็ดดีเอ็นเอที่สามารถจัดการสารบกวนการตรวจวัดเช่นเครื่องเทศออกไปได้



ภาพที่ 59 แสดงผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับสูตรควบคุมที่พบว่าไม่มีการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมาย

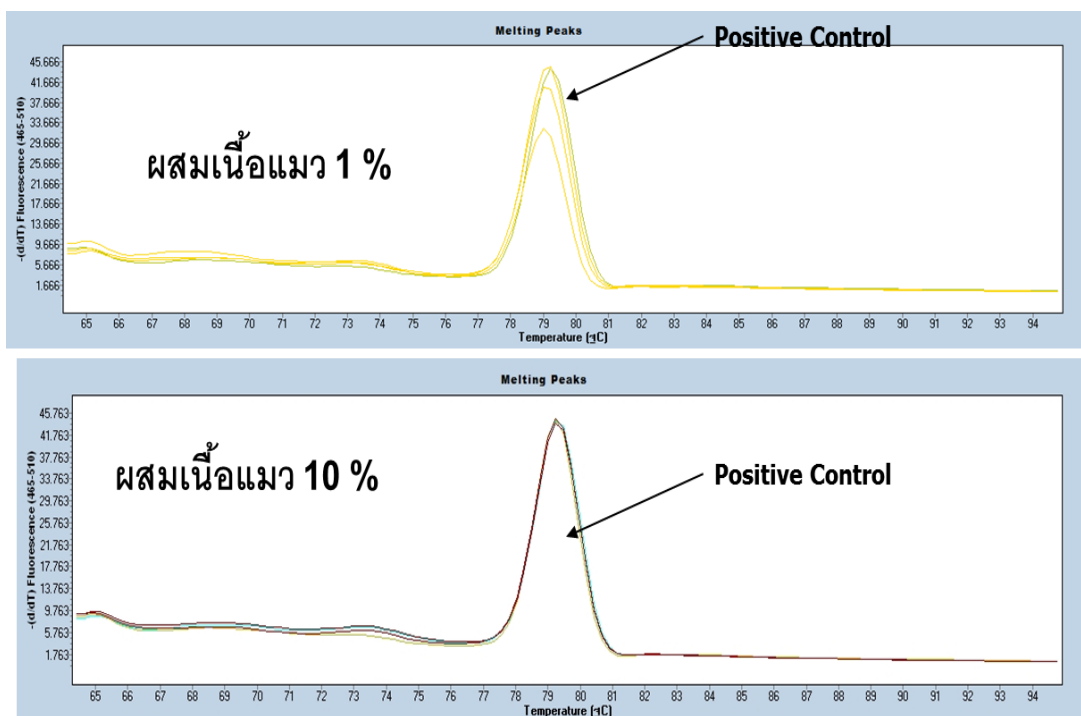


ภาพที่ 60 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกรสูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

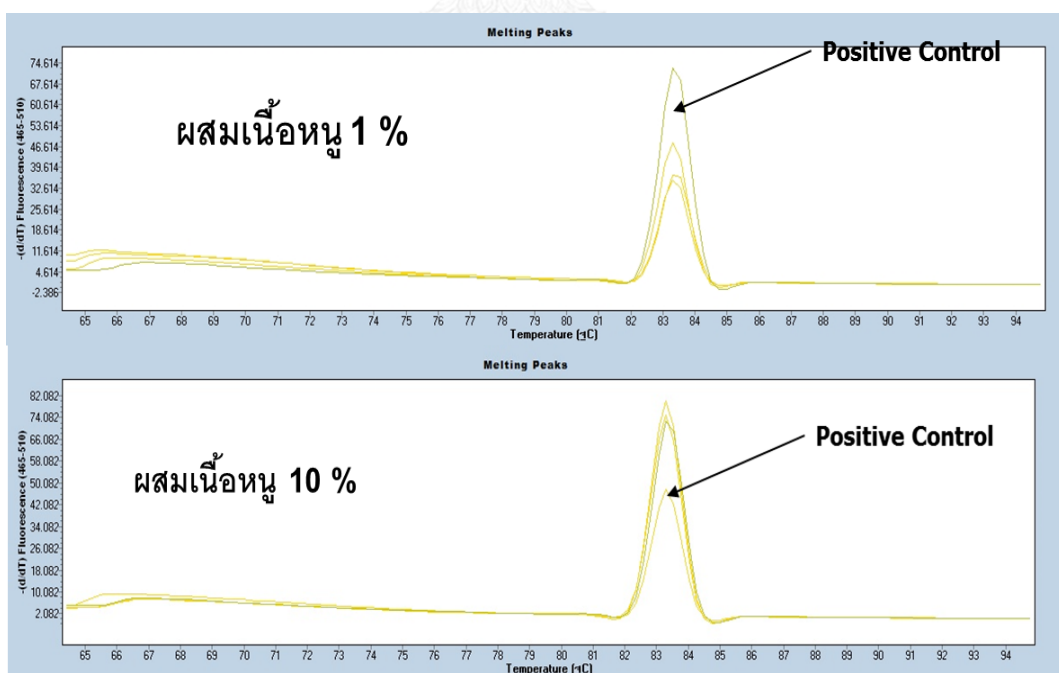


ภาพที่ 61 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสับสูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

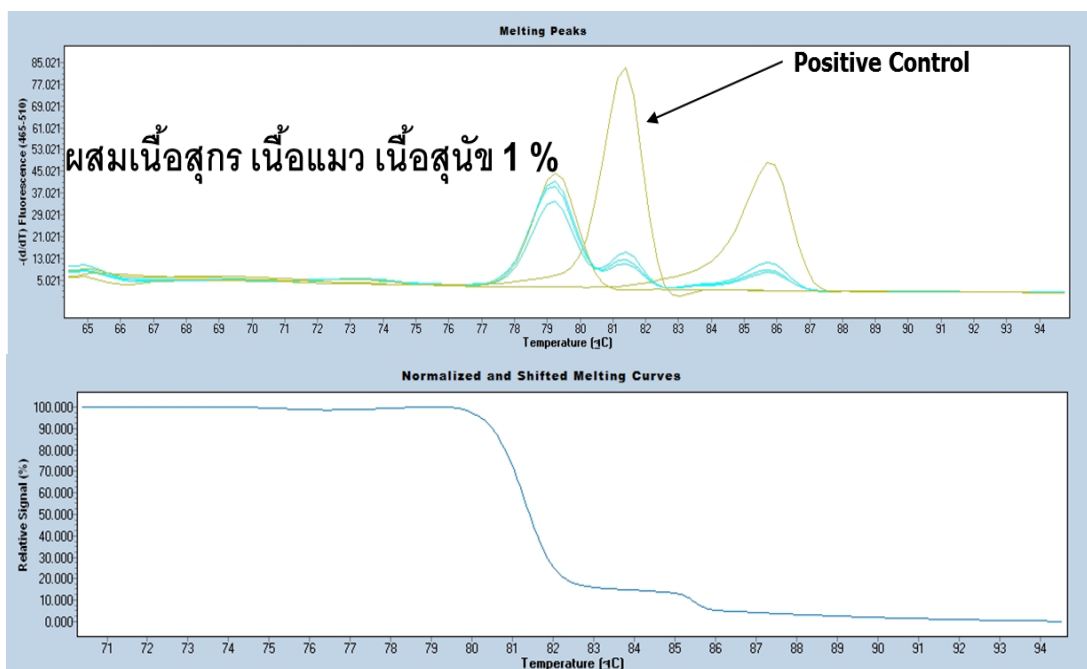




ภาพที่ 62 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อแมวสูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRM



ภาพที่ 63 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อหมูนา สูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA



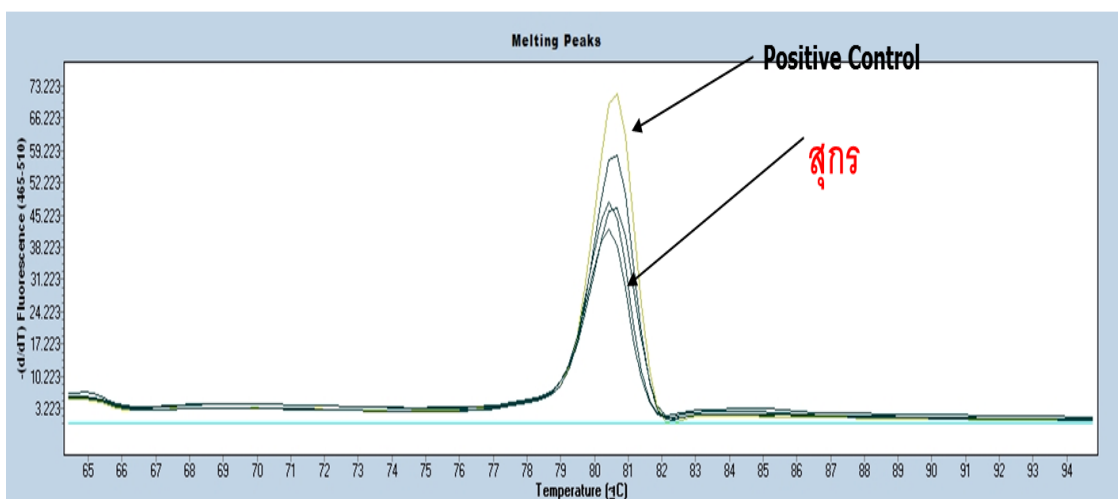
ภาพที่ 64 แสดง Melting peak ของการตรวจวัดลูกชิ้นเนื้อวัวผสมเนื้อสุกร เนื้อสุนัข เนื้อแมว สูตรที่มีเครื่องเทศ ด้วยเทคนิค Multiplex HRMA

#### 4.10 การศึกษาความน่าเชื่อถือของเทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม

หลังจากทดสอบความน่าเชื่อถือในลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามแล้ว ซึ่งให้ผลการทดลองถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ ได้นำเทคนิค Multiplex HRMA ไปตรวจวัดตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสัตว์ต้องห้าม เช่น ลูกชิ้นหรือไส้กรอกที่มีเนื้อสุกรเป็นส่วนผสม ทดลองตรวจวัดจำนวน 10 ตัวอย่างจากหลากหลายบริษัท พบว่า Multiplex HRMA ให้ผลบวกกับตัวอย่างที่มีสุกรเป็นส่วนผสมทั้ง 10 ตัวอย่าง ไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของสัตว์ต้องห้ามชนิดอื่น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างอาหารที่ใช้ตรวจวัดมีส่วนผสมของสุกรจริง ซึ่งสอดคล้องกับฉลากที่ระบุไว้ ไม่มีส่วนผสมของลา แมว หนูนา สุนัขและลิง นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ยังมี Melting peaks และค่า  $T_m$  ที่สอดคล้องกับดีเอ็นเอของสุกรที่ใส่ลงไปเป็น Positive control อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 27 และภาพที่ 65

ตัวอย่างอาหาร	Multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ลูกชิ้นหะรอม 1	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นหะรอม 2	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นหะรอม 3	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นหะรอม 4	-	-	+	-	-	-
ลูกชิ้นหะรอม 5	-	-	+	-	-	-
ไส้กรอกหะรอม 1	-	-	+	-	-	-
ไส้กรอกหะรอม 2	-	-	+	-	-	-
ไส้กรอกหะรอม 3	-	-	+	-	-	-
ไส้กรอกหะรอม 4	-	-	+	-	-	-
ไส้กรอกหะรอม 5	-	-	+	-	-	-

ตารางที่ 27 แสดงผลการตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA กับตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสัตว์ต้องห้าม ให้ผลบวกเฉพาะสุกร



ภาพที่ 65 แสดง Melting peaks ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่มีส่วนผสมของสุกร

สามารถคำนวณความถูกต้องของการตรวจวัดได้จากสมการ

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = \frac{(\text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ} + \text{จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ})}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100 \%$$

$$\text{ความถูกต้อง (Accuracy)} = \frac{(10+0)}{10} \times 100 \%$$

$$= 100 \%$$

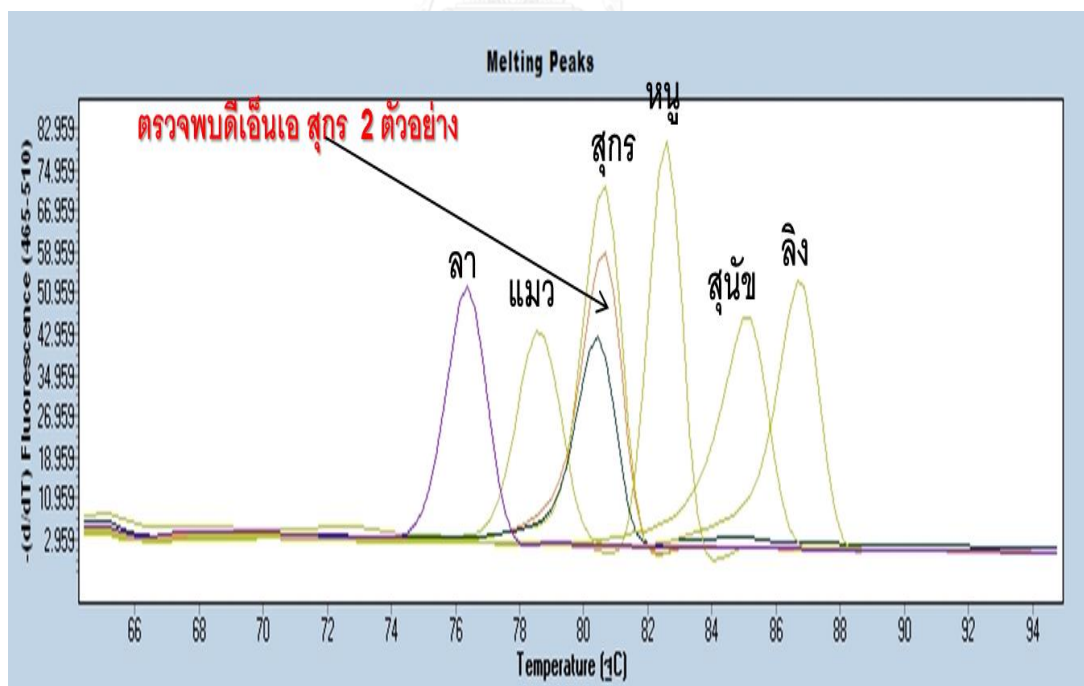
$$= 100 \%$$

#### 4.11 การประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้า

เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมและประกันคุณภาพอาหารฮาลาล ได้นำเทคนิค Multiplex HRMA มาตรวจวัดตัวอย่างอาหารทางการค้าที่ผู้บริโภคมุสลิมนิยมบริโภค ทั้งที่เป็นตัวอย่างอาหารที่ได้รับการรองเครื่องหมายฮาลาลและตัวอย่างอาหารที่ไม่มีการรับรองเครื่องหมายฮาลาล (แต่ไม่ได้ระบุชัดเจนว่ามีส่วนผสมของสัตว์ต้องห้าม) เก็บตัวอย่างอาหารจำนวน 260 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างอาหารออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป 100 ตัวอย่าง กลุ่มเครื่องปรุงรสและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร 65 ตัวอย่าง กลุ่มขนมอบกรอบและช็อกโกแลต 50 ตัวอย่าง กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่ 25 ตัวอย่าง และกลุ่มผลิตภัณฑ์จากนม 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 28) นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอและนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค Multiplex HRMA พบว่า กลุ่มขนมอบกรอบและช็อกโกแลต กลุ่มผลิตภัณฑ์ขนมอบและเบเกอรี่และกลุ่มผลิตภัณฑ์จากนม ไม่พบการเพิ่มดีเอ็นเอของสัตว์เป้าหมายแสดงว่าอาหาร ใน 3 กลุ่มนี้ไม่มีการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด ในขณะที่กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูปกลุ่มเครื่องปรุงรสและกลุ่มวัตถุดิบในการประกอบอาหารพบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกร อย่างละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างอาหารที่ไม่มีการรับรองฮาลาลทั้ง 2 ตัวอย่างแต่ผู้บริโภคมุสลิมนิยมบริโภค เพื่อเป็นการยืนยันผลการปนเปื้อนได้นำ 2 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ส่งตรวจการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล ซึ่งใช้เทคนิค Real-Time PCR ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่า ตัวอย่างอาหารดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรดังแสดงในภาพที่ 67 และภาพที่ 68

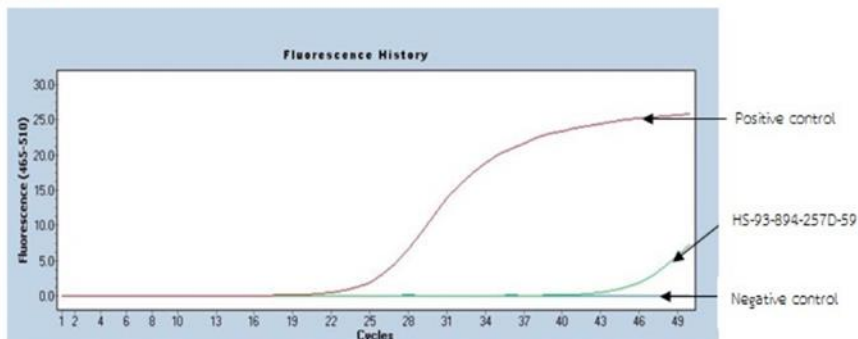
ผลิตภัณฑ์อาหาร / จำนวน	Multiplex HRMA					
	ลา-16S	แมว-Cytb	สุกร-ND5	หนู-Cytb	สุนัข-ATP6	ลิง-ND5
ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปสำเร็จรูป	100	0/100	0/100	1/100	0/100	0/100
เครื่องปรุงรสและวัตถุดิบในการประกอบอาหาร	65	0/65	0/65	1/65	0/65	0/65
ขนมอบกรอบและซ็อกโกแลต	50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
ผลิตภัณฑ์ขนมอบเบเกอรี่	25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25
ผลิตภัณฑ์จากนม	20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

ตารางที่ 28 แสดงจำนวนตัวอย่างอาหารทางการค้าที่นำมาตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้าม



ภาพที่ 66 แสดง Melting peak ของตัวอย่างอาหารทางการค้าที่พบการปนเปื้อนสุนัข เทียบกับ Positive control ของสัตว์ต้องห้าม ซึ่งสอดคล้องกับ Positive control ของสุนัข

การทดสอบ : สารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร  
 เทคนิคการทดสอบ : Real-Time PCR (Light Cycler 480)  
 ผลการทดสอบ

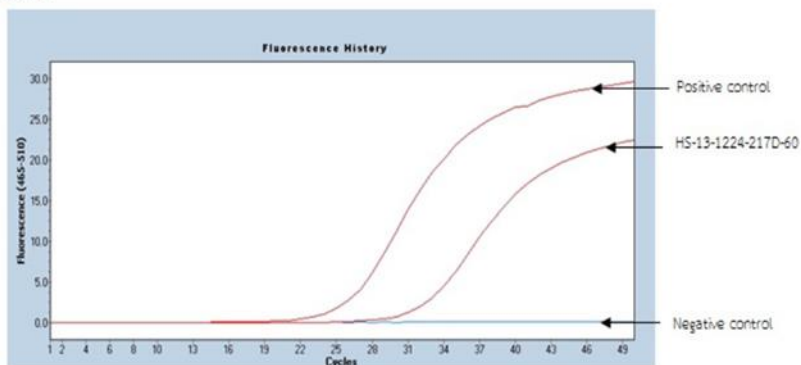


สรุปผลการทดสอบ

ที่ขีดจำกัดต่ำสุดของเทคนิควิเคราะห์ สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม (DNA) ของสุกรในตัวอย่าง HS-93-894-257D-59

ภาพที่ 67 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและตรวจวัดด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์ ฮาลาล  
 ซึ่งใช้เทคนิค Real-Time PCR

การทดสอบ : สารพันธุกรรม (DNA) ของสุกร  
 เทคนิคการทดสอบ : Real-Time PCR (Light Cycler 480)  
 ผลการทดสอบ



สรุปผลการทดสอบ

ที่ขีดจำกัดต่ำสุดของเทคนิควิเคราะห์ สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม (DNA) ของสุกรในตัวอย่าง HS-13-1224-217D-60

ภาพที่ 68 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรและตรวจวัดด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์ ฮาลาล  
 ซึ่งใช้เทคนิค Real-Time PCR

ตัวอย่างที่ปนเปื้อนนั้น ตัวอย่างแรกคือไก่หยอง ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าบริษัทที่ผลิตไก่หยองนั้นมีการผลิตหมูหยองด้วยซึ่งเป็นไปได้ที่ผู้ผลิตจะใช้สายการผลิตเดียวกัน จึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสุกรในผลิตภัณฑ์ไก่หยองได้ โดยผลิตภัณฑ์ไก่หยองของบริษัทนี้ผู้บริโภคมุสลิมนิยมซื้อมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำขนมเบเกอรี่ อีกตัวอย่างที่ปนเปื้อนคือผงปรุงอาหารต้มจืดสำเร็จรูป กรณีนี้ได้ตรวจสอบที่ฉลากอาหารพบว่าที่บรรจุภัณฑ์ได้ระบุไว้ว่ามีส่วนผสมของหมูผง จึงทำให้ตรวจพบการปนเปื้อน แต่อย่างไรก็ดีผงปรุงรสดังกล่าวนี้ผู้บริโภคมุสลิมนิยมซื้อมาใช้ เพราะคิดว่าเป็นแค่ผงปรุงรสเพิ่มความอร่อยในอาหาร โดยไม่ได้อ่านฉลากให้เสียก่อน ดังนั้นการให้ความรู้ความเข้าใจแก่ผู้บริโภคมุสลิมจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งตัวอย่างที่ตรวจพบนั้นไม่มีการรับรองฮาลาลทั้งคู่ ตัวอย่างอาหารที่มีเครื่องหมายฮาลาลที่สุ่มมาตรวจในการทดลองนี้ ไม่พบการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามเลย แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพและความเข้มงวดของระบบรับรองฮาลาลของประเทศไทยที่ใช้แนวทางที่ว่า ศาสนารับรองวิทยาศาสตร์รอบรับ จึงทำให้ตัวอย่างอาหารฮาลาลของประเทศไทยตรวจไม่พบการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้าม (van der Spiegel et al., 2012)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค HRMA เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูง สามารถนำมาตรวจวัดการปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาลได้จริง ให้ผลที่สอดคล้องกับเทคนิคตรวจวัดตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการตรวจวัดอาหารฮาลาล แต่พบว่ามีข้อดีก็คือสามารถตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามได้ถึง 6 ชนิดภายในการตรวจวัดครั้งเดียว ใช้เวลารวดเร็ว ลดค่าใช้จ่าย นับว่าเป็นครั้งแรกของประเทศไทยที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค HRMA ได้สำเร็จ สร้างเป็นนวัตกรรมใหม่ของวงการฮาลาลไทย ที่มีระบบประกันคุณภาพอาหารฮาลาลที่มีประสิทธิภาพสูง คู่ครองผู้บริโภคมุสลิมและผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการรับประทานอาหารที่ถูกต้องตามฉลากที่ระบุไว้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างความเชื่อถือของฮาลาลประเทศไทยในตลาดโลกได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันพบการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาลอยู่บ่อยครั้ง ทั้งที่เกิดจากการรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากจงใจปนเปื้อน เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและสร้างระบบการประกันคุณภาพให้แก่การผลิตอาหารฮาลาล การพัฒนาเทคนิคที่มีศักยภาพสูงในการตรวจวัดการปนเปื้อนเนื้อสัตว์ต้องห้ามจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เทคนิคการวิเคราะห์การหลอมละลายแบบแยกชัดสูง (High resolution melting analysis: HRMA) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีศักยภาพสูงมีงานวิจัยที่ผ่านมารองรับว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจระบุแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างจำเพาะเจาะจงและรวดเร็วโดยอาศัยหลักการวิเคราะห์หาค่าจุดหลอมเหลว (Melting Temperature, Tm) ของดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค HRMA สำหรับตรวจวัดการปนเปื้อนและบ่งชี้สัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาล จำนวน 6 ชนิดแบบพร้อมกัน ได้แก่ สุกร สุนัข ลิง หนู แมว และลา รวมถึงทดสอบความไว ความจำเพาะ และความน่าเชื่อถือของเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้น

เริ่มต้นการทดลองจากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเลือดสัตว์ ของสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิด จำนวนสัตว์ละ 5 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการทดลอง รวมถึงเก็บตัวอย่างสัตว์ฮาลาลชนิดอื่นๆ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมสำหรับทดสอบความจำเพาะเจาะจง สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Blood & Tissue Kit จากนั้นนำไปวัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและความบริสุทธิ์อยู่ในเกณฑ์ที่ดีสามารถนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค HRMA ได้

ในส่วนของการคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่เฉพาะเจาะจงต่อสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิดได้สืบค้นงานวิจัยเพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงกับสัตว์ชนิดนั้นๆ รวมถึงออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ในงานวิจัยนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่คือ ไพรเมอร์ของลา ส่วนไพรเมอร์ แมว สุกร หนู ได้คัดเลือกจากงานวิจัย ไพรเมอร์สุนัขและลิง ได้ดัดแปลงจากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์ของสัตว์ต้องห้าม ล้วนแล้วคัดเลือกมาจากตำแหน่งยีนบนไมโทคอนเดรีย ซึ่งยีนเหล่านี้มีความจำเพาะสูงต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ และมีจำนวนมากในแต่ละเซลล์รวมถึงมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดี ซึ่งสุกรและลิงใช้ยีน NADH dehydrogenase 5 สุนัขใช้ยีน ATPase subunit 6 แมวและหนูใช้ยีน Cytochrome b และลาใช้ 16S rRNA



การทดสอบความจำเพาะ ความไวและความน่าเชื่อถือ ทั้งในแบบไพรเมอร์เดี่ยว (Singleplex HRMA) และไพรเมอร์รวม (Multiplex HRMA) พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงและความถูกต้องในการระบุชนิดของสัตว์ต้องห้ามถูกต้อง 100% ยิ่งไปกว่านั้นรูปแบบ Melting peak และค่า Tm ยังมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทำให้สามารถระบุสัตว์แต่ละชนิดได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการยืนยันผลการทดลองโดยนำผลผลิตปฏิกิริยาไปวัดขนาดด้วยเครื่อง QIAxcel Capillary Electrophoresis ขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่วัดได้ มีขนาดสอดคล้องกับขนาดที่ทำนายไว้ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงและเที่ยงตรงของการไพรเมอร์ ในด้านการทดสอบความไวพบว่าระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสัตว์ต้องห้าม คือ 0.02 นาโนกรัม ยกเว้นสุกรที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 0.002 นาโนกรัม

สำหรับการศึกษาความน่าเชื่อถือ ทดลองใช้ตรวจวัดการปนเปื้อนในลูกชิ้นเนื้อวัวที่ผสมเนื้อสัตว์ต้องห้ามและผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้าที่มีส่วนผสมของเนื้อสัตว์ต้องห้าม พบว่าสามารถระบุชนิดของสัตว์ต้องห้ามได้ถูกต้อง 100% เช่นกัน ซึ่งประเมินผลเทียบกับ Melting peaks ของ Positive control ของสัตว์ต้องห้ามแต่ละชนิด รวมถึงเทียบกับค่า Tm จากนั้นนำเทคนิคที่พัฒนาได้มาตรวจวัดผลิตภัณฑ์อาหารทางการค้าที่วางจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 260 ตัวอย่าง พบว่ามี 2 ตัวอย่างปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกร ทั้งนี้ได้ยืนยันผลการปนเปื้อนโดยนำ 2 ตัวอย่างดังกล่าวส่งตรวจการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธีมาตรฐานของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล คือเทคนิค Real-Time PCR ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่าตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกร

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เทคนิค HRMA จัดเป็นเทคนิคที่มีความสะดวก ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน รวดเร็ว มีความยืดหยุ่นในการประยุกต์ใช้ ค่าใช้จ่ายถูก และที่สำคัญคือ มีความถูกต้องแม่นยำสูง จากข้อได้เปรียบหลายประการของเทคนิค HRMA นี้ ทางผู้วิจัยจึงเห็นศักยภาพของเทคนิคนี้จึงนำศึกษาพัฒนาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดการปนเปื้อนและบ่งชี้สัตว์ต้องห้าม 6 ชนิดที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารฮาลาลเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมรวมถึงผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการอาหารที่ถูกต้องตามฉลากอาหาร สร้างเป็นระบบประกันคุณภาพอาหารในการผลิตอาหารฮาลาลและอาหารทั่วไปได้ และนับเป็นครั้งแรกของประเทศไทยที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex HRMA กับอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลได้สำเร็จ สามารถสร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทยในตลาดฮาลาลโลกได้ด้วยการมีระบบประกันคุณภาพฮาลาลที่มีศักยภาพสูง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการพิจารณาเลือกสัตว์ต้องห้ามทั้ง 6 ชนิดในงานวิจัยนี้ เริ่มจากการสำรวจตลาดและเก็บข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ซึ่งล้วนแล้วเป็นสัตว์ที่เคยพบการปนเปื้อนในอาหารและมีโอกาสปนเปื้อนมาก ในปัจจุบัน การปนเปื้อนสัตว์ต้องห้ามในอาหารฮาลาลถือว่าเป็น Zero Tolerance กล่าวคือจะเจตนาหรือไม่เจตนาถ้ามีการปนเปื้อนไปในอาหารแล้ว อาหารนั้นจะไม่ฮาลาลทันที

สัตว์ดังกล่าวได้ถูกห้ามไว้ในคัมภีร์อัลกุรอานและวจนะของท่านศาสดารวมถึงห้ามไว้มาตรฐานอาหารฮาลาล โดยให้เหตุผลไว้ต่างๆ มากมาย เช่นสุกร ได้ห้ามไว้เนื่องจากเป็นสัตว์ที่สกปรก สุนัข หนู แมวและลิง ได้ห้ามไว้เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีเขี้ยวแหลมคม สามารถกินสัตว์อื่นเป็นอาหารได้ ส่วนลาที่ห้ามไว้ นั้นคือลาที่เลี้ยงเพื่อใช้งาน เพราะลาเหล่านั้นชอบกินสิ่งสกปรก เช่นมูลสัตว์ เป็นอาหาร

จากการทดลองพบว่า ในการทดลองทั้ง 5 ตัวอย่างของสัตว์แต่ละชนิด ให้ค่า Tm และรูปแบบ Melting peas คาดเคลื่อนแต่อยู่ในช่วงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ยอมรับได้ ซึ่งเป็นผลมาจากความผันแปรพันธุกรรมภายในสัตว์ชนิดนั้นๆ ที่มีความแตกต่างกันระหว่างสัตว์แต่ละตัว ซึ่งสามารถทราบได้ โดยการนำผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA Sequencing หรือตรวจวัดด้วยเทคนิค Personal Genome Machine (PGM)

นอกจากนี้สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากวิจัยครั้งนี้ไปต่อยอดพัฒนาตรวจวัดสัตว์ต้องห้ามชนิดอื่นๆ ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ รวมถึงสามารถพัฒนาต่อไปเป็นชุดตรวจวัดสำเร็จรูปอย่างง่าย (test kits) ในการตรวจการปนเปื้อนเชิงการค้า เป็นต้น

เทคนิค Multiplex HRMA ที่พัฒนาได้นั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการประกันคุณภาพอาหารฮาลาลและคุ้มครองผู้บริโภคมุสลิมได้ นอกจากนี้ยังสามารถคุ้มครองผู้บริโภคทั่วไปที่ต้องการรับประทานอาหารที่ถูกต้องตามฉลากอาหารที่ระบุไว้ได้อีกด้วย

## รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นุชนาตร ฉัตรกลม. (2558). ยกผู้ประกอบการไทยสู่ฮาลาลสากล. *อุตสาหกรรมสาร*, 57-2558.
- พรพิมล มะหะหมัด. (2549). การพัฒนาวิธีการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี *Loop-mediated isothermal amplification*. (วิทยาสตรมหาบัณฑิต), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วินัย ดะห์ลัน. (2556). หนึ่งทศวรรษสถาบันด้านวิทยาศาสตร์ฮาลาลแห่งแรกของโลก. กรุงเทพฯ: ธนาเพรส.
- วินัย ดะห์ลัน. (2558). นปีมุฮัมมัด (ช.ล.) นักวิทยาศาสตร์เอกของโลก. กรุงเทพฯ: สหพัฒนการพิมพ์.
- วีระพงศ์ ลูติดานนท์. (2557). เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์. กรุงเทพฯ: ดิทีริโอ จำกัด.
- ศราวุฒิ อารีย์. (2557). โอกาสและสู่ทางการเข้าสู่ตลาดของธุรกิจฮาลาลในอินโดนีเซีย. กรุงเทพฯ: สถาบันระหว่างประเทศเพื่อการค้าและการพัฒนา.
- ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2556). รายงานตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอสุกรตั้งแต่ปี 2553-2555. Retrieved from
- สถาบันอาหาร. (2557). รู้จักผู้บริโภคมุสลิม. กรุงเทพฯ: พีร้นท์ซิติ.
- มกอช 8400 อาหารฮาลาล, (2550).

## ภาษาอังกฤษ

- Aghwan, Z. A., Bello, A. U., Abubakar, A. A., Imlan, J. C., & Sazili, A. Q. (2016). Efficient halal bleeding, animal handling, and welfare: A holistic approach for meat quality. *Meat Sci*, 121, 420-428.
- Al-Kahtani, H. A., Ismail, E. A., & Asif Ahmed, M. (2017). Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. *Food Chem*, 219, 54-60.
- Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Che Man, Y. B., Dhahi, T. S., Kashif, M., et al. (2012). Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Sci*, 91(4), 454-459.
- Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B., Rahman, M. M., Amin, M. A., Rashid, N. R., et al. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chem*, 177, 214-224.
- Amaral, J. S., Santos, G., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control*, 72, 53-61.
- Ayaz, Y., Ayaz, N. D., & Erol, I. (2006). Detection of Species in Meat and Meat Products Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Muscle Foods*, 17(2), 214-220.
- Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet J*, 190(1), 34-38.
- Cai, H., Gu, X., Scanlan, M. S., Ramatlapeng, D. H., & Lively, C. R. (2012). Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 83-87.
- Cheng, J. C., Huang, C. L., Lin, C. C., Chen, C. C., Chang, Y. C., Chang, S. S., et al. (2006). Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR. *Clin Chem*, 52(11), 1997-2004.

- Cheng, X., He, W., Huang, F., Huang, M., & Zhou, G. (2014). Multiplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from duck, pig and chicken in Chinese blood curds. *Food Research International*, 60, 30-37.
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA-- its role and potential in food analysis. *Food Chem*, 158, 245-254.
- Filipiak, A., & Hasiow-Jaroszewska, B. (2016). The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and discrimination of nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Mol Cell Probes*, 30(2), 113-117.
- Forum, W. H. (2011). Halal industry in the future. *the executive review* 2011.
- Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., Madesis, P., & Tsaftaris, A. (2013). A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chem*, 141(2), 835-840.
- Hellberg, R. S., & Morrissey, M. T. (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *J Lab Autom*, 16(4), 308-321.
- Hossain, M. A., Ali, M. E., Hamid, S. B., Hossain, S. M., Asing, Nizar, N. N., et al. (2017). Tetraplex PCR assay involving double gene-sites discriminates beef and buffalo in Malaysian meat curry and burger products. *Food Chem*, 224, 97-104.
- Iacumin, L., Ginaldi, F., Manzano, M., Anastasi, V., Reale, A., Zotta, T., et al. (2015). High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. *Food Microbiol*, 46, 357-367.
- Iwobi, A., Sebah, D., Spielmann, G., Maggipinto, M., Schrempp, M., Kraemer, I., et al. (2017). A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products. *Food Control*, 74, 89-97.
- Jahangir, M., Mehmood, Z., Saifullah, Bashir, Q., Mehboob, F., & Ali, K. (2016). Halal status of ingredients after physicochemical alteration (Istihalah). *Trends in Food Science & Technology*, 47, 78-81.

- Jilberto, F., Araneda, C., & Larrain, M. A. (2017). High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species. *Food Chem*, 229, 716-720.
- Keeratipibul, S., Silamat, P., Phraephaisarn, C., Srisitthinam, D., Takahashi, H., Chaturongkasumrit, Y., et al. (2015). Genotyping of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates by multilocus variable number of tandem repeat high-resolution melting analysis (MLV-HRMA). *Foodborne Pathog Dis*, 12(1), 8-20.
- Kesmen, Z., Güllüce, A., Yilmaz, M. T., Yetiman, A. E., & Yetim, H. (2013). Taqman-Based Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for the Detection and Quantification of Donkey and Pork Adulterations in Raw and Heat-Processed Meats. *International Journal of Food Properties*, 17(3), 629-638.
- Kim, M., Yoo, I., Lee, S. Y., Hong, Y., & Kim, H. Y. (2016). Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan(R) real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food Chem*, 210, 102-106.
- Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chem*, 163, 77-82.
- Klomtong, P., Phasuk, Y., & Duangjinda, M. (2016). 8. Animal Species Identification through High Resolution Melting Real Time PCR (HRM) of the Mitochondrial 16S rRNA Gene. *Annals of Animal Science*, 16(2).
- Kongklieng, A., Kaewkong, W., Intapan, P. M., Sanpool, O., Janwan, P., Thanchomnang, T., et al. (2013). Molecular differentiation of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mekongi* by real-time PCR with high resolution melting analysis. *Korean J Parasitol*, 51(6), 651-656.
- Lubis, H. N., Mohd-Naim, N. F., Alizul, N. N., & Ahmed, M. U. (2016). From market to food plate: Current trusted technology and innovations in halal food analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 55-68. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.024
- Magnino, S., Colin, P., Dei-Cas, E., Madsen, M., McLauchlin, J., Nockler, K., et al. (2009). Biological risks associated with consumption of reptile products. *Int J Food Microbiol*, 134(3), 163-175.

- Nakyinsige, K., Man, Y. B., & Sazili, A. Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Sci*, 91(3), 207-214.
- Nurjuliana, M., Che Man, Y. B., Mat Hashim, D., & Mohamed, A. K. (2011). Rapid identification of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer. *Meat Sci*, 88(4), 638-644.
- Ohshima, C., Takahashi, H., Iwakawa, A., Kuda, T., & Kimura, B. (2017). A novel typing method for *Listeria monocytogenes* using high-resolution melting analysis (HRMA) of tandem repeat regions. *Int J Food Microbiol*, 253, 36-42.
- Pereira, L., Gomes, S., Castro, C., Eiras-Dias, J. E., Brazao, J., Graca, A., et al. (2017). High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. *Food Chem*, 216, 80-86.
- Perestam, A. T., Fujisaki, K. K., Nava, O., & Hellberg, R. S. (2017). Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control*, 71, 346-352.
- Poppert, S., Essig, A., Stoehr, B., Steingruber, A., Wirths, B., Juretschko, S., et al. (2005). Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol*, 43(7), 3390-3397.
- Qiu, C., Zhi, Y., Shen, Y., Gong, J., Li, Y., & Li, X. (2015). High-resolution melting analysis of HPV-16L1 gene methylation: A promising method for prognosing cervical cancer. *Clin Biochem*, 48(13-14), 855-859.
- Rahman, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B., Mustafa, S., Hashim, U., & Hanapi, U. K. (2014). Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat Sci*, 97(4), 404-409.
- Razzak, M. A., Hamid, S. B., & Ali, M. E. (2015). A lab-on-a-chip-based multiplex platform to detect potential fraud of introducing pig, dog, cat, rat and monkey meat into the food chain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(11), 1902-1913.

- Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*, 50(10), 1748-1754.
- Safdar, M., & Junejo, Y. (2016). The development of a hexaplex-conventional PCR for identification of six animal and plant species in foodstuffs. *Food Chem*, 192, 745-749.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsiftaris, A. (2013). A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Meat Sci*, 94(1), 84-88.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A., & Tsiftaris, A. (2013). High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*, 28(1), 32-35.
- Sarri, C., Stamatis, C., Sarafidou, T., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., et al. (2014). A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, 43, 35-41.
- Schuler, F., & Dolken, G. (2006). Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta*, 363(1-2), 147-156.
- Smith, N. W. (2016). Food Policy. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.03428-4
- Soncin, S., Chiesa, L. M., Cantoni, C., & Biondi, P. A. (2007). Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 436-439.
- Song, K. Y., Hwang, H. J., & Kim, J. H. (2017). Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications. *Food Chem*, 229, 341-346.
- van der Spiegel, M., van der Fels-Klerx, H. J., Sterrenburg, P., van Ruth, S. M., Scholtens-Toma, I. M. J., & Kok, E. J. (2012). Halal assurance in food supply chains: Verification of halal certificates using audits and laboratory analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 109-119.



- von Bargaen, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *J Agric Food Chem*, 62(39), 9428-9435.
- von Bargaen, C., Dojahn, J., Waidelich, D., Humpf, H. U., & Brockmeyer, J. (2013). New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. *J Agric Food Chem*, 61(49), 11986-11994.
- Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Kalivas, A., Osathanunkul, M., Chatzopoulou, P., Tsafaris, A., et al. (2016). Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas. *Food Control*, 60, 113-116.
- Yalcinkaya, B., Yumbul, E., Mozioglu, E., & Akgoz, M. (2017). Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chem*, 221, 1253-1257.
- You, J., Huang, L., Zhuang, J., & Mou, Z. (2013). Species-specific multiplex real-time PCR assay for identification of deer and common domestic animals. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 133-139.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก.

### รายละเอียดน้ำยา PCR Master mix

งานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดเทคนิค Singleplex HRMA และ Multiplex HRMA คือ QIAGEN Multiplex PCR Kit จากของบริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมนี ซึ่งในน้ำยาสำเร็จรูปนี้ประกอบไปด้วย

- HotStarTaq® DNA Polymerase
- Multiplex PCR Buffer (ผสม 6 mM MgCl<sub>2</sub>)
- dNTP Mix

ทางบริษัทผู้ผลิตได้ผสมสัดส่วนไว้อย่างเหมาะสม ซึ่งเหมาะแก่งานที่ตรวจวัดแบบ Multiplex

## ภาคผนวก ข.

### การผลิตลูกชิ้นเนื้อวัว

1. เริ่มด้วยการชั่งเนื้อวัวและเนื้อสัตว์ต้องห้ามตามอัตราส่วน 1% และ 10%
2. นำเนื้อสัตว์ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปแช่เย็นอุณหภูมิต่ำ -4 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที
3. เมื่อปั้นเสร็จเอาไปแช่เย็นต่อ ประมาณ 15 นาที ระหว่างรอเตรียมเครื่องปรุงรสไว้
4. ใส่เนื้อแช่เย็นผสมกับเครื่องเทศและวัตถุดิบอื่นๆ เช่น พริกไทยป่น น้ำตาลทราย เกลือ แป้งข้าวโพด ผงฟู ผสมให้เข้ากันให้ส่วนผสมละลาย
5. นำเนื้อสัตว์ที่บดแล้ว ที่แช่ไว้มาใส่เครื่องปั้นอาหารเตรียมผสมกับน้ำปรุง
6. ใส่เครื่องปรุงที่ผสมไว้ลงไปแล้วก็ปั้นผสมให้เข้ากันจนเหนียวติดกัน
7. จากนั้นเอาไปแช่เย็นอีกครั้ง (ต้องแช่ให้เนื้อสัตว์เย็นจัด ลูกชิ้นจะได้มีความเต่ง)
8. ต้มน้ำไว้สำหรับลวกลูกชิ้น ประมาณ 80-100 องศาเซลเซียส
9. เอาเนื้อที่แช่เย็นไว้มาเตรียมปั้นเป็นลูกชิ้น ปั้นให้กลมๆ ขนาดประมาณ 30 มิลลิกรัม แล้วก็ใช้ช้อนที่จุ่มน้ำมาปาด ลูกชิ้นใส่หม้อน้ำต้มที่ต้มไว้
10. เมื่อต้มครบ 10 นาทีแล้ว จะตักลูกชิ้นขึ้น ใส่ในน้ำเย็นจัดทันที เพื่อหยุดความร้อน แล้วรอ 3-5 นาทีให้อยู่ในน้ำเย็น

จากนั้นตักขึ้นจากน้ำเย็นใส่กระชอน ให้สะเด็ดน้ำ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อสกัดดีเอ็นเอต่อไป

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอาณัฐ เต๋นยั้งโยชน์ เกิดเมื่อวันที่ 8 กันยายน พ.ศ.2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจาก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2551

เคยทำงานที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำแหน่งหัวหน้าหน่วยบริการภาคอุตสาหกรรมและธุรกิจ ตั้งแต่พ.ศ. 2553-2556

เสนอผลงานทางวิชาการ ภาคบรรยาย เรื่อง High resolution melting analysis (HRM) for detection of forbidden animals in halal food ในงานการประชุมวิชาการนานาชาติ Biotechnology International Congress (BIC) 2016“Biomass energy and its refinery” วันที่ 20-23 กันยายน พ.ศ.2559 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพมหานคร

ผลงานวิจัย SIMULTANEOUS DETECTION OF THREE FORBIDDEN ANIMALS (PORCINE, CANINE, AND RAT) IN HALAL FOOD BY USING HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร SCIENTIFIC BULLETIN "BIOTECHNOLOGY". SERIES F, VOL. XXI, 2017, ISSN 2285-1364.