บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารโดยกำหนดตัวอย่างอาหารเป็นกลุ่ม ๆ ให้ผลการทดลองที่สามารถจำแนกชนิดอาหารได้สอดคล้องกับสัดส่วนขององค์ประกอบที่ตรวจสอบได้ ได้แก่ อาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 25 คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าร้อยละ 50 และอาหารที่มีไขมันสูงกว่าร้อยละ 30 ซึ่งอาหารเหล่านี้เป็นตัวแทนตัวอย่างอาหารที่พบว่าทำการสกัดและตรวจสอบ DNA ได้ยาก

ผลการศึกษาวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมกับอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่า เนื้อสัตว์และอาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 25 ควรจะสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐาน อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่าร้อยละ 50 ควรจะสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB และอาหารที่มีไขมันสูงกว่าร้อยละ 30 ควรสกัด DNA ด้วยวิธี urea ซึ่งการใช้วิธีสกัดที่เหมาะสมกับชนิดอาหารจะทำให้ได้ DNA ที่มีความเข้มข้นสูงและบริสุทธิ์ เหมาะสมที่จะนำมาทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป สำหรับการสกัด DNA จากอาหารด้วย kit สำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์มาก แต่ค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างสูงกว่าวิธีอื่น

ความเหมาะสมของวิธีการที่สอดคล้องกับชนิดของกลุ่มตัวอย่างอาหาร ทำให้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคในการสกัด DNA ได้ครอบคลุมเนื้ออาหารหลากหลายชนิด สอดคล้องกับที่พบในชีวิตประจำวัน

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์เบื้องต้นเพื่อทำการออกแบบและพัฒนาชุดตรวจสอบ DNA จากสุกรตามวัตถุประสงค์ พบว่า ในยีน growth hormone แม้ว่าจะพบว่าเป็นยีนที่พบในเนื้อสัตว์ทุกสปีชีส์ แต่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์กลับพบว่า ส่วนต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ไม่สูงพอที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบได้ดีพอ จึงทำให้ไม่สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาการทำ PCR โดยไม่ต้องใช้เอนไซม์จำเพาะในการตัดยีนได้ การเลือกใช้ DNA clone จากที่รายงานไว้ใน Davoli และคณะ (1999) จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมและการเลือกใช้โคลนที่ไม่มีความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลิโอไทด์ใด ๆ ที่ปรากฏใน database มาเป็นข้อมูลอ้างอิงจึงช่วยให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้

ผลการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาตรวจสอบ DNA สุกรในตัวอย่างอาหาร พบว่าคู่ไพรเมอร์ 813 ซึ่งออกแบบจากยีนกล้ามเนื้อของสุกรโคลน Z98813 มีความจำเพาะเจาะจงกับ DNA สุกร แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับ DNA ของสัตว์ชนิดอื่น สอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ใน Davoli

และคณะ (1999) แม้ว่าชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จะมีความสัมพันธ์กันกับโปรตีน แกมมาสับไทพ์ 14-3-3 ก็ตาม

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 450 นิวคลิโอไทด์ ซึ่งเหมาะสมกับการวิเคราะห์บนเจลความเข้มข้น 1% และสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ DNA อื่นได้โดยง่าย ผลการทดลองดังกล่าวสรุปให้เห็นถึงข้อดีของความเป็นไปได้ในการนำไพรเมอร์ 813 นี้ไปใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของสุกร ทดแทนวิธีเดิมที่มีผู้รายงานไว้ซึ่งอาศัยการออกแบบไพรเมอร์จาก mitochondrial cytochrome *b* gene (Meyer *et al.*, 1995; Matsunaga *et al.*, 1999; Wolf, Rentsch and Hübner, 1999) ribosomal RNA (Carrera *et al.*, 1999; Borgo *et al.*, 1996) ทำให้ได้วิธีการตรวจสอบจากการเพิ่มปริมาณDNA เพียงครั้งเดียวโดยไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์จำเพาะในการตัดยีน

สำหรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมพบว่า ค่า annealing temperature จะอยู่ที่ 45°C และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 2.08 mM และจากการตรวจสอบ sensivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่า สามารถตรวจสอบ DNA สุกรปนเปื้อนได้น้อยที่สุด 705 ng และตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้ถึงร้อยละ 1 และเมื่อนำมาตรวจสอบในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสุกร สามารถตรวจสอบได้ sensitivity ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถปรับปรุงให้สูงขึ้นได้โดยการปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมมากขึ้น เช่น การแปรความเข้มข้นหรือปริมาณdNTP และเอนไซม์ เพิ่มจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา เป็นต้น รวมทั้งการตรวจสอบ DNA สุกรที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น การให้ความร้อนที่ระดับต่าง ๆ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการจัดนำระบบไปพัฒนาต่อเพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของ DNA จากสุกรที่เป็นมาตรฐานยิ่งขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในวงกว้าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย