

การตรวจสอบการปนเปื้อนของสูตรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ

นางสาวนัน พงษ์พรวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0718-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE

Miss Natinee Pongpanluk

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

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0718-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจสอบการปนเปื้อนของสูกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอ

โดย

นางสาวทินี พงษ์พรวาก

ภาควิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

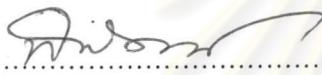
อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. วนิช สงวนดีกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)

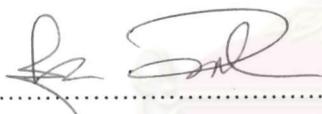
อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชลุ่มพฤกษ์

คณะกรรมการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

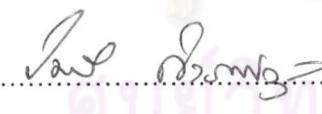
 รองคณบดีฝ่ายบริหาร

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒ์ การเที่ยง) รักษาการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

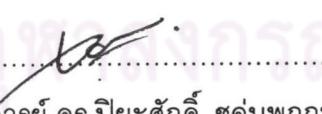
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตะเอียร)

 อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. วนิช สงวนดีกุล)

 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชลุ่มพฤกษ์)

 กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

นทินี พงษ์พรวาก : การตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรในอาหารโดยเทคนิคการตรวจ
สอบดีเอ็นเอ (DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS BY DNA
DETERMINATION TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. วนิช สงวนดีกุล, อ.ที่
ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชัยมพูกันช์ ; 45 หน้า. ISBN 974-17-0718-5

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอบนพื้นฐานการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย
ปฏิกิริยาลูกลิโพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของ
สุกรในอาหาร สนองตอบต่อความต้องการของผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไม่รับประทานเนื้อสุกร โดยสกัด
ดีเอ็นเอจากอาหาร แล้วนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณซึ่งส่วนดีเอ็นเอสุกรที่อาจปนเปื้อน จากนั้นจึง
ตรวจวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis การทดลองได้แยกทดสอบอาหารที่มีองค์ประกอบซับ
ซ้อน 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เนื้อสุกร กลุ่มที่ 2 อาหารที่มีโปรตีน $\geq 25\%$ กลุ่มที่ 3 อาหารที่มี
คาร์บอไฮเดรต $\geq 50\%$ และกลุ่มที่ 4 อาหารที่มีไขมัน $\geq 30\%$ โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ต่าง
กัน 4 วิธี ได้แก่ วิธีมาร์โซน, วิธีสกัดด้วย CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide), วิธี
สกัดด้วย Urea และวิธีสกัดด้วยซุลฟิดสกัดดีเอ็นเสำเร็จรูป Qiagen™ พบร่วม วิธีที่เหมาะสมกับ
อาหารกลุ่มที่ 1 และ 2 คือวิธีมาร์โซน วิธีที่เหมาะสมสำหรับอาหารกลุ่มที่ 3 คือ การสกัดดีเอ็นเอ
ด้วย CTAB และการสกัดดีเอ็นเอด้วย Urea เมะกับอาหารกลุ่มที่ 4 การสกัดดีเอ็นเอด้วย kit
สำเร็จรูป แม้จะให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่า แต่ค่าใช้จ่ายสูง สำหรับการตรวจสอบซึ่งส่วนดีเอ็นเอ
สุกรที่ปนเปื้อนในอาหารนั้น ได้จากการออกแบบหัวไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ DNA clone ที่พบ
เฉพาะในสุกรเท่านั้น โดยการสืบค้นข้อมูลใน DNA data bank เพื่อตรวจหาคลอนที่เฉพาะเจาะจง
ของสุกรจาก growth hormone gene แต่เมื่อพบ ไม่สามารถออกแบบหัวไพรเมอร์ได้ จึงออกแบบไพร
เมอร์จากยีนที่พบแสดงออกในกล้ามเนื้อของสุกร 3 clone (Z98771, Z98802 และ Z98813) เมื่อ
นำมาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสุกรโดย PCR พบร่วมคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากคลอน
Z98813 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 450 นาโนลิตร/หลอด คู่ไพรเมอร์นี้ไม่
เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์อื่นยกเว้นเนื้อสุกร โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา
PCR คือ annealing temperature 45°C และ $\text{MgCl}_2 2.08 \text{ mM}$ เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถ
ตรวจสอบ DNA สุกรปนเปื้อนได้น้อยที่สุด 705 ng และตรวจสอบเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อสัตว์
ชนิดอื่นได้ถึงร้อยละ 1 และเมื่อ拿来ตรวจน้ำดูดูในตัวอย่างอาหารที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของ
สุกร พบร่วมสามารถตรวจสอบได้

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต..... ๙๘๗ พงษ์พรวาก
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4172315823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : PCR / PORK

NATINEE PONGPANLUK : DETECTION OF SWINE CONTAMINATED IN FOODS
BY DNA DETERMINATION TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ROMANEE
SANGUANDEEKUL, Ph.D., PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 45 pp. ISBN 974-
17-0718-5

DNA determination technique based on DNA amplification with Polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect the swine contaminated in foods for consumers that can not to consume swine and swine products. The technique begins with the extraction of DNA from food materials, amplification of swine DNA fragments that may be contaminated in foods and evaluation of the results by gel electrophoresis. The food materials were divided into 4 groups : 1. pork 2. foods containing protein \geq 25% 3. foods containing carbohydrate \geq 50% and 4. foods containing lipid \geq 30%. DNA was then extracted with 4 methods : Standard method, CTAB method, Urea method and extract with Qiagen™ kit. The results showed that the standard method was suitable for the first and second group of food materials. CTAB method could be used for the third group and Urea method was used for the fourth group because with presence of urea, lipid could be clarified apart. Qiagen™ kit extraction resulted in pure DNA but too high in cost consumption. Determination of swine DNA fragments that contaminated in food began with primer design for swine specific DNA clone only. By querying DNA sequences from DNA data bank for swine growth hormone genes and skeletal muscle genes (Z98802, Z98771, and Z98813) several paired-primers were designed. The test on DNA amplification revealed that primer 813 was only primer enable to amplification swine DNA product specifically and yielded DNA products of 450 nucleotide bases. This paired-primer do not specific with DNA from other species except swine. And when determined in contaminated samples, swine DNA can be detected with PCR condition of annealing temperature 45°C and MgCl₂ 2.08 mM. And at least 705 ng of swine DNA and 1% of swine contaminated in mixed animal fresh were detected by this technique. This technique could be applied to detect swine contaminated in other foods.

Department.....Food technology..... Student's signature.....Natinee Pongpanluk.....
Field of study.....Food technology.....Advisor's signature.....Romanee Sanguandeekul.....
Academic year.....2001.....Co-advisor's signature.....K.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความเมตตาของอัลลอฮُ ซุบยานะสูวะตะอาลา และด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชัยมูลพากษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดเวลาของการทำวิจัย

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตะระธีร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ รวมทั้งครอบครัวและญาติพี่น้องของผู้เขียนที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลืออย่างสุดความสามารถ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๑
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๒
กิตติกรรมประกาศ.....	๓
สารบัญ.....	๔
สารบัญตาราง.....	๕
สารบัญรูปภาพ.....	๖
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	๗

บทที่

1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	2
3 วิธีทดลอง.....	11
4 ผลการทดลอง.....	21
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	37
รายการอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก.....	44
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์บอไฮเดรตในตัวอย่างอาหาร.....	21
2 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากเนื้อสุกรที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ.....	23
3 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 2 (โปรตีนสูงกว่า 25%).....	25
4 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 3 (คาร์บอไฮเดรตสูงกว่า 50%).....	26
5 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DNA จากตัวอย่างอาหารกลุ่มที่ 4 (ไขมันสูงกว่า 30%).....	27
6 คู่ไฟเรโนร์ทีออกแบบจากยีนกล้ามเนื้อของสุกร.....	29
7 ขนาด DNA ของเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ	36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction).....	6
2 ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นแบบ 2 ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	7
3 กราฟมาตรฐานในการคำนวณความเข้มข้นของ DNA.....	18
4 แบบ DNA ที่สกัดจากเนื้อสุกรด้วยวิธีต่าง ๆ	24
5 แบบ DNA ของตัวอย่างอาหารจากแต่ละกลุ่มที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ	24
6 แบบ DNA ของตัวอย่างอาหารที่สกัดด้วย kit สำเร็จรูป.....	27
7 ชิ้นส่วน DNA จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 381 กับ DNA จากเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ เปรียบเทียบกับสุกร.....	30
8 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณ MgCl ₂ จาก 0-2.08 mM...	31
9 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปร annealing temperature เป็น 40, 43, 45 และ 47°C ตามลำดับ.....	32
10 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยแปรปริมาณDNA สุกรที่ใช้เป็น DNAต้นแบบเป็น 4 ระดับ.....	33
11 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCRโดยแปรปริมาณเนื้อสุกรในเนื้อผสมเป็นร้อยละ 0-100.....	34
12 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR เมื่อ spike DNA สุกรลงในอาหารต่าง ๆ ...	35
13 แบบ DNA จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR ในตัวอย่างอาหารที่คาดว่ามีการปนเปื้อนจากสุกร.....	35

**ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CTAB	=	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	gram
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR-RFLP	=	polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism
pmol	=	picomole
RNase	=	ribonuclease
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TE	=	Tris-EDTA
U	=	unit(s)