บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

การตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร เพื่อบ่งบอกสัดส่วนของเนื้อสัตว์ในองค์ประกอบของอาหาร การตรวจสอบการปลอมปน และเพื่อตรวจรับรองอาหารให้เป็นไปตามบทบัญญัติทางศาสนาเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการตรวจสอบอาหาร เนื่องจากทำได้ยาก (Ebbehøj and Thomsen, 1991)

เทคนิคในการตรวจสอบในอดีตทำโดยการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะมีความสะดวก รวดเร็ว และใช้ได้กับอาหารหลายชนิด แต่มีข้อจำกัดคือ อาหารที่ไม่มีกรดไขมันหรือมีกรดไขมันในระดับต่ำ จะไม่สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนี้กรดไขมันยังเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้ระหว่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูปที่รุนแรง หรือเก็บอาหารไว้เป็นเวลานาน ทำให้การตรวจสอบได้ผลไม่ชัดเจน

เทคนิคที่ใช้การตรวจสอบโปรตีนเป็นหลัก เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในเนื้อสัตว์กับแอนตี้ซีรัมที่เฉพาะเจาะจงกับโปรตีน ตัวอย่างวิธีที่อาศัยหลักการดังกล่าวได้แก่ agar gel immunodiffusion assays (Fugate and Penn, 1971; Shaw, Deane and Cooper, 1983) enzyme-linked immunosorbent assay (Kang'ethe, Jones, and Patterson, 1982) และการใช้เทคนิค electrophoresis เข้าช่วย เช่น electrophoretic methods เทคนิคเหล่านี้มีข้อจำกัดทางด้านความแม่นยำในการตรวจสอบ การเกิด cross-reaction และในหลายกรณีไม่สามารถตรวจสอบในเนื้ออาหาร (food matrices) ที่ซับซ้อนได้ (Sotelo *et al.*, 1993)

การตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์โดยตรวจสอบ DNA ที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจาก DNA มีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่าโมเลกุลอื่น ๆ เมื่อผ่านกระบวนการผลิต (Meyer, Hofelein *et al.*, 1995) การตรวจสอบ DNA มีขั้นตอนหลัก 2 ขั้น ได้แก่ การสกัด DNA จากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ และการตรวจสอบ DNA ที่สกัดได้ และทั้งสองขั้นตอนมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน การสกัด DNA จากตัวอย่างอาหารอาศัยหลักการทำให้เนื้ออาหารแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในบัฟเฟอร์และขจัดโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่ DNA ออกไป (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989) ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวนิยมใช้สารละลายฟีนอลเป็นตัวทำลายโมเลกุลที่ไม่ต้องการ จากนั้นจึงนำ DNA มาตกตะกอนจนได้ DNA บริสุทธิ์

การตรวจสอบ DNA ที่ได้ขึ้นอยู่กับการวางแนวทางตรวจสอบให้มีความเหมาะสม Bauer, Teifel-Greding และ Liebhardt (1987) และ Chikuni และคณะ (1990) ได้เสนอวิธีการตรวจสอบ

ชนิดของเนื้อสัตว์โดยใช้ DNA ที่เรียกว่า DNA hybridization technique ซึ่งจะตรวจสอบลำดับเบสบน DNA จำเพาะในจีโนมของเนื้อสัตว์ที่ปนอยู่ในอาหาร และตรวจสอบระบุชนิดของเนื้อสัตว์โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงทางสีเมื่อใช้เทคนิค autoradiography อย่างไรก็ดี การตรวจสอบโดยวิธีนี้ไม่สามารถระบุความแตกต่างของสัตว์ที่มีสปีชีส์ใกล้กันมากได้ (Chikuni *et al.*, 1990) ในบางกรณี probe ที่จำเพาะต่อ DNA ของเนื้อสัตว์อาจทำปฏิกิริยาต่อกัน ทำให้ผลการประเมินผิดพลาด

Saiki และคณะ (1985) ได้เสนอเทคนิคใหม่ในการเพิ่มจำนวน DNA ที่เรียกว่า PCR (polymerase chain reaction) โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ของสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณ DNA แบบวงจรในหลอดทดลองโดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการให้เป็นล้าน ๆ เท่าภายในระยะเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง

Meyer, Candrian และ Lüthy (1994) นำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีนสร้าง growth hormone ในสุกร วัว แพะ และแกะ พบว่า วิธีพีซีอาร์โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์เป็นไพรเมอร์ในการตรวจสอบเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นวิธีที่ตรวจสอบได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบสารพันธุกรรมวิธีอื่น โดยเหตุผลสำคัญคือ ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย มีความไวสูงโดยสามารถตรวจพบเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนน้อยกว่าร้อยละ 2 ในเนื้อวัวที่ผ่านความร้อน และวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนสาย DNA ต้นแบบได้มากในเวลาสั้น ๆ โดยใช้ตัวอย่างเล็กน้อยเพียง 0.3 กรัม โดยที่วัตถุเจือปนอาหารซึ่งรวมทั้งเกลือและเครื่องเทศที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่มีผลแทรกซ้อนต่อการใช้พีซีอาร์ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังใช้ได้กับตัวอย่างอาหารทั้งที่เป็นอาหารสดและอาหารที่ผ่านความร้อนสูง เช่น อาหารเด็ก ผลิตภัณฑ์เนื้อบรรจุกระป๋อง (Bottero *et al.*, 1999) อย่างไรก็ดีการตรวจโดยใช้ยีน growth hormone จำเป็นต้องผ่านกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะในการจำแนกชนิดของผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีต้นทุนและยุ่งยาก

นอกเหนือจากการใช้ยีน growth hormone ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงกับอาหารในกลุ่มเนื้อสัตว์ ยังพบว่าสามารถตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์จากยีนบนไมโตคอนเดรียได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ genome DNA จากไมโตคอนเดรียของสัตว์หลายชนิดพบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง small ribosomal RNA (12S และ 16S) (Carrera *et al.*, 1999) และ cytochrome *b* (Cyt*b*) (Espoti *et al.*, 1993) เป็นอีกทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเนื้อสัตว์ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดที่ใกล้เคียงกันทั้งระหว่างและในสปีชีส์ได้ (Kocher *et al.*, 1989) ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ นอกจากจะพบได้ในทุกเซลล์แล้ว โดยทั่วไปจะมีความคล้ายคลึง

กันในระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิต และสามารถแยกสกัดออกได้ง่ายในปริมาณที่มาก การที่ข้อมูลมีส่วนคล้ายคลึงกัน ทำให้การออกแบบไพรเมอร์เพื่อการเพิ่มจำนวนทำได้ง่าย จึงทำให้มีผู้ประยุกต์ใช้ข้อมูลของ DNA จากไมโตคอนเดรียกันมาก การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนทั้งคู่ดังกล่าวในการตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ (โค, กระบือ) และเนื้อปลา กุ้ง เต่า และสุกร (Chow, Clarke, and Walsh, 1993; Chow and Inoue, 1993; Silberman and Walsh, 1992 และ Karl, Bowen, and Avise, 1992) เป็นตัวอย่างในการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าว การตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์ด้วยระบบนี้ยังต้องการการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะเช่นเดียวกับการใช้ยีน growth hormone

เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว Fei และคณะ (1996) ได้ออกแบบ multiplex PCR primer บนพื้นฐานของลำดับเบสบน D-loop ของไมโตคอนเดรียจากสัตว์ต่างชนิด ทำให้สามารถแยกชนิดของเนื้อสัตว์จำพวก วัว สุกร และไก่ ออกจากกันได้ อย่างไรก็ดีงานวิจัยของ Meyer และคณะ (1994) เป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเนื้อสุกรเฉพาะในผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัตว์เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ซึ่งการสกัด DNA จะทำได้ง่ายเพราะมี DNA ของเนื้อสัตว์อยู่ในปริมาณสูง แต่อาหารส่วนใหญ่โดยเฉพาะอาหารที่จำเป็นต้องตรวจรับรองให้เป็นไปตามบทบัญญัติทางศาสนาบางชนิดมีสัดส่วนของเนื้อสัตว์อยู่น้อย ทำให้งานวิจัยมีข้อจำกัดอยู่ที่สภาพเนื้อของอาหาร (food matrices) การตรวจด้วย multiplex PCR ยังคงจำกัดอยู่เพียงเนื้อสัตว์ไม่กี่จำพวก เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์มีความยุ่งยากมากกว่า ทำให้การนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารไม่สามารถทำได้อย่างกว้างขวาง

การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเพื่อแยกชนิดของเนื้อสุกรออกจากเนื้อสัตว์ในกลุ่มอื่นที่เหมาะสมจึงควรเป็นการทำปฏิกิริยา PCR ที่สามารถตรวจสอบชนิดของเนื้อสัตว์จากผลิตภัณฑ์ PCR ได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะจะทำให้การตรวจง่ายขึ้นและมีต้นทุนในการดำเนินงานต่ำลง นอกจากนี้ ด้วยระบบ PCR ปกติกับยีนจำเพาะที่สามารถออกแบบและตรวจสอบได้ จะทำให้สามารถประยุกต์ใช้งานได้ดีกว่าระบบ multiplex PCR อย่างไรก็ดี เนื่องจากอาหารที่มีองค์ประกอบและสภาพของอาหารแตกต่างกันจะมีการจัดเรียงตัวของแต่ละองค์ประกอบในอาหารแตกต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อกระบวนการสกัด DNA ออกจากตัวอย่างอาหารแต่ละชนิด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ประการหนึ่งเพื่อศึกษาวิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างอาหารต่างชนิดและอีกประการหนึ่งเพื่อพัฒนาระบบการจำแนกชนิดของสุกรที่ปะปนในตัวอย่างอาหารบางชนิดบนพื้นฐานของการตรวจสอบ DNA เพื่อนำทั้ง 2 เทคนิคมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบอาหารฮาล้าลต่อไป

2.1 **การสกัดดีเอ็นเอจากอาหาร** (Sambrook *et al.*, 1989)

ปกติการสกัด DNA สามารถทำได้โดยการใช้แรงทางกายภาพบดชิ้นส่วนตัวอย่างให้มีขนาดเล็กและพร้อมที่จะปลดปล่อย DNA จากเนื้อตัวอย่างออกสู่ภายนอกที่มีระบบบัฟเฟอร์รองรับ พร้อมกันนี้มีการนำสารในกลุ่มดีเทอเจนต์มาช่วยทำให้ DNA หลุดออกจากโครงสร้างที่ยึดเกาะอยู่ได้ง่าย จากนั้นจึงทำการกำจัดส่วนของโมเลกุลที่ไม่ต้องการเช่น โปรตีน ไขมัน และบางส่วนของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งขั้นตอนนี้นิยมใช้สารละลายฟีนอลและฟีนอล/คลอโรฟอร์มเป็นหลัก ในขั้นตอนสุดท้ายจึงทำการตกตะกอน DNA ด้วยสารละลายเกลืออะซิเตตและแอลกอฮอล์ ในการสกัด DNA จากอาหารมีหลักการคล้ายกัน อย่างไรก็ดี DNA ที่พบในอาหารจะมีลักษณะที่ต่างไปจาก DNA ที่พบในเซลล์หรือในเนื้อสัตว์ ทั้งนี้เนื่องจากขณะผ่านกระบวนการแปรรูปอาหาร DNA สูญเสียสภาพและมีขนาดสั้นลง นอกจากนี้ โมเลกุลต่าง ๆ ที่ประกอบกันเป็นเนื้ออาหารยังเข้ามาปะปน จึงทำให้กระบวนการสกัด DNA จากอาหารบางครั้งต้องมีการดัดแปลงให้มีความเหมาะสมสอดคล้องกับชนิดของอาหารเหล่านั้น

Meyer และคณะ (1995) รายงานถึงลักษณะของเนื้ออาหารและความยากง่ายในการสกัด DNA และแหล่งเนื้ออาหารตามองค์ประกอบของปริมาณโปรตีนในอาหารแต่ละชนิด ในอาหารบางชนิดที่มีไขมันสูง เช่น เลซิธิน จำเป็นต้องกำจัดปริมาณไขมันที่ไม่ต้องการในปฏิกิริยาออกโดยใช้ตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอน ขณะที่อาหารบางชนิด เช่น นมและแป้งบางชนิด อาจมีสัดส่วนของสารประกอบบางอย่างในปริมาณสูง ทำให้การสกัด DNA ที่มีคุณภาพจากตัวอย่างอาหารเหล่านั้นทำได้ยาก

การพัฒนาเทคนิคการสกัด DNA จึงมีความจำเป็น ในการทดลองได้นำเทคนิคการสกัด DNA หลายเทคนิคเข้ามาประกอบเพื่อประยุกต์ใช้ โดยจำแนกอาหารตามองค์ประกอบทางเคมีเป็นหลัก เพื่อหาและปรับวิธีการเหล่านั้นให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างอาหารที่มักพบในประเทศ

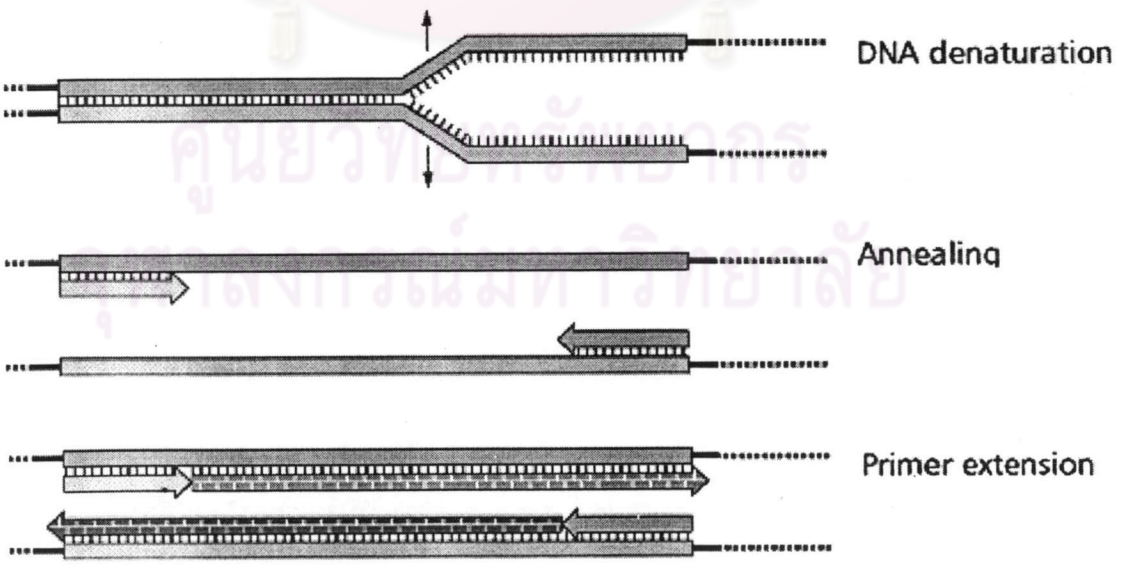
2.2 **เทคนิคพีซีอาร์** (Polymerase chain reaction - PCR) (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536; วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

เทคนิคพีซีอาร์ มีหลักการสำคัญคือ การเลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์สิ่งมีชีวิตเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA แบบวงจรในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง ๆ แล้วทำปฏิกิริยาหลาย ๆ รอบเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการให้เป็นล้าน ๆ เท่าภายในระยะเวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญในการทำปฏิกิริยาดังนี้

1. **ดีเอ็นเอต้นแบบ** (template DNA) คือ DNA ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน
2. **ไพรเมอร์** (primer) เป็นนิวคลิโอไทด์สายสั้น ๆ ที่ออกแบบให้มีเบสคู่สมกับ DNA ต้นแบบบริเวณที่ต้องการเพิ่มจำนวน ใน 1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์ 1 คู่
3. **เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส** ทนความร้อนสูง ซึ่งจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการเติมเบสให้กับ DNA สายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น ในปัจจุบันจะใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (แยกสกัดได้จากแบคทีเรียทนความร้อน *Thermus aquaticus* (*Taq*) ทนความร้อนได้ถึง 95°C), Vent DNA polymerase, Deep Vent DNA polymerase (แยกสกัดได้จากแบคทีเรีย *Pyrococcus species* ทนความร้อนได้ถึง 104°C) เป็นต้น
4. **สารต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยา** เช่น $MgCl_2$ ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ดีออกซี นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) เป็นสับสเตรตของปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาแต่ละรอบของพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน (รูปที่ 1) ได้แก่

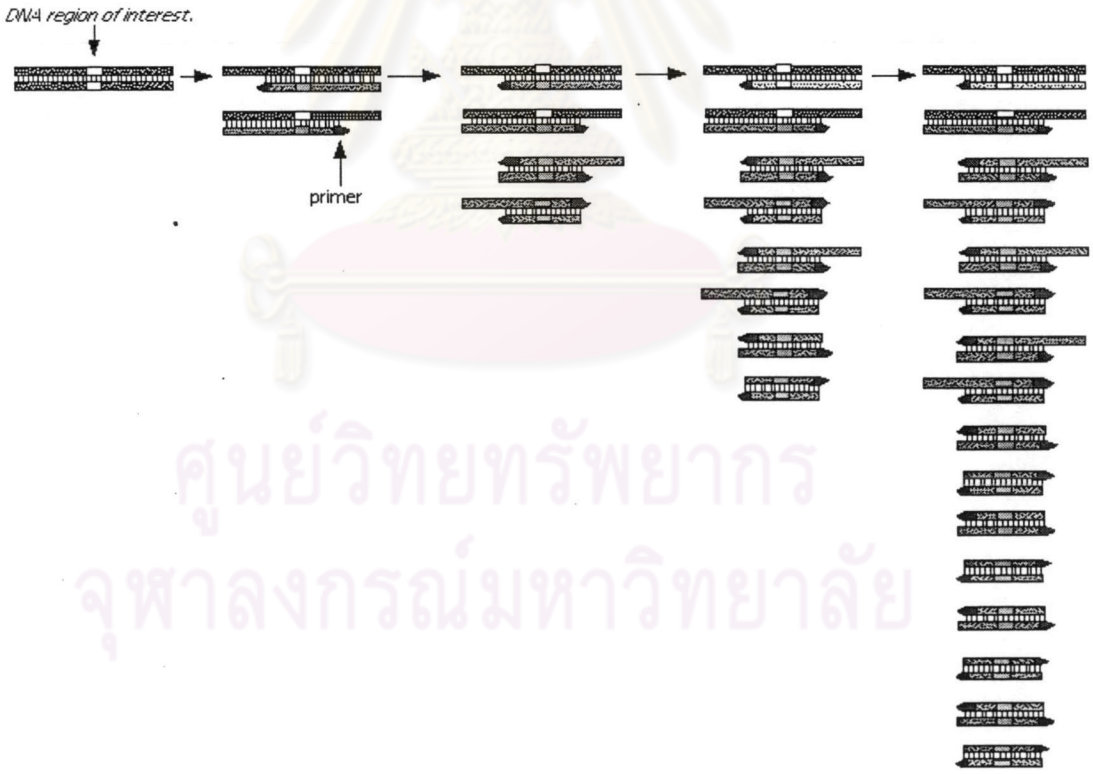
1. Denaturation ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95°C เพื่อทำให้ DNA สายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว
2. Primer annealing ลดอุณหภูมิลงที่ 40-60 °C ไพรเมอร์ 2 สายเข้าไปจับคู่สมบน DNA สายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ (template)
3. Primer extension การต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ทนร้อนเป็นตัวเร่ง



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

ดังนั้นถ้าเริ่มต้นจาก DNA ต้นแบบ 1 คู่ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปจนสิ้นสุด ในรอบแรกจะได้ DNA 2 คู่ ในรอบที่สองจะได้เป็น 4 คู่ (รูปที่ 2) ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากเดิมได้อย่างทวีคูณในรูปยกกำลัง โดยมีจำนวนผลิตผล (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ดังนั้น ถ้าปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพ 100% เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป 25 รอบ จะได้ DNA 2^{25} ชุด หรือประมาณ 3.4×10^7 เท่าของ DNA ต้นแบบ

โดยทฤษฎีแล้วแม้ว่าเทคนิค PCR สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้อย่างไม่จำกัด แต่องค์ประกอบทุกตัวในปฏิกิริยาเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมอัตราการเพิ่มจำนวน DNA DNA เส้นใหม่ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยาแต่ละรอบจำทำหน้าที่เป็น DNA ต้นแบบของปฏิกิริยารอบต่อไป เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดในแต่ละรอบจะได้ DNA เส้นใหม่ที่เหมือน DNA ต้นแบบจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ในขณะที่จำนวนไพรเมอร์และสารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาจะลดลง นั่นคืออัตราส่วนของ DNA ต้นแบบต่อไพรเมอร์จะเพิ่มขึ้น เมื่อจำนวนรอบของปฏิกิริยามากขึ้นถึงจุดหนึ่ง DNA เส้นใหม่จะมีปริมาณมากและส่งผลให้มีการจับคู่กันเองระหว่าง DNA เส้นใหม่มากกว่าการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับ DNA ต้นแบบ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา PCR



รูปที่ 2 ปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นแบบ 2^n ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

Innis และ Gelfand (1990) รายงานปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปฏิกิริยา โดยพบว่านอกเหนือจากการปรับความเข้มข้นของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์ Taq DNA polymerase, ความเข้มและ pH ของ dNTP ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในปฏิกิริยาแล้ว ความเข้มข้นของแมกนีเซียมก็มีผลโดยตรงต่อการทำปฏิกิริยา เนื่องจากแมกนีเซียมมีผลต่อ primer annealing, product specificity และมีผลถึงความถูกต้องแม่นยำของเอนไซม์

นอกจากนี้ การเข้าจับตัวของไพรเมอร์เป็นปัจจัยที่สำคัญด้วยเช่นกัน อุณหภูมิและระยะเวลาในการจับตัวของไพรเมอร์กับสาย DNA เป้าหมายขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์นั้น ๆ ความยาว และความเข้มข้น ซึ่งโดยปกติจะมีค่าต่ำกว่า Tm ประมาณ 5°C ดังนั้น การปรับองค์ประกอบภายใน PCR โดยเฉพาะไพรเมอร์มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของปฏิกิริยา

2.3 ไพรเมอร์และการออกแบบไพรเมอร์ (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536; Erlich, Gibbs, and Kazazian, 1989)

การเลือกไพรเมอร์เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ การจะเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณที่ต้องการ ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะต้องมีความสอดคล้องกับ DNA เป้าหมายมากที่สุดเพื่อให้เกิดการจับคู่กันอย่างสมบูรณ์ และจะต้องไม่จับกับบริเวณอื่นของ DNA ต้นแบบและ DNA อื่น ๆ สำหรับปัจจัยสำคัญในการออกแบบไพรเมอร์ได้แก่

- **ความยาวของไพรเมอร์** Berry และ Peter (1984) รายงานความยาวที่เหมาะสมของไพรเมอร์ว่าขึ้นอยู่กับชนิดของยีนเป้าหมาย โดยในการออกแบบจะต้องใช้ความยาวระหว่าง 20-30 คู่เบส
- **ปริมาณเบส G และ C** บนสายไพรเมอร์ควรมีเบส G และ C รวมกันมากกว่า 50% (ควรมีเบส G+C มากกว่า T+A) เพื่อให้การจับคู่กับสาย DNA เป้าหมายมีความเหนียวแน่นดีพอ แต่บริเวณปลายทั้งสองด้านของไพรเมอร์ควรเป็นเบส C หรือ G เพื่อให้การเกาะตัวของไพรเมอร์และการสร้างสาย DNA ทางปลาย 3' ทำได้ง่ายและมีเสถียรภาพ
- Annealing temperature ไพรเมอร์โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิในช่วง 55 ถึง 75°C และโดยปกติควรจะต่ำกว่า melting temperature ประมาณ 5°C
- ไพรเมอร์และ DNA เป้าหมายไม่จำเป็นต้องเป็นเบสคู่สมกันทั้งหมด แต่ควรมี homology 70% ขึ้นไป โดยเฉพาะลำดับเบสทางปลาย 3' จะต้องเหมือนกัน 100%

การออกแบบลำดับเบสบนไพรเมอร์ทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ เช่น melting temperature, โอกาสที่จะเกิด dimer, โอกาสที่จะจับกับ DNA อื่น ๆ โดยในขั้นต้นตรวจสอบ conserve ของยีนที่สนใจในสัตว์ชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงนำมาตรวจ homology กับยีนของสัตว์สปีชีส์อื่น ๆ แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกบริเวณที่ต่างจากลำดับ

เบสบนสาย DNA ของสัตว์สปีชีส์อื่น ร่วมกับปัจจัยที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แล้วจะถูกนำไปทำ BLAST search คือการตรวจสอบ homology ของไพรเมอร์กับ DNA ของสัตว์สปีชีส์อื่น ๆ จาก DNA data bank[1] อีกครั้ง (Meyer, 1995)

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสปีชีส์ของสัตว์ในอาหารนั้น ได้มีผู้ออกแบบบนพื้นฐานของการตรวจสอบยีนหลายชนิด เช่น satellite[2] I DNA sequence (Chikuni *et al.*, 1994), growth hormone gene (Meyer *et al.*, 1994) และ mitochondrial cytochrome *b* (Matsunaga *et al.*, 1999) แต่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจงกับ DNA สัตว์สปีชีส์เดียว เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR แล้วจะต้องนำผลิตผลที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์อีกครั้งหนึ่งจึงจะตรวจสอบสปีชีส์ของสัตว์ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสุกรให้ได้ในขั้นตอนเดียว

2.4 PCR optimization

ปฏิกิริยา PCR แต่ละปฏิกิริยามีสภาวะในการทำปฏิกิริยา คือ ปรับปริมาณ, ความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของ Mg^{2+}, annealing temperature, ปริมาณ DNA ต้นแบบ, ความเข้มข้นของ dNTP, ปริมาณเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมแตกต่างกัน ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ และมีผลต่อปริมาณผลิตผลจากปฏิกิริยาซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบผลได้อย่างชัดเจน (Erlich *et al.*, 1989)

Magnesium ion (Mg^{2+}) : จับกับ *Taq* DNA polymerase โดยทำหน้าที่เป็น co-factor ในขณะเกิดปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา PCR โดยในสภาวะที่มีปริมาณ Mg^{2+} น้อยเกินไปเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ไม่ทำงาน และลดผลิตผลจากปฏิกิริยาด้วย ตรงกันข้าม ในสภาวะที่มี Mg^{2+} เกินพอจะลดความแม่นยำในการทำงานของเอนไซม์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จาก PCR ที่ไม่ต้องการได้ โดยความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 1-4 mM

---

[1] ฐานข้อมูล nucleotide sequence ซึ่งเชื่อมโยงกันระหว่างฐานข้อมูลของแต่ละหน่วยงาน ได้แก่ GenBank (National center for biotechnology information – NCBI : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), EMBL (European molecular biology laboratory : http://www.embl-heidelberg.de/), DDBJ (DNA database of Japan : http://www.ddbj.nig.ac.jp/)

[2] satellite (แซทเทลไลท์) คือ เบสซ้ำสั้นขนาด 1-6 เบส หรือเบสซ้ำยาวขนาดหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 103-107 ครั้ง จัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสเป็นจำนวนมาก แซทเทลไลท์แต่ละแบบจะพบเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม และมักจะพบบริเวณเซนโทรเมียร์ (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

ปริมาณเอนไซม์ : ปริมาณ *Taq* DNA Polymerase ที่เหมาะสมคือประมาณ 2.5 U/100 µl PCR solution ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปและเวลาในช่วง Primer extension นานจะเพิ่มโอกาสที่จะได้ดีเอนเอที่ไม่สมบูรณ์และเป็นแถบยาว โดยปกติเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะมี subunit ย่อยทำหน้าที่เป็น 5'-3' exonuclease เมื่อมีเอนไซม์มากเกินพอจะลดความเฉพาะเจาะจง และเพิ่มอัตราการเกิด proof reading มากเกินความจำเป็น ส่งผลให้เมื่อนำ PCR product มา run gel ทำให้เห็นเป็น band ที่จางและหายไป

Annealing temperature : ขึ้นอยู่กับ melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ตัวที่ต่ำกว่า โดย annealing temperature ของปฏิกิริยา PCRที่เหมาะสมควรต่ำกว่า T_m ประมาณ 5°C

ความเข้มข้นของ dNTP : ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 40-200 µM dNTP ที่มากเกินไปยับยั้งปฏิกิริยา PCRและ dNTP น้อยเกินไปจะมีผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยา

ไพรเมอร์ : ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาเป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน โดยปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปฏิกิริยาคือ 10 pmol

2.5 PCR inhibitors

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ก็คือ จะต้องไม่มีตัวยับยั้งปฏิกิริยาซึ่งปะปนมากับ DNA ซึ่งตัวยับยั้ง PCR ก็ได้แก่สารเคมีบางชนิดที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด DNA เช่น คลอโรฟอร์ม, ฟีนอล, อัลกอฮอล์, sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.01%, sarkosine เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีตัวยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นม (Bickley *et al.*, 1996) เครื่องดื่มโกโก้ชา เครื่องเทศบางชนิด แป้งถั่วเหลือง น้ำแอ๊ปเปิ้ล และจากงานวิจัยของ Rossen และคณะ (1992) พบว่า อาหารที่ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันในสัดส่วนสูงจะขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เช่นเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย