บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างโมเลกุลมาตรฐาน

3.1.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการสร้างโมเลกุลมาตรฐาน ได้แก่ อ่างควบคุมอุณหภูมิ เครื่องปั่นแยกชั้น เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง ชุดอุปกรณ์แยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิแบบหลุม เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1.1.2 สารเคมีในการสร้างโมเลกุลมาตรฐาน ได้แก่ ผงวุ้นอะกาโรส อาหารเลี้ยงเชื้อ ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

3.1.2 ตัวอย่างถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์แปรรูป

3.1.2.1 เมล็ดถั่วเหลืองจากร้านค้าตลาดสามย่าน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

3.1.2.2 ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองแปรรูป ได้แก่ น้ำนมถั่วเหลืองจากผู้ประกอบธุรกิจอุตสาหกรรมน้ำนมถั่วเหลือง (ไม่ประสงค์จะออกนาม)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูป

3.1.3.1 เครื่องมือในการให้ความร้อนด้วยการอบแห้ง ได้แก่ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ จานเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.2 เครื่องมือในการให้ความร้อนด้วยการนึ่งความดัน ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน

3.1.3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำน้ำนมถั่วเหลือง ได้แก่ เครื่องชั่ง เครื่องบด เครื่องให้ความร้อน ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ผ้าขาวบาง กระบอกตวง เครื่องแก้ว เทอร์โมมิเตอร์

3.1.3.4 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ได้แก่ เครื่องชั่ง เครื่องให้ความร้อน กระด้งไม้ไผ่ ผ้าขาวบาง ขวดสำหรับหมัก เกลือสมุทร แป้งสาลี เชื้อ *Aspergillus oryzae*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.4 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1.4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่งบดยา เครื่องบด เครื่องชั่ง เครื่องปั่นแยกชั้น เครื่องปั่นเขย่า เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิแบบหลุม Automatic micropipette หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ตามที่อธิบายในวิธีการ

3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอ

3.1.5.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1.5.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องอิเล็กโทรฟอเรซิส อุปกรณ์ในการย้อมเจล UV illuminator และอุปกรณ์บันทึกภาพ

3.1.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

3.1.6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แก่ หลอดพลาสติกขนาด 0.5 มิลลิลิตร เครื่อง DNA Thermal Cycler

3.1.6.2 สารเคมีในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แก่ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ *Taq* DNA polymerase สารละลาย dNTP ไพรเมอร์เลคตินยีนขนาด 119, 327 และ 826 นิวคลีโอไทด์ และ mineral oil

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การพัฒนาระบบการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบการลดลงของขนาดดีเอ็นเอแม่แบบได้

3.2.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ทดสอบการลดลงของขนาดดีเอ็นเอแม่แบบจากดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอาหาร และผลกระทบอันเกิดจากการย่อยสลายจนเหลือขนาดของดีเอ็นเอแม่แบบที่สั้นลง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่พบในธรรมชาติของถั่วเหลือง โดยเฉพาะยีน *lectin* ซึ่งเป็น house keeping gene โดยดึงข้อมูลยีน *lectin* จาก DNA databank (GeneBank accession no. K00821) (Vodkin และคณะ, 1983) และทำการทำนายเพื่อหาบริเวณออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) เปรียบเทียบข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้จากการทำนายกับข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้จากวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิตเซอร์แลนด์

จากนั้นทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่ได้ โดยการนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของจีโนมิกดีเอ็นเอของถั่วเหลือง

3.2.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อสร้างโมเลกุลมาตรฐานเพื่อการทดสอบ

นำไพรเมอร์ที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะที่ให้ขนาดใหญ่ที่สุด คือประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากจีโนมิกของถั่วเหลืองเป็นแม่แบบให้ได้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega) ตามที่อธิบายในเอกสารกำกับการใช้งานของเอนไซม์ ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่ามีขนาดสอดคล้องกับขนาดที่คาดหวังตามทฤษฎีคือประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นให้บริสุทธิ์และตกตะกอนดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยใช้เกลือแอมโมเนียมอะซิเตทแทนโซเดียมอะซิเตท และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำ 10 ไมโครลิตร และนำไปทำปฏิกิริยาด้วย T4 DNA polymerase ตามที่ระบุในเอกสารกำกับการใช้งานของเอนไซม์ ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยานำดีเอ็นเอที่ได้มาสกัดให้บริสุทธิ์ ตกตะกอนและเก็บไว้เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 35S promoter ต่อไป

ในการสร้างโครงสร้างโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐานที่ประกอบด้วยส่วนของ 35S promoter เช่นเดียวกับที่พบในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม จึงได้เพิ่มปริมาณบริเวณชิ้นส่วนของ 35S promoter ตามที่รายงานโดย Jones และคณะ (1992) ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ณ บริเวณ 35S promoter ดังกล่าว ภายหลังการสกัดให้บริสุทธิ์ ตกตะกอนดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ T4 DNA polymerase เช่นเดียวกับในส่วนของยีน *lectin* นำดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนนี้ไปเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *lectin* ที่ได้ในตอนต้นโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ด้วยภาวะปฏิกิริยาตามที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับการใช้งานของเอนไซม์ ภายหลังจากการบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาทีนำส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาไปเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยมี 5′ primer จำเพาะต่อบริเวณ 5′ ของ 35S promoter และบริเวณ 3′ มีความจำเพาะต่อบริเวณ 3′ ของยีน *lectin* (ตำแหน่งที่ 1791)

คัดเลือกดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในขั้นตอนนี้โดยแยกผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเฉพาะที่ให้ขนาดประมาณ 1200 นิวคลีโอไทด์ (400 นิวคลีโอไทด์สำหรับ 35S promoter และ 800 นิวคลีโอไทด์สำหรับยีน *lectin*) และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCRII ตามที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับการใช้งาน บ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 16°ซ 12 ชั่วโมง นำปฏิกิริยาที่ได้มาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* โดยวิธี heat shock transformation ของ Sambrook และคณะ (1989) คัดเลือกโคลนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และนำไปตรวจสอบโดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน 35S promoter และยีน *lectin* โดยเทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธี small scale plasmid DNA preparation (Sambrook และคณะ, 1989) นำพลาสมิดที่ได้ไปใช้ประกอบร่วมกับระบบทดสอบที่พัฒนาได้ในหัวข้อ 3.2.1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การศึกษาภาวะในกระบวนการแปรรูปที่มีผลต่อขนาดของดีเอ็นเอจากตัวอย่างเน้นความร้อน การนึ่งความดัน การต้มเป็นระยะเวลานาน และการหมักโดยระบบการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแม่แบบที่พัฒนาขึ้น

3.2.2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองและอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ดังนี้

3.2.2.1.1 เมล็ดถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูป

สุ่มเมล็ดถั่วเหลืองจากตลาดสดสามย่านในปริมาณตัวอย่างละ 500 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลืองทุก 10 กิโลกรัม นำถั่วเหลืองดังกล่าวส่วนหนึ่งไปใช้ในการทดลองในแต่ละการทดลอง อีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อเป็นชุดควบคุมบวกต่อไป

3.2.2.1.2 เมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยภาวะต่างกันดังนี้

3.2.2.1.2.1 การแปรรูปถั่วเหลืองโดยใช้ความร้อน

3.2.2.1.2.1.1 การอบแห้ง

สุ่มเมล็ดถั่วเหลือง 50 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัม ทดลองอบแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันดังนี้

อบแห้งเมล็ดถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 และ 160°ซ โดยแต่ละอุณหภูมิของการอบแห้งนั้นจะอบแห้งเป็นระยะเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

อบแห้งเมล็ดถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 170, 180, 190, 200, 210, และ 220°ซ โดยแต่ละอุณหภูมิของการอบแห้งนั้นจะอบแห้งเป็นระยะเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองที่อบแห้งไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อทดสอบต่อไป

3.2.2.1.2.1.2 การนึ่งความดัน

สุ่มเมล็ดถั่วเหลือง 50 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัมมาทำการทดลองนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 ที่เวลาต่างกัน เริ่มจาก 0, 5, 10, 15, 30, 60 และ 120 นาที ตามลำดับ สกัดดีเอ็นเอเพื่อทดสอบต่อไป

3.2.2.1.2.1.3 **การต้มเป็นระยะเวลานานเลียนแบบวิธีการแปรรูปน้ำนมถั่วเหลือง**

สุ่มเมล็ดถั่วเหลืองปริมาณตัวอย่างละ 50 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัม เพื่อเป็นวัตถุดิบในการทำน้ำนมถั่วเหลือง โดยประยุกต์จากวิธีของวันชัย สมชิต (2527) (ภาคผนวก ก-1) และสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการแปรรูปที่มีภาวะต่างกัน ดังนี้คือ

- ขั้นตอนของน้ำที่ได้จากถั่วภายหลังจากการกรองเมื่อปั่นถั่วแล้ว
- ขั้นตอนของกากถั่วเหลืองที่ได้จากการกรอง
- ขั้นตอนของน้ำนมถั่วเหลืองภายหลังจากการต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที
- ขั้นตอนของน้ำนมถั่วเหลืองภายหลังจากการอุ่นเป็นเวลาตั้งแต่ 2, 5,10, 15 และ 20 ชั่วโมง

3.2.2.1.2.1.4 **การสุ่มตัวอย่างจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองของผู้ประกอบการ**

สุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองดังแสดงในรูปที่ 6 ตัวอย่างละ 50 กรัมในกรณีที่เป็นของแข็ง และตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตรในกรณีที่เป็นของเหลว

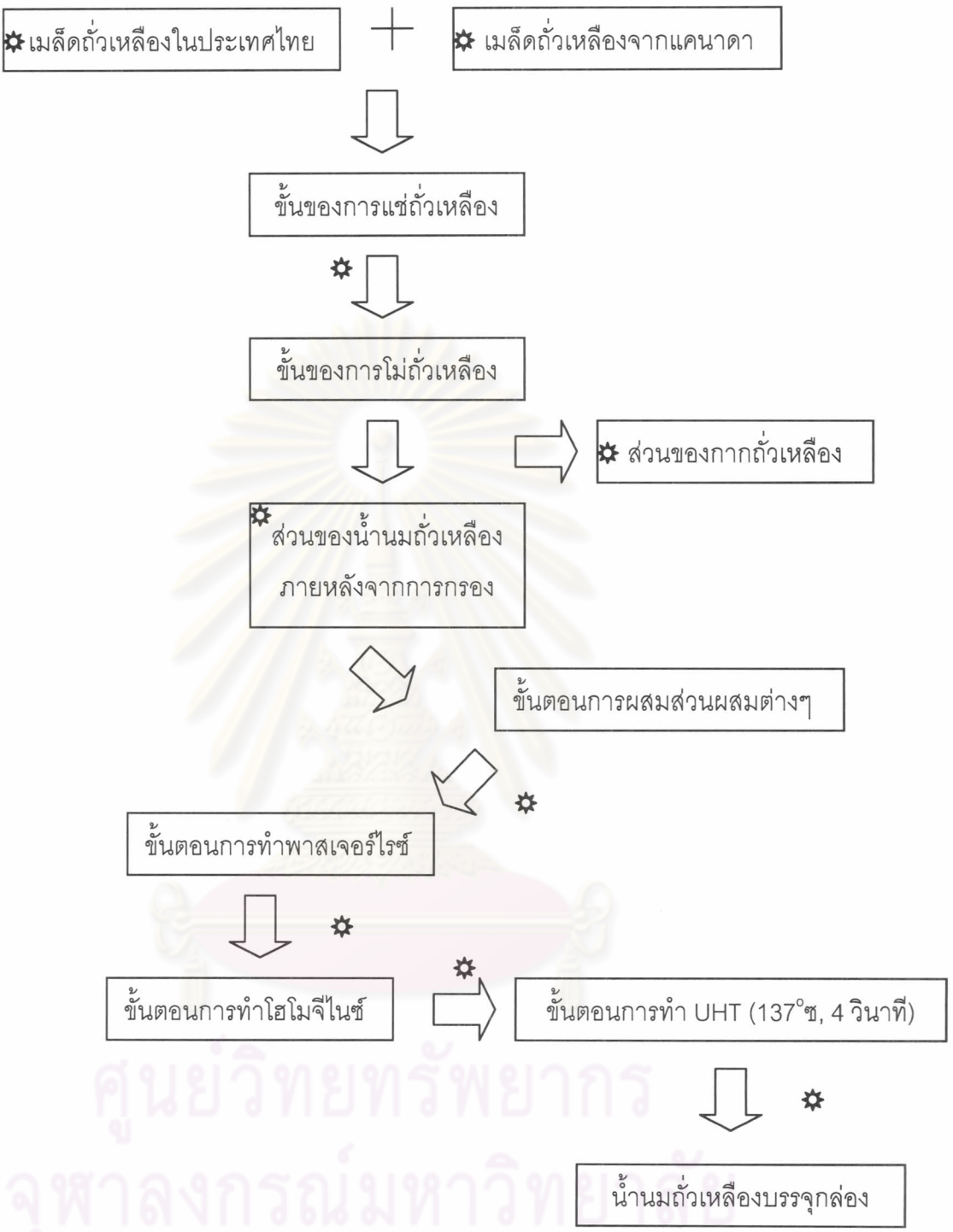
3.2.2.1.2.2 **การแปรรูปถั่วเหลืองโดยการหมัก**

3.2.2.1.2.2.1 **การจำลองวิธีการทำซีอิ้ว**

สุ่มเมล็ดถั่วเหลืองปริมาณตัวอย่างละ 50 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัม เพื่อเป็นวัตถุดิบในการทำซีอิ้ว โดยประยุกต์จากวิธีของวันชัย สมชิต (2527) (ภาคผนวก ก-2) และสุ่มเก็บตัวอย่าง ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการแปรรูป ดังนี้ ถั่วเหลืองที่ได้ภายหลังจากการแช่น้ำข้ามคืน ถั่วเหลืองที่ได้ภายหลังจากการต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และภายหลังจากการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วัน

3.2.2.1.2.2.2 **การจำลองวิธีการทำเต้าเจี้ยว**

สุ่มเมล็ดถั่วเหลืองปริมาณตัวอย่างละ 50 กรัม จากเมล็ดถั่วเหลือง 500 กรัม เพื่อเป็นวัตถุดิบในการทำเต้าเจี้ยว โดยประยุกต์จากวิธีของวันชัย สมชิต (2527) (ภาคผนวก ก-3) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการแปรรูปเช่นเดียวกับการทำซีอิ้ว



หมายเหตุ ✡ เป็นขั้นตอนของการสุ่มเก็บตัวอย่าง

รูปที่ 6 ขั้นตอนการสุ่มเก็บตัวอย่างในกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองผู้ประกอบการอุตสาหกรรมน้ำนมถั่วเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดถั่วเหลืองและตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป

ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็งจะทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมัน (Meyer, 1999) ซึ่งมีรายละเอียดของขั้นตอนการสกัดดังภาคผนวก ข-1.1 และในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวจะทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิตเซอร์แลนด์ ซึ่งมีรายละเอียดของขั้นตอนการสกัดดังภาคผนวก ข-1.2 (Spoth และ Strauss, 2001)

3.2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอสามารถทำได้พร้อมๆ กัน โดยวิธี optical method ซึ่งเป็นวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยอาศัยหลักการว่า เบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และคาร์โบไฮเดรตจะดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร ดังนั้นจึงใช้หลักการดังกล่าวนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ

3.2.2.4 การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR

การทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยดูจากขนาดของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง โดยการใช้ในระบบการตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบที่มีขนาดต่างกันระหว่าง 119, 327 และ 826 นิวคลีโอไทด์ สำหรับดีเอ็นเอจากเมล็ดถั่วเหลืองสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ มาใช้เป็นตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปในแต่ละตัวอย่างใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในขั้นตอนที่ผ่านมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละชิ้นส่วนโดยอาศัยความจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 119 นิวคลีโอไทด์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GM03/GM04 ส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 327 และ 826 นิวคลีโอไทด์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Lec0/Lec1, Lec0/Lec2 ตามลำดับ

ปฏิกิริยา PCR เป็นไปตามวิธี PCR มาตรฐาน โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR ขนาด 0.5 มิลลิลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร

ต่อหลอด นำปฏิกิริยาไปบ่มในเครื่อง PCR โดยกำหนดภาวะของอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนตามคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ

คู่ไพรเมอร์ GM03/GM04

Denaturation	93°ซ	1 นาที
Annealing	55°ซ	1 นาที
Extension	73°ซ	1 นาที

ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ

คู่ไพรเมอร์ Lec0/Lec1 หรือ Lec0/Lec2

Denaturation	94°ซ	1 นาที
Annealing	55°ซ	2 นาที
Extension	73°ซ	3 นาที

ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ

หลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสต่อไป

3.2.2.5 การวิเคราะห์และแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส

วิเคราะห์และแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 1%ใน 1XTAE buffer สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบขนาด 327 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป และใช้อะกาโรสเจล 1.5%ใน 1XTAE buffer สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบขนาดต่ำกว่า 327 นิวคลีโอไทด์ ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลการทดลอง