การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค Duplex PCR และ Multiplex PCR

Detection of Cows' and Goats' Milk in Buffalos' Milk by Duplex PCR and Multiplex PCR Technique

ปิยธิดา งอกงาม[1,2] และ ศศิธร นาคทอง[1,2,3]*

Piyatida Ngokngam[1*,2] and Sasitorn Nakthong[1,2,3]

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the accuracy of the duplex PCR and multiplex PCR techniques in detecting the adulteration of buffalo milk with cow and goat milk. The specific primers were designed in the mitochondrial 12s and 16s rRNA genes that were specific for individual animal species. The specific fragments were 220 bp, 256 bp and 326 bp for buffalo, cow and goat milk, respectively. The result showed that duplex PCR and multiplex PCR techniques could detect the addition of cow and goat milk in buffalo with the sensitivity threshold of 0.1%

Keywords: Buffalo milk, Cow milk, Goat milk, Duplex PCR, Multiplex PCR

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้เทคนิค Duplex PCR และ Multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ 16s rRNA ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำนมสัตว์แต่ละชนิด โดยน้ำนมกระบือมีดีเอ็นเอขนาด 220 bp น้ำนมโคมีดีเอ็นเอขนาด 256 bp และน้ำนมแพะมีดีเอ็นเอขนาด 326 bp ผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถใช้เทคนิค Duplex PCR และ Multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือและตรวจการปลอมปนได้ที่ระดับต่ำสุด 0.1 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: น้ำนมกระบือ น้ำนมโค น้ำนมแพะ Duplex PCR Multiplex PCR

[1*] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kampheang Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900, Thailand.

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

[3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Animal Produce Research and Development Center, Suwanvajokkasikit Animal Research and Development Institute, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[*]Corresponding author: Tel.08-96815759, E-mail address: piyatida_ng@hotmail.com

คำนำ

ปัจจุบันการบริโภคน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกและพฤติกรรมการบริโภคที่เปลี่ยนไป ในต่างประเทศพบว่ามีการบริโภคน้ำนมกระบือมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากน้ำนมโค (Olivia *et al., 2010*) เนื่องจากน้ำนมกระบือมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมโค เช่น ไขมันสูง แต่มีคอเรสเตอรอลต่ำ โปรตีน ฟอสฟอรัส และสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโทโคฟีรอล (tocopherol) สูงเหมาะสำหรับผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ เช่นเดียวกับปริมาณวิตามินเอในน้ำนมกระบือจะพบปริมาณสูงกว่าน้ำนมโคและน้ำนมแพะ เนื่องจากสารแคโรทีน(carotene) ถูกเปลี่ยนเป็นวิตามินเอเกือบทั้งหมด จึงทำให้น้ำนมกระบือมีสีขาวข้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำนมชนิดอื่น

ประเทศไทยนิยมบริโภคน้ำนมกระบือน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำนมโคและน้ำนมแพะ เนื่องจากข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเกี่ยวกับน้ำนมกระบือ เช่น ข้อมูลด้านองค์ประกอบของน้ำนม (โปรตีน ไขมัน ของแข็งทั้งหมด ของแข็งไม่รวมไขมัน น้ำตาลแลคโตส) มีน้อย แต่อย่างไรก็ตามน้ำนมกระบือได้รับความสนใจมากขึ้นโดยเฉพาะผู้บริโภคชาวต่างประเทศที่นิยมบริโภคเนยแข็ง (cheese) และผู้บริโภคชาวไทยที่ใส่ใจสุขภาพ แต่จากปัญหาน้ำนมกระบือราคาแพงอาจทำให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการบางรายแอบผสมหรือปลอมปนน้ำนมชนิดอื่นลงไปในน้ำนมกระบือเพื่อเพิ่มปริมาณและผลกำไร ซึ่งถือว่าเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย เพราะนอกจากเป็นการหลอกลวงผู้บริโภคแล้วยังอาจส่งกระทบต่อสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น การแพ้โปรตีนบางชนิดในน้ำนม รวมถึงข้อจำกัดทางศาสนาหรือกฎระเบียบของแต่ละประเทศ (Lopez-Calleja *et al*., 2005a) การติดฉลากจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ (Abdel and Ahmed, 2007) นอกจากนี้ยังมีหลายวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยเทคนิคอีไลซา (ELISA) มีการใช้อย่างกว้างขวางเพราะง่ายและสะดวกแต่ไม่นิยมสำหรับตรวจสอบอาหารที่ผ่านความร้อนหรือมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (Lopez-Calleja *et al*., 2005b) ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคด้านดีเอ็นเอ (DNA-based) มาใช้สำหรับการตรวจสอบชนิดของสัตว์ (species) เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร (Lopez-Calleja *et al*., 2007) สามารถบอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ รวมถึงการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) หรือโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) (อรรัตน์, 2548)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนในน้ำนม เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว โดยจะใช้เซลล์ร่างกาย (somatic cells) เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) หรือเซลล์เยื่อบุนม (epithelial mammary cells) เป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบ (Abdel and Ahmed, 2007) และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific) กับเซลล์หรือยีน (gene) ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ

Duplex PCR เป็นเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ส่วนเทคนิค Multiplex PCR จะใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 คู่ขึ้นไปในการทำ

ปฏิกิริยาพร้อมๆ กัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่จะได้รับการออกแบบให้จำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละตัวและไม่มีเบสคู่สมกลับมาจับกันเอง เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR จะต้องปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทุกตัวที่ใส่ลงไป Bottero *et al.* (2003) ใช้เทคนิค multiplex PCR จำแนกผลิตภัณฑ์เนยแข็ง (cheese) ที่ทำจากน้ำนมโค น้ำนมแพะ และน้ำนมแกะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนไมโตคอนเดรีย 12s และ16s rRNA พบว่าสามารถตรวจการปลอมปนได้ที่ระดับ 0.5% Lopez-Calleja *et al.* (2005a) ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมแกะทั้งน้ำนมดิบและน้ำนมที่ผ่านความร้อน โดยกำหนดไพรเมอร์เป้าหมายที่จำเพาะกับยีนไมโตคอนเดรีย 12s rRNA ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำนมแพะขนาด 122 bp และเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะได้ที่ระดับ 0.1% จากรายงานของ Mafra *et al.* (2007) ใช้เทคนิค duplex PCR ในการตรวจสอบน้ำนมโคในเนยแข็งที่ทำจากน้ำนมแพะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรีย 12s rRNA และเปรียบเทียบเชิงเส้นโค้งปกติระหว่างน้ำนมโคและเนยแข็งนมแพะ พบว่าสามารถตรวจพบน้ำนมโคในเนยแข็งนมแพะได้ที่ช่วง 1-60% และนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเนยแข็งนมแพะทางการค้าจำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่ามีการปลอมปนน้ำนมโคลงไปเนยแข็งนมแพะจำนวน 15 ตัวอย่าง และมี 3 ตัวอย่างที่ติดฉลากว่าเป็นน้ำนมแพะแท้ ศศิธรและคณะ (2553) ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในผลิตภัณฑ์น้ำนมแพะ โดยใช้ไพรเมอร์เป้าหมายที่มีความจำเพาะกับยีนไมโตคอนเดรีย 12s rRNA ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำนมโคขนาด 223 bp พบว่าสามารถตรวจพบการปลอมปนของน้ำนมโคในน้ำนมแพะดิบในระดับที่เข้มข้นที่สุด 0.1% และจากการศึกษาผลิตภัณฑ์น้ำนมแพะในท้องตลาดของประเทศไทยพบว่ามี 3 จาก 9 ตัวอย่าง ที่พบการปลอมปนของน้ำนมโคในผลิตภัณฑ์น้ำนมแพะ และ Sachinandan *et al.* (2011) ใช้เทคนิค simplex PCR และ duplex PCR ในการจำแนกชนิดน้ำนมจากโค กระบือ และเนยแข็งที่ทำจากน้ำนมกระบือ โดยใช้ยีนจากไมโตคอนเดรีย DNA D loop ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำนมโคขนาด 126 bp และแถบดีเอ็นเอของน้ำนมกระบือขนาด 226 bp พบว่าสามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคที่ระดับ 0.1% เช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังที่จะศึกษาประสิทธิภาพการใช้เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือเพื่อเป็นประโยชน์ของข้อมูลทางวิชาการสามารถนำไปประยุกต์ให้เกิดงานวิจัยชิ้นใหม่ๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ

แบ่งการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน

1. การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค duplex PCR โดยเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคดิบและน้ำนมกระบือดิบแบ่งเป็น 7 ตัวอย่างได้แก่ น้ำนมกระบือ 100%, น้ำนมโค 100%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโค 50%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโค 10%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโค 1%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโค 0.5% และน้ำนมกระบือผสมน้ำนมโค 0.1%

2. การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค duplex PCR โดยเตรียมตัวอย่างน้ำนมแพะดิบและน้ำนม

กระบือดิบ แบ่งเป็น 7 ตัวอย่างได้แก่ น้ำนมกระบือ 100%, น้ำนมแพะ 100%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมแพะ 50%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมแพะ 10%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมแพะ 1%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมแพะ 0.5% และน้ำนมกระบือผสมน้ำนมแพะ 0.1%

3. การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค multiplex PCR โดยเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคดิบ น้ำนมแพะดิบและน้ำนมกระบือดิบ แบ่งเป็น 9 ตัวอย่างได้แก่ น้ำนมกระบือ 100%, น้ำนมโค 100%, น้ำนมแพะ 100%, น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 33% (1:1:1), น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 50% (2:1:1), น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 10% (18:1:1), น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 1% (99:0.5:0.5), น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 0.5% (99.5:0.25:0.25), น้ำนมกระบือผสมน้ำนมโคและน้ำนมแพะ 0.1% (99.9:0.05:0.05)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำนมโค น้ำนมแพะและน้ำนมกระบือ

ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNA Trap II จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี อาคารศูนย์เทคโนโลยี-ดีเอ็นเอและจีโนมิคส์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยนำตัวอย่างน้ำนมที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (µl) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร (ml) เติม trapping buffer 400 µl ลงในแต่ละหลอดตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม extraction buffer 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ให้ตะกอนแตกตัวจนหมด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม washing buffer I 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม washing buffer II 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าของเหลวจะระเหยออกจากตะกอนจนหมด จากนั้นเติม elution buffer 100 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 30 นาที (เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมา) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 วินาที แล้วจึงดึงส่วนใสที่เป็นดีเอ็นเอใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอต่อไป

3.การตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยผสมดีเอ็นเอ 2 µl กับ TE dye 2 µl ให้เข้ากัน และนำไปตรวจสอบพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น 3 µl โดยผ่านตัวกลาง คือ 0.8% อะกาโรส ใน 0.5X TBE buffer (40 mM Tris base, 20 mM aetate, 2 mM EDTA, pH 8) ผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ lambda 20 ng/µl

4. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอตัวอย่างน้ำนมที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ไพรเมอร์ ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรียของโค แพะและกระบือ (Table 1) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์

โดย 1 ปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 60 ng 1 µl, 1 mM primer (forward และ reverse) 0.5 µl ,10X Taq buffer (20 mM buffer + KCL) 1 µl, 25mM $MgCl_2$ 1 µl, 1 mM dNTP 2 µl, *Taq* DNA polymerase (5U/µl) 0.4 µl และ dH_2O ปริมาตรรวม 10 µl

หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติซึ่งมีอุณหภูมิและเวลาต่างๆ ในแต่ละขั้นตอน คือ initail denaturation 95 °C เวลา 1 นาที, denaturation 94 °C เวลา 5 นาที, annealing 62 °C เวลา 1 นาที, extension 72 °C เวลา 1 นาที และ final extension 72 °C เวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ

Table 1 Oligonucleotides used as PCR primers

Species	Oligonucleotide primers	Amplicons (bp)	Reference
Buffalo (*Bubalus bubalis*)	12SM-FW :** 5' CTA GAG GAG CCT GTT CTA TAA TCG ATA A 3' 12SBUF-REV2 : 5' TTC ATA ATA ACT TTC GTG TTG GGT GT 3'	220	Lopez-Calleja *et al.* (2005b)
Goat (*Capra hircus*)	Sense 144 : 5' CGC CCT CCA AAT CAA TAA G 3' Antisense 469 : 5' AGT GTA TCA GCT GCA GTA GGG TT 3'	326	Bottero *et al.* (2003)
Cow (*Bos Taurus*)	Sense 916 : 5' GTA CTA CTA GCA ACA GCT TA 3' Antisense 1171 : 5' GCT TGA TTC TCT TGG TGT AGA G 3'	256	

** 12SM-FW primer to be common to buffalo cow and goat.

5. การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ

หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ผสมดีเอ็นเอกับ sequencing dye (10 mM EDTA pH 8.0, 98% formamide, 0.025% bromophenol blue และ 0.025% xylene cyanol) 2 µl ให้เข้ากัน แล้วนำไปตรวจสอบขนาดพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว (ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ คือ 100 bp ladder) โดยในแต่ละ lane จะใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 5 µl โดยผ่านตัวกลาง คือ 2% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลาย etidium bromide นาน 10 นาที และแช่ในน้ำ 10 นาที เพื่อล้าง etidium bromide ส่วนเกินออก จากนั้นถ่ายรูปเพื่อนำไปประมาณขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลและวิจารณ์

1. การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค duplex PCR

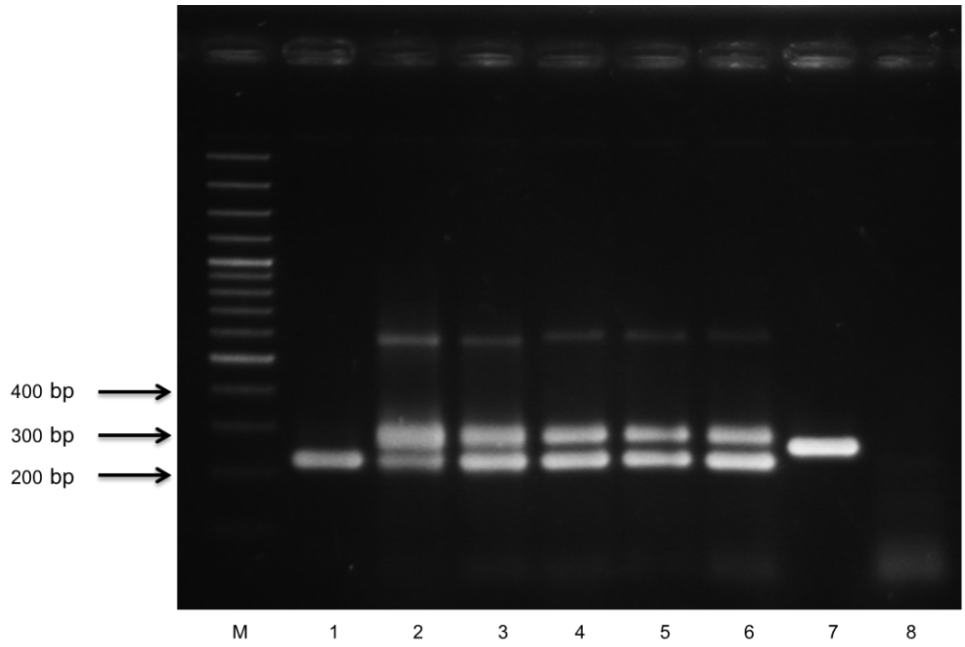

Figure 1 Duplex PCR analyses of buffalo milk with the addition of cow milk at the rate of 0.1-50%: 1; 100% buffalo milk, 2; 50% cow milk, 3; 10%, 4; 1%, 5; 0.5%, 6; 0.1%, 7; 100% cow milk, 8; negative control and M; molecular weight marker.

Figure 1 แสดงการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในน้ำนมกระบือด้วยเทคนิค duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรียของโคและกระบือซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงใน table 1 หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำไปตรวจสอบขนาดพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดด้วย 2 % อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที พบว่าใน lane M (ช่องแรก) คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยมีขนาดตั้งแต่ 100-1,000 bp ใน lane ที่ 1 คือ น้ำนมกระบือ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 220 bp และ lane ที่ 7 คือ น้ำนมโค 100% มีดีเอ็นเอขนาด 256 bp ส่วน lane ที่ 2-6 คือ น้ำนมกระบือผสมกับน้ำนมโคที่ระดับปริมาณที่ต่างกัน คือ 50, 10, 1, 0.5 และ 0.1% ตามลำดับ ทำให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอทั้งสองแตกต่างกันไปตามระดับปริมาณน้ำนมโคที่ผสมลงไป โดย lane 2 จะมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอทั้งสองใกล้เคียงน้ำนมกระบือและน้ำนมโค 100% ส่วน lane 6 จะพบว่าแถบดีเอ็นเอของน้ำนมโค (แถบบน) จางเมื่อเทียบกับน้ำนมโค 100% (lane 7) เนื่องจากใน lane 6 จะมีการผสมน้ำนมโคลงไปในน้ำนมกระบือเพียง 0.1%

จากผลการทดลองจะพบแถบดีเอ็นเอบริเวณด้านบนแถบดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบใน lane 2-6 ขนาดประมาณ 600 bp อาจจะเนื่องมาจากไพรเมอร์ 2 คู่เกิดการจับกันเอง ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ หรืออาจจะเกิดจากไพรเมอร์ที่ใช้กับน้ำนมกระบือ คือ 12SM-FW ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ ไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด อาจเป็นไปได้ว่านอกจากไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอของน้ำนมกระบือแล้วยังจับกับดีเอ็นเอบางส่วนของน้ำนมโคอีกด้วย นอกจากนี้อุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ของการทำปฏิกิริยา PCR ยังมีผลในการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยในปฏิกิริยา PCR นั้นหากใช้อุณหภูมิต่ำไพร

เมอร์จะเข้ากับกับดีเอ็นเอต้นแบบแบบไม่จำเพาะเจาะจง (วัชรีและมนตรี, 2536) คือ ถึงแม้ว่าไพรเมอร์มีลำดับเบสไม่เหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมดก็ยังสามารถเข้าจับได้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็จะทำให้ไพรเมอร์ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบต้องมีความเหมือนกันหรือความจำเพาะเจาะจงกันมาก จึงจะสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและสามารถเพิ่มปริมาณได้ และจากผลการทดลองสามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคในน้ำนมกระบือได้ที่ระดับ 0.1% (lane 6)

2.การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค Duplex PCR

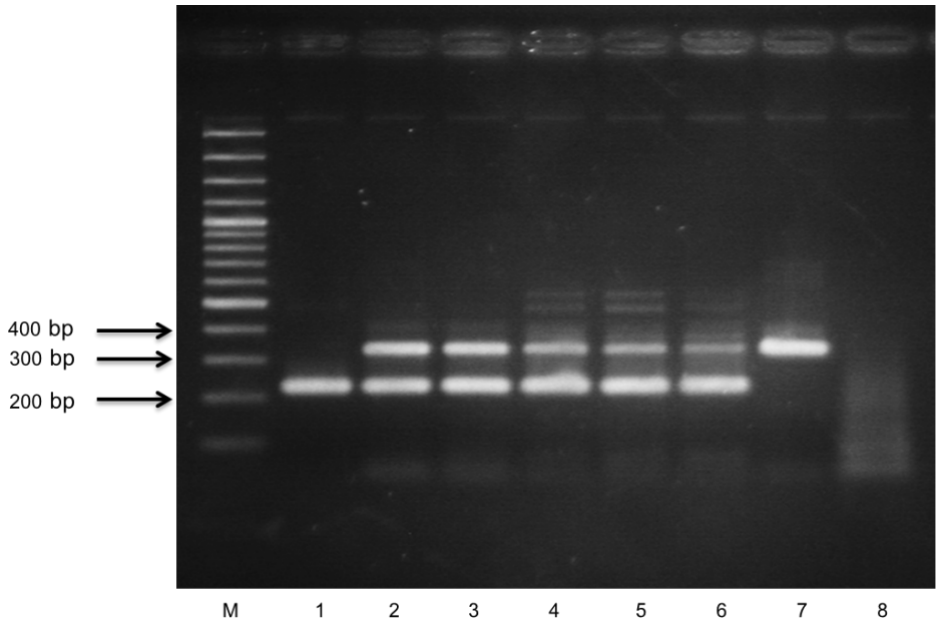

Figure 2 Duplex PCR analyses of buffalo milk with the addition of goat milk at the rate of 0.1-50%: 1; 100% buffalo milk, 2; 50% goat milk, 3; 10%, 4; 1%, 5; 0.5%, 6; 0.1%, 7; 100% goat milk, 8; negative control and M; molecular weight marker.

Figure 2 แสดงการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือด้วยเทคนิค duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรียของแพะและกระบือซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงใน table 1หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำไปตรวจสอบขนาดพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดด้วย 2 % อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที พบว่าใน lane M (ช่องแรก) คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยมีขนาดตั้งแต่ 100-1,000 bp lane ที่ 1 คือ น้ำนมกระบือ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 220 bp และlane ที่ 7 คือ น้ำนมแพะ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 326 bp ส่วน lane ที่ 2-6 คือ น้ำนมกระบือผสมกับน้ำนมแพะที่ระดับปริมาณที่ต่างกัน คือ 50, 10, 1, 0.5 และ 0.1% ตามลำดับ ทำให้ความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอทั้งสองแตกต่างกันไปตามระดับปริมาณน้ำนมแพะที่ผสมลงไป โดย lane 2 จะมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอทั้งสองใกล้เคียงน้ำนมกระบือและน้ำนมแพะ 100% ส่วน lane 6 จะพบว่าแถบดีเอ็นเอของน้ำนมแพะ (แถบบน) จางเมื่อเทียบกับน้ำนมแพะ 100% (lane 7) เนื่องจากใน lane 6 จะมีการ

ผสมน้ำนมแพะลงไปในน้ำนมกระบือเพียง 0.1% ซึ่งจากผลการทดลองสามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือได้ที่ระดับ 0.1% (lane 6)

3. การตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค multiplex PCR

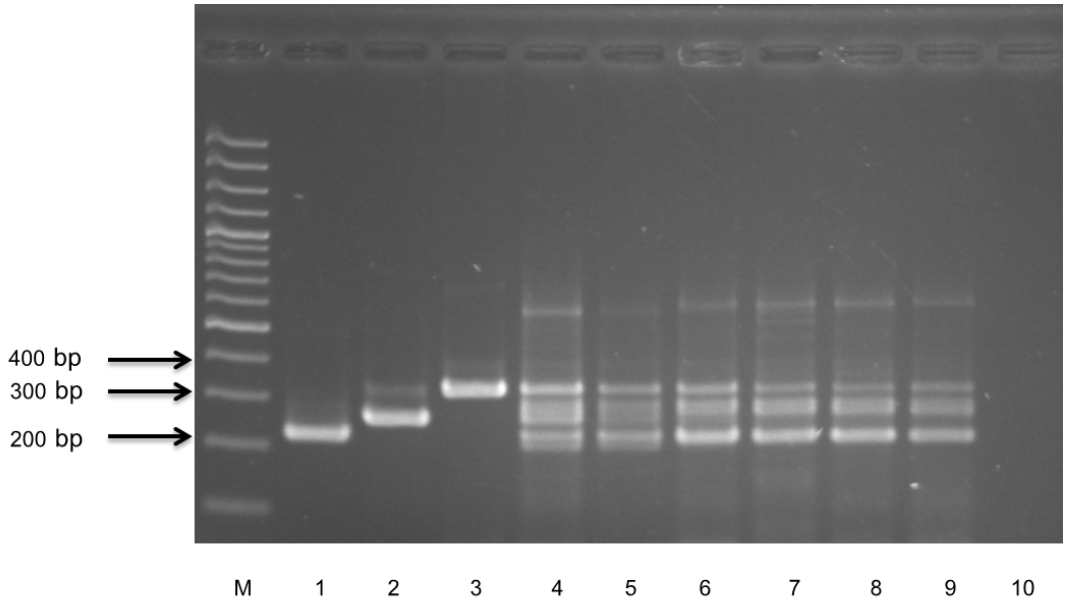

Figure 3 Multiplex PCR analyses of buffalo milk with the addition of cow and goat milk at the rate of 0.1-33%: 1; 100% buffalo milk, 2; 100% cow milk, 3; goat milk, 4; 33.3% (1:1:1), 5; 50% (1:1:2), 6; 10% (1:1:18), 7; 1% (0.5:0.5:99), 8; 0.5% (0.25:0.25:99.5), 9; 0.1% (0.05:0.05:99.9), 10; negative control and M; molecular weight marker.

Figure 3 แสดงการตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มาจากยีนไมโตคอนเดรียของโค แพะ และกระบือซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงใน Table 1 หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR นำไปตรวจสอบขนาดพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดด้วย 2 % อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ผ่านสนามไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที พบว่าใน lane M (ช่องแรก) คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยมีขนาดตั้งแต่ 100-1,000 bp ใน lane ที่ 1 คือ น้ำนมกระบือ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 220 bp ใน lane ที่ 2 คือ น้ำนมโค 100% มีดีเอ็นเอขนาด 256 bp และ lane 3 คือ น้ำนมแพะ 100% มีดีเอ็นเอขนาด 326 bp ส่วน lane ที่ 4-9 คือ น้ำนมกระบือผสมกับน้ำนมโคและน้ำนมแพะที่ระดับปริมาณที่ต่างกัน คือ 33.3% (1:1:1),50% (2:1:1), 10% (18:1:1), 1% (99:0.5:0.5), 0.5% (99.5:0.25:0.25) และ 0.1% (99.9:0.05:0.05) ทำให้ความเข้มของแถบดีเอ็นเอทั้งสามแตกต่างกันไปตามระดับปริมาณน้ำนมโคและน้ำนมแพะที่ผสมลงไปในน้ำนมกระบือ

จากผลการทดลองจะพบว่าแถบดีเอ็นเอของน้ำนมกระบือ 100% (lane 1), น้ำนมโค 100% (lane 2) และน้ำนมแพะ 100% (lane 3) เข้มกว่าแถบดีเอ็นเอของน้ำนมกระบือ น้ำนมโคและน้ำนมแพะที่ผสมตั้งแต่ lane ที่ 4-9 อาจจะ

เนื่องมาจากอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ยังมีผลในการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งในปฏิกิริยาพีซาอาร์นั้นหากใช้อุณหภูมิต่ำไพรเมอร์จะเข้ากับกับดีเอ็นเอต้นแบบแบบไม่จำเพาะเจาะจง (วัชรีและมนตรี, 2536) คือ ถึงแม้ว่าไพรเมอร์มีลำดับเบสไม่เหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมดก็ยังสามารถเข้าจับได้ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็จะทำให้ไพรเมอร์ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบต้องมีความเหมือนกันหรือความจำเพาะเจาะจงกันมาก จึงจะสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและสามารถเพิ่มปริมาณได้ จึงทำให้การเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของน้ำนมทั้งสามใน lane ที่ 4-9 อาจจะไม่จำเพาะเจาะจง 100% ก็เป็นได้ และจากผลการทดลองสามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือโดยเทคนิค multiplex PCR ได้ที่ระดับ 0.1% (lane 9) คือ มีการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบืออย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์

สรุป

เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR สามารถตรวจสอบการปลอมปนน้ำนมโคและน้ำนมแพะในน้ำนมกระบือได้ที่ระดับการปลอมปน 0.1% ทั้งสองเทคนิค

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตผลจากสัตว์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและวิจัยผลิตผลปศุสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เอกสารอ้างอิง

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 208 น.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 95 น.

ศศิธร นาคทอง, พนิตา ชัยสิทธิ์, พรทิพย์ แต้ภักดี และพิศักด์ พัดทอง. 2553. การตรวจสอบการปลอมปนนมโคในผลิตภัณฑ์นมแพะโดยเทคนิค PCR. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(2) : 283-290.

Abdel-Rahman, S.M. and M.M.M. Ahmed. 2007. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR–RFLP techniques.Food Control. 18 : 1246–1249.

Bottero, M.T., T. Civera, D. Nucera, S. Rosati, P. Sacchi and R.M. Turi. 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. International Dairy Journal. 13 : 277–282

Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P. E. Hernandez, T. Garcia, and R. Martin. 2005a. Application of

Polymerase Chain Reaction to Detect Adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk. Journal of Dairy Science. 88 : 3115–3120.

Lopez-Calleja, I. Gonzalea, V. Fajardo, M.A. Rodriguez, P.E. Hernandez, T. Garcia and R. Martin. 2005b. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. International Dairy Journal. 15 : 1122-1129

Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo, I. Martin, P.E. Hernandez, T. Garcia and R. Martin. 2007. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. International Dairy Journal. 17 : 729–736

Mafra, I., A. Roxo, I.M.P.L.V.O. Ferreira and M.B.P.P. Oliveira. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. International Dairy Journal. 17 : 1132–1138

Olivia, M., S. Ahmad, F. Rousseau, V. Briard-Bion, F. Gaucheron and C. Lopez. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential compositions in total fatty acids, and in polar lipids from the milk fat globule membrane. Food Chemistry. 120 : 544–551

Sachinandan D., B. Brahma, S. Polley, A. Mukherjee, D. Banerjee, M. Gohaina, K. P. Singh, R. Singh, T. K. Datta and S. L. Goswami. 2011. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control. 22 : 690-696.

Received 5 February 2013

Accepted 17 June 2013