บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

งานค้นคว้าแบบอิสระครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีนไซโตโครม บี จากตัวอย่างไก่และตัวอย่างสัตว์อีก 5 ชนิด ได้แก่ มนุษย์ ปลา หมู วัว และเป็ด การใช้เทคนิค PCR ดังกล่าวต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง forward primer และ reverse primer ให้เหมาะสม คือ มีขนาด 20 - 24 bp มีองค์ประกอบของเบสกัวนีน (G) และเบสไซโทซีน (C) อยู่ระหว่าง 40 - 60 % โดยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรจะมีส่วนประกอบของเบสกัวนีนและเบสไซโทซีนที่เท่ากันเพื่อให้ค่าของอุณหภูมิการหลอมเหลว (Melting temperature; T_m) เท่ากันหรือใกล้เคียงกันที่สุดและไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลายสองข้างเป็นคู่สมกันทั้งภายในไพรเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กัน เนื่องจากชนิดของไพรเมอร์ดังกล่าวจะเกิดการจับตัวกันเอง

ในการศึกษาผู้ศึกษาได้ทำการออกแบบลำดับเบสของไพรเมอร์เองโดยดัดแปลงมาจากงานของ Matsunaga, *et al.* (1999) ที่มีการใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน (Multiplex PCR) แต่มีการปรับเปลี่ยนลำดับเบสบางตัวให้ตรงกับยีนไซโตโครม บี ของไก่ และได้ตัดเบสบางตัวออกไปให้เหลือเพียง 20 bp เพื่อให้ปลาย 3' เป็นเบส GC ทำให้ forward primer ที่ได้ คือ ตำแหน่ง L 14962 (5'- GCCCCATCCAACATCTCTGC -3') จากนั้นนำ forward primer ดังกล่าวไปเข้าโปรแกรม Primer 3 เพื่อให้ออกแบบ reverse primer ซึ่งโปรแกรมจะทำการออกแบบ reverse primer หลายชุด แต่จากการเปรียบเทียบค่า GC % ค่า T_m และตัวเบสที่เป็นคู่สมกันทั้งภายในไพรเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันแล้ว ทำให้ได้ reverse primer ที่ตำแหน่ง H 15142 (5'- GGAGATTCCGGATGAGTCAG -3') และเมื่อใช้ไพร์เมอร์คู่นี้จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 181 bp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนไซโตโครม บี ของไก่แล้ว จะนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้กับตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของไก่พันธุ์เนื้อจำนวน 45 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลของ PCR products โดยการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ผลที่ได้ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ชัดเจนขนาดประมาณ 181 bp จากนั้นก็ได้นำวิธีการดังกล่าวไปทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ มนุษย์ ปลา หมู วัว และเป็ดชนิดละ 25 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของสัตว์ทั้ง 5 ชนิด ไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR เลย แสดงว่าวิธีการที่ใช้สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่เท่านั้น

แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้สามารถที่จะประเมินถึงประสิทธิภาพของวิธีการได้เป็นอย่างดี แต่ในการนำไปใช้ในกรณีการเกิดข้อพิพาททางกฎหมาย พยานหลักฐานทางชีวภาพที่ส่งตรวจอาจเป็นเพียงเศษของคราบเลือด เส้นผม เส้นขน เนื้อเยื่อ กระดูก อวัยวะ หรือคราบอสุจิเท่านั้น การตรวจสอบทางกายภาพคงไม่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์บุคคล หรือชนิดของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าของตัวอย่างพยานหลักฐานทางชีวภาพนั้นได้ เนื่องจากว่าพยานหลักฐานนั้นมีปริมาณที่น้อยมาก ดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี จึงมีบทบาทอย่างมากในการช่วยตรวจสอบ ในกรณีนี้อาจนำเทคนิค Multiplex PCR หรือ Nested PCR เข้ามาช่วยเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบโดยไม่ลดความจำเพาะของตัวอย่างและผลผลิตของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จะมีจำนวนมากขึ้นตามต้องการ แต่เทคนิคนี้มีข้อเสีย คือ จะเสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลา เนื่องจากจะต้องใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ และอาศัยการทำ PCR ถึง 2 ครั้ง ทำให้มีโอกาสในการเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย

กรณีของการตรวจสอบคุณภาพอาหาร การปนเปื้อนอาหาร และการปลอมปนอาหารที่ผิดกับกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค บางครั้งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจมีรูปแบบที่แตกต่างกันไป อีกทั้งสัดส่วนปริมาณการปนเปื้อนที่มากหรือน้อยไม่ทราบได้ ในการทดลองควรออกแบบให้มีความหลากหลายของสภาวะ เช่น การตรวจดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อดิบและชิ้นเนื้อที่ถูกทำให้สุกในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน หรือใช้เทคนิค Real-Time PCR มาทำการตรวจสอบ ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในเวลาต่างๆ ทำให้ทราบส่วนผสมของชนิดเนื้อสัตว์ รวมถึงปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์ชนิดอื่นได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved