การพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณร้อยละของขนสัตว์ปีกปนในอาหารโค
ด้วยเทคนิค digital Polymerase Chain Reaction

ธงไชย ดิษฐประชา ธญานี ปาณพิมลวัฒน์ เกรียงไกร เกื้อกูล ยุพา จันทร์คำทรัพย์ พงษ์เทพ เวียงวะลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณร้อยละของขนสัตว์ปีกปนในอาหารโคด้วยเทคนิค digital Polymerase Chain Reaction พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือการบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ให้ผล real time PCR ที่ Ct ดีที่สุด และจากการใช้สภาวะดังกล่าวที่ในสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ผสมระหว่างขนสัตว์ปีกปนกับอาหารโคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการผสมสารพันธุกรรมเป้าหมายกับเมทริกซ์ซึ่งในที่นี้คือสารพันธุกรรมที่สกัดจากอาหารโคโดยตรง กับการสกัดจากขนสัตว์ปีกปนที่แยกได้หลังจากการผสมลงในอาหารโค พบว่าทั้งสองกรณีให้ผลร้อยละของขนสัตว์ปีกปนไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจอยู่ที่ขั้นตอนของการสกัดสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ต้องการหา ซึ่งคือสารพันธุกรรมของไก่อาจมีจำนวนน้อยหรือไม่สมบูรณ์ จึงควรศึกษาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน และเป็น by-product ซึ่งอาจมีจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายอยู่เป็นจำนวนน้อย

คำสำคัญ: ขนสัตว์ปีกปน อาหารโค digital Polymerase Chain Reaction

Method development for quantitative in percentage of poultry feather meal in bovine feed by digital Polymerase Chain Reaction

Thongchai Ditpracha Tayanee Panapimonlawat Kriangkrai Kuakoon Pongtap Wiangwalai Yupa Jankamsab

Absract

The objective of this study is to develop methods for quantifying the percentage of poultry feather meals in bovine feed by digital Polymerase Chain Reaction. The optimal extraction condition is incubated at 60°C periods 16 hours. This condition has yielded the best real-time PCR results at Ct. Using this condition to extract genetic material from samples mixed with feather meal and bovine feed at various concentrations, compared the target genetic material mixture with the matrix, in this case, genetic material extracted directly from bovine feed, with the extraction from poultry feather meal isolated after mixing into bovine feed. The results showed inconsistent results in the percentage of poultry feather meals in both cases. This may be due to the extraction process of the target genetic material, as poultry genetic material may contain only a small amount or be incomplete. Therefore, it is necessary to study the method for extracting genetic material from heat-treated samples as a by-product, which may contain a small amount of target genetic material.

Keywords: Poultry feather meal, Bovine feed, digital Polymerase Chain Reaction

บทนำ

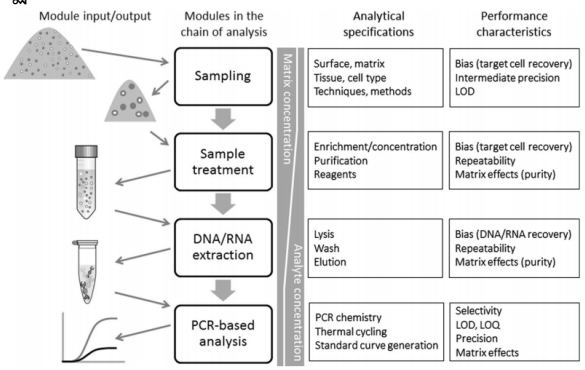
อาหารโคที่มีการผสมขนสัตว์ปีกป่น

ขนสัตว์ปีกป่น หมายความว่า ขนสัตว์จำพวก นก ไก่ เป็น ห่านป่น ที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารสัตว์ และจะต้องทำขึ้นตามกระบวนการย่อยภายใต้ความดันอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม และตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบ พ.ศ. 2558 กำหนดข้อจำกัดในการใช้ของขนสัตว์ปีกป่นที่จะใช้เป็นสูตรในการผลิตอาหารสัตว์ ให้ใช้ได้ไม่เกินร้อยละของน้ำหนักอาหารสัตว์ ซึ่งในอาหารโคมีข้อจำกัดการใช้ตามอายุของโคดังนี้

ระยะ	ให้ใช้เป็นสูตรในการผลิตอาหารสัตว์ไม่เกินร้อยละของน้ำหนักอาหารสัตว์
โคแรกเกิดถึงอายุ 3 เดือน	3
โคอายุเกิน 3 เดือน ถึง 6 เดือน	2
โคอายุเกิน 6 เดือน ถึง 1 ปี 6 เดือน	3
โคอายุเกิน 1 ปี 6 เดือน ขึ้นไป	5
โคระยะอุ้มท้องและระยะให้นม	5

หลักการของ digital Polymerase chain reaction

วิธีการวิเคราะห์สารพันธุกรรมมีการนำมาใช้วิเคราะห์กันอย่างแพร่หลาย หนึ่งในนั้นคือวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้ในการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมเป้าหมายที่มีความจำเพาะ วิธี Quantitative real-time PCR (qPCR) ใช้วิธีการทางพลศาสตร์ระหว่างกระบวนการ amplification (Higuchi *et al.,* 1992) โดยเฝ้าดูกระบวนการแบบ real-time จากสัญญาณการเรืองแสงในระหว่างกระบวนการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมาย สัญญาณดังกล่าวเกิดจากโพรบที่ติดสี fluorescent (Rasmussen *et al.,* 1998) หรือการปลดปล่อยแสงจากปฏิกิริยา (Morrison *et al.,* 1998)



ภาพที่ 1 กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และ performance characteristic ของวิธีในแต่ละขั้นตอน (ที่มา Hedman et. al, 2018)

Digital PCR (dPCR) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งทาง PCR แต่มีความแตกต่างจาก qPCR ตรงที่แต่ละปฏิกิริยาจะถูกแบ่งออกเป็น partition จำนวนเล็กๆ ตั้งแต่ 500 จนถึงเป็นล้าน partition ในแต่ละ partition ของปฏิกิริยาจะมีปริมาณน้อยมาก ตั้งแต่ 6 นาโนลิตรจนถึง 2-3 พิโคลิตร เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR แต่ละ partition จะให้ผลเป็นบวกหรือลบ (binary หรือ digital read-out) จากนั้นจะคำนวณปริมาณของ DNA เป้าหมายในตัวอย่างได้

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมของขนสัตว์ปีกป่นโดยใช้สารพันธุกรรมของไก่เป็นตัวแทน และศึกษาการตรวจหาปริมาณร้อยละของของขนสัตว์ปีกป่นในอาหารโคด้วยเทคนิค digital PCR

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมของไก่จากขนสัตว์ปีกป่น

1.2 เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของไก่ด้วยเทคนิค digital polymerase chain reaction (dPCR) และคำนวณร้อยละของน้ำหนักขนสัตว์ปีกป่นในอาหารโค

2. ขอบข่าย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดขนสัตว์ปีกป่น และหาปริมาณสารพันธุกรรมของไก่ในอาหารโคด้วยเทคนิค dPCR

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างที่มีขนสัตว์ปีกป่น สำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณร้อยละน้ำหนักของขนสัตว์ปีกป่นในอาหารโค

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง digital PCR ยี่ห้อ QIAGEN รุ่น QIAcuity One (QIAGEN, Germany)

4.1.2 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop) (Eppendorf, Germany)

4.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Eppendorf, Germany)

4.1.4 เครื่องผสมอาหารสัตว์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบบ 3D mixer

4.1.5 Heating block (Techne, UK)

4.1.6 Micropipette ขนาด 1-10, 10-100, 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany)

4.1.7 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorf, Germany)

4.1.8 QIAcuity nanoplate 26k ชนิด 24 หลุม (QIAGEN, Germany)

4.1.9 เครื่อง Real-time PCR ยี่ห้อ Roche รุ่น LightCycler® 480 II (Roche, Germany)

4.2 สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

4.2.1 Isopropanol, molecular biology grade (Merck, USA)

4.2.2 Ethanol, molecular biology grade (Merck, USA)

4.2.3 Chloroform, AR grade (Merck, USA)

4.2.4 High Pure PCR Template Preparation kit for DNA extraction (Roche, Germany)

4.2.5 QIAcuity Probe PCR Kit (QIAGEN, Germany)

4.2.6 Foodproof® SL Chicken Species Detection Kit (Biotecon Diagnostics, Germany)

4.2.7 Primers และ Probe ที่จำเพาะต่อยีน TGF-β_3 ของไก่ (Biosearch Technologies, USA)

5. วิธีดำเนินการ

5.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมจากขนสัตว์ปีกป่น

ชั่งขนสัตว์ปีกป่นจำนวน 25 มิลลิกรัม ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมจากขนสัตว์ปีกป่น แล้วนำมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป High pure PCR template preparation kit (Roche, Germany) ตามตารางที่ 1 ซึ่งจะศึกษาปัจจัยโดยการเปลี่ยนแปลง 3 สภาวะได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เวลาที่ใช้ในการบ่ม และการเติม chloroform 500 ไมโครลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต่อจากขั้นตอนที่ 2

จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการสกัดสารพันธุกรรมในแต่ละสภาวะมาวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop) เพื่อเปรียบเทียบและหาสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 วิธีสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ High pure PCR template preparation kit

<table>
<tr><th>ขั้นตอนที่</th><th>วิธีสกัดสารพันธุกรรม</th></tr>
<tr><td>1</td><td>ชั่งตัวอย่าง 25 มิลลิกรัมลงในหลอด microtube</td></tr>
<tr><td>2.</td><td>เติม tissue lysis buffer 200 ไมโครลิตร และ proteinase K 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex</td></tr>
<tr><td>3.</td><td>บ่มด้วยเครื่อง Heating block ตามสภาวะที่ต้องการศึกษา ดังนี้
<table>
<tr><th>สภาวะที่ (condition)</th><th>อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)</th><th>ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)</th></tr>
<tr><td>A1</td><td>37</td><td>1</td></tr>
<tr><td>A2</td><td></td><td>-----> 4</td></tr>
<tr><td>A3</td><td></td><td>----------> 16</td></tr>
<tr><td>A4</td><td></td><td>----------> 24</td></tr>
<tr><td>B1</td><td>55</td><td>1</td></tr>
<tr><td>B2</td><td></td><td>-----> 4</td></tr>
<tr><td>B3</td><td></td><td>----------> 16</td></tr>
<tr><td>B4</td><td></td><td>----------> 24</td></tr>
<tr><td>C1</td><td>60</td><td>1</td></tr>
<tr><td>C2</td><td></td><td>-----> 4</td></tr>
<tr><td>C3</td><td></td><td>----------> 16</td></tr>
<tr><td>C4</td><td></td><td>----------> 24</td></tr>
<tr><td>D1</td><td>65</td><td>1</td></tr>
<tr><td>D2</td><td></td><td>-----> 4</td></tr>
<tr><td>D3</td><td></td><td>----------> 16</td></tr>
<tr><td>D4</td><td></td><td>----------> 24</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>4.</td><td>เมื่อครบเวลาในแต่ละสภาวะ เติม Chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้ว invert tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 x g นาน 5 นาที เก็บส่วนใส ในขั้นตอนนี้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการมีขั้นตอนการเติม chloroform (CH) กับไม่มีขั้นตอนดังกล่าว</td></tr>
<tr><td>5.</td><td>เติม Binding buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex</td></tr>
<tr><td>6.</td><td>บ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง Heating block</td></tr>
<tr><td>7.</td><td>เมื่อครบเวลา เติม cold Isopropanol 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex</td></tr>
<tr><td>8.</td><td>ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน filter tube ที่วางบน collection tube หลอดที่ 1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 × g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง collection tube และสารที่ไหลผ่าน
แล้วนำ filter tube ใส่เข้ากับ collection tube หลอดที่ 2</td></tr>
<tr><td>8.</td><td>เติม Inhibitor removal 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 × g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง collection tube และสารที่ไหลผ่าน แล้วนำ filter tube ใส่เข้ากับ collection tube หลอดที่ 3</td></tr>
<tr><td>9.</td><td>เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 × g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งสารที่ไหลผ่าน filter tube และทำขั้นตอนที่ 7 ซ้ำอีกครั้ง</td></tr>
<tr><td>10.</td><td>นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 × g เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อปั่นแห้ง</td></tr>
<tr><td>11.</td><td>ย้าย filter tube ไปใส่ในหลอด microcentrifuge</td></tr>
<tr><td>12.</td><td>เติม elution buffer (ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส) 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 × g เป็นเวลา 1 นาที</td></tr>
<tr><td>13.</td><td>วัดปริมาณ DNA ของตัวอย่างที่สกัดได้ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260})</td></tr>
</table>

5.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมขนสัตว์ปีกป่น

นำอาหารโคมาตรวจหาสารพันธุกรรมของไก่ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป foodproof® SL Chicken Species Detection Kit โดยวิธี Real-time PCR เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีส่วนประกอบของไก่ปนอยู่ จากนั้นนำขนสัตว์ปีกป่นมาผสมกับอาหารโคให้มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5% ตามตารางที่ 2 และนำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารสัตว์ แบบ 3D Mixer เป็นเวลา 150 นาที

ตารางที่ 2 ปริมาณขนสัตว์ปีกป่นและอาหารโคที่ใช้ผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (%w/w)	ขนสัตว์ปีกป่น (กรัม)	อาหารโค (กรัม)
0.05	0.005	9.995
0.10	0.010	9.990
0.50	0.050	9.950
1.00	0.100	9.900
5.00	0.500	9.500

5.3 การหาปริมาณของสารพันธุกรรมไก่ด้วยเทคนิค dPCR

5.3.1 การหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ด้วยการผสมสารพันธุกรรมที่สกัดได้โดยตรง

นำสารพันธุกรรมที่สกัดจากขนสัตว์ปีกป่นและอาหารโคมาผสมให้เข้ากัน ตามสัดส่วนความเข้มข้น 0.005, 0.10, 0.50, 1.00 และ 5.00% (v/v) และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารพันธุกรรมตามขั้นตอนที่ 5.3.3

5.3.2 การหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ด้วยการคัดแยกเฉพาะขนสัตว์ปีกป่นจากอาหารโค

นำอาหารโคที่ผสมขนสัตว์ปีกป่นที่ระดับ 5% (w/w) จากขั้นตอนที่ 5.2 มาคัดแยกออกเฉพาะขนสัตว์ปีกป่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำตัวอย่างขนสัตว์ปีกป่นที่แยกได้ทั้งหมดทำการสกัดโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 5.1

5.3.3 การหาปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค dPCR

นำอาหารโคผสมขนสัตว์ปีกป่นที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 มาสกัดโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 5.1 และทดสอบด้วยเทคนิค dPCR ใช้ชุด primers และ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีน TGF-β3 ของไก่ (ISO/TS 20224-4, 2020) ตามตารางที่ 3 โดยเตรียมน้ำยาปฏิกิริยา dPCR ตามส่วนผสมของน้ำยาในตารางที่ 4 และดูดน้ำยาที่เตรียมลงใน QIAcuity nanoplate 26k ชนิด 24 หลุม หลุมละ 35 ไมโครลิตร จากนั้นเติมตัวอย่างที่สกัดได้ หลุมละ 5 ไมโครลิตร สำหรับ no template control (NTC) ใช้การเติม DNase/RNase-free water 5 ไมโครลิตร แทนตัวอย่าง และ positive control เติมสารพันธุกรรมไก่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา dPCR ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 3 primers และ probe ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไก่

Name	DNA sequence	Length (bp)
Chicken-77bp-F	5′-CAGCTGGCCTGCCGGC-3′	77
Chicken-77bp-R	5′-GCCCAGTGGAATGTGGTATTCA-3′	
Chicken-77bp-P	5′-[FAM]-TGCCACTCCTCTGCACCCAGTGC-[BHQ1]-3′	

ตารางที่ 4 อัตราส่วนของน้ำยาสำหรับปฏิกิริยาของ dPCR

ส่วนผสมของน้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 reaction (ไมโครลิตร)
4X Probes PCR Master Mix	10
20X primer-probe mix	1
DNase/RNase-free water	24
DNA template	5
Total reaction volume	40

ตารางที่ 5 สภาวะในการทำปฏิกิริยา dPCR

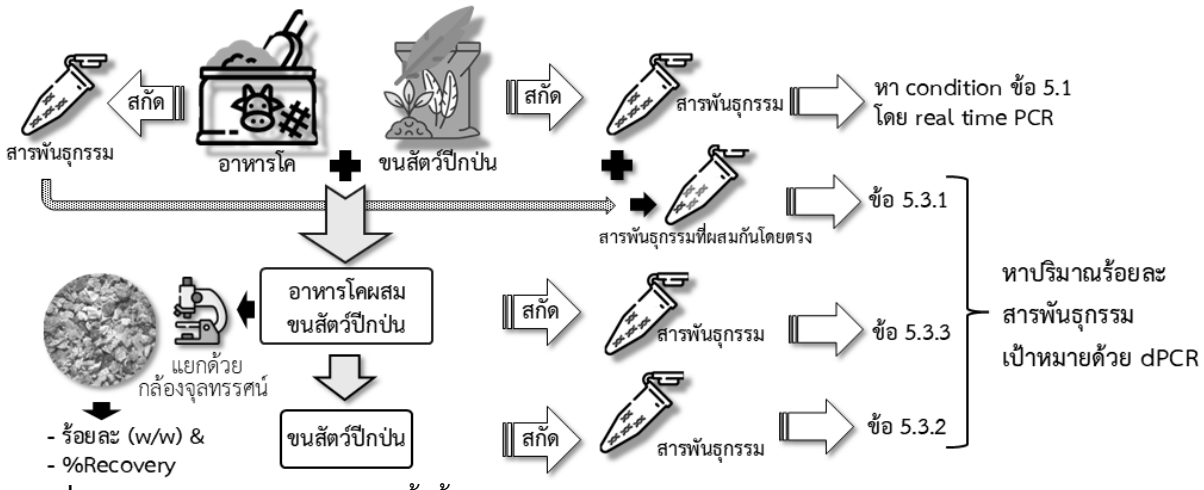
ขั้นตอน	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	จำนวนรอบ (cycles)
PCR initial activation	02:00	95	1
2-step cycling			
Denaturation	00:15	95	45
Annealing/Extension	00:30	60	

5.4 คำนวณสัดส่วนร้อยละของขนสัตว์ปีกป่นในตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลจาก dPCR

ในการคำนวณเทียบเป็นสัดส่วนร้อยละของน้ำหนัก เนื่องจาก dPCR ให้ผลเป็นจำนวน DNA copies จึงไม่ต้องมีการทำ calibration curve และสามารถนำมาใช้คำนวณโดยตรงได้ (Nesvadbova *et al*., 2023) โดยใช้สมการ (1)

$$\frac{Mean\ DNA\ copy\ number\ in\ an\ unknown\ sample}{Mean\ DNA\ copy\ number\ in\ a\ 100\%\ sample} \times 100 \qquad (1)$$

โดยจะนำค่า DNA copies ที่วัดได้จากตัวอย่างขนสัตว์ปีกป่น จำนวน 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยและนำค่าเฉลี่ยนั้นมาใช้ในการคำนวณหาสัดส่วนร้อยละของขนสัตว์ปีกป่นในตัวอย่างอาหารโค



ภาพที่ 2 ภาพรวมของการศึกษาในครั้งนี้

6. ผลการทดลอง

6.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมจากขนสัตว์ปีกปน

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพันธุกรรมจากขนสัตว์ปีกปน

Condition	รายละเอียด	DNA concentration (µg/mL)	A260/280	Threshold cycle (C_t)		
				Rep.1	Rep.2	Mean C_t ± SD
A1	37°C 1 ชั่วโมง	10.5, 12.0	1.79, 1.82	39.27	>40	-
A1(CH)	37°C 1 ชั่วโมง (CH)	10.1, 11,5	1.76, 1.92	35.98	36.42	36.20 ± 0.22
A2	37°C 4 ชั่วโมง	7.6, 9.4	1.76, 1.85	37.37	ND	-
A2(CH)	37°C 4 ชั่วโมง (CH)	10.9, 12.6	1.86, 1.89	35.91	> 40.00	-
A3	37°C 16 ชั่วโมง	16.3, 16.9	1.78, 1.80	37.28	ND	-
A3(CH)	37°C 16 ชั่วโมง (CH)	11.5, 16.7	1.73, 1,92	36.92	37.93	37.43 ± 0.51
A4	37°C 24 ชั่วโมง	7.8, 9.4	1.89, 2,37	> 40.00	ND	-
A4(CH)	37°C 24 ชั่วโมง (CH)	9.8, 11.1	1.64, 2.02	37.83	39.63	38.73 ± 0.09
B1	55°C 1 ชั่วโมง	9.8, 11.1	1.72, 1.85	38.67	> 40	-
B1(CH)	55°C 1 ชั่วโมง (CH)	11.3, 13.8	1.78, 1.82	37.67	37.73	37.70 ± 0.03
B2	55°C 4 ชั่วโมง	12.5, 13.9	1.69, 1.75	38.29	> 40	-
B2(CH)	55°C 4 ชั่วโมง (CH)	11.3, 18.0	1.68, 1.87	37.48	38.12	37.80 ± 0.32
B3	55°C 16 ชั่วโมง	12.2, 17.0	1.61, 1.71	37.47	38.12	37.80 ± 0.33
B3(CH)	55°C 16 ชั่วโมง (CH)	10.1, 18.3	1.82, 1.87	36.97	37.09	37.03 ± 0.06
B4	55°C 24 ชั่วโมง	8.2, 8.8	1.50, 1.77	39.14	39.57	39.36 ± 0.22
B4(CH)	55°C 24 ชั่วโมง (CH)	10.1, 11.7	1.61, 1.88	37.00	39.49	38.25 ± 1.25
C1	60°C 1 ชั่วโมง	12.2, 12.5	1.81, 1,88	37.23	38.00	37.62 ± 0.39
C1(CH)	60°C 1 ชั่วโมง (CH)	11.5, 12.0	1.80, 1.83	39.24	ND	-
C2	60°C 4 ชั่วโมง	9.4, 13.6	1.80, 1.94	37.70	38.68	38.19 ± 0.49
C2(CH)	60°C 4 ชั่วโมง (CH)	12.4, 14.6	1.85, 1.92	36.54	38.75	37.65 ± 1.11
C3	60°C 16 ชั่วโมง	9.1, 11.8	1.75, 2.07	38.03	ND	-
C3(CH)	60°C 16 ชั่วโมง (CH)	9.4, 9.7	**1.85, 1.88**	34.91	35.52	**35.22 ± 0.31**
C4	60°C 24 ชั่วโมง	8.0, 9.0	1.46, 1.52	37.31	38.78	38.05 ± 0.74
C4(CH)	60°C 24 ชั่วโมง (CH)	8.8, 10.0	**1.41, 1,52**	34.17	34.61	**34.39 ± 0.22**
D1	65°C 1 ชั่วโมง	6.0, 11.8	1.73, 1.80	37.32	38.47	37.90 ± 0.58
D1(CH)	65°C 1 ชั่วโมง (CH)	13.7, 16.2	1.79, 1.81	37.13	38.66	37.90 ± 0.77
D2	65°C 4 ชั่วโมง	13.2, 18.5	1.85, 1.93	39.39	> 40	-
D2(CH)	65°C 4 ชั่วโมง (CH)	16.3, 18.6	1.79, 2.01	36.54	36.94	36.74 ± 0.20
D3	65°C 16 ชั่วโมง	8.6, 9.1	1.66, 1.76	37.88	39.47	38.68 ± 0.80
D3(CH)	65°C 16 ชั่วโมง (CH)	10.3, 10.5	1.57, 1,69	37.52	37.79	37.66 ± 0.14
D4	65°C 24 ชั่วโมง	10.9, 13.0	1.63, 1,65	40.00	ND	-
D4(CH)	65°C 24 ชั่วโมง (CH)	15.4, 18.9	1.58, 1.62	39.49	39.52	39.51 ± 0.02

หมายเหตุ (CH) หมายถึงใช้ Chloroform ในการสกัด, ND หมายถึง ไม่พบ

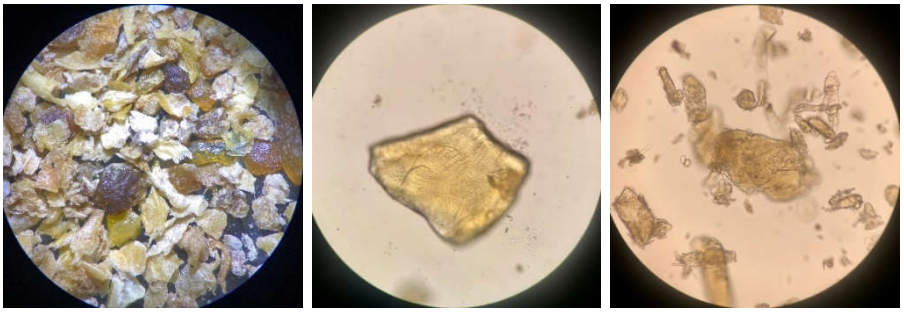
เกณฑ์การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากขนไก่ปน จะใช้ค่า C_t ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค rt-PCR เป็นหลักเนื่องจากเป็นวิธีที่มี sensitivity สูงกว่าเครื่อง spectrophotometer ขนไก่ปน เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ผ่านกระบวนการผลิตที่มีการใช้ความร้อนสูง ทำให้เกิด DNA fragmentation ซึ่งจะมีผลต่อความแม่นยำในการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมในตัวอย่างด้วย qPCR

ยกเว้นเทคนิค spectrometry เนื่องจากมี sensitivity ต่ำกว่า และไม่สามารถแยกระหว่าง DNA ที่มีความยาวแตกต่างกันได้ (Sedlackova *et.,al*¸2013)

จากตารางที่ 6 การบ่มตัวอย่างที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและใช้ Chloroform หรือ condition ที่ C4(CH) ให้ค่า C_t ต่ำที่สุดที่ 34.39 ± 0.22 แต่จากการวัด DNA purity ด้วย Nanodrop พบว่ามีค่า A260/280 อยู่ในช่วง 1.41-1.62 จึงเป็นตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากตัวอย่าง DNA จากการสกัดควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.70-2.00 โดยการที่มีค่าต่ำกว่า 1.80 หมายความว่าตัวอย่างที่สกัดมาได้นั้น มีโปรตีนหรือ phenol ปนอยู่ (O'Neill *et.,al*. 2011) ขณะที่การบ่มตัวอย่างที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและใช้ chloroform หรือ condition ที่ C3(CH) ให้ค่า C_t เป็นลำดับรองลงมา โดยมีค่า C_t อยู่ที่ 35.22 ± 0.31 และมีค่า A260/280 อยู่ในช่วง 1.85-1.88 ซึ่งถือว่ามีค่า purity ที่เหมาะสม จึงเลือกใช้สภาวะนี้เป็นตัวแทนในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

6.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารโคผสมขนสัตว์ปีกป่น

เมื่อผสมขนสัตว์ปีกป่นลงในอาหารโค ที่ระดับต่างๆ นำมาทดสอบหาปริมาณร้อยละด้วยวิธีทางกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการคัดแยกเอกลักษณ์เฉพาะของขนสัตว์ปีกป่นและกล้ามเนื้อของสัตว์ปีกที่ผสมรวมอยู่ในอาหารโค และนำส่วนที่สามารถแยกออกได้ดังกล่าว ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณเป็นร้อยละของการคืนกลับหรือ %Recovery ซึ่งลักษณะของขนสัตว์ปีกป่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงมีดังภาพที่ 2



ภาพที่ 3 ขนสัตว์ปีกป่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ผสมลงในอาหารโคสำหรับทดสอบหาปริมาณของสารพันธุกรรม ก.กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ข. ลักษณะของกล้ามเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ค. ลักษณะขนไก่หลอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

จากภาพที่ 2 เอกลักษณ์เฉพาะที่ใช้แยกวัตถุดิบขนสัตว์ปีกป่นออกจากอาหารโคคือ มีขนไก่ป่น กล้ามเนื้อ และขนไก่หลอม คัดแยกลักษณะดังกล่าวออกจากอาหารโคและนำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณกลับเป็นร้อยละตามตารางที่ 7 โดยเลือกระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 5 เป็นตัวแทนเนื่องจากตามกฎหมายระบุให้ใช้ได้อยู่ระหว่างร้อยละ 2 ถึง 5

ตารางที่ 7 %Recovery ของขนสัตว์ปีกป่นที่คัดแยกออกจากอาหารโคที่มีการผสมขนสัตว์ปีกป่น

รายละเอียด	ร้อยละ 2 (w/w) (n = 10)	ร้อยละ 5 (w/w) (n =10)
น้ำหนักอาหารโค (กรัม)	5.012 (5.000 - 5.046; 0.02)[a]	5.007 (5.000 - 5.043; 0.02)
น้ำหนักขนสัตว์ปีกป่น (กรัม)	0.075 (0.064 - 0.089; 0.01)	0.184 (0.161 - 0.209; 0.02)
ร้อยละ (w/w)	1.51 (1.28 - 1.77; 0.19)	3.68 (3.22 - 4.14; 0.32)
% Recovery	75.3 (64.1 - 88.6)	73.6 (64.4 - 82.8)

หมายเหตุ ; a = ค่าเฉลี่ย (ค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุด; ส่วนเบี่ยงแบนมาตรฐาน)

พบว่าเมื่อผสมขนสัตว์ปีกป่นลงในอาหารโคและใช้วิธีการทางกล้องจุลทรรศน์ในการทดสอบประสิทธิภาพการคืนย้อนกลับหรือ %Recovery พบว่า %Recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 64 – 88 ทั้งสองระดับความเข้มข้นที่ผสมลงไป

จากนั้นนำตัวอย่างของขนสัตว์ปีกป่นที่แยกออกได้ จากระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่น้ำหนักเฉลี่ย 0.18 กรัม มาทำการสกัดเพื่อหาปริมาณของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค dPCR โดยใช้สภาวการสกัดตามขั้นตอนที่ 1 ผลที่ได้ดังข้อที่ 6.3.2

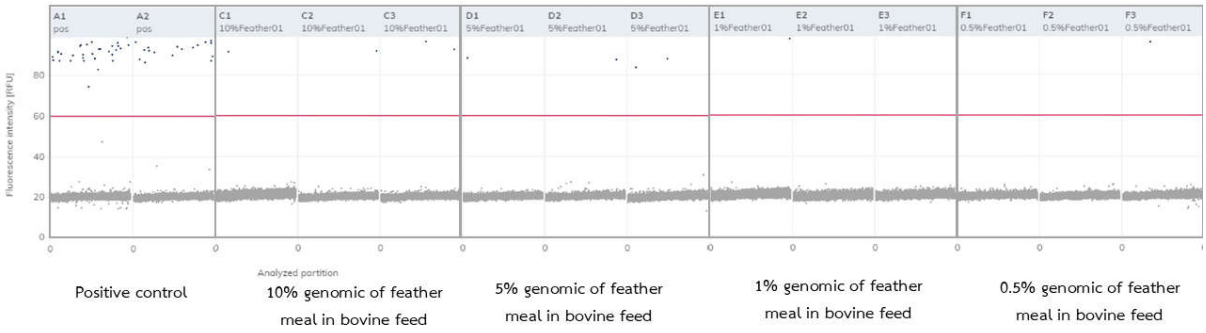
6.3 ทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไก่ด้วย dPCR

6.3.1 การหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ด้วยวิธีการผสมสารพันธุกรรมที่สกัดจากขนสัตว์ปีกป่นกับสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากอาหารโค

เมื่อผสมสารพันธุกรรมที่สกัดจากขนสัตว์ปีกป่นลงในสารพันธุกรรมที่สกัดจากอาหารโคในอัตราส่วนระหว่าง 10% - 0.05% (v/v) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ด้วยเทคนิค dPCR ผลที่ได้ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 3

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไก่ในตัวอย่างผสมระหว่างสารพันธุกรรมไก่และสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากอาหารโคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ระดับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไก่	ผล dPCR (copies/µL)
10% (v/v)	พบ (0.577)
5% (v/v)	พบ (0.579)
1% (v/v)	พบ (0.427)
0.5% (v/v)	พบ (0.433)



ภาพที่ 4 ผลของ dPCR จากตัวอย่างสารพันธุกรรมผสม ระหว่างสารพันธุกรรมที่สกัดจากขนสัตว์ปีกป่นและสารพันธุกรรมที่สกัดจากอาหารโค

จากตารางที่ 8 และภาพที่ 3 พบว่าปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายอยู่ระหว่าง 0.427 – 0.579 copies/µL

6.3.2 การหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย ด้วยวิธีการผสมขนสัตว์ปีกป่นในอาหารโคที่ระดับต่างๆ

เมื่อทำการผสมขนสัตว์ปีกป่นในอาหารโคดังขั้นตอนที่ 5.2 นำอาหารโคดังกล่าวทำการคัดแยกเอกลักษณ์เฉพาะของขนสัตว์ปีกป่น ซึ่งพบเป็นขนไก่หลอมเป็นส่วนมาก จากนั้นนำขนสัตว์ปีกป่นที่แยกออกได้ทั้งหมด ในที่นี้ใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% (w/w) เป็นตัวแทน พบว่ามี %Recovery ของขนสัตว์ปีกป่นอยู่ที่ 73.6% และมีปริมาณของขนสัตว์ปีกป่นเฉลี่ยอยู่ที่ 0.184 กรัมดังตารางที่ 7 จึงใช้ปริมาณดังกล่าวสำหรับการสกัดหาสารพันธุกรรมเป้าหมาย โดยใช้สภาวะ C3 ตามขั้นตอนที่ 5.1 และนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วย dPCR ผลที่ได้ดังตารางที่ 9 และภาพที่ 4

ตารางที่ 9 ความเข้มข้นของสารพันธุกรรมไก่จากการสกัดจากขนไก่ปนที่แยกจากอาหารโคทั้งหมดโดยตรง

ขนไก่ปนที่แยกได้โดยตรงจากอาหารโค	ผล dPCR (copies/µL)
ตัวอย่างที่ 1	พบ (0.418)
ตัวอย่างที่ 2	ไม่พบ
ตัวอย่างที่ 3	ไม่พบ

ภาพที่ 5 ผลของ dPCR จากขนไก่ปนที่แยกจากอาหารโคทั้งหมดโดยตรง

จากการสกัดตัวอย่างขนสัตว์ปีกปนจำนวน 0.184 กรัมด้วยสภาวะการสกัด C3 และนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย พบว่าไม่สามารถหาสารพันธุกรรมเป้าหมายได้ ทั้ง 3 ตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ซึ่งอาจเกิดการที่ไม่มี DNA เป้าหมายในปฏิกิริยา จึงทำให้ตรวจไม่พบด้วยเทคนิค dPCR ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจพบ DNA เป้าหมายได้ ถึงแม้จะมีจำนวนน้อยมากก็ตาม

7. สรุปผล

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณร้อยละของขนสัตว์ปีกปนในอาหารโคด้วยเทคนิค digital Polymerase Chain Reaction พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือการบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ให้ผล real time PCR ที่ Ct ดีที่สุด และจากการใช้สภาวะดังกล่าวที่ในสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ผสมระหว่างขนสัตว์ปีกปนกับอาหารโคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการผสมสารพันธุกรรมเป้าหมายกับเมทริกซ์ซึ่งในที่นี้คือสารพันธุกรรมที่สกัดจากอาหารโคโดยตรง กับการสกัดจากขนสัตว์ปีกปนที่แยกได้หลังจากการผสมลงในอาหารโค พบว่าทั้งสองกรณีให้ผลร้อยละของขนสัตว์ปีกปนไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจอยู่ที่ขั้นตอนของการสกัดสารพันธุกรรมเป้าหมายที่ต้องการหา ซึ่งคือสารพันธุกรรมของไก่อาจมีจำนวนน้อยหรือไม่สมบูรณ์ จึงควรศึกษาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน และเป็น by-product ซึ่งอาจมีจำนวนของสารพันธุกรรมเป้าหมายอยู่เป็นจำนวนน้อย

8. ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาวิธีการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนและมีการย่อยด้วยกรด เพื่อศึกษาความสมบูรณ์ของสารพันธุกรรม รวมทั้งการพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายตามที่ต้องการ

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสาวสุนีย์ คณาพิพัฒน์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานให้ลุล่วงตามวัตถุประสงค์ ขอขอบคุณงานจุลชีววิทยาที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการเตรียมตัวอย่างทดสอบ จนทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

10. เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2558. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ประเภทวัตถุดิบ พ.ศ. 2558. *ราชกิจจานุเบกษา*. เล่ม 132 ตอนพิเศษ 322 ง. หน้า 11.

รัฐกานต์ ศรีศิริ, แกมกาญจน์ ไชยมงคล, เกรียงไกร เกื้อกูล, พงษ์เทพ เวียงวะลัย และยุพา จันทร์คำทรัพย์. (2566). *การพัฒนาวิธีการหาปริมาณดีเอ็นเอของไก่ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Digital polymerase chain reaction*. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. https://qcontrol.dld.go.th/index.php/th/2023-06-12-02-47-06/2023-06-26-06-24-11/398-2566.

สุรัตนา บุญใส และไกรวุฒิ นวลขาว. 2564. *การพัฒนาวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของสัตว์ปีกในอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction*. เลขทะเบียนผลงาน 64(2)-0304-117.

Aksel, Esma & Kasırga, Halil & Tekin, Mahmut & Arslan, Korhan & Akyüz, Bilal. (2023). Isolation of DNA by Phenol-Chloroform Extraction Method from Shed and Waiting Feathers of Psittaciformes Bird Order. *Journal of Applied Biological Sciences*, *17*, 460-466. https://doi:10.5281/zenodo.10035334.

Bello, N., Francino, O., & Sánchez, A. (2001). Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *13*(2), 162–164. https://doi.org/10.1177/104063870101300212

dMIQE Group, & Huggett, J. F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical chemistry*, *66*(8), 1012–1029. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125

Eguchi, T., Eguchi, Y. (2000). High yield DNA extraction from the snake cast-off skin or bird feathers using collagenase. *Biotechnology Letters*, *22*, 1097–1100. https://doi.org/10.1023/A:1005658029607

Esma Gamze, A., Halil İbrahim, K., Mahmut, T., Korhan, A., & Bilal, A. (2023). Isolation of DNA by Phenol-Chloroform Extraction Method from Shed and Waiting Feathers of Psittaciformes Bird Order. *Journal of Applied Biological Sciences*, *177*(3), 460–466. https://doi.org/10.5281/zenodo.10035334

Foodproof® SL Chicken Species Detection Kit.

Hedman, J., Lavander, M., Salomonsson, E. N., Jinnerot, T., Boiso, L., Magnusson, B., & Rådström, P. (2018). Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics. Accreditation and Quality Assurance, 23(3), 133–144. https://doi.org/10.1007/s00769-018-1319-7

ISO 20224-4. 2020. Molecular biomarker analysis—Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR---Part4: Chicken DNA detection method.

Nesvadbova, M., Dziedzinska, R., Hulankova, R., Babak, V., Kralik, P. (2023). Quantification of the percentage proportion of individual animal species in meat products by multiplex qPCR and digital PCR, *Food Control*, *154*, 110024. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110024.

Ramón-Laca, A., White, D. J., Weir, J. T., & Robertson, H. A. (2018). Extraction of DNA from captive-sourced feces and molted feathers provides a novel method for conservation management of New Zealand kiwi (*Apteryx* spp.). *Ecology and evolution*, *8*(6), 3119–3130. https://doi.org/10.1002/ece3.3795

Roche. (2019). High Pure PCR Template Preparation Kit. 1-18.

Sophian, A. (2021). Analysis of the Results of DNA Isolation from Chicken Feather Sampled from the Base of the Young Feathers, the base of the Old Feathers and the Ends of the Feathers. *Bioeduscience*. *5*. https://doi.org/10.22236/j.bes/526211.