

การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล นันทพัชร ลินทรตันศิริกุล
ณัฐพล เลี้ยงเพชร ณัฐญา แสงสว่าง

บทคัดย่อ

จากปัญหาเรื่องการระบาดของโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ในทั่วโลก จึงต้องมีการหาไพรเมอร์ (primer) และ โพรบ (probe) เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์ เพื่อที่จะทำให้เกิดความเชื่อมั่นว่าอาหารสัตว์ปลอดจากเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้คือ เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำมาตรฐานตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปในการตรวจแยกชนิดเนื้อสัตว์ (โค แพะ และ แกะ) และวิธี In-house (สำหรับ primer, probe ของกระบือ) จากผลการทดลอง ตรวจหาเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (โค แพะ แกะ และกระบือ)

คำสำคัญ : เนื้อและกระดูกปน, Real-time PCR, อาหารสัตว์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
Meat and bone meal detection in animal feeds by Real-Time PCR

Wantana Jantaramongkon Nuntaschaporn Lindratsirikul
Nattaphol Liangpetch Natchaya Sangsawang

Abstract

There was a problem of spreading Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) around the worldwide. Consequently, having more primer and probe to detect meat and bone meal in ruminant feed which can prove that samples were free from meat and bone meal of ruminant. The purpose of this study was using the results as a database in order to draft animal feed law of Thailand. (Bovine, *Capra aegagrus hircus*, *Ovis aries* and *Bubalus bubalis*) in animal feed in Thailand. In addition, we used real-time PCR techniques to detect meat and bone meal in animal feed and also using commercial kit and in-house method. From the results, ruminant detection in the total of feed samples were 20 samples, cannot detect meat and bone meal of ruminant (Bovine, *Capra aegagrus hircus*, *Ovis aries* and *Bubalus bubalis*).

Keywords: Meat and Bone meal (MBM), Real-time PCR, animal feeds

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
การตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกป่นในอาหารสัตว์ด้วยเครื่อง Real-Time PCR

วันทนา จันทรมงคล นันทชพร ลินทรต้นศิริกุล ญัฐพล เลียงเพชร ญัฐญา แสงสว่าง

บทนำ

โรค Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารสัตว์ และเกิดการระบาดในปี ค.ศ.1986 ทำให้ European Union ได้ออกกฎหมายบังคับ Regulation (EC) No. 999/2001, Regulation (EC) NO. 1774/2002 และ Regulation (EC) No.1234/2003 โดยมีการกำหนดห้ามนำ โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Proteins ,PAPs) ที่รวมทั้งเนื้อและกระดูกป่น (Meat and Bone meal, MBM) มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ เพื่อนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ จากงานวิจัยของ Van Raamsdonk et al., 2007 กล่าวว่า ได้มีวิธีการตรวจหา โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Proteins ,PAPs) อย่างเป็นทางการ ใน compound feed ในยุโรป ด้วยวิธีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Classical Light microscopy) แต่วิธีนี้ถูกจำกัดเพราะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางคุณลักษณะในแต่ละสายพันธุ์ (species) ได้

โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animals Protein ,PAPs) เป็นแหล่งกรดอะมิโนที่จำเป็นและมีคุณค่าทางโปรตีนสูง อีกทั้งต้องมีการจัดอย่างปลอดภัย ดังนั้นจะต้องหาวิธีการควบคุมและจัดเก็บอย่างปลอดภัยในการนำโปรตีนจากสัตว์ (Animal proteins) กลับมาใช้ใหม่ในอาหารสัตว์ ที่รวมทั้งการห้ามการใช้โปรตีนที่มาจากสัตว์ที่เป็นสายพันธุ์ (species) เดียวกัน ที่เรียกว่า “intra-species recycling” ภายหลังจากการห้ามใช้ โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ในอาหารสัตว์ เมื่อเดือนมิถุนายน ปี ค.ศ.2013 ที่รวมทั้งการห้ามใช้เนื้อและกระดูกป่นในอาหารสำหรับปลา โดยระบบการควบคุมอาหารสัตว์จะต้องสามารถตรวจพบโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ในระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัม (EFSA, 2011) และสิ่งสำคัญคือจะต้องสามารถจำแนกสายพันธุ์ (species) ต้นต้นของโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ได้ จาก Regulation (EU) No.51/2013 กล่าวว่า สามารถหาสายพันธุ์ (species) ต้นต้นของโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ได้ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ทั้งนี้ได้มีรายงานของ Fumiere et al. 2012 ที่ใช้วิธีทาง PCR ในการตรวจหาดีเอ็นเอของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์น้ำ โดยได้นำมาทดสอบความใช้ได้ของวิธีและได้มีการตีพิมพ์วิธีดังกล่าวโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงของยุโรปสำหรับการตรวจหาโปรตีนจากสัตว์ (Animal protein) ในอาหารสัตว์

จากงานวิจัยของ Martín et al., 2009 สามารถสรุปได้ว่า การห้ามใช้โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ในอาหารเสริมสำหรับสัตว์ (feed additive) ในฟาร์มสัตว์เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในการป้องกันการระบาดของ Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) ในปัจจุบันการห้ามใช้โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (Processed Animal Proteins) ได้ถูกควบคุมโดย Council Decision 2000/766/EC (European Commission, 2000) อีกทั้งได้มีการห้ามใช้ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากสัตว์ (Animal byproduct ,ABP) ที่มีส่วนผสมของโปรตีนของสัตว์สายพันธุ์ (species) เดียวกัน เพื่อนำมาเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ จากข้อบังคับดังกล่าวทำให้ต้องหาวิธีการในการตรวจวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือได้ในการแสดงให้เห็นถึง ความสามารถในการจำแนกคุณลักษณะของโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การป้องกันการใช้โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) ได้

ยกตัวอย่างจาก European Commission, 2002 ซึ่งเป็นข้อบังคับของการใช้ ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากสัตว์ (Animal byproduct ,ABP) แสดงให้เห็นว่า ยังมีความต้องการหาวิธีในการตรวจสอบการพบของการจำแนกสายพันธุ์โปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs) เช่น การตรวจหาโปรตีนที่แปรรูปจากสัตว์ (processed animal proteins ,PAPs)จากหมู

ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาโรควัวบ้า (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) ซึ่งจะทำให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และการถ่ายทอดโรค BSE และ TSE ในสัตว์ จึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจและจำแนกชนิดเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ๔ ประเภท ได้แก่ แพะ แกะ วัว กระบือ ในอาหารสัตว์ เพื่อควบคุม เฝ้าระวังและสามารถหาความสัมพันธ์ของการเกิดปัญหาโรควัวบ้าและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSE) ในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ ซึ่งจะสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นฐานข้อมูลของการป้องกันเกิดโรคระบาดในสัตว์เศรษฐกิจได้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการตรวจคุณภาพอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออกของประเทศไทย

1.วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาเนื้อสัตว์ปนเปื้อน (วัว แพะ แกะ และกระบือ) ในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR
2. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ได้

2. ขอบข่าย

เพื่อพัฒนาวิธีและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีในการตรวจแยกชนิดเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (เนื้อวัว แพะ แกะ และกระบือ) ในตัวอย่างอาหารสัตว์ 3 ประเภทได้แก่ อาหารผงสำหรับโค อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับ และวัตถุดิบสำหรับอาหารโค โดยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 3.1 มีฐานข้อมูลของเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วัว แพะ แกะ และกระบือ) ในอาหารสัตว์
- 3.2 มีโครงการวิจัยเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในอาหารสัตว์ของประเทศไทยที่เพิ่มมากขึ้น
- 3.3 ใช้ในการป้องกันและเฝ้าระวังในอาหารสัตว์ที่นำเข้า-ส่งออก เพื่อเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการส่งออกอาหารสัตว์ของประเทศไทยรวมทั้งเป็นการเฝ้าระวังอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนอย่างผิดกฎหมาย

4. วิธีดำเนินการ

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง แบ่งได้ 3 ประเภทได้แก่ อาหารผงสำหรับโค อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับ และวัตถุดิบสำหรับอาหารโค

4.2 การสกัดสารพันธุกรรม

สุมและซังตัวอย่าง ประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยใช้ชุดทดสอบ High Pure PCR Template preparation Kit (Roche, Germany) โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีการสกัดของชุดทดสอบ

4.3 การเตรียมสารละลายปฏิกิริยา Real-time PCR ในการตรวจแยกชนิดเนื้อสัตว์เคี้ยวเอื้อง

4.3.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Real-time PCR และสภาวะการทำงานของการทำงานของตรวจแยกชนิดเนื้อกระบือ

ตารางที่ 1ไพรเมอร์และโพรบของกระบือ

Primer/Probe	Type	Sequence (5' → 3')	Target
Bub2F	Forward primer	TCAGCCCAAAGAAAAATAAACCA	16S (Buffalo)
Bub2R	Reverse primer	GTCACCCCAACCGAAACTGT	16S (Buffalo)
Bub 16S	TaqManprobe	FAM-TAAGGARTAACACAMTCT- MGB	16S (Mammals)

หมายเหตุ Bub 16S probe was designed to undergo degeneration. According to IUPAC, R = A หรือ G, M = A หรือ C

แหล่งที่มา : Drummond et al., 2013

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำยาตรวจดีเอ็นเอกระบือ

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)/ตัวอย่าง
Probes master (2X)	10
Forward primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5
Reverse primer (10 ไมโครโมลาร์)	0.5
TaqMan probe (10 ไมโครโมลาร์)	0.5
Distilled water, PCR grade	3.5
Total volume	15

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย 40 รอบ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลา ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที

4.4 การเตรียมตัวอย่าง DNA

ให้ทำการเจือจางตัวอย่าง DNA ในอัตราส่วน 1:10 (ตัวอย่าง DNA 1 ไมโครลิตร น้ำ PCR grade 9 ไมโครลิตร) เนื่องจากตัวอย่างอาหารสัตว์มี inhibitor มาก อาจทำให้ผลการทดสอบที่ได้ออกมาเป็นผลลบปลอมได้

5. ผลการทดลอง

ตารางที่ 3 ผลการทดลอง

ตัวอย่าง	รายละเอียดตัวอย่าง	เนื้อวัว	เนื้อแพะ	เนื้อแกะ	เนื้อกระบีอบก
1	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
4	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
6	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
8	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
11	ปลาและกระดูกปลาปน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
12	ปลาและกระดูกปลาปน	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
13	ปลาปนชั้นคุณภาพที่ 1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
14	ปลาปนชั้นคุณภาพที่ 3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
15	ปลาปนชั้นคุณภาพที่ 1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
16	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
17	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดผง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตัวอย่าง	รายละเอียดตัวอย่าง	เนื้อวัว	เนื้อแพะ	เนื้อแกะ	เนื้อกระบือบก
18	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
19	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
20	อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับโค ชนิดเม็ด	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

6. สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจวิเคราะห์เนื้อและกระดูกปนในตัวอย่างอาหารสัตว์ จำนวน 20 ตัวอย่าง แบ่งได้ 3 ประเภทได้แก่ อาหารผงโค อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับโค และวัตถุดิบสำหรับอาหารโค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (วัว แพะ แกะ และกระบือ) ในอาหารผงโค และอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับโค

7. ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจหาเนื้อและกระดูกปนสำหรับอาหารสัตว์ที่ถูกนำเข้ามาจากประเทศแถบยุโรป ควรจะมีการพัฒนาวิธีในเรื่องของการหา primer และ probes ของสัตว์ประจำถิ่นแต่ละประเทศ เพื่อที่จะได้ข้อมูลของการปนเปื้อนของเนื้อและกระดูกปนในอาหารสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ได้ และสามารถลดอัตราการนำเข้าของอาหารสัตว์ที่ผิดกฎหมายได้

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยการสนับสนุนของท่านผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (ผอ.วรวิชัย วราอัสวปติ) ผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์คุณภาพสินค้าปศุสัตว์ (นางสุทธิพร พิริยานน) ที่ให้คำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

9. เอกสารอ้างอิง

D'Amato, M. Davison, S. and Coach, D. 2013. Meat trade: Need for international standardization ? Forensic Scienc International: Genetic Supplement Series, 4(1), 328-329.

Di Pinto, A. Bottaro, M. Bonerba, E. Bozzo, G. Ceci, E. Marchetti, P. Mottola, A, et al. 2015. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay. Journal of Food Science and Technology, 52(4): 2479-2484.

EFSA. 2011. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE posed by processed animal proteins (PAPs). EFSAJ.9, 80 pp, <http://dx.org/10.2903/j.efsa.2011.1947>, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1947.htm>

European Commission. 2000. Council decision 776/2000/EC of 4 December 2002 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. Official Journal of European Communities, L306, 32-33.

European Commission. (2002). Council decision 1774/2002/EC of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. Official Journal of European Communities, L273, 1-95.

Fumiere, O. Marien, A. Berben, G. 2012. Validation study of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion by for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs, http://eurl.craw.eu/img/page/interlaboratory/Ruminant_Validation_Study_draft_ver_1_5.06/2012.pdf (วันที่ค้นหา 16 เมษายน 2560).

Martín, I. García, T. Fajardo, V. Rojas, M. Pegels, N. Hernández, P.E. González, I. and Martín, R. 2009. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. Meat Science. 82: 252-259.

Nesic, K. Samanc, H. Vujanac, I. Prodanovic, R. Nesic, V. Velebit, B. and Savic, B. 2014. Detection of meat and bone meal in cattle feed and ruminal fluid-Comparison and combining of microscopy and polymerase chain reaction. Animal Feed Science and Technology. 187: 86-90.

Commission Regulation (EU) No. 51/2013 of 16 January 2013 amending Regulation (EC) No. 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed Text with EEA relevance.

Commission Regulation (EC) No. 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the preventions , control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies.

Commission Regulation (EC) No.1234/2003 of 10 July 2003 amending Annexes I, IV and XI to Regulation (EC) No.999/2001 of the European Parliament and of the council and Regulation (EC) No.1326/2001 as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding.

Van Raamsdonk, L.W.D. Von Holst, C. Baeten, V. Berben, G. Boix, A. de Jong, J. 2007. New developments on the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science Technology*, 133: 63-83.

Wang, P. Hu, Y. Yang, H. Han, J. Zhao, Y. and Chen, Y. 2013. DNA-based authentication method for detection of yak (*Bosgrunniens*) in meat products. *Journal of AOAC International*, 96(1): 142-146.

Xue, C. Wang, P. Zhao, J. Xu, A. Guan, F. 2017. Development and validation of a universal primer pair for the simultaneous detection of eight animal species. *Food Chemistry*. 221.: 790-796.

Yin, R.H. Bai, W.I. Wang, J.M. Wu, C.D. Dou, Q.I. Yin, R.L. He, J.B. et al. 2009. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. *Meat Science*. 83(1): 38-44.