บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 วัสดุอุปกรณ์สำหรับเตรียมน้ำเนื้อเพื่อทดสอบชนิดเนื้อสัตว์

- เนื้อสด คือ เนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อกระบือ เนื้อสุนัข เนื้อไก่ และตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (High speed centrifuge, Hettich zentrifugen :Universal 32R, Germany)
- เครื่องตีผสม (Laboratory stomacher, Masticator silver : IUL, Spain)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance, OHAUS:TS 400 Precision standard, America)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Electrolux : Swedish design, Thailand)
- กรรไกร ขนาด 5" S/S str. (Operating scissors, salim 1:stainless stell CE)
- ปากคีบ (Forceps, Mira : Stainless steel CE)
- หลอดทดลองชนิดแก้วขนาด 16 x100 มิลลิเมตร พร้อมฝาเกลียว (Test tube, Pyrex ^{R} : culture Screw cap, USA)
- ชั้นวางหลอดทดลอง (Rack)
- บีกเกอร์ ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร (Pyrex ^{R}, USA)

1.2 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (UV / Visible Spectrophotometer, Spectronic Instrument : Spectronic ^{R} 20 Genesys ^{TM}, USA)
- ออโตไปเปต ขนาด 10–100 และ 100–1000 ไมโครลิตร (Autopipette, Transferpette : Brand, Germany)
- นาฬิกาจับเวลา (Timer, CASIO :TMR – 100, Japan)
- เซลล์วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Polystyrene cuvette, Dispolab Kartell)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (High speed centrifuge, Eppendorf : Centrifuge 5415 C, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการฉีดซีรั่มเข้ากระต่ายและการเก็บเลือดจากกระต่าย

- กระบอกฉีดยาชนิดพลาสติกแบบใช้ครั้งเดียว ขนาด 3 และ 5 มิลลิลิตร (Disposable syringe, Becton dickinson : Precise ™, Singapore)
- เข็มฉีดยาแบบใช้ครั้งเดียว เบอร์ 18 ยาว 2 นิ้ว พร้อมด้วยเบอร์ 23 และ เบอร์ 26 ยาว 1 นิ้ว (Disposable needle Nissho Nipro : Nepro, Thailand)
- หลอดทดลองชนิดแก้วขนาด 16 x100 มิลลิเมตร พร้อมฝาเกลียว (Test tube, Pyrex ® : culture Screw cap, USA)
- ขวดพลาสติกเล็ก (Plastic vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- สำลี
- ถุงมือ (Latex examination gloves, สยามเซมเพอร์เมด จำกัด: Sempermed ®, Thailand)
- บีกเกอร์ ขนาด 25 มิลลิลิตร (Pyrex ®, USA)

1.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการผลิตแอนติซีรั่ม

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (High speed centrifuge, Hettich zentrifugen: Universal 32R ,Germany)
- เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer, VELP scientifica : ARE, Italy)
- แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar) ขนาด 0.5 x 1 x 0.5 นิ้ว
- Regenerated cellulose tubular membrane, Membrane filtration products : Cellusep T 4 Part # 1430 –25, Australia
- บีกเกอร์ ขนาด 100 และ 2000 มิลลิลิตร (Pyrex ®, USA)
- ขวดเก็บสารเคมี (Duran bottle)
- แท่งแก้วสำหรับคน

1.5 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเตรียมเจล

- เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ (Heating magnetic stirrer, VELP Scientifica : ARE, Italy)
- ออโตไปเปตคอนโทล (Autopipette control, Jencon : Powerpette, England)
- อุปกรณ์เจาะเจล (Gel punch) (Disposable needle Ø 1.8 mm :Dispomed ®, Germany)
- ไปเปตแก้ว (Glass pipette) ขนาด 5 และ 20 มิลลิลิตร
- สไลด์ ขนาด 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร (microscope slide, Sail brand : CAT. No. 7101, China)
- แม่แบบการเจาะหลุมเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิลิตร (Petri dish)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance, OHAUS :TS 400 Precision standard, USA)

1.6 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทดสอบความจำเพาะ ปฏิกิริยาข้าม ปริมาณความเข้มข้น (Antiserum titer) ของแอนติซีรั่ม และการทดสอบชนิดเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ของเนื้อสัตว์

- ออโตไปเปต ขนาด 10–100 ไมโครลิตร (Autopipette, Transferpette :Brand, Germany)
- กล่องเก็บความชื้น
- เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

1.7 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการศึกษาปริมาณเปอร์เซ็นต์การปลอมปน (w/w) ของเนื้อสุกรและเนื้อโค

- เนื้อสุกรและเนื้อโคสด
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance, OHAUS : Precision standard, USA)
- ออโตไปเปต ขนาด 10–100 ไมโครลิตร (Autopipette, Transferpette : Brand, Germany)
- กล่องเก็บความชื้น
- เครื่องตีผสม (Laboratory stomacher : Masticator silver : IUL, Spain)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Electrolux : Swedish design, Thailand)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (High speed centrifuge, Hettich zentrifugen : Universal 32 R, Germany)
- หลอดทดลองชนิดแก้วขนาด 16 x100 มิลลิเมตร พร้อมฝาเกลียว (Test tube, Pyrex^{R} : culture Screw cap, USA)
- กรรไกร ขนาด 5" S/S str. (Operating scissors, salim 1 : stainless stell CE)
- ปากคีบ (Forcep, Mira : Stainless steel CE)
- ช้อนตักสาร
- ถุงพลาสติก

1.8 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการทดสอบชนิดเนื้อสุกรและเนื้อโค

- เนื้อสุกรสดและเนื้อโคสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ (Heating magnetic stirrer, VELP Scientifica : ARE, Italy)
- เครื่องวัดอุณหภูมิแก้วชนิดแอลกอฮอล์ที่ผ่านการปรับเทียบมาตรฐาน
- เครื่องตีผสม (Laboratory stomacher : Masticator silver : IUL, Spain)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Electrolux : Swedish design, Thailand)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance, OHAUS : TS 400 Precision standard, USA)
- ออโตไปเปต ขนาด 10–100 ไมโครลิตร (Autopipette, Transferpette^{R}, Brand, Germany)
- กล่องเก็บความชื้น
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (High speed centrifuge, Hettich zentrifugen : Universal 32 R, Germany)
- กรรไกร ขนาด 5" S/S str. (Operating scissors, salim 1 : stainless stell CE)
- ปากคีบ (Forcep, Mira : Stainless steel CE)
- หลอดทดลองชนิดแก้วขนาด 16 x100 มิลลิเมตร พร้อมฝาเกลียว (Test tube, Pyrex^{R} : culture Screw cap, USA)
- บีกเกอร์ชนิดแก้ว ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร (Pyrex^{R}, USA)
- ถุงพลาสติก
- Aluminium foil
- ช้อนตักสาร

2. สารเคมีและสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง

- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride ; NaCl, Merck, Germany)
- Agarose gel (Agarose D – 1 Low EEO ; Pronadisa, Spain)
- โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide ; Na N_3, Merck, Germany)
- โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride ; KCl, Carlo Erba, Italy)
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate ; H_2KO_4P, Merck, Germany)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเด็คคาไฮเดรท์ (di – Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate ; Na_2HPO_4. 12 H_2O, Carlo Elba, Italy)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate ; $[NH_4]_2SO_4$, Merck, Germany)
- แบเรียมคลอไรด์ (Barium chloride ; $BaCl_2$, Merck, Germany)
- Coomassie brilliant Blue G_{250} ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$, Merck, Germany)
- กรดฟอสโฟริก (Phosphoric acid ; PO_4H_3, Merck, Germany)
- เอทานอล (Ethanol ; C_2H_5OH, Merck, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide ; NaOH, Merck, Germany)
- ไอโซโพรพานอล (Isopropanol ; $[CH_3]_2CHOH$, สหการโอสถ, Thailand)
- Bovine Albumin (Albumin, Bovine ; Fraction V, Sigma, Germany)
- ซีรั่มโคและสุกร
- Incomplete Freund ' s Adjuvant (F – 5506 lot 39H8927, Sigma, Germany)
- กระต่ายพันธุ์ (New zealand albino rabbit)

3. วิธีการทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

กระต่ายใช้เพื่อการผลิตแอนติซีรั่มต่อซีรั่มของสุกรและโคอย่างละ 1 ตัว ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นตัวละ 2.3 กิโลกรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ

มีการจัดการเลี้ยงกระต่าย [55-56] 1 ตัว ในกรง 1 กรง พร้อมให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยในวันทำการให้อาหารวันละ 2 ครั้ง วันเสาร์ – อาทิตย์และวันหยุดประจำปี ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ประกอบกับเสริมแครอทสัปดาห์ละ 1 ครั้งและให้น้ำตลอดเวลา (ตามภาคผนวก ง) และเลี้ยงกระต่าย ณ อาคารเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1 การเตรียมซีรั่มสำหรับเป็นแอนติเจน

ซีรั่มสุกรและโคที่นำมาใช้ทดสอบต้องมาจากสุกรและโคที่ผ่านการตรวจสุขภาพเบื้องต้น และมีสุขภาพสมบูรณ์ จึงนำมาเจาะเก็บเลือดบริเวณด้านข้างลำคอของทั้งสุกรและโค (ตามภาคผนวก ง) โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ยาว 1.5 นิ้ว และกระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ เก็บเลือด 20 มิลลิลิตร ต่อตัว ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร หลังจากเลือดแข็งตัวจึงใช้ออโตไปเปตขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร เก็บซีรั่ม แล้วนำซีรั่มไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 2,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บซีรั่มที่ไม่ปนเม็ดเลือดแดงไปใช้ต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วนำซีรั่มไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford [56] (ภาคผนวก จ) และเก็บซีรั่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการทดสอบ

3.2 การตรวจแอนติซีรั่มจำเพาะจากกระต่าย

3.2.1 วิธีการเตรียมแอนติเจน

การดำเนินการได้ปรับเปลี่ยนและพัฒนาจากวิธีของโสมทัต [21] และ Dunbar [57] โดยนำซีรั่มจากข้อ 3.1 มาชนิดละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant 1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็น Water-in-oil emulsion (ตามภาคผนวก ง) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเรื้อรังเฉพาะที่ เป็นผลให้แอนติเจนถูกปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ กระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีออกมาเรื่อย ๆ หลังจากนำไปฉีดกระต่ายที่ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณหลังขาหน้าข้างละ 0.25 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ

3.2.2 โปรแกรมการฉีดแอนติเจนเข้ากระต่าย และการเก็บซีรั่มจากกระต่าย

ฉีดซีรั่มเข้ากระต่าย สัปดาห์ที่ 0, 2 และ 6 ตามลำดับ โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 23 ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ และหลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดจากใบหูกระต่าย โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 ความยาว 0.5 นิ้ว และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ (ตามภาคผนวก ง) เก็บเลือด 15 มิลลิลิตร ต่อกระต่าย 1 ตัว ในแต่ละครั้ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร หลังจากเลือดแข็งตัวจึงใช้ออโตไปเปต 100–1,000 ไมโครลิตร เก็บส่วนซีรั่ม แล้วนำซีรั่มไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 2,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บซีรั่มที่ไม่ปนเม็ดเลือดแดงไปใช้ต่อไป

3.3 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Ammonium sulfate 35 % และการทำ dialysis

นำซีรั่มจากข้อ 3.2.2 มา 10 มิลลิลิตร แล้วตกตะกอนด้วย Ammonium sulfate 35 % ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง [58 - 59] โดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า พร้อมแท่งแม่เหล็กหมุนอย่างช้า ๆ ตลอดเวลา (ตามภาคผนวก ฉ) แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอน 4,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline 5 มิลลิลิตร (ตามภาคผนวก ช) โดยค่อย ๆ ละลายแล้วนำสารละลายที่ได้มาทำ dialysis โดยการนำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน dialysis tube ซึ่งแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.85 % ปริมาณ 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำสารละลายที่อยู่ภายในถุง dialysis tube ปริมาณ 50 ไมโครลิตร มาทดสอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Barium chloride 2 % [60] ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ถ้าไม่พบการตกตะกอนจึงนำไปใช้ต่อไปได้ แต่ถ้าพบการตกตะกอนต้องนำสารละลายที่ได้ไป dialysis ต่อ จนกระทั่งทดสอบไม่พบการตกตะกอน แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (ตามภาคผนวก ข)

3.4 การเตรียม Agar gel diffusion plate และสไลด์

เตรียม Agarose 1.0 กรัม และ Sodium azide (NaN_3) 20 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลาย Phosphate buffered saline 100 มิลลิลตร (ภาคผนวก ช) แล้วนำไปต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียสโดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ เมื่อสารละลายเจลใสจึงนำไปใส่ในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร หรือสไลด์ขนาด 25.4 X 76.2 มิลลิลิตร ปริมาณ 15 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตามภาคผนวก ฉ) ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จึงนำมาเจาะรูโดยให้แต่ละหลุมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร และความห่างแต่ละหลุม 5 มิลลิเมตร โดยใช้ Gel punch [60]

3.5 การเตรียมน้ำเนื้อ

นำเนื้อสัตว์สดคือ เนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อไก่ เนื้อกระบือ เนื้อสุนัขและตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อต่าง ๆ ที่นำมาวิจัยซึ่งได้จากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าใน อำเภอเมือง และอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่างละ 10 กรัม จำนวน 50 ตัวอย่าง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 x 1 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำเกลือ (NaCl 0.85 %) 10 มิลลิลิตร บดด้วยเครื่องตีผสม (Laboratory stomacher) เป็นเวลา 2 นาที (ตามภาคผนวก ฉ) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน แล้วปั่นให้ตกตะกอนที่ 1,500 g นาน 10 นาที [61] แล้วเก็บส่วนใสไปทดสอบพิสูจน์ชนิดเนื้อสัตว์โดยวิธี Double gel diffusion test ต่อไป

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพแอนติซีรั่มด้วยวิธี Double gel diffusion test

3.6.1 การทดสอบความจำเพาะ และปฏิกิริยาข้าม ของแอนติซีรั่ม

แอนติซีรั่มที่ได้จากกระต่าย ตามข้อ 3.3 นำมาทดสอบหาความจำเพาะ และปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี Double gel diffusion test โดยการเติมแอนติซีรั่มจากกระต่ายลงในหลุมกลาง ส่วนตัวอย่างน้ำเนื้อที่ทราบชนิดลงในหลุมรอบนอก หลุมละ 25 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (23 –26 องศาเซลเซียส) อ่านผล ครั้งแรกภายใน 24 ชั่วโมง ครั้งที่สอง

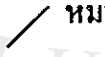
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และครั้งที่สามในวันที่ 2 และวันที่ 4 ตามลำดับ อ่านผลการเกิด precipitin band ได้เป็น positive และไม่เกิด precipitin band ได้เป็น negative (ตามรูปที่ 3.1 ก และ ข)

รูปที่ 3.1 ก การทดสอบความจำเพาะพร้อม precipitin bands ที่พบ

รูปที่ 3.1 ข การทดสอบปฏิกิริยาข้ามพร้อม precipitin bands ที่พบ

1 = แอนติซีรั่มต่อโค 2 = แอนติซีรั่มต่อสุกร 3 = น้ำเนื้อจากโค 4 = น้ำเนื้อจากสุกร
5 = น้ำเนื้อจากไก่ 6 = น้ำเนื้อจากสุนัข 7 = น้ำเนื้อจากกระบือ 8 = น้ำเกลือ 0.85 %

และ  หมายถึง Precipitin bands

3 .6 .2 การทดสอบหา Antibody titer

เติมแอนติซีรั่มที่ไม่เจือจางและที่เจือจางโดยใช้น้ำเกลือ 0.85 % (1:2, 1:4, 1:8, 1:10) และน้ำกลั่น ลงในหลุม 6 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร บน Agar gel diffusion plate ที่เตรียมไว้ โดยใส่ น้ำเนื้อของสัตว์ในหลุมตรงกลางกับแอนตีซีรั่มที่จำเพาะกับน้ำเนื้อสัตว์นั้นในหลุมรอบนอก ให้แต่ละหลุมรอบนอกมีความเข้มข้นของแอนติซีรั่มตามที่กำหนดไว้ข้างต้น เก็บเพลทไว้ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (23 – 26 องศาเซลเซียส) อ่านผลครั้งแรกภายใน 24 ชั่วโมง ครั้งที่สอง และครั้งที่สามในวันที่ 2 และวันที่ 4 ตามลำดับ โดยอ่านผลเป็นค่า Antibody titer ซึ่งหมายถึง ค่าส่วนกลับของ Dilution ที่เจือจางมากที่สุดของแอนติบอดี ที่สามารถเกิด precipitin band ได้เป็นยูนิตต่อปริมาตรแอนติบอดี (25 ไมโครลิตร) ที่ใช้ในการทดสอบ (ตามรูปที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3.2 การทดสอบหา Antibody titer พร้อม precipitin bands ที่พบ

A = น้ำเนื้อจากโค
A1 = แอนติซีรั่มต่อโค
A2 = แอนติซีรั่มต่อโค (1:2)
A3 = แอนติซีรั่มต่อโค (1:4)
A4 = แอนติซีรั่มต่อโค (1:8)
A5 = แอนติซีรั่มต่อโค (1:10)
A6 = น้ำเกลือ 0.85 %

B = น้ำเนื้อจากสุกร
B1 = แอนติซีรั่มต่อสุกร
B2 = แอนติซีรั่มต่อสุกร (1:2)
B3 = แอนติซีรั่มต่อสุกร (1:4)
B4 = แอนติซีรั่มต่อสุกร (1:8)
B5 = แอนติซีรั่มต่อสุกร (1:10)
B6 = น้ำเกลือ 0.85 %

\ หมายถึง Precipitin bands

<u>หมายเหตุ</u> ในวงเล็บ คือ แอนติซีรั่ม 1 ส่วน : น้ำเกลือ 0.85 % (ส่วนทั้งหมด - 1 ส่วน) ผสมกับแอนติซีรั่ม 1 ส่วน

3.6.3 การศึกษาปริมาณเปอร์เซ็นต์การปลอมปน (w/w) ของเนื้อสุกรและเนื้อโค

นำเนื้อสุกรสดมาทดสอบที่ 0.5 %, 1.0 %, 2.0 %, 3.0 %, 4.0 %, 5.0 % ในเนื้อโคสด (w/w) ใส่ในหลุมรอบนอก และนำเนื้อโคสดมาทดสอบที่ 0.5 %, 1.0 %, 2.0 %, 3.0 %, 4.0 %, 5.0 % ในเนื้อสุกรสด (w/w) ใส่ในหลุมรอบนอก แล้วทดสอบด้วยแอนติซีรั่มต่อโคและสุกร ใส่ในหลุมตรงกลาง จำนวนอย่างละ 5 ซ้ำ โดยเตรียมตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง (ตามรูปที่ 3.3)

รูปที่ 3.3 การทดสอบปริมาณเปอร์เซ็นต์การปลอมปน (w/w) ของเนื้อสุกรและเนื้อโค

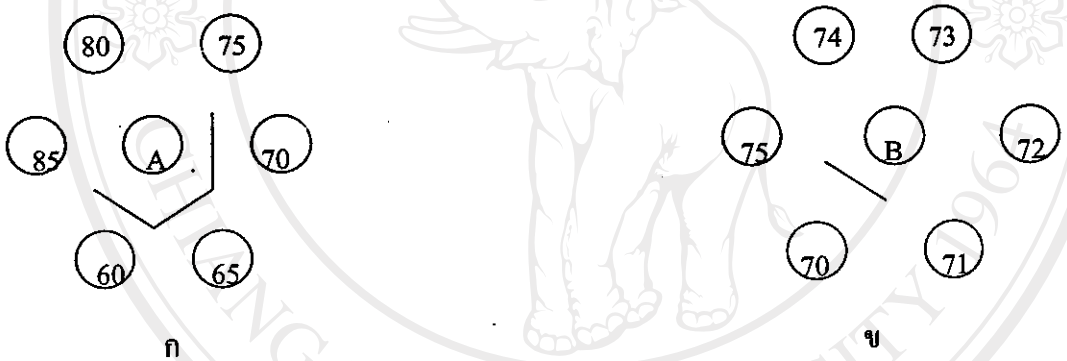
A คือ แอนติซีรั่มต่อโค, B คือ แอนติซีรั่มต่อสุกร, \ หมายถึง Precipitin bands

<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลขเป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์การปลอมปนที่ 0.5 %, 1.0%, 2.0 %, 3.0 %, 4.0 %, 5.0 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.4 การทดสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อการพิสูจน์ชนิดเนื้อสุกรและเนื้อโค

ตัดเนื้อสุกรสดและเนื้อโคสดขนาด 1x1x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 15 กรัมแล้วนำไปใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปริมาณ 60 มิลลิลิตรและแท่งแม่เหล็กขนาด 0.5x1x1 ลูกบาศก์นิ้วอยู่ภายใน แล้วนำไปตั้งบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กที่สามารถปรับอุณหภูมิได้ค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิ ขณะเดียวกันก็ใช้เทอร์โมมิเตอร์แบบแก้วชนิดแอลกอฮอล์วัดอุณหภูมิเมื่อได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ก็นำเนื้อสัตว์มาเทใส่กระชอน แล้วนำมาชั่งให้ได้ 10 กรัม จึงนำมาเตรียมเป็นน้ำเนื้อเพื่อใส่ในหลุมรอบนอก ทดสอบกับแอนติซีรั่มต่อโคและสุกรที่ใส่ในหลุมตรงกลางต่อไป ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 5 ครั้ง โดยเตรียมตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง แล้วทำการทดสอบแบบเดิมกับเนื้อโคและสุกรที่ผ่านการให้ความร้อน ณ อุณหภูมิ 65, 70, 75, 80, 85 องศาเซลเซียส (ตามรูปที่ 3.4 ก) และเมื่อได้ช่วงระหว่างอุณหภูมิสูงที่สุดที่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอน ให้ทำการทดสอบแบบเดิมแต่ปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นที่ละหนึ่งองศาเซลเซียส ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (ตามรูปที่ 3.4 ข)



รูปที่ 3.4 การทดสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อการพิสูจน์ชนิดเนื้อสุกรและเนื้อโค

หมายเหตุ ตัวเลขแสดงถึงอุณหภูมิต่าง ๆ และ A หรือ B คือแอนติซีรั่มต่อโคหรือแอนติซีรั่มต่อสุกร

\ หมายถึง Precipitin bands

3.6.5 การพิสูจน์ชนิดเนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ด้วยแอนติซีรั่ม

เตรียมน้ำเนื้อตามข้อที่ 3.5 ตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมรอบ ๆ และเติม 1 หลุมตรงกลาง ด้วยแอนติซีรั่มต่อโคหรือสุกร แล้วอ่านผลการเกิด precipitin band ครั้งแรกภายใน 24 ชั่วโมง ครั้งที่สอง และครั้งที่สามในวันที่ 2 และวันที่ 4 วัน ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3. 5 การพิสูจน์ชนิดเนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี Double gel diffusion test

<u>หมายเหตุ</u> A, B คือ แอนติซีรั่มต่อโคหรือแอนติซีรั่มต่อสุกร

1 – 6 คือ ตัวอย่างน้ำเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved