การพัฒนาวิธีการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification

นางสาวพรพิมล มะหะหมัด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF PORCINE DETECTION IN FOOD PRODUCTS BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD

Miss Pornpimol Mahamad

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

490965

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification
โดย	นางสาวพรพิมล มะหะหมัด
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์)

พรพิมล มะหะหมัด : การพัฒนาวิธีการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification. (DEVELOPMENT OF PORCINE DETECTION IN FOOD PRODUCTS BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, 162 หน้า.

ได้ทำการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และวิธี LAMP-Dot Blotting โดยการออกแบบไพรเมอร์ 4 เส้นคือ Forward Inner Primer (FIP), Backward Inner Primer (BIP), Outer Primer F3 และ Outer Primer B3 ที่จำเพาะกับยีน *cytochome b* และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี LAMP พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การทดสอบความจำเพาะของLAMP และ LAMP-Dot Blotting ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกุ้ง เนื้อหอยแครง เนื้อหอยลาย เนื้อหอยนางรม เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อสุนัข และเนื้อกบ มีความไวที่ขีดจำกัดต่ำสุดของดีเอ็นเอสุกร 1 นาโนกรัม ซึ่งเท่ากับวิธี PCR แต่น้อยกว่าวิธี Real-Time PCR 10 เท่า สำหรับเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวนั้นมีขีดจำกัดต่ำสุดที่ 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งน้อยกว่าวิธี PCR และ Real-Time PCR 100 เท่า และ 1000 เท่า ตามลำดับ ยกเว้น เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ทดสอบด้วย LAMP-Dot Blotting จะมีความไวกว่าวิธี LAMP 5 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี LAMP นั้นสามารถตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรที่ผ่านความร้อนที่ 0-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีได้ การวิเคราะห์การปนเปื้อนเนื้อสุกรด้วยเทคนิค LAMP กับผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จำนวน100 ตัวอย่างและตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ไซเบอร์กรีนวันสังเกตผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสงยูวี และเทคนิค Dot blot hybridization เปรียบเทียบกับวิธี Real-Time PCR ที่เป็น Gold Standard ในการศึกษาครั้งนี้ การปนเปื้อนจากเนื้อสุกร 27, 13, 17, 24 ตัวอย่าง ตามลำดับ และการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบผลผลิต LAMP ทั้ง 4 วิธีพบว่าการตรวจสอบผลผลิตด้วยไซเบอร์กรีนภายใต้แสงยูวีเป็นวิธีที่ดีที่สุด เนื่องจากมีความรวดเร็ว ความจำเพาะ และความไวสูงกว่าวิธีอื่น ส่วนวิธี LAMP Dot-Blotting ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยครั้งนี้ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร ในภาคสนาม และห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากมีความสะดวก และไม่ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต.....พรพิมล มะหะหมัด.....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์.....

ปีการศึกษา 2549

4877208937 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE
KEY WORD: LAMP / LAMP-Dot Blotting / Porcine

PORNPIMOL MAHAMAD : DEVELOPMENT OF PORCINE DETECTION IN FOOD PRODUCTS BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION THESIS ADVISOR : ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, PhD., 162 pp.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and LAMP-Dot Blotting methods were developed for detection of porcine in food products. A set of four primers which were Forward Inner Primer (FIP), Backward Inner Primer (BIP), Outer Primer F3 and Outer Primer B3, were designed specifically to recognize the *cytochome b* gene. The reaction conditions were optimised to amplify porcine DNA by incubation at 60°C, for 1 hour. No cross amplification was detected with chicken, beef, duck, sheep, goat, salmon, shrimp, blood cockle, surf clam, oyster, squid, crab, ostrich, canine and frog. The detection limit of porcine DNA was 1 ng as same as the PCR method but 10 times reduction in Real-Time PCR method. The detection limit of pork in chicken and pork in beef were 10% which decreased 100 and 1,000 time in PCR and Real-Time PCR, respectively. Exceptionally, pork in beef, LAMP-Dot Blotting assay was 5 times more sensitive than LAMP method. Moreover, heated pork at 0-120 °C for 30 min could be detected with LAMP reaction. Porcine contamination was examined in 100 meat products using LAMP method and visualized by electrophoresis, SYBR Green I under natural light, SYBR Green I under UV light and dot blot hybridization in comparison to Real-time PCR, the gold standard in this study. The number of contaminated meat samples which examined by each methods were 27, 13, 17 and 24, respectively. From 4 methods, evaluation of LAMP product using SYBR Green I under UV is the best method because it is the most rapid, specific and sensitive method. However, LAMP Dot-Blotting which developed in this study, is the alternative method for detection of porcine in food products in the fields and general laboratories. Because, it is a convenience method with no need of special equipment.

Department Clinical Chemistry Student's signature .....
Field of study Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Advisor's signature .....
Academic year 2006

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดขึ้นจากบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆมากมาย จึงขอขอบพระคุณบุคคลต่างๆ มา ณ โอกาสนี้ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ เทคนิค ตลอดจนข้อคิดต่างๆ ในการทำงาน จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณารับเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนโครงการจัดตั้งศูนย์ข้อมูลและบริการทางวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการเพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาหารฮาลาล พร้อมโครงข่าย

ขอขอบพระคุณ Professor Yasuhiko Suzuki, Department Global Epidemiology, Hokkaido University ที่ให้คำแนะนำทางด้านเทคนิค LAMP

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เอกวรรณ ลือพร้อมชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท ทุกคนที่เป็นกำลังใจ และให้คำแนะนำดีๆ ตลอดมา

ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบแด่อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฑ

สารบัญภาพ.....ฒ

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....3

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1 ศาสนาอิสลามกับอาหารฮาลาล.....5

2.1.1 แนวคิดเกี่ยวกับการปฏิบัติตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม.....5

2.1.2 หลักการและบทบัญญัติของศาสนาอิสลามเกี่ยวกับอาหารฮาลาล.....6

2.1.3 วิธีการเชือดหรือฆ่าสัตว์ตามหลักการศาสนาอิสลาม.....8

2.2 มาตรฐานและการผลิตอาหารฮาลาล.....8

2.2.1 มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์.....9

2.2.2 มาตรฐานฮาลาลจีเอ็มพี/เอชเอซีซีพี (Halal-GMP/HACCP).....11

2.2.3 มาตรฐานฮาลาลอาเซียน.....15

2.2.4 มาตรฐานฮาลาลัน ตอยยีบา.....16

2.3 การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์.....18

2.3.1 โครมาโตรกราฟฟี (Chromatography).....18

2.3.2 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โปรตีนจากเนื้อสุกร และเนื้อสัตว์อื่นๆ.....19

บทที่ หน้า

2.4 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสัตว์.....20
2.4.1 DNA hybridization.....20
2.4.2 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)..... 21
2.4.3 Single strand conformational polymorphism analysis (SSCP).....21
2.4.4 วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Polymerase Chain Reaction 22
2.4.5 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP) 23
2.4.6 Real-Time PCR.....23
2.5 Loop-mediated isothermal amplification assay.....24
2.5.1 หลักการ.....24
2.5.2 การออกแบบไพรเมอร์.....31
2.5.3 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP 32
2.5.3.1 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส.....32
2.5.3.2 การตรวจสอบโดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน.....33
2.5.3.4 การตรวจวัดลำดับเบสที่จำเพาะของปฏิกิริยา LAMP โดยการเติม cationic polymers.....35
2.5.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ.....36

3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....38
3.1 ตัวอย่าง.....38
3.1.1 เนื้อสัตว์.....38
3.1.2 เนื้อสัตว์ผสม.....39
3.1.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์.....39
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์อาหารด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard®Genomic DNA Purification Kit.....40
3.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry).....40
3.4 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี Loop-mediated isothermal

บทที่ หน้า

Amplification Reaction (LAMP).....41
3.4.1 การออกแบบไพร์เมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP.....41
3.4.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ของสุกรด้วยวิธี LAMP.....42
3.4.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับ ปฏิกิริยา LAMP.....42.
3.4.2.2 การทดสอบความเข้มข้นของเบตาอีนที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา LAMP.....43
3.4.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิว คลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ที่เหมาะสมสำหรับ ปฏิกิริยา LAMP.....43
3.4.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP 44
3.4.2.5 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP.....44
3.4.2.6 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP.....44
3.4.2.7 การทดสอบหาเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา LAMP.....44
3.5 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร.....45
3.5.1 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้วิธีเคลื่อนที่ผ่าน กระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส.....45
3.5.2 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน.....45
3.6 การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....45
3.7 การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP โดยวิธี Southern Blot ด้วยชุดน้ำยา สำเร็จรูป DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I.....46
3.7.1 การเตรียมโพรบ.....46
3.7.1.1 การหาลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่ใช้เป็นโพรบ.....46

บทที่ หน้า

3.7.1.2 การติดฉลากโพรบ.....47
3.7.1.3 การวัดปริมาณความเข้มข้นโพรบ.....47
3.7.2 Southern blotting.....48
3.7.3. ไฮบริไดเซชั่น (Hybridization).....49
3.7.4. Detection.....49
3.8 การทดสอบหาดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรที่ในความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ด้วยวิธี LAMP.....50
3.9 การทดสอบหาความจำเพาะ ของวิธี LAMP กับเนื้อสัตว์อื่นๆ.....51
3.10 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม ด้วยวิธี LAMP.....51
3.10.1 การหาความไว ในการตรวจดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP.....51
3.10.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร ในเนื้อสัตว์ผสม โดยวิธี LAMP.....51
3.11 การทดสอบหาความไว ในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม ด้วยวิธี PCR.....52
3.11.1 การหาความไว ในการตรวจดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี PCR.....52
3.11.2 การหาความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร ในเนื้อสัตว์ผสม โดยวิธี PCR.....52
3.12 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม ด้วย วิธี Real-Time PCR.....53
3.12.1 การหาความไว ในการตรวจดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี Real-Time PCR.....53
3.12.2 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร ในเนื้อสัตว์ผสม โดยวิธี Real-Time PCR.....54
3.13 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....53
3.13.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจเนื้อสุกร และ เนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....54
3.14 การทดสอบหาความจำเพาะ กับเนื้อสัตว์อื่นๆ โดยวิธี LAMP-Dot Blotting 58

บทที่ หน้า

3.15 การทดสอบหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรและเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....58
3.15.1. การหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....58
3.15.2. การทดสอบหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....59
3.16 การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิค LAMP reaction.....59
3.17 การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิค LAMP Dot-Blotting.....59

4 ผลการทดลอง.....60
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ผสม และผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์.....60
4.2 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification Reaction.....60
4.2.1 การออกแบไพร์เมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP 60
4.2.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี LAMP 68
4.3 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ SYBR Green I..... 75
4.4 การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....78
4.5 การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP โดยวิธี Southern Blot.....78
4.5.1 การหาลำดับเบสของโพรบที่เตรียมจากปฏิกิริยา PCR.....78
4.5.2 การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP โดยวิธี Southern Blot.....81
4.6 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรที่ผ่านกระบวนการและอุณหภูมิต่างๆ ด้วยวิธี LAMP.....81
4.7 การวิเคราะห์ความจำเพาะของวิธี LAMP กับเนื้อสัตว์อื่นๆ.....85
4.8 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี LAMP.....85

บทที่ หน้า

4.9 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี PCR.....88
4.10 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี Real-Time PCR.....88
4.11 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี LAMP.....93
4.11.1 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี LAMP.....93
4.11.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี LAMP.....93
4.12 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี PCR.....96
4.12.1 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี PCR.....96
4.12.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี PCR.....96
4.13 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี Real-Time PCR.....96
4.13.1 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี Real-Time PCR.....99
4.13.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี Real-Time PCR.....99
4.14 การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting.....106
4.15 การวิเคราะห์ความจำเพาะโดยวิธี LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์อื่นๆ.....111
4.16 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....111
4.17 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting.....116
4.17.1 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี Real-Time PCR.....116

บทที่ หน้า

4.17.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี Real-Time PCR.....116
4.18 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิค LAMP reaction.....116
4.19 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิค LAMP-Dot Blotting.....126
4.20 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ค่าความไว(Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV) ของเทคนิค LAMP(Electrophoresis), ไซเบอร์กรีน (แสงไฟธรรมดา), ไซเบอร์กรีน(แสงยูวี), Real-Time PCR, LAMP-Dot Blotting.....129

5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....131

รายการอ้างอิง.....142
ภาคผนวก.....157
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....162

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

3.1 ตารางแสดงอัตราส่วนของเนื้อสัตว์ผสมระหว่างเนื้อสุกรกับเนื้อไก่ และเนื้อสุกรกับเนื้อวัว ตั้งแต่ 0.001-75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก).....39

3.2 ตารางแสดงปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะ 1-5.....43

3.3 ตารางการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกับโพรบที่ทำการติดฉลาก.....47

3.4 แสดงสภาวะของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ที่ใช้ทำการทดลองเพื่อลดระยะเวลา.....57

4.1 ตารางแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3', ความยาว, ค่า Tm, dGที่ปลาย 5' และ 3', อัตรา GC ของไพรเมอร์ทั้ง 4เส้นในปฏิกิริยา LAMP ที่ดีที่สุดที่เลือก.....65

4.2 ตารางสรุปจำนวนผลจากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธีวิเคราะห์ต่างๆ.....127

4.3 ตารางแสดงค่าการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความไว(Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) ของเทคนิค LAMP(Electrophoresis), LAMP ไซเบอร์กรีน (แสงไฟธรรมดา), LAMP ไซเบอร์กรีน(แสงยูวี), Real-Time PCR และ LAMP-Dot Blotting.....130

ภาพประกอบ หน้า

4.4 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์.....64

4.5 แสดงตัวอย่างชุดของไพรเมอร์ที่โปรแกรมออกแบบให้.....66

4.6 แสดงลำดับเบส และบริเวณไพร์เมอร์ที่คัดเลือก.....67

4.7 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....69

4.8 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เบตาอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ.....70

4.9 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ.....72

4.10 สดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ.....73

4.11 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้อุณหภูมิต่างๆกัน.....74

4.12 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เวลาต่างๆกัน.....76

4.13 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เครื่องมือที่ให้ความร้อนต่างๆกัน.....77

4.14 แสดงภาพผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน.....79

4.15 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตของปฏิกิริย๊า LAMP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....80

4.16 แสดงลำดับเบสผลผลิต PCR ดีเอ็นเอสุกรที่ใช้เป็นโพรบ.....82

4.17 แสดงผลการทำ Southern blotting ของผลผลิต LAMP ของดีเอ็นเอสุกร และดีเอ็นเอสุกรที่ตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ.....83

4.18 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนภายที่อุณหภูมิต่างๆ 84

4.19 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวัน การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP กับเนื้อสัตว์ต่างๆ.....86

ภาพประกอบ หน้า

4.20 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวัน การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสุกร 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร.....87

4.21 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา PCR ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสุกร 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร.....89

4.22 แสดงกราฟ Amplification Curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกร ที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร.....90

4.23 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกร ที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร.....91

4.24 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตการทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสุกร 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร.....92

4.25 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวัน การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ ที่ความเข้มข้น 75-0.001%.....94

4.26 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวัน การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 75-0.001% 95

4.27 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....97

4.28 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....98

4.29 แสดงกราฟ Amplification Curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....100

4.30 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกร ผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....101

4.31 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....102

ภาพประกอบ หน้า

4.32 แสดงกราฟ Amplification curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....103
4.33 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกร ผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....104
4.34 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75%-0.001%.....105
4.35 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร ของสภาวะที่ 1 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....108
4.36 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร ของสภาวะที่ 2 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....108
4.37 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร ของสภาวะที่ 3 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....109
4.38 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร ของสภาวะที่ 4 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....109
4.39 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของ สภาวะที่ 5.1.1, 5.2.1 และ 5.3.1 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....112
4.40 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอ สุกรของสภาวะที่ 5.1.2, 5.2.2 และ 5.3.2 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....113
4.41 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของ สภาวะที่ 5.1.1, 5.2.1 และ 5.3.1 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....114
4.42 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการทดสอบความจำเพาะโดยวิธี LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์อื่นๆ.....115
4.43 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการทดสอบความจำเพาะของดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....115
4.44 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสม เนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75%-0.001% โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....117
4.45 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกร ผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75%-0.001% โดยวิธี LAMP-Dot Blotting.....117

ภาพประกอบ หน้า

4.46 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 1-10 ด้วยวิธี LAMP....119
4.47 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 11-25 ด้วยวิธี LAMP....120
4.48 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 26-40 ด้วยวิธี LAMP....121
4.49 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 41-55 ด้วยวิธี LAMP....122
4.50 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 56-70 ด้วยวิธี LAMP....123
4.51 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 71-85 ด้วยวิธี LAMP....124
4.52 การทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลขที่ 86-100 ด้วยวิธี LAMP....125
4.53 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมายเลข 1-100 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting....128

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 แสดงขั้นที่ 1 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับกับไพร์เมอร์.....25

2.2 แสดงขั้นที่ 2 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพร์เมอร์ FIP ที่บริเวณ F2 เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 3'.....26

2.3 แสดงขั้นที่ 3 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ F3.....26

2.4 แสดงขั้นที่ 4 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ 27

2.5 แสดงบริเวณของผลผลิต LAMP ในขั้นตอนที่ 3 รูปที่ 2.3 ที่สามารถจับกับเป็นห่วงที่ปลาย 5'.....27

2.6 แสดงขั้นที่ 6 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพร์เมอร์ BIP และ B3.....28

2.7 แสดงขั้นที่ 7 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ.....28

2.8 แสดงขั้นที่ 8 ของปฏิกิริยา LAMP ของโครงสร้างหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบๆ.....29

2.9 แสดงขั้นที่ 8-11 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบ.....30

2.10 แสดงไพร์เมอร์ของปฏิกิริยา LAMP.....31

2.11 แสดงระยะห่างของไพร์เมอร์ที่เหมาะสม.....32

2.12 แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา LAMP ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน.....33

2.13 แสดงโครงสร้างของไซเบอร์กรีนวัน.....34

2.14 แสดงกราฟของไซเบอร์กรีนวันที่เข้าจัยกับดีเอ็นเอสายคู่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี.....34

2.15 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ด้วยสีไซเบอร์กรีนวัน.....34

2.16 แสดงปฏิกิริยาการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex.....35

3.1 แสดงไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP reaction.....41

3.2 แสดงภาพการย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงสู่แผ่นเมมเบรน.....49

4.1 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์.....61

4.2 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอจากเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ 75- 0.001 เปอร์เซ็นต์.....62

4.3 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอจากเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว 75-0.001 เปอร์เซ็นต์.....63