

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

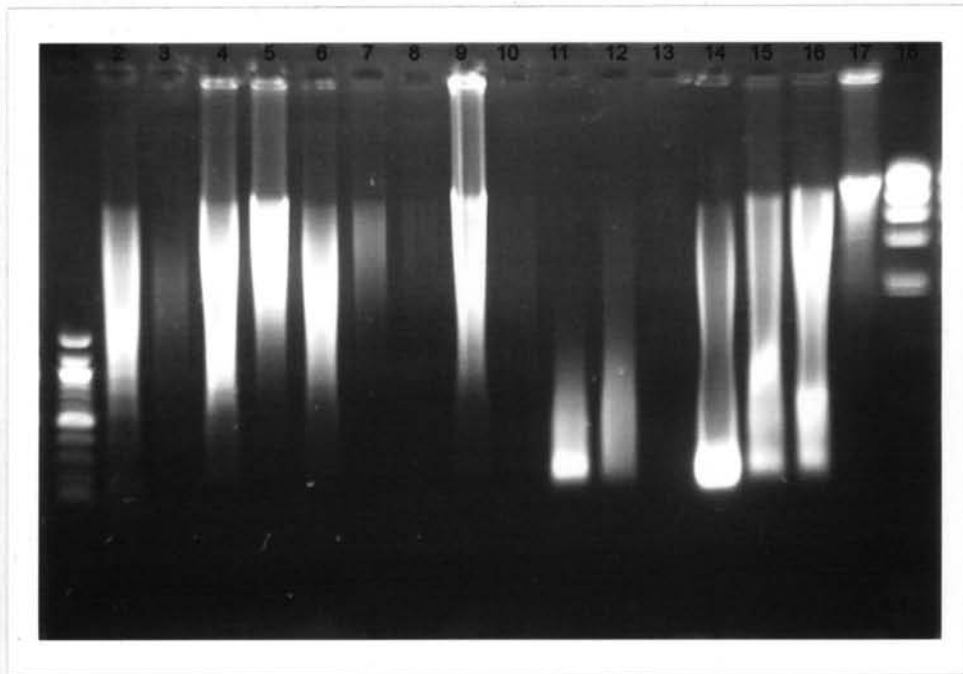
#### 1. การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ผสม และผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์

นำเนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ผสม และผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการบดด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit แล้วนำมาตรวจสอบผลผลิต ด้วยวิธีการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ Hind III โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 16 ชนิด ดังนี้ เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อเป็ด เนื้อนกกระจกเทศ เนื้อสุนัข เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกบ เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อกุ้ง เนื้อหอยนางรม เนื้อหอยเชลล์ เนื้อหอยลาย และเนื้อสุกร ผลดังแสดงในรูปภาพที่ 4.1 สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อผสม สามารถสกัดดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.2 และ ดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงรูปภาพที่ 4.3 และผลการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง คือดีเอ็นเอเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง เนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง เนื้อปลา 18 ตัวอย่าง เนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 จะเห็นแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นสเมียร์ยาวจากดีเอ็นเอขนาดใหญ่ถึงขนาดเล็ก แสดงถึงคุณภาพดีเอ็นเอปานกลาง สามารถใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา LAMP, PCR และ Real-Time PCR ต่อไปได้ ทั้งนี้มีผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ ดังนี้ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว 2 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ 12 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลา 19 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อกุ้ง 7 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 11 ตัวอย่าง จึงไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองนี้

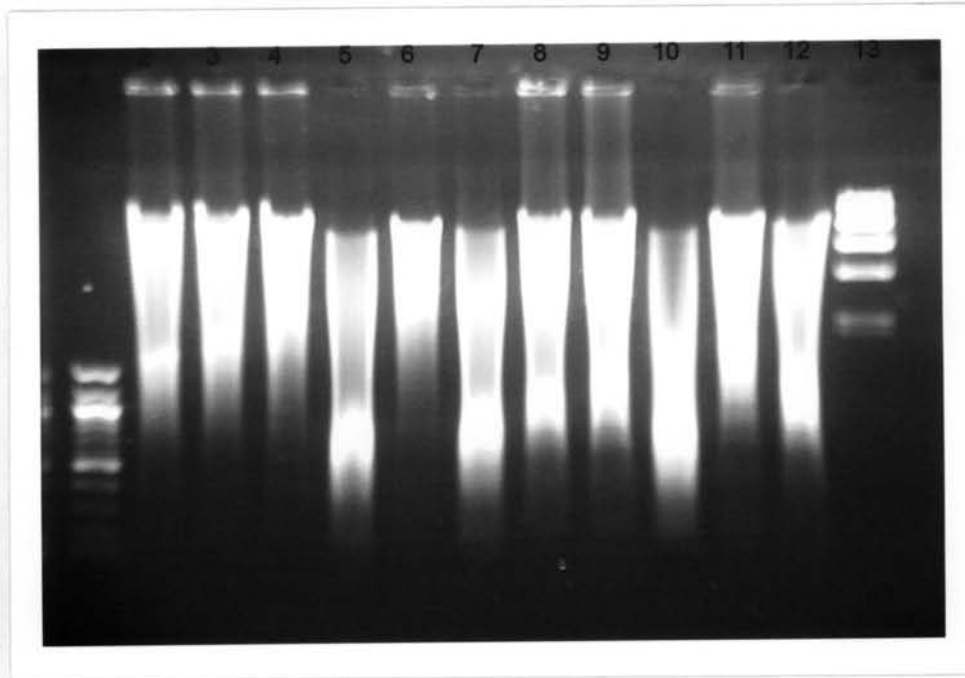
#### 2. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification Reaction

##### 2.1. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP

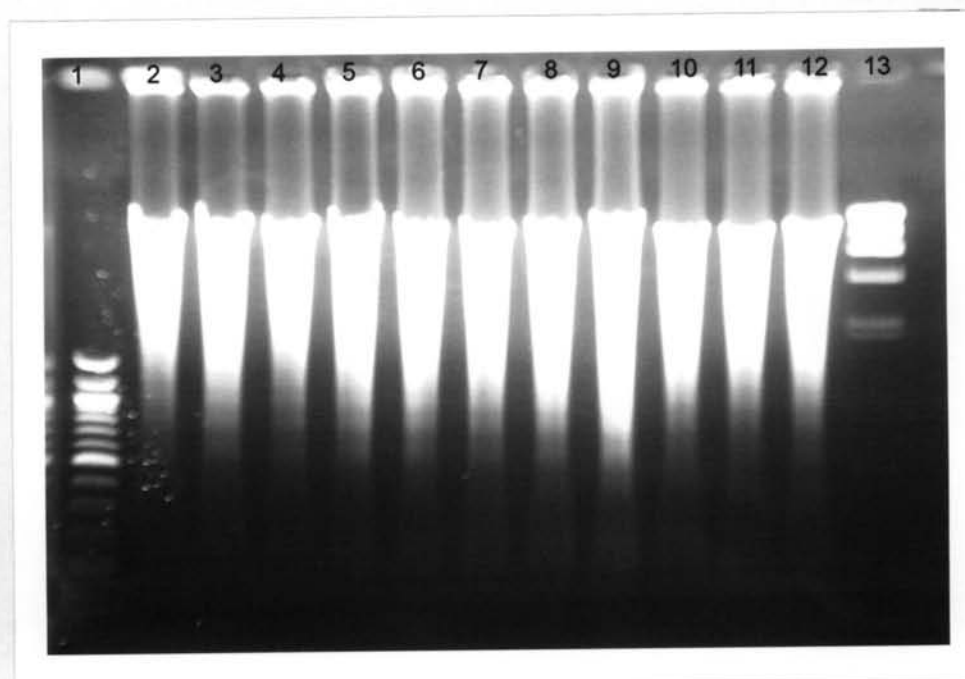
การออกแบบไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่จำเพาะกับยีนของสุกร บริเวณยีน *cytochrome b* จากโปรแกรม Primer Explorer V3 โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากธนาคารยีน AF034253 บริเวณ 15342-16481 ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 เส้น ดังนี้ F3, B3, FIP และ BIP โดยที่ Forward Inner Primer (FIP) จะประกอบด้วยบริเวณ F1c และ F2, และ Backward Inner Primer (BIP) จะประกอบด้วยบริเวณ B1c และ B2 จากนั้นทำการคัดเลือกไพรเมอร์ชุดที่ดีที่สุด



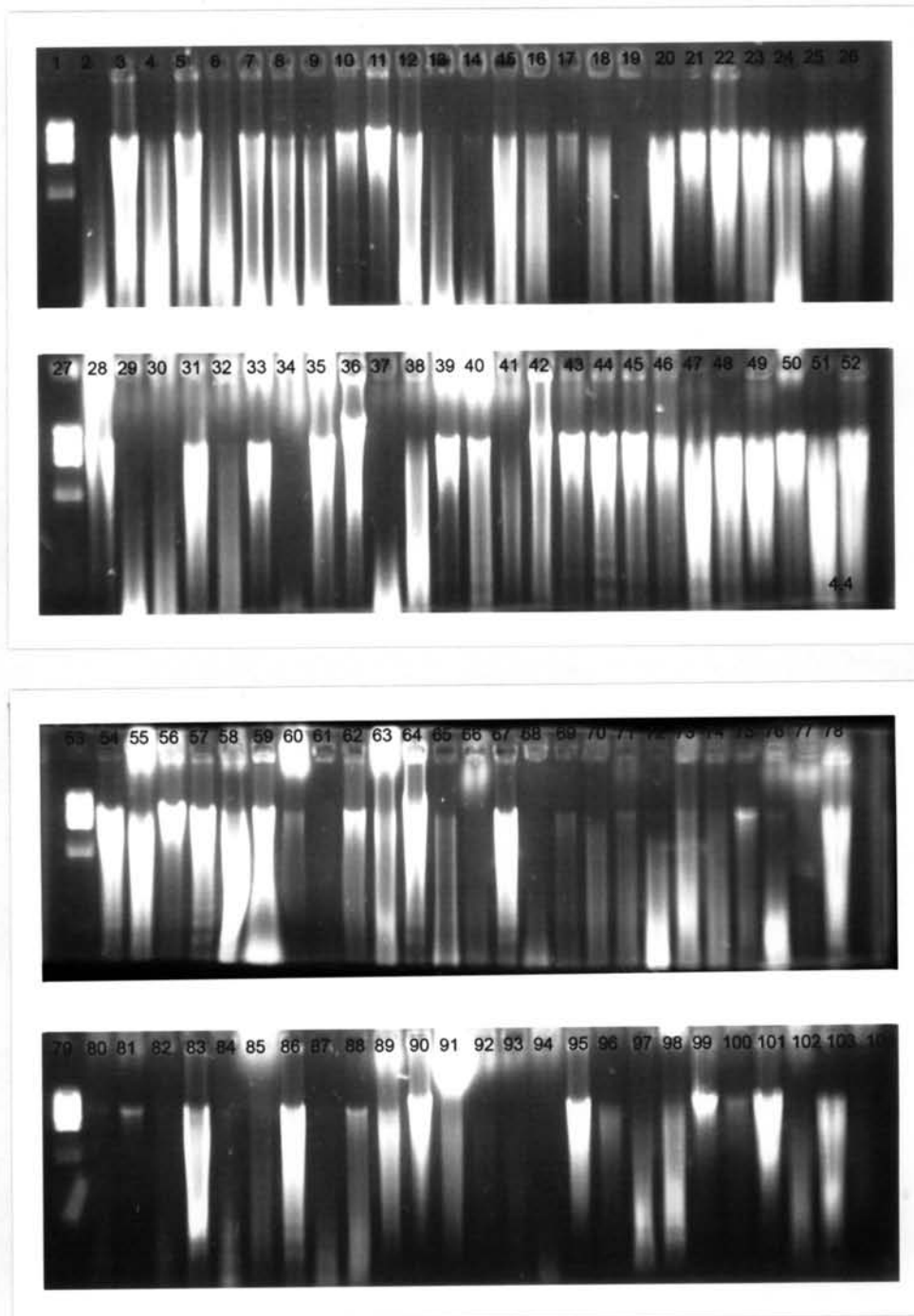
รูปที่ 4.1 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2 ดีเอ็นเอของเนื้อไก่, แถวที่ 3 ดีเอ็นเอของเนื้อวัว, แถวที่ 4 ดีเอ็นเอของเนื้อแพะ, แถวที่ 5 ดีเอ็นเอของเนื้อแกะ, แถวที่ 6 ดีเอ็นเอของเนื้อเป็ด, แถวที่ 7 ดีเอ็นเอของเนื้อนกกระทา, แถวที่ 8 ดีเอ็นเอของเนื้อสุนัข, แถวที่ 9 ดีเอ็นเอของเนื้อปลาชามอน, แถวที่ 10 ดีเอ็นเอของเนื้อกบ, แถวที่ 11 ดีเอ็นเอของเนื้อปลาหมึก, แถวที่ 12 ดีเอ็นเอของเนื้อปู, แถวที่ 13 ดีเอ็นเอของเนื้อกุ้ง, แถวที่ 14 ดีเอ็นเอของเนื้อหอยนางรม, แถวที่ 15 ดีเอ็นเอของเนื้อหอยเชลล์, แถวที่ 16 ดีเอ็นเอของเนื้อหอยลาย, แถวที่ 17 ดีเอ็นเอของเนื้อสุกร, แถวที่ 18 ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII



รูปที่ 4.2 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอเนื้อสุกผสมเนื้อไก่อ 75-0.001 เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-12 ดีเอ็นเอของเนื้อสุกผสมเนื้อไก่อที่ 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.005% และ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แถวที่ 13 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII



รูปที่ 4.3 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอเนื้อสุกผสมเนื้อวัว 75-0.001 เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-12 ดีเอ็นเอของเนื้อสุกผสมเนื้อวัวที่ 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.005% และ 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แถวที่ 13 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII



รูปที่ 4.4 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง; แถวที่ 1, 27, 53 และ 79 แสดงดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐาน  $\lambda$ HindIII, แถวที่ 2-11 ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 15 ตัวอย่าง แถวที่ 12-52 ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 25 ตัวอย่าง แถวที่ 54-78 ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 15 ตัวอย่าง เนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง เนื้อปลา 9 ตัวอย่าง แถวที่ 80-104 ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อปลา 9 ตัวอย่าง เนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 2 ตัวอย่างและผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง

โดยดูจากค่าพลังงาน  $\Delta G$  ของ dimer จะต้องไม่น้อยกว่า -2.5 กิโลแคลอรี/โมล ผลปรากฏว่าได้จำนวนชุดของไพรเมอร์ที่ดีทั้งหมด 36 ชุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.5 และไพรเมอร์ที่ได้นั้นต้องมีความเสถียร หรือ ค่า  $\Delta G$  ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ F2 ปลาย 5' ของไพรเมอร์ F1c ปลาย 3' ของไพรเมอร์ B2 และปลาย 5' ของไพรเมอร์ B1c น้อยกว่าเท่ากับ -4.0 กิโลแคลอรี/โมล พบว่าได้ไพรเมอร์ที่ดีที่สุด 1 ชุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ ตำแหน่งลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3', ความยาว, ค่า Tm,  $\Delta G$  ที่ปลาย 5' และ 3', อัตรา GC ของไพรเมอร์ F3, B3, FIP, BIP, F2, F1C, B2 และ B1C ดังสรุปในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3', ความยาว, ค่า Tm,  $\Delta G$  ที่ปลาย 5' และ 3', อัตรา GC ของไพรเมอร์ทั้ง 4 เส้นในปฏิกิริยา LAMP ที่ดีที่สุดที่เลือก

ไพรเมอร์	ตำแหน่งปลาย 5'	ตำแหน่งปลาย 3'	ความยาว	Tm	5' $\Delta G$	3' $\Delta G$	อัตรา GC	ลำดับเบส
F3	468	485	18	56.84	-5.79	-4.76	0.56	CGGAACAGACCTCGTAGA
B3	619	636	18	56.23	-4.15	-5.34	0.50	TGAGATTCCGGTAGGGTT
FIP								TGGAAGGCGAAGAATCGTGT- ATGAATCTGAGGGGGCTT
BIP								CTGCCATTATTACCGCC- GTTGGATCCGGTTTCGTG
F2	486	503	18	57.05	-3.45	-6.19	0.50	ATGAATCTGAGGGGGCTT
F1c	526	545	20	61.37	-4.86	-5.74	0.50	TGGAAGGCGAAGAATCGTGT
B2	601	618	18	57.45	-5.02	-5.35	0.56	GTTGGATCCGGTTTCGTG
B1c	553	573	21	61.28	-6.25	-7.53	0.56	CTGCCATTATCATTACCGCC

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP ได้แล้วจึงสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์แล้วนำมาทำปฏิกิริยา LAMP โดยจะหาความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาได้แก่ เบตาอิน, ดิออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์, แมกนีเซียมซัลเฟต, อุณหภูมิ, เวลา, และเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสมต่อไป

Primer Set List DesignId 070326123119

1. Turn on the check box of a primer set to see its detailed information.  
 2. Push "Details" button in order to transfer to page "Primer Sets Details".

Sorting rule [None] / Displayed 1 - 36 / [outputs: 36 sets]

**Primer set: sorting rule [None]**

**Target DNA** TCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTCCGTCGACAAAGCAACCTCACACGATTCTCGCCTTC

**(Complement)** agtcgatagg gaatatagcc ttgtctggag catcttactt agactcccc gaaaaggcag ctgtttcgtt gggagtgctc taagaagcgg aag

**CONSENSUS(\*)** xxx

Primer ID(dimer)	451	461	471	481	491	501	511	521	531	541
<input checked="" type="checkbox"/> [1]	-2.49 [1]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [2]	-2.49 [2]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [3]	-2.49 [3]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [4]	-2.49 [4]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [5]	-2.49 [5]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [6]	-2.49 [6]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [7]	-2.49 [7]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [8]	-2.49 [8]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						tggtc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [9]	-2.49 [9]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						gtgc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [10]	-2.49 [10]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						gtgc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [11]	-2.49 [11]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						gtgc taagaagcgg aag		
<input type="checkbox"/> [12]	-2.49 [12]	CGG AACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTT						gtgc taagaagcgg aag		

รูปที่ 4.5 แสดงตัวอย่างชุดของไพรเมอร์ที่โปรแกรมออกแบบให้





## 2.2. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification reaction

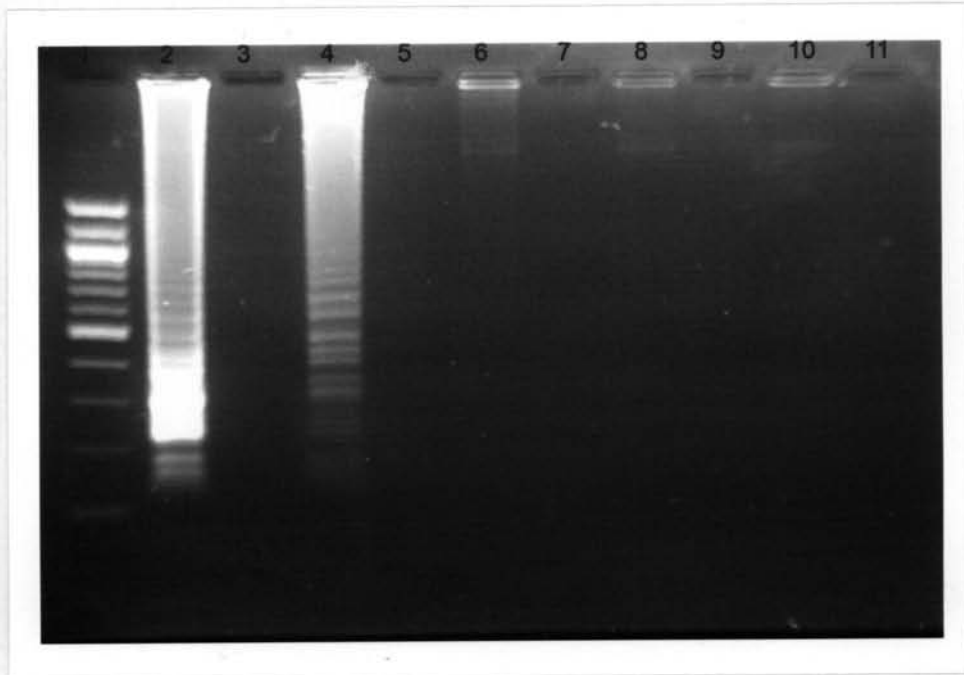
2.2.1. การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ BIP, FIP, B3 และ F3 ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP จะเริ่มต้นจากการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ FIP BIP F3 และ B3 ที่เหมาะสมโดยใช้สภาวะที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 สภาวะ ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกร ดังวิธีการทดลองในตารางที่ 3.2 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส พบว่าสภาวะที่ 1 และ 2 จะเห็นลักษณะผลผลิต LAMP เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีหลายขนาดคล้ายขั้นบันได (แถวที่ 2 และ 4) ในขณะที่ สภาวะที่ 3-5 (แถวที่ 6 , 8 และ 10) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใดๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และความเข้มข้นไพรเมอร์ที่สูงขึ้นจะเพิ่มผลผลิตของปฏิกิริยา ดังนั้น ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมเป็นดังนี้ ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นไพรเมอร์ F3 และ B3 เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์

### 2.2.2. การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอิน ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

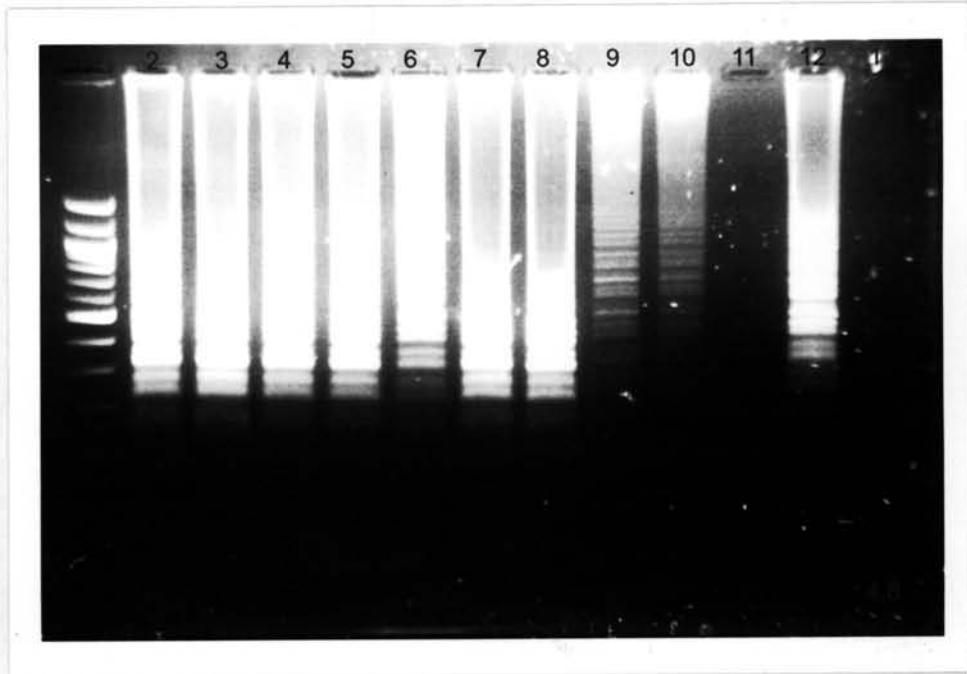
การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสมจะใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 โมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.1. ดังนี้ FIP และ BIP เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์ ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกร ผลผลิต LAMP ที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดคล้ายขั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.8 พบว่าความเข้มข้นของเบตาอินที่ต่ำกว่า 0-0.6 โมลาร์ ทำให้เกิดผลบวกปลอม (แถวที่ 3, 5, 7 และ 9) ขณะที่ความเข้มข้นของเบตาอินที่ 0.8 โมลาร์ และ 1.0 โมลาร์ (แถวที่ 10-13) ไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอม โดยที่ความเข้มข้นของเบตาอินที่ 1.0 โมลาร์ ให้ผลผลิต LAMP ในปริมาณที่สูงกว่าเล็กน้อย

### 2.2.3. การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสมจะใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 1.4 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ FIP และ BIP เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของเบตาอินเท่ากับ 0.8 โมลาร์ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกร ผลผลิต LAMP ที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลาย



รูปที่ 4.7 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เพอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกรที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ในสภาวะที่ 1, 2, 3, 4, 5 ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ในสภาวะที่ 1, 2, 3, 4, 5 ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เบตาอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุนัขที่ใช้ปริมาณเบตาอีนเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ไมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้ปริมาณเบตาอีนเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ไมลาร์ ตามลำดับ

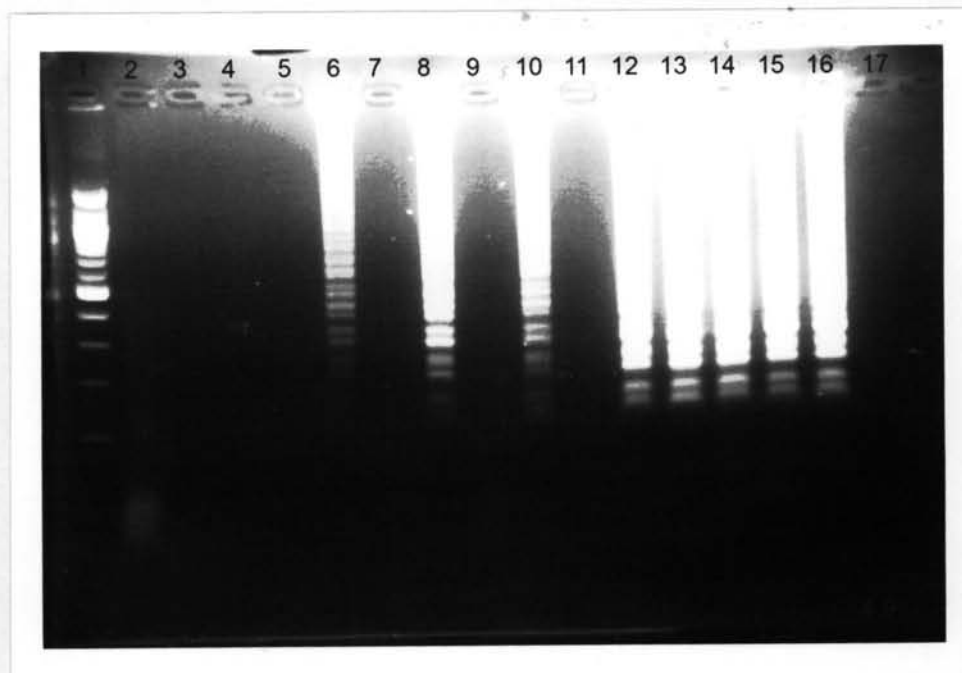
ขนาดคล้ายชั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.9 ผลพบว่าดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 0-0.2 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 2-5) ไม่เหมาะสมเนื่องจากไม่ปรากฏผลผลิต LAMP ในตัวอย่างที่เป็น Positive control ขณะที่ความเข้มข้นที่ 1.0 และ 1.2 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 12-16) ทำให้เกิดผลบวกปลอม ความเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสมคือที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 6-11) โดยที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดผลผลิต LAMP มากขึ้น

#### 2.2.4. การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

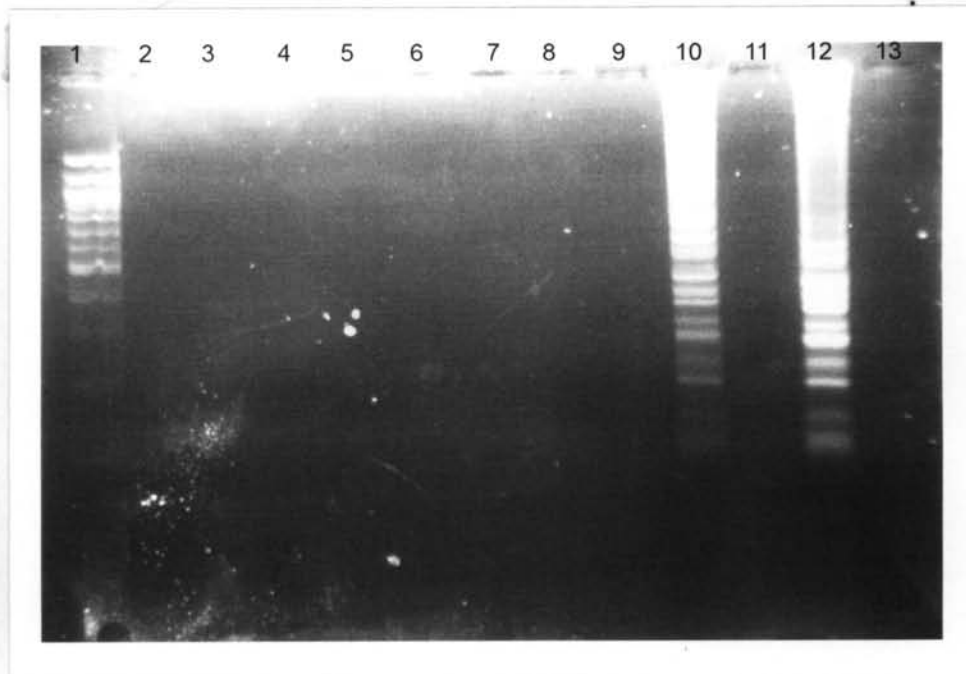
การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมโดยจะใช้เวลาเข้มข้นตั้งแต่ 0- 10 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ FIP และ BIP เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของเบตาอินเท่ากับ 0.8 โมลาร์ และความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเท่ากับ 1.4 มิลลิโมลาร์ ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกร ผลผลิต LAMP ที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดคล้ายชั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.10 ผลพบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-6 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 2-9) ไม่เหมาะสมเนื่องจากไม่ปรากฏผลผลิต LAMP ในตัวอย่างที่เป็น Positive control ความเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสมคือที่ 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ (แถวที่ 10-13) โดยที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดผลผลิตมากขึ้น

#### 2.2.5. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

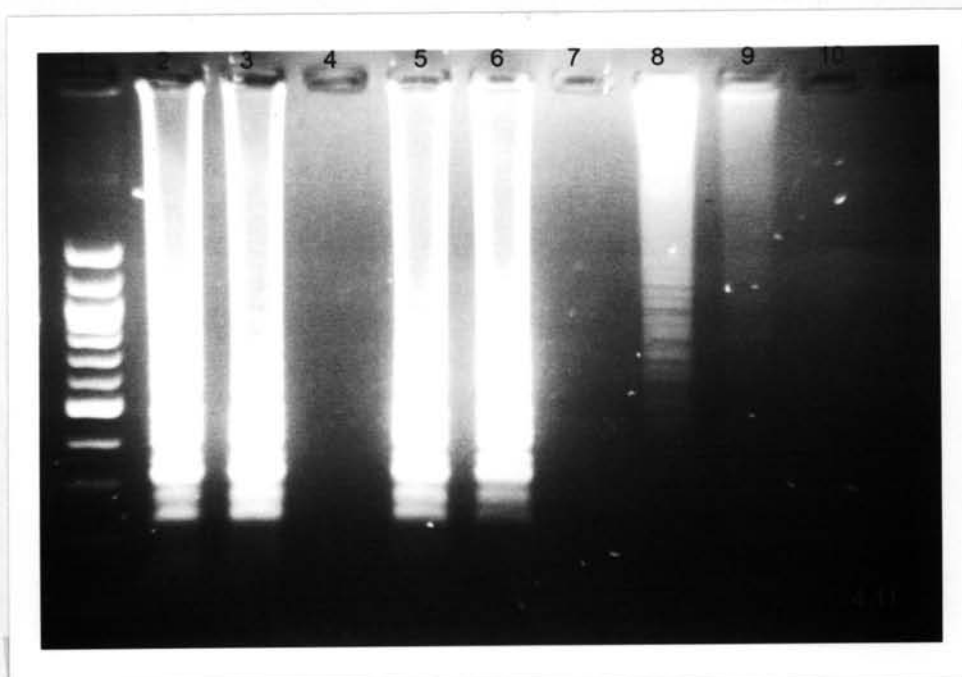
การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP จะใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 60-65 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ ในปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.1-2.2.4 ดังนี้ ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์, เบตาอิน ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ผลผลิต LAMP ที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดคล้ายชั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.11 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (แถวที่ 2 และ 3) และ อุณหภูมิ 63 (แถวที่ 5 และ 6) องศาเซลเซียส จะเห็นแถบดีเอ็นเอเข้มที่สุด ขณะที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (แถวที่ 8 และ 9) จะเห็นแถบดีเอ็นเอจางลงมาก อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดผลผลิตน้อยลง ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกร จะอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.9 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 เป็น ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร ที่ใช้ปริมาณดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 เป็น ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ที่ใช้ปริมาณดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของของดีเอ็นเอของ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้อุณหภูมิต่างๆกัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 3 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร ที่บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, แถวที่ 4 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, แถวที่ 5, 6 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร ที่บ่มที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส แถวที่ 7 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส, แถวที่ 8, 9 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร ที่บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แถวที่ 10 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

### 2.2.6. การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP จะใช้เวลาตั้งแต่ 30-120 นาที และใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆในปฏิกิริยาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.1-2.2.5 ดังนี้ ความเข้มข้นไพรมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์, เบตาอิน ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ปุ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลผลิต LAMP ที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดคล้ายขั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.12 ผลพบว่าระยะเวลาที่ 30 นาที และ 45 นาที ไม่เหมาะสมเนื่องจากไม่ปรากฏผลผลิต LAMP หรือเกิดผลผลิตน้อย (แถวที่ 2 และ 4) ขณะที่ ระยะเวลาที่ 90 นาที และ 120 นาทีทำให้เกิดผลผลิตมากขึ้น (แถวที่ 8 และ 10) แต่ก็ทำให้เกิดผลบวกปลอมด้วย (แถวที่ 9 และ 11) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมคือที่ 60 นาที (แถวที่ 6 และ 7) เนื่องจากได้ผลผลิตมากที่สุดและไม่เกิดผลบวกปลอม

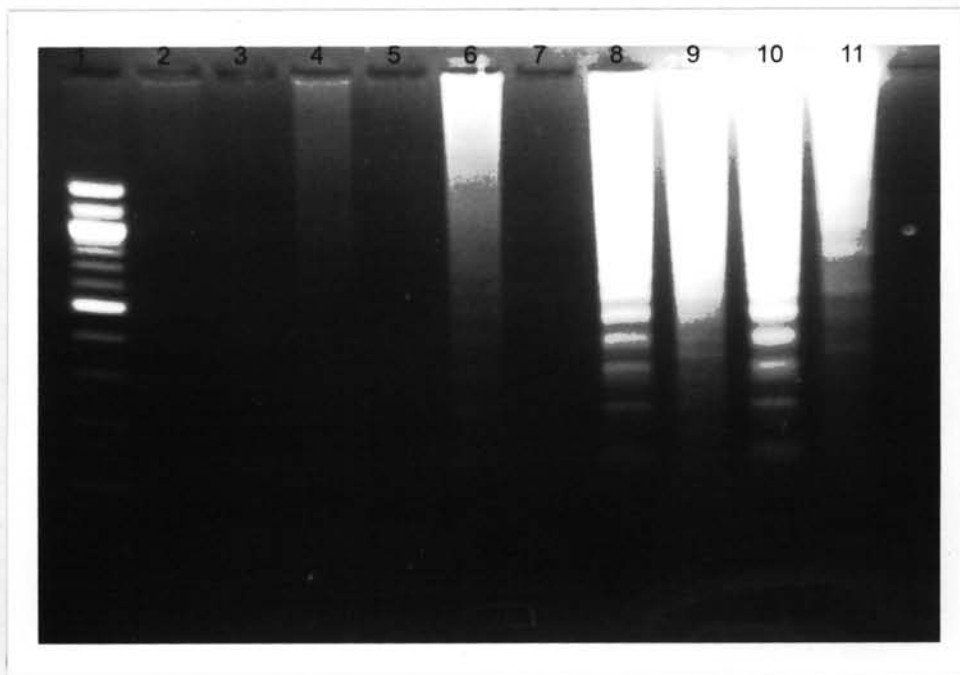
### 2.2.7. การทดสอบหาเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

การทดสอบหาเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP จะใช้เครื่องมือทั้งหมด 5 ประเภท คือ ก่อ่งร้อนควบคุมอุณหภูมิ(Heat block) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(Water bath) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) และ ตู้อบความร้อนแห้ง(Hot air oven) และใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆในปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.1-2.2.4 ดังนี้ ความเข้มข้นไพรมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์, เบตาอิน ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ปุ่มที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผลผลิต LAMPที่ได้จะเห็นเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดคล้ายขั้นบันไดดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสมคือ ก่อ่งร้อนควบคุมอุณหภูมิ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และเครื่อง Thermal Cycler (แถวที่ 2-7) ส่วน ตู้บ่มเชื้อและตู้อบความร้อนแห้งไม่สามารถใช้เป็นอุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP เนื่องจากไม่ปรากฏผลผลิต LAMP ขึ้นในตัวอย่างดีเอ็นเอสุกรที่ใช้เป็น positive control (แถวที่ 8-11)

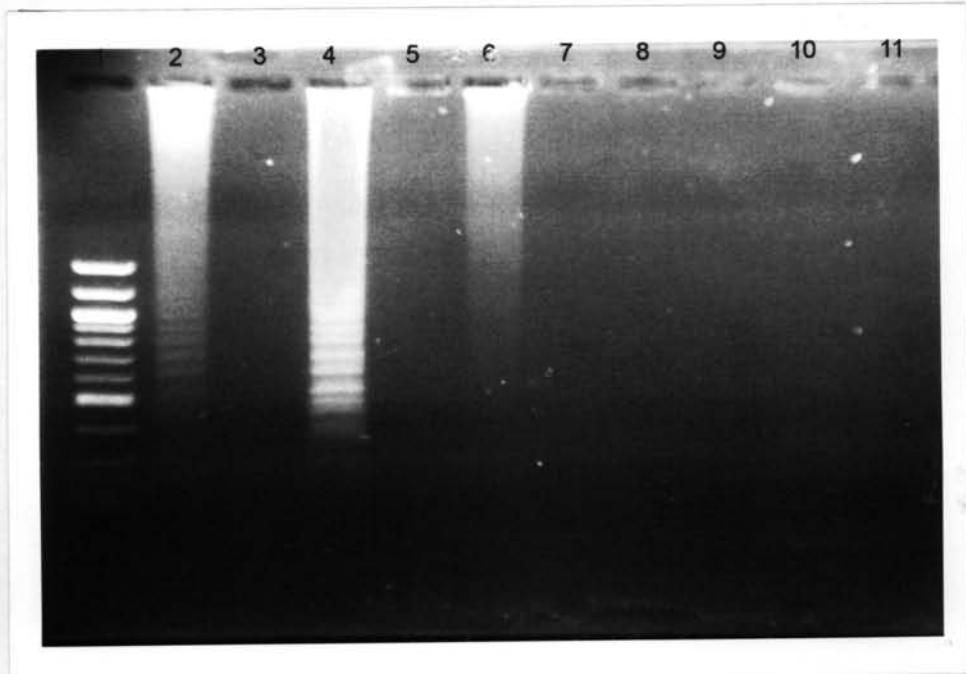
## 3. การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน (SYBR Green I)

การตรวจสอบผลผลิตอีกวิธีหนึ่งของปฏิกิริยา LAMP คือการตรวจสอบผลผลิตด้วยไซเบอร์กรีนวัน เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบผลผลิตLAMPด้วยตาเปล่าได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆ ในขั้นการตรวจสอบไซเบอร์กรีนวันจึงต้องมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ใน





รูปที่ 4.12 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เพอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เวลาต่าง ๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกที่ใช้เวลาในการบ่ม 30, 45, 60, 90, 120 นาทีตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11 ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้เวลาในการบ่ม 30, 45, 60, 90, 120 นาทีตามลำดับ



รูปที่ 4.13 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้เครื่องมือที่ให้ความร้อนต่างกัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 4, 6, 8, 10 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, ถังร้อนควบคุมอุณหภูมิ, เครื่อง Thermal Cycler, ตู้บ่มเชื้อ และ ตู้อบความร้อนแห้ง ตามลำดับ แถวที่ 3, 5, 7, 9, 11 เป็นผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, ถังร้อนควบคุมอุณหภูมิ, เครื่อง Thermal Cycler, ตู้บ่มเชื้อ และ ตู้อบความร้อนแห้ง ตามลำดับ

ปฏิกิริยา โดยเติมไซเบอร์กรีนวันที่ความเข้มข้นที่เจือจางใน DMSO 10-10000 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP พบว่าที่ความเข้มข้น 10000 และ 1000 เท่า สามารถมองเห็นผลผลิตได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดาโดยหลอด positive control จะเห็นสีออกเหลืองเขียวที่ความเข้มข้น 10000 เท่า จะเห็นการเรืองแสงสีเขียวชัดเจนที่สุดที่ความเข้มข้น 1000 เท่า และ สีจะจางลงถ้าปริมาณไซเบอร์กรีนวันที่เจือจางเหลือ 100 เท่า และไม่เกิดการเรืองแสงเลยที่ความเข้มข้น 10 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่หลอด negative control จะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้มที่ความเข้มข้น 10000 เท่า และสีส้มจะจางลงที่ความเข้มข้น 1000 เท่า แต่ที่ความเข้มข้น 100 และ 10 เท่า พบว่าปริมาณไซเบอร์กรีนวันที่เจือจางมากเกินไปทำให้ไม่สามารถมองเห็นสีภายใต้แสงไฟธรรมดาได้ ขณะเดียวกันการตรวจสอบผลผลิตด้วยไซเบอร์กรีนวันที่ภายใต้แสงยูวี พบว่าหลอด positive control จะเห็นการเรืองแสงสีเขียว ชัดเจนที่สุดที่ความเข้มข้น 10000 เท่า และ สีจะจางลงถ้าปริมาณไซเบอร์กรีนวันที่เจือจางเหลือ 1000 และ 100 เท่า ตามลำดับ และไม่เกิดการเรืองแสงเลยที่ความเข้มข้น 10 เท่า ในขณะที่หลอด negative control จะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้มที่ความเข้มข้น 10000 เท่า และสีส้มจะจางลงที่ความเข้มข้น 1000 เท่า จนไม่เห็นสีเลยที่ความเข้มข้น 100 และ 10 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ดังนั้นความเข้มข้นของไซเบอร์กรีนวันที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างของผลผลิต LAMP ที่เป็นผลบวกและเป็นผลลบ จากกันได้ชัดเจนที่สุดทั้งภายใต้แสงไฟธรรมดาและภายใต้แสงยูวีจะเท่ากับ 1000 เท่า

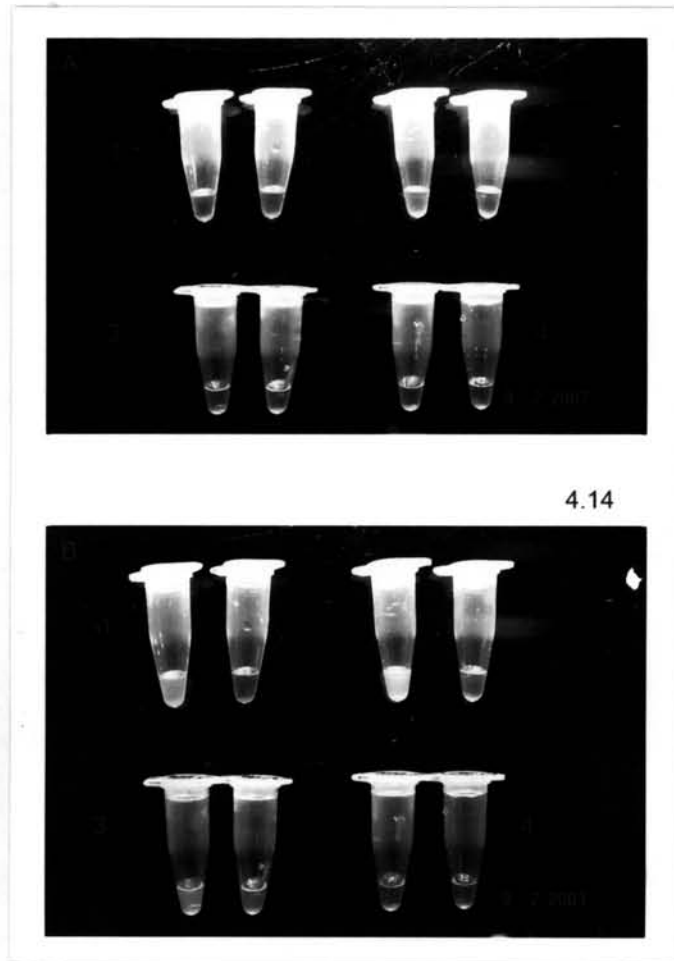
#### 4. การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อตรวจสอบยืนยันว่าผลผลิต LAMP ที่เกิดขึ้นเป็นยีน *cytochrome b* ของสุกรจริง จึงทำการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Taq*I ที่สามารถตัดบริเวณห่วง(loop) ทั้งสองข้างของผลผลิต LAMP จากนั้นนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่าหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 คู่เบส (แถวที่ 3) และผลที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Taq*I (แถวที่ 4) จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้

#### 5. การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยวิธี Southern Blot

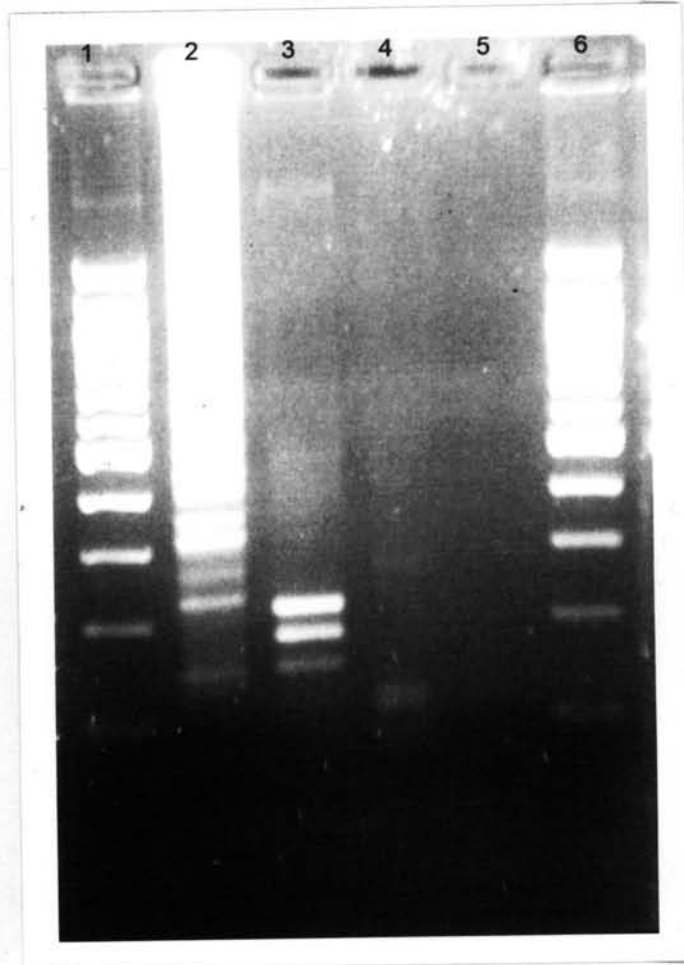
##### 5.1 การหาลำดับเบสของโพรบที่เตรียมจากปฏิกิริยา PCR

นอกจากการทดสอบยืนยันว่าผลผลิต LAMP ที่เกิดขึ้นเป็นยีน *cytochrome b* ของสุกรจริงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว การตรวจสอบยืนยันอีกขั้นหนึ่งคือการทดสอบโดยการทำ Southern blotting กับโพรบที่เป็นยีน *cytochrome b* ของสุกร โดยโพรบที่ใช้ใน



4.14

รูปที่ 4.14 ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน รูป A ภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป B ภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร ; ชุดที่ 1 แสดงการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวันที่ความเข้มข้น 10000 เท่า, ชุดที่ 2 แสดงการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวันที่ความเข้มข้น 1000 เท่า, ชุดที่ 3 แสดงการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวันที่ความเข้มข้น 100 เท่าชุดที่ 4 แสดงการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไซเบอร์กรีนวันที่ความเข้มข้น 10 เท่า ในแต่ละชุด หลอดทางด้านซ้ายจะเป็น positive control ซึ่งใช้ดีเอ็นเอสุกรและหลอดทางด้านขวาจะเป็น Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ



รูปที่ 4.15 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2 แสดง ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร, แถวที่ 3 ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกรที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI แถวที่ 4 ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกรที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Taq*I, แถวที่ 5 คือผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

การศึกษาครั้งนี้จะเตรียมมาจากการทำ PCR ดีเอ็นเอของสุกรด้วยไพรเมอร์ F3 และ B3 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการการหาลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นว่าเป็นยีน *cytochrome b* จริงก่อนที่จะนำไปใช้เป็นไพรเมอร์ ผลจากการหาลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 4.16 และจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในธนาคารยีน(GenBank) พบว่าลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่ได้เป็นยีน *cytochrome b* ของ *Sus scrofa* หรือ สุกร โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 96-98 เปอร์เซ็นต์

## 5. 2 การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP โดยวิธี Southern Blot

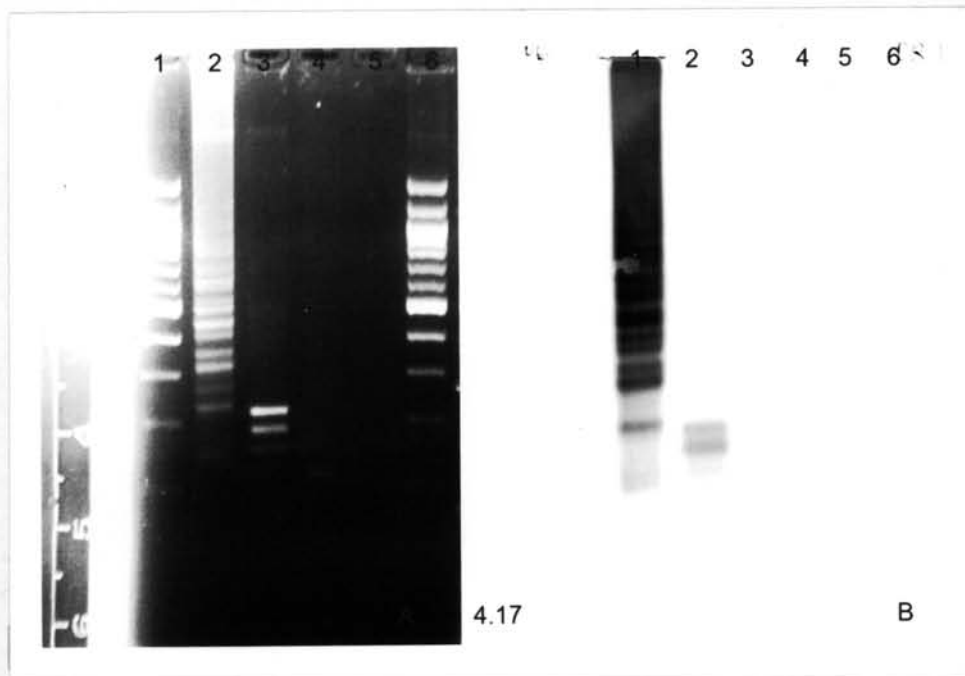
การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP ของดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี Southern Blot โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cytochrome b* ของสุกรที่เตรียมจากวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ F3 และ B3 ผลที่ได้ดังในรูปที่ 4.17A และ 4.17B แสดงให้เห็นว่าผลผลิต LAMP ที่เกิดขึ้น (แถวที่ 2A และ 2B) รวมทั้งผลผลิต LAMP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* (แถวที่ 3A และ 3B) และ *BamHI/TaqI* (แถวที่ 4A และ 4B) สามารถจับกับไพรเมอร์ได้จึงเป็นการยืนยันว่าผลผลิตที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ที่ออกแบบเป็นยีนของสุกรจริง

## 6. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรที่ผ่านกระบวนการและอุณหภูมิต่างๆด้วยวิธี LAMP

เนื่องจากวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์จะมีการผ่านกระบวนการความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆแตกต่างกันไป ซึ่งจะมีผลในการทำลายดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี LAMP ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรที่ผ่านกระบวนการต่างๆ โดยการนำเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LAMP แล้วตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ผลที่ได้พบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยจะเห็นผลผลิต LAMP ของดีเอ็นเอสุกรมีลักษณะคล้ายขั้นบันไดดังรูปที่ 4.19A แถวที่ 3-6 ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับผลผลิต LAMP ที่เกิดขึ้นจากดีเอ็นเอสุกรที่สกัดจากเนื้อสัตว์ดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการ (แถวที่ 1) การตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันและสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวดังในหลอดที่ 3-6 รูปที่ 4.18B และ รูปที่ 4.18C ซึ่งเหมือนกับผลผลิต LAMP จากเนื้อสัตว์ดิบที่ไม่ผ่านกระบวนการ ในหลอดที่ 2 รูปที่ 4.18B และ รูปที่ 4.18C ส่วน Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอไม่มีผลผลิตเกิดขึ้น ดังรูปที่ 4.18A แถวที่ 7 และจะเห็นการเรืองแสงของไซเบอร์กรีนวันเป็นสีส้มด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดาและไม่มีสีภายใต้แสงยูวีดังในหลอดที่ 7 รูปที่ 4.18B และ C ตามลำดับ

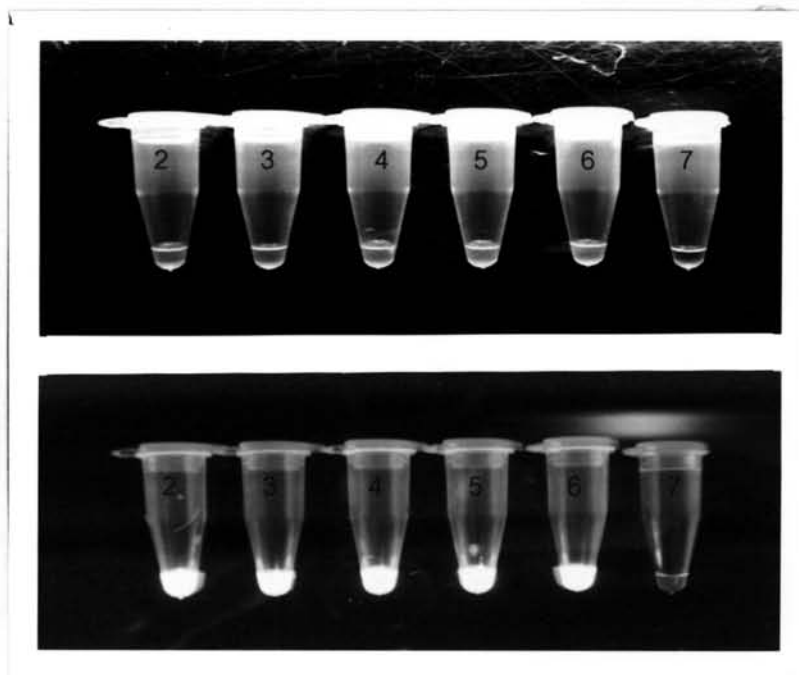
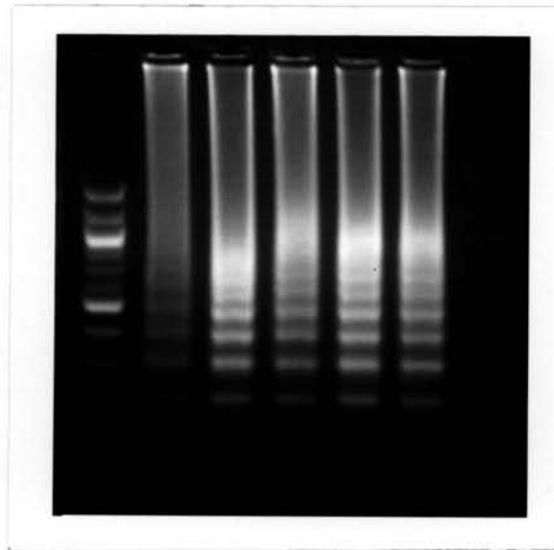
GTNGGGGGCTTTTCCGTCGACAAGCACCCCTCACACGATTC  
TTCGCCTTCCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTC  
GCAGCCGTACATCTCCTATTCTGCACGAAACCGGATCCA  
ACAACCGNTACCGGAATCTCAANNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNN

รูปที่ 4.16 แสดงลำดับเบสของผลผลิต PCR ดีเอ็นเอสุกรที่ใช้เป็นโพรบ



รูปที่ 4.17 ผลการทำSouthern blotting ของผลผลิต LAMP ของดีเอ็นเอสุกร และ ดีเอ็นเอสุกรที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูป A แสดงผลการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส รูป B แสดงผลเมมเบรนที่ไฮบริไดเซชัน ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2 แสดง ผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกรก่อนตัดด้วยเอนไซม์, แถวที่ 3 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI, แถวที่ 4 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Taq*I, แถวที่ 5 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ





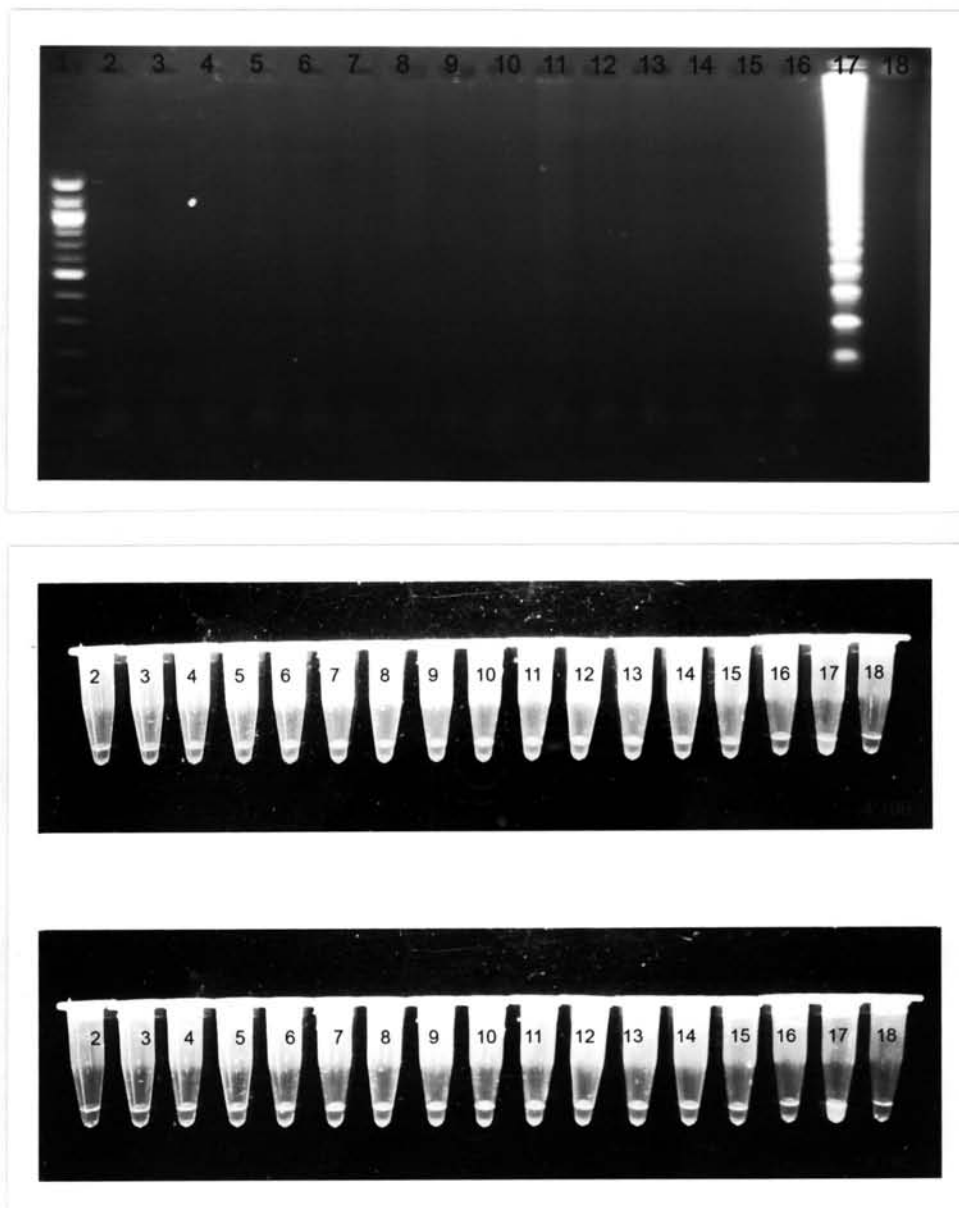
รูปที่ 4.18 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ รูป B ภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา และ รูป C ภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรดิบ, แถว/หลอดที่ 3-6 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที, 80 องศาเซลเซียส 30 นาที, 100 องศาเซลเซียส 30 นาที, 120 องศาเซลเซียส 30 นาที ตามลำดับ, แถว/หลอดที่ 7 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

## 7. การทดสอบความจำเพาะของวิธี LAMP กับเนื้อสัตว์อื่นๆ

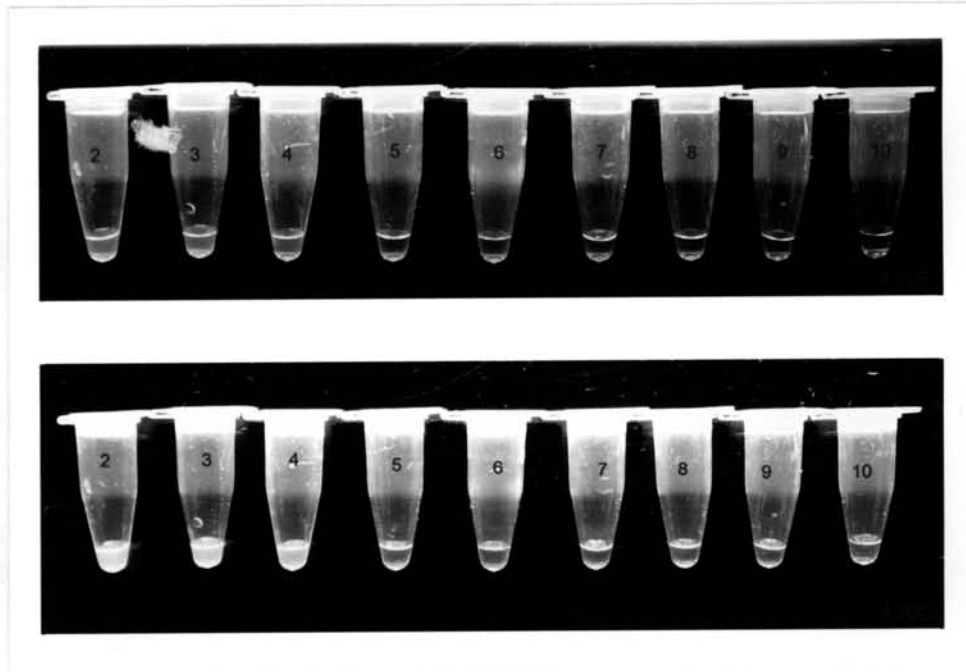
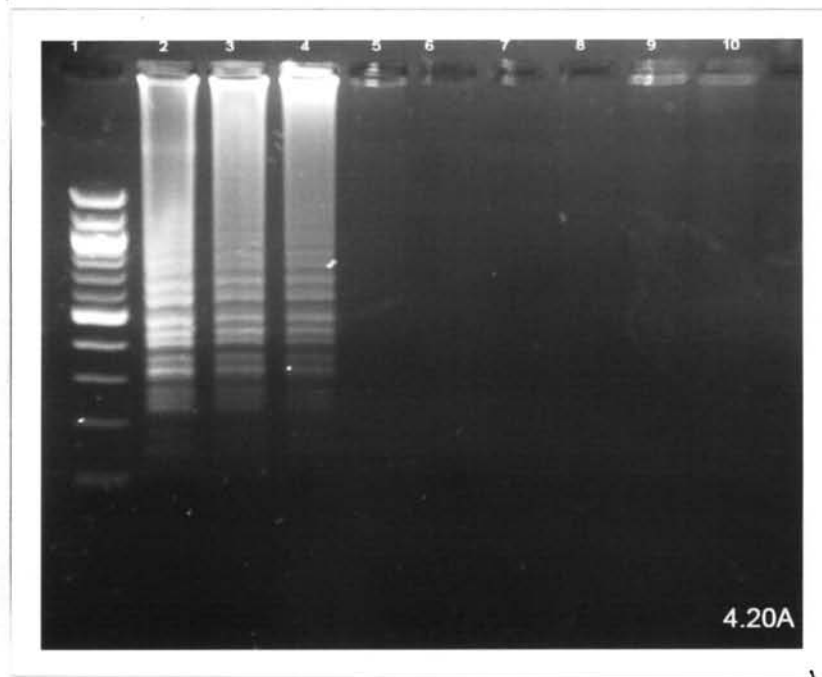
ทำการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าไฟรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับยีนสุกรหรือไม่หรือสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเนื้อสัตว์อื่นๆ จึงทำการทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง ดังนี้ เนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย ผลดังแสดงในรูปที่ 4.19 A-C พบว่าไฟรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะสูงมากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเนื้อสัตว์อื่นๆ โดยที่ไม่เกิดผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ดังรูปที่ 4.19 A แฉวที่ 2-16 และ 18 ตามลำดับ และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันและสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้ม ดังรูปที่ 4.19B และ 4.19C หลอดที่ 2-16 และ 18 ตามลำดับ ในขณะที่เนื้อสุกรจะเกิดผลผลิต LAMP มีลักษณะคล้ายชั้นบันไดดังรูปที่ 4.19A แฉวที่ 17 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาและแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียว ดังรูปที่ 4.19B และ C หลอดที่ 17

## 8. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี LAMP

ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุกรเป็นลำดับที่ละ 10 เท่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตรวจสอบผลผลิต LAMPโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาของไซเบอร์กรีนวันในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.20 A-C ดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-1 นาโนกรัม/ไมโครลิตรจะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอคล้ายชั้นบันไดบนวุ้นอะกาโรสดังรูปที่ 4.20A แฉวที่ 2-4 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาและแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.20B และ 4.20C หลอดที่ 2-4 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.1-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตรจะไม่เกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.20A ที่ 5-9 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้มดังรูปที่ 4.20B และ 4.20C หลอดที่ 5-9 ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวของปฏิกิริยา LAMP พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม



รูปที่ 4.19 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันของการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP กับเนื้อสัตว์ต่างๆ รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ รูป B ภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา และ รูป C ภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกกระจอกเทศ เนื้อสุนัข, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลายและเนื้อสุกร ตามลำดับ แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



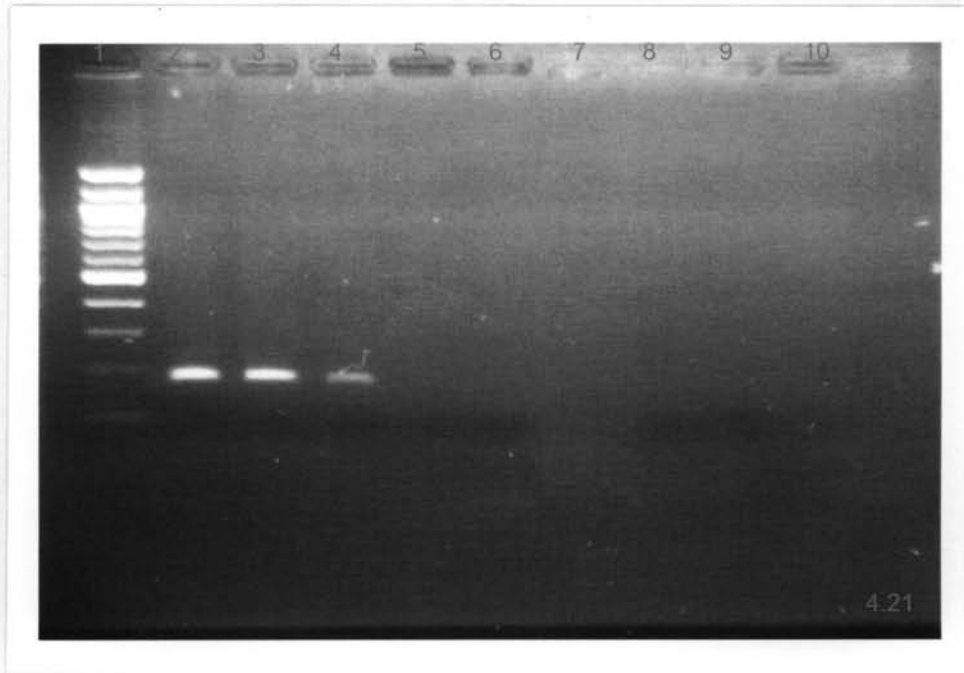
รูปที่ 4.20 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันของการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เพอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-9 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แถว/หลอดที่ 10 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

### 9. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี PCR

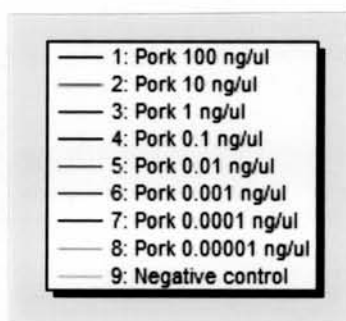
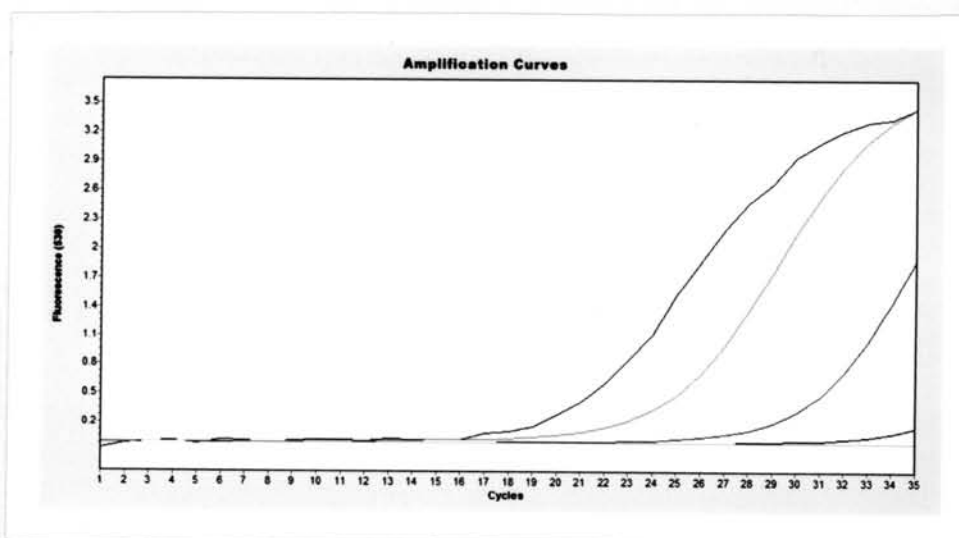
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลผลิตโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ดังรูปที่ 4.21 พบว่าดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-1 นาโนกรัม/ไมโครลิตรจะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 169 คู่เบส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ดังรูปที่ 4.21 แถวที่ 2-4 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.1-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตรจะไม่เกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.21 แถวที่ 5-9 ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวของปฏิกิริยา PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม

### 10. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี Real-Time PCR

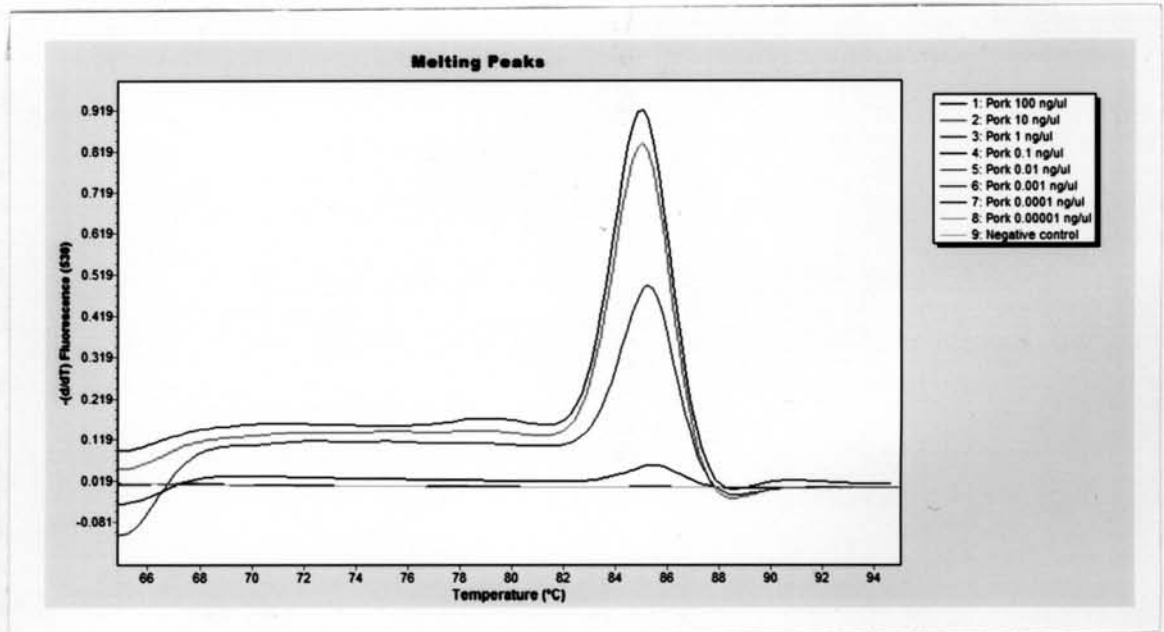
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR โดยการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา Real-Time PCR ตรวจสอบผลผลิตจากกราฟ Amplification Curves และ กราฟ Melting Peaks ดังรูปที่ 4.22-4.23 พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100, 10, 1 และ 0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับดังรูปที่ 4.22 Melting Peaks อยู่ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 4.23 ส่วนดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.01-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาเกิดขึ้น ตรวจสอบผลผลิตของ Real-Time PCR อีกครั้งโดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส 1.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส พบว่าเกิดผลผลิตของปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่ขนาด 169 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 100-0.1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (แถวที่ 2-5) ดังรูปที่ 4.24 ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัม



รูปที่ 4.21 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์การทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-9 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของเนื้อสุกที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แถวที่ 10 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

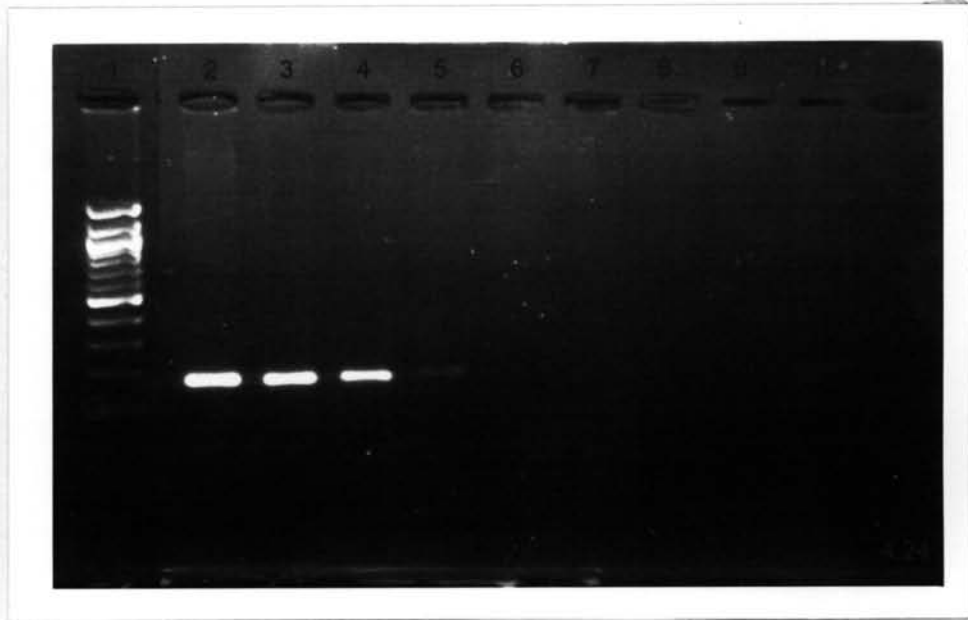


รูปที่ 4.22 แสดงกราฟ Amplification Curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร



รูปที่ 4.23 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร





รูปที่ 4.24 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตการทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสูง 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2-9 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แถวที่ 10 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

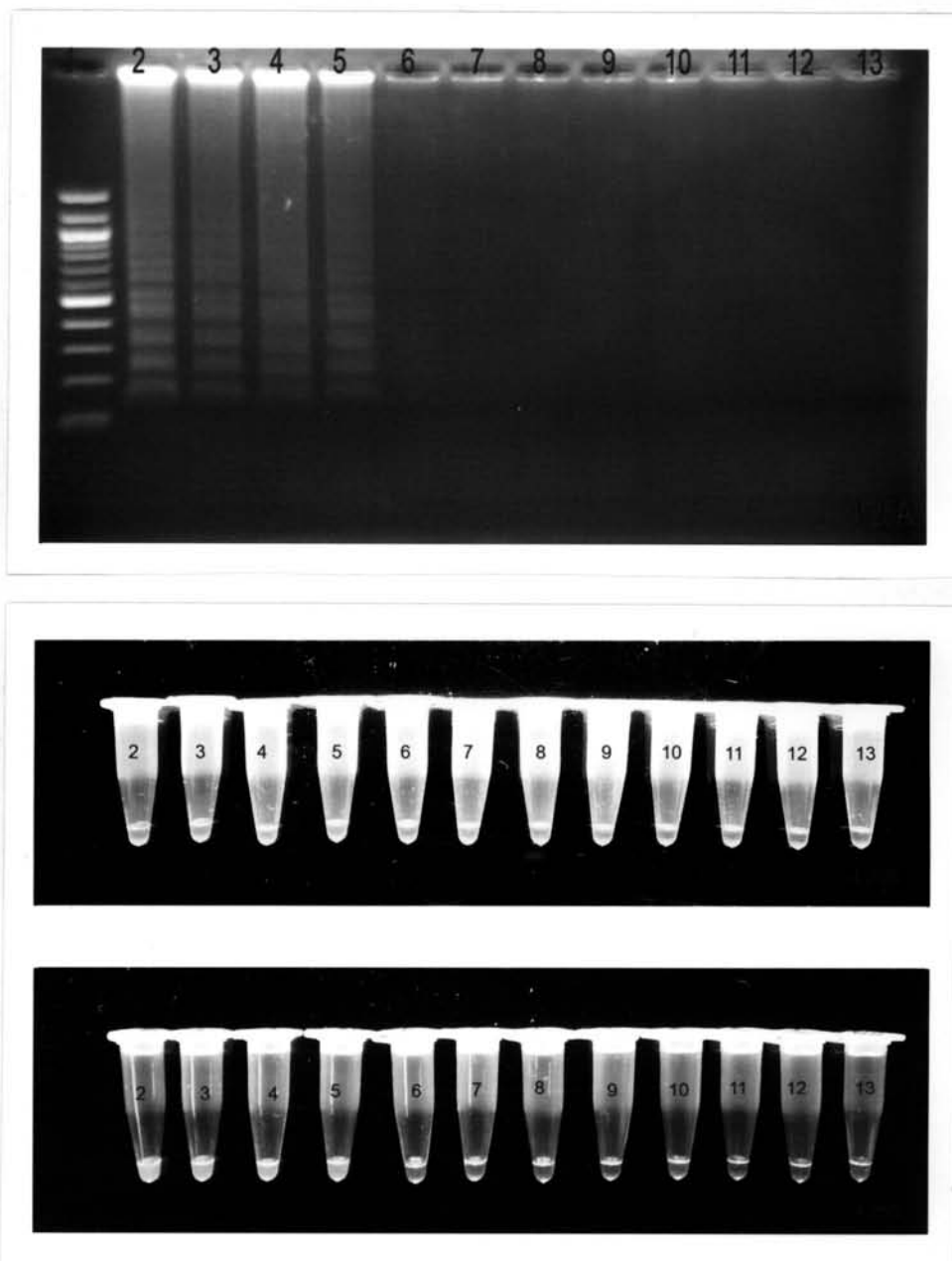
## 11. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี LAMP

### 11.1. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี LAMP

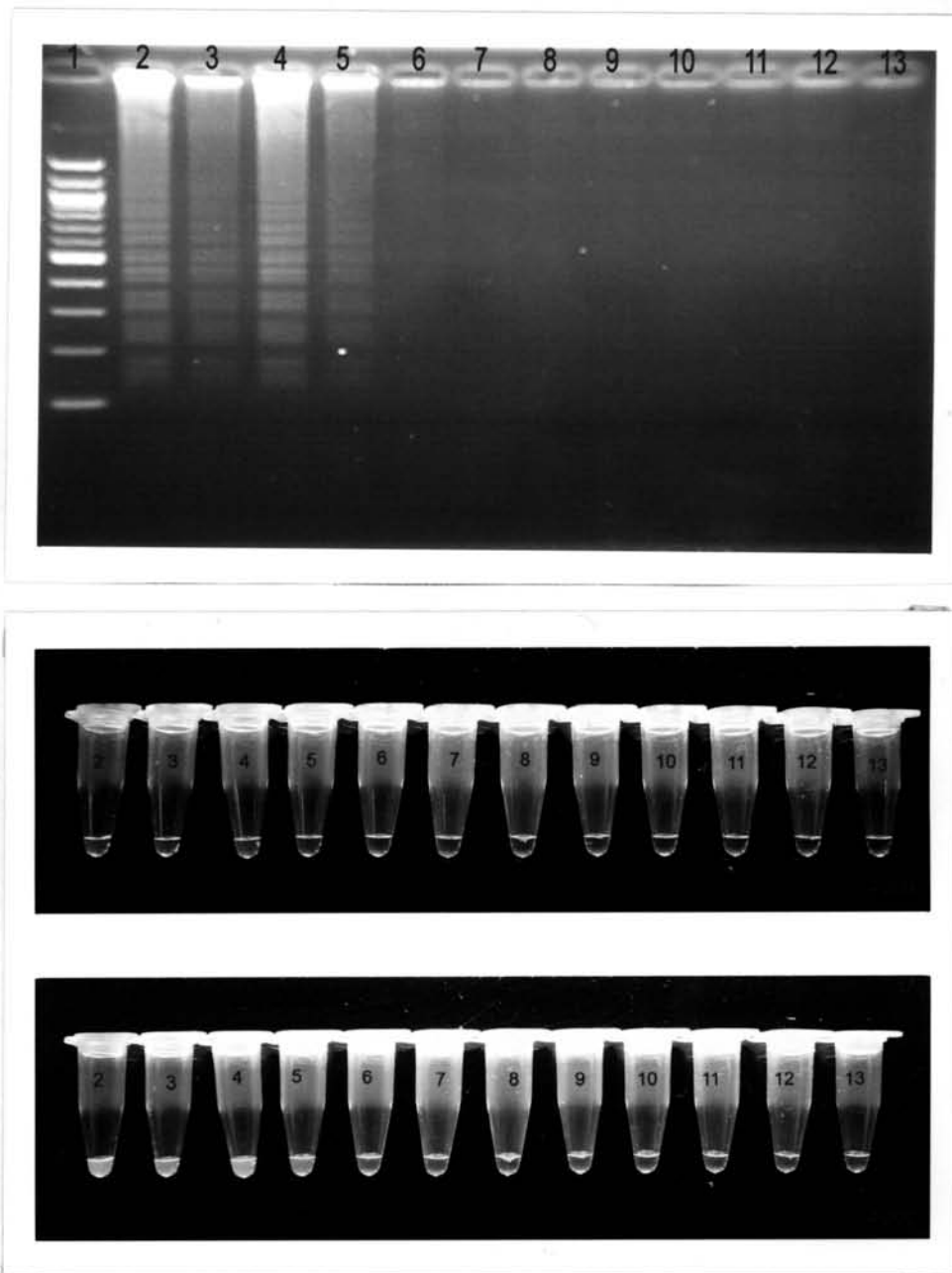
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอจากเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลผลิตโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาของไซเบอร์กรีนในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.25A-C ดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-10 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอคล้ายชั้นบันไดบนวุ้นอะกาโรสดังรูปที่ 4.25A แถวที่ 2-5 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาและแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.25B และ 4.25C หลอดที่ 2-5 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 5-0.001 เปอร์เซ็นต์ จะไม่เกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.25A แถวที่ 6-12 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาและแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้ม ดังรูปที่ 4.25B และ 4.25C หลอดที่ 6-12 ดังนั้นความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการวิเคราะห์เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

### 11.2. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี LAMP

ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบผลผลิตโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาของไซเบอร์กรีนวันในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.26A-4.26C ดีเอ็นเอของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-10 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอคล้ายชั้นบันไดบนวุ้นอะกาโรสดังรูปที่ 4.26A แถวที่ 2-5 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาคะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.26B และ 4.26C หลอดที่ 2-4 และแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวในหลอดทดลองดังรูปที่ 4.26B และ 4.26C หลอดที่ 2-5 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1-0.001 เปอร์เซ็นต์ จะไม่เกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.26A แถวที่ 6-12 และการตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดาและแสงยูวีจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีส้ม ดังรูปที่ 4.26B และ 4.26C หลอดที่ 6-12 ดังนั้นความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการวิเคราะห์เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวพบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.25 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรมสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์ รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภาพไซเบอร์กรีนภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรมสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 4.26 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์ รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

## 12. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดย วิธี PCR

### 12.1. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี PCR

ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ และ ตรวจสอบผลผลิตโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ดังรูปที่ 4.27 พบว่าดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.1 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 169 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ดังแสดงในรูปที่ 4.27 แถวที่ 2-9 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.01-0.001 เปอร์เซ็นต์ (แถวที่ 10-12) จะไม่เกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

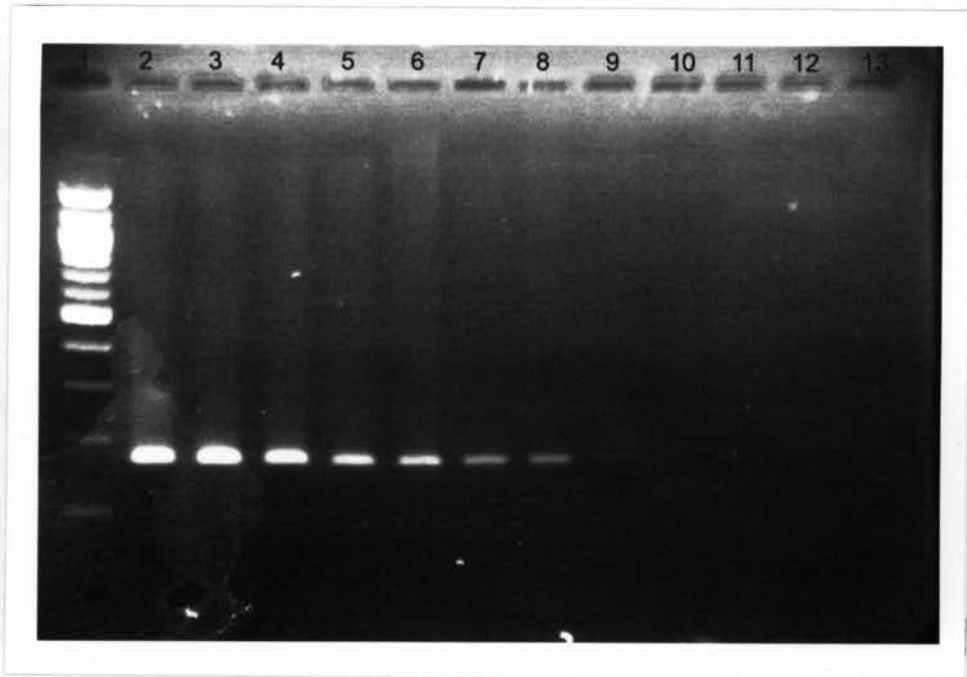
### 12.2. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี PCR

ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ และ ตรวจสอบผลผลิตโดยการนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ดังรูปที่ 4.28 พบว่าดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.1 เปอร์เซ็นต์จะเกิดผลผลิตของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 169 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ดังรูปที่ 4.28 แถวที่ 2-9 ส่วนดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 0.01-0.001 เปอร์เซ็นต์ (แถวที่ 10-12) ไม่พบผลผลิตของแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

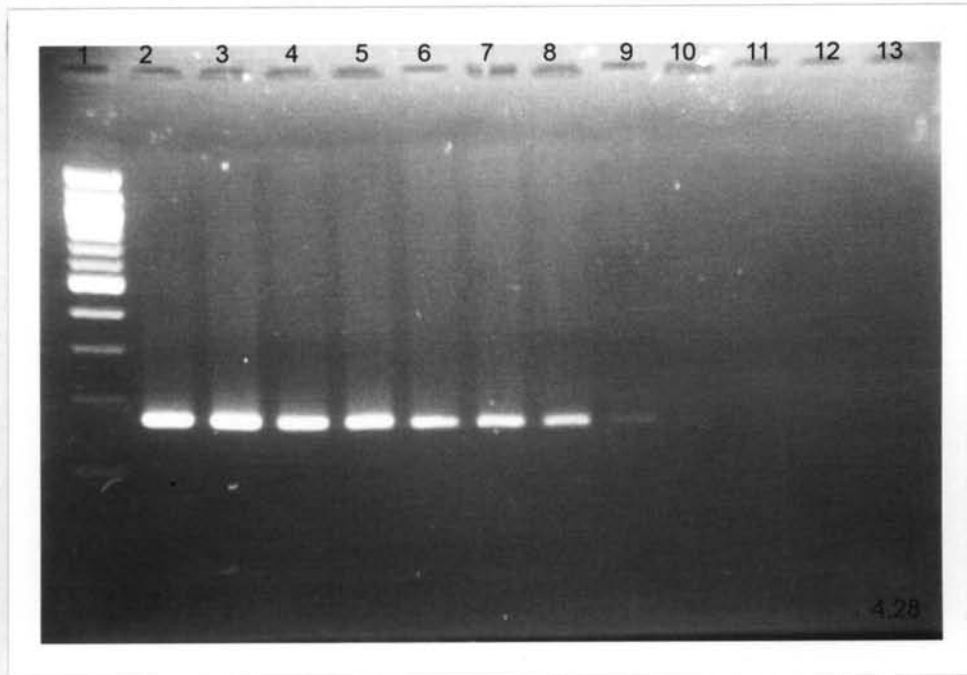
## 13. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี Real-Time PCR

### 13.1. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี Real-Time PCR

ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบผลผลิตจากกราฟ Amplification Curves, กราฟ Melting Peaks ของปฏิกิริยาดังรูปที่ 4.29-4.30 ตามลำดับ จากกราฟ Amplification Curves พบว่าดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นได้ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย Melting Peaks อยู่ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ที่ค่า Crossing Point 25.20, 25.25, 26.27, 28.62, 29.07, 31.59, 32.13, 35.11 ขณะที่ไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.27 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของน้ำก้นปนจากเชื้อ



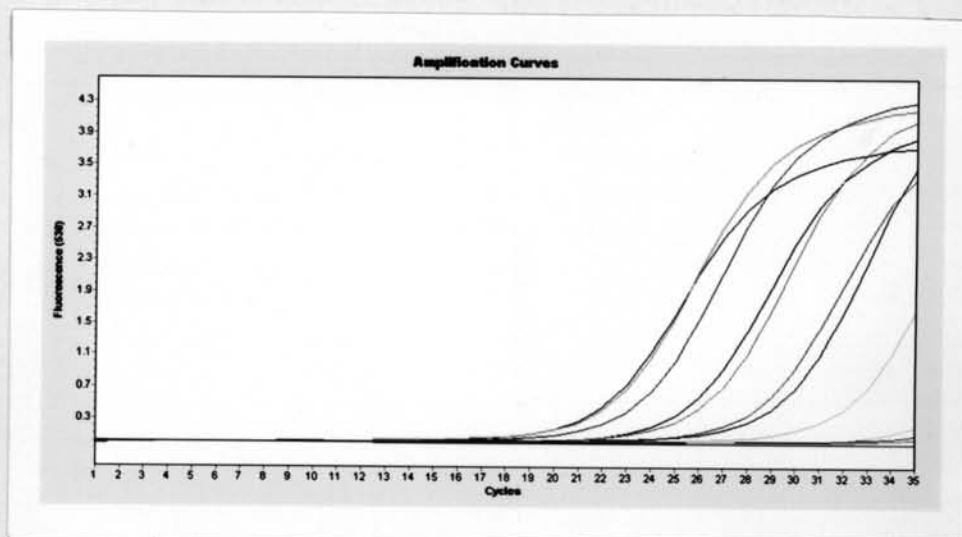
รูปที่ 4.28 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

และ 4.30 ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิตของ Real-Time PCR อีกครั้งโดยการแยกขนาดด้วย กระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอขนาด 169 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *cytochrome b* ตามที่คาดหวังไว้ ในเนื้อสุกผสมเนื้อไก่ ความเข้มข้น 100-0.001 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.31 แถวที่ 2-12 ดังนั้นการวิเคราะห์หาความไวดีเอ็นเอสุกของเนื้อสุกผสมเนื้อไก่ด้วยปฏิกิริยา Real-Time PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้นมากกว่าเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์

### 13.2. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกของเนื้อสุกผสมเนื้อวัวด้วยวิธี Real-Time PCR

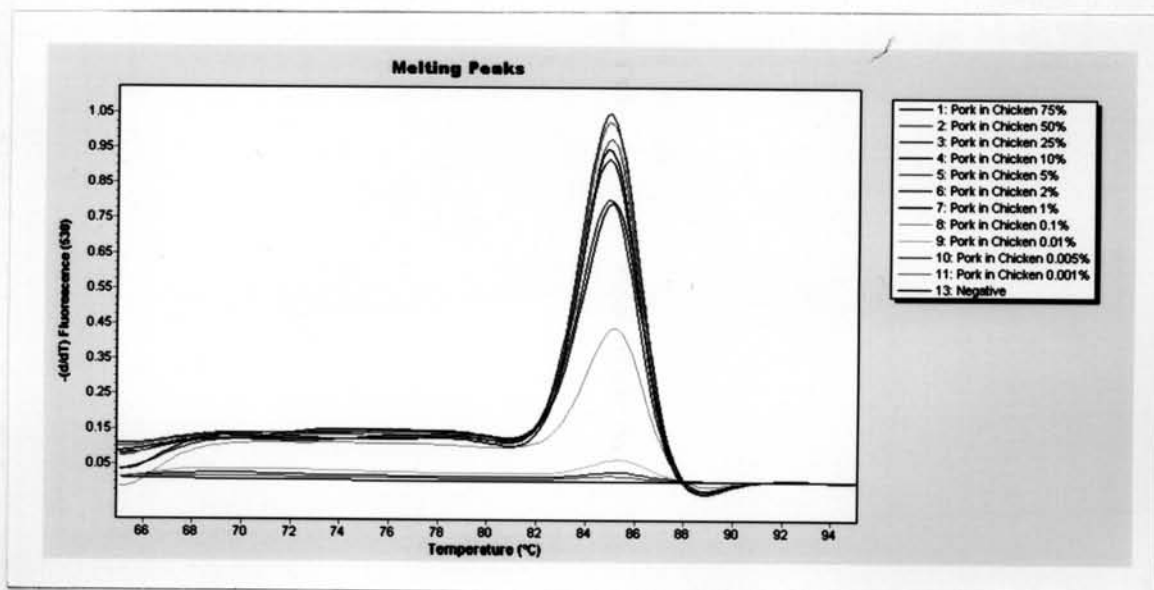
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ และ ตรวจสอบผลผลิตจากกราฟ Amplification Curves, กราฟ Melting Peaks ดังรูปที่ 4.32-4.33 ตามลำดับ จากกราฟ Amplification Curves พบว่าดีเอ็นเอสุกจากเนื้อสุกผสมเนื้อวัวถูกเพิ่มปริมาณขึ้นได้ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย Melting Peaks อยู่ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ขณะที่ไม่พบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเนื้อสุกผสมเนื้อวัวความเข้มข้น 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ดังรูปที่ 4.32 และ 4.33 ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิตของ Real-Time PCR อีกครั้งโดยการแยกขนาดด้วย กระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส พบว่าเกิดผลผลิตของปฏิกิริยา Real-Time PCR ที่ขนาด 169 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ในเนื้อสุกผสมเนื้อไก่ ความเข้มข้น 100-0.001 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.34 ดังนั้นการวิเคราะห์หาความไวดีเอ็นเอสุกของเนื้อสุกผสมเนื้อวัวด้วยปฏิกิริยา Real-Time PCR พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้นมากกว่าเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์



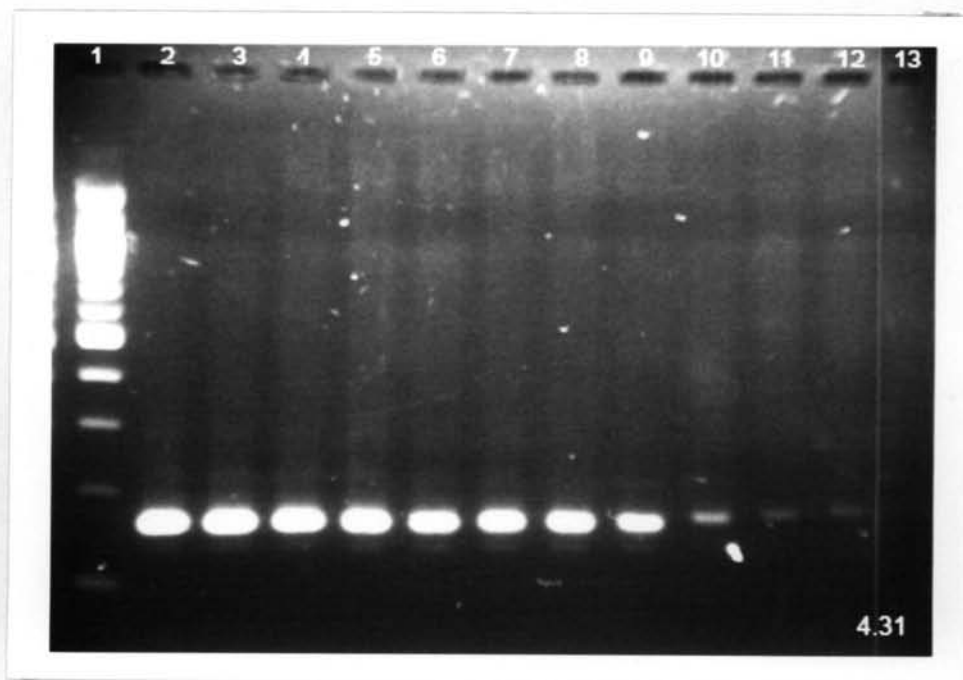


- 1: Pork in Chicken 75%
- 2: Pork in Chicken 50%
- 3: Pork in Chicken 25%
- 4: Pork in Chicken 10%
- 5: Pork in Chicken 5%
- 6: Pork in Chicken 2%
- 7: Pork in Chicken 1%
- 8: Pork in Chicken 0.1%
- 9: Pork in Chicken 0.01%
- 10: Pork in Chicken 0.005%
- 11: Pork in Chicken 0.001%
- 13: Negative

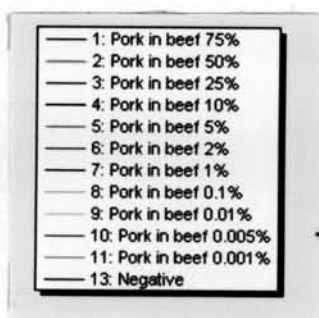
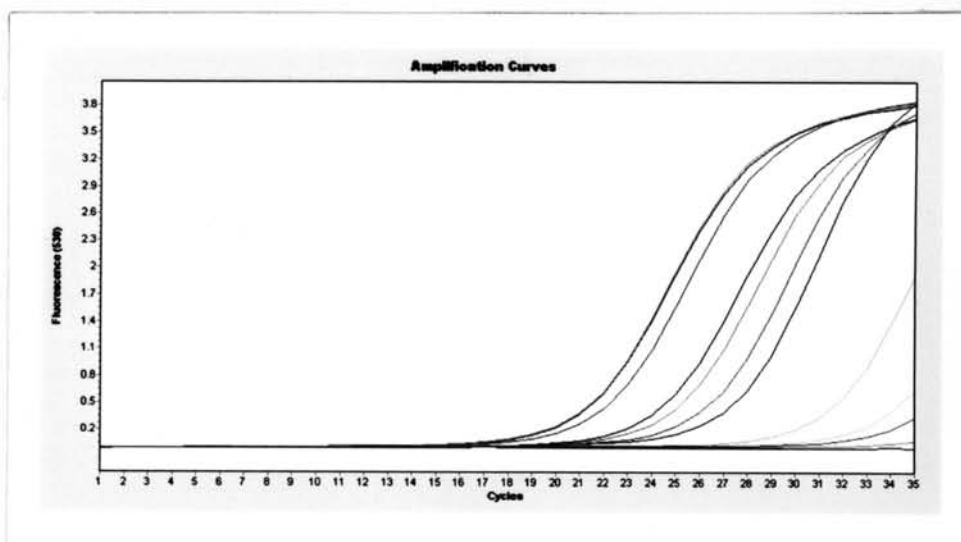
รูปที่ 4.29 แสดงกราฟ Amplification Curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์



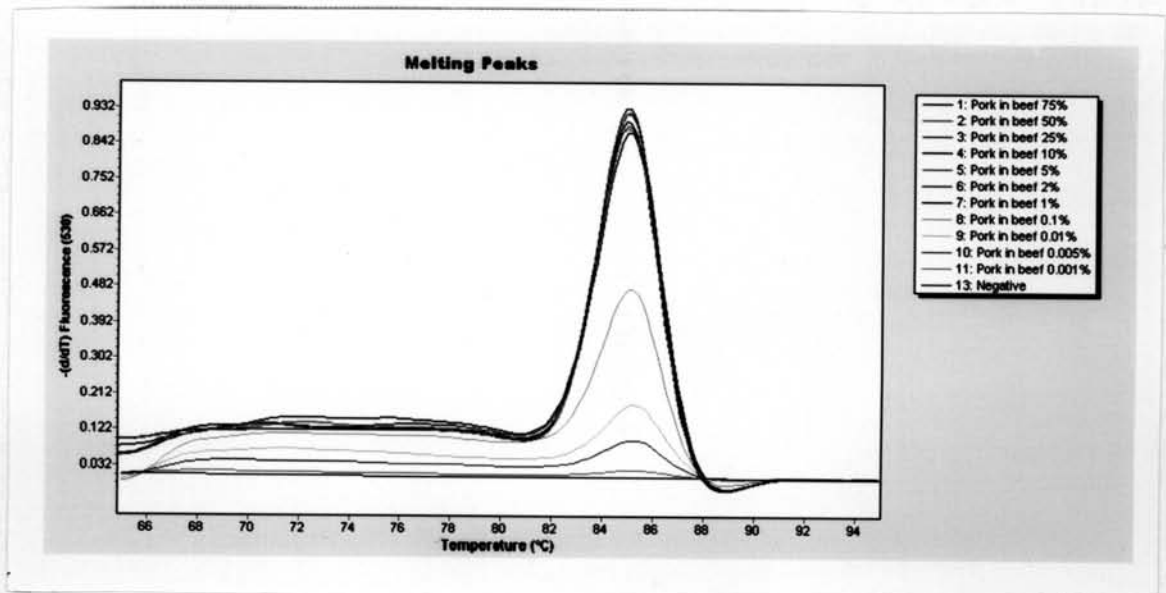
รูปที่ 4.30 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR  
ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์



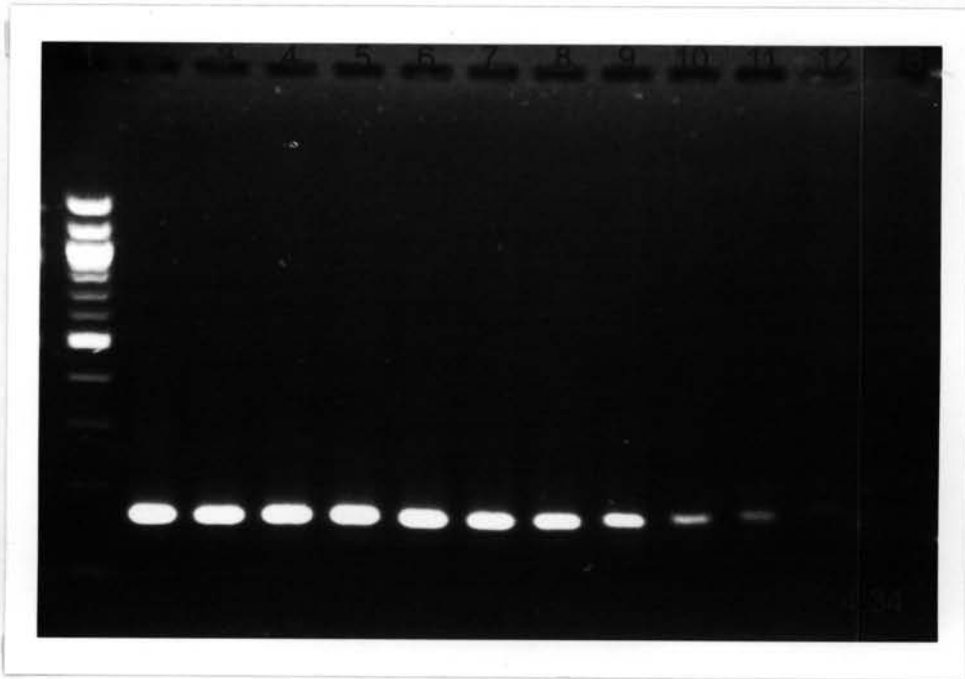
รูปที่ 4.31 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 ตามลำดับ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 4.32 แสดงกราฟ Amplification curves ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.33 แสดงกราฟ Melting Peaks ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR  
ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.34 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR เนื้อสุกผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซ็นต์; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถวที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 ตามลำดับ แถวที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา Real-Time PCR น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

## 14. การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting

### 14.1. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร โดยวิธี LAMP-Dot Blotting

เนื่องจากการวิเคราะห์ผลการทดสอบ LAMP ด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้านั้นค่อนข้างมีความยุ่งยาก เสียเวลา จึงต้องมีการพัฒนาใช้วิธี LAMP-Dot Blotting เพื่อให้การวิเคราะห์ผลมีความง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น เริ่มแรกจะต้องมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP-Dot Blotting ตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร ผลผลิต LAMP ที่เป็น Negative control คือใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งใช้เป็น Negative control อีกชนิดหนึ่ง เพื่อเป็นการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะที่เกิดขึ้น ทดสอบโดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเวลาในขั้นตอนไฮบริไดเซชัน คือในสภาวะที่ 1 จะทำตามวิธีการมาตรฐานของชุดน้ำยา แล้วเริ่มลดระยะเวลาที่ใช้ใน ขั้นตอนแผ่นเมมเบรน ชั้น Pre-hybridization ชั้น Hybridization ชั้นล้าง ชั้น Antibody และชั้น Detection ให้ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดตามวิธีการในตารางที่ 4 โดยในสภาวะที่ 5 และ 6 มีการเปรียบเทียบผลของปริมาณของผลผลิต LAMP ที่ใช้ในปฏิกิริยาดัง โดยจุดที่ 1 ใช้ปริมาณจุดละ 1 ไมโครลิตร จุดที่ 2 ใช้ปริมาณจุดละ 2 ไมโครลิตร และจุดที่ 3 ใช้ปริมาณจุดละ 2 ไมโครลิตร โดยจุดครั้งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม ผลที่ได้จะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร ส่วนผลผลิต LAMP ที่เป็น Negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งใช้เป็น Negative control จะไม่เกิดสี

จากสภาวะที่ 1 จะทำตามวิธีการมาตรฐานของชุดน้ำยา โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทำ Southern Blot ยกเว้นเวลาขั้นตอน Pre-hybridization ลดจาก 30 นาทีเป็น 15 นาที, ปริมาณ DIG-labeled DNA probe ที่เติมในขั้นตอน Hybridization จะเจือจางกว่าปกติ 8 เท่า และ เวลาสำหรับ color solution เพิ่มจาก 1-2 นาที เป็น 15 นาที พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร (P) ส่วนผลผลิต LAMP ที่เป็น Negative control ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอสุกร (N) และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* (C) จะไม่เกิดสีดังรูปที่ 4.35

สภาวะที่ 2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 1 ยกเว้น อุณหภูมิในขั้นตอน Pre-hybridization จะเปลี่ยนจาก 42 องศาเซลเซียส 15 นาที เป็น อุณหภูมิห้อง 15 นาที, อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอน hybridization จะเปลี่ยนจาก 42 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน เป็น อุณหภูมิห้อง 60 นาที, เวลาล้างในขั้นตอน Detection ก่อนเติม Blocking solution ลดจาก 5 นาทีเหลือ 2 นาที,

เวลาสำหรับ blocking solution และ Antibody solution ลดจาก 30 นาที เหลือ 15 นาที, เวลาสำหรับ Detection buffer ลดจาก 5 นาที เหลือ 2 นาที และ เวลาสำหรับ color solution เพิ่มจาก 15 นาที เป็น 60 นาที พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร (P) แต่ต่างจากในสภาวะที่ 1 ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอสุกร (N) และผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* (C) จะไม่เกิดสี ดังรูปที่ 4.36

สภาวะที่ 3 จะเหมือนกับสภาวะที่ 2 ยกเว้น ปริมาณ DIG-labeled DNA probe ที่เติมในขั้นตอน Hybridization จะเจือจางกว่าปกติ 4 เท่า, อุณหภูมิที่ล้างด้วย washing solution II เปลี่ยนจาก 68 องศาเซลเซียส เป็น อุณหภูมิห้อง และ เวลาที่ใช้ล้างด้วย washing buffer ก่อนเติม detection buffer ลดจาก 15 นาที เป็น 10 นาที 2 ครั้ง พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร (P) และผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (N) เกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงต่างจากในผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร ส่วนผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* (C) ไม่เกิดสี ดังรูปที่ 4.37 ดังนั้นสภาวะที่ 3 จึงเกิดผลบวกปลอม

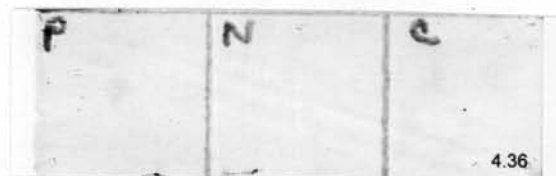
สภาวะที่ 4 จะเหมือนกับสภาวะที่ 3 ยกเว้นเวลาในขั้นตอน Hybridization จะเปลี่ยนจาก 60 นาที เป็น 30 นาที, เวลาล้างในขั้นตอน Detection ก่อนเติม Blocking solution ลดเหลือ 1 นาที, เวลาที่ใช้ล้างด้วย washing buffer ก่อนเติม detection buffer ลดเหลือ 5 นาที 2 ครั้ง และ เวลาสำหรับ Detection buffer ลดเหลือ 1 นาที พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร (P) แต่ต่างจากในสภาวะที่ 1 ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอสุกร (N) และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* (C) จะไม่เกิดสี ดังรูปที่ 4.38

สภาวะที่ 5.1.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับสภาวะที่ 4 แต่ตัดขั้นตอน Hybridization และ ขั้นตอนล้างด้วย Washing solution I ออก ในขั้นตอนล้างด้วย washing buffer ก่อนเติม detection buffer ลดเหลือ 1 ครั้ง 5 นาที สภาวะที่ 5.2.1 ต่างกับสภาวะที่ 5.1.1 ที่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 5.3.1 จะต่างกันที่ไม่มีขั้นตอนการอบ จากผลการทดลองของทั้ง 3 สภาวะข้างต้นพบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกรทั้งที่จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (P1) จุด 2 ไมโครลิตร (P2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (P3) ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ นั้นเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงจางๆ ทั้งที่จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (N1) จุด 2 ไมโครลิตร (N2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (N3) ในขณะที่ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จะไม่เกิดสี (C1, C2, C3) ดังรูปที่ 4.39A 4.39B และ 4.39C ดังนั้นสภาวะที่ 5.1.1 -5.3.1 จึงเกิดผลบวกปลอมทั้งหมด





รูปที่ 4.35 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอของสภาวะที่ 1 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting; P ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ N ผลผลิต LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ C ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*



รูปที่ 4.36 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอของสภาวะที่ 2 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting; P ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ N ผลผลิต LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ C ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*



รูปที่ 4.37 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของสถานะที่ 3 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting; P ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร N ผลผลิต LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ C ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*



รูปที่ 4.38 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของสถานะที่ 4 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting; P ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร N ผลผลิต LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ C ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori*

สภาวะที่ 5.1.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.1 ยกเว้น การล้างด้วย Washing solution II ลดเหลือ 1 ครั้ง 5 นาที และเวลาสำหรับ Blocking solution ลดจาก 15 นาที เหลือ 10 นาที สภาวะที่ 5.2.2 ต่างกับสภาวะที่ 5.1.2 ที่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 5.3.2 จะต่างกันที่ไม่มีขั้นตอนการอบ จากผลการทดลองที่ สภาวะ 5.1.2 และ 5.2.2 พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกรทั้งที่ จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (P1) จุด 2 ไมโครลิตร (P2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (P3) ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอนั้นเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงจางๆ ที่ จุด 2 ไมโครลิตร (N2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (N3) ส่วนจุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (N1) และผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จะไม่เกิดสี (C1,C2, C3) และที่สภาวะที่ 5.3.2 พบว่า เกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกรทั้งที่จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (P1) จุด 2 ไมโครลิตร (P2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (P3) ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ที่จุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (N1) และที่จุด 2 ไมโครลิตร (N2) และ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (N3) และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จะไม่เกิดสี (C1,C2,C3) ดังรูปที่ 4.40A 4.40B และ 4.40C ดังนั้นสภาวะที่ 5.1.2 และ 5.2.2 เกิดผลบวกปลอม

สำหรับสภาวะที่ 6.1.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.2 ยกเว้น เวลาในการ Hybridization ที่อุณหภูมิห้อง ลดจาก 30 นาที เหลือ 15 นาที สภาวะที่ 6.2.2 ต่างกับสภาวะที่ 6.1.2 ที่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 6.3.2 จะต่างที่ไม่มีขั้นตอนการอบ จากผลการทดลองพบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกรทั้งที่จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (P1) จุด 2 ไมโครลิตร (P2) และจุดครึ่งละ 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (P3) แต่จางกว่าในสภาวะที่ 5 ทั้งหมด ส่วนผลผลิต LAMP ที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอสุกรนั้นเกิดสีน้ำเงินอมม่วงจางๆ ที่จุด 1 ไมโครลิตร 2 ครั้งทับจุดเดิม (N3) ส่วนจุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง (N1) จุด 2 ไมโครลิตร (N2) และผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จะไม่เกิดสี (C1,C2,C3) ดังรูปที่ 4.41A 4.41B และ 4.41C ดังนั้นสภาวะที่ 6.1.2 -6.3.2 จึงเกิดผลบวกปลอมทั้งหมด

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรด้วยปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting คือ สภาวะที่ 5.3.2. เนื่องจากสภาวะดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Positive และ Negative ได้อย่างชัดเจน ไม่เกิดผลบวกปลอม กับทั้งน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* โดยขั้นตอนของวิธี LAMP-Dot Blotting สรุปได้ดังนี้ จุดปริมาตร 1 ไมโครลิตรของผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไป

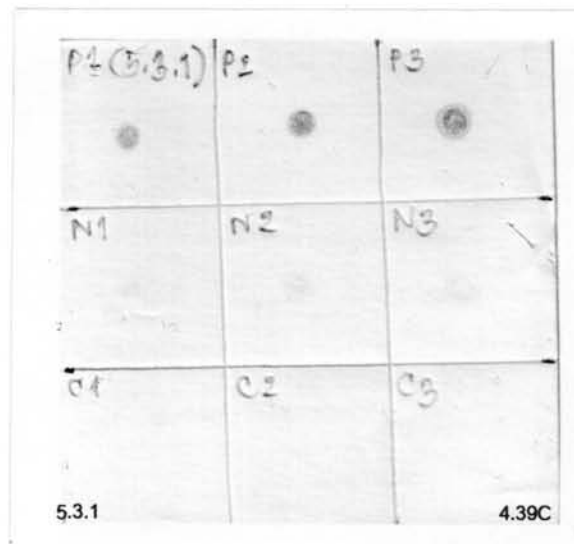
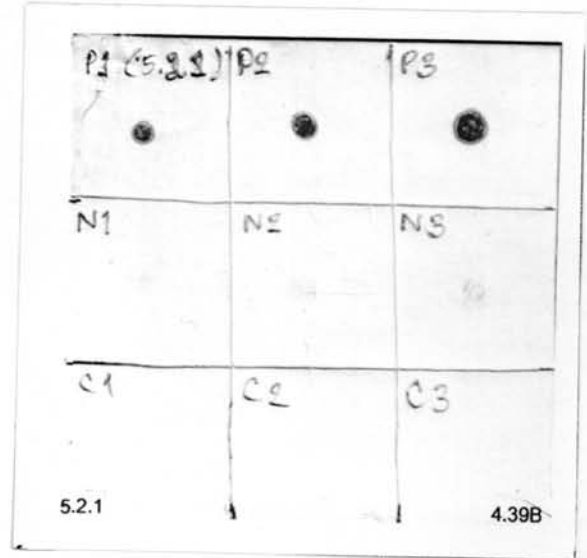
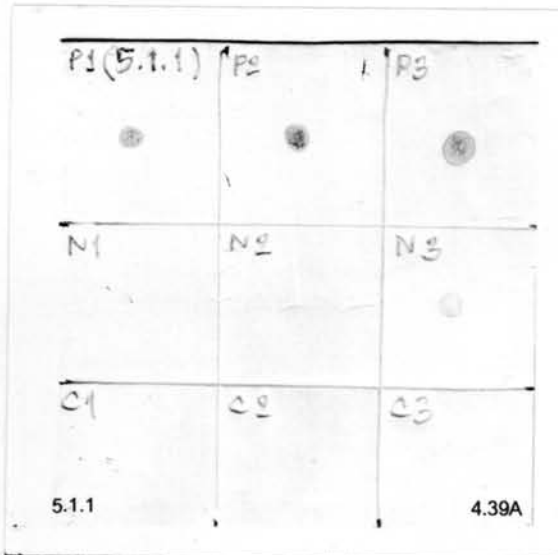
Hybridization เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย Washing solution II (0.5X SSC ผสมกับ 0.1% SDS) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วย Washing buffer อีก 1 นาที เติม Blocking Solution 10 นาที Antibody solution 15 นาที Washing buffer 5 นาที Detection 1 นาที และ Color substrate solution อีก 30-60 นาที โดยจะใช้เวลารวมทั้งสิ้น 90-120 นาที

#### 15. การวิเคราะห์ความจำเพาะโดยวิธี LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์อื่น ๆ

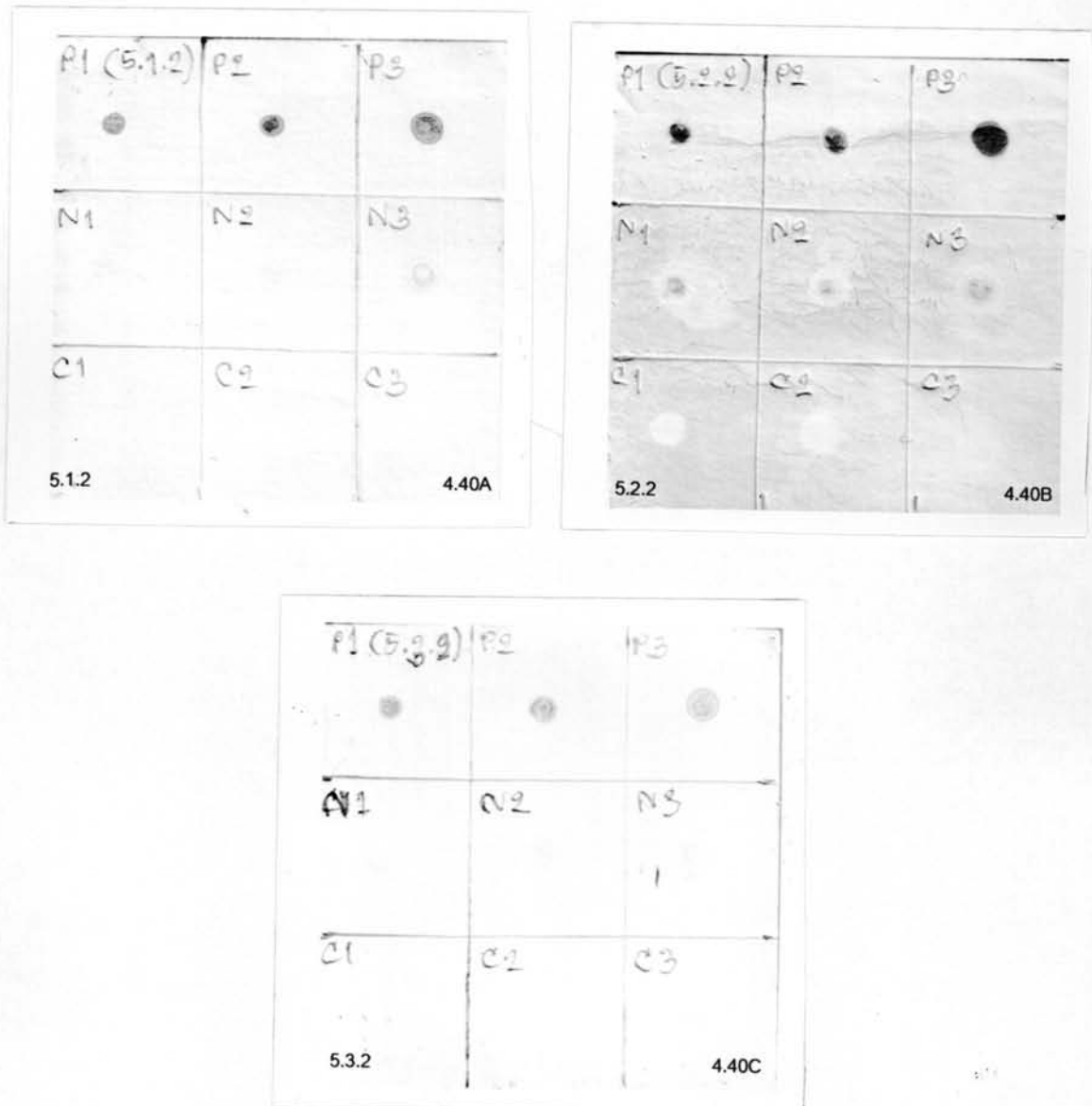
ทำการวิเคราะห์ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting เพื่อเป็นการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของเนื้อสัตว์อื่น นอกจากเนื้อสุกร 15 ตัวอย่าง ได้แก่ เนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาชาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย โดยการนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสัตว์มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ตามสภาวะที่ได้ ผลดังแสดงในรูปที่ 4.42 พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิตปฏิกิริยาที่เป็นเนื้อสุกร (หมายเลข16) และเกิดสีน้ำเงินอมม่วงจางๆ สำหรับผลผลิตปฏิกิริยาเนื้อไก่ เนื้อวัว, เนื้อแกะ, เนื้อแพะ, เนื้อปลาชาลมอน, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, และเนื้อหอยนางรม (หมายเลข 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 13) ส่วนเนื้อเป็ด, เนื้อนกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อกบ, เนื้อกุ้ง เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (หมายเลข 5, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 17) จะไม่เกิดสี ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องทำPositive control คือใช้ดีเอ็นเอสุกร และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ควบคู่ไปด้วย เนื่องจากเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแกะ, เนื้อแพะ, เนื้อปลาชาลมอน, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, และเนื้อหอยนางรม จะสามารถให้ผลบวกจางๆได้ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลผิดพลาดเป็นผลบวกปลอมได้

#### 16. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting

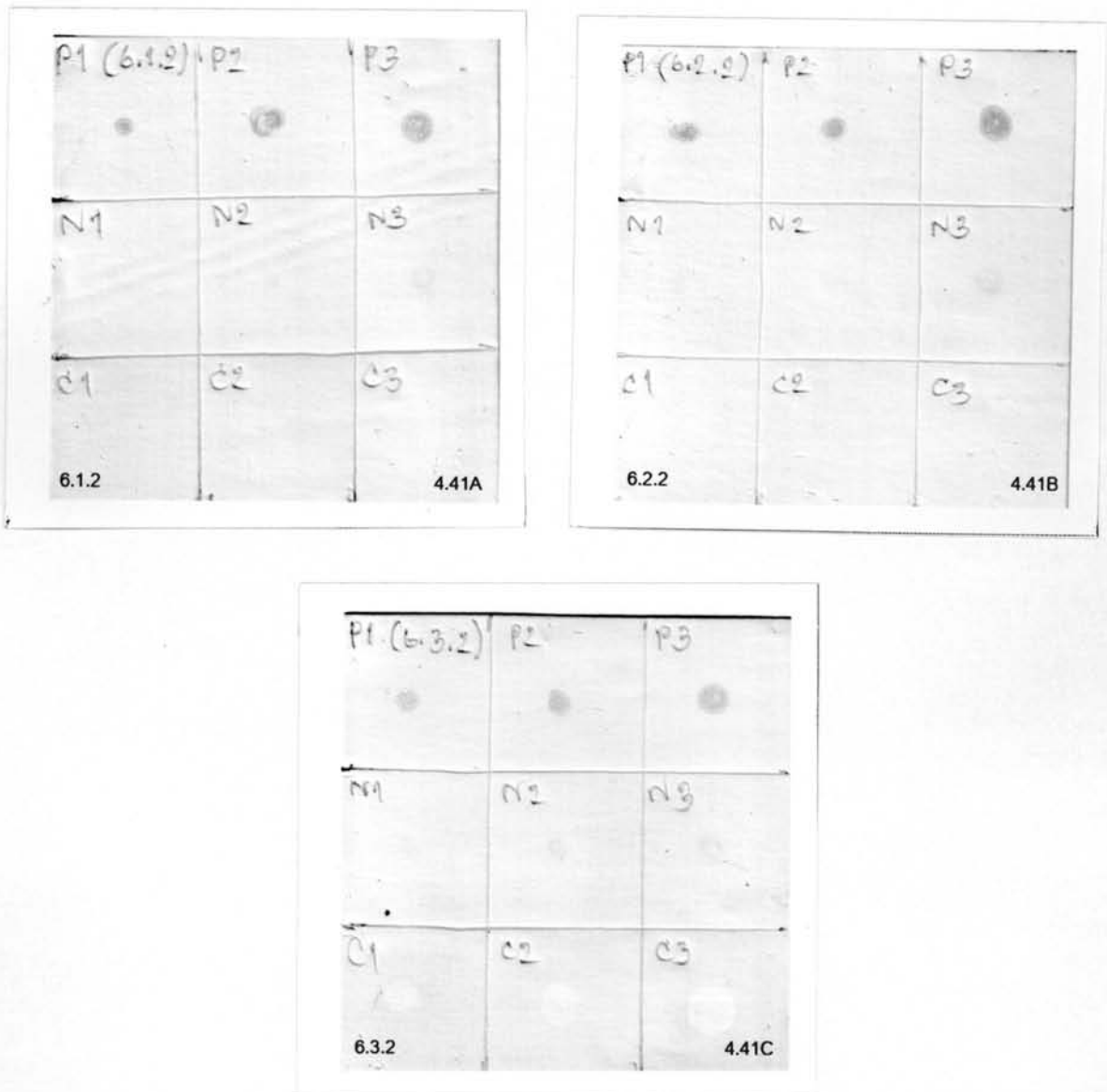
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting โดยการนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ผลดังแสดงในรูปที่ 4.43 พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิตปฏิกิริยาที่เป็นเนื้อสุกรที่ความเข้มข้น 100, 10, 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (หมายเลข 1, 2, 3) ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (หมายเลข 4, 5, 6, 7, 8, 9) จะไม่เกิดสี ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting มีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร



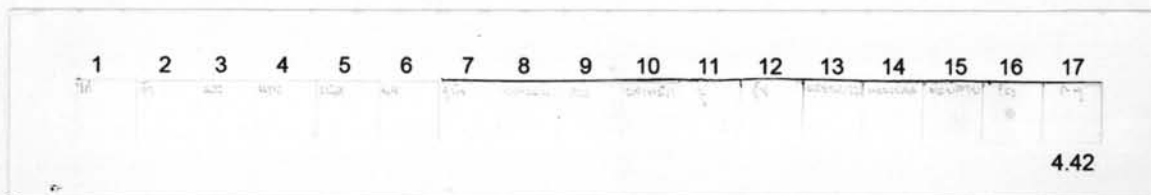
รูปที่ 4.39 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอของ *Helicobacter pylori* โดยวิธี LAMP-Dot Blotting ของสภาวะที่ 5.1.1, 5.2.1 และ 5.3.1; P1 ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอของจุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, P2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, P3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง, N1 แสดง LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง, C1 แสดงผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง



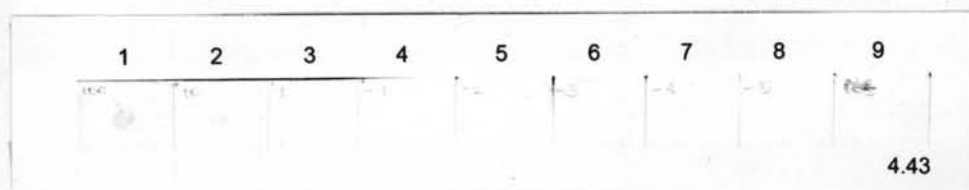
รูปที่ 4.40 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting ของ สถานะที่ 5.1.2, 5.2.2 และ 5.3.2; P1ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง , P2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, P3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง, N1 แสดง LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง, C1 แสดงผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง



รูปที่ 4.41 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของสถานะที่ 6.1.2, 6.2.2 และ 6.3.2 โดยวิธี LAMP-Dot Blotting; P1 ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกรจุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, P2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, P3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง, N1 แสดง LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, N3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง, C1 แสดงผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* จุด 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C2 แสดงจุด 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง, C3 แสดงจุด 1 ไมโครลิตรซ้ำ 2 ครั้ง



รูปที่ 4.42 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการทดสอบความจำเพาะในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์อื่นๆ; หมายเลขที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ของเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกกระเจกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาชาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย และเนื้อสุกร ตามลำดับ หมายเลขที่ 12 แสดงผลผลิต LAMP-Dot Blotting ของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 4.43 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการทดสอบความไวของในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกร ที่ความเข้มข้น 100-0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting; หมายเลขที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 แสดงผลผลิตปฏิกิริยาวิธี LAMP-Dot Blotting ของดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ตามลำดับ หมายเลขที่ 9 แสดงผลผลิต LAMP-Dot Blotting ของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



## 17. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี LAMP-Dot Blotting

### 17.1. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่โดยวิธี LAMP-Dot Blotting

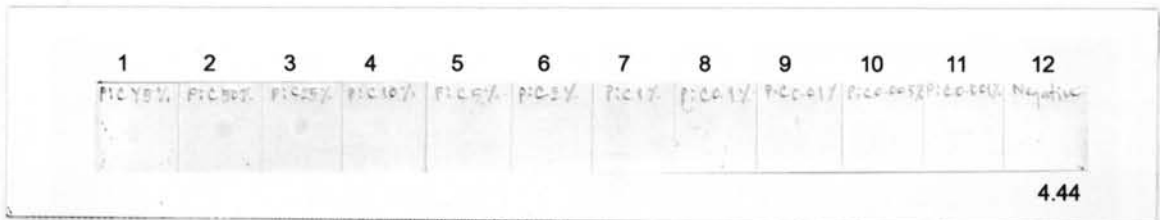
ทำการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting โดยการนำผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ผลดังแสดงในรูปที่ 4.44 พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิตปฏิกิริยาที่เป็นเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10 เปอร์เซ็นต์ (หมายเลข 1, 2, 3, 4) ส่วนที่ความเข้มข้น 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (หมายเลข 5, 6, 7, 8, 9) จะไม่เกิดสี ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting มีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

### 17.2. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวโดยวิธี LAMP-Dot Blotting

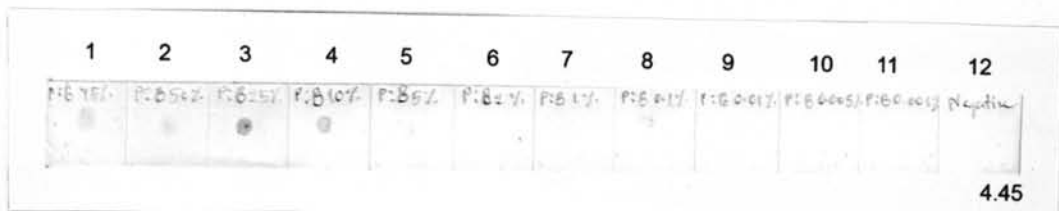
ทำการทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting โดยการนำผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัววัดที่ความเข้มข้น 75-0.0001 เปอร์เซ็นต์ มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ผลดังแสดงในรูปที่ 4.45 พบว่าจะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิตปฏิกิริยาที่เป็นเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5 เปอร์เซ็นต์ (หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5) ส่วนที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (หมายเลข 6, 7, 8, 9) จะไม่เกิดสี ดังนั้นการวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting มีขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

## 18. การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LAMP reaction

ทำการตรวจหาเนื้อสุกรปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP จากผลิตภัณฑ์อาหารที่หาซื้อได้ทั่วไปตามท้องตลาด หรือซูเปอร์มาร์เกตทั่วไป จำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง คือดีเอ็นเอเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง เนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง เนื้อปลา 18 ตัวอย่าง เนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง นำดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างละ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบผลผลิตโดย นำไปแยก



รูปที่ 4.44 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75-0.001เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LAMP-Dot Blotting ; หมายเลขที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ที่ความเข้มข้น 75, 5, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หมายเลขที่ 12 แสดงผลผลิต LAMP-Dot Blotting ของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

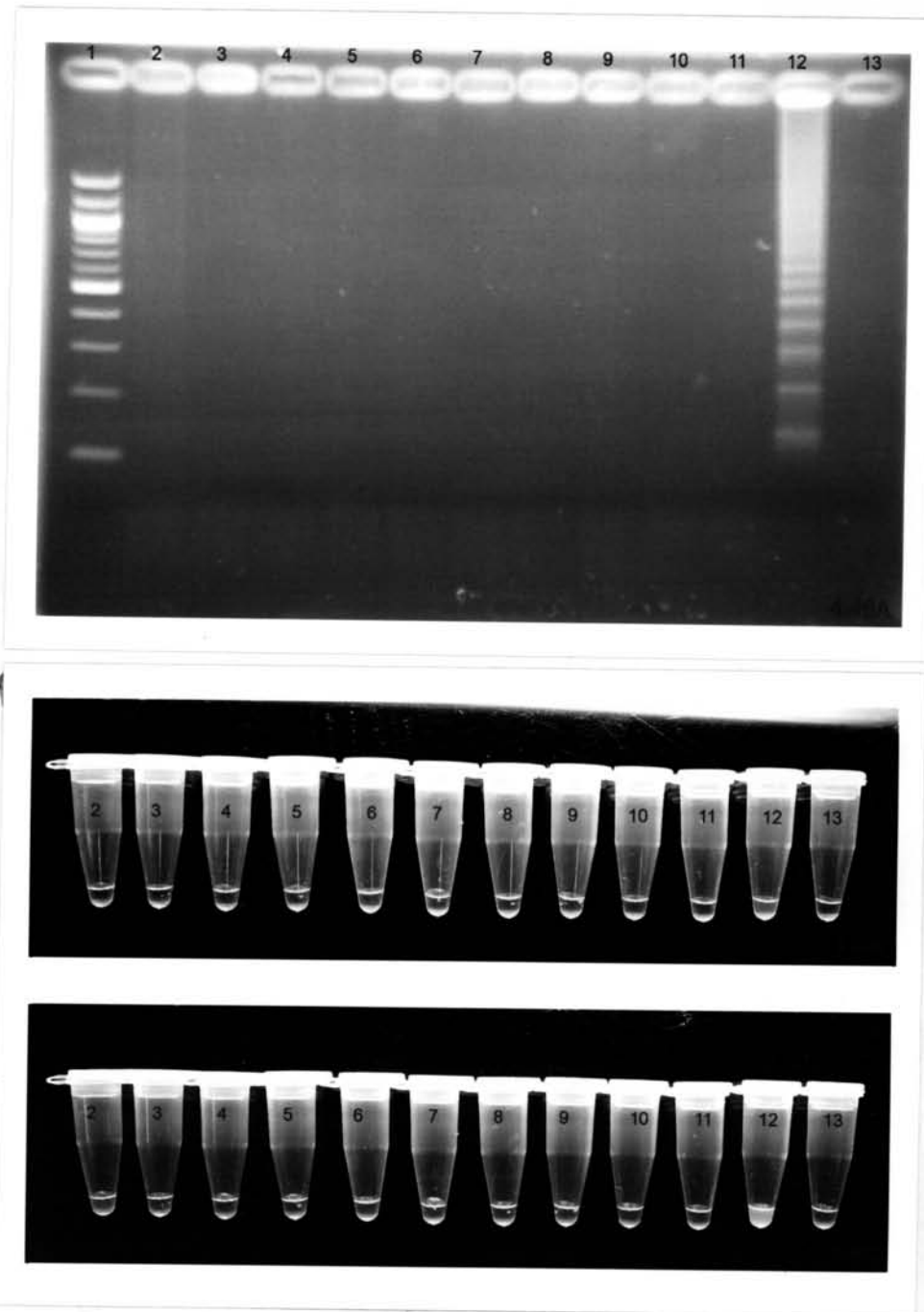


รูปที่ 4.45 แสดงแผ่นเมมเบรนการทดสอบความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75-0.001เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LAMP-Dot Blotting ; หมายเลขที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ความเข้มข้น 75, 50, 25, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หมายเลขที่ 12 แสดงผลผลิต LAMP-Dot Blotting ของ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

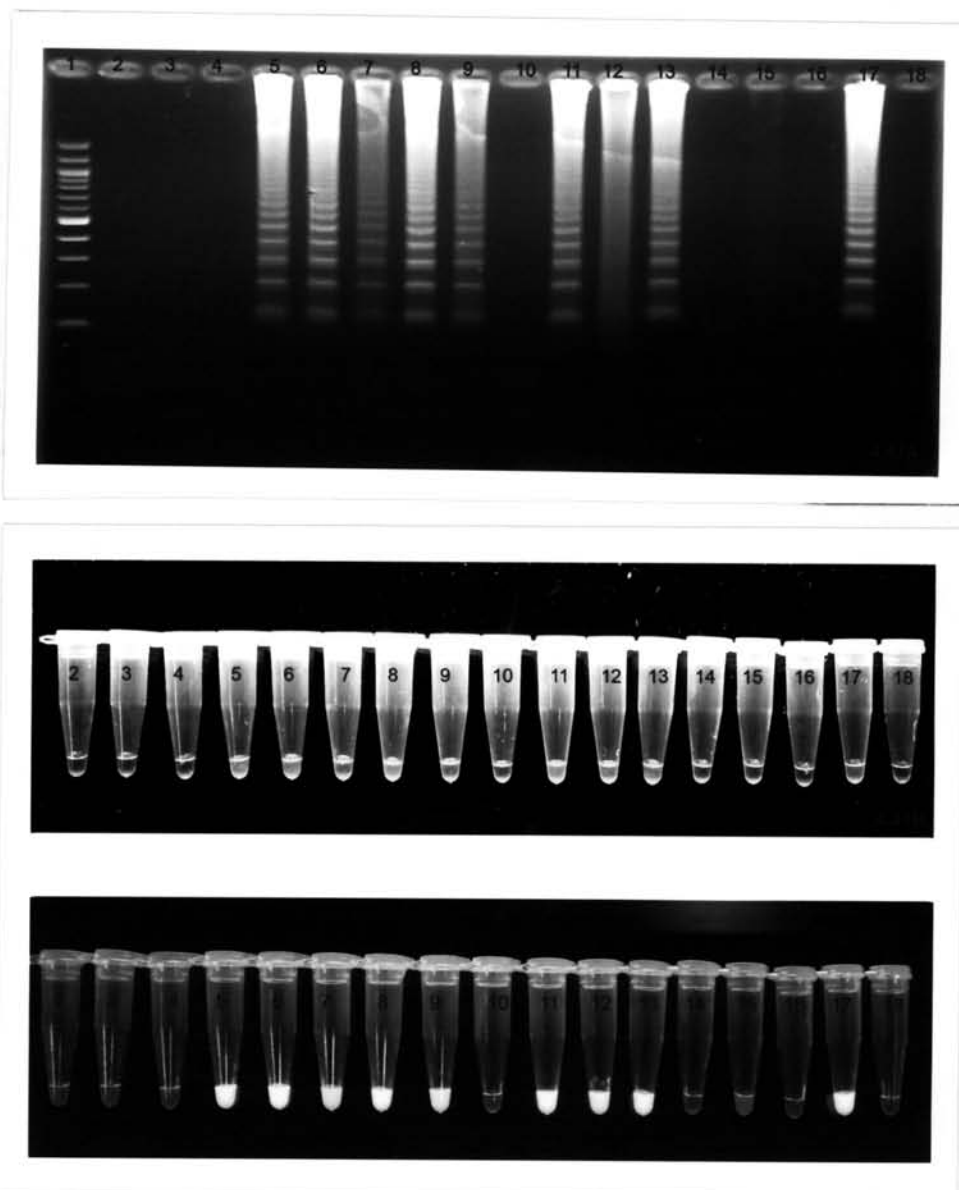
ขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาของไซเบอร์กรีนในหลอดทดลอง ซึ่งผลจากการตรวจวิเคราะห์สรุปได้ในตารางที่ 4.2. และรูปที่ 4.46-4.52 ผลการทดลองการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสพบว่าเกิดผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP คล้ายชั้นบันไดบนวุ้นอะกาโรสในทั้งหมด 27 ตัวอย่าง คือตัวอย่างเนื้อวัว 1 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.46A แถวที่ 2 , ตัวอย่างเนื้อไก่ 19 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.47A แถวที่ 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, รูปที่ 4.49A แถวที่ 8, 10, 11, 12, 13, 14, รูปที่ 4.50A แถวที่ 3, รูปที่ 4.52A แถวที่ 13,15, ตัวอย่างเนื้อปลา 4 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.50A แถวที่ 13, 16, รูปที่ 4.51 แถวที่ 4, 10, ตัวอย่างเนื้อกุ้ง 1 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.52A แถวที่ 2, ตัวอย่างอาหารทะเล 2 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.52A แถวที่ 11, 16 ตามลำดับ ส่วนรูปที่ 4.46A แถวที่ 13 และ รูปที่ 4.47A-4.52A แถวที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMPของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ผลการสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงไฟธรรมดา พบว่าเกิดสีเขียวของปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันในหลอดทดลองภายใต้แสงไฟธรรมดาทั้งหมด 13 ตัวอย่าง คือตัวอย่างเนื้อไก่ 11 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.47B หลอดที่ 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, รูปที่ 4.49B หลอดที่ 11, 13, รูปที่ 4.52B หลอดที่ 15 ตัวอย่างเนื้อปลา 1 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.51B หลอดที่ 10, ตัวอย่างเนื้อกุ้ง 1 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.52B แถวที่ 2 ส่วนรูปที่ 4.46B หลอดที่ 12 และ รูปที่ 4.47B-4.52B หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร และรูปที่ 4.46B แถวที่ 13 และ รูปที่ 4.47B-4.52B หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMPของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นอกนั้นเกิดสีเขียวของปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันในหลอดทดลอง

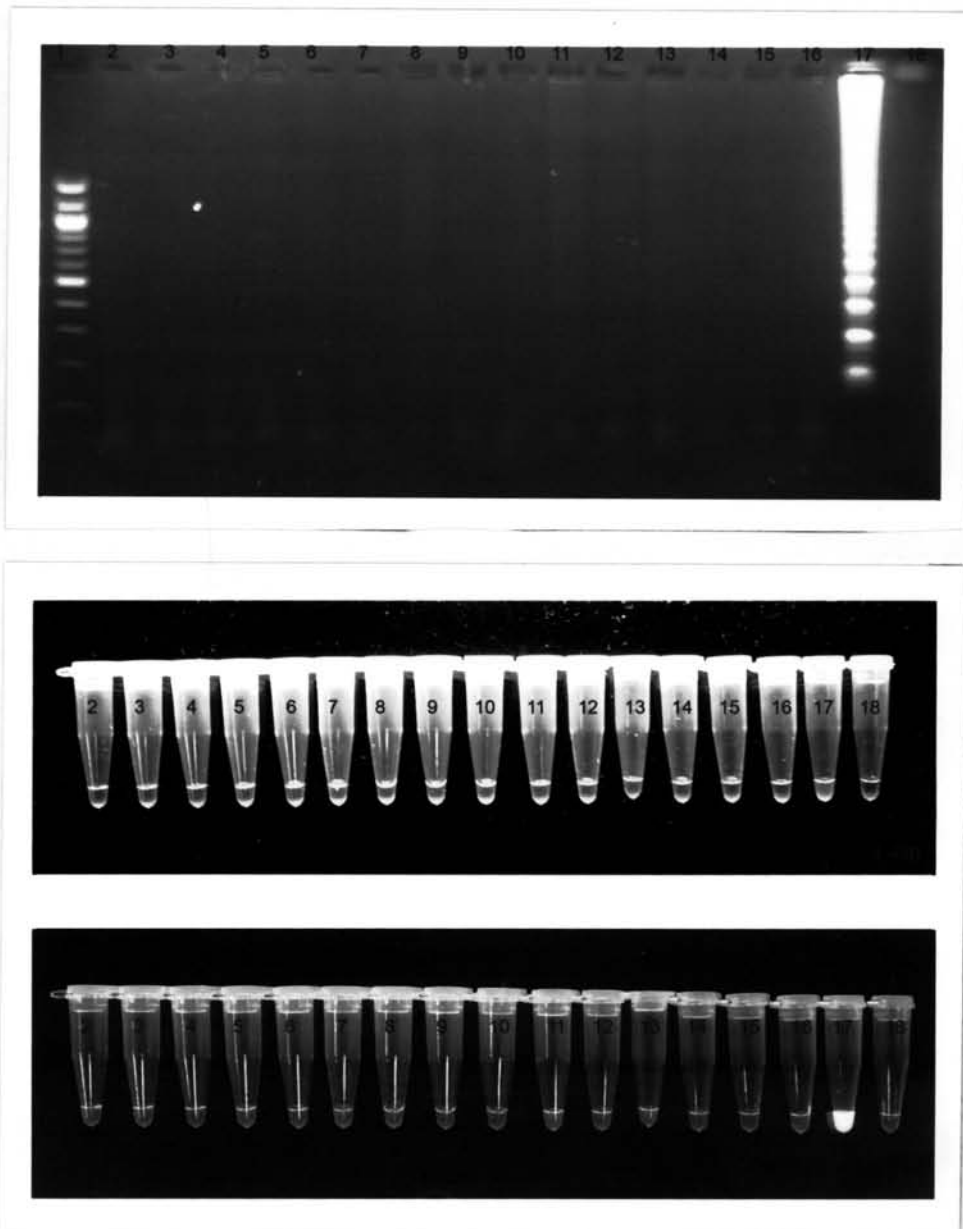
ผลการสังเกตด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันภายใต้แสงยูวีพบว่าเกิดสีเขียวของปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันในหลอดทดลองภายใต้แสงยูวีทั้งหมด 17 ตัวอย่าง คือตัวอย่างเนื้อไก่ 14 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.47C หลอดที่ 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, รูปที่ 4.49C หลอดที่ 9, 10, 11, 12, 13, รูปที่ 4.52C หลอดที่ 15, ตัวอย่างเนื้อปลา 2 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.50C หลอดที่ 16, รูปที่ 4.51C หลอดที่ 10, ตัวอย่างเนื้อกุ้ง 1 ตัวอย่าง คือรูปที่ 4.52C หลอดที่ 2 ส่วนรูปที่ 4.46C หลอดที่ 12 และ รูปที่ 4.47C-4.52C หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร และ รูปที่ 4.47C แถวที่ 13 และ รูปที่ 4.47C-4.52C หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMPของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



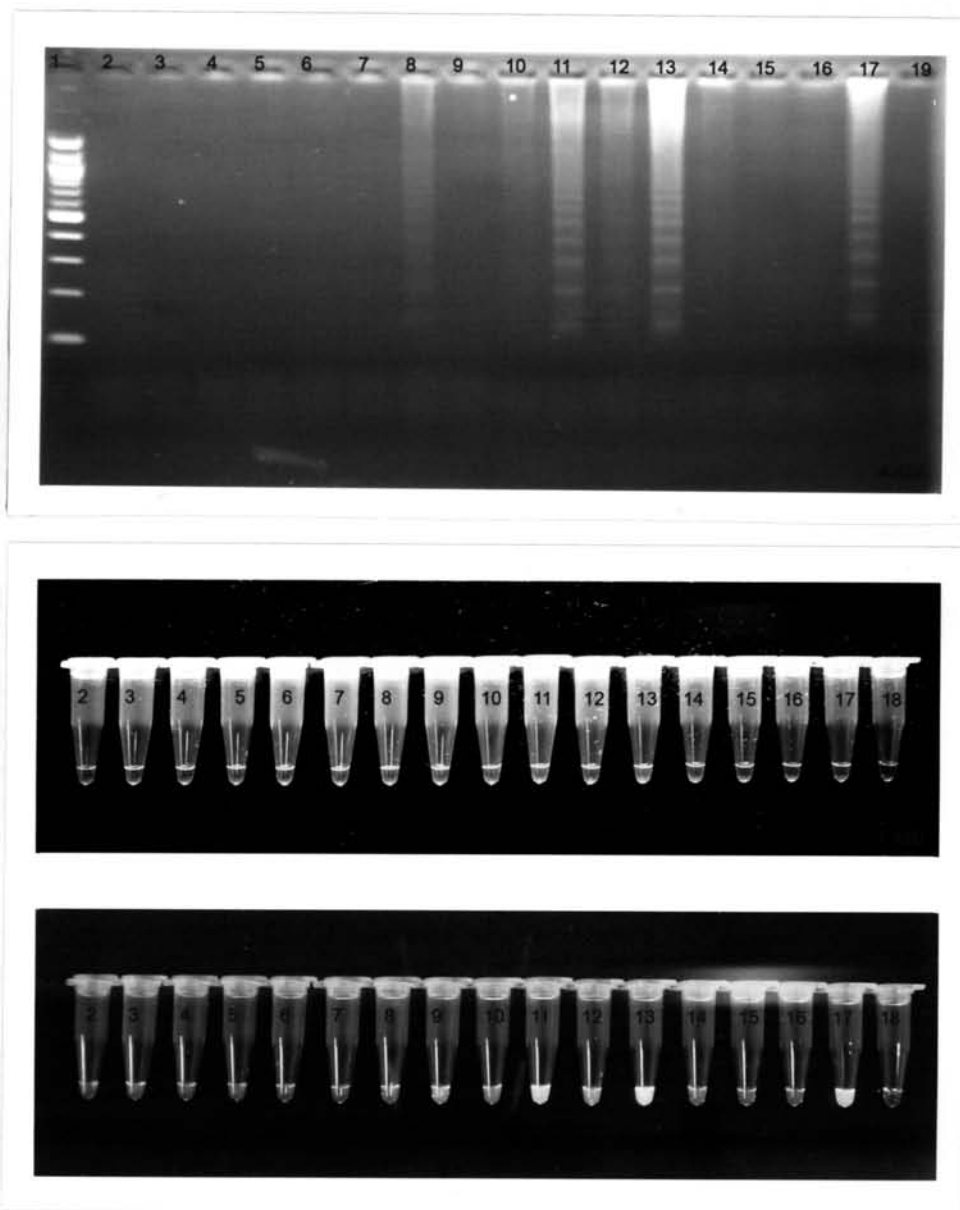
รูปที่ 4.46 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 1-10; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 13 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



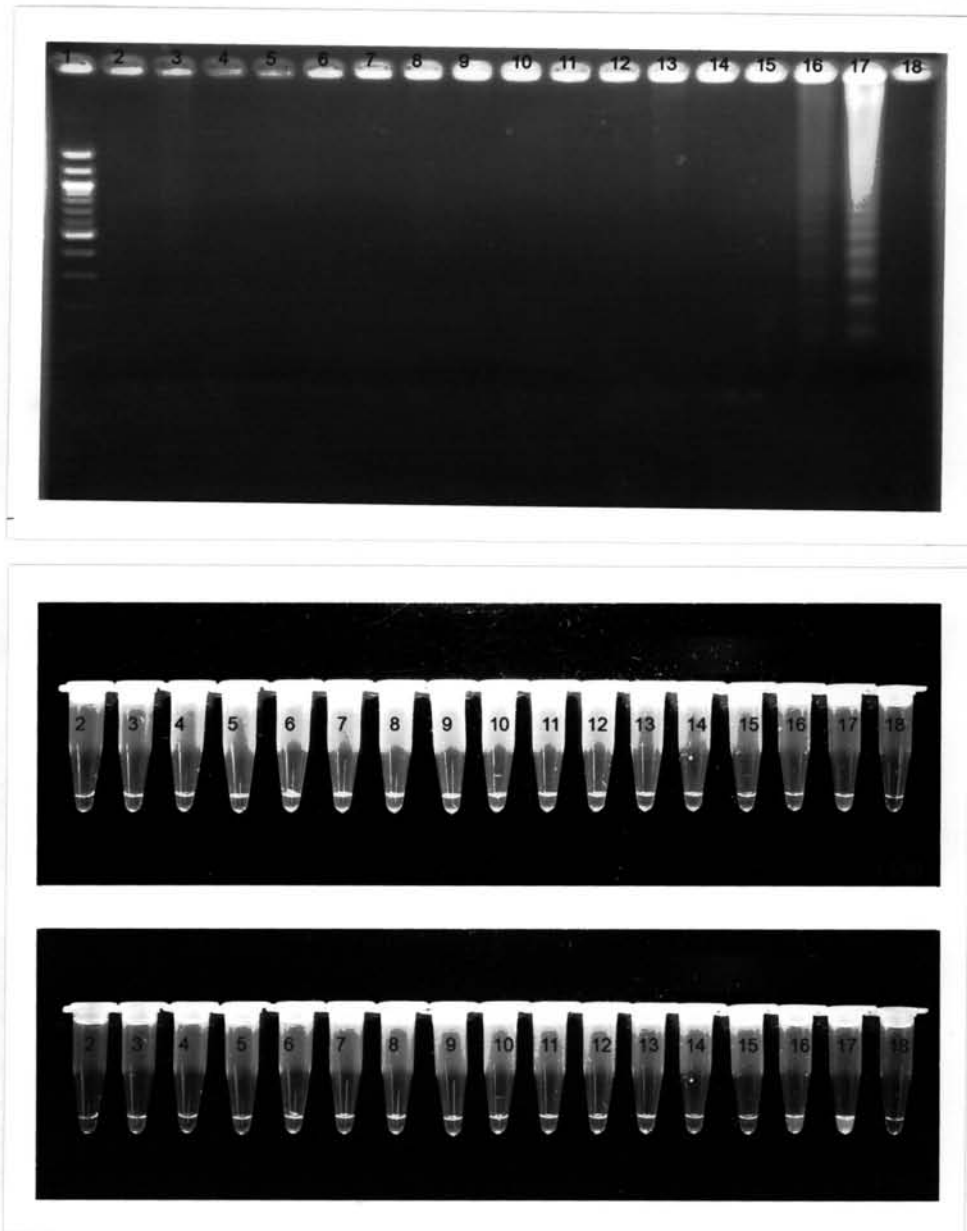
รูปที่ 4.47 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 11-25; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 15 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 4.48 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 26-40; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 15 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

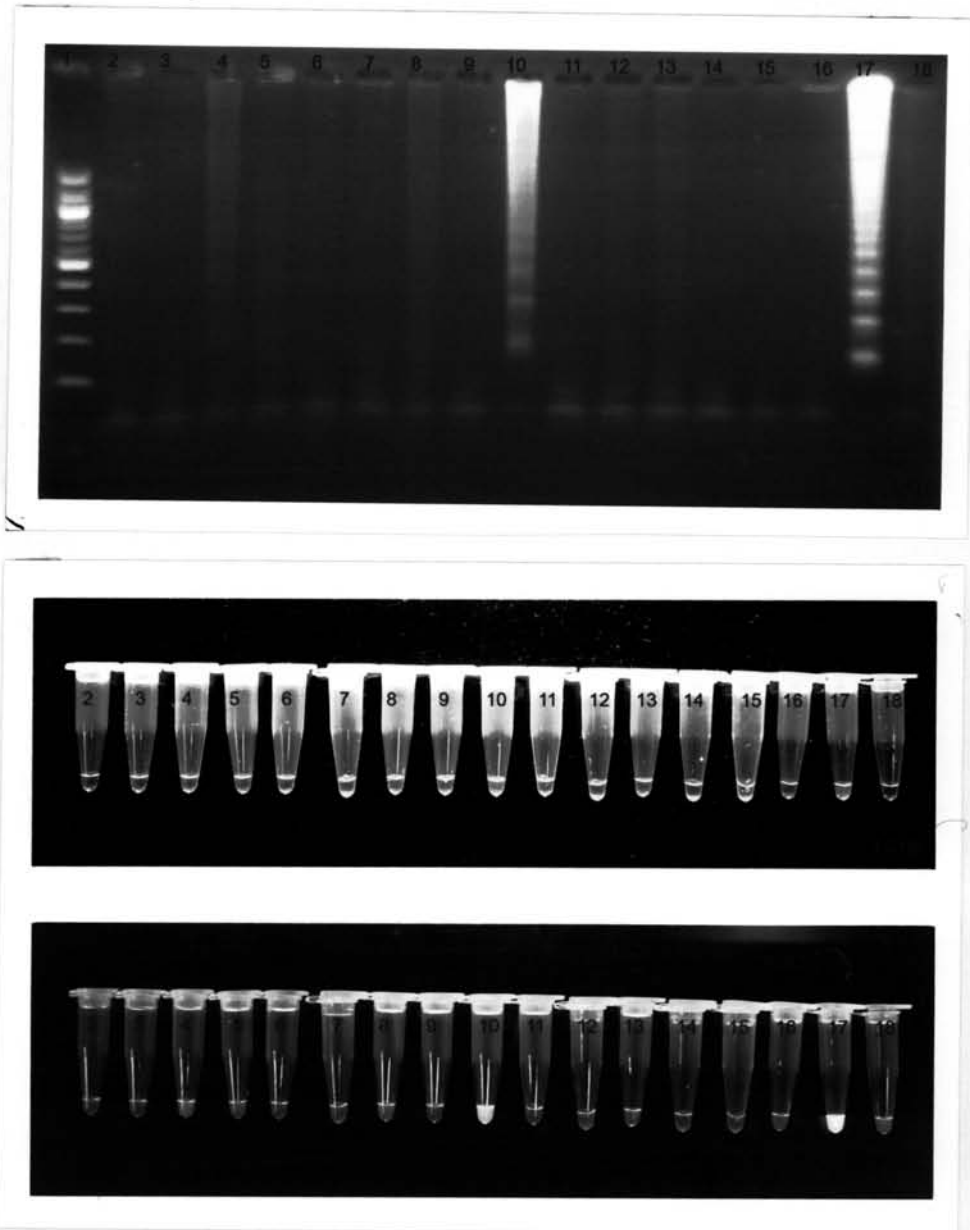


รูปที่ 4.49 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 41-55; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 15 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

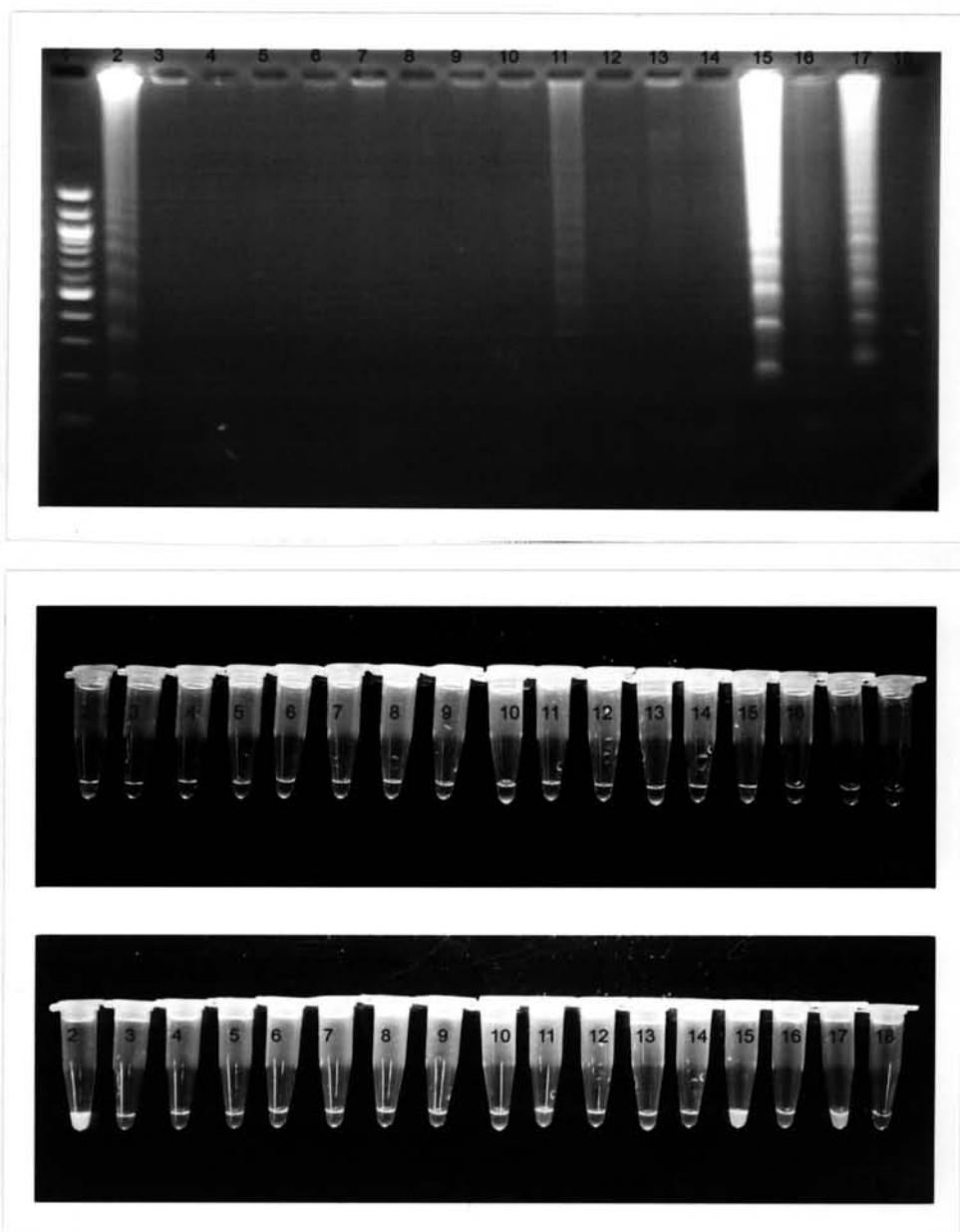


รูปที่ 4.50 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 56-70; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เพอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-11 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 10 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 12 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 13-16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อปลา 4 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ





รูปที่ 4.51 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 71-85; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-15 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อปลา 14 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อกุ้ง 1 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 4.52 แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพปฏิกิริยาไซเบอร์กรีนวันการทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP หมายเลข 86-100; รูป A แสดงภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.8 เปอร์เซ็นต์, รูป B แสดงภาพไซเบอร์กรีนวันด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และรูป C ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว/หลอดที่ 2-8 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อกุ้ง 7 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 9-12,14,16 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 13,15 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่ 2 ตัวอย่าง แถว/หลอดที่ 17 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของเนื้อสุกร แถว/หลอดที่ 18 แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

### 19. การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์โดยเทคนิค LAMP Dot-Blotting

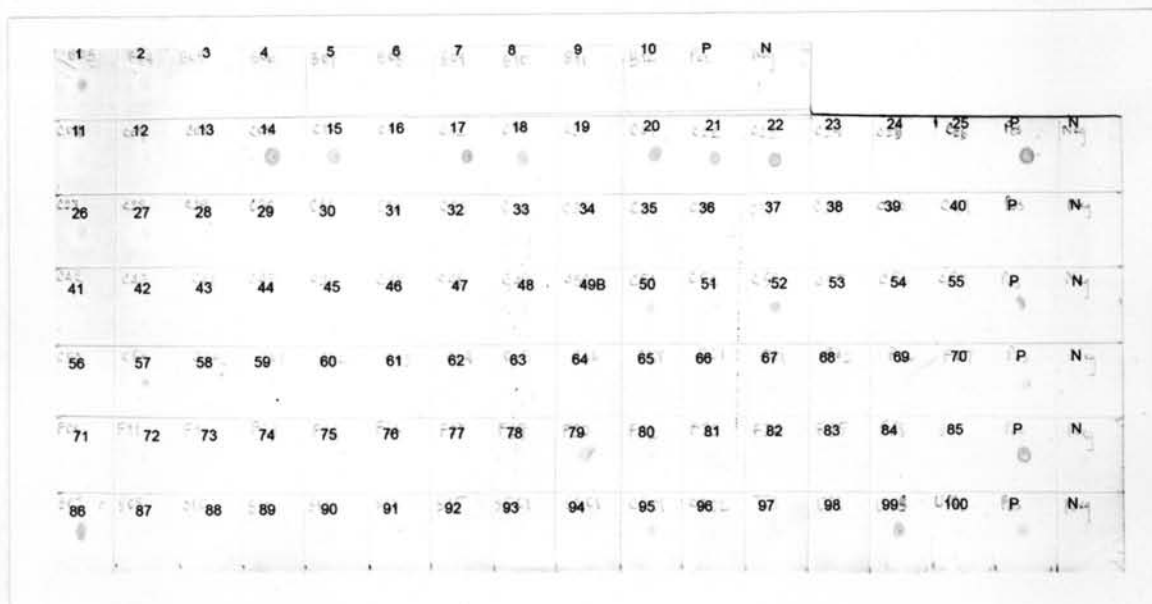
ทำการตรวจหาเนื้อสุกรปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting โดยการนำผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ของผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง คือดีเอ็นเอเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง เนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง เนื้อปลา 18 ตัวอย่าง เนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง มาจุดลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ตามสภาวะที่ 5.3.2 พบว่า จะเกิดจุดสีน้ำเงินอมม่วงของผลผลิตปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ดังสรุปในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.54 คือตัวอย่างจากเนื้อวัว 1 ตัวอย่าง คือหมายเลข 1; ตัวอย่างจากเนื้อไก่ 17 ตัวอย่าง คือหมายเลข 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 48, 50, 51, 52, 57, 99; ตัวอย่างจากเนื้อปลา 2 ตัวอย่าง คือหมายเลข 70, 79; ตัวอย่างจากเนื้อกุ้ง 2 ตัวอย่าง คือหมายเลข 86, 91; ตัวอย่างจากอาหารทะเล 2 ตัวอย่าง คือหมายเลข 95, 100 เทียบกับ LAMP positive และ LAMP negative ทั้งนี้ได้นำดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลบวกกับทั้ง 4 วิธีมาทำการตรวจสอบยืนยันผลบวกด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer F3 และ B3 ของยีน *cytochrome b* อีกครั้งหนึ่งพบว่า มีเพียง 23 ตัวอย่างที่เห็นดีเอ็นเอขนาด 169 คู่เบส ซึ่งตรงกับผลที่ได้จากวิธี Real-Time PCR ที่ใช้เป็น Gold Standard ในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 4.2 ตารางสรุปผลการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธีต่างๆ

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	จำนวนรวมทั้งหมด	วิธีวิเคราะห์									
		Real-Time* PCR		LAMP อิเล็กโตรโฟเรซิส		LAMP ไชเบอร์กรีน (ไฟอรรมาดา)		LAMP ไชเบอร์กรีน (ฮูวี)		LAMP-Dot Blotting	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
เนื้อวัว	10	1	9	1	9	0	10	0	10	1	9
เนื้อไก่	57	15	42	19	38	11	46	14	43	17	40
เนื้อเป็ด	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
เนื้อปลา	18	3	15	4	14	1	17	2	16	2	16
เนื้อกุ้ง	8	2	6	1	7	1	7	1	7	2	6
อาหารทะเล	6	2	4	2	4	0	6	0	6	2	4
รวม	100	23	77	27	73	13	87	17	83	24	76

P คือ ผลบวก N คือ ผลลบ

\* การวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-Time PCR จะใช้เป็น Gold Standard ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นข้อมูลจากงานวิจัยก่อนหน้าที่อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์จำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน Mitochondial DNA บริเวณ D loop



รูปที่ 4.54 แสดงภาพแผ่นเมมเบรนของการตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธี LAMP-Dot Blotting; หมายเลข 1-100 แสดงผลผลิตปฏิกิริยาวิธี LAMP-Dot Blotting ของผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์หมายเลข 1-100 คือดีเอ็นเอเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง เนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง เนื้อปลา 18 ตัวอย่าง เนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่าง, P แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ของเนื้อสุกร, N แสดงผลผลิตปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

20. การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ค่าความไว(Sensitivity), ความจำเพาะ(Specificity), Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV) ของเทคนิค LAMP(Electrophoresis), ไชเบอร์กรีน(แสงไฟธรรมดา), ไชเบอร์กรีน(แสงยูวี), Real-Time PCR, LAMP-Dot Blotting

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ 100 ตัวอย่างด้วยวิธี LAMP (Electrophoresis), ไชเบอร์กรีน(แสงไฟธรรมดา), ไชเบอร์กรีน(แสงยูวี), Real-Time PCR และ LAMP-Dot Blotting แล้วนำผลจากตารางที่ 4.2 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความไว(Sensitivity), ความจำเพาะ(Specificity), Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) ของวิธีการตรวจสอบผลผลิต LAMP แต่ละวิธีข้างต้นกับวิธี Real-Time PCR ที่เป็น Gold Standard สำหรับการทดลองครั้งนี้ โดยดูจากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อไก่เท่านั้น เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างมากเพียงพอ ที่จะคำนวณทางสถิติได้ ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ มีจำนวนตัวอย่างน้อยเกินไป พบว่าวิธีการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรส ไชเบอร์กรีนวันสังเกตผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา ภายใต้แสง UV และเทคนิค LAMP-Dot Blotting ของผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่มีความไว 86.60, 73.33, 86.67 และ 80.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความจำเพาะ 85.71, 100, 97.62 และ 88.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่าพยากรณ์ผลบวก(PPV) , 68.42, 92.86 และ 70.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าพยากรณ์ผลลบ (NPV) 94.74, 91.30, 95.35 และ 92.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความไว(Sensitivity), ความจำเพาะ(Specificity), Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) ของเทคนิค LAMP(Electrophoresis), LAMP ไชเบอร์กรีน(แสงไฟธรรมดา), LAMP ไชเบอร์กรีน(แสงยูวี), Real-Time PCR และ LAMP-Dot Blotting ของผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่จำนวน 57 ตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์	ความไว (Sensitivity)	ความจำเพาะ (Specificity)	Positive predictive value (PPV)	Negative predictive value (NPV)
Real-Time PCR	100%	100%	100%	100%
LAMP (Electrophoresis)	86.60%	85.71%	68.42	94.74%
LAMP ไชเบอร์กรีน (แสงไฟธรรมดา)	73.33%	100%	100%	91.30%
LAMP ไชเบอร์กรีน (แสงยูวี)	86.67%	97.62%	92.86%	95.35%
LAMP Dot-Blotting	80.00%	88.10%	70.59%	92.50%