บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี และน้ำยา

เอทานอล (Ethanol), ไอโซโพรพานอล (2-propanol), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), ไฮโดรคลอริก (HCl), กรดบอริก (Boric acid), โซเดียมซิเตรด ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

เบตาอีน (N,N,N-trimethylglycine, Betaine), อีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), กรดมาเลอิก (Maleic acid) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I, ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100 bp Ladder) สั่งซื้อจากบริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จากบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

ทวีนยี่สิบ (Tween 20) สั่งซื้อจากบริษัท Fisher Biotech ประเทศสหรัฐอเมริกา

ทริสเบส (Tris Base) สั่งซื้อจากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอทิเดียมโบรไมด์ (EtBr) สั่งซื้อจากบริษัท PlusOne™ ประเทศสวีเดน

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) สั่งซื้อจากบริษัท Bio rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่าง

1.1.เนื้อสัตว์

ใช้ตัวอย่างเนื้อสัตว์ดิบจากตลาด หรือซุปเปอร์มาเก็ตทั่วไปทั้งหมด 16 ชนิด ดังนี้ เนื้อสุกร เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกุ้ง เนื้อหอยแครง เนื้อหอยลาย เนื้อหอยนางรม เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อนกกระจอกเทศ เนื้อสุนัข และเนื้อกบ ตัวอย่างละประมาณ 100-1000 กรัม มาบดปั่นด้วยเครื่องบดปั่นผสมอาหาร(Moulinex 645 ประเทศเมกซิโก) เป็นเวลา 15 วินาที 5 ครั้งให้ละเอียด จากนั้นเก็บใส่ถุงถนอมอาหารขนาด 66.5 × 14.9 เซนติเมตร (Ziploc ประเทศไทย) เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป หากไม่ได้สกัด

ดีเอ็นเอทันทีให้เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง หรือที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 30 วัน

1.2. เนื้อสัตว์ผสม

บดเนื้อสุกรประมาณ 200 กรัม เนื้อไก่ประมาณ 1000 กรัม และเนื้อวัวประมาณ 1000 กรัม ด้วยเครื่องบดปั่นผสมอาหารเป็นเวลา 10 วินาที 5 ครั้งให้ละเอียด จากนั้นนำเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่บดไว้มาผสมกันในน้ำหนักรวมเท่ากับ 100 กรัม โดยชั่งเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 0.001เปอร์เซนต์-75เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ดังในตารางที่ 1 นำเนื้อสัตว์ผสมที่ชั่งไว้มาบดปั่นด้วยเครื่องบดปั่นผสมอาหาร อีกครั้งหนึ่งให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที 3 ครั้ง จากนั้นเก็บใส่ถุงถนอมอาหาร เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป หากไม่ได้สกัดดีเอ็นเอทันทีให้เก็บไว้ที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง หรือที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 30 วัน

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนของเนื้อสัตว์ผสมระหว่างเนื้อสุกรกับเนื้อไก่ และเนื้อสุกรกับเนื้อวัว ตั้งแต่ 0.001 เปอร์เซ็นต์ (%)-75 เปอร์เซ็นต์ (%) (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

อัตราส่วนเนื้อสุกร	0.001 %	0.005 %	0.01 %	0.1 %	1 %	2 %	5 %	10 %	25 %	50 %	75 %
เนื้อสุกร (กรัม)	0.001	0.005	0.01	0.1	1	2	5	10	25	50	75
เนื้อไก่/เนื้อวัว (กรัม)	99.999	99.995	99.99	99.9	99	98	95	90	75	50	25

1.3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์

สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์ต่างๆ ที่หาซื้อได้จากตลาด หรือซูเปอร์มาร์เก็ตทั่วไป ดังนี้ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ 57 ตัวอย่าง, ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว 10 ตัวอย่าง, ผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลา 18 ตัวอย่าง, ผลิตภัณฑ์จากเนื้อเป็ด 1 ตัวอย่าง, ผลิตภัณฑ์จากเนื้อกุ้ง 8 ตัวอย่าง, ผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล 6 ตัวอย่างโดยทำการบันทึก ชื่อ น้ำหนัก รูปร่างลักษณะ กลิ่น สี รส ราคา สถานที่ซื้อ สถานที่ผลิต วันเดือนปีที่ผลิต วันหมดอายุ มาตรฐานที่ได้รับการรับรอง จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อสัตว์ประมาณ 100-1000 กรัม มาบดปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมอาหารให้ละเอียดดังข้อ 1.1 เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. **การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์อาหารด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ** Wizard® Genomic DNA Purification Kit

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ผสม และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์ ที่บดเตรียมไว้ในข้อ 1 ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเริ่มจาก ชั่งเนื้อสัตว์บด เนื้อสัตว์ผสม และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์บดอย่างละ 0.1 กรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร(ml) จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 800 ไมโครลิตร(µl) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง(Micro Centrifuge, Hettich mikro 22R ประเทศเยอรมัน) ที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม Nuclei lysis solution ที่แช่เย็นไว้ก่อนปริมาณ 600 ไมโครลิตร และบดให้ละเอียดด้วยแท่งบด (pestle) นำไปบ่มในกล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block, Wealtec ประเทศไต้หวัน) หรืออ่างน้ำควบคุมอุณภูมิ (Water bath, Memmert ประเทศเยอรมัน) ที่ 65 องศาเซลเซียส 15-30 นาที เติม Proteinase K solution 17.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นเติม RNase solution 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา15-30 นาที เติม Protein precipitation solution 200 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร(Vortex, Vortex-Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา) 20 วินาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 3-5 ครั้ง ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากให้แห้งในอากาศ หรือใช้เครื่องปั่นแห้งสูญญากาศ (Vacuum dry, Thermo Savant ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยปั่นที่ความเร็วปานกลางเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายให้ละลายดีเอ็นเอด้วย DNA Rehydration solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำดีเอ็นเอไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และวัดปริมาณด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี หลังจากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา LAMP, PCR และ Real-Time PCR ต่อไป

3. **การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี** (Spectrophotometry)

การวัดปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเจือจางดีเอ็นเอในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่อัตราส่วน 1:100 คือ เจือจางดี

เอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Hitachi U-2001 ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร(A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร(A_{280}) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ จากสูตรดังต่อไปนี้

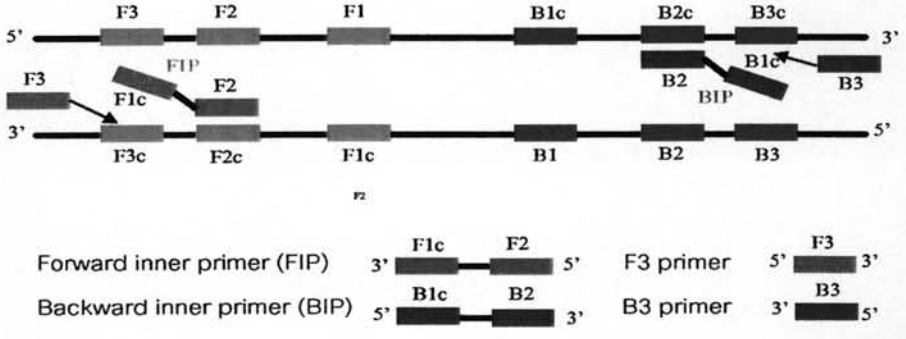
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ = A_{260} x 50 x อัตราส่วนการเจือจาง(นาโนกรัม/ไมโครลิตร)

อัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์
อัตราส่วน A_{260}/A_{280} มากกว่า 1.85 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่
อัตราส่วน A_{260}/A_{280} น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีน หรือฟีนอลปะปนอยู่

4. **การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี** Loop-mediated isothermal amplification Reaction

4.1. **การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา** LAMP

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *cytochrome b* ของสุกร [โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากธนาคารยีน(GenBank) Accession no. AF034353 บริเวณ 15342-16481 ทั้งหมด 4 เส้นคือ F3, B3, Forward Inner Primer (FIP) ประกอบด้วยบริเวณ F1c และF2, Backward Inner Primer (BIP) ประกอบด้วยบริเวณ B1c และ B2, ดังรูปที่ 9 โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer V3 Software (33)



รูปที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP reaction

เนื่องจากลำดับเบสของ *cytochome b* ที่คัดเลือกไว้เป็นบริเวณที่มี AT rich จึงมีการปรับค่าของตัวแปร โดยตั้งค่าแบบขั้นสูง (Advance setting) ที่ค่า GC 50-60 เปอร์เซ็นต์ โปรแกรมจะทำการออกแบบไพรเมอร์แบบต่างๆให้ ซึ่งจะแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ F1, F2, F3, B1, B2, B3, FIP และ BIP และจำนวนชุดของไพรเมอร์ที่สามารถออกแบบได้ทั้งหมด โดยมีเกณฑ์การพิจารณาไพรเมอร์ที่ดีดังนี้คือ ค่าพลังงานอิสระ(free energy) ของไดเมอร์(dimer) ที่ดีที่สุดที่โปรแกรมคำนวณให้ จะต้องไม่น้อยกว่า -2.5

สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมด จากบริษัท Operon ประเทศเยอรมัน โดยคุณภาพของไพรเมอร์เป็นชนิด HPLC นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์มาละลายในบัฟเฟอร์ TE [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM EDTA (pH 8.0)] ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในปฏิกิริยา LAMP ต่อไป

4.2. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification reaction

สารตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วยไพรเมอร์ BIP, FIP, B3 และ F3 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์, เบตาอีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, 10X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl pH 8.8) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ และทวีนยี่สิบ (Tween20) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์], เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 8000 ยูนิต/มิลลิลิตร และดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับ Negative Control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร

4.2.1. การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตรดังนี้ เบตาอีน ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, 1X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (pH8.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ และทวีนยี่สิบความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์], เอนไซม์ *Bst*

DNA polymerase large fragment ความเข้มข้น 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา และดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และไพรเมอร์ FIP, BIP, F3, B3 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ สภาวะที่ 1-5 ดังสรุปในตารางที่ 3.2 บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ Negative Control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ต่อไป

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะ1-5

สภาวะ	ความเข้มข้นไพรเมอร์			
	FIP(μM)	BIP(μM)	F3(μM)	B3(μM)
สภาวะที่ 1	0.8	0.8	0.2	0.2
สภาวะที่ 2	0.4	0.4	0.2	0.2
สภาวะที่ 3	0.2	0.2	0.2	0.2
สภาวะที่ 4	0.1	0.1	0.1	0.1
สภาวะที่ 5	0.1	0.1	0.05	0.05

4.2.2. การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอีน ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2.1 ยกเว้นเบตาอีนจะใช้ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 4.2.1 ดังนี้ FIP และ BIP อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์, F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์

4.2.3. การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2.1 ยกเว้น ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ จะใช้ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 , 1, 1.2 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์

4.2.4. การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2.1 ยกเว้น แมกนีเซียมซัลเฟต จะใช้ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 0 , 2 , 4 , 6, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์

4.2.5. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร ตามสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, และ 4.2.4. ดังนี้ ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์, เบตาอีน ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, 1X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (pH8.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ และทวีนยี่สิบ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์], เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase large fragment ความเข้มข้น 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา และดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วน negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร บ่มที่อุณหภูมิต่างๆกัน ดังนี้ 60 , 63 และ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ต่อไป

4.2.6. การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2.5. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆกันดังนี้ 30 นาที, 45 นาที, 60 นาที, และ 90 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ต่อไป

4.2.7. การทดสอบหาเครื่องมือที่ให้ความร้อนที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2.5. บ่มในเครื่องมือที่ให้ความร้อนชนิดต่างๆกันดังนี้ กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ, ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, SL-Shel Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา), ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven, Contherm thermotec 2000 oven ประเทศนิวซีแลนด์) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

(MJ research 200 ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส 5-10 นาที

5. การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ของดีเอ็นเอสุกร

5.1. การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้วิธีเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel elctrophoresis)

เตรียมวุ้นอะกาโรส 1.8 เปอร์เซนต์ โดยชั่งวุ้นอะกาโรส (Gene Pure LE Agarose บริษัท ISC BioExpress ประเทศสหรัฐอเมริกา) 1.8 กรัม ในบัฟเฟอร์ 0.5 X TBE (0.045 M Tris-OH, 0.045 M Boric acid, 0.001 M EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้ม หรือใช้ไมโครเวฟให้เดือดจนวุ้นละลายหมด ทิ้งไว้ให้อุ่นประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม เอทิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไป 1 ไมโครลิตร เทลงในพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ รอจนวุ้นแข็ง ดึงหวีออก วางลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส (Toyobo ประเทศญี่ปุ่น) นำดีเอ็นเอหรือผลผลิต LAMPที่ต้องการตรวจสอบผสมกับสีย้อม (BJII; 50% sucrose, 50 mM EDTA, 0.005% Bromphenol Blue) หยอดลงในแต่ละหลุม เติมบัฟเฟอร์ TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA) ความเข้มข้น 0.5 เท่า ให้ท่วมวุ้น ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลล์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ดูผลด้วยเครื่องกำเนิดแสงยูวี (Transilluminator) และบันทึกผลโดยใช้กล้อง (UVitec ประเทศอังกฤษ) ทำการตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP ด้วยวิธี Southern Blot ต่อไป

5.2. การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ ไซเบอร์กรีนวัน (SYBR Green I)

เติม 1 ไมโครลิตรของไซเบอร์กรีนวัน (SYBR Green I บริษัท Molecular Probes ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่เจือจางใน DMSO 10-1000 เท่าลงในผลผลิต LAMP สังเกตุการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร ถ้ามีผลผลิต LAMP เกิดขึ้นจะเห็นเป็นสีเขียว แต่ถ้าไม่มีผลผลิตเกิดขึ้นจะเห็นเป็นสีส้ม บันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล (Samsung Digimax ประเทศไต้หวัน)

6. การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP มาทำการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นยีนของสุกรจริงหรือไม่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่มีตำแหน่งที่ตัดบริเวณช่วงห่วง(Loop)ทั้งสองข้างคือ เอนไซม์ *Bam*HI และ *Taq*I (New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา) เตรียมปฏิกิริยา

การตัดเอนไซม์ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เริ่มต้นด้วยการตัดเอนไซม์ *Bam*HI ในปฏิกิริยาดังนี้ 1X บัฟเฟอร์, 0.1X BSA, *Bam*HI 0.5 ยูนิต และผลผลิตปฏิกิริยา LAMP 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 นาที จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1X บัฟเฟอร์, 0.1X BSA, *Taq*I 10 ยูนิต และผลผลิตปฏิกิริยาหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำผลผลิตที่ตัดเอนไซม์มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลล์ ประมาณ 50 นาที ดูว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 223 คู่เบส เมื่อตัดด้วย *Bam*HI และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 125 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Taq*I หรือไม่ และทำการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี Southern Blot ต่อไป

7. การตรวจสอบยืนยันผลผลิต LAMP โดยวิธี Southern Blot ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

7.1. การเตรียมโพรบ

โพรบเตรียมจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) บริเวณยีน *cytochome b* โดยใช้ไพรเมอร์ F3 และ B3 ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X บัฟเฟอร์ (Real-Biotech ประเทศไต้หวัน) , ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ F3 และ B3 ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, เอนไซม์ Real Taq DNA polymerase (Real-Biotech Corporation ประเทศไต้หวัน) 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง Thermal cycle ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 1 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ว่าเป็นยีน *cytochome b* ของสุกรจริงหรือไม่ โดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ว่าได้ขนาดตามที่คาดไว้คือ 169 คู่เบส และตรวจสอบยืนยันโดยการหาลำดับเบส (sequencing) ต่อไป

7.1.1. การหาลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่ใช้เป็นโพรบ

เนื่องจากโพรบที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP เตรียมมาจากวิธี PCR ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบยืนยันผลผลิต PCR ว่าเป็นยีน *cytochome b* ของสุกรจริงหรือไม่ โดยนำผลผลิต PCR ไปทำการหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bio-Technology Service Unit ประเทศไทย) และนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบส

ในธนาคารยีน (GenBank) โดยโปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อตรวจสอบผลผลิต PCR ดังกล่าวว่าเป็นยีนอะไร และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความแตกต่างกับยีนอะไรบ้างอย่างไร

7.1.2. การติดฉลากโพรบ

การติดฉลากโพรบจะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I บริษัท Roche ประเทศเยอรมัน นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR เข้มข้นประมาณ 1 ไมโครกรัม ในปริมาตร 16 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติม DIG-High Prime 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที นำโพรบที่ติดฉลากไปตรวจสอบความเข้มข้นของโพรบและนำไปใช้ในขั้นตอนไฮบริไดเซชัน(Hybridization) ต่อไป

7.1.3. การวัดปริมาณความเข้มข้นของโพรบ

นำโพรบที่ติดฉลากและดีเอ็นเอควบคุมไปจุดลงบนเมมแบรนโดยทำการเจือจางดังตารางที่ 3.3

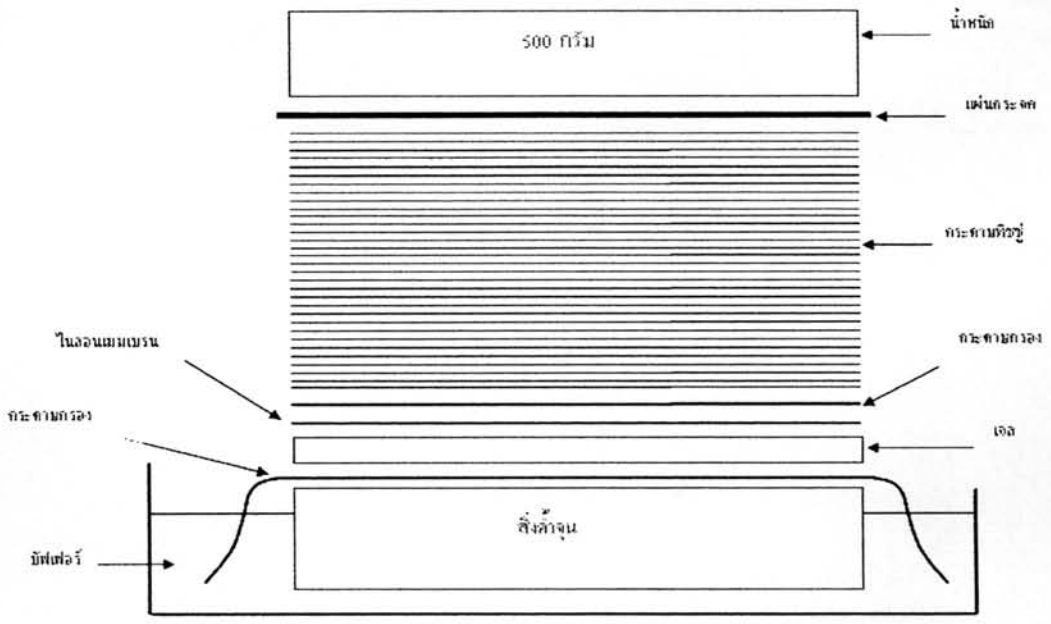
ตารางที่ 3.3 ตารางการเจือจางดีเอ็นเอควบคุมเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกับโพรบที่ทำการติดฉลาก

หลอดที่	ดีเอ็นเอ (ไมโครลิตร)	จากหลอดที่	DNA Dilution buffer	Dilution	ความเข้มข้นสุดท้าย
1	1	เริ่มต้น			1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
2	1	เริ่มต้น	9	1:10	100 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
3	2	1	198	1:100	10 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
4	15	2	35	1:3.3	3 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
5	5	2	45	1:10	1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
6	5	3	45	1:10	0.3 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
7	5	4	45	1:10	0.1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
8	5	5	45	1:10	0.03 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
9	5	6	45	1:10	0.01 พิโคกรัม/ไมโครลิตร
10	0	-	50	-	0

หลังจากนั้นนำไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอติดแน่นกับแผ่นเมมเบรน ต่อมานำมาแช่ในบัฟเฟอร์มาเลอิก[0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaOH (pH 7.5)] 20 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 2 นาที และแช่ใน 1X Blocking solution (เจือจาง 10X Blocking solution ด้วย Maleic acid buffer ในอัตราส่วน 1:10)10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 30 นาที แช่ใน Antibody solution (Anti-Digoxigenin AP Conjugate) 10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 30 นาที แล้วล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาทีด้วย Washing buffer [0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaOH (pH 7.5), 0.3% Tween20 (v/v)] 100 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ เติม Detection buffer [0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH 9.5)] 10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน ทิ้งไว้ 2-5 นาที จากนั้นเติม Color substrate solution (NBT/BCIP) 2 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน วางไว้ในที่มืด ห้ามเขย่า ทิ้งไว้ 1-2 นาที จะพบจุดสีม่วงน้ำเงินปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือบัฟเฟอร์ TE [10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.8) 50 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน] 5 นาที จะทราบความเข้มข้นของโพรบโดยอ่านผลเทียบกับดีเอ็นเอควบคุมในชุดน้ำยาดังในตารางที่ 3.3 บันทึกผลและถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล

7.2. Southern blotting

สำหรับขั้นตอน Southern blot ทำการทดลองโดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP มาแยกขนาดใน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส แช่วุ้นในไฮโดรคลอริก 0.25 โมลาร์ นาน 15 นาที แล้วแช่ใน Denaturizing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 30-60 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นแช่ใน Neutralizing solution (1 M Tris-HCl (pH 7.0), 2 M NaCl) เป็นเวลา 30-60 นาที เขย่าเบาๆ ตัดไนลอนเมมเบรนขนาดพอดีกับวุ้น แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที และแช่ในบัฟเฟอร์ 10X SSC (0.15 M Sodium Citrate (pH 7.0), 1.5 M NaCl) 1 นาที นำแผ่นเมมเบรน, วุ้น, กระดาษกรอง, กระดาษทิชชู่ มาเรียงซ้อนกันดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงภาพการย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงสู่แผ่นเมมเบรน

เติม 10X SSC ที่ถาดด้านล่าง ทิ้งไว้ 6-24 ชั่วโมงจากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างใน 2X SSC และอบที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอติดแน่นกับแผ่นเมมเบรน หากยังไม่ได้ทำไฮบริไดเซชั่น ให้เก็บเมมเบรนไว้ในที่แห้งอย่าให้ถูกแสง โดยห่อเมมเบรนด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ เก็บใน Desiccator

7.3. **ไฮบริไดเซชั่น** (Hybridization)

นำแผ่นเมมเบรนในขั้นตอนที่ 7.2 ใส่ในกระบอกแก้ว เติม Pre-hybridization solution DIG Easy Hyb (10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน) ที่อุ่นให้ร้อนที่ 42 องศาเซลเซียสไว้ก่อนลงไป บ่มในตู้อบไฮบริไดเซชัน (Hybridization oven) (Whatman Biometra ประเทศเยอรมัน) ที่ 42 องศาเซลเซียส 30 นาที หมุนที่ความเร็วระดับ 2 ตลอดเวลา จากนั้นเท Pre- hybridization solution ทิ้ง และเติม Hybridization solution DIG Easy Hyb ที่อุ่นไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน ที่ผสมกับ DIG-labeled DNA probe 20 ไมโครลิตร (โดยDIG-labeled DNA probe ต้องทำการต้มในน้ำเดือด 10 นาที และแช่น้ำแข็งทันทีไว้ก่อน) ลงไป บ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน หมุนที่ความเร็วระดับ 2 ตลอดเวลา จากนั้นนำไปล้างด้วย Washing solution I (2X SSC ผสมกับ 0.1% SDS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างอีกครั้งด้วย Washing solution II (0.5X SSC ผสมกับ 0.1% SDS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส

7.4. Detection

จะมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 7.1.3 โดยเริ่มจากการนำแผ่นเมมเบรนที่ล้างเรียบร้อยแล้วจากขั้นตอน Hybridization มาล้างอีกครั้งด้วย Washing buffer [0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaOH (pH 7.5), 0.3% Tween20 (v/v)] 1-5 นาที และแช่ใน Blocking solution 100 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 30 นาที แช่ใน Antibody solution 20 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน พร้อมกับเขย่าเบาๆ 30 นาที ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ด้วย Washing buffer 100 มิลลิลิตร /100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน พร้อมกับเขย่าเบาๆ เติม Detection buffer 20 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน 2-5 นาที แล้วเติม Color substrate solution 10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน วางไว้ในที่มืด ห้ามเขย่า ทิ้งไว้ 1-2 นาที จะพบจุดสีม่วงน้ำเงินปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือบัฟเฟอร์ TE 50 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรนแช่ไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพ

8. **การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆด้วยวิธี LAMP**

เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะใช้ขั้นตอนและกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอบางส่วนถูกทำลายไป ดังนั้นจึงต้องการทดสอบว่าวิธี LAMP จะสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรที่ผ่านกระบวนการและอุณหภูมิต่างๆได้หรือไม่ โดยทำการทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับเนื้อสุกรที่นำไปให้ความร้อนที่ 50, 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในเครื่อง Autoclave (TOMY SX-500 ประเทศญี่ปุ่น) โดยเตรียมปฏิกิริยา LAMP ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตรในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้ เบตาอีน ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, 1X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอริก (pH8.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ และทวีนยี่สิบ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์], เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase large fragment ความเข้มข้น 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา และดีเอ็นเอของเนื้อสุกรที่ต้มที่อุณหภูมิต่างๆข้างต้น ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอสุกร และ Positive control จะใช้ดีเอ็นเอจากสุกรดิบ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา

ด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และไซเบอร์กรีนวัน ดังในการทดลองที่ 5.1. และ 5.2. ต่อไป

9. **การทดสอบความจำเพาะ ของวิธี LAMP กับเนื้อสัตว์อื่น ๆ**

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อสัตว์ในข้อ1.1 ดังนี้ ดีเอ็นเอเนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกุ้งกุลาดำ เนื้อหอยแครง เนื้อหอยลาย เนื้อหอยนางรม เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อนกกะจอกเทศ เนื้อสุนัข และเนื้อกบ ความเข้มข้นอย่างละ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตรมาตรวจสอบความจำเพาะด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยเตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 8 Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ต่างๆ และ Positive control จะใช้ดีเอ็นเอสุกร ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และไซเบอร์กรีนวัน ดังในการทดลองที่ 5.1. และ 5.2. ต่อไป

10. **การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี LAMP**

ทำการทดสอบหาความไวเพื่อตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี LAMP และปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์จากเนื้อสัตว์ผสม ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว

10.1. การวิเคราะห์ความไว ในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP

ทำการเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อสุกรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัม ตามลำดับ แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี LAMP โดยเตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 8 Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และไซเบอร์กรีนวัน ดังในการทดลองที่ 5.1. และ 5.2. ต่อไป บันทึกปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

10.2 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร ในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี LAMP

นำเนื้อสัตว์ผสมที่สกัดได้ จากข้อ 1.2. คือ ดีเอ็นเอเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 0.001-75 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้ว

ทำการทดสอบด้วยวิธี LAMP โดยเตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 8 Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร และ Positive control จะใช้ดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และไซเบอร์กรีนวัน ดังในการทดลองที่ 5.1. และ 5.2.ต่อไป บันทึกอัตราส่วนของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ หรือ ผสมเนื้อวัว ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

11. การวิเคราะห์ความไว ในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดย วิธี PCR

เพื่อเปรียบเทียบความไวระหว่างวิธี LAMP และวิธี PCR ในการตรวจหาเนื้อสุกรและเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม จึงทำการทดสอบหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรและดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสัตว์ผสม ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และ เนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี PCR

11.1. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอสุกรที่เจือจางจางข้อ 10.1. คือดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัม ตามลำดับ มาทำการทดสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ F3 และ B3 ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10 X บัฟเฟอร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ F3 และ B3 ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์, เอนไซม์ Real Taq DNA polymerase 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง Thermal cycle ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 1 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ, 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ว่าได้ขนาดตามที่คาดไว้คือ169 คู่เบส ที่ปริมาณดีเอ็นเอสุกรที่น้อยที่สุดที่ความเข้มข้นเท่าใด

11.2. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมด้วยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 0.001-75 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในข้อ 10.2. มาทำการทดสอบด้วยวิธี PCR ดังในการทดลองที่ 11.1. สำหรับ negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของเนื้อผสม ตรวจสอบ

ผลผลิต PCR โดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ว่าได้ขนาดตามที่คาดไว้คือ169 คู่เบส ที่อัตราส่วนของเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ หรือเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่น้อยที่สุดเท่ากับเท่าไหร่

12. การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี Real-Time PCR

เพื่อเปรียบเทียบความไวระหว่างวิธี LAMP และวิธี Real-time PCR ในการตรวจหาเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม จึงทำการทดสอบหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรและดีเอ็นเอสุกรจากเนื้อสัตว์ผสม ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และ เนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธี Real-time PCR

12.1 การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี Real-Time PCR

นำดีเอ็นเอสุกรที่เจือจางจางที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร) ในข้อ 10.1. มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-Time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche ประเทศเยอรมัน) กับเครื่อง LightCycler 2.0 (Roche ประเทศเยอรมัน) โดยตั้งโปรแกรมในซอฟแวร์ LightCycler 4.0 ตามวิธีที่แนบมากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปประกอบด้วย 4 โปรแกรมดังนี้ โปรแกรม Pre incubation 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที, โปรแกรม Amplification จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนด้วยกันคือขั้น Denature 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที และขั้น Primer Annealing 55 องศาเซลเซียส 10 วินาที และขั้น Extension 72 องศาเซลเซียส16 วินาที, โปรแกรม Melting curve เป็นการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาว่ามีความจำเพาะหรือไม่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 95 องศาเซลเซียส จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงจนถึง 65 องศาเซลเซียส 15 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส และโปรแกรม Cooling ที่ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที วิเคราะห์ผล Amplification Curves, Melting Curves และวัดปริมาณดีเอ็นเอเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยเส้นกราฟมาตรฐานสร้างจากดีเอ็นเอสุกรที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัม/1 ไมโครลิตร และตรวจสอบผลผลิตของ Real-Time PCR อีกครั้งโดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ว่าได้ขนาดตามที่คาดไว้คือ169 คู่เบส หรือไม่

12.2 **การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี** Real-Time PCR

นำดีเอ็นเอเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 0.001-75 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ ไมโครลิตรในข้อที่ 10.2. มาทำการทดสอบด้วยวิธี Real-Time PCR และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 10.1. negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของเนื้อผสม

13. **การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี** LAMP-Dot Blotting

เนื่องจากการตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้านั้นค่อนข้างมีความยุ่งยาก เสียเวลา และต้องใช้เครื่องแยกกระแสไฟฟ้า(Electrophoresis) ซึ่งจัดเป็นอุปกรณ์เฉพาะทางห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา จึงอาจไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือใช้ในภาคสนาม ดังนั้นจึงต้องการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ผลให้มีความง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น โดยนำเทคนิค Dot Blot Hybridization มาประยุกต์เข้ากับวิธี LAMP เป็นวิธี LAMP-Dot Blotting ซึ่งจะทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP-Dot Blotting จากนั้นจึงทดสอบความจำเพาะ ความไว และทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ต่อไป

13.1 **การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจเนื้อสุกร และเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม โดยวิธี** LAMP-Dot Blotting

ตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ ผลผลิต LAMP จากดีเอ็นเอสุกร ผลผลิต LAMP ที่เป็น Negative control คือใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอ และ ผลผลิต PCR ของเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งใช้เป็น Negaitve control อีกชนิดหนึ่ง นำผลผลิต LAMP มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ในอัตราส่วน 1:1 คือ ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP 2 ไมโครลิตรผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ LAMP-Dot Blotting โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เวลาในขั้นตอนไฮบริไดเซชัน ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4 ดังนี้

สภาวะที่ 1 จะทำตามวิธีการมาตรฐานของชุดน้ำยา โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 7.3 และ 7.4 ยกเว้น เวลาขั้นตอน 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 สภาวะ

ที่ 2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 1 ยกเว้น อุณหภูมิในขั้นตอน Pre-hybridization จะเปลี่ยนจาก 42 องศาเซลเซียส 15 นาที เป็น อุณหภูมิห้อง 15 นาที, อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอน hybridization จะเปลี่ยนจาก 42 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เป็น อุณหภูมิห้อง 60 นาที, เวลาล้างในขั้นตอน Detection ก่อนเติม Blocking solution ลดจาก 5 นาทีเหลือ 2 นาที, เวลาสำหรับ blocking solution และ Antibody solution ลดจาก30 นาทีเหลือ 15 นาที, เวลาสำหรับ Detection buffer ลดจาก 5 นาทีเหลือ 2 นาที และ เวลาสำหรับ color solution เพิ่มจาก 15 นาทีเป็น 60 นาที 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 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

หลังจากปรับเปลี่ยนเวลาและอุณหภูมิในขั้นตอนหลักต่างๆแล้ว จะทำการทดสอบหาปริมาตรของผลผลิต LAMP ที่เหมาะสมและตัดขั้นตอนหลักบางขั้นตอนออกเพื่อที่จะทำให้เวลาและขั้นตอนลดน้อยลงให้มากที่สุด โดยปริมาตรของผลผลิต LAMP จะมีด้วยกัน 3 แบบ คือ สภาวะที่ 5.1.1, 5.1.2 และ 6.1.2 จุดผลผลิต LAMP 1 ไมโครลิตร 1 ครั้ง สภาวะที่ 5.2.1, 5.2.2 และ 6.2.2 จุดผลผลิต LAMP 2 ไมโครลิตร 1 ครั้ง สภาวะที่ 5.3.1, 5.3.2 และ 6.3.2 จุดผลผลิต LAMP 2 ครั้งซ้ำที่เดิม โดยจุดครั้งละ 1 ไมโครลิตร

สำหรับสภาวะที่ 5.1.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับสภาวะที่ 4 แต่ตัดขั้นตอน Hybridization และ ขั้นตอนล้างด้วย Washing solution I ออก ในขั้นตอนล้างด้วย washing buffer ก่อนเติม detection buffer ลดเหลือ 1 ครั้ง 5 นาที สำหรับสภาวะที่ 5.2.1 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.1 แต่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 5.3.1จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.1 แต่ตัดขั้นตอนการอบออก

สำหรับสภาวะที่ 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 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.2 แต่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 5.3.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.2 แต่ตัดขั้นตอนการอบออก

สำหรับสภาวะที่ 6.1.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 5.1.2 ยกเว้น เวลาในการ Hybridization ที่อุณหภูมิห้อง ลดจาก 30 นาที เหลือ 15 นาที สภาวะที่ 6.2.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 6.1.2 แต่ลดเวลาในการอบเมมเบรนที่ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็น 10 นาที และ สภาวะที่ 6.3.2 จะเหมือนกับสภาวะที่ 6.1.2 แต่ตัดขั้นตอนการอบออก

ตารางที่ 3.4 แสดงสภาวะต่างๆของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ที่ใช้ในการทดลอง

สภาวะ	[Probe] 1 ng/µl	ปริมาตรที่จุด	อบ		Pre-hybridization		Hybridization		Washing Solution I		Washing Solution II		Washing buffer	Blocking Solution	Antibody Solution	Washing buffer	Detection buffer	Color Substrate solution
			เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)	เวลา (นาที)	เวลา (นาที)	เวลา (นาที)	เวลา (นาที)	เวลา (นาที)
1	เจือจาง 8 เท่า	1 µl	30	120	15	42	0vernight	42	2×5	RT	2×5	68	5	30	30	2×15	5	15
2	เจือจาง 8 เท่า	1 µl	30	120	15	RT	60	RT	2×5	RT	2×5	68	2	15	15	2×15	2	60
3	เจือจาง 4 เท่า	1 µl	30	120	15	RT	60	RT	2×5	RT	2×5	RT	2	15	15	2×10	2	60
4	เจือจาง 4 เท่า	1 µl	30	120	15	RT	30	RT	2×5	RT	2×5	RT	1	15	15	2×5	1	60
5.1.1	-	1 µl	30	120	-	-	30	RT	-	-	2×5	RT	1	15	15	5	1	15-60
5.2.1	-	2 µl	10	120														
5.3.1	-	2 µl (ซ้ำ)	-	-														
5.1.2.	-	1 µl	30	120	-	-	30	RT	-	-	5	RT	1	10	15	5	1	15-60
5.2.2.	-	2 µl	10	120														
5.3.2.	-	2 µl (ซ้ำ)	-	-														
6.1.2.	-	1 µl	30	120	-	-	15	RT	-	-	5	RT	1	10	15	5	1	15-60
6.2.2.	-	2 µl	10	120														
6.3.2.	-	2 µl (ซ้ำ)	-	-														

14. อื่นๆ โดยวิธี LAMP-Dot Blotting

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อสัตว์ในข้อ1.1.ดังนี้ ดีเอ็นเอเนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อเป็ด เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อปลาซาลมอน เนื้อกุ้งกุลาดำ เนื้อหอยแครง เนื้อหอยลาย เนื้อหอยนางรม เนื้อปลาหมึก เนื้อปู เนื้อนกกะจอกเทศ เนื้อสุนัข และเนื้อกบ มาทำปฏิกิริยา LAMP ดังขั้นตอนที่ 9 Negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ในอัตราส่วน 1:1 คือ ผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP 2 ไมโครลิตรผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ 2 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาจุดลงบนแผ่นแมมเบรนจุดละ 1 ไมโครลิตร นำไปทำ Dot Blot Hybridization ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 13.1. ดังนี้ เติม Hybridization solution (3.5 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน) ที่ผสมกับ DIG-labeled DNA probe ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (โดยต้องต้ม DIG-labeled DNA probe ในน้ำเดือด 10 นาที และแช่น้ำแข็งทันทีไว้ก่อน) ลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นล้างด้วย Washing Solution II เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วย Washing buffer เขย่าเบาๆ 1 นาที และแช่ใน blocking solution 100 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 10 นาที แช่ใน antibody solution 20 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 15 นาที แล้วล้างด้วย washing buffer 100 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน เขย่าเบาๆ 5 นาที เติม detection buffer 20 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรนทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเติม color substrate solution 10 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน วางไว้ในที่มืด ห้ามเขย่า ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที จะพบจุดสีม่วงน้ำเงินปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหรือบัฟเฟอร์ TE 50 มิลลิลิตร/100 ตารางเซนติเมตรของเมมเบรน แช่ไว้เป็นเวลา 5 นาที Negative control จะไม่มีสีหรือสีจางมาก ส่วน Positive control จะมีสีม่วงน้ำเงินชัดเจน

15. การหาความไวในการตรวจหาเนื้อสุกรในเนื้อสัตว์ผสม โดยวิธี LAMP-Dot Blotting

15.1. การหาความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรโดยวิธี LAMP-Dot Blotting

นำดีเอ็นเอสุกรที่เจือจางที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 นาโนกรัม/ 1 ไมโครลิตร ในข้อ 10.1 มาตรวจสอบความไวด้วยปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting โดยทำการทดลองตามข้อ 14. negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของสุกร

15.2. **การวิเคราะห์ความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสมโดยวิธี** LAMP-Dot Blotting

นำดีเอ็นเอเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 0.001-75 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ 1 ไมโครลิตร ในข้อ 10.2. มาตรวจสอบความไวด้วยปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting โดยทำการทดลองตามข้อ 14. negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์

16. **การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์โดยเทคนิค** LAMP reaction

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ในข้อ1.3. มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/1ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยเตรียมปฏิกิริยา LAMP ดังในข้อ 9. Positive control จะใช้ดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/1 ไมโครลิตร ส่วน negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1.8 เปอร์เซนต์ วุ้นอะกาโรส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และไซเบอร์กรีนวัน ดังในการทดลองที่ 5.1. และ 5.2. ต่อไป

17. **การตรวจหาการปนเปื้อนของสุกรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์โดยเทคนิค** LAMP-Dot Blotting

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ในข้อ1.3. มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP-Dot Blotting โดยทำการทดลองตามข้อ 14. Positive control จะใช้ดีเอ็นเอสุกรความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/1 ไมโครลิตร ส่วน negative control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ