

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

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