ชื่อโครงการ การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (พี ซี อาร์) แบบไพรเมอร์เดี่ยวร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบซาลโมเนลลา เอนเทอริทิดิส ที่มีชีวิตในอาหาร

Development of Single Primer-Based Polymerase Chain Reaction Combined with Ethydium Bromide Monoazide for Reliable Detection of Viable *Salmonella* spp. in Foods.

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2555 จำนวนเงิน 184,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2555 - 2556
ชื่อผู้วิจัย นางสร้อยทอง สายหยุดทอง สถาบันมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร. 0897745713 e-mail: ifrsos@ku.ac.th

---

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบไพรเมอร์เดี่ยว ในการตรวจวิเคราะห์ ซาลโมเนลลา เอนเทอริทิดิส ที่มีชีวิตในอาหาร จากการศึกษาพบว่า เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์เดี่ยวขนาด 20 เบส สามารถตรวจสอบซาลโมเนลลาจำนวน 38 สายพันธุ์ โดยให้แถบดีเอ็นเอหลักขนาดประมาณ 770 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอนี้ในเชื้อกลุ่มที่ไม่ใช่ซาลโมเนลลา จำนวน 20 สายพันธุ์ แถบดีเอ็นเอหลักที่ใช้ตรวจความจำเพาะนี้มีความจำเพาะและความแม่นยำสูงในการนำมาใช้ตรวจสอบซาลโมเนลลาซีโรไทป์ต่างๆ เทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบซาลโมเนลลาในสภาวะเครียดที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองและในอาหารที่ผ่านกระบวนการต่างๆในขั้นตอนการผลิต ได้แก่ การแช่เย็น การแช่เยือกแข็ง และกระบวนการหมัก โดยพบแถบดีเอ็นเอหลักขนาด 770 คู่เบสเช่นเดียวกับ การตรวจสอบซาลโมเนลลาที่อยู่ในสภาวะปกติ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ใช้ไพรเมอร์เดี่ยวร่วมกับสีย้อมดีเอ็นเอ เอ็ททิเดียมโบรไมด์ โมโนเอไซด์ เพื่อใช้ตรวจสอบซาลโมเนลลาที่มีชีวิตเท่านั้น จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคนี้พบว่า ปริมาณเอ็ททิเดียมโบรไมด์ โมโนเอไซด์ที่ใช้ในปฏิกิริยา เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยากับแสง 5 นาทีและระยะห่างระหว่างหลอดไฟกับตัวอย่างดีเอ็นเอเท่ากับ 20 เซนติเมตร จากผลการทดลองพบว่า เทคนิคนี้สามารถยับยั้งการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอที่ตายแล้วของซาลโมเนลลา เอ็นเทอริทิดิส ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้ทั้งตัวอย่างที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติและตัวอย่างที่สร้างการปนเปื้อนเทียม เทคนิคนี้เป็นวิธีตรวจสอบอย่างรวดเร็วที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจซาลโมเนลลาที่มีชีวิตเท่านั้นในตัวอย่างอาหาร

The main objective of this research was to develop the single primer-based random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) combined with ethydium bromide monoazide (EMA) for reliable detection of only viable *Salmonella* spp. in food samples. The results indicated that RAPD-PCR using 20-mer oligonucleotide primer (primer 3) could produce the specific 770-bp DNA of all 80 *Salmonella* strains. No 770-bp DNA band was amplified from any DNA sample of 20 non-*Salmonella* bacteria. The DNA band had high specificity and consistency for the detection of various *Salmonella* serotypes. For the stress conditions, this method could detect stressed *Salmonella* cells from various treatments, *in vitro* and processed foods such as chilled, frozen and fermented pork and chicken Nham with the same positive signal of 770-bp DNA band as the non-stressed cells. In addition, primer 3-based RAPD-PCR combined with ethidium bromide monoazide (EMA-RAPD-PCR) was developed for the discrimination of viable *Salmonella* cells from dead cells. The optimum amount of EMA, light exposure time and distance were 3 μg/ml, 5 min and 20 cm, respectively. The detection limit was not less than 1.3×10^3 viable cells and EMA-RAPD-PCR could inhibit the DNA amplification of 1.3×10^6 dead cells. The obtained

results of the detection of *Salmonella* contaminated in all tested chicken products from fresh market and supermarket by EMA-RAPD-PCR were identical to the conventional method. The developed EMA-RAPD-PCR had potential to detect only viable *Salmonella* contaminated in the food samples providing the advantages of rapidity, reliability, high sensitivity and specificity.