

MAGNETIC NANOPARTICLE BASED PCR ASSAY FOR DETECTION OF
CAMPYLOBACTER SPECIES IN FOOD SAMPLES AND DIELECTROPHORETIC
IMPEDANCE MEASUREMENT FOR DNA DETECTION

WUTTICHOTE JANSAENTO 5137680 MTMT/D

Ph.D. (MEDICALTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : WIJIT WONGLUMSOM, Ph.D., WANPEN
CHAICUMPA, D.V.M. (Hons), Ph.D., CHAMRAS PROMMAS, Ph.D.,
KULACHART JANGPATARAPONGSA, Ph.D., DUANGPORN POLPANICH,
Ph.D.

ABSTRACT

Campylobacter species are major foodborne pathogens, causing bacterial gastroenteritis worldwide. Poultry are considered to be important reservoirs of *Campylobacter* transmission and campylobacteriosis commonly relates to the consumption of undercooked chicken products. This study successfully developed a magneto-PCR-enzyme linked gene assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* from chicken skin. The forward primers immobilized on magnetic nanoparticles captured *Campylobacter* DNA to be amplified by PCR reaction and the PCR products were detected by streptavidin-horseradish peroxidase and its substrate. The method demonstrated 100% specificity and high sensitivity with one picogram detection of *Campylobacter* DNA. All positive results derived from the detection in naturally contaminated samples were in accordance with the results analyzed by a conventional cultural method and PCR assay. In this study, the dielectrophoretic impedance measurement (DEPIM) method has been used for the detection of PCR and LAMP products by measuring an increment of the conductance. Dielectrophoresis is a motion of the polarized particles in spatially non-uniform electric fields. The DEP-trapping process of DNA, generated from PCR or LAMP products, was not visualized by a fluorescence microscopy. However, in an AC electric field of 150 kHz, the conductance increased when applying the undiluted PCR product of 187 base pairs. After optimizing conditions for detecting LAMP product, only undiluted and ten-fold diluted LAMP products significantly demonstrated the conductance increment. This preliminary study showed the possibility of applying The DEPIM method for detection of PCR and LAMP products.

KEY WORDS: MAGNETIC NANOPARTICLE/ CHICKEN SKIN/ PCR/LAMP/
THERMOPHILIC *CAMPYLOBACTER* / DIELECTROPHORESIS/

82 pages

การพัฒนาวิธี PCR โดยใช้ magnetic nanoparticle เพื่อตรวจหา *Campylobacter* species ในตัวอย่างอาหารและการใช้เทคนิค dielectrophoretic impedance ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ

MAGNETIC NANOPARTICLE BASED PCR ASSAY FOR DETECTION OF *CAMPYLOBACTER* SPECIES IN FOOD SAMPLES AND DIELECTROPHORETIC IMPEDANCE MEASUREMENT FOR DNA DETECTION

วุฒิโชติ จันทร์แสนตอ 5137680 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : วิจิตร วงศ์ล้ำชา, Ph.D., วันเพ็ญ ชัยคำภา, สพ.บ. (เกียรตินิยม), Ph.D., จักรีส พร้อมมาศ, ปร.ด., กุลชาติ จังภัทรพงศา, ปร.ด., ดวงพร พลพานิช, ปร.ด.

บทคัดย่อ

เชื้อ *Campylobacter* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญที่ติดต่อได้ทางอาหารและพบการก่อโรคลำไส้ อักเสบได้ทั่วโลก สัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่จัดเป็นแหล่งสะสมเชื้อตามธรรมชาติที่สำคัญและโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นมักเกี่ยวข้องกับการรับประทานเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากไก่ที่ปรุงไม่สุก ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี magneto-PCR-enzyme linked gene เพื่อตรวจหาเชื้อ *Campylobacter* จากตัวอย่างหนึ่งไก่ขึ้น โดย forward primer ไปติดกับอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนเพื่อจับกับสายพันธุกรรมของเชื้อนี้และนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรม ทำการตรวจหาผลผลิต PCR โดยใช้ streptavidin-horseradish peroxidase ข้อยสารตั้งต้นที่เติมลงไปและเมื่อมีการย่อยเกิดขึ้นสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีความจำเพาะเป็น 100 เปอร์เซ็นต์และมีความไวสูง โดยตรวจได้ในปริมาณสารพันธุกรรมของ *Campylobacter* ต่ำที่สุดได้ระดับ 1 พิโคกรัม เมื่อนำวิธีนี้ไปทำการทดสอบกับตัวอย่างหนึ่งไก่ที่เป็นบวก พบว่ามีความสอดคล้องกับผลบวกที่ได้จากการทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงมาตรฐานและวิธี PCR ปกติ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำเทคนิค dielectrophoresis ร่วมกับการวัดค่าความเหนี่ยวนำไฟฟ้ามาใช้ในการตรวจหาผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR และ LAMP ซึ่งเทคนิค dielectrophoresis เป็นการเคลื่อนที่ของวัสดุที่มีขั้วประจุในสนามไฟฟ้าที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน การศึกษานี้ไม่สามารถแสดงภาพการจับของสายพันธุกรรมกับขั้วไฟฟ้าได้เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่สามารถวัดการเพิ่มขึ้นของค่าความเหนี่ยวนำไฟฟ้าเมื่อใช้ตัวอย่างที่เป็นผลผลิตจาก PCR ขนาด 187 คู่เบส เมื่อใช้กระแสสลับที่ความถี่ 150 kHz ตัวอย่างจากปฏิกิริยา LAMP ทั้งที่ไม่เจือจางและเจือจาง 10 เท่ามีผลเพิ่มค่าความเหนี่ยวนำไฟฟ้าได้ดี งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมจากปฏิกิริยา PCR และ LAMP