ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการปนเปื้อนของ เชื้อ *Escherichia coli* ในน้ำและอาหาร โดยการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบและเทคนิค polymerase chain reaction
ผู้วิจัย	ชลธิชา คลังทอง
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด Dr.Eng.
	พนิดา ชัยเนตร, M.D.
	ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.
วันสำเร็จการศึกษา	21 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2539

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้นำดีเอ็นเอโพรบและวิธีการทำ PCR มาใช้ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* ในน้ำและอาหาร ดีเอ็นเอโพรบ 4 ขนาดที่ใช้เป็นส่วนของยีน *uidA* ของ *E. coli* K12 ซึ่งสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) เมื่อติดฉลากดีเอ็นเอโพรบเหล่านี้ด้วย digoxigenin และนำไปทดสอบกับแบคทีเรียต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ผลการทำไฮบริไดเซชันพบว่า ดีเอ็นเอโพรบทั้ง 4 สามารถไฮบริไดซ์กับ *E. coli* ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 120 สายพันธุ์ โดยไม่ขึ้นอยู่กับ การสร้างเอนไซม์ GUS และให้ผลลบ กับเอ็นเตอริคแบคทีเรียตัวอื่นๆ คือ *Citrobacter, Enterobacter, Edwardsiella, Morganella, Klebsiella, Proteus* และ *Salmonella* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ที่ใช้ในการทดสอบคือ *Bacillus* และ *Staphylococcus* แต่ให้ผลบวกกับ *Shigella* จำนวน 11 สายพันธุ์ทั้งที่สร้าง และไม่สร้างเอนไซม์ GUS การใช้เทคนิค PCR โดยใช้ primer 2 คู่ ที่ได้จากส่วนของยีน *uidA* คือ GAL-301 กับ GAR-432 ซึ่งจะให้ product ขนาด 0.153 kb และ GAL-301 กับ GAR-806 ซึ่งจะให้ product ขนาด 0.527 kb เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันว่า primer จากส่วนของยีนดังกล่าวมีความจำเพาะสูงในการตรวจสอบเชื้อ *E. coli* จากผลการทดสอบ ความจำเพาะแสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอโพรบทั้ง 4 คือ GA153, GA527, GA175 และ GA549 และ primer ทั้ง 3 คือ GAL-301, GAR-432 และ GAR-806 มีความจำเพาะสูงในการใช้ตรวจสอบ *E. coli* และ *Shigella* ทุกสายพันธุ์ทั้งที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ GUS การทดสอบความไวของวิธีการพบว่า เทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบติดฉลากด้วย digoxigenin มีความไวในการตรวจสอบ เชื้อได้ประมาณ

Copyright by Chulalongkorn University

10^5 CFU/dot ขณะที่ เทคนิค PCR จะสามารถตรวจพบเชื้อได้ถ้ามีเชื้อ 1-10 เซลล์ต่อหนึ่งปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟเรซิส ได้ทำการตรวจสอบ *E. coli* ในน้ำโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิคการกรองน้ำด้วย FHLP membrane (Millipore Corp.) พบว่าตรวจไม่พบ *E. coli* ในน้ำดื่ม 10 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ได้ใช้เทคนิคการทำ PCR โดยตรงและการใช้ PCR ร่วมกับเทคนิคการกรองมาใช้ตรวจสอบ *E. coli* ในตัวอย่างอาหาร จากการทดสอบพบว่า ขั้นตอน preenrichment สามารถเพิ่มจำนวน PCR products ซึ่งแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการบ่ม อย่างไรก็ตามมีผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค PCR สามารถตรวจพบ DNA อิสระ (1 นาโนกรัม) ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาหารได้ แม้ว่าจะผ่าน การบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 0, 30 และ 60 นาที แล้วก็ตาม ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่ การใช้เทคนิค PCR จะสามารถตรวจพบ DNA อิสระ หรือ DNA ที่มาจากเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบได้ ดังนั้นการแปลผลการตรวจสอบแบคทีเรียในน้ำและอาหารด้วยเทคนิค PCR จึงต้องมีปัจจัยควบคุมที่เฉพาะเจาะจง

Copyright by Mahidol University