

## เอกสารอ้างอิง

- กุ่มศักดิ์ บำรุงเสนา. 2549. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. ปีที่ 37 ฉบับที่ 18. กรุงเทพฯ.
- ธีรพร กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. โรคอาหารเป็นพิษและความเป็นพิษของอาหาร. (1) 140 – 152.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2522. จุลชีววิทยาเล่ม 2. พิมพ์ครั้งที่ 2 โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- บรรศักดิ์ ถีนานนท์. 2548. จุลชีววิทยาอาหารชั้นสูง. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ประภาวดี ดิษยาธิคม. 2553. ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. (ค้นเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2553) ที่มา: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info\\_id=210](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=210).
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2550. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 6. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ศิวาพร ศิวาเวช . 2542 การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพร นุชดำรง. 2547. โครงสร้างทางเคมีและบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อรุณ บำรุงตระกูลนนท์, สุเมธชา วัฒนสินธุ์, และ ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข นนทบุรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. (ค้นเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2553) ที่มา: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info\\_id=37](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=37)
- อังคณา คงกัน. 2550. กองสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย HACCP-TQM สิ่งจำเป็นสำหรับความปลอดภัยด้านอาหาร. กองสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย.
- Begum F., Adachi Y., and Khan M. S. R., 2008. Immunological Characterization of the 37.81 kDa common immunodominant surface protein of some *Salmonella* serovars. *J. Vet. Med.* 6 (2), 145–151
- Begum F . 2005. A 37.81 kDa protein reacting with sera obtained from *Salmonella typhimurium* infected chicks in *Salmonella* serovars. Ph. D. thesis submitted to the Animal Health Laboratory, School of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki, Japan.
- Blais, B.W., J. Leggate, J. Bosley, and A. Martinez-Perez, 2004. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 516– 522.

- Brooks, B., W.J. Devenish, C.L. Lutze-Wallace, D. Milnes, R.H. Robertson, and G. Berlie Surujballi. 2004. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.* 103:77-84.
- Chung, K.C., and J.M. Goepfert. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* 35: 326-328.
- Couacy-Hymann, E., F. Roger, C. Hurard, J.P. Guillou, G. Libeau, and A. Diallo. 2002. Rapid and sensitive detection of PPRV by a PCR assay. *J. Virol. Methods* 100, 17–25.
- Croci, L., E. Delibato, G. Volpe, and G. Palleschi. 2001. A rapid electrochemical ELISA for the detection of salmonella in meat sample. *Anal. Lett.* 34: 2597-2607.
- Crowther, J., and R. Ed. 1995. ELISA Theory and Practice. Humana Press Inc., USA, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa. 279-5.
- Deak, T. and Beuchat, L.R. 1995. Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages. *Food Microbiol.* 12: 165-172.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Fung, D.Y.C. 1994. Rapid methods and automation in food microbiology: a review. *Food Rev. International* 10: 3,357-375.
- George, M., and Sc.D. Garrity. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Department of microbiology and Molecular Genetics. Michigan State University. Print in the United States of America.
- Goldschmidt, M.C. 1993. Biosensors: blessing or bane? *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.* 2: 9-15.
- Hanes D. E., Koch W. H., Miliotis M. D. and Lampe K. A. 1995. DNA probe for detecting *Salmonella enteritidis* in food. *Molecular and Cellular Probes* (1995) 9, 9-18
- Huis in't Veld, J. and Hofstra, H. 1991. Biotechnology and the quality assurance of foods. *Food Biotechnol.* 5 (3): 313-322.
- ICMSF. 1986. Microorganisms in Foods 2. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Univ. of Toronto Press : Canada.
- Iryna B., Sorokulova, Eric V. Olsen, I-Hsuan Chen, Ben Fiebor, James M., Barbaree, Vitaly J. Vodyanoy, Bryan A. Chin, Valery A., and Petrenko, T. 2005. Landscape phage probes for *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiological Methods* 63, 55– 72
- Leskela, T., T.-T.A., J. Kusnetsov, P. Neubauer, and A. Breitstein. 2005. *J. Microbiol Methods.* 62: 167–179.
- Liu, H.S., Y. Li, X.X. Huang, Y. Kawamura, and T. Ezaki, 2003. *Microbiol. Immunol.* 47 (11), 859–869.

- MacKenzie, N.M. and A.C. Pinder. 1987. Flow cytometry and its applications in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science* 42:31-139.
- Mansfield P.L., and F. S.J. 2001. Food Microbiol. 18, 361–366.
- Mattila, T. 1987. Automated turbidometry - a method for enumeration of bacteria in food samples. *J. Food Prot.* 50: 640-642.
- McClure, P.J., Blackburn, C. de W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, D.E., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P. and Walker, S.J. 1994. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods; the Food MicroModel approach. *Int. J. Food Microbiol.* 23(3/4): 265-275.
- Ogden, K. 1993. Practical experiences of hygiene control using ATP bioluminescence. *J. Inst. Brew.* 99: 389-393.
- Olivier, A., V.G. Valerie, G. Valerie, and T. Philippe. 2007. Development and comparison of two immunoassay formats for rapid detection of botulinum neurotoxin type A. *Immunological Methods.* 325: 78–87.
- Pettipher, G.L. 1983. The Direct Epifluorescent Filter Technique for the Rapid Enumeration of Microorganisms. *Research Studies Press Ltd.* Letchworth, England, 193 pp.
- Pingoud, A., C. Urbanke, J. Hoggett, and A. Jeltsch. 2002. *Biochemical Methods.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag Gmb H.
- Rajashekara, G, D. Wanduragala, DA. Halvorson, KV. Nagaraja 1999. A rapid strip immunoblot assay for the specific detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens . *Int. J. Food Microbiol.* 53, 53–60.
- Sapsford, K.E., Rasooly, A., Taitt, C.R., Ligler, F.S., 2004. *Anal. Chem.* 76: 433–440.
- Simpson, W.J., J.R.M. Hammond, P.A. Thurston and A.L. Kyriakides. 1989. Brewery processcontrol and the role of "instant" microbiological techniques. *Proceedings of the European Brewery Convention, Zurich 1989*, IRL Press, 663pp.
- Rajashekara, G., D. Wanduragala, D.A. Halvorson, and K.V. Nagaraja. 1999. A rapid strip immunoblot assay for the specific detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens . *Int. J. Food Microbiol.* 53: 53–60.
- Vanne, L., Karwoski, M., S. Karppinen, and A.M. Sjoberg. 1996. HACCP-based food quality and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control.* 7(6): 263-276.
- Villari, P., M.E. Farullo, and C.I. Torre, 1998. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 106–110.
- Vanne, L., Karwoski , M., Karppinen , S. and Sjoberg , A.M. 1996. HACCP-based food quality and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control.* 7(6): 263-276.
- Vanne, L., Karwoski , M., Karppinen , S. and Sjoberg , A.M. 1996. HACCP-based food quality and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control.* 7(6): 263-276.
- Villari, P., M.E., Farullo, C., Torre, I., 1998. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 106–110.
- Wong, Y.Y., Ng, S.P., Si, S.H., Yao, S.Z., Fung, Y.-S., 2002. *Biosens. Bioelectron.* 17, 676–684.

Zhu, Fu, S. Rogelj, and T.L. Kieft\*. 2005. Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 99 (2005) 47– 57.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย

## 1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

### 1.1 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มจนแน่ใจแล้วว่าอุ่นละลายหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

### 1.2 Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มจนแน่ใจแล้วว่าสารละลายหมด นำแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3 BHI broth

### 1.4 RVS broth

ภาคผนวก ข  
การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 2. การเตรียมสารที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

### 2.1 สารละลาย Bradford dye

Coomassie brilliant blue G-250	20	มิลลิกรัม
95% ethanol	10	มิลลิลิตร
Phosphoric acid	20	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เวลาใช้ให้เจือจางในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:5 กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1)

## 3. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองโดยวิธี SDS-PAGE

### 3.1 สารละลาย Acrylamide/Bis (30%T,2.6%C)

Acrylamide	87.6	กรัม
N, N'- Methylene-bis-acrylamide	2.4	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่นจำนวน 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2 สารละลาย 0.5 M Tris-HCl , pH 6.8

Tris-base	6.057	กรัม
-----------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 60 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตรบรรจุในขวดแก้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

### 3.3 สารละลาย 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8

Tris-base	18.17	กรัม
-----------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 60 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

### 3.4 สารละลาย 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

SDS	10	กรัม
-----	----	------

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง

### 3.5 สารละลาย 10% Ammonium persulphate (APS)

Ammonium persulphate	0.1	กรัม
----------------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ไมโครลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

## 3.6 สารละลาย 5X Electrode buffer, pH 8.3

Tris-base	15	กรัม
Glycine	72	กรัม
SDS	5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้ดวงสารละลายมา 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 400 มิลลิลิตร

## 3.7 สารละลาย 0.1% Coomassie brilliant blue R-250

Coomassie brilliant blue R-250	0.1	กรัม
Methanol	40	มิลลิลิตร

ละลายแล้วนำมาเติม Glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 3.8 สารละลาย Destain solution

Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 3.9 สารละลาย 2X Solubilizing solution

Glycerol	12	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.8	มิลลิลิตร
10% SDS	4	มิลลิลิตร
Bromophenol Blue	0.001	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10% ของปริมาตรทั้งหมด

### 3.10 การเตรียม SDS-PAGE (ต่อ mini gel 1 แผ่น)

สารละลายและสารเคมี	12% Separating gel ( $\mu$ l)	4% Stacking gel ( $\mu$ l)
Acrylamide/Bis(30%T,2.6%C)	1,600	265
0.5 M Tris-HCl , pH 6.8	-	500
1.5 M Tris-HCl , pH 8.8	1,000	-
Double distilled water	1,340	1183
10% SDS	40	20
10% Ammonium persulphate	21	30
TEMED	2.4	2

#### 4. การเตรียมสารละลาย Standard marker protein

Standard marker protein	1	vial
Bromophenol Blue solution	80	ไมโครลิตร
Double distilled water	9	ไมโครลิตร
10% SDS	10	ไมโครลิตร
$\beta$ - mercaptoethanol	5	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำให้เดือดนาน 5 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : วิธีเตรียม Bromophenol Blue solution

Bromophenol Blue	0.0005	กรัม
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	10	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : Standard marker protein

- Phosphorylase	97	kDa
- Albumin	66	kDa
- Ovalbumin	45	kDa
- Carbonic anhydrase	30	kDa
- Trypsin inhibitor	20	kDa
- $\alpha$ - Lactalbumin	14	kDa

## 5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองโดยวิธี Western immunoblotting และ

### Dot blotting

#### 5.1 สารละลาย Substrate buffer, pH 9.5

Tris-base	3.0285	กรัม
NaCl	1.4612	กรัม
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5413	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 5.2 สารละลาย TBS buffer, pH 8.0

Tris-base	2.42	กรัม
NaCl	17.53	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย เป็น 250 มิลลิลิตร

#### 5.3 สารละลาย TBST buffer

TBS buffer, pH 8.0	1,000	มิลลิลิตร
Tween-20	500	ไมโครลิตร

#### 5.4 สารละลาย blocking solution

Skim milk	2.5	กรัม
ละลายใน TBST buffer	50	มิลลิลิตร

#### 5.5 สารละลาย Towbin buffer (transfer buffer)

Glycine	0.586	กรัม
Tris-base	1.162	กรัม
Methanol	40	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

#### 5.6 สารละลาย substrate solution สำหรับ western immunoblotting

สารละลาย NBT	30	ไมโครลิตร
สารละลาย BCIP	30	ไมโครลิตร
Substrate buffer, pH 9.5	5	มิลลิลิตร

สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่เสมอและไม่ควรให้ถูกแสง

## 5.7 0.1% Amido black

Glycine	0.1	กรัม
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
Methanol	45	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

## 5.8 สารละลาย Carbonate buffer, pH 9.5

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.4	กรัม
$\text{NaHCO}_3$	0.73	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

## ประวัติผู้เขียน



นางสาววราภรณ์ พันธุ์พรหม เกิดเมื่อวันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2521 ภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัด สกลนคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนหนองหลวงศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม เมื่อปี พ.ศ. 2544 ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานรัฐวิสาหกิจขนาดย่อม

