วรินทร จันทร์ทองอิน 2554: การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, Ph.D. 90 หน้า

การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้ออย่างง่ายโดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟฟี (Chromatography) ร่วมกับ DNA hybridization สำหรับตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และง่ายต่อการใช้งานกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการส่วนภูมิภาค อีกทั้งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ

Salmonella enterica serovar Typhimurium เป็นแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษา เริ่มจากทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *HilA* gene และ *InvA* gene ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนก่อโรค (virulence gene) สำหรับจีนัส *Salmonella* spp. ด้วยวิธี PCR โดยเลือกใช้ primer ที่มีความจำเพาะ (specific primer) 3 คู่ คือ hilA, invA1 และ invA2 พร้อมทั้งติดฉลาก PCR product ด้วยสารปลอดรังสีเพื่อใช้เป็นตัวติดตาม (probe) ในการทำปฏิกิริยา hybridization สำหรับการตรวจ DNA ด้วยเทคนิค paper chromatography dot blot hybridization (PACHA) จากนั้นสกัด DNA จากเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี chelex-100 แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ ซึ่งทราบความเข้มข้นหยดและตรึงลงบน nylon membrane strip ทำการตรวจสอบ DNA ด้วย probe ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีความยาวแตกต่างกัน และมีความจำเพาะ (specific) ต่อบริเวณ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในบริเวณที่แตกต่างกัน ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PACHA ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ เวลา การล้าง และการเคลือบผิวเมมเบรนที่ให้ผลการตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. มีความถูกต้อง แม่นยำ และไวต่อเชื้อมากที่สุด

ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิขณะทำ hybridize ที่ 75°C เทคนิค PACHA ให้ผลบวกต่อ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 13 serovars แต่ไม่พบผลบวกในแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม เทคนิค PACHA สามารถตรวจพบ DNA ที่มีความเข้มข้นอย่างน้อยที่สุด 100 นาโนกรัม/หยด ด้วยปริมาณความเข้มข้น probe สำหรับตรวจสอบ 1 นาโนกรัม ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค PACHA ใช้เวลาสำหรับตรวจสอบทั้งสิ้น 90 นาที เป็นวิธีที่เรียบง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะ ความไว และประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับอุปกรณ์พื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อเชื้อ *S.* Typhimurium จำนวน 9.2×10^5 CFU/ml ที่เติมลงในเนื้อไก่ที่ปราศจากเชื้อ *Salmonella* spp.

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์