

การพัฒนาวิธีการทดสอบยีน *invA* ของเชื้อ
Salmonella spp. โดยเทคนิค LAMP

นางสาวณัฏฐพิชา เสงี่ยมพรหม
นางสาวพรพรรณ นิติภานนท์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2552

Development of rapid test for detection *invA* gene
of *Salmonella* spp. using LAMP technique.

MISS NATTAPICHA HENGPRAPROM
MISS PORNPAN NITIPHANONT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ
เรื่อง การพัฒนาวิธีการทดสอบยีน *invA* ของเชื้อ *Salmonella* spp.
โดยเทคนิค LAMP

.....
(นางสาวณัฐจิรา เสงพะพรหม)

.....
(นางสาวพรพรรณ นิติกานนท์)

.....
(รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการทดสอบยีน *invA* ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค LAMP

ณัฐพิชา เสงพะพรหม, พรพรรณ นิติกานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษา: จันทรเพ็ญ วิวัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ: *Salmonella* spp., Loop-mediated isothermal amplification, LAMP

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญ เป็นสาเหตุของโรคเช่น โรคลำไส้อักเสบ ไทฟอยด์ หรือการติดเชื้อในกระแสเลือด มักพบปนเปื้อนในอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ไข่ นม ไข่ และผัก วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว โดยการตรวจสอบยีน *invA* ขนาด 210 bp ของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP เป็นเทคนิคใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะสูง และสามารถทำได้อย่างรวดเร็วภายใต้อุณหภูมิคงที่ ในการทดลองนี้ได้ทำการออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน *invA* ของ *Salmonella enterica* จำนวน 4 เส้น โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) แล้วนำ primers ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะต่อยีน *invA* จาก genomic DNA ของ *Salmonella* spp. โดยเทคนิค LAMP ที่อุณหภูมิ 65°C. ภายในเวลา 50 นาที พบว่าให้ผลบวกกับเชื้อ *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, และ *S. Mbandaka* ส่วนการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียกลุ่ม Non-*Salmonella* ได้แก่ *Bacillus sphaericus*, *Escherichia coli*, และ *Staphylococcus aureus* พบว่าให้ผลลบ

การทดสอบความไว (sensitivity) ของการตรวจสอบเชื้อ *Salmonella Typhi* พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยเทคนิค LAMP คือ 5.6 pgDNA/μl ซึ่งมีความไวมากกว่าการตรวจสอบโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ต้องมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 320 pgDNA/μl นอกจากนี้เทคนิค LAMP ยังใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพียง 50 นาที ในขณะที่เทคนิค PCR ใช้เวลาทั้งหมด 90 นาที อีกทั้งเทคนิค LAMP ยังไม่จำเป็นต้องใช้ agarose gel electrophoresis เพื่อการพิสูจน์ดีเอ็นเอ เพราะเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอโดยสังเกตความขุ่น หรือการเติมสี SYBR green I ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบยีน *invA* ของเชื้อ *Salmonella* spp.

Abstract

Development of rapid test for detection *invA* gene of *Salmonella* spp. using LAMP technique.

Nattapicha Hengpraprom, Pornpan Nitiphanont

Project advisor : Chanpen Wiwat

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword : *Salmonella* spp., Loop-mediated isothermal amplification, LAMP

Salmonella spp. is a major food-borne pathogen found in meat, chicken, milk, egg and vegetable. *Salmonella* infections could be gastroenteritis, typhoid fever or bacteremia. The aim of this study is to develop a rapid test for detection the *Salmonella*-specific 210bp *invA* gene by using Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique.

LAMP assay is a novel technique that amplifies DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions. In this study, two pairs of primers were designed based on *invA* gene of *Salmonella enterica* using PrimerExplorer V4 software program (<http://primerexplorer.jp/e/>). The primers were used to amplify the *invA* gene from genomic DNA of *Salmonella* spp. at 65 °C for 50 min by LAMP technique. The positive results were found when using genomic DNAs of *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, and *S. Mbandaka* as templates. But also the negative results were found when using genomic DNAs of *Bacillus sphaericus*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* as templates.

Comparison in sensitivity and detection limits for detection of *S. Typhi* showed that the detection limit of the LAMP assay was 5.6 pgDNA/μl, while the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay was 320 pgDNA/μl. In addition, the final results were obtained within 50 minutes for the LAMP assay, whereas the PCR needed approximately 90 minutes. Furthermore, there was no need to run agarose gel electrophoresis to demonstrate the amplified products. LAMP product could be visualized by turbidity or adding SYBR green I. Thus, LAMP was more sensitive, rapid and simple to perform than PCR to detect the specific *invA* gene of *Salmonella* spp.