การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* อย่างรวดเร็ว โดยเทคนิค LAMP

นางสาววศินี อุดมกิจมงคล
นางสาวศรีทอง สีขาว

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2554

Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by LAMP technique.

MISS WASINEE UDOMKITMONGKHON
MISS SRITHONG SIKHAO

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY
2011

โครงการพิเศษ

เรื่อง การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* อย่างรวดเร็ว โดยเทคนิค LAMP

.....

(นางสาววศินี อุดมกิจมงคล)

.....

(นางสาวศรีทอง สีขาว)

.....

(รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2554 **โครงการที่** 3

การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* อย่างรวดเร็วโดยเทคนิค LAMP

วศินี อุดมกิจมงคล, ศรีทอง สีขาว

อาจารย์ที่ปรึกษา: จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ: *Staphylococcus* aureus., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), ยีน triphosphate isomerase, polymerase chain reaction

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ พบปนเปื้อนในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง และอาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดได้ การศึกษานี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) โดยการตรวจสอบยีน triosephosphate isomerase (*Tpi59*) ขนาด 402 bp ของเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะของเชื้อเป็นยีนเป้าหมาย

LAMP หรือ Loop-mediated isothermal amplification เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง โดยใช้เอนไซม์ *BstI* polymerase ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่คงที่ อ่านผลได้อย่างรวดเร็ว การทดลองได้ออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน *Tpi59* ของเชื้อ *S. aureus* จำนวน 4 เส้น โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V4 แล้วนำ primers ไปทดสอบความจำเพาะต่อ genomic DNA ของ *S. aureus* โดยเทคนิค LAMP ที่สภาวะต่างๆ ซึ่งสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 62°C ระยะเวลา 60 นาที ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 100 mM ซึ่งให้ผลบวกกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* 1334, *S. aureus* 1609, *S. aureus* DMST 1386 และ *S. aureus* ATCC 25923 และทดสอบยืนยันผลโดย การตัด LAMP product ด้วยเอนไซม์ *Tru9* I ส่วนการตรวจสอบกับ genomic DNA ของแบคทีเรียอื่นๆ *S. typhimurium* ATCC 11331, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 14579 พบว่าให้ผลลบ

การทดสอบความไวของการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* พบว่าความเข้มข้นของ DNA น้อยที่สุดที่ตรวจพบได้โดยเทคนิค LAMP คือ 3.2 pg DNA/μL มีความไวมากกว่าเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่ต้องมีความเข้มข้นของ DNA น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 320 pg DNA/μL นอกจากนี้เทคนิค LAMP ไม่จำเป็นต้องใช้ agarose gel electrophoresis พิสูจน์ DNA เพราะเทคนิค LAMP อ่านผลได้ทันทีโดยสังเกตจากตะกอน magnesium pyrophosphate ที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการ หรือการเปลี่ยนสีเมื่อเติมสี SYBR green I ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบ *S. aureus*

Academic year 2011 Project 3

Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by LAMP technique.

Wasinee Udonkitmongkhon, Srithong Sikhao

Project adivisor : Chanpen Wiwat

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: *Staphylococcus* spp., Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, Triosephosphate isomerase gene, polymerase chain reaction

Staphylococcus aureus is a gram positive coccus, non-spore-forming bacterium which could be found in food, drugs and cosmetics. This bacterium can cause food poisoning diseases, skin infections and sepsis or bacteremia. Project's objective is to develope rapid detection for *S. aureus* by LAMP technique by using 402 bp of triosephosphate isomerase gene (*Tpi59*) of *S. aureus* as specific gene target.

LAMP or Loop-mediated isothermal amplification is a new technique to rapidly detect amplified DNA *in vitro*, using *BstI* polymerase with single temperature incubation. PrimerExplorer V4 program was used to design 4 primers to *Tpi59* gene of *S. aureus*. The designed primers were used to study the optimal conditions of amplification reactions. The optimal conditions were 62°C for 60 minutes and 100 mM magnesium sulfate. The result demonstrated, the primers were specific to *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* 1334, *S. aureus* 1609, *S. aureus* DMST 1386 and *S. aureus* ATCC 25923. The amplified LAMP products were confirmed by *Tru9* I digestion. Non-*S. aureus* group; *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 11331, *B. cereus* ATCC 14579 gave negative results.

The sensitivity of LAMP technique was studied, LAMP could be detected the minimal DNA concentration at 3.2 pg DNA/μL which is more sensitive than Polymerase Chain Reaction (PCR) technique which could be detected DNA at 320 pg DNA/μL. In addition to the sensitivity LAMP also need only 60 minutes to increase the copy number of target gene while PCR need 90 minutes. LAMP could be detected by tubidity caused by increasing quantity of magnesium pyrophosphate in solution or with addition of SYBR green I, a color change can be seen. So agarose gel electrophoresis is no need for visualized amplification products. LAMP is an effectively, rapidly, and specific detected *S. aureus*.