ชนิดา กุประดิษฐ์ : การพัฒนาโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์เพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคในเนื้อไก่สด (DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDE ARRAY FOR DETECTING FOODBORNE PATHOGENS IN FRESH CHICKEN MEAT) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 201 หน้า.

เทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ เป็นเทคนิคที่ใช้การจับคู่เบสอย่างจำเพาะของสายดีเอ็นเอเป้าหมายจากเชื้อ กับดีเอ็นเอติดตามสายสั้น (DNA probes) ที่อยู่บนแผ่นอเรย์ สามารถใช้ตรวจเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารจำนวนมากด้วยเวลาอันรวดเร็วในขั้นตอนเดียว การศึกษานี้ได้คัดเลือก ดีเอ็นเอติดตามสายสั้นที่มีความจำเพาะต่อสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้มีความเหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียบ่งชี้คุณภาพด้านความปลอดภัยของเนื้อไก่สดเพื่อการบริโภค โดยติดฉลากสายดีเอ็นเอเป้าหมายจากเชื้อ ด้วยเทคนิคการติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) หลังจากทำการเพิ่มปริมาณของสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งสามารถตรวจสอบการเกิดการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของสายดีเอ็นเอเป้าหมายจากเชื้อกับดีเอ็นเอติดตามสายสั้นที่อยู่บนแผ่นอเรย์ได้ด้วยตาเปล่า ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ใช้ 16S rRNA gene ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* เป็นจีนเป้าหมายต้นแบบ ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอติดตามสายสั้นบนแผ่นอเรย์ คือ 200 พิโคโมล การใช้ 16S rRNA gene เป็นจีนเป้าหมายเพียงจีนเดียวนั้น สามารถตรวจเชื้อต่างสปีชีส์กันได้ถึง 5 สปีชีส์ ที่ปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมของแต่ละเชื้อต่ำสุดที่ 1 นาโนกรัม อย่างไรก็ตาม การตรวจหาแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำได้เพียงระดับสกุลเท่านั้น รวมทั้งยังพบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน กับแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อเป้าหมายที่แยกได้จากอาหารจำเพาะที่ใช้เพิ่มจำนวนเชื้อเป้าหมาย อีกด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงพัฒนา เทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ ร่วมกับเทคนิคที่เพิ่มปริมาณจีนเป้าหมายอื่นที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเป้าหมายร่วมด้วย โดยการใช้เทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และพีซีอาร์ดั้งเดิม ในการประเมินผลเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมานี้ ใช้เชื้อเป้าหมาย 4 เชื้อ คือ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. พบว่า สามารถตรวจพบแบคทีเรียเป้าหมายด้วยเทคนิค มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้จีน *usp*A, *prf*A, *fim*Y และ *ipa*H ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ตามลำดับ และหลังจากใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ หรือ พีซีอาร์ดั้งเดิมร่วมกับ เทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ ในการตรวจเชื้อเป้าหมาย พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อเป้าหมายได้ในระดับสกุลและระดับสปีชีส์โดยมีความผิดพลาดในการแปลผลที่ต่ำมาก และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ หรือ พีซีอาร์ดั้งเดิมร่วมกับเทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ พบว่า ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ

จีนเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ดั้งเดิมนั้นดีกว่า เป็นผลให้สามารถตรวจเชื้อเป้าหมายทั้ง 4 เชื้อได้พร้อมกัน ทั้งในตัวอย่างที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ และในตัวอย่างเนื้อไก่สด ในงานวิจัยนี้พบว่าการใช้ เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และ พีซีอาร์ดั้งเดิม ร่วมกับเทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ สามารถตรวจเชื้อทั้ง 4 เชื้อได้ในปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมของแต่ละเชื้อต่ำสุดที่ 1 นาโนกรัม และที่ 0.1 นาโนกรัม ตามลำดับ นอกจากนั้น ยังได้นำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อในเนื้อไก่สด 10 ตัวอย่าง ผลการวิจัย พบว่า หลังจากเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อเป้าหมายโดยใช้อาหารที่จำเพาะและการเพิ่มปริมาณจีนเป้าหมายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ดั้งเดิม ร่วมกับ เทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์แล้ว สามารถตรวจเชื้อได้ทั้ง 4 เชื้อพร้อมกัน ในตัวอย่างเนื้อไก่สด 25 กรัม ในขณะที่การใช้ เทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ ร่วมกับเทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ สามารถตรวจได้เพียง 3 เชื้อ พร้อมกัน ได้แก่ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. จากตัวอย่างเดียวกัน ทั้งนี้ การใช้เทคนิค พีซีอาร์ดั้งเดิม ร่วมกับเทคนิคโอลิโกนิวคลีโอไทด์อเรย์ สามารถใช้ตรวจเชื้อ *Sh. boydii* ที่ปนเปื้อนในเนื้อไก่สด 25 กรัม ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดอย่างน้อย 3 เซลล์ และ *L. monocytogenes* ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำสุดอย่างน้อย 10 เซลล์ขึ้นไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHANIDA KUPRADIT : DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDE ARRAY FOR DETECTING FOODBORNE PATHOGENS IN FRESH CHICKEN MEAT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 201 PP.

OLIGONUCLEOTIDE ARRAY/FOODBORNE PATHOGENS/DNA PROBES

Oligonucleotide array hybridization based methods can be used for screening of multiple foodborne pathogens. Several target pathogens can be monitored in a single step of DNA hybridization using suitable specific probes on an array matrix. In this investigation, screenings of suitable probes for specific detection of foodborne pathogens prevalence in fresh chicken meat were performed using post-PCR labeled target regions. The hybridization signals of non-radioactive labeling digoxigenin (DIG) incorporated into the PCR target regions were observed by naked eyes. The target regions of 16S rRNA gene specific for *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Clostridium perfringens*, were used as models. The optimum concentration of the oligonucleotide probes was found to be 200 pmol. The detection using only 16S rRNA gene as target gene was carried out to detect multiple target bacteria at as low as 1 ng in the mixed genomic DNA from the 5 bacterial species. Although the results showed that a large number of target bacteria can be detected with easy result interpretation by oligonucleotide array hybridization but some of them can be differentiated in only the genus level and some cross-reactivities were found from the non-target bacteria isolated from the enrichment culture. Therefore, oligonucleotide array combined with multiplex PCR (m-PCR) or conventional PCR using specific genes as targets were developed to specifically

detect dominant foodborne pathogens in chicken meat. Target bacteria including *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp. were used as models for the evaluation of these combined methods. M-PCR targeting the *usp*A, *prf*A, *fim*Y, and *ipa*H was successfully used to detect *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp., respectively. The combination of m-PCR or conventional PCR with oligonucleotide array revealed discriminatory power among genera and species of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp. with low or no incident of false negative results. The efficiency of the conventional PCR amplification is more sensitive than that of m-PCR for amplification of target genes. The m-PCR- and conventional PCR-oligonucleotide array could detect all 4 target bacteria at as low as 1 ng and 0.1 ng of each in the mixed genomic DNA extracted from pure cultures, respectively. The application of oligonucleotide array was tested with 10 fresh chicken meat samples. Combination of target bacterial enrichment and DNA amplification demonstrated that the conventional PCR-oligonucleotide array could be used for simultaneously detection of all 4 target bacteria in fresh chicken meat samples while m-PCR-oligonucleotide array could simultaneously detect only *E. coli*, *Salmonella* sp., and *L. monocytogenes* in the same samples. Conventional PCR-oligonucleotide array was able to detect *Sh. boydii* and *L. monocytogenes* at initial concentration of at least 3 and 10 cells in 25 g sample, respectively.

School of Biotechnology

Academic Year 2012

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____