# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

**วัสดุอุปกรณ์**

3.1.1 บีกเกอร์(Beaker) ขนาด125, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.2 หลอดทดลอง ( Test tube)

3.1.3 จานเพาะเชื้อ ( Petri dish)

3.1.4 โหลบ่มเชื้อแบบไม่ใช้ออกซิเจน ( Anaerobic jar)

3.1.5 Micoaerobic gas generating kit

3.1.6 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ ( Micropipettes) ขนาด 2 - 20, 20 - 200, 100 - 1,000 และ 1,000 – 5,000 ไมโครลิตร

3.1.7 ไมโครปิเปต ทิป ( Micropipettes tip)

3.1.8 ที่ตั้งหลอดทดลอง ( Rack for tube)

3.1.9 ขวดรูปชมพู่ ( Erlenmeyerflask) ขนาด125, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ ( Alcohol burner)

3.1.11 ลูปเขี่ยเชื้อ ( Loop)

3.1.12 แท่งแก้วคนสาร ( Stirring Rod)

3.1.13 หลอดเซ็นตริฟิวจ์ ( Centrifuge tube)ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.14 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ ( Micro-centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.15 กระดาษฟอยล์ ( Aluminium foil)

3.1.16 ขวดดูแรน ( Duran) ขนาด125, 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.17 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)ขนาด5, 10, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.18 ช้อนตักสารสแตนเลส ( Spatula)

3.1.19 คิวเวท ( Cuvette)

3.1.20 พาราฟิล์ม ( Parafilm)

3.1.21 ไม้พันสำลี ( Cotton swab)

3.1.22 ปากคีบ ( Forceps)

3.1.23 กระบอกตวง ( Cylinder)

3.1.24 กระดาษกรอง ( Filter paper)ยี่ห้อ Whatman®ขนาด 0.45 µm

**เครื่องมือ**

3.1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ( Autoclave) รุ่นHVE 50 ยี่ห้อ Hirayama

3.1.2 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)ECLIPSE E 200 ยี่ห้อ Niko

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)รุ่น S20-K ยี่ห้อ Toledo

3.1.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Precion balance)รุ่น MS 1602S ยี่ห้อ Metter Toledo

3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)รุ่น XT 220A ยี่ห้อ Précis

3.1.6 เครื่องเขย่า (Shaker)รุ่น SKO-2D ยี่ห้อ Wiscshake

3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น Legend Mach 1.6 R ยี่ห้อ Thermo Sciencetific

3.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Optizen POP ยี่ห้อ Mecasys

3.1.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Boss Tech

3.1.10 เครื่องกวนสารเคมี (Hot plate & stirrer)

3.1.11 ตู้เย็นสำหรับแช่อาหารเลี้ยงเชื้อ รุ่น RT25FGRA ยี่ห้อ Samsung

3.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-22

3.1.13 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex Genie 2

3.1.14 เครื่องกวนสารโดยใช้แม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Variomag

3.1.15 เครื่องรันเจล( Gel electrophoresis)

3.1.16 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ( Thermal cycler)

3.1.17 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ( pH meter)

**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

3.1.1 Campylobacter Enrichment Broth Base (Preston Enrichment Broth Base)

3.1.2 BSA (BrucellaSheep Blood Agar)

3.1.3 Nitrate broth(NB)

3.1.4 Urease slant

**สารเคมี**

3.1.1 10x PCR buffer

3.1.2 dNTP(Deoxynucleotide)

3.1.3 Magnesium chloride

3.1.4 Taq polymerase

3.1.5 Primer F3(Forward outer primer)

3.1.6 Primer B3 (Backward outer primer)

3.1.8 Primer FIB(Forward internal primer)

3.1.9 Primer BIP(Backward internal primer)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.1.10 Primer F (Forward internal primer)

3.1.11 Primer B (Backward internal primer)

3.1.12 10x ThermoPol buffer

3.1.13 Betaine

3.1.14 *Bst 2*(*Bacillus stearothermophilus*DNA)

3.1.15 Magnesium sulphate

3.1.16 Hydroxynaphthol blue (HNB)

3.1.17 TBE buffer

3.1.18 Template DNA

3.1.19 Hydrogen peroxide

3.1.20 Nitrate A

3.1.21 Nitrate B

3.1.22 Ninhydrin

3.1.23 10% Hippurate acid

3.1.24 Acetone

3.1.25 Butanol

3.1.26 Zinc

3.1.27 SDS 0.001%

3.1.28 3% KOH

3.1.29 Catalase

3.1.30 0.5M EDTA

3.1.31 Agarose

3.1.32 RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution

## 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อไก่สด เช่น ปีก อก ลำไส้ น่อง และเครื่องในไก่ จากตลาด และห้างสรรพสินค้าในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 30 ตัวอย่าง

### 3.2.2 การคัดแยกเชื้อ *Campylobacter* spp.

นำตัวอย่างเนื้อไก่สดมาคัดแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างไก่ที่เก็บมาหั่นเป็นชิ้นเล็กนำไปชั่ง 25 กรัมแล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Preston broth 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำมาแบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 40 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด โดยนำหลอดที่ 1 ไปสกัดดีเอ็นเอ และหลอดที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะ

Microaerophilicโดยใส่ Microaerobic gas generating kitลงในโถบ่ม (anaerobic jar) จากนั้นนำสารละลายของเชื้อมาหยดบนกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมโครเมตร บนอาหาร BSA4-8 หยด ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที นำกระดาษกรองออกแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะ microaerophilicแล้วให้นำมาตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี

**3.2.3 การทดสอบทางชีวเคมี**

นำเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร BSA มาทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่

การทดสอบ Catalase test, Nitrate test,Hippurate test, Urease test และย้อมแกรมเพื่อคัดแยกสปีชีส์ของเชื้อ

1) Catalase test

1.1) หยด 15% $H_2O_2$ลงบนแผ่นสไลด์

1.2) เขี่ยโคโลนีของเชื้อลงบนหยดสายละลาย 15 % $H_2O_2$

1.3) สังเกตการณ์เกิดฟองแก๊ส (เกิดฟองแก๊สให้ผลบวกและไม่เกิดฟองแก๊สให้ผลลบ)

2) Nitrate test

2.1) เขี่ยโคโลนีของเชื้อลงใน Nitrate broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง

2.2) เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้วหยดสารละลาย Nitrate reduction reagent A และ B สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย (เปลี่ยนเป็นสีแดงหรือชมพูให้ผลบวกถ้าไม่เปลี่ยนสีเติม Zinc เปลี่ยนเป็นสีแดงให้ผลลบและไม่เปลี่ยนสีให้ผลบวก)

3) Hippurate test

3.1) นำสารละลาย 10 % Hippurate acid 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13× 100มิลลิลิตร

3.2) เขี่ยโคโลนีของเชื้อ ลงในสารละลาย 10% Hippurate acid

3.3) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

3.4 ) เมื่อบ่มครบ 2 ชั่วโมง หยดสารละลาย 3.5% Ninhydrin in acetone : butanol(ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินภายใน 5-10 นาที ให้ผลบวกถ้าไม่เปลี่ยนสีให้อ่านผลเป็นผลลบ)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

4) Urease test

4.1) เขี่ยโคโลนีของเชื้อมา Streak บนผิวหน้าอาหาร Urease

4.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง

4.3) เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร (เปลี่ยนเป็นสีชมพูให้ผลบวก ไม่เปลี่ยนสีให้ผลลบ)

5) Gram stain

5.1) หยด Sterile distilled water 1 หยดลงบน slide

5.2) นำ โคโลนีมาเสมียร์ให้ทั่วบนแผ่นสไลด์รอให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ2-3 ครั้ง

5.3) นำไปย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

6) คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

**ตารางที่ 3.1** คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

| **คุณสมบัติทาง Phenotype** | **Growth at 37°C** | **Nitrate Reduction test** | **Catalase test** | **Ureas test** | **Hippurate test** |
|---|---|---|---|---|---|
| *C. jejuni* | + | + | + | - | + |
| *C. coli* | + | + | + | - | - |
| *C. lari* | + | + | + | +/- | - |
| *C. fetus* | + | + | + | - | - |
| *C. upsaliensis* | + | + | - | - | - |
| *C. jejuni sup sp. doylei* | + | - | + | - | + |

ที่มา : Saiyudthong. S. et al. (2015)

**3.2.4 เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี โดยการต้ม** (Andrew E. Cook and Paul R. Meyers, 2003)

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร BSA หรือ NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อลงใน SDS 0.001% 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม SDS 0.001% 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**3.2.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)** (Thongphueak, D. et al. (2019)

ไพรเมอร์16SrRNA

| ชื่อ | ไพรเมอร์ |
|---|---|
| F3 | 5’ TAA CGG TTC GGC CGA GCA CT 3’ 20 base |
| B3 | 5’ GGC TTC ATG CTC TCG AGT TG 3’ 20 base |

**3.2.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตัวอย่างของยีน 16 S rRNAด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | | |
|---|---|---|
| *Taq* polymerase | 0.5 | M |
| 10X PCR buffer | 4.4 | mM |
| $MgCl_2$ | 2 | mM |
| dNTP | 2 | µM |
| Primer F3 | 2 | µM |
| Primer B3 | 4 | U |
| Deionized water | 17.9 | µl |

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอลงไปในหลอดพีซีอาร์ที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยให้เกิดปฏิกิริยา จำนวน 34 รอบ และกำหนดสภาวะดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Pre-denaturing | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 5 นาที |
| Denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| Final Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที |

4) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agaroseที่ผสม redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องUVtransilluminator

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

**3.2.7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**(Thongphueak, D. et al.(2019)

ไพรเมอร์16SrRNA

| ชื่อ | primer |
|---|---|
| F3 | 5’ TAA CGG TTC GGC CGA GCA CT 3’ 20 base |
| F | 5’ TCG TCC ACA CCT TCC TCC TC 3’ 20 base |
| B | 5’ GCG AGG TGG AGC AAA TCT AT 3’ 20 base |
| B3 | 5’ GGC TTC ATG CTC TCG AGT TG 3’ 20 base |
| FIP | 5’ TGG GCA TAA GGG CCA TGA TGA CTT TTT CTA AAT AGA CTG CCT TCG 3’ 45 base |
| BIP | 5’ ATA CAA TGA GAC GCA ATA CCT TTT TGA ACA ATC CGA ACT GGG ACA 3’ 45 base |

**3.2.8 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP)ร่วมกับการวัดค่าสีด้วย Hydroxynaphthol blue (HNB)**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP(ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | |
|---|---|
| dNTP | 1.6 mM |
| *Bst2* | 4 U |
| $MgSO_4$ | 0.4 mM |
| 10X Thermopol | 0.5 M |
| Betaine | 0.5 M |
| Primer F3 | 2 µM |
| Primer B3 | 2 µM |
| Primer B | 2 µM |
| Primer F | 2 µM |
| Primer FIP | 2 µM |
| Primer BIF | 2 µM |
| HNB | 40 µM |
| Deionized water | 13 µl |

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอลงไปในหลอดที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง Drythermal block เป็นเวลา 60 นาที

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue (HNB) ภายในหลอดทดลองที่ใส่ไปตั้งแต่ต้นก่อนการเกิดปฏิกิริยา เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

5) ตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agaroseที่ผสม redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UVtransilluminator เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

**3.2.9 การทดสอบความไว (Sensitivity)**

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMPและ PCRโดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *Campylobacter* ที่สกัดดีเอ็นเอได้ไปวัดความเข้มข้นจากนั้นเจือจางแบบลำดับส่วน ( 10 fold serial dilution) ตั้งแต่ $10^{0}$ – $10^{-9}$ จากปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากับ 36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ( ng/µl) แล้วนำดีเอ็นเอนั้นมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMPและเทคนิค PCR จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue(HNB)ภายในหลอดทดลองและนำไปตรวจสอบด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของปฏิกิริยา LAMPและ PCRจากความเข้มข้นต่างๆของดีเอ็นเอ (Thongphueak, D. et al. (2019)

**การทดสอบความไวด้วยเทคนิค PCR**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | |
|---|---|
| 10X PCR buffer | 0.5 M |
| $MgCl_2$ | 4.4 mM |
| dNTP | 2 mM |
| Primer F3 | 2 µM |
| Primer B3 | 2 µM |
| *Taq* polymerase | 4 U |
| Deionized water | 17.9 µl |

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการเจือจางแบบลำดับส่วนลงไปในหลอดพีซีอาร์ที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยให้เกิดปฏิกิริยา จำนวน 34 รอบ และกำหนดสภาวะดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Pre-denaturing | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 5 นาที |
| Denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| Final Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที |

4) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ที่ผสม redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องUV transilluminator

**การทดสอบความไวด้วยเทคนิค LAMP**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP(ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | |
|---|---|
| dNTP | 1.6 mM |
| *Bst2*, DNA polymerase | 4 U |
| $MgSO_4$ | 0.4 mM |
| 10X Thermopol | 0.5 M |
| Betaine | 0.5 M |
| Primer F3 | 2 µM |
| Primer B3 | 2 µM |
| Primer B | 2 µM |
| Primer F | 2 µM |
| Primer FIP | 2 µM |
| Primer BIF | 2 µM |
| HNB | 40 µM |
| Deionized water | 13 µl |

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการเจือจางแบบลำดับส่วน ลงไปในหลอดที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรตามลดับ ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง Drythermal block เป็นเวลา 60 นาที

4) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue (HNB) ภายในหลอดทดลองที่ใส่ไปตั้งแต่ต้นก่อนการเกิดปฏิกิริยา เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

5) ตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agaroseที่ผสม redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องUVtransilluminator

**2.3.10 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)**

เชื้อที่ใช้ทดสอบความจำเพาะ ได้แก่ *Escherichia coli, Salmonella typhi,Listeriamonocytogenes,Psedomonasaeruginosa, Bacillus megaterium, Staphylococcus aureus, Enterobacteraerogenes, Klebsiellaoxytoca, Serratiamarcescens*และ *Citrobacterdiversus*ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร BSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมงแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเทคนิค PCR และ LAMP (Thongphueak, D. et al. (2019)

**การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค PCR**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | |
|---|---|
| 10X PCR brffer | 0.5 M |
| $MgCl_2$ | 4.4 mM |
| dNTP | 2 mM |
| Primer F3 | 2 µM |
| Primer B3 | 2 µM |
| Taq polymerase | 4 U |
| Deionize water | 17.9 µl |

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอลงไปในหลอพีซีอาร์ที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง PCR โดยให้เกิดปฏิกิริยา จำนวน 34 รอบ และกำหนดสภาวะดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Predenaturing | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 5 นาที |
| Denaturation | ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที |
| Final Extension | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที |

4) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agaroseที่ผสม สี redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่องUV transilluminator

**การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค LAMP**

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP(ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

| | |
|---|---|
| dNTP | 1.6 mM |
| *Bst2*, DNA polymerase | 4 U |
| $MgSO_4$ | 0.4 mM |
| 10X Thermopol | 0.5 M |
| Betaine | 0.5 M |
| Primer F3 | 2 µM |
| Primer B3 | 2 µM |
| Primer B | 2 µM |
| Primer F | 2 µM |
| Primer FIP | 2 µM |
| Primer BIF | 2 µM |
| HNB | 40 µM |
| Deionize water | 13 µl |

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้ จากการสกัดดีเอ็นเอส่วน ลงไปในหลอดที่ผสมสารในข้อ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง Drythermal block เป็นเวลา 60 นาที

4) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue (HNB) ภายในหลอดทดลองที่ใส่ไปตั้งแต่ต้นก่อนการเกิดปฏิกิริยา เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP

5) ตรวจสอบผลผลิต LAMPด้วยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ 2 % agaroseที่ผสมสี redsaftแล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UVtransilluminatorเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวัดปฏิกิริยาLAMP

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี