

รหัสโครงการ: DIG518004

ชื่อโครงการ: การตรวจกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสโรคหิวาต์สุกรโดยReverse Transcription Loop – Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. จันทรดี ระเบียบเลิศ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address: Jundee04@gmail.com, Jundee@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 มีนาคม 2551 ถึง 2 มีนาคม 2553 (2 ปี)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) จากบริเวณ 5'untranslated gene ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว กล่าวคือ สามารถเพิ่มปริมาณ gene ได้ในเวลา 60 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพียงอุณหภูมิเดียว โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจง จำนวน 6 เส้น ปริมาณ gene ที่เพิ่มจำนวนอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยดูการเปลี่ยนสี Hydroxynaphthol blue (HNB) จากสีม่วงเป็นสีฟ้าน้ำเงิน และอ่านผลด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จะปรากฏรูปร่างคล้ายขั้นบันได ค่าความไวของวิธีนี้ที่วัดได้คือจำนวน 100 copy ไม่สามารถตรวจวัดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ (JEV) และเชื้อไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ในสุกร (PRRSV) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่าวิธี HNB RT-LAMP อ่านผลด้วยตาเปล่า วิธีนี้มีประโยชน์สำหรับการตรวจเชื้อ CSFV ในสุกร ที่วงไวและรวดเร็ว ซึ่งมีความสะดวกสบายในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาในภาคสนาม

คำหลัก : เชื้อไวรัสโรคหิวาต์สุกร/ วิธี RT-LAMP/ สี Hydroxynaphthol blue

Project Code: DIG518004

Project Title: Detection of nucleic acid of classical swine fever virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Investigator: Dr. Jundee Rabablert, Department of Biology, Faculty of Science,
Silpakorn University

E-mail Address: Jundee04@gmail.com, Jundee@su.ac.th

Project Period: 3 March 2008 ถึง 2 March 2010 (2 years)

In the present study, we developed reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay targeting the 5'untranslated gene for the detection of CSFV. The RT-LAMP assay is very simple and rapid, wherein the amplification can be obtained in 60 min under isothermal conditions at 65°C by employing a set of six specific primer mixtures. A positive amplification was visualized with the naked eye by using Hydroxynaphthol blue (HNB) dye; indicated by a color change from violet to sky blue and had a ladder-like appearance by agarose gel electrophoresis. The sensitivity of this assay was 100 copy numbers. No cross-reactivity related to Japanese encephalitis (JE) virus and Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus was found. Our results clearly demonstrated that the developed HNB RT-LAMP assay visualized with naked eye is an extremely rapid, cost-effective, sensitive, and specific method for the detection of CSFV RNA.

Keywords: Classical swine fever virus (CSFV); RT-LAMP; Hydroxynaphthol blue dye