51303201: MAJOR : BIOLOGY
KEY WORDS: CSFV/ RT-LAMP ASSAY/ HYDROXYNAPHTHOL BLUE DYE

KANOKWAN WONGSAWAT: DETECTION OF NUCLEIC ACID OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS BY REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP). THESIS ADVISORS: JUNDEE RABABLERT, Ph.D., AND PROF. TARARAJ DHARAKUL, M.D., Ph.D. 72 pp.

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℃ 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. In addition, the FTA technology was investigated for its use for storage, transport, collection, and subsequent molecular analysis of CSFV RNA, facilitating epidemiological investigations in the field.

มหาวิทยาลัยศิลปากร silpakorn

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010
Student's signature …….
Thesis Advisors' signature 1…….2. …….

51303201: สาขาชีววิทยา
คำสำคัญ: เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร/ วิธี RT-LAMP/ สี Hydroxynaphthol blue

กนกวรรณ วงษ์สวัสดิ์ การตรวจกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสโรคอหิวาต์สุกรโดย Reverse Transcription Loop - Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อ. ดร. จันทร์ดี ระแบบเลิศ และ ศ. ดร. พญ. ธารารัชต์ ธารากุล. 72 หน้า.

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยเทคนิค 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 ที่ว่องไวและรวดเร็ว นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยี FTA สำหรับการเก็บ ขนส่ง สะสม และการวิเคราะห์ด้านอณูโมเลกุลของ RNA เชื้อ CSFV ซึ่งมีความสะดวกสบายในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาในภาคสนาม

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. ……..…… 2. ……..……

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to my major advisor, Dr. Jundee Rabablert, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University and my co-advisors, Professor Dr. Tararaj Dharakul, Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for their kind expression, excellent supervision, scholarship support, advice, and suggestion on technical problems and encouragement throughout the period of my graduate study and in preparation of this thesis. Without their thoughts, attenuation, and advice, this thesis could not have been completed.

Special thanks to Dr. Jarunee Satra from Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives for providing classical swine fever virus Bangkhen strain as the reference strain in this study, Mr. Phairot Narat Bangkok Agro-Industrial Products Public Co., Ltd., Bangkok for samples and Dr. Pahol Kosiyachinda, Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University for reviewing the thesis.

I would like to thank all staff members of Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University and Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University

I would like to express my special thanks to the Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Thailand Research Fund (TRF no. DIG 5180004), Partial fund from MRG-WII525S092 and RGP 2552-06 for the financial supports

I would like to express my special thanks to Mr. Boonsong Pannoi and Mr. Wanlop Supising director of Omnoisophonchanupathom School, respectively.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my family for their understanding, love, and care, which is the great support to my success.

Kanokwan Wongsawat

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์