COMPARATIVE DETECTION METHOD BETWEEN PCR AND qPCR TECHNIQUE OF *ASPERGILLUS FLAVUS* IN DRIED FOOD

PHARITA MAKKAEW

TIPMARIN PUNYARATABANDHU

A SENIOR PROJECT SUBMITTED FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

BACHELOR OF SCIENCE IN BIOMEDICAL SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2018

นักศึกษา	นางสาวผริตา เมฆแก้ว
	นางสาวทิพย์มารินทร์ บุณยรัตพันธุ์
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5800590, 6006494
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.ปานันท์ กาญจนภูมิ
เรื่อง	การเปรียบเทียบวิธีตรวจหาเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหารแห้งระหว่างเทคนิค PCR และ qPCR
คำสำคัญ	*Aspergillus flavus*, PCR, quantitative PCR, qPCR, dried shrimp, peanut

บทคัดย่อ

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่พบปนเปื้อนได้บ่อยในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหารแห้ง เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด ผลไม้อบแห้ง กุ้งแห้ง และพริกแห้ง ตัวเชื้อผลิตสารพิษอันตรายที่เรียกว่าอะฟลาท็อกซินชนิดบีหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุใหญ่ในการก่อโรงมะเร็งที่ตับ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีตรวจหาเชื้อ *A. flavus* ระหว่างวิธี PCR และ qPCR ในถั่วลิสงและกุ้งแห้งบริเวณตลาดโดยรอบจังหวัดปทุมธานี วิธีการวิจัยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* เพื่อนำมาทำ artificial infection และหาเวลาการเจริญของเชื้อที่เหมาะสม (Enrichment time) ในการทำการวิจัย จากนั้นเก็บตัวอย่างถั่วลิสงและกุ้งแห้งจากตลาด 15 แหล่งโดยรอบจังหวัดปทุมธานี เพื่อมาสกัดเชื้อรา *A. flavus* แล้วตรวจหาด้วยเทคนิค PCR และ qPCR ผลที่ได้ในการวิจัยนี้ความไวของ *A. flavus* ในเทคนิค PCR มีเข้มข้น 50 pg/µl ส่วนเทคนิค qPCR มีความเข้มข้น 500 fg/µl แสดงว่าเทคนิค qPCR มีความไวสูงกว่าเทคนิค PCR ถึง 100 เท่า เวลาที่เหมาะสมในการทำการวิจัยคือ artificial infection ที่ 1 ชั่วโมงและ enrichment time ที่ 1 วันของทั้ง 2 อาหารแห้งตัวอย่างและทั้ง 2 เทคนิค พบว่า เทคนิค PCR ไม่พบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 550 bp และผลิตภัณฑ์จากเทคนิค qPCR ส่วนมากตรวจพบได้หลัง cycle ที่ 20 ในอาหารแห้งตัวอย่างหมายความว่าเชื้อ *A. flavus* มีปริมาณน้อยมากซึ่งไม่อยู่ในระดับที่ทำอันตรายต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต

Student	Pharita Makkaew
	Tipmarin Punyaratabandhu
Student ID	5800590, 6006494
Degree	Bachelor of Science
Program	Biomedical Sciences
Academic Year	2019
Advisor	Assist. Prof. Panan Kanchanaphum Ph.D.
Title	Comparative detection method between PCR and qPCR technique of *Aspergillus flavus* in dried food
Keywords	*Aspergillus flavus*, PCR, quantitative PCR, qPCR, dried shrimp, peanut

ABSTRACT

Aspergillus flavus is a fungus that often contaminated in agricultural products and dried foods such as peanuts, corn, dried fruits, dried shrimp, and dried chili. It produces the dangerous mycotoxins called aflatoxin B1 that is the major cause of Liver Cell Cancer. So, the objective of this study is to compare the detective method of *A. flavus* between PCR and qPCR technique in peanuts and dried shrimps from local market at Pathum Thani. The research method started with cultivating *A. flavus* for artificial infection method and finding the enrichment time. Then, peanut and dried shrimp samples from 15 local markets in Pathum Thani were collected to extract DNA and following by PCR and qPCR techniques. This study showed that sensitivity of *A. flavus* DNA is 50 pg/µl in PCR technique and 500 fg/µl in qPCR technique. It meant that qPCR technique was 100 times higher sensitivity than PCR techniques. The appropriate time in experiment was 1 hour for artificial infection and 1 day for enrichment time in both dried food samples and detection techniques. It did not find any PCR product at 550 bp and mostly showed qPCR product after cycle 20 time in both dried food samples. It assumed that the dried food samples had a very small amount of *A. flavus* that not in the process of harming the organism.