

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป 3 ชนิด สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี Real-Time RT-PCR

นันทยา เอี่ยมประภาศ

หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

*อีเมลของผู้ประพันธ์บทความ: nanthiya.i@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป 3 ชนิด สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ด้วยวิธี real-time RT-PCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อแบบ 10-fold (10 เท่า) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่สกัดจากพลาสมิดของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนชุดน้ำยาสำเร็จรูป แต่ใช้ไพรเมอร์และความเข้มข้นเท่ากัน ใช้สารพันธุกรรมตั้งต้นปริมาณเท่ากัน และจำนวนรอบการทำ real-time RT-PCR 45 รอบเท่ากัน พบว่า ชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix สามารถตรวจพลาสมิดเนื้อเยื่อของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความเข้มข้นต่ำสุด คือ 7.923 copies/ μ L ได้ และตรวจวัดได้รวดเร็วด้วยจำนวนรอบที่น้อยกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ QuantiTect® Probe RT-PCR Kit ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR efficiency (E) และค่า R^2 อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จากผลการวิจัย คณะผู้วิจัยจึงเลือกชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกร (Classical Swine Fever) ด้วยวิธี real-time RT-PCR กับเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น QuantStudio™ 5

คำสำคัญ: ไวรัสอหิวาต์สุกร, real-time RT-PCR, copies/ μ L, ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา, ค่า R^2

Efficiency of Three Commercial Real-Time PCR Kits for Detecting Classical Swine Fever Virus

Nanthiya Iampraphat

*Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,
Pathum Wan, Bangkok 10330, Thailand*

*Corresponding author's e-mail: nanthiya.i@chula.ac.th

Abstract

A comparative study of the efficiency of three commercial real-time PCR kits for detecting Classical Swine Fever Virus (CSFV) by real-time RT-PCR from 10-fold serially diluted viral plasmid DNA samples was conducted. The experiment was conducted three times, each trial using a different commercial kit but maintaining the same concentrations of probes and primers. The template volume and the number of real-time RT-PCR cycles (45 cycles) were also kept constant. The results showed that the TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix kit was able to detect diluted plasmid DNA of classical swine fever virus at the lowest concentration of 7.923 copies/ μ L. Furthermore, it achieved detection with a lower cycle number compared to the SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit and QuantiTect® Probe RT-PCR Kit at each corresponding concentration. The PCR efficiency (E) and R^2 values for the TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix were also within the acceptable range. Therefore, the TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix kit was selected for the detection of classical swine fever virus by real-time RT-PCR using the QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System.

Keywords: Classical Swine Fever, real-time RT-PCR, copies/ μ L, PCR efficiency (E), R^2

บทนำ

งานบริการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกรหรือคลาสสิกัล สไวน์ ฟีเวอร์ (Classical swine fever) ด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาที่หน่วยชั้นสูงโรคสัตว์ให้บริการในปัจจุบันเป็นวิธีรีเวอร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (อาร์ที-พีซีอาร์) (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ทั้งนี้วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีข้อจำกัด คือมีความไวและความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาต่ำและมีขั้นตอนหลังพีซีอาร์ ที่ต้องรอให้ปฏิกิริยาการเกิดลูกโซ่โพลีเมอเรสสิ้นสุด แล้ววิเคราะห์ผลผลิตที่ได้โดยการทำ Agarose gel electrophoresis ซึ่งอาจก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของผลผลิตพีซีอาร์ ที่นำไปสู่การเกิดผลบวกปลอม (false positive) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเป็นวิธีแบบเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ (real-time RT-PCR) ซึ่งวิธีนี้ไม่มีขั้นตอนหลังพีซีอาร์ ทำให้ลดโอกาสในการปนเปื้อน และใช้เวลาในการทำงานรวดเร็วกว่า อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถติดตามผลการเกิดปฏิกิริยาได้ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณแสงของปฏิกิริยา

ปัจจุบันไพรเมอร์ (Primer) ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิมเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนส่วน 5' Non Coding Region (5' NCR) ใช้ตรวจยีนต่อไวรัสในกลุ่มเพสต์ไวรัส (Pestivirus) ทั่วไป ซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 284 bp (Vilcek et al., 1994) เมื่อมีการพัฒนาเป็นวิธีเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ จึงใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อส่วนของยีน 5' UTR ของจีโนมเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร (GenBank accession number NC_000294.1) (Risatti et al., 2003) ทั้งนี้การปรับสภาวะและองค์ประกอบของปฏิกิริยาเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ ให้เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยให้ได้ผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ เมื่อเลือกโพรบและไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรได้แล้ว การเลือกชุดน้ำยาสำเร็จรูปจึงเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องตระหนัก เนื่องจากมีความหลากหลายจากผู้ผลิต ประสิทธิภาพและราคาของชุดน้ำยาที่แตกต่างกัน รวมถึงค่าความไวต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ หรือ Limit of Detection (LOD) บริษัทผู้ผลิตเครื่อง real-time PCR ส่วนใหญ่มักผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้กับเครื่องของบริษัทผู้ผลิตเอง และยังมีน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่สามารถใช้กับเครื่อง real-time PCR ได้ทุกรุ่นทุกยี่ห้อได้ (วีระพงศ์ ลุติตานนท์, 2557) ด้วยปัจจัยดังกล่าวข้างต้นจึงต้องทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร เพื่อให้ได้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องดีที่สุด และสร้างความมั่นใจในกระบวนการตรวจวินิจฉัย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเลือกชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและเหมาะสมที่สุด ในการตรวจหาเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรด้วยวิธีเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์กับเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงรุ่น QuantStudio™

ระเบียบวิธีวิจัย

แหล่งที่มา จำนวน และเกณฑ์การคัดเลือกประชากร

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็นตัวอย่างเจือจางแบบ 10-fold (10 เท่า) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่สกัดจากพลาสมิดของเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่สกัดจากพลาสมิดของเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกร เจือจางแบบสิบเท่า (10-fold dilution)

Dilution of DNA (log10)	DNA concentration (Nanogram/ μ L)	copies/ μ L
-1	2.5173	7.923×10^8
-2	0.25173	7.923×10^7
-3	0.025173	7.923×10^6
-4	0.0025173	7.923×10^5
-5	0.00025173	7.923×10^4
-6	0.000025173	7.923×10^3
-7	0.0000025173	7.923×10^2
-8	0.00000025173	7.923×10^1
-9	0.000000025173	7.923×10^0

ขั้นตอนกระบวนการ

1) การโคลนนิ่ง เตรียม Plasmid DNA ของเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกร

นำชิ้นยีน 5' UTR ของเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกรขนาด 67 bp มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pCR[®]8/GW/TOPO[®] (pCR[®]8/GW/TOPO[®]TA Cloning Kit, invitrogen, USA) และนำพลาสมิดที่มียีน 5' UTR ของเชื้อไวรัสฮิวาต์สุกรทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย One Shot[®]TOP10 Chemically Competent *E.coli* (pCR[®]8/GW/TOPO[®]TA Cloning Kit, invitrogen, USA) คัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็งแอลบีอะการ์ (LB agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Spectinomycin dihydrochloride 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) สกัดพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin[®] Plasmid EasyPure kit (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้น ตรวจวัดความเข้มข้นพลาสมิดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, US) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ (DNA copy number) ตามสูตร (Whelan et al., 2003)

$$\text{Copies} = \frac{(Xng) \times 6.022 \times 10^{23}}{n \times 660 \times 10^9}$$

อธิบายตัวแปรโดย X คือ ปริมาณของดีเอ็นเอหน่วยเป็นนาโนกรัม (ng)

n คือ ความยาวของดีเอ็นเอ (bp)

660 คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเบสคู่ 1 bp (660 g/mol/bp)

6.022×10^{23} คือ เลขอาโวกาโดร (จำนวนโมเลกุลต่อ mol)

2) เจือจางพลาสติกของเชื้อไวรัสที่ต้องการทดสอบแบบ 10-fold (10 เท่า) ตั้งแต่ความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึง 10^0 copies

3) นำพลาสติกที่เจือจางไปตรวจหาเชื้อไวรัสหิวาต์สุกร ด้วยวิธีเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ ตั้งแต่ความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึง 10^0 copies ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

4) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนชุดน้ำยาสำเร็จรูป แต่ใช้โพรบและไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ใช้ปริมาตรเท่ากัน และการทำปฏิกิริยาเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ จำนวน 45 รอบเท่ากัน ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น QuantStudio™ 5 ดังนี้

ตารางแสดงองค์ประกอบครั้งที่ 1 ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit

องค์ประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X Reaction Mix	12.5	1X
2. Forward primer, 10 μM	2.5	1 ไมโครโมลาร์
3. Reverse primer, 10 μM	2.5	1 ไมโครโมลาร์
4. Fluorogenic probe, 10 μM	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
5. ROX™ Reference Dye (1:10)	0.5	50 นาโนโมลาร์
6. SuperScript III RT / Platinum™ Taq Mix	0.5	4 / 0.1 ยูนิต
7. Nuclease-free water	4.25	
8. Template	1	
ปริมาตรรวม	25	

ตารางแสดงองค์ประกอบครั้งที่ 2 ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป QuantiTect® Probe RT-PCR Kit

องค์ประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5	1X
2. Forward primer, 10 μM	2.5	1 ไมโครโมลาร์
3. Reverse primer, 10 μM	2.5	1 ไมโครโมลาร์
4. Fluorogenic probe, 10 μM	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์

องค์ประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5. QuantiTect RT Mix	0.25	
6. Nuclease-free water	5	
7. Template	1	
ปริมาตรรวม	25	

ตารางแสดงองค์ประกอบครั้งที่ 3 ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix

องค์ประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 4X TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	5	1X
2. Forward primer, 10 µM	2	1 ไมโครโมลาร์
3. Reverse primer, 10 µM	2	1 ไมโครโมลาร์
4. Fluorogenic probe, 10 µM	1	0.5 ไมโครโมลาร์
5. Nuclease-free water	9	
6. Template	1	
ปริมาตรรวม	20	

ผลการวิจัย

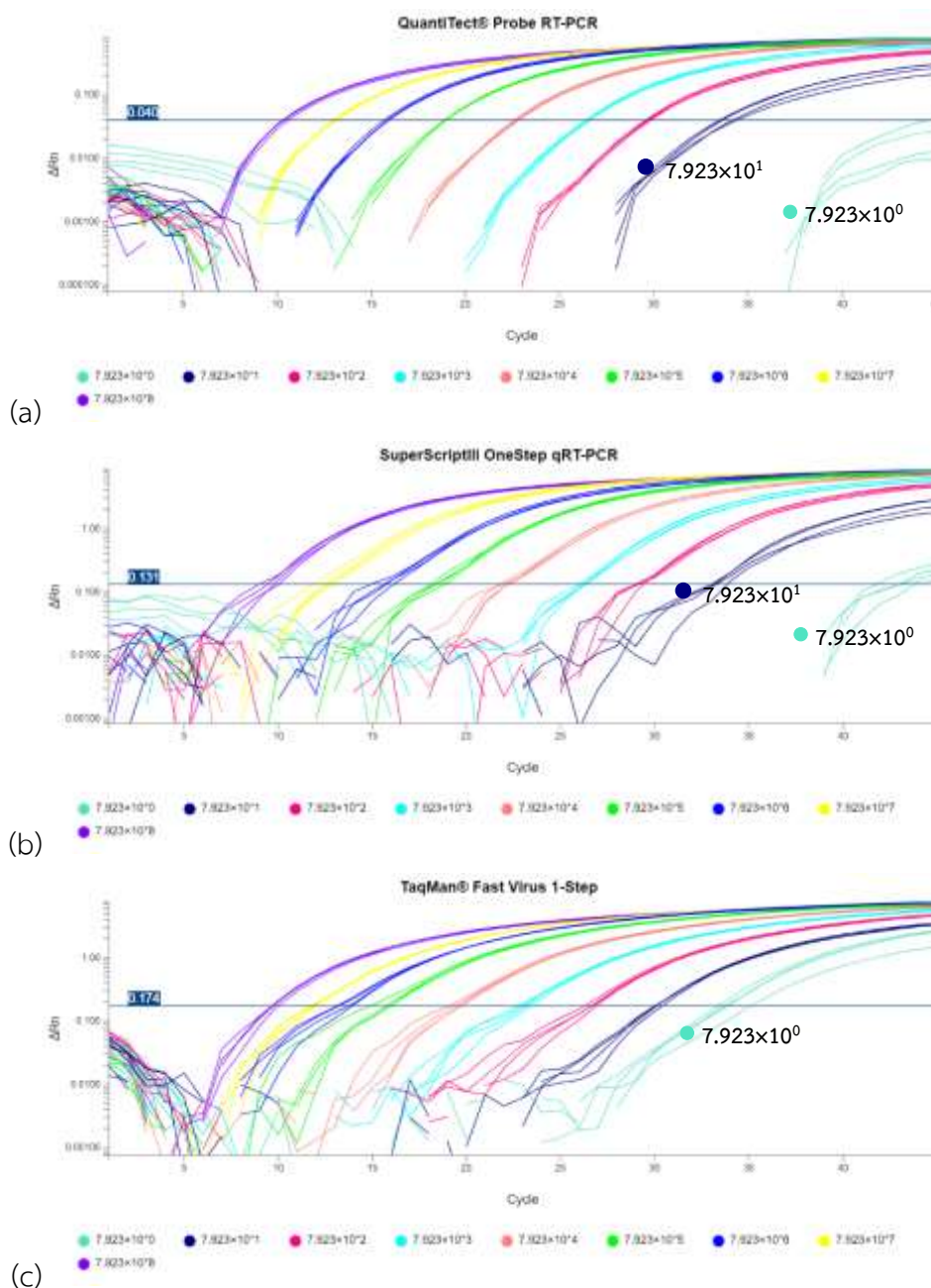
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสหิวาต์สุกรแบบ 10-fold (10 เท่า) ตั้งแต่ 10^8 จนถึง 10^0 ตัวอย่างละ 4 ซ้ำ โดยเปลี่ยนชุดน้ำยาสำเร็จรูป แต่ใช้โพรบและไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ใช้สารพันธุกรรมตั้งต้น ปริมาตรเท่ากัน และทำปฏิกิริยาเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ จำนวน 45 รอบ วิเคราะห์ผลตรวจด้วยค่า Cycle threshold (Ct) เฉลี่ย ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 7.923 copies/µL ชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix มีค่า Ct เฉลี่ย คือ 35.56 รอบ ส่วนชุดน้ำยาสำเร็จรูป QuantiTect® Probe RT-PCR Kit และ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit ไม่สามารถตรวจได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดนี้ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทั้งสองนี้สามารถตรวจได้คือ 7.923×10^1 copies/µL และมีค่า Ct เฉลี่ยอยู่ที่ 33.96 และ 33.28 รอบ ตามลำดับ เมื่อนำค่า Ct เฉลี่ยของแต่ละชุดน้ำยาสำเร็จรูปมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของพลาสมิดเจี๊อง ดังรูปที่ 2 พบว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix มีแนวโน้มในการตรวจด้วยจำนวนรอบที่รวดเร็วกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ QuantiTect® Probe RT-PCR Kit

ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา ค่า PCR efficiency (E) ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม QuantStudio™ Design & Analysis Software และค่า R^2 ดังรูปที่ 3 พบว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix มีค่า Efficiency (%) สูงสุดคือ 108.836 (Slope = -3.127) สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ QuantiTect® Probe RT-PCR Kit มีค่าใกล้เคียงกันคือ 97.636

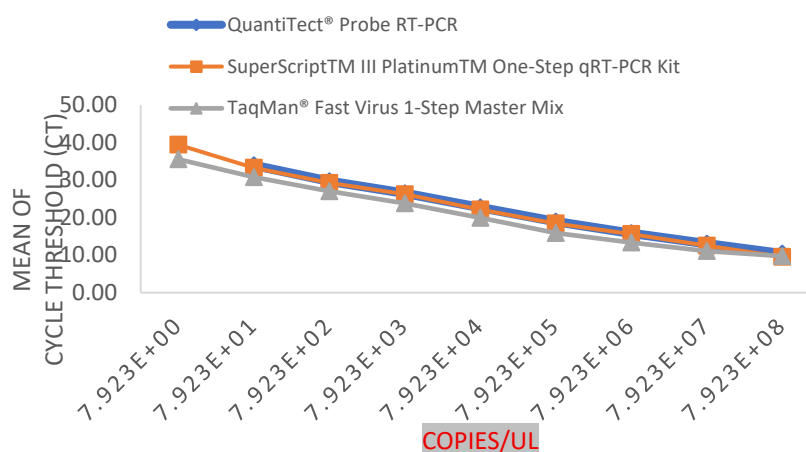
(Slope = -3.397) และ 96.952 (Slope = -3.38) ตามลำดับ ซึ่งค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 90 - 110 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า R^2 ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป QuantiTect® Probe RT-PCR Kit, SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix มีค่าเท่ากับ 0.996, 0.995 และ 0.982 ตามลำดับ ซึ่งค่า R^2 ที่ยอมรับได้ควรมากกว่า 0.985 (Rogers-Broadway & Karteris, 2015) ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 - 3

ตารางที่ 2 แสดงค่า Ct เฉลี่ยของแต่ละชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^0 จนถึง 10^8

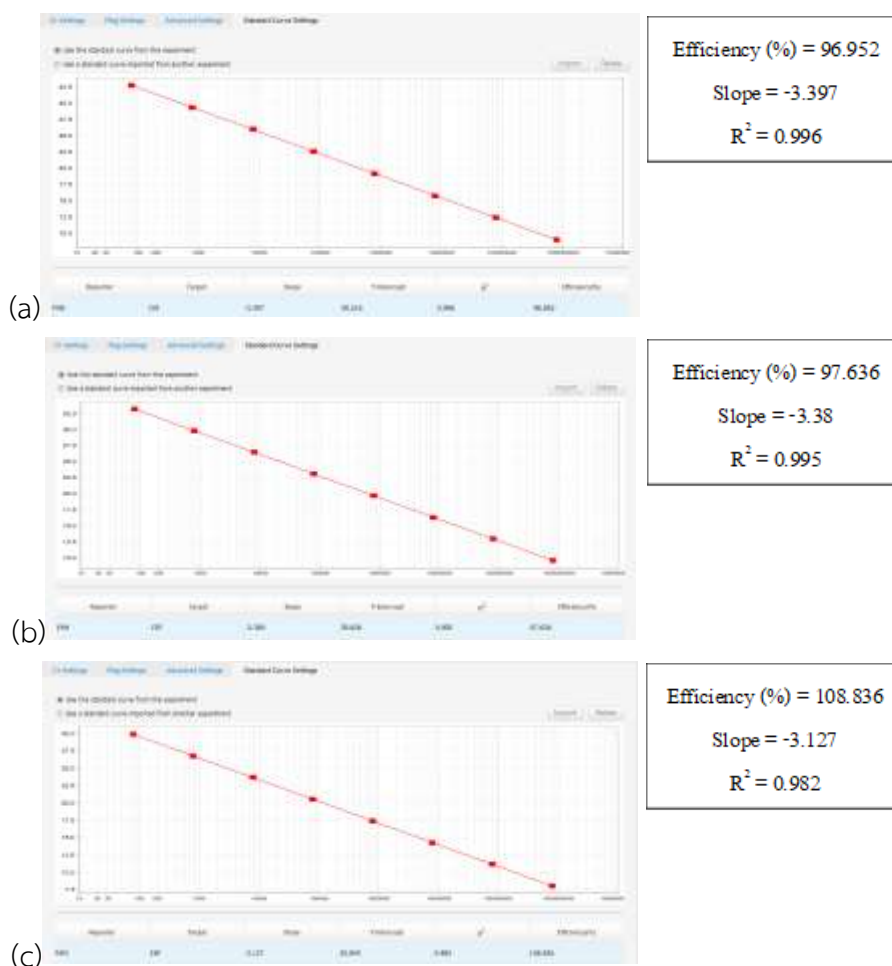
copies/ μ L	ค่า cycle threshold (Ct) เฉลี่ย		
	QuantiTect® Probe RT-PCR Kit	SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit	TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix
7.923×10^0	Not detected (no Ct value)	Not detected (39.42)	35.56
7.923×10^1	33.96	33.28	30.79
7.923×10^2	29.69	29.24	27.04
7.923×10^3	26.48	26.21	23.82
7.923×10^4	22.71	22.14	19.94
7.923×10^5	18.94	18.44	15.90
7.923×10^6	15.84	15.62	13.37
7.923×10^7	13.04	12.52	11.09
7.923×10^8	10.38	9.53	9.72



ภาพที่ 1 แสดงกราฟการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Amplification plot) ของเชื้อไวรัสฮิวมาตัสเกรนเจอร์แบบ 10 เท่า ตั้งแต่ค่าถึง 10^8 ถึง 10^0 copies/ μ L และแสดงให้เห็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ของน้ำยาสำเร็จรูป (a) QuantiTect® Probe RT-PCR Kit, (b) SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ (c) TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix



ภาพที่ 2 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่า Cycle threshold (Ct) เฉลี่ยของแต่ละชุดน้ำยาสำเร็จรูปในแต่ละความเข้มข้นของพลาสมิดเจือจาง



ภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) ค่า PCR amplification efficiency (E) และค่า R² ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป (a) QuantiTect® Probe RT-PCR Kit, (b) SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ (c) TaqMan® Fast Virus 1-Step Master

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix สามารถตรวจพลาสมิดเจือจางของเชื้อไวรัสอหิวาต์สุกรที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบค่า LOD คือ 7.923 copies/ μ L ได้ และสามารถตรวจวัดด้วยจำนวนรอบที่น้อยกว่าชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ QuantiTect® Probe RT-PCR Kit ที่แต่ละความเข้มข้นเดียวกัน ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR efficiency ก็อยู่ในช่วงที่เหมาะสมระหว่าง 90 - 110 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งนี้ค่า R^2 ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix ต่ำกว่าค่าที่ยอมรับได้เล็กน้อย คือ 0.982 ซึ่งควรจะต้องมากกว่า 0.985 ดังนั้นจึงเลือกชุดน้ำยาสำเร็จรูป TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้ออหิวาต์สุกร ด้วยวิธีเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ กับเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น QuantStudio™ 5 ทั้งนี้อาจจะต้องทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลลัพธ์ ปรับสถานะเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ให้เหมาะสม ปรับหาความเข้มข้นของโพรบ ไพรเมอร์ และสารพันธุกรรมตั้งต้น รวมถึงโปรแกรมอุณหภูมิในการทำเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อให้ได้ผลถูกต้อง มีความจำเพาะ ความไว และได้ประสิทธิภาพที่สูงสุด

ข้อเสนอแนะการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนางานประจำสำหรับงานบริการตรวจวินิจฉัยโรคอหิวาต์สุกร ด้วยเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์ นอกจากประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป สิ่งที่ต้องพิจารณาเพิ่มเติมคือ ราคาต้นของชุดน้ำยาสำเร็จรูป และความเร็วในการทำเรียล-ไทม์ อาร์ที-พีซีอาร์

สำหรับชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit และ QuantiTect® Probe RT-PCR Kit สามารถใช้เป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำรองได้ (Backup Reagent) ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR efficiency และค่า R^2 อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าองค์ประกอบในชุดน้ำยาสำเร็จรูปเหล่านี้อาจมีส่วนประกอบและความเข้มข้นแตกต่างกัน แต่ก็มีส่วนประกอบหลักที่สำคัญเหมือนกัน ได้แก่ DNA polymerase, dNTPs และ $MgCl_2$ แต่ก็อาจเกิดผลลบปลอมได้ในกรณีที่ความเข้มข้นของ template ต่ำกว่า 7.923×10^1 copies/ μ L

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (โครงการพัฒนาคุณค่างานประจำสู่งานวิจัยและนวัตกรรมปีงบประมาณ 2567)

เอกสารอ้างอิง

วีระพงศ์ ลุติตานนท์. (2557). เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ *Real-time PCR* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพมหานคร: บริษัท ดีทีริโอ จำกัด.

- Risatti, G. R., Callahan, J. D., Nelson, W. M., & Borca, M. V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 500-505.
- Rogers-Broadway, K. R., & Karteris, E. (2015). Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1261-1264.
- Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., & Paton, D. J. (1994). Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology*, 136(3-4), 309-323.
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278(1), 261-269.