รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช**

2. **โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : **เทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno-Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of Immuno-Strip Detection for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on Orchid

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : รุ่งนภา ทองเครั่ง **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทัศนาพร ทัศคร สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทิพวรรณ กันหาญาติ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ** :

พัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM) โดยผลิตแอนติ-ซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ด้วย Membrane protein complex (MPC) ทำการสกัด IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG และเตรียม conjugated release pad (CRP) ทำเส้น control line ด้วย Goat anti rabbit (GAR) และ test line ด้วย IgG บนแผ่น membrane S&S-AE 99 เมื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบแล้ว ทำการทดสอบกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี-ต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ได้อย่างรวดเร็ว โดยเส้น control line และ test line ปรากฏสีในเวลา 5 นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวของชุดตรวจสอบ สามารถตรวจแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ได้ในปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

: Immuno-strip was developed for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* detection on orchid using the principle of serology and lateral flow test techniques on nitrocellulose membrane (NCM). Specific antiserum for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* was produced by membrane protein complex (MPC) from virulent strains. The IgG of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* antiserum was purified to produce Immuno-strip. Gold-conjugated IgG was prepared by conjugaing IgG with colloidal gold and used to produce a line for conjugated release pad (CRP). A Control line and test line were made on NCM S&S AE 99 with Goat anti rabbit (GAR) and IgG respectively. The Immuno-strips were tested with suspension of 10^8 cfu/ml of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. The result showed that color appeared in the control line and the test line within 5 minutes. The sensitivity of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* detection on orchid using Immuno-strip was at the minimum concentration of 10^4 cfu/ml.

6. คำนำ : โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้มีสาเหตุจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (ชื่อเดิม *Pseudomonas cattleyae*) ลักษณะอาการที่พบเริ่มแรกแผลจะมีอาการฉ่ำน้ำสีเหลืองอ่อน มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลจะมีการพัฒนาขยายขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลงไปจากผิวใบ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน พบได้ทั้งใบแก่และใบอ่อน มีการระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน อาจจะพบลักษณะอาการอีกแบบคือ แผลสีขาว เป็นวงสีน้ำตาลหรือเทา ที่ขอบแผลชั้นกลาง จะเป็นสีดำขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลนอกสุดมีสีเหลืองล้อมรอบ (Divinagracia *et al*., 1984) เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae subsp. cattleyae* สามารถเข้าสู่ใบกล้วยไม้ได้ทางบาดแผล (wound) ช่องเปิดธรรมชาติของใบ (hydrathods) เชื้อสามารถแพร่กระจายโดยกระเด็นไปกับน้ำที่ใช้รด โดยเฉพาะวิธีการให้น้ำด้วยระบบสปริงเกอร์จะส่งผลให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปได้ดี (Miller, 1990) พบการระบาดในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา (Vanda Hybrid) แคทลียา (Cattleya) ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) ซิมบิเดียม (Cymbidium) เดนโดรเบียม (Dendrobium) ม็อคคาร่า (Mokara) และออนซิเดียม (Oncidium) (Miller, 1990) ในเกือบทุกแหล่งที่มีการปลูกกล้วยไม้

จากเทคนิคต่างๆ ที่ใช้เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เช่น ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิคชีวเคมี ELISA PCR และ Biolog™ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความไวในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้ง 5 วิธี มีข้อจำกัดคือ การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ เทคนิคชีวเคมีเป็นวิธีการที่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกเชื้อจากตัวอย่างพืชในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ก่อนแล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี นอกจากนี้ยังมีข้อเสียคือต้องอาศัยการทดสอบจำนวนมาก ใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน และอาจได้ผลแตกต่างกันไปตามห้องปฏิบัติการเนื่องจากมาตรฐานในการปฏิบัติทดสอบแตกต่างกัน (วิชัย, 2549) สำหรับเทคนิค

ELISA ซึ่งเป็นวิธีการทางเซรุ่มวิทยา (serology) ได้มีการประยุกต์ใช้ในงานด้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมาก มีความจำเพาะเจาะจงและได้มีการปรับปรุงเพื่อเพิ่มความไวให้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจแต่ละครั้งอย่างน้อย 5-6 ชั่วโมง ส่วนเทคนิค PCR มีข้อจำกัดในเรื่องการปฏิบัติงานที่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจนาน ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Biolog™ ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวบรวมการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีหลายชนิดได้พร้อมกันภายในครั้งเดียว โดยนำเอาซับเตรทเตรียมเป็นอาหารสำเร็จรูปเคลือบลงในจานหลุม จำนวน 96 ชนิด และนำรูปแบบของคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ปรากฏเปรียบเทียบกับรูปแบบคุณสมบัติทางชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรียต้นแบบชนิดต่างๆ (Type strain) ในฐานข้อมูล การตรวจเชื้อด้วย Biolog™ เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบผลได้อย่างง่าย รวดเร็วและให้ผลค่อนข้างแม่นยำ แต่เทคนิค Biolog™ ยังมีข้อเสียคือในการจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีตาม Biolog™ นั้นต้องมีการทดสอบพื้นฐานเพื่อให้สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้อย่างถูกต้องมากที่สุด ใช้ระยะเวลาในการตรวจมากกว่า 24 ชั่วโมง และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ขั้นต่ำ 1,500-2,000 บาท/ตัวอย่าง สำหรับปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบ (detection kits) โดยนำวิธีการทางอิมมูโนวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (immunochomatography) ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ซึ่งนักวิชาการได้พัฒนาขึ้นใช้เอง ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ทำให้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียพืชได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และสะดวกในการใช้งาน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคอื่นๆ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืช (สุรภี และคณะ, 2551)

จากการระบาดของโรคใบจุดสีน้ำตาลที่พบในปัจจุบัน ได้สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรค่อนข้างมาก เนื่องจากเกษตรกรไม่ทราบชนิดของโรค จึงส่งผลให้วิธีการป้องกันกำจัดที่นำมาใช้ไม่ตรงกับลักษณะการระบาดของโรค ซึ่งในขณะเดียวกันหากเกษตรกรสามารถทราบถึงสาเหตุของโรคที่ถูกต้องจะช่วยให้การป้องกันกำจัดโรคทำได้อย่างถูกวิธีและลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และที่สำคัญต้องรวดเร็ว เพื่อสามารถหาแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมการระบาดของศัตรูพืชได้ทันสถานการณ์ งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ เพื่อให้การตรวจสอบทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้องแม่นยำ และสะดวกรวดเร็วมากขึ้น

7. **วิธีดำเนินการ** : - **อุปกรณ์**

1. แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae*
2. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ PSA
3. Goat anti-rabbit IgG
4. สารละลาย Colloidal gold
5. วัสดุที่ใช้ประชุดตรวจสอบ Immuno Strip เช่น nitrocellulose membrane AE99, sample pad, conjugate pad, absorption pad, backing pad

- วิธีการ

1. การผลิตแอนติซีรั่ม : เตรียมแอนติเจนของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในรูปของ membrane protein complex (MPC) ดัดแปลงจากวิธีของ Yakrus และ Schaad (1979)ใช้กระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นเซรุ่มปกติ (normal serum; Ns) แล้วฉีดกระตุ้นด้วย MPC ผสม Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ในสัปดาห์ที่สอง ในครั้งต่อๆ ไป ผสม MPC กับ Incomplete Freund's Adjuvant แทน ด้วยวิธีการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาตร 500 ไมโครกรัมต่อครั้ง เก็บเลือดกระต่ายที่ใบหูในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป โดยเจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดที่ใบหูลงในบีกเกอร์ที่สะอาด นำเลือดกระต่ายที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเลือดแข็งตัว ใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อเขี่ยขอบบีกเกอร์ให้เลือดหลุดจากขอบบีกเกอร์ เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ดูดส่วนน้ำใสนำไปปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดที่ความเร็วรอบ 10000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเซรุ่มที่ได้แบ่งเก็บใส่ขวด เติม NaN_3 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รัชนี, 2549)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่ม :

<u>การตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*</u>

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect โดยนำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ($1.6x10^8$ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS pH 7.4 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วย PBST (Phosphate buffer+0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม PAb ที่ได้ทำการเจือจางแบบ 2 เท่า เป็นลำดับ (two fold serial dilution) ใน 1x PBS เริ่มจากความเข้มข้น 1:1000 จนถึง 1:128000 โดยมีตัวควบคุม (negative control) คือ normal serum เจือจาง 1:1000 ใน 1x PBS นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphates ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1 : 1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเจือจางสาร PNPP ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 200

ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiscan EX, Lab system, Finland) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *A. avenae* subsp. *cattleyae, A. avenae* subsp. *citrulli*, *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางด้วย 1x PBS ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางเซลล์แบคทีเรียใน 1x PBS ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับ PAb ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีข้อ 6.3.1 โดยมีตัวควบคุม (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

3. การพัฒนาชุดตรวจสอบด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay (อิมมูโนสตริป)

การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ดัดแปลงตามวิธีการที่สุรภีและคณะ (2551) ได้พัฒนาขึ้นมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำ PAb-Aact 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ กวนด้วย magnetic stirrer ช้าๆ เติม saturated ammonium sulfate 10 มิลลิลิตร ทีละหยดขณะกวนด้วย magnetic stirrer บ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้ว dialyse ใน 0.5x PBS นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity column chromatography โดยนำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialyse ผ่านลงในคอลัมน์ โดยใช้ recProtein A affinity column chromatography

(Zymed-Invitrogen, USA) จากนั้นล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย 20 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ และชะ (elute) IgG ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ Glycine-HCl pH 2.7 เก็บสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดทดลองที่มี 2 โมลาร์ Tris, pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ของแอนติบอดีให้เป็นกลาง

3.1.1 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ทดสอบคุณภาพของ IgG ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* โดยวิธี DIBA โดยบดตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคใบจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ให้ละเอียดในถุงพลาสติกด้วย Sample buffer (extraction buffer: PBST+1% PVP) ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติเช่นเดียวกัน และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำน้ำคั้นพืชและเซลล์แขวนลอยเชื้อมาหยดลงบนแผ่น NCM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (2% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาแล้ว ย้ายแผ่น NCM ไปแช่สารละลาย IgG ที่เจือจาง 1:500 ใน TBS เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น NCM มาแช่ใน GAR เจือจาง 1:5,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย BCIP/NP หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

3.1.2 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้อนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.2.1 การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น Conjugate release pad ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ Backing pad ที่เลือกใช้) ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG

ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร คิดเป็นอัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.2.2 การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง แตะปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อแผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

3.2.3 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมินัมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

- เวลาและสถานที่ : เริ่มต้น ตุลาคม 2557 สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. **ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง :** โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ พบว่ามีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000 - 128,000 และเมื่อทดสอบค่าเจือจางของแอนติบอดี พบว่าที่ค่าเจือจางระดับ 1:1000 สามารถตรวจสอบเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect ELISA พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ แต่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* เชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง (Bacterial fuit blotch disease) โดยมีค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ใน genus และ species เดียวกันมีความใกล้ชิดกันมาก ต่างกันเฉพาะ subsp. ที่เกี่ยวข้องกับพืชอาศัย โดยแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* พบเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้นไม่พบในกล้วยไม้ แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น ดังนั้นโพลีโคลนอล

แอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* จากการทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect ELISA

การพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปของเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* โดยนำ IgG ต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ในการทดลองนี้ ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (สารละลาย colloidal gold) และใช้ IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น test line และใช้ Goat anti-Rabbit (GAR) ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 สำหรับ control line พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบน test line และ control line ให้เส้นปฏิกิริยาสีม่วงคมชัด จากการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่าให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับเทคนิค indirect ELISA เมื่อทดสอบความจำเพะกับตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการโรคต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกกล้วยไม้ พบว่ามีเฉพาะลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เท่านั้น ที่เกิดปฏิกิริยาบวกบน test line ของชุดตรวจสอบอิมมูโนตริปที่พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค indirect ELISA ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน ดังนั้นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ จากผลการทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยทดสอบกับสารแขวนลอยเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อได้ปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ : ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาได้ในการทดลองนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ใน ณ จุดตรวจโรค (point of care) ในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11. เอกสารอ้างอิง :

วิชัย โฆสิตรัตน. 2549. **โรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย: บทปฏิบัติการ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 161 น.

สุรภี กีรติยะอังกูร, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. การผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์. **วารสารวิชาการเกษตร** 2: 168-177.

Divinagracia, G.G., B.L. Candole and E.T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. **Summary in Philippine Phytopathology** 20: 3-4..

Miller, J.W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae.* **Plant Pathology Circular** 330.