รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช**

2. **โครงการวิจัย** : เทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : **เทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of Immuno-Strip Detection for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : รุ่งนภา ทองเคร็ง **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทิพวรรณ กันหาญาติ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ** : การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno-Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรคใบเน่าดำของคะน้า ให้การตรวจสอบโรคทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้อง แม่นยำ และสะดวกรวดเร็วมากขึ้น ได้ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 การพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM) โดยผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ XCC ด้วย Membrane protein complex (MPC) ในการฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย จำนวน 2 ครั้ง และเก็บเลือดกระต่ายในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป จากการตรวจหาค่าไตเตอร์และทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ พบว่าแอนติซีรัมครั้งที่ 7 และครั้งที่ 8 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดคือ 1:128,000 และมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ) ในคะน้าเท่านั้น จึงเลือกใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 7 และครั้งที่ 8 สำหรับเตรียม IgG บริสุทธิ์และติดฉลากด้วยสารละลายอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG) เพื่อระบายลงบนแผ่น CRP (conjugated release pad) ทำ control line ด้วย Goat anti rabbit (GAR) และ test line ด้วย IgG บนแผ่น nitrocellulose membrane ชนิด S&S-AE 99 สำหรับประกอบเป็นชุดตรวจสอบ จากการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ Immuno-Strip ด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย XCC ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ โดยเส้น control line และ

test line ปรากฏสีในเวลา 10-15 นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวของชุดตรวจสอบพบว่าสามารถตรวจแบคทีเรีย XCC ได้ในปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1: 2,000 ผลจากงานวิจัยนี้สามารถนำชุดตรวจสอบ Immuno-Strip ไปใช้ในการตรวจแบคทีเรีย XCC ในแปลงปลูกคะน้า เพื่อหาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันต่อสถานการณ์ได้

6. คำนำ : โรคขอบใบทองหรือเน่าดำมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปและเป็นปัญหามากกับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประกอบด้วย บล็อกโคลี่ (broccoli) กะหล่ำดาว (Brussels sprouts) กะหล่ำปลี (cabbage) กะหล่ำดอก (cauliflower) collards คะน้า (kale) กะหล่ำปม (kohlrabi) มัสตาร์ด (mustard) radish rutabaga และ turnip โรคเน่าดำทำให้ผลผลิตเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่สภาวะแวดล้อมเหมาะสม พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคให้เห็นในส่วนใบ โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบแล้วลามลึกเข้ามาในเนื้อใบจนจรดแกนกลางของใบเป็นรูปตัววี (V) เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลดำ ต่อมาจะเกิดอาการแห้งจากขอบใบ ใบเหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำ (xylem) เน่ามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่ๆ จะเกิดอาการเน่าดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว บางครั้งพบอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักคะน้า โดยจะเริ่มเกิดจุดแผลขนาดเล็กๆ ต่อมาจุดขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ขนาดประมาณ ๑ มิลลิเมตร และถ้าความชื้นสูงจะปรากฏลักษณะฉ่ำน้ำรอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเกิดใกล้ชิดกันทำให้เกิดลักษณะไหม้ แห้งตายเป็นหย่อมๆ เนื้อใบที่เป็นแผลขาดทะลุเป็นรู การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะหรือจากเชื้อที่ที่ตกค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพืชอาศัยที่ตกค้างอยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบราก ทางปากใบ (stomata) ต่อมคายน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน น้ำ ชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกิน หรือแผลจากการเขตกรรม

จากการระบาดที่พบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมากเนื่องมาจากเกษตรกรไม่สามารถจำแนกชนิดของโรคได้ถูกต้องในระยะแรกทำให้เกิดการแพร่ระบาด ดังนั้นหากเกษตรกรสามารถวินิจฉัยและรู้ถึงสาเหตุที่ถูกต้องจะทำให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น และที่สำคัญต้องมีการพัฒนาให้รวดเร็วขึ้น เพื่อสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นหัวใจสำคัญในการอารักขาพืช

เมื่อมีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างถูกต้องแม่นยำ ประกอบกับการตรวจที่รวดเร็ว ทำให้สามารถหาแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมการระบาดของศัตรูพืชได้ทันสถานการณ์ ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิด ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

เทคนิค Immuno Strip มีพื้นฐานมาจากเทคนิค latex agglutination test เริ่มคิดค้นพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Singer and Plotz (1956) เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว สะดวก ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจเชื้อไวรัส ต่อมา Yallow and Berson (1959) ได้พัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีหรือ lateral flow test ขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิค คือ latex agglutination tests, sandwich assay และโครมาโทกราฟี เพื่อใช้ตรวจหา anti-insulin antibodies จากแนวคิดที่ว่าแอนติบอดี 2 ชนิด มีความจำเพาะต่ออิพิโทปที่แตกต่างกันบนแอนติเจน ดังนั้นหากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งมาติดกับ solid support แล้ว เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่ติดกับ solid support แอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีนี้จะถูกตรวจ โดยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากกับอนุภาค bead ที่มีขนาดต่างกันเช่น latex bead, erythrocytes, colloidal dyes หรือ metal solution ทำให้สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาได้จากสี bead ที่เกิดขึ้น (Garland *et al*., 1986; Borque *et al*., 1995) สุรภี และคณะ (2551) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส 11 ชนิด และแบคทีเรีย 2 strain โดยวิธี Gold labeled IgG Flow Technique (GLIFT) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ กล้วยไม้ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง พืชผัก และยาสูบ เสาวรส มะละกอ ปทุมมา และพืชตระกูลแตง โดยการนำแอนติซีรัมของเชื้อแต่ละชนิดมาสกัด IgG และปรับความเข้มข้นเป็น 1 มก./มล. และทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อเชื้อด้วยเทคนิค DIBA จากนั้นนำมาติกฉลากด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ทดสอบอัตราที่ใช้กับชนิดของ membrane ขั้นตอนสุดท้ายประกอบเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับพืช ใช้เวลาในการตรวจ ประมาณ 5 นาที และชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

7. วิธีดำเนินการ : - **อุปกรณ์**

1. แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
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. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ กวนด้วย magnetic stirrer ช้าๆ เติม saturated ammonium sulfate 10 มิลลิลิตร ทีละหยดขณะกวนด้วย magnetic stirrer บ่มไว้ 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้ว dialysis ใน 0.5x PBS นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย spectrophotometer ที่ OD 280 แล้วคำนวณความเข้มข้น IgG ที่แยกได้จากสูตร $O.D._{280}/1.4=X$ มิลลิกรัม

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยาเชื้อ Xcc

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA เตรียมสารแขวนลอยเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมี PBS เป็น negative control สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน 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 จากนั้นเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร โดยมีอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์เข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ PBS เป็น negative control 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 ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ทดสอบคุณภาพของ IgG ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc โดยวิธี DIBA บดตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรคใบเน่าดำด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบคะน้าปกติเช่นเดียวกัน และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xcc 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 1:10,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย BCIP/NP หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

2. การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) OD 1 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. การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร 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 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางอนุภาคทองใน gold diluted buffer แบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 (0.3 เท่า) และ 1:4 (0.6 เท่า) เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส นำไประบายลงบนแผ่น CRP ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ เปรียบเทียบความเข้มสีบนเส้น control line

- **เวลาและสถานที่** : เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง :

1. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Xcc โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 5 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทำ dialysis แล้ว นำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialysis มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ (ตารางที่ 1) ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไป conjugate กับ Colloidal gold

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่เจือจาง 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรได้ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.405 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

อิมมูโนโกลบูลินทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นตัวอย่างใบคะน้าที่มีอาการโรคเน่าดำ และแบคทีเรีย *XCC* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลของปฏิกิริยาเป็นสีม่วง และพบว่าอิมมูโนโกลบูลินไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบคะน้าปกติ เมื่อเจือจางเป็น 1:500

2. การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

สารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร แสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line มีสีม่วงคมชัด จึงเป็นความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad (CRP) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc

3. การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

เมื่อนำสารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร มาเจือจางแบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 และ 1:4 แล้วนำไประบายลงบนแผ่น CRP จากผลการทดลองพบว่า Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีม่วงชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่ Gold conjugated IgG ที่ทำการเจือจาง 1:2 และ1:4 จะเกิดปฏิกิริยาสีชมพูค่อนข้างชัดเจนบน test line แต่จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีชมพูอ่อนไม่ชัดเจนบน control line

4. การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร อัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้แผ่น CRP พร้อมนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Immuno strip

5. 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 ไมโครลิตร/แผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

6. 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 การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมินัมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

7. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

7.1 ทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

- ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยการเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคะน้าปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่าเหมือนข้างต้น พบว่าสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

- ทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรค

ทำการเจือจางน้ำคั้นใบคะน้าที่แสดงอาการของโรคเน่าดำแบบ 10 เท่า โดยมีน้ำคั้นใบคะน้าปกติเป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการของโรคที่เจือจาง 1: 2,000

7.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

- ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Pantoea* sp., และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้าที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน

- ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างคะน้า

เมื่อนำตัวอย่างคะน้าที่มีลักษณะอาการต่างๆ มาทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป พบว่ามีเฉพาะอาการโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อ Xcc เท่านั้นที่ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

เกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากคั้นใบคะน้าที่มีลักษณะอาการต่างๆ และใบคะน้าปกติ

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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคเน่าดำของคะน้าในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11. เอกสารอ้างอิง :

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์” กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

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.

Garland, D.L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophyline with the abbot TDX and high pressure liquid chromatography methods. **Clinical Chemistry** 32: 1104.

Singer, J.M. and C.M. Plotz. 1956. The latex fixation test application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **American Journal of Medicine** 21: 888-892.

Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature** 184: 1648-1649.