พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ

Development of the Detection Phytoplasma of Sugarcane White Leaf Disease by Nucleic Acid Probe

กาญจนา วาระวิชะนี วันเพ็ญ ศรีทองชัย ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

อ้อยเป็นพืชอุตสาหกรรมหลักอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่นำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งๆ มากกว่าหมื่นล้านบาท และในปัจจุบันอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล จากศักยภาพดังกล่าวจึงต้องมีการขยายพื้นที่ปลูกให้เพิ่มมากขึ้นซึ่งส่วนใหญ่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตไปมาก คือ ปัญหาของโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ ดังนั้นวิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด คือ การปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค ควบคู่กับการจัดการในแปลงผลิต ดังนั้น วิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำจึงสามารถตรวจการปนเปื้อนโรคโดยทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย คือ ยีนในส่วน *secA* gene โดยออกแบบไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ SecA-F & SecA-R และ SecAfor1 & SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 เบส และ 800 เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือน Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 เมื่อนำมาสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ พบว่า มีประสิทธิภาพการแสดงผลตรวจเทียบเท่ากับกรดนิวคลีอิกตัวตรวจในส่วนของ 16S rDNA ทั้งนี้~~ตาม~~การสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจจาก~~ยีน~~ *secA* gene ถือว่าเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้บูรณาการร่วมกันเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยทำให้ผลทดสอบที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-07-54

คำนำ

โรคใบขาวอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมามีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียขนาดเล็กที่สุด แต่ไม่มีผนังเซลล์ รูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 80-900 นาโนเมตร มีแมลงพาหะคือเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล สามารถพบเชื้ออยู่ในกลุ่มเซลล์ท่ออาหารของต้นอ้อย อ้อยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีใบสีขาว ต้นแคระแกร็น ใบแคบ เรียวเล็กกว่าปกติ แตกหน่อเร็ว หน่อที่แตกใหม่จะมีสีขาวมีลักษณะคล้ายกอตะไคร้ หากเป็นมากอ้อยจะตายภายใน 2-4 เดือน โรคใบขาวอ้อยสามารถติดไปได้กับท่อนพันธุ์ จึงเป็นปัญหาอย่างมากถ้าอ้อยมีอาการแฝงของโรคอยู่ หากเกษตรกรนำอ้อยที่มีอาการแฝงไปขยายพันธุ์จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอย่างกว้างขวางและรวดเร็วมากขึ้นหากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลช่วยถ่ายทอดโรคในสภาพแปลงปลูก ซึ่งในขณะนี้วิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด คือ การใช้ท่อนพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค จึงเป็นที่มาของวิจัยเพื่อพัฒนากรดนิวคลีอิกตัวตรวจโรคใบขาวในอ้อยขึ้น เรียกว่าเทคนิคนิวคลีอิกไฮบริไดเซชั่น (nucleic acid hybridization) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายได้ถึงระดับยีนโดยอาศัยหลักการจับคู่กันของลำดับเบสคู่สม โดยทั่วไปวิธีการนี้มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจจับกรดนิวคลีอิกของไฟโต~~ร~~พลาสมาถึงแม้ว่าเชื้อจะมีปริมาณน้อยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจก็มีประสิทธิภาพในการตรวจจับได้ดี เมื่อทำการผลิตกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ~~มา~~แล้วยังสามารถเก็บไว้ได้นานและสามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายเมื่อต้องการใช้งาน และที่สำคัญกรดนิวคลีอิกตัวตรวจนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อสาเหตุได้ถึงระดับสายพันธุ์ (พรทิพย์ และคณะ 2541) (Klinkong *et. al.*, 1993) แต่อย่างไรก็ตามก่อนการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นต้องหายีนที่เหมาะสมก่อนเพื่อให้สามารถตรวจจับเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างแม่นยำ จึงต้องทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะสูงกับเชื้อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วนำไปผลิตเป็นกรดนิวคลีอิกตัวตรวจที่มีความจำเพาะสูงเป็นลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาว
2. ตัวอย่างอ้อยปกติ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - โกร่งบดตัวอย่าง
    - กระติกสุญญากาศ
    - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
    - ตู้แช่แข็ง -20 ^{0}C
    - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
    - เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Centrifuge)
    - ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
    - เครื่อง Thermal cycler

- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - ไนโตรเจนเหลว
   - สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40)
   - เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen)
   - GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
   - Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
   - Ethanol
   - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
   - Agarose gel

วิธีการ

1.สำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างโรคอ้อยใบขาว จากแปลงปลูกอ้อย จ.กาญจนบุรี แล้วนำท่อนพันธุ์จากแปลงที่ไปสำรวจมาเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อต่อไป

2.ทดสอบหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย

2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย DNeasy Plant Mini Kit

ชั่งตัวอย่างใบพืชที่ทดสอบให้ได้น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วบ่มบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม AP3/E buffer ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย (volume) ทำการผสมเบา ๆ ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้วดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด DNeasy Mini column นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ให้ตะกอนดีเอ็นเอเกาะที่แผ่นเมมเบรนของ DNeasy Mini column และล้างด้วย AW buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย AE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB buffer (Doyle and Doyle, 1987)

ชั่งตัวอย่างใบพืชที่ทดสอบให้ได้น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ย้ายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน

30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanol (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ผึ่งตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene

ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยโดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **(ตารางที่ 1)** และมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 (http://simgene.com/Primer3) ออกแบบไพร์เมอร์ จำนวน 2 ชุด และคำนวณค่า Annealing Temperature (Tm °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html)

ตารางที่ 1 แสดงฐานข้อมูลเชื้อไฟโตพลาสมาจาก GenBank ที่เลือกสำหรับออกแบบไพร์เมอร์ จากส่วน *secA* gene แหล่งที่มา : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Name	Acronym	Accession No.	Group (base on 16S rRNA)
Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB	AYWB	CP000061	16SrI-A
Onion yellows phytoplasma OY-M DNA	OY-M	AP006628	16SrI-B
Mulberry dwarf phytoplasma strain MD-TA SecA (secA) gene	MD-TA	GU441574	16SrI-B
Himachal periwinkle phytoplasma partial secA gene	Himachal	FM991883	16SrI-B
Toona witches'-broom phytoplasma partial secA gene, isolate Himachal	Toona	FM991884	16SrI-B
Sesame phyllody phytoplasma (Thailand 16SrI) strain SEPL3 SecA (secA) gene, partial cds	SEPL3	JN977037	Thailand 16SrI
Paulownia witches'-broom phytoplasma strain YL07 SecA (secA) gene, complete cds	YL07	EU665493	16SrI-D
Palm lethal yellowing phytoplasma preprotein translocase subunit (secA) gene, complete cds	OY-W	EU267187	16SrIV-A
Jujube witches'-broom phytoplasma strain PY SecA (secA) gene, partial cds	JWBP	GU471766	16SrV (Elm yellows group)
Candidatus Phytoplasma mali strain AT complete chromosome	AT	CU469464	16SrX
Napier grass stunt phytoplasma SecA (secA) gene, partial cds	NPGS	EU168750	16SrXI (Rice yellow dwarf group).
Sugarcane white leaf phytoplasma isolate SCWL1SL secA (secA) gene, partial cds	NGSP-A	JF754450	16SrXI
Sugarcane white leaf phytoplasma strain KHO002 SecA gene, partial cds	SWL	JX987241	16SrXI
Sugarcane grassy shoot phytoplasma partial secA pseudogene	Ssgh	AM261834	16SrXl-B
Sugarcane grassy shoot phytoplasma partial secA gene for preprotein translocase secA subunit	Ssgh	AM261835	16SrXl-B
Sugarcane grassy shoot phytoplasma SecA (secA) gene, partial cds	Ssgh	DQ459440	16SrXl-B
Candidatus Phytoplasma pini strain PineBT	PineBT	JQ434465	16SrXXI; subgroup: 16SrXXI-A"

4. สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย และดีเอ็นเออ้อยปกติ ที่ได้สกัดด้วยวิธีการ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ 2 คู่ ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
- 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
- $MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- platinum Taqmix (Invitogen,0.5unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR ผสมกัน แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: Pre-denaturing	94°C	นาน 3 นาที
ขั้นที่ 2: Denaturing	94°C	นาน 1 นาที
ขั้นที่ 3: Annealing	53 - 55°C	นาน 1 นาที
ขั้นที่ 4: Elongation	72°C	นาน 1 นาที
*** ปฏิกิริยาซ้ำขั้นที่ 2 - 4 จำนวน 29 รอบ**		
ขั้นที่ 5: Final-elongation	72°C	นาน 10 นาที
ขั้นที่ 6: Hold	15°C	นาน 15 นาที

นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เตรียมในสารละลาย 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

5. การโคลนยีนและการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* gene

สารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่พร้อมรับ พลาสมิดลูกผสม (competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำพลาสมิดลูกผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์

DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989) หลังจากได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เพื่อยืนยันว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยจริง

6.การผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ที่จำเพาะต่อ *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด agarose gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ จากนั้นเติมสารละลาย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน spin down นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.2 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ซึ่งในขั้นนี้จะได้ DNA probe ที่ถูกติดฉลากด้วย DIG (digoxigenin) เรียบร้อยแล้ว เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค dot blot hybridization ต่อไป

7.การตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอตัวตรวจ โดยเปรียบเทียบกับการเจือจาง (series dilution) ความเข้มข้นของ DNA control **ตามตารางที่ 2** และเตรียมสารละลายดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} เท่า (10 fold dilution) จากนั้นหยดสารละลายดีเอ็นเอตัวตรวจ และ DNA control หยดละ 1 ไมโครลิตร ที่เตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ ไว้ลงบนแผ่น nylon membrane ตามแผนผัง **ตามตารางที่ 3**

ตารางที่ 2 การเจือจาง (series dilution) ความเข้มข้น DNA control

Tube	From tube (µl)	DNA control(µl)	DNA Dilution Buffer3 (µl)	Final Concentration
1	Original	1	0	1 ng/µl
2	1	2	198	10 pg/µl
3	2	15	35	3 pg/µl
4	2	5	45	1 pg/µl
5	3	5	45	0.3 pg/µl
6	4	5	45	0.1 pg/µl
7	5	5	45	0.03 pg/µl
8	6	5	45	0.01 pg/µl
9	0	0	50	0 pg/µl

ตารางที่ 3 ผังการหยดสารละลาย DNA probe และ DNA control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

DNA control	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
DNA probe	10 ng/µl	10 pg/µl	3 pg/µl	1 pg/µl	0.3 pg/µl	0.1 pg/µl	0.03 pg/µl	0.01 pg/µl	0 pg/µl

8. การตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค dot blot hybridization จาก ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ที่ผลิตได้

ตรวจด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) สำหรับทำ dot blot hybridization โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชมาหยดลงบนแผ่น nylon membrane ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วหยด 2X SSC Denature solution (0.125 X SSC, 0.125 M NaOH) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว ผึ่งให้แห้งหมาดๆ นำไปฉาย UV-transilluminator นาน 2 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นกับแผ่น nylon membrane ทำการ Prehybridize แผ่น membrane ด้วยสารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมไว้ โดยเขย่าเบา ๆ ในภาชนะที่ปิดฝาสนิท นาน 30 นาที นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ในขณะเดียวกันทำการเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือนนาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที และเติมในสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างแผ่น nylon membrane ด้วย washing solution I (2 X SSC ที่มี 0.1% SDS) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที และ washing solution II (0.5 X SSC ที่มี 0.1% SDS) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วย้ายแผ่น nylon membrane ในสารละลาย anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate ที่เจือจาง 1 : 5000 ใน buffer2 เติมสารละลายซับสเตรท BCTP/NBT ใน Alkaline phosphatase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บแผ่นเมมเบรนบ่มในที่มืดและนิ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สามารถอ่านผลจากของปฏิกิริยา hybridization จากความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

9. ทำการบันทึกข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2554-กันยายน 2555

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1.ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาว จากแปลงปลูกอ้อย จ.กาญจนบุรี **(ภาพที่ 1)** และนำมาสกัดดีเอ็นเอไว้ทดสอบในขั้นตอนสังเคราะห์ *secA* gene ด้วยเทคนิค PCR สำหรับตัวอย่างอ้อยปกตินำมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) ในส่วนท่อนพันธุ์ **(ภาพที่ 2)** จากแปลงที่สำรวจนำมาปลูกในกระถาง และเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อ และหลังจาก 2 สัปดาห์ ท่อนพันธุ์อ้อยเริ่มแตกใบใหม่ที่ยังคงแสดงลักษณะอาการใบขาวเช่นเดิม **(ภาพที่ 3)** และเนื่องมาจากพืชแสดงอาการโรคใบขาวรุนแรงส่งผลทำให้พืชไม่สามารถการสังเคราะห์แสงได้ตามปกติ จึงพบว่าใบอ้อยจะแห้งและตายในที่สุด ภายในระยะเวลา 2 เดือน

ภาพที่ 1 แสดงกออ้อยแตกใบใหม่เป็นสีขาว

อ้อยแตกใบยอดสีขาว และ
ขาวในลักษณะเดียวกัน

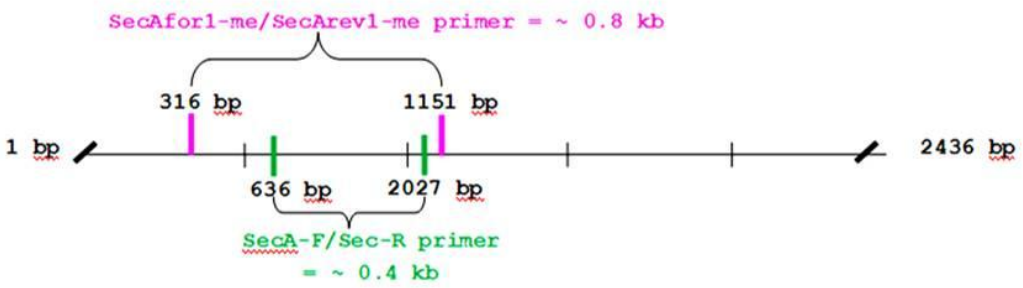
ภาพที่ 3 แสดงท่อนพันธุ์อ้อยเริ่มแตกใบใหม่ที่ยังคงแสดงลักษณะอาการใบขาวเช่นเดิม

2.ผลทดสอบหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยการวัดที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร เพื่อหาค่าความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่า วิธี CTAB buffer มีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย ประมาณ 50.35 ng/ul ส่วน DNeasy Plant Mini Kit ดีเอ็นเอที่สกัดจากมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ประมาณ 125.35 ng/ul ทั้งนี้ จากค่าความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของดีเอ็นเอ จึงเลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ DNeasy Plant Mini Kit อีกทั้งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอสะดวกรวดเร็วใช้เวลาในประมาณ 30 นาทีเท่านั้น ส่วนการสกัดดีเอ็นเอ CTAB buffer ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอยุ่งยากและใช้เวลาปฏิบัติงานถึง 2 วัน

3.ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนยีนที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank สำหรับนำมาออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในส่วน ***secA* gene** จำนวน 2 คู่ ไพร์เมอร์ คือ SecA-F/ SecA-R และ SecAfor1 / SecArev1 โดยแสดงตำแหน่งการออกแบบไพร์เมอร์ใน **ภาพที่ 4**



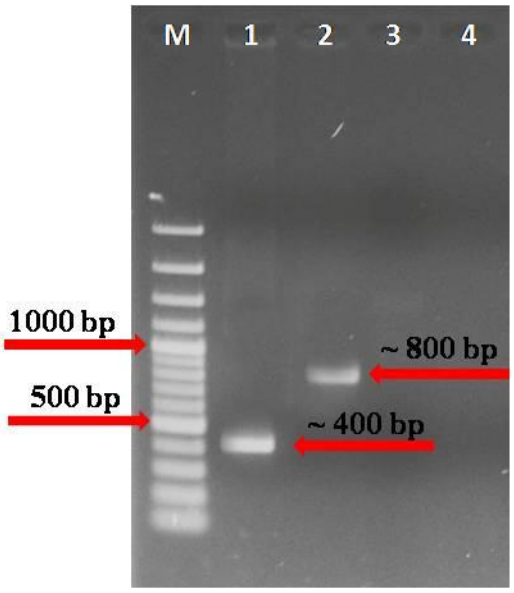
ภาพที่ 4 แสดงแผนภาพจำลองตำแหน่งการออกแบบไพร์เมอร์ส่วน *secA* gene ของ Palm lethal yellowing phytoplasma preprotein translocase subunit (secA), Accession No.EU267187

<u>หมายเหตุ</u> กำหนด Scale 2 cm เท่ากับ 0.5 kb

4. สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค PCR โดยไพร์เมอร์ ทั้ง 2 คู่ คือ SecA-F/ SecA-R และ SecAfor1 / SecArev1 ได้ออกแบบให้มีความจำเพาะกับ ***secA* gene** ของเชื้อไฟโตพลาสมา ผลการตรวจสอบพบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp จากคู่ไพร์เมอร์ SecA-F/ SecA-R และได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp จากคู่ไพร์

เมอร์ SecAfor1 / SecArev1 (ภาพที่ 5) ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและได้ขนาดเท่าหรือใกล้เคียงกับการออกแบบไพร์เมอร์ของทั้ง 2 คู่



ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยส่วน *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค PCR

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentus)
ช่อง 1 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp จากคู่ไพร์เมอร์ SecA-F/ SecA-R
ช่อง 2 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp จากคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1 / SecArev1
ช่อง 3 = ดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ (Negative control)
ช่อง 4 = น้ำ

5. การโคลนยีนและการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* gene

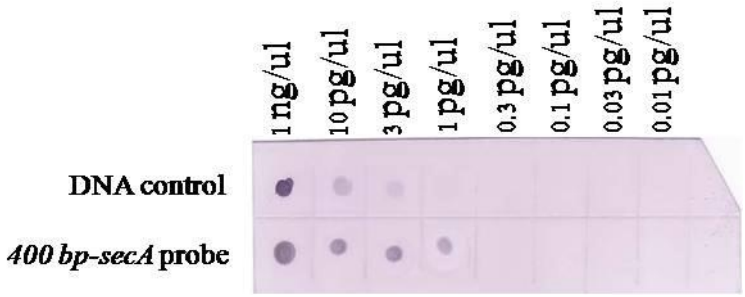
นำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 เบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไฟโตพลาสมา มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) กับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 637-800 bits และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 ดังนั้น คู่ไพร์เมอร์ SecAfor1 / SecArev1 ที่ออกแบบ สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน ***secA*** gene ได้ความยาวขนาด 836 เบส เมื่อนำมาแปลรหัสลำดับอะมิโนได้ 278 อะมิโน **(ภาพที่ 6)** เมื่อพิจารณาค่า expect value อยู่ในช่วง 6e-172 9e-112 ถึง 0.0 มีค่า score อยู่ในช่วง 328-805 bits ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่แสดงจาก GenBank ดังนั้น ค่าทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 836 เบสเป็นส่วน ***secA*** gene ของเชื้อโรคพืชในกลุ่มไฟโตพลาสมา >SecA Protein

EMKTGEGKTLTSVMPAYLNALSGESVHIVTVNEYLAQREAKGIISEIFIFLGLTVGLNIKEYNIEEKQKAY
NCDILYTTNSEIGFDYLRDNIEKKESNLLMKRDYNYVIIDEVDSVLIDEARTPLIISSYAKKEKKFYMDANR
FAKILKPHHYIIDLEANSIELTEEGIKKGENFFKIPNLYDSNNIVLLHCIKNALKAHFIMNKNKDYLVYKNN
VLIIDQFTGRTLEGRQFSDGLHQALEAKEGCIIKEETEIAATITYQNFFRIYKKISGMTGTAK

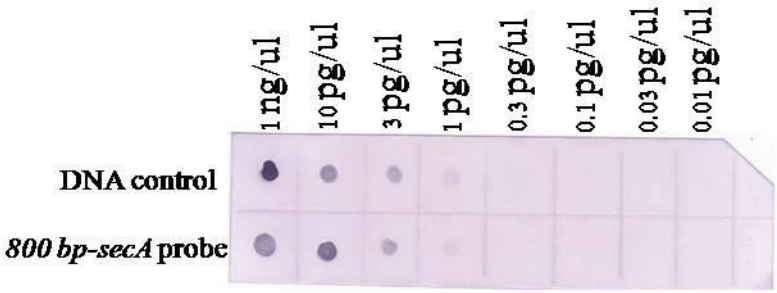
ภาพที่ 6 ลำดับลำดับอะมิโนเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย จำนวน 278 อะมิโน

6.ผลการตรวจสอบความเข้มข้นและประสิทธิภาพที่เหมาะสมของดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ที่ผลิตจาก PCR product ที่ขนาด 400 bp และ 800 bp จาก *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ng/ul โดยคำนวณจากความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผลิตที่ 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ เทียบกับความเข้มข้นของ DNA control 10 pg/ul และ 1 pg/ul ตามลำดับ (ภาพที่ 7 และภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 แสดงการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผลิตจาก secA gene ขนาด ~ 400 bp



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผลิตจาก secA gene ขนาด ~ 800 bp

7.การตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค dot blot hybridization จาก ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ที่ผลิตได้

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพที่ของดีเอ็นเอตัวตรวจ พบว่า ให้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นเกิดสีม่วงเกิดขึ้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ซึ่งไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าวในตัวอย่างดีเอ็นเอปกติ จากผลการทดลองพบความเข้มของสัญญาณไฮบริไดเซชั่นให้สีม่วงเข้มกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากก้านใบชัดที่สุด รองลงมาดีเอ็นเอที่สกัดจากกาบ และลำดับสุดท้ายตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบ **(ภาพที่ 9 และภาพที่ 10)** เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายพืชภายในท่ออาหาร (Lee *et al.*, 1993) ดังนั้น จึงพบสัญญาณดีเอ็นเอตัวตรวจเข้มกว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาจากส่วนอื่น และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพดีเอ็นเอตัวตรวจ *secA* gene กับดีเอ็นเอตัวตรวจ 16S rDNA พบว่าความเข้มของสัญญาณไฮบริไดเซชั่นที่ให้สีม่วงกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงจนไม่มีความแตกต่าง (ไม่ได้แสดงภาพ) ทั้งนี้ *secA* gene มีเพียง 1 ยีนในเซลล์ของเชื้อไฟโตรพลาสมาเท่านั้น (Kakizawa *et al.*, 2004) ดังนั้น การสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจจากยีน *secA* gene สามารถทำให้ผลทดสอบที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

ภาพที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ด้วยตัวตรวจที่ผลิตจาก secA gene ขนาด ~ 400 bp

ภาพที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ด้วยตัวตรวจที่ผลิตจาก secA gene ขนาด ~ 800 bp

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถนำมาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ 2 คู่ ในส่วน Sec A ไพร์เมอร์คู่ที่ 1 คือ SecA-F/ SecA-R ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 เบส และ ไพร์เมอร์คู่ที่ 2 คือ SecAfor1/SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 เบส และทำการโคลน Sec A ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนกับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 637-800 bits และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน ดังนั้น ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ นี้สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้เหมือนไพร์เมอร์ ในส่วน 16s ribosomal RNA คือ P1/P7 และ R16F2/R2 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 เบส และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพที่ของดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) *secA* gene พบว่า ให้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นเกิดสีม่วงเกิดขึ้นกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อย ซึ่งไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าวในตัวอย่างดีเอ็นเอปกติ จากผลการทดลองพบความเข้มของสัญญาณไฮบริไดเซชั่นให้สีม่วงเข้มกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากก้านใบชัดที่สุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับดีเอ็นเอตัวตรวจ 16S rDNA พบว่าความเข้มของสัญญาณไฮบริไดเซชั่นที่ให้สีม่วงกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อยได้ความเข้มข้นใกล้เคียงจนไม่มีความแตกต่าง ทั้งนี้ ตามการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจจาก *secA* gene ถือว่าเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้บูรณาการร่วมกันเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยทำให้ผลทดสอบที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร สมคิด บุญครอง และชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไร่โดยวิธี DNA probe. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติครั้งที่ 3, หน้า 50-61. กรุงเทพฯ. สมาคมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติร่วมกับสำนักคณะ กรรมการอ้อยและน้ำตาล.

Doyle, JJ. and JL. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaftissue. Phytochemical Bulletin for the Botany Society of America. 19: 11–15.

Kakizawa, S., Oshima, K., Nighigawa, H., Jung H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellow phytoplasma through the Sec protein-translocation system in Escherichaia coli. Microbiology. 150: 135-142.

Klinkong, S. and E. Seemuller, 1993. Detection and differentiation of the mycoplasmalike organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA probe. Kasetsart J.27 : 98-103.

Lee, I M., R.W. Hammond, R.E.Davis and D.E. Gunderson. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16 SrDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology 83 : 834-842.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manistis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.