การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า

Development of a Immuno-Strip for the Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Kale

รุ่งนภา ทองเครง ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ผลิตได้ โดยใช้ membrane protein complex เป็นสิ่งกระตุ้น (antigen) ในการผลิตแอนติบอดีนั้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด คือ 128,000 เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เมื่อทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังนั้น โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno Strip ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้าได้

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-01-60

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 ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ที่ตกค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน 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 ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและ

การให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

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 ดังนั้น หากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งมาติดกับ 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 จากนั้น นำมาติกฉลากด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ทดสอบอัตราที่ใช้กับชนิดของ membrane ขั้นตอนสุดท้ายประกอบเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับพืช ใช้เวลาในการตรวจ ประมาณ 5 นาที และชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

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. เตรียมแอนติเจนจาก Membrane protein complex (MPC) บริสุทธิ์ของเชื้อ*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร) สกัดโปรตีนส่วนที่เรียกว่า Membrane protein complex (MPC) โดยวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) และปรับความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

นำกระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum; Ns) แล้วฉีดกระตุ้นด้วย MPC ผสม Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ในสัปดาห์ที่สอง ในครั้งต่อๆ ไปผสม MPC กับ Incomplete Freund's Adjuvant แทน ด้วยวิธีการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาตร 500 ไมโครกรัมต่อครั้ง เก็บเลือดกระต่ายที่ใบหูในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป นำแอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บใส่ขวด เติม NaN_3 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.ทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

3.1 ตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ดัดแปลงวิธีของ รัชนี (2549)

3.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้า ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร 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

3.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xcc 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 ตามวิธี

ข้อ 6.3.1 โดยมีตัวควบคุม (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เตรียมแอนติเจนจาก Membrane protein complex (MPC) บริสุทธิ์ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

ได้เอนติเจนจาก Membrane protein complex (MPC) บริสุทธิ์ของเชื้อ XCC ที่ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

2. ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

ฉีดกระตุ้นด้วย MPC ผสม Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ในสัปดาห์ที่สอง ในครั้งต่อๆ ไปผสม MPC กับ Incomplete Freund's Adjuvant แทน ด้วยวิธีการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาตร 500 ไมโครกรัมต่อครั้ง เก็บเลือดกระต่ายที่ใบหูในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป

3.ทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc

3.1 ตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

จากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc สามารถเก็บเลือดจากกระต่ายได้ 7 ครั้ง เมื่อนำมาตรวจค่าไตเตอร์ พบว่า มีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000 - 128,000 โดยแอนติซีรัมที่เจาะในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีค่าเพียง 1:1,000 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2 ครั้งแรก เป็น 1:64,000 ครั้งที่ 5 และครั้งที่ 6 มีค่า 1:128,000 ในขณะที่การเจาะในครั้งที่ 7 มีค่าไตเตอร์เริ่มลดลงมีค่า 1:64,000 ดังนั้น จึงเลือกใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 5 และครั้งที่ 6 สำหรับเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อไป

3.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีกับเชื้อแบคทีเรีย *Xcc, X. axonopodis* pv. *citri, X. axonopodis* pv. *glycines, X. axonopodis* pv. *dieffenbachia, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้า ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยาต่อชื้อ Xcc แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri, X. axonopodis* pv. *glycines, X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae, X. oryzae* pv.

oryzae, Erwinia carotovora subsp. *carotovora* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้า ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน แสดงว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ Xcc

3.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ผลการทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจเชื้อ Xcc ได้ในปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ผลิตได้ โดยใช้ membrane protein complex เมื่อทดสอบประสิทธิภาพแล้วพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด คือ 128,000 มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* และมีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังนั้น โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno Strip ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้าได้

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.