การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*

Development of Lateral flow test strip for *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* detection

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ ทัศนาพร ทัศคร
รุ่งนภา ทองเครั่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip ถูกพัฒนาเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow test บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM) โดยการเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของแอนติซีรั่มของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) การเตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช้ปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15 – 18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ผลการทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบ พบว่า membrane S&S AE 99 และ membrane S&S AE 100 ให้ผลการทดสอบในการทำtest line ได้ดีมาก และดี ตามลำดับ ทำชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip โดยทำเส้น control line ด้วย GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) และ test line ด้วย IgG ของ แบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนรแผ่น membrane S&S AE 99 เมื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบแล้ว ทำการทดสอบกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า ชุดตวจสอบ Lateral flow test strip สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้อย่างรวดเร็ว โดยเส้น control line และ test line ปรากฏสี ในเวลาประมาณ 5 นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพของความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* พบว่า สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ในปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-05-54

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ไทยครองสัดส่วนการส่งออกกล้วยไม้อันดับหนึ่งของโลก สำหรับมูลค่าการค้ากล้วยไม้ของโลกปี พ.ศ. 2550 สูงกว่า 155 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (คิดเป็นมูลค่าประมาณ 5,337 ล้านบาท) โดยไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้อันดับหนึ่งของโลก โดยเฉพาะกล้วยไม้เมืองร้อน และในปี พ.ศ. 2550 ไทยมีสัดส่วนส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกสูงถึงร้อยละ 70 ของตลาดโลก รองลงมาได้แก่ สิงคโปร์ นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ และออสเตรเลียเป็นต้น แต่การผลิตกล้วยไม้ประสบปัญหาการระบาดของศัตรูพืช นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ชนิดใหม่ๆขึ้นมาที่อ่อนแอต่อศัตรูพืช ทำให้แต่การผลิตกล้วยไม้ประสบปัญหามากขึ้น โดยเฉพาะโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย แต่เดิมพบเป็นเพียงเล็กน้อย แต่ในปัจจุบันพบปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียระบาดอย่างมาก และด้วยสภาพภูมิอากาศปัจจุบัน ภาวะโลกร้อนได้ส่งผลกระทบโดยทางตรงและทางอ้อมต่อ สภาพแวดล้อมและ มนุษย์ และ สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยเฉพาะจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ทำมีการปรับสภาพให้มีกิจกรรมต่างๆเปลี่ยนแปลงไป จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชในเขตร้อน ที่มีการปรับตัวให้รุนแรงขึ้น สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยเพิ่มมากขึ้น โรคแบคทีเรียของกล้วยไม้ที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ โรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas gladioli)* (Chuenchitt *et al.,*1983; สุเนตรา และสิริลักษณ์, 2532; ปิยะรัตน์ และจงวัฒนา, 2551) โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae (Pseudomonas cattleyae)* (นิยมรัฐ, 2547; ปิยะรัตน์ และจงวัฒนา, 2551) และโรคเน่าและ (soft rot) เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora subsp. Carotovora* (นิยมรัฐ, 2538; ปิยะรัตน์ และจงวัฒนา, 2551) แต่โรคที่พบระบาดมากในแปลงปลูกในปัจจุบันได้แก่ โรคเน่าสีน้ำตาลและโรคใบจุด ซึ่ง Chuenchitt *et al.* (1983) ได้รายงานการพบการระบาดของโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ตระกูลหวายที่เกิดจากแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ในเขตหนองแขม กรุงเทพฯ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้ขนาดใหญ่ของประเทศไทย โดยทำความเสียหายถึงร้อยละ 50 ของกล้วยไม้ที่ปลูก ดังนั้นการที่สามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วทำให้สามารถป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียได้อย่างทันต่อสถานการณ์ ทำให้สามารถเก็บดอกจำหน่าย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* ชุดตรวจสอบนี้สมารถนำไปใช้ในการตรวจสอบในแปลงปลูกและรู้ผลการตรวจภายในเวลา 5-10 นาที ทำให้เกษตรกรสามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

การเตรียมแอนติเจน (Antigen)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลล์แบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายในPBSจากนั้นนำไปทำการ fix เซลล์แบคทีเรีย ด้วย 2% glutaraldehyde (Allan and Kelman, 1977) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ dialysis ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

การผลิตแอนติซีรัม

ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลล์ด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว โดยก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรัม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ แล้วกรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บแช่แข็งไว้

ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม

โดยนำแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้ง มาทำให้เจือจางจนถึง 1: 10^6 และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทคนิค วิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton et al, 1990)

ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี Lateral flow test strip

การสกัด Immunoglobulin (IgG) ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* นำแอนติซีรั่มที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton el al,1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรั่มผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็น ค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรั่ม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อย ๆ ละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) เติม 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ 1.02 มิลลิลิตรของ saturated ammonium sulfate ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ PBS นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20°C

การทดสอบคุณภาพ IgG โดยนำ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจแบคทีเรีย pv. *gladioli* pv. *gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^{8} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *el al*,1990 โดยใช้ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่เจือจาง 1: 500

การติดฉลาก IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ด้วยอนุภาคทอง เตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร นำ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนนาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมและการทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*

ทำการทดสอบ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของIgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* บนเส้น test line โดยทดสอบกับ membrane 4 ชนิด ได้แก่

1) membrane S&S AE 100 ขนาด 12 ไมโครเมตร
2) membrane S&S AE 99 ขนาด 8 ไมโครเมตร
3) membrane Millipore HC 100 ขนาด 10 ไมโครเมตร
4) membrane Immunopore FP 100 ขนาด 5 ไมโครเมตร

นำแผ่น membrane ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายด้วยดินสอที่ด้านบนของแผ่น เป็นตำแหน่ง control line ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น membrane 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจาก control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง แตะปากกาลงและลากเส้นจากซ้ายไปทางขวาช้า ๆ จนสุดปลาย membrane ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น membrane มีขนาดเท่า ๆ กันทั้งเส้น ใช้ปากกาด้ามใหม่ (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มซับ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip

- วางmembrane ที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่พลาสติกกาวรองพื้น (plastic backing polymer) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร
- วางแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ของแบคทีเรีย pv. *gladioli* pv. *gladioli* ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ให้เกยทับ membrane ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร
- วางแผ่นรับตัวอย่าง (Sample application pad) เกยแผ่น CRP 1-2 มิลลิเมตร
- วางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับแผ่น NCM 1-2 มิลลิเมตร
- ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นให้มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร
- บรรจุชุดตรวจสอบลงตลับพลาสติก นำไปทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- เก็บ Lateral flow test strip ไว้ในถุงอลูมินั่มฟอล์ย และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง
- ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* นำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยาบน membrane ทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกัน

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของชุดเตรียมสอบ

ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ทดสอบกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในกล้วยไม้ โดยนำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกริยากับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่แยกได้จากกล้วยไม้ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่สามารถเกิดโรคกับกล้วยไม้ได้ ได้แก่ *Erwinia carotovora , E. chrysanthemi, Acidivorax avenae pv. cattaryae* เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* นำสารแขวนลอยแบคทีเรียต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยา ถ้าปฏิกริยาเป็นบวกจะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากปฏิกริยาเป็นลบจะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*

โดยนำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* pv. *gladioli* ที่ระดับความเข้มข้น 10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจผลของการเกิดปฏิกริยา ในกรณีตัวอย่างที่ตรวจสอบมีแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* จะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากไม่มีแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* จะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่ม

การผลิตแอนติเซรั่ม ของแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* เพื่อใช้ผลิตชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip โดยการแยกสกัดโปรตีน Membrane protein complex บริสุทธิ์จากผนังเซลแบคทีเรีย*B. gladioli* pv. *gladioli* โดยวิธี Li CL_2 extraction เพื่อใช้เป็นแอนติเจน นำแอนติเจนบริสุทธิ์พร้อมที่จะฉีดกระต่าย ฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัม โดยฉีดกระต่ายจำนวน 4 ครั้ง เจาะเลือดกระต่ายทุกอาทิตย์ จำนวน 4 ครั้ง นำเลือดกระต่ายมาแยกเอาแอนติซีรั่มโดยแยกเฉพาะน้ำเหลืองทิ้งเม็ดเลือดแดง ได้แอนติซีรั่มจำนวน 30 ml นำแอนติซีรั่มมาทดสอบประสิทธิภาพโดยนำมาทำให้เจือจางจนถึง 1: 10^6 และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทคนิค DIBA ได้ค่า titer คือ 1: 25,000 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่ม ได้ความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มที่มีต่อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ 10^4 cfu/ml สกัด IgG จากแอนติซีรั่มเพื่อใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ

ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี Lateral flow test strip

การสกัด Immunoglobulin (IgG) จากแอนติซีรั่มต่อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* และทดสอบคุณภาพ

จากการสกัด IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ IgG ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ OD 6.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร นำ IgG ที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบคุณภาพของ IgG ที่ความเข้มข้น 1:10, 1:100, 1:500, 1:1,000 และ 1:5,000 ในการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยวิธี DIBA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* และมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี DIBA คือ 1:500

การติดฉลาก IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ด้วยอนุภาคทอง,การเตรียมแผ่น Conjugated release pad (CRP), การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมและการทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*

นำ IgG ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ได้เป็น IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold conjugated IgG or gold particle labeled IgG) ทำการเตรียมแผ่น CRP โดยใช้พู่กันจุ่มและป้ายลงบนแผ่น CRP ปริมาณ 100 – 120 ไมโครลิตร/แผ่น (15 – 18 เซนติเมตร) แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินั่มฟอล์ย เก็บไว้ในที่แห้ง จากนั้นทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมสำหรับใช้ประกอบชุดตรวจสอบ ได้นำแผ่น membrane ทั้ง 4 ชนิด มาทำเส้น test line และ control line แล้วประกอบเป็นชุดตรวจสอบโดยนำแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง และแผ่น membrane ที่ได้ลากเส้น test line และ control line ประกอบลงบนแผ่น backing โดยประกอบร่วมกับแผ่น SAP และแผ่น wick ผลการทดสอบพบว่า membrane S&S AE 99 ให้ผลดีที่สุด รองลงมา คือ membrane S&S AE 100 โดยให้ปฏิกิริยาของเส้น test line ที่ดีมาก และดี ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของชุดเตรียมสอบ

ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ และทดสอบกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในกล้วยไม้ ผลการทดสอบพบว่า ชุดตรวจสอบ เป็นผลบวกเฉพาะกับแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* แต่ชุดตรวจสอบที่ผลิตได้ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบกับ *Erwinia carotovora , E. chrysanthemi, Acidivorax avenae pv. cattaryae* และ

ชุดตรวจสอบที่ผลิตได้ ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวกกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง แต่ชุดตรวจสอบที่ผลิตได้ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea sp.*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ลักษณะ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยวิธีการ indirect ELISA แสดงว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเมื่อนำมาตรวจกับตัวอย่างกล้วยไม้จึงมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae*

ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*

จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวของชุดตรวจสอบในการตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ พบว่าชุดตรวจสอบสามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยปรากฏแถบสีม่วงทั้ง control line และ test line ในตลับที่หยดด้วยสารแขวนลอยความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรภายใน 5 นาที ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเป็นบวก ในขณะที่ตลับที่หยดด้วยสารแขวนลอยความเข้มข้นตั้งแต่ 10 -10^3 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร เกิดปฏิกิริยาเป็นลบ โดยปรากฏแถบสีม่วงเฉพาะ control line เท่านั้น ชุดตรวจสอบไม่สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร แสดงว่าชุดตรวจสอบมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในน้ำคั้นใบกล้วยไม้ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นต้นไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ ในครั้งนี้ สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ จากตัวอย่างน้ำคั้นในกล้วยไม้ ที่ความเข้มข้น 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร เป็นต้นไป โดย test line และ control line ปรากฏแถบสีม่วงภายในระยะเวลาประมาณ 5 นาที ดังนั้นเทคนิค Gold labeled IgG flow test นี้ สามารถนำมาปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ เพื่อให้นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าของกล้วยไม้ ที่เกิดจากแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ด้วยตนเอง รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในตรวจสอบต้นพันธุ์ในกล้วยไม้ ก่อนปลูกเพื่อลดการระบาดของโรค การนำไปใช้เป็นเครื่องมือในผลิตหัวพันธุ์ปลอดโรคและสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบรับรองในงานกักกันพืชด้วย

เอกสารอ้างอิง

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 50 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2547. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด.หน้า 47-74. ใน เอกสารวิชาการกล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

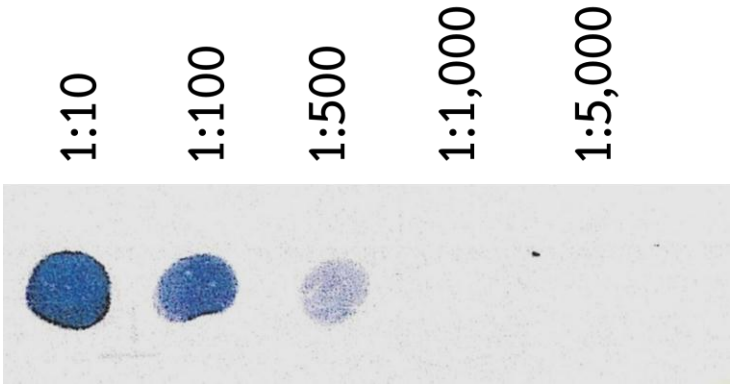
ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สุเนตรา ภาวิจิตร สุทธิพงษ์ ญาณวารี และ ศิริลักษณ์ โล่สวัสดิ์. 2532. การศึกษาสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลหวายทางเคมีและฟิสิกส์. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 30-40.

อนุพันธ์ อิฐรัตน์ .2542. ภัยเงียบจากคลอรีน. เอกสารประกอบการบรรยาย ณ ห้องประชุมกำธร สุวรรณกิจ กรมอนามัย.

Chandrkrachang, S.2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand, in: K. Suchiva, S. Chandrkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (Eds.), Advances in Chitin Science, vol. 5:458-462.

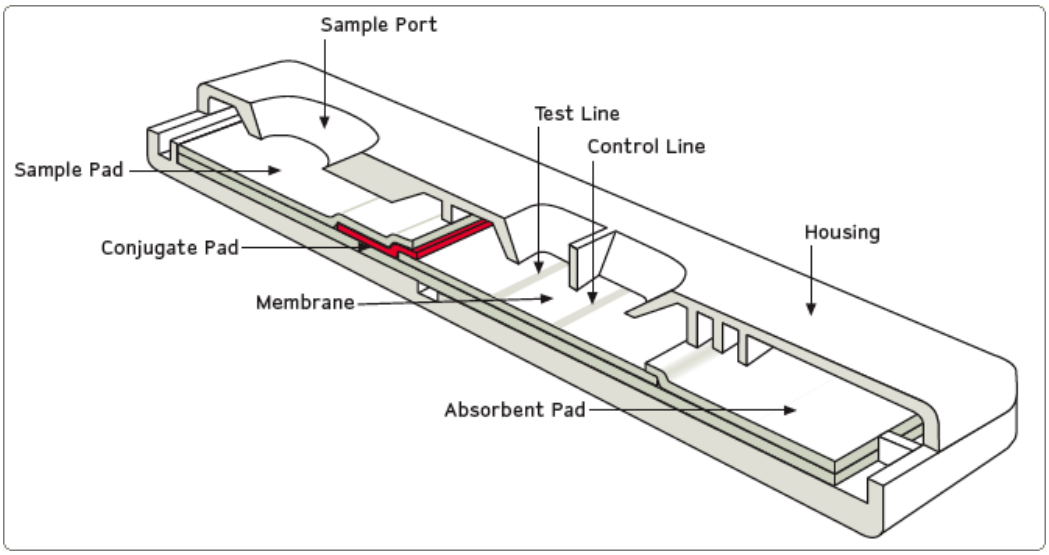
Chuenchitt, S. 1982. A new bacterial disease on orchids Dendrobium sp. caused by Pseudomonas gladioli. Kasetsart J. (Sci) 17 : 27-32.



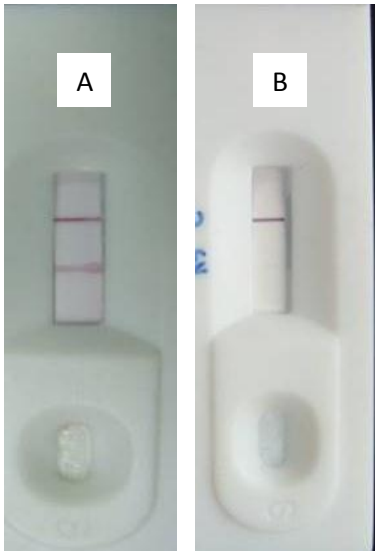
ภาพที่ 1 การทดสอบคุณภาพ IgG ของแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *Gladioli* โดยวิธี Dot-Immunobinding assay (DIBA)

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของชนิดของ membrane ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตชุดตรวจสอบ producing Lateral flow test strip

IgG	S&S AE 100 size 12 um	S&S AE 99 size 8 um	Millipore HC 100 size 10 um	Immunopore FP size 5 um
IgG RS (test line)	Good	Excellent	Fair	Fair
IgG GAR (control line)	Good	Excellent	Fair	Fair



ภาพที่ 2 แผนภาพแผนภาพองค์ประกอบของชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip composition



A : Positive reaction; purple color stripe in both test line and control line

B : Negative reaction; purple color stripe in only control line

ภาพที่ 4 The result of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* detection on Orchid by Lateral flow test strip