

การพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย
***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำคะน้า**
Development of Immuno Strip for Detection of *Xanthomonas campestris* pv.
***campestris* the Causative Agent of Black Rot of Chinese Kale**

รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} บุรณี พัววงศ์แพทย์^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} กาญจนา ศรีไม้^{1/}
Rungnapha Thongkeng^{1/} Nuttima Kositchareonkul^{1/} Buranee Puawongphat^{1/}
Tippawan Kanhayate^{1/} Kanchana Srimai^{1/}

Received 1 Aug. 2022/Revised 7 Oct. 2022 /Accepted 11 Oct. 2022

ABSTRACT

The immuno strip test kit for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), the causal agent of Chinese kale black rot disease, was developed to obtain convenient, rapid, highly efficient and accurate diagnostic tool for field application using serology and lateral flow technique. The polyclonal antibody specific to Xcc was produced by injecting purified membrane protein complex (MPC) into rabbit. The highest antibody titer of 1:128,000 was selected and then precipitated in saturated ammonium sulfate solution to produce pure immunoglobulin (IgG). IgG was subsequently labelled with Colloidal Gold (O.D. 0.5 at 540 nanometer) and respectively drawn on conjugated release pad. Goat anti rabbit (GAR) was used for the control line and the prepared IgG-Xcc was used for the test line on S&S-AE 99 nitrocellulose membrane. The test kit was then assembled and tested. Results showed that the immuno strip test kit developed was specific to Xcc the causative agent of black rot of Chinese kale. The sensitivity of the test kit was 10^4 cfu/ml, which was able to detect Xcc in 1:2,000 dilution plant sap within 10-15 mins.

Keywords: immuno strip, black rot disease, serology

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Pathology research group, Plant Protection and Development Office, Department of Agriculture, 50 Paholyothin Rd. Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author: rung_ppath65@hotmail.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป สำหรับตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา ร่วมกับเทคนิค lateral flow assay เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีความแม่นยำ รวดเร็ว เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปสามารถนำไปใช้งานในภาคสนามได้จริงอย่างมีประสิทธิภาพ โดยนำโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ Membrane protein complex เป็นแอนติเจนในการฉีดกระต่าย เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc ผลการทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้พบว่า มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปได้ จึงเลือกใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีค่าไตเตอร์สูงสุด คือ 1:128,000 ในการเตรียมอิมมูโนโกลบูลินให้บริสุทธิ์ (IgG-Xcc) โดยวิธีการตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว จากนั้นนำไปติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร สำหรับใช้ทาบน conjugate release pad (nitrocellulose membrane ชนิด S&S-AE 99) เพื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบ ในการทำ control line ใช้ goat anti IgG และใช้ IgG-Xcc ในการทำ test line ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปพบว่ามีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า มีความไวในการตรวจแบคทีเรียได้ปริมาณต่ำสุดที่ 1×10^4 หน่วยโคโลนี/มล. และสามารถตรวจน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1: 2,000 ได้ ซึ่งแสดงผลการเกิดปฏิกิริยาภายในเวลา 10-15 นาที

คำสำคัญ : อิมมูโนสตริป, โรคเน่าดำ, เซรุ่มวิทยา

บทนำ

โรคเน่าดำ (black rot disease) หรือโรคขอบใบทองมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) เป็นโรคที่พบบ่อยทั่วไปและเป็นปัญหาสำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น บล็อกโคลี กะหล่ำดาว กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า กะหล่ำปม มัสตาร์ด เป็นต้น (Williams, 1980) พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคที่ส่วนใบก่อน โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบลามถึงเส้นกลางใบเป็นรูปตัววี เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลเข้ม ใบจะแห้งเหี่ยวและร่วงจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบส่วนท่อน้ำ (xylem) เน่ามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่จะเกิดอาการเน่าดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย บางครั้งจะพบลักษณะอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น คะน้า จะพบแผลจุดขนาดเล็กและขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ถ้าความชื้นสูงจะพบลักษณะฉ่ำน้ำรอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเชื่อมติดกันทำให้เกิดอาการไหม้ เนื้อใบที่เป็นแผลจะขาดทะลุเป็นรู สาเหตุสำคัญของการแพร่ระบาดของโรคนี้ ได้แก่ การที่เชื้อสาเหตุติดไปกับเมล็ดพันธุ์ หรือติดอยู่กับเศษซากพืชในแปลงหลังเก็บผลผลิต หรืออยู่ในพืชอาศัยชนิดอื่นที่ตกค้างอยู่ในแปลง โรคนี้สามารถแพร่กระจายโดยฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อจะเข้าสู่พืชทางระบบราก ทางปากใบ (stomata) ช่องเปิดบริเวณปลายใบ (hydathodes) ทางบาดแผลที่แมลงกัดกินหรือแผลที่เกิดจากการขีดข่วน การระบาดของโรคจะรุนแรงเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Williams, 1980)

การตรวจสอบเชื้อสาเหตุในเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าก่อนปลูก โดยทั่วไปจะใช้วิธีการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ และการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA ซึ่งทั้ง 2 วิธี จะใช้เวลาค่อนข้างนานเพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการตรวจ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจให้มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพ ซึ่งควรเป็นวิธีการตรวจที่ง่าย

ทราบผลได้รวดเร็ว ผู้ตรวจไม่จำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญ งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำในคะน้าด้วยเทคนิค lateral flow immunoassay เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจคัดกรองเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าในภาคสนามให้ปราศจากเชื้อสาเหตุโรคก่อนนำไปเพาะปลูกซึ่งเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) ต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris*

นำแบคทีเรีย Xcc สายพันธุ์ 266 ที่แยกได้จากต้นคะน้าที่แสดงอาการโรคเน่าดำในพื้นที่ปลูกอบางกรวย จ.นนทบุรี และได้เก็บรักษาไว้ที่ศูนย์เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดลองนี้ สำหรับเตรียมแอนติเจนเพื่อผลิต PAb ได้เตรียมแอนติเจนในรูปของ membrane protein complex (MPC) ดัดแปลงจากวิธีของ Yakus and Schaad (1979) จากนั้นส่งให้ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อผลิต PAb ตามโปรแกรม โดยใช้กระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กก. เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นแอนติซีรัมปกติ (normal serum; Ns) แล้วฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วย MPC ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม ผสมกับ Complete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1 ด้วยวิธีการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ในสัปดาห์ที่สองและทำการฉีดครั้งที่สองกระตุ้นเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection) อีก 2 ครั้ง แบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ โดยผสม MPC ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตรา 1:1

เก็บเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดที่ใบหูตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป โดยเจาะเลือดสัปดาห์เว้นสัปดาห์ จำนวน 8 ครั้ง จากนั้นนำเลือดกระต่ายที่เจาะได้มาแยกเก็บเฉพาะส่วนของแอนติซีรัมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °ซ. ตามวิธีการเก็บรักษาแอนติบอดีของ รัชนี (2558)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ PAb ต่อเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris*

2.1 การตรวจค่าไคเตอร์ของ PAb

ใช้วิธี indirect ELISA โดยนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย Xcc ที่มีค่า O.D. (Optical Density) ที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 (1.6×10^8 หน่วยโคโลนี/มล.) มาเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมีตัวควบคุมลบ (negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS pH 7.4 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วย PBST (NaCl 8.0 ก., $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 ก., KH_2PO_4 0.2 ก., KCl 0.2 ก. ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. +0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชม. จากนั้นเติม PAb ที่เจือจางแบบ 2 เท่า (two fold serial dilutions) ใน 1x PBS เริ่มจากความเข้มข้น 1: 1,000 จนถึง 1: 128,000 โดยมีตัวควบคุมลบคือ normal serum เจือจาง 1: 1,000 ใน 1x PBS นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชม. เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphate (GAR-AP) (Sigma-Aldrich, USA) ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1: 1,000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชม. ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยา โดยการเติม p-nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer ความเข้มข้น 1 มก./มล. หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืด

ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าว วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiscan EX, Lab system, Finland) ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 นาโนเมตร

2.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ PAb

เตรียมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Pantoea* sp., Xcc และ แบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้าที่มีลักษณะโคลีนีแตกต่างกัน นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์มาเจือจางด้วย 1x PBS ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคลีนี/มล. แล้วนำไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยมีหลุมที่เคลือบด้วย 1xPBS เป็นตัวควบคุมลบ และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1,000

2.3 การทดสอบความไว (sensitivity) ของ PAb

เตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย Xcc ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 หน่วยโคลีนี/มล. แล้วเจือจางเซลล์แบคทีเรียใน 1x PBS ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคลีนี/มล. นำไปเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับ PAb ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีในข้อ 2.1 โดยมีตัวควบคุมลบ เช่นเดียวกับข้อ 2.2

3. การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PAb ต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* กับ แอนติบอดีทางการค้า (LOEWE®, China)

3.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

ทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยมีตัวควบคุมลบ เช่นเดียวกับข้อ 2.2

3.2 การทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดี

ทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีในข้อ 2.3 โดยมีตัวควบคุมลบ เช่นเดียวกับข้อ 2.3

4. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

เลือกใช้แอนติซีรัที่มีค่าไอเตอร์สูงที่สุดมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยนำแอนติซีรั 1 มล. มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มล. ในบีกเกอร์กวนด้วยแท่งแม่เหล็กช้า ๆ เติมสารละลาย saturated ammonium sulfate 10 มล. ที่ลดหยดขณะที่กวน แล้วบ่มไว้ เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้ ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มล. แล้วนำไปไดอะไลซ์ (dialyse) ใน 0.5x PBS นาน 12 ชม. โดยเปลี่ยน 0.5xPBS ทุก 4 ชม. จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin; IgG) ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้น IgG จากสูตร $O.D.280 \text{ nm}/1.4 = \text{มก. IgG/มล.}$ (ค่า Absorbance coefficient ของ IgG ของกระต่ายเท่ากับ 1.4)

4.1 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

นำ IgG ที่ปรับความเข้มข้นให้มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. แล้วเจือจางด้วย TBS ให้มีความเข้มข้น 1:500 สำหรับใช้ในการทดสอบเตรียมตัวอย่างพืชโดยบดตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรคใบเน่าดำด้วย Tris-saline buffer (TBS : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบคะน้าปกติเช่นเดียวกันเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบ และเตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย Xcc ความเข้มข้น

10⁸ หน่วยโคโลนี/มล. นำน้ำคั้นพืชและเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) แยกกันแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง แล้วนำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (2% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นย้ายแผ่น NCM ไปแช่สารละลาย IgG ที่เตรียมไว้ เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น NCM มาแช่ใน GAR-AP ที่เจือจาง 1:10,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 5-Bromo-4-chloroindoyl phosphate (BCIP) หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

5. การพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริป

5.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารละลายอนุภาคทอง (gold conjugated IgG)

เติม IgG ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในสารละลายอนุภาคทอง (colloidal gold) ที่มีอนุภาคขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 10 มล. กวนด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 45 นาที เติม 10% bovine serum albumin กวนต่ออีก 45 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20% เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 °ซ.

5.2 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการป้ายลงบน conjugate release pad (CRP)

นำ gold conjugated IgG ที่เตรียมได้จาก ข้อ 5.1 มาเจือจางใน gold diluted buffer แบบ 2 เท่า อีกสองระดับการเจือจาง คือ 1:2 และ 1:4

5.3 การเตรียมแผ่น CRP

นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) มาตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.8-1.0 ซม. ยาวประมาณ 15-18 ซม. (ขึ้นกับขนาดของ backing pad ที่เลือกใช้) ใช้ฟู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ที่เตรียมป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 ซม. (อัตรา 5 ไมโครลิตร/ซม.) นำไปอบแห้งที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชม.

5.4 การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่น NCM (วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 pore size 8.0 ไมโครโมลาร์) ขนาดความกว้าง 2.5 ซม. นำมาตัดให้มีมีความยาว 18 ซม. ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 ซม. และเส้น test line อยู่ต่ำลงมาจากเส้น control line 0.5 ซม. ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มล.) จุ่ม goat anti IgG (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง ต่ปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเบา ๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มล.) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร/แผ่น ทำเส้น test line โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการทำเส้น control line นำไปอบแห้ง 2 ชม. ที่ 37 °ซ.

5.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกวางรองพื้น (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 ซม. วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่น NCM ประมาณ 1-2 มม. วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่าง น้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มม.

และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มม. (Figure 1) ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นให้มีความกว้างเท่ากับ 0.4 ซม. เก็บในซองอลูมิเนียมฟอยด์ที่มีสารดูดความชื้นซีลปิดของให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้น

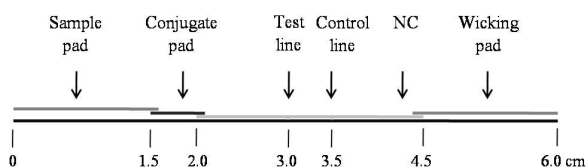


Figure 1 Assembly diagram of the Immuno Strip

5.6 วิธี การใช้ชุดตรวจสอบและการอ่านผลของปฏิกิริยา

บดตัวอย่างค่น้ำในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) อัตราส่วน 1 ก. /10 มล. คั้นค่น้ำจากตัวอย่างพืชที่บดไว้ในหลอด 1.5 มล. ปริมาตร 1 มล. แล้วจุ่มชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่เตรียมไว้ลงไป โดยจุ่มทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที แล้วอ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปจะแสดงผลของปฏิกิริยาบวกลบเป็นสีม่วงเข้มทั้งบน test line และ control line และจะแสดงผลปฏิกิริยาลบเป็นสีม่วงเข้มเฉพาะบน control line เท่านั้น

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

นำตัวอย่างค่น้ำที่แสดงอาการเน่าดำจากแปลงปลูกของเกษตรกร และตัวอย่างค่น้ำที่แสดงอาการเน่าดำ ที่ได้จากการปลูกเชื้อมาล้างทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำไหลผ่าน แบ่งตัวอย่างพืชบริเวณที่แสดงอาการออกเป็น 2 ส่วน ให้มีน้ำหนักส่วนละ 1 ก.

นำชิ้นส่วนพืชส่วนที่ 1 ไปบดในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) อัตราส่วน 1 ก. /10 มล. เพื่อใช้ในการทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป และตัวอย่างพืชอีกส่วนนำไปบดในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ อัตราส่วน 1 ก./10 มล. สำหรับนำไปตรวจสอบปริมาณแบคทีเรีย Xcc บนอาหาร Wakimoto's medium (PSA)

6.1 การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

6.1.1 การทดสอบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* บริสุทธิ์

เจือจางเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนี/มล. โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ใส่ในหลอด 1.5 มล. ปริมาตร 1 มล. จากนั้นจุ่มชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่เตรียมไว้ลงในสารละลายแล้วเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับการทดสอบกับแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบค่น้ำปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มล. และเจือจางแบบ 10 เท่าเหมือนข้างต้น โดยชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปจะแสดงผลปฏิกิริยาบวกลบเป็นสีม่วงเข้มบน test line และ control line ในขณะที่ผลปฏิกิริยาลบจะแสดงเป็นสีม่วงเข้มเฉพาะบน control line เท่านั้น เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุมทดสอบด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อบริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบค่น้ำปกติ นำไปทำปฏิกิริยากับ PAb ต่อแบคทีเรีย Xcc อ่านค่าปฏิกิริยาที่ O.D. 405 nm

6.1.2 การทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างคะน้ำที่เป็นโรคเน่าดำ

เตรียมตัวอย่างคะน้ำที่เป็นโรคเน่าดำสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ตามวิธีการในข้อ 6 แล้วนำมาเจือจางเป็น 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 ทดสอบน้ำคั้นพืชแต่ละระดับการเจือจางกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยมีน้ำคั้นใบคะน้ำปกติเป็นตัวควบคุมลบ เปรียบเทียบผลกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุมทดสอบตามวิธีการในข้อ 6.1.1

6.2 การทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

6.2.1 การทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

เตรียมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Pcc*, *Pantoea* sp., *Xcc* และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้ำที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนี/มล. โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมลบ

6.2.2 การทดสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างคะน้ำ

เตรียมตัวอย่างคะน้ำที่ได้จากการปลูกเชื้อและตัวอย่างคะน้ำที่เก็บจากแปลงตามวิธีการในข้อ 6 นำตัวอย่างคะน้ำมาทดสอบกับชุดตรวจอิมมูโนสตริป โดยมีน้ำคั้นใบคะน้ำปกติเป็นตัวควบคุมลบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิต PAb ต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* และการทดสอบประสิทธิภาพ

สามารถเก็บแอนติซีรัมต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ได้ทั้งหมด จำนวน 8 ครั้ง ๆ ละ 20-25 มล. และมีประสิทธิภาพดังนี้

1.1 ค่าไตเตอร์ของ PAb

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของ PAb โดยใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *Xcc* 1.6×10^8 หน่วยโคโลนี/มล. ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าค่าความเจือจางสูงสุดของ PAb ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้หรือค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 1,000-128,000 (Table 1) โดยแอนติซีรัมครั้งที่ 1 และ 2 มีค่าเพียง 1:1,000 ครั้งที่ 3 และ 4 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2 ครั้งแรก เป็น 1:16,000 ครั้งที่ 5 และ 6 มีค่า 1:128,000 ในขณะที่ครั้งที่ 7 และ 8 ค่าไตเตอร์ลดลงเหลือ 1:64,000 ดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 5 สำหรับเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อไป

Table 1 Antiserum titer against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* when determined by indirect ELISA^{1/}

Antiserum	Titer	O.D. 405 nm.
1	1,000	0.974 ^{2/}
2	1,000	1.205
3	16,000	1.386
4	16,000	1.460
5	128,000	1.520
6	128,000	1.652
7	64,000	1.429
8	64,000	1.756
PBS buffer (negative control)	-	0.175

^{1/}Antigen was prepared from *Xcc* cell suspension (1×10^8 cfu/ml)

^{2/}The cut-off value was taken as $\leq 2 \times$ O.D. value of negative control (PBS buffer) = 0.175. Thus, an O.D. value above $2 \times$ value of negative control = 0.350 was considered positive

1.2 ความจำเพาะของ PAb

PAb ที่ผลิตได้ พบว่า ทำปฏิกิริยากับ เชื้อต่อแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำเพียง ชนิดเดียว แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย Pcc, *Pantoea* spp. และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

จากผิวใบคะน้า ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีครีม ขอบไม่เรียบคล้ายกลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5 ลักษณะโคโลนี ดังนั้น PAb ที่ผลิตได้ จึงมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำ (Table 2)

Table 2 Comparison the specificity of DOA-polyclonal antibody and commercial polyclonal antibody, LOEWE® against different bacterial isolates when determined by indirect ELISA technique

Bacterial isolates	O.D. 405 nm	
	DOA-PAb	LOEWE®-PAb
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	2.806 (+) ^{1/}	2.766 (+)
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0.023 (-)	0.043 (-)
<i>Pantoea</i> spp.	0.138 (-)	0.151 (-)
Bacteria contaminant of kale-1	0.093 (-)	0.070 (-)
Bacteria contaminant of kale-2	0.059 (-)	0.057 (-)
Bacteria contaminant of kale-3	0.074 (-)	0.066 (-)
Bacteria contaminant of kale-4	0.058 (-)	0.064 (-)
Bacteria contaminant of kale-5	0.098 (-)	0.093 (-)
PBS buffer (negative control)	0.194 (-)	0.180 (-)

^{1/}The cut-off value was taken as $\leq 2 \times$ O.D. value of negative control (PBS buffer) = 0.194 and 0.180. Thus, an O.D. value above this 2xvalue of 0.388 and 0.360 was considered positive

1.3 ความไวของ PAb

ผลการทดสอบความไวของ PAb ในการ ทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc บริสุทธิ์ พบว่า สามารถ ตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10^4 หน่วย โคโลนี/มล. ด้วยวิธี indirect ELISA มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.605 (Table 3) ซึ่ง PAb ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เมื่อนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา พบว่า จะสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนี/มล. (Goto, 1992) ดังนั้น PAb ต่อแบคทีเรีย Xcc ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ได้

2. ประสิทธิภาพของ PAb ต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ที่ผลิตได้ กับ แอนติบอดีต่อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ทางการค้า (LOEWE®, China)

2.1 ความจำเพาะเจาะจง

ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้และแอนติบอดีทางการค้ากับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติบอดีทั้งสองชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ โดยให้ผลของปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน (Table 2)

2.2 การทดสอบความไว

ผลการทดสอบความไวด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า PAb ที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ 1×10^4 หน่วยโคโลนี/มล. ซึ่งเท่ากับแอนติบอดีทางการค้าที่นำมาเปรียบเทียบ (Table 3)

Table 3 Comparison the sensitivity between DOA-polyclonal antibody and commercial polyclonal antibody, (LOEWE®) for detection of *X. campestris* pv. *campestris* at various concentration by indirect ELISA technique

<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (cfu/ml)	O.D. 405 nm	
	DOA-PAb	LOEWE®-PAb
10 ⁸	2.788 (+) ^{1/}	2.758 (+)
10 ⁷	2.025 (+)	2.015 (+)
10 ⁶	1.891 (+)	1.759 (+)
10 ⁵	1.361 (+)	1.263 (+)
10 ⁴	0.605 (+)	0.768 (+)
10 ³	0.298 (-)	0.303 (-)
10 ²	0.218 (-)	0.276 (-)
10	0.208 (-)	0.203 (-)
PBS buffer (negative control)	0.173 (-)	0.164 (-)

^{1/}The cut-off value was taken as $\leq 2 \times$ O.D. value of negative control (PBS buffer) = 0.173 and 0.164. Thus, an O.D. value above this 2x value of 0.346 and 0.320 was considered positive.

3. แอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

3.1 แอนติบอดีให้บริสุทธิ์

อิมมูโนโกลบูลิน (IgG) บริสุทธิ์ ที่ได้มีความเข้มข้น 1.15 มก./มล. ปริมาตร 3 มล. รวมปริมาณของ IgG ที่ได้คือ 3.45 มก./แอนติซีรัม 1 มล. ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. เพื่อนำไปติดฉลาก (conjugate) ด้วยสารละลายอนุภาคทอง (colloidal gold) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno-Strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ (รุ่งนภา และคณะ, 2556) และการผลิตชุด GLIFT ของ *Ralstonia solanacearum* (สุรณี และคณะ, 2551)

3.2 คุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินทดสอบโดยวิธี DIBA

ผลการทดสอบคุณภาพของ IgG ด้วยวิธี DIBA พบว่า IgG ที่ปรับความเข้มข้น 1 มก./มล. ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นตัวอย่างใบคะน้าที่มีอาการโรคเน่าดำ และแบคทีเรีย Xcc ความเข้มข้น 1×10^8 หน่วยโคโลนี/ มล. ให้ผลของปฏิกิริยาเป็นสีม่วงและพบว่า IgG ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบคะน้าปกติ ซึ่งค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ในการตรวจสอบด้วยวิธี DIBA คือ 1: 500 (Figure 2)

TBS	H	D	P
TBS	H	D	P

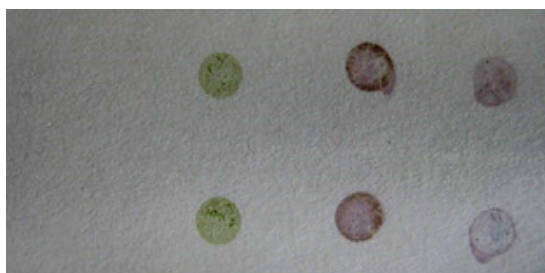


Figure 2 The quality of immunoglobulin (IgG) testing by Dot immunobinding assay (DIBA)
TBS = Tris buffer saline, H = healthy, D = disease, P = Xcc, IgG concentration 1 mg/ml was diluted 1:500 in TBS for detecting Xcc in Chinese Kale

4. การพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริป

4.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารละลายอนุภาคทอง

จากการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองและวัดค่า O.D. 540 nm เท่ากับ 0.5 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line การเกิดปฏิกิริยามีสีม่วงคมชัด จึงเป็นความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการป้ายลง

บนแผ่น CRP สำหรับการพัฒนาชุดตรวจ
อิมมูโนสตริปเพื่อตรวจแบคทีเรีย Xcc การพัฒนา
ชุดตรวจไวรัส TMV ในพืช Byzova *et al.* (2008)
พบว่า อัตราของสารละลาย gold conjugated IgG
ที่มีค่า O.D. 540 nm เท่ากับ 2.0 แสดงปฏิกิริยา
ชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่
สารละลาย gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D.
เท่ากับ 0.5 วัดที่ O.D. 540 nm มีความเหมาะสม
ในการป้ายลงบนแผ่น CRP และในการผลิตชุด
GLFT kit เพื่อตรวจแบคทีเรีย *R. solanacearum*
ซึ่งแสดงปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control
line มีสีม่วงคมชัด (สุรกี และคณะ, 2551)

4.2 ความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสม
สำหรับป้ายลงบนแผ่น CRP

ความเข้มข้นของ gold conjugated IgG
ที่ไม่ได้เจือจาง และที่เจือจาง 1:2 และ 1:4 เพื่อใช้
ระบายลงบนแผ่น CRP พบว่า gold conjugated
IgG ที่ไม่ได้เจือจางสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็น
สีม่วงชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่
gold conjugated IgG ที่เจือจาง 1:2 และ 1:4
เกิดปฏิกิริยาสีชมพูค่อนข้างชัดเจนบน test line
แต่เกิดปฏิกิริยาเป็นสีชมพูอ่อนไม่ชัดเจนบน
control line กิตติศักดิ์ และคณะ (2549)
ได้อธิบายว่า การเจือจาง Gold conjugated IgG
แล้วทำให้ control line เกิดปฏิกิริยาไม่ชัดเจนนั้น
เนื่องจากปริมาณของ gold conjugated IgG
ไม่เพียงพอสำหรับ control line เนื่องจาก gold
conjugated IgG ต้องไหลผ่าน test line ก่อน
จึงเหลือปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะไปทำให้
control line มีสีเข้ม

4.3 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

เลือกใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM)
ชนิด S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ ในการ
ทำ test line และ control line ประกอบเป็นชุด
ตรวจสอบอิมมูโนสตริป สอดคล้องตามรายงาน
ของณัฐิมา และคณะ (2555) ซึ่งได้ทดสอบชนิด
ของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

ของ IgG บน test line โดยทดสอบกับ membrane
จำนวน 4 ชนิด พบว่า membrane ชนิด S&S AE 99
มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ทำ test line
และ control line เพื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบ
โรคเหี่ยวของปทุมมามากที่สุด เนื่องจากแสดงผล
การเกิดปฏิกิริยาของ test line และ control line
ชัดเจน

4.4. การอ่านผลของปฏิกิริยาในการใช้ชุด
ตรวจสอบอิมมูโนสตริป

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น
จะแสดงผลของปฏิกิริยาบวกเป็นสีม่วงเข้มทั้งบน
test line และ control line ภายใน 10-15 นาที
หลังจากจุ่มในหลอดน้ำคั้นใบคะน้าที่เป็นโรคเน่าดำ
และจะแสดงผลปฏิกิริยาลบเป็นสีม่วงเข้ม
เฉพาะบน control line หลังจากจุ่มในหลอดน้ำ
คั้นใบคะน้าปกติ

5. ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

5.1 ความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

ผลการทดสอบความไวในการตรวจ
แบคทีเรีย Xcc พบว่า ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปมี
ความไวในการตรวจเชื้อบริสุทธิ์ได้ที่ระดับความ
เข้มข้นต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนี/มล. (Figure 3)
เช่นเดียวกับการตรวจเชื้อ Xcc ที่ผสมในน้ำคั้นใบคะน้า
ปกติ และสามารถตรวจเชื้อ Xcc จากตัวอย่างใบ
คะน้าที่เป็นโรคได้ถึงระดับการเจือจาง 1: 2,000
จากการทดสอบความไว ในการตรวจแบคทีเรีย Xcc
บริสุทธิ์และตัวอย่างคะน้าที่เป็นโรคด้วยชุด
ตรวจสอบอิมมูโนสตริป เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค
ELISA พบว่า การตรวจด้วยชุดตรวจสอบ
อิมมูโนสตริปและเทคนิค ELISA มีความไว
ในการตรวจพบแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ปริมาณ
ต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนี/มล. เมื่อทดสอบความไว
ในการตรวจตัวอย่างคะน้าที่เป็นโรค พบว่า
ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อ
ได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1: 2,000 ซึ่งความไวของ
ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของ

แอนติบอดี Alvarez (2004) พบว่า ชุดอิมมูโนสตริปที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจแบคทีเรีย เช่นเดียวกับชุดตรวจ GLIFT kit สำหรับตรวจกล้วยไม้ (สุรภี และคณะ, 2551) ชุดอิมมูโนสตริปตรวจโรคเหี่ยวของปทุมมา และโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ (ณัฐริมา และคณะ, 2555) เมื่อเปรียบเทียบการใช้ชุดตรวจอิมมูโนสตริปกับเทคนิค ELISA ด้วยข้อจำกัดหลายประการของเทคนิค ELISA เช่น การใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนาน (4-6 ชม.) ต้องใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างพร้อมในการทำงาน และผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญเฉพาะด้าน ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น (Figure 4) จึงมีความสะดวกในการใช้งานมากกว่า มีความรวดเร็ว และผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีทักษะเฉพาะด้านในการใช้งาน จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจสอบแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้าในภาคสนามได้ดีกว่าเทคนิค ELISA

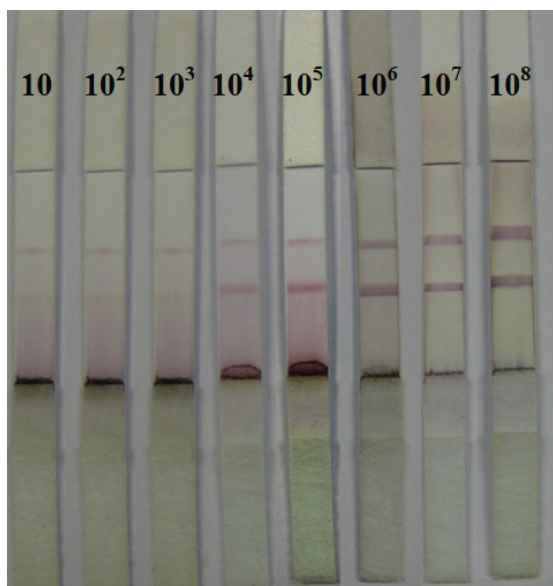


Figure 3 The sensitivity of the Immuno strip test with a serial dilution of Xcc cell. The 10^8 cfu/ml represents the highest tested concentration, and the 10^4 cfu/ml represents the least concentration giving a positive result

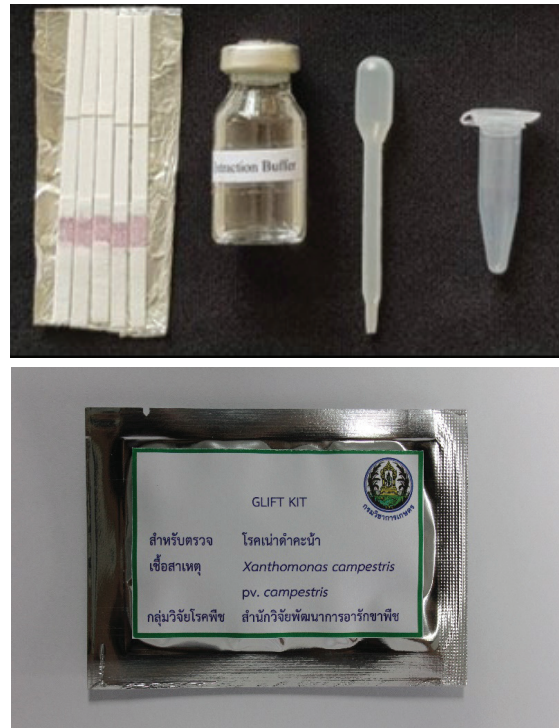


Figure 4 Immuno Strip for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* the causative agent of Black Rot of Chinese Kale

5.2 ความจำเพาะของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

5.2.1 ความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบเป็นลบกับแบคทีเรีย *Pcc*, *Pantoea* sp. และแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้า ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค indirect ELISA แสดงว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำในคะน้าและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น

5.2.2 ความจำเพาะกับตัวอย่างคะน้า

เมื่อนำตัวอย่างคะน้าที่มีลักษณะอาการต่าง ๆ มาทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปพบว่า ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เฉพาะใบคะน้าแสดงอาการโรคเน่าดำที่เกิดจากแบคทีเรีย Xcc เท่านั้น เช่นเดียวกับ

ผลการเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA พบว่า หลุมทดสอบ ELISA ที่เคลือบด้วยน้ำคั้นใบคะน้าที่มีอาการโรคเน่าดำมีค่า 3.092 ใกล้เคียงกับหลุมที่เคลือบด้วยแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ คือ 3.113 สำหรับหลุมทดสอบ ELISA ที่เคลือบด้วยน้ำคั้นใบคะน้าอาการต่าง ๆ และหลุม control ให้ผลเป็นลบ ดังนั้น ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำเท่านั้น

สรุปผลการทดลอง

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำ ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้มีความจำเพาะในการตรวจจับเชื้อแบคทีเรีย Xcc เท่านั้น มีความไวในการตรวจจับที่ระดับเข้มข้นต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนี/มล. ใช้เวลาในการตรวจเพียง 10-15 นาที หลังบดตัวอย่างพืชสามารถแนะนำให้นักวิชาการ เจ้าหน้าที่ รวมถึงเกษตรกรและผู้เกี่ยวข้อง นำชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc สาเหตุโรคเน่าดำ ไปใช้เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยโรคในคะน้าและพืชตระกูลกะหล่ำได้ โดยที่ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีประสบการณ์ สามารถใช้และอ่านผลได้ทันที ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว แม่นยำ มีประสิทธิภาพ เป็นแนวทางการป้องกันกำจัดโรคให้ทันต่อสถานการณ์การแพร่ระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักวิชาการ และบุคลากรกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กิตติยะอังกูร สุรภี กิตติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT kit เพื่อทำการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง. ว. วิชาการเกษตร. 2 (24): 168-177.
ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล สุรภี กิตติยะอังกูร ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเครื่อง. 2555. GLIFT kit เพื่อตรวจสอบ

แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในปทุมมา. หน้า 230-240. ใน : รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 7-9 สิงหาคม 2555 ณ โรงแรมริเวอร์แคว รีสอร์ท กาญจนบุรี.

รัชณี ธงประยูร. 2558. เทคนิคทางชีววิทยาในการวินิจฉัยโรคพืช. เพชรเกษมพรินติ้ง กรู๊ป จำกัด, นครปฐม. 88 หน้า.

รุ่งนภา ทองเครื่อง สุจินต์ ภัทรภูวดล วิชัย ไชยสิทธิ์ และณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2556. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*) อย่างรวดเร็ว. หน้า 1385-1389. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 11. สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย 26-28 พฤศจิกายน 2556 ณ โรงแรมเซ็นทารา คอนเวนชันเซ็นเตอร์ ชonan แก่น.

สุรภี กิตติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์. กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

Alvarez, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.

Byzova, N.A., I.V. Safenkova, S.N. Chirkov, A.V. Zherdev, A.N. Blintsov, B.B. Dzantiev, and I.G. Atabekov. 2008. Development of Immunochromatographic Test Systems for Express Detection of Plant Viruses. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45 (2) :204-209.

Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, INC. 341 p.

Williams, P.H. 1980. Black Rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant Disease*. 64: 736-742.

Yakrus, M. and N.M. Schaad. 1979. Serological Relationships Among Strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Plantpathol.* 69: 517-522.