

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

ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ ทศนาพร ทศกร รุ่งนภา ทองเครื่อง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การผลิตแอนติซีรัม ของแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* เพื่อใช้ผลิตชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip โดยการแยกสกัดโปรตีน Membrane protein complex บริสุทธิ์จากผนังเซลล์แบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* โดยวิธี Li CL₂ extraction เพื่อใช้เป็นแอนติเจน นำแอนติเจนบริสุทธิ์พร้อมที่จะฉีดกระต่าย ฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัม โดยฉีดกระต่ายจำนวน 4 ครั้ง เจาะเลือดกระต่ายทุกอาทิตย์ จำนวน 4 ครั้ง นำเลือดกระต่ายมาแยกเอาแอนติซีรัมโดยแยกเฉพาะน้ำเหลืองทิ้งเม็ดเลือดแดง ได้แอนติซีรัมจำนวน 30 ml นำแอนติซีรัมมาทดสอบค่า titer ที่มีค่า titer 1: 25,000 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม ได้ความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่มีต่อแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ 10⁴ cfu/ml สกัด IgG จากแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ทดสอบ IgG พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG คือ 1:500

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 และออสเตรเลีย เป็นต้น แต่การผลิตกล้วยไม้ประสบปัญหาการระบาดของศัตรูพืช นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาที่อ่อนแอต่อศัตรูพืช ทำให้แต่การผลิตกล้วยไม้ประสบปัญหามากขึ้น โดยเฉพาะโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย แต่เดิมพบเป็นเพียงเล็กน้อย แต่ในปัจจุบันพบปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียระบาดอย่างมาก และด้วยสภาพภูมิอากาศปัจจุบัน ภาวะโลกร้อนได้ส่งผลกระทบต่อโดยตรงและทางอ้อมต่อ สภาพแวดล้อมและ มนุษย์ และ สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยเฉพาะจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ทำให้มีการปรับสภาพให้มิกิจกรรมต่างๆเปลี่ยนแปลงไป 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* ชุดตรวจสอบนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบในแปลงปลูกและรู้ผลการตรวจภายในเวลา 5-10 นาที ทำให้เกษตรกรสามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เชื้อเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน ทรายกลางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติเจน (Antigen) นำเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia 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 นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำการ 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

2. การผลิตแอนติซีรั่ม 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 สัปดาห์เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรั่ม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเจาะเอาซีรั่ม แล้วกรีดที่ผิวหนังรอยต่อระหว่างปีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำปีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บแช่แข็งไว้

3. **ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม** โดยนำแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้ง มาทำให้เจือจาง จนถึง 1: 10⁵ และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ความเข้มข้น 10⁸ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทคนิค วิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton et al, 1990)

4. ผลิตตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 นำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยการใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton et al, 1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรัมผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็น ค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรัม 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 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 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

4.2 **การทดสอบคุณภาพ IgG** โดยนำ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื่อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ความเข้มข้น 10⁸ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton et al, 1990) โดยใช้ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่เจือจาง 1: 500

4.3 **การติดฉลาก IgG ของแบคทีเรีย *B. 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* จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวน

นาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

4.4 การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมและการทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *B. gladioli*

ทำการทดสอบ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ IgG ของแบคทีเรีย *B. 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 เข็มข้นอัตรา 1:3) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง ตะปากลากและลากเส้นจากซ้ายไปทางขวา ๆ จนสุดปลาย membrane ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น membrane มีขนาดเท่า ๆ กันทั้งเส้น ใช้ปากกาตามใหม่ (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มซับ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* (เข็มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ GLIFT

- วาง membrane ที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกการรองรับ (plastic backing polymer) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร
- วางแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ของแบคทีเรีย *B. 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 นำไปทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli*

- เก็บ GLIFT kit ไว้ในถุงอลูมิเนียมฟอล์ย และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง
- ทดสอบปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* นำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจสอบผลของการเกิดปฏิกิริยาบน membrane ทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกัน

4.6 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของชุดเตรียมสอบ ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* ในกล้วยไม้ ทดสอบกับแบคทีเรียอื่นๆ ที่อยู่ในกล้วยไม้ โดยนำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากกล้วยไม้ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถเกิดโรคกับกล้วยไม้ได้ ได้แก่ *Erwinia carotovora* , *E. chrysanthemi*, *Acidovorax avenae* pv. *cattaryae* เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *B. gladioli* นำสารแขวนลอยแบคทีเรียต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจสอบผลของการเกิดปฏิกิริยา ถ้าปฏิกิริยาเป็นบวกจะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากปฏิกิริยาเป็นลบจะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

4.7 ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* โดยนำชุดตรวจที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทำการทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* โดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-10} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นรับตัวอย่างของชุดตรวจสอบจำนวน 3 หยดต่อตลับ ตรวจสอบผลของการเกิดปฏิกิริยา ในกรณีตัวอย่างที่ตรวจสอบมีแบคทีเรีย *B. gladioli* จะปรากฏแถบสีทั้ง control line และ test line หากไม่มีแบคทีเรีย *B. gladioli* จะปรากฏสีเฉพาะ control line เท่านั้น

เวลาและสถานที่

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตแอนติเซรัม ของแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* เพื่อใช้ผลิตชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip โดยการแยกสกัดโปรตีน Membrane protein complex บริสุทธิ์จากผนังเซลล์แบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* โดยวิธี Li CL₂ extraction เพื่อใช้เป็นแอนติเจน นำแอนติเจนบริสุทธิ์พร้อมที่จะฉีดกระต่าย ฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติเซรัม โดยฉีดกระต่ายจำนวน 4 ครั้ง เจาะเลือดกระต่ายทุกอาทิตย์ จำนวน 4 ครั้ง นำเลือดกระต่ายมา

แยกเอาแอนติซีรัมโดยแยกเฉพาะน้ำเหลืองทิ้งเม็ดเลือดแดง ได้แอนติซีรัมจำนวน 30 ml นำแอนติซีรัมมาทดสอบค่า titer ที่มีค่า titer 1: 25,000 ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม ได้ความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่มีต่อแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ 10^4 cfu/ml สกัด IgG จากแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ทดสอบ IgG พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG คือ 1:500

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลิตแอนติซีรัม ของแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* โดยการแยกสกัดโปรตีน Membrane protein complex จากผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี Li CL₂ extraction เพื่อใช้เป็นแอนติเจน ฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัม ได้แอนติซีรัมจำนวน 30 ml ที่มีค่า titer 1: 25,000 แอนติซีรัมมีความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่มีต่อแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ 10^4 cfu/ml สกัด IgG จากแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ ทดสอบ IgG พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG คือ 1:500

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
- สุนตรา ภาวิจิตร สุทธิพงษ์ ญาณวารี และ ศิริลักษณ์ โส่วสวัสดิ์. 2532. การศึกษาสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลหวายทางเคมีและฟิสิกส์. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย กลุ่มงานבקเตรียวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 30-40.
- อนุพันธ์ อธิรัตน์ .2542. ภัยเงียบจากคลอรีน. เอกสารประกอบการบรรยาย ณ ห้องประชุมกำธรสุวรรณกิจ กรมอนามัย.
- Chandrkrachang, S.2002. The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand, in: K. Suchiva, S. Chandkrachang, 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.