การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยวิธี PCR-ELISA

Development of PCR-ELISA for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

วันเพ็ญ ศรีชาติ[1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[2/] ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[2/]
กาญจนา วาระวิชะนี[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ในการตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ได้รับเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลแตงโม โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบมี จำนวน 2 คู่ ได้แก่ WFB1 (F) 5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'/WEB2 (R) 5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3' และ WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'/ WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3' ส่วน Probe จำนวน 1 เส้น คือ 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3' และจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้ชัดเจน โดยเฉพาะ ไพรเมอร์คู่ WFBA (F)/WFBA (R) สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนกว่าไพรเมอร์คู่ WFB1 (F) / WEB2 (R) ในส่วนของการติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ได้ PCR product ของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml และชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-02-56

คำนำ

โรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของพืชสกุลแตง สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) เดิมคือเชื้อ *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* ซึ่งเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ได้ ในประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 ในพื้นที่ปลูกแตงโมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญเพื่อส่งออกไปจำหน่ายยังหลายประเทศ ในการส่งออกต้องมีการรับรองการปลอดเชื้อโรคศัตรูพืชที่สำคัญตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชสกุลแตงไปยังต่างประเทศ จากการศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเมล็ดพันธุ์แตงโมด้วยวิธี Immunomagnetic separation และ PCR โดยการสังเคราะห์ไพรเมอร์จากยีน 16S rRNA ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถตรวจจากน้ำล้างเมล็ดแตงโมที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10 cfu/ml และตรวจสอบกับเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ 0.1% ได้ (Walcott, et al, 2000) ซึ่งการตรวจสอบเชื้อสาเหตุเพื่อให้มั่นใจและสามารถตรวจกับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่น้อย เช่น การปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ ELISA เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าเพื่อเป็นการยืนยันการรับรองเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกได้ อีกทั้งสามารถ นำเทคนิคการตรวจสอบดังกล่าวไปปรับใช้กับการตรวจสอบเชื้อโรคที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์อื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ชุดสารเคมี พีซีอาร์ อิไลซ่า ดิกเลเบลลิ่ง
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ ไพรเมอร์ โพรบ
3. ตัวอย่างเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
5. วัสดุและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้ว ไปเปรตดูดสาร อีไลซ่ารีดเดอร์ เป็นต้น
6. ชุด ELISA Kit สำหรับตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ของ Agdia
7. ชุดตรวจสอบของ**สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ**

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli*

1.1 ไอโซเลทเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบต่อไป

1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ และการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเพิ่มปริมาณ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* โดยทำการเกลี่ยขยายเชื้อบนอาหาร Nutrient agar แล้วทำการบ่มเชื้อในอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวบรวมสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในบีกเกอร์ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 µl ใส่ในจานหลุมอิไลซ่าแล้วนำไปตรวจด้วยเครื่อง

อ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 600 (OD_{600}) ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 cfu/ml หลังจากนั้น ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในหลอด ปริมาตร 1 ml แล้วจึงนำหลอดที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอยแบคทีเรียในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำสารเขวนลอยแบคทีเรียใช้เป็น DNA template ทดสอบ ไพรเมอร์ต่อไป

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และการหาลำดับดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* แล้วนำไปทำการ Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product แล้วทำการเลือกลำดับเบสตรงกลางของ PCR Product เพื่อนำไปออกแบบ ดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) สำหรับใช้ตรวจสอบในขั้นตอน ELISA และทำการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์และดีเอ็นเอ ตัวตรวจกับบริษัท

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer)

ทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl , 2 mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ความเข้มข้น คือ 10^7 และ 10^8 cfu/ml) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp. เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

3. การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

3.1 การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยเตรียมหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำหลอดของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอยแบคทีเรียในตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น DNA template ทดสอบต่อไป

3.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมสารเคมีที่ได้จากชุดตรวจสอบ ซึ่งมีการเติมสาร DIG ร่วมกับสารละลายที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ และนำหลอดสารละลายเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบสเป้าหมาย โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 6 µl, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 2.5 µl, 10 µM reverse primer ปริมาตร 2.5 µl, nuclease-free water ปริมาตร 64.5 µl, Taq polymerase 5 u/µl ปริมาตร 0.5 µl, DNA template ปริมาตร 4 µl (ส่วนหลอดที่เป็น Negative control ให้เติม nuclease-free water แทน DNA template ปริมาตร 4 µl) total volume 100 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมสารเคมีที่ได้จากชุดตรวจสอบ ซึ่งมีการเติมสาร DIG ร่วมกับสารละลายที่ใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ และนำหลอดสารละลายเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบสเป้าหมาย โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 µl, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 4 µl, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 µl, 125 pmol Control primer ปริมาตร 10 µl, nuclease-free water ปริมาตร 55.5 µl, Taq polymerase 5 u/µl ปริมาตร 0.5 µl, Human control DNA 3 ng/ µl ปริมาตร 10 µl (ส่วนหลอดที่เป็น Negative control ให้เติม nuclease-free water แทน DNA template ปริมาตร 10 µl) total volume 100 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	45 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60 °C	1 นาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	2 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	10 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุมด้วยเทคนิค ELISA

ทำการตรวจสอบการติดฉลากของ DIG ใน PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม โดยนำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 นำมาตรวจสอบกับจานหลุม ELISA ที่มีการเคลือบสาร streptavidin แล้วทำ hybridization เชื่อมต่อ probe ที่ติดด้วยสารไบโอติน โดยทดสอบตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.1 เตรียมหลอด PCR product ได้แก่ ชุดควบคุม เชื้อทดสอบ และ Negative Control ดูดสารละลายจากหลอด PCR ตัวอย่างละ 5 µl ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml. แล้วเติมสาร Denaturation solution หลอดละ 20 µl และทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงพอให้สารละลายผสมกัน หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.3.2 เติมสาร Hybridization solution ในหลอดข้อที่ 3.3.1 หลอดละ 225 µl แล้วทำการผสมสารละลายด้วยเครื่อง vortex

3.3.3 ทำการดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละหลอดลงในจานหลุม ELISA (MTP strip) หลุมละ 200 µl ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วนำไปบ่มไว้ใน water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง

3.3.4 ทำการเตรียมสาร Anti-DIG-POD working solution : Conjugate dilution buffer เท่ากับ 1 vol : 99 vol. โดยเก็บไว้ที่มืด

3.3.5 เทสารละลายในข้อ 3.3.3 ทิ้งในอ่างล้าง และทำการล้างหลุม MTP strip ด้วย washing solution 3-5 ครั้ง ครั้งละ 250 µl ต่อหลุม ครั้งสุดท้ายของการล้างให้ตบจานหลุมให้แห้งบนกระดาษ

3.3.6 เติมสารละลายในข้อ 3.3.4 ที่เตรียมไว้ หลุมละ 200 µl และปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วห่อจานหลุมด้วยฟอยด์ และบ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.7 เตรียมสารละลาย ABTS substrate solution ใช้ 1 เม็ด ของ ABTS ต่อ substrate buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด

3.3.8 ล้างจานหลุมเหมือนในข้อ 3.3.5

3.3.9 เติมสารละลาย ABTS ใส่ในหลุมหลุมละ 200 µl ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว และห่อด้วยฟอยด์ บ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.10 นำจานหลุม วัดค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ค่าความยาวคลื่น 405 nm. ทำการบันทึกผล

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A.avenae subsp. citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR

ทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction (10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 µl, 2mMdNTP mix ปริมาตร 2.5 µl, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 µl, 10 µM reverse primerปริมาตร 0.63 µl, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 µl, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 µl, DNA template ปริมาตร 1 µl (ตัวอย่างของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 9 ความเข้มข้น) total volume 25 µl) ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 °C	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 °C	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 °C	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 °C	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100V นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

4.2 การตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยเตรียมหลอดละ 1 มิลลิลิตร

4.2.2 นำชุดตรวจ จุ่มลงในสารแขวนลอยแบคทีเรียแช่ทิ้งไว้ 5-10 นาที และอ่านผล

4.2.3 ทำการอ่านผลหากเกิดแถบสีทั้ง test line และ control line แสดงว่ามีเชื้อ Aac หรือถ้าเกิดแถบสีที่ control line อย่างเดียว แสดงว่าไม่มีเชื้อ Aac. ในตัวอย่าง ทำการบันทึกผล

4.3 การตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

4.3.1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

4.3.2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.4 ทำการหยอดเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3.5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.8 ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD_{405}) และทำการบันทึกผล

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ *A.avenae subsp. citrulli*

ทำการขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ เชื้อที่ได้จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลเมลอน (Aac001) และจากกลุ่มงานแบคทีเรีย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลแตงโม (PSA1228)

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และการหาลำดับดีเอ็นเอ ตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

- ไพรเมอร์ (primer) ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่

คู่ที่ 1 สืบค้นจากรายงานของ Walcott and Gitaitis (2000)

WFB1 (F) 5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'

WEB2 (R) 5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 360 bp

คู่ที่ 2 ได้จากการปรับไพรเมอร์ของ Walcott and Gitaitis (2000) หลังจากนำไป Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product

WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'

WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 364 bp

- ลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

Probe 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3'

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer)

ทำการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Aac001 และ PSA1228 ไอโซเลทละ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ WFB1 (F)/WEB2 (R) และ WFBA (F)/WFBA (R) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์คู่ **WFB1 (F)/WEB2 (R)** สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้อย่างชัดเจน แต่ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เห็นแถบดีเอ็นเอของไอโซเลท Aac001 บางๆ ส่วน ไอโซเลท PSA1228 ที่ความเข้มข้นนี้ ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น

ส่วนไพรเมอร์คู่ **WFBA (F)/WFBA (R)** ให้ผลเช่นเดียวกับกับไพรเมอร์คู่ WFB1 (F)/WEB2 (R) แต่ชัดเจนกว่า แต่ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เห็นแถบดีเอ็นเอของไอโซเลท Aac001 ชัดเจน ส่วน ไอโซเลท PSA1228 สามารถเห็นได้บางๆ (รูปที่ 1)

3. การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

3.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ได้ PCR product ของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml จำนวน 9 ตัวอย่าง

3.2.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชองชุดควบคุม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ได้ PCR product ของชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control

3.3 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุมด้วยเทคนิค ELISA

กำลังดำเนินการทดสอบปีงบประมาณ 2557

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A.avenae subsp. citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA กับเทคนิคอื่นๆ

กำลังดำเนินการทดสอบในปีงบประมาณ 2557

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อทดสอบ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 1 ไอโซเลทที่แยกได้จากผลแตงโม (PSA1228) และได้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 ไพรเมอร์จากรายงานของ Walcott and Gitaitis (2000) ได้แก่ WFB1 (F) / WEB2 (R) มีขนาด PCR product size เท่ากับ 360 bp และ คู่ที่ 2 ไพรเมอร์ที่มีการปรับจากรายงานของ Walcott and Gitaitis (2000) ได้แก่ WFBA (F)/WFBA (R) มีขนาด PCR product size เท่ากับ 364 bp ส่วนลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) จำนวน 1 สาย และจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของลำดับเบสของไพรเมอร์ (primer) พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้ชัดเจน โดยเฉพาะ คู่ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R) สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้ดีกว่าชัดเจนกว่าไพรเมอร์คู่ WFB1 (F) / WEB2 (R) ในส่วนของการติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ได้ PCR product ของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml และชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control

เอกสารอ้างอิง

ประภาษ กาวิชา เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ พิศาล ศิริธร . 2545. ความหลากหลายของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเขตผลิตแตงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ . หน้า 415-430. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2545, วันที่ 28-29 มกราคม 2545 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พยอม พินยพงศ์. 2537. รายงานครั้งแรกของโรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของแตงโมในประเทศไทย. แก่นเกษตร 22 : 55-57.

เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และประภาษ กาวิชา . 2541. โรคผลเน่าแตงโมของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย . รายงานการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2543, หน้า 34-45. วันที่ 24-25 มกราคม 2543 ณ ห้องประชุมกวีจุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น .

Babadoost, M., and Pataky, N. 2002. First Report of Bacterial Fruit of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. Plant Dis. 86:443.

Evans, T.A., and R. P. Mulrooney. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. Plant Dis. 73: 1074.

Feng, J.J., Li, J.Q., Walcott, R.R., Zhang, G.M., Luo, L.X., Kang, L., Zheng, Y. and Schaad, N.W. 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. Seed Sci. & Technol., 41, 1-15.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Isakeit, T., M.C. Black, L.W. Barnes and J.B. Jones. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 81: 694.

Oya, H., Nakagawa, H., Saito, N., Uematsu, H and Ohara, T. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304–310.

Pinyapong, P.S. 1994. Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum&Nakai) in Northeastern Thailand. M.S. Thesis. University of the Philippines at Los Banos. 99.

Rane, K.K. and R.X. Latin 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon : association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.

Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson.1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

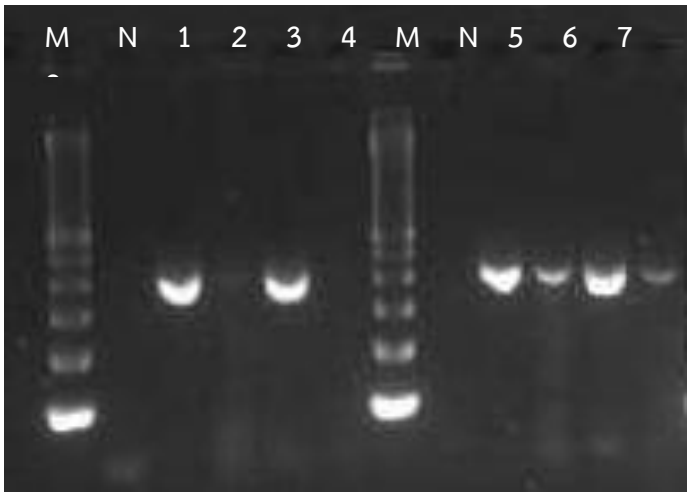
Walcott, R. R., and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.

Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease, 84, 470-474.

Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehaie, A.C. and Ling, K. (2006).Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology, 34, 101-106.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L, and Thomas, C.E. 1996. Bacterial fruit blotch in Compendium of Cucurbit Disease. The America Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota . 34-35 p.

ภาคผนวก



M = Marker 100 bp ladder

N = Negative

1 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

2 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

3 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

4 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFB1 (F) / WEB2 (R)

5 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

6 = เชื้อ Aac001 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

7 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

8 = เชื้อ PSA1228 เข้มข้น 10^8 CFU/ml ใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบไพรเมอร์ 2 คู่กับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ไอโซเลทละ 2 ความเข้มข้น