บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ใบหน้าวัวที่เป็นโรค ใบหน้าวัวปกติ และต้นหน้าวัวปกติ
2. ต้นพันธุ์หน้าวัวสายพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน
3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ
   - *Bacillus* sp. 5 สายพันธุ์
   - *Erwinia* sp. 1 สายพันธุ์
   - *Escherichia coli* 1 สายพันธุ์
   - *Pantoea* sp. 2 สายพันธุ์
   - *Pseudomonas fluorescens* 3 สายพันธุ์
   - *Ralstonia solanacearum* 20 สายพันธุ์
   - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 3 สายพันธุ์
   - *X. oryzae* pv. *oryzae* 2 สายพันธุ์
4. อาหารเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย
   - Potato semi-synthetic agar (PSA)
   - Nutrient agar (NA)
   - Nutrient broth (NB)
   - Hugh and Leifson's medium (H-L medium)
   - Yeast extract-dextrose –$CaCO_3$ (YDC)
   - King *et al.*'s medium B agar (KB)
   - Nutrient glucose agar (NGA)
   - Nutrient broth yeast extract agar (NBY)
   - D1M agar
   - Esculin-trehalose medium (ET medium)
   - Modified yeast salts broth (YS broth)
   - SX agar
   - Medium C
   - Liquid 523 medium

5. สารเคมี
   - Ethyl alcohol 70% และ 95%
   - Clorox 10 %
   - Sulfuric acid
   - Barium chloride
   - Phosphate buffer saline (PBS)
   - Phosphate buffer saline + 2 % Tween 80 (PBST)
   - Incomplete Freund's Adjuvant
   - Coomassie blue
   - Arabinose
   - Melibiose
   - Glycerol
   - Soluble starch
   - Sodium chloride
   - Esculin
   - D-methionine
4. Tuberculin syringe
5. กระบอกฉีดพ่น (foggy sprayer)
6. เข็มฉีดยาเบอร์ 21
7. Taflon coated slide
8. Goat anti-rabbit Ig-FITC

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดเลี้ยงเชื้อ และเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. ไมโครปิเปต (micropipette)
3. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ แท่งแก้ว
4. เครื่องเขย่า (shaker)
5. เครื่องวัดความขุ่น (spectophotometer)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
7. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

8. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
9. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
11. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow cabinet)
12. กล้องถ่ายรูป (camera)
13. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
14. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (sorvall)
15. ตู้เย็น
16. Microwave
17. Sonicator
18. Slide rack พร้อมอ่างแก้ว
19. ถาดวางสไลด์
20. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
21. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope)

วิธีการ

1. **การสำรวจและเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ทางภาค ใต้ของประเทศไทย**

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ภูเก็ต นราธิวาส ตรัง และสงขลา โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างคือ เก็บใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้ใส่ถุงพลาสติกใส บันทึกวัน เดือน ปี ที่เก็บ สายพันธุ์หน้าวัว ส่วนของพืชที่แสดงอาการ และทำการประเมินระดับการระบาดของโรคในแปลงปลูกตามวิธีของ Little และ Hills (1978, อ้างถึงใน Norman and Henny, 1986)

2. **การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคใบไหม้**

ทำการตรวจกลุ่มของแบคทีเรีย (bacterial ooze) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound จากนั้นนำตัวอย่างที่ตรวจพบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ ทำความสะอาดตัวอย่างโดยล้างผ่านน้ำไหล ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5x5 ตารางมิลลิเมตร แช่ในสารละลายคลอร็อก 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีก 2 ครั้ง ใช้ลูปลนไฟจนร้อนแดงตักใส่หลอดทดลองซึ่งมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใช้แท่งแก้วลนไฟที่ปล่อยให้เย็นบดขยี้ตัว อย่างจนละเอียด ได้สารแขวนลอยแบคทีเรีย (bacterial suspension, BS) ทำการสตรีค (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient

agar (NA) บ่มเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ลักษณะสีเหลืองเป็นมันเก็บในหลอดอาหาร potato semi-synthetic agar (PSA) โดยเก็บเชื้อ 1 สายพันธุ์ (isolate) ต่ออาหาร 1 หลอด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. **การทดสอบการเกิดโรค**

เตรียมต้นหน้าวัวสายพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแต่ละต้นมีใบจำนวน 3-5 ใบ ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ใช้ถ่านกะลาปาล์มน้ำมันเผาเป็นวัสดุปลูก แต่ละต้นคลุมด้วยถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำไว้ภายในก่อนปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 colony forming unit (cfu)/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาฉีดพ่นบนใบหน้าวัว โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ 1 สายพันธุ์ ต่อหน้าวัว 1 ต้น ส่วนชุดควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น คลุมต้นอีกครั้งด้วยถุงพลาสติกเพื่อเพิ่มความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตอาการการเกิดโรคทุก ๆ วันเป็นเวลา 60 วัน

4. **การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย**

4.1 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสกุล

นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 3 ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัวมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี โดยศึกษาในระดับสกุล (genus) ตามวิธีของ Schaad และคณะ (2001) ซึ่งสามารถเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย ได้โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาในระดับสกุล โดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ปฏิกิริยาแกรม การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน ลักษณะโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร YDC โคโลนีลักษณะ mucoid การสร้างสารเรืองแสง fluorescein บนอาหาร KB การแพร่ของสารไม่เรืองแสงในอาหาร KB การสร้างเอนไซม์ urease และ oxidase การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส การมีแฟลกเจลลามากกว่า 4 เส้นที่ขั้ว การเจริญบนอาหาร D1M การสร้างสปอร์ และลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการในการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวกที่ 2

4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อในระดับชนิด

นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 3 ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหน้าวัว

มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี โดยศึกษาในระดับระดับชนิด (species) ตามวิธีของ Schaad และคณะ (2001) ซึ่งสามารถเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย ได้โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาในระดับชนิดซึ่งใช้ลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ โคโลนีลักษณะ mucoid การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส การเจริญบนอาหาร SX การย่อยสลายแป้ง esculin และโปรตีน การสร้างกรดหรือด่างจากนม ปฏิกิริยา ice nucleation การสร้างกรดจาก arabinose การใช้ glycerol และ melibiose ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการในการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังแสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวกที่ 2

5. **พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเบื้องต้น**

พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะจากอาหาร SX agar (starch soluble-potato 10.0 กรัม beef extract 1.0 กรัม NH_4Cl 1 กรัม K_2HPO_4 2.0 กรัม methyl violet 2B 1% 1.0 มิลลิลิตร methyl green 1% 2.0 มิลลิลิตร agar 15.0 กรัม Cycloheximide 5% 5.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) โดยใช้ esculin เป็นแหล่งของคาร์บอนแทนแป้ง ในปริมาณ 2 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบเบื้องต้นโดยเตรียมอาหารตามสูตรต่าง ๆ ข้างต้น ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารแต่ละสูตรโดยเลี้ยงเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหาร PSA ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ทำการสตรีคลงบนจานอาหารแต่ละสูตร บ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลโดยศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของโคโลนี ได้แก่ ขนาดโคโลนี สี ขอบ ผิวหน้า รวมทั้งสีของอาหารรอบ ๆ ขอบโคโลนี

6. **การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ**

ทำการทดสอบการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ A 001-1, A 003-2, A 006-3, A 009-1, A 011-1, A 014-3, A 015-5, A 020-3, A 025-3, A 029-1, A 031-1, A 035-2, A 039-1, A 052-2, A 054-1, A 066-1, A 072-1, A 078-4, A 082-1 และ A 087-1 บนอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 5 ซึ่งให้ชื่อว่า SXE เปรียบเทียบกับบนอาหาร SX โดยมีอาหาร NA เป็นอาหารมาตรฐานหรือชุดควบคุม โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวหน้าอาหาร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (L-shaped glass rod) นำไปบ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการ

ทดสอบเชื้อละ 3 ซ้ำ บันทึกผลศึกษาโดยนับจำนวนโคโลนีและคำนวณประสิทธิภาพการเจริญบนอาหารตามวิธีการของ Civerolo และคณะ (1982)จาก

ประสิทธิภาพการเจริญบนอาหาร (%) = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหารทดสอบ}}{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหาร NA}} \times 100$

นอกจากนี้ทำการทดสอบการเจริญ และลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 5 ชนิด คือ *R. solanacearum* สายพันธุ์1084-2 และสายพันธุ์ 1166-2 *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *X. axonopodis* pv. *citri*, รวมทั้ง *E. coli*, *P. fluorescens* และ *Bacillus* sp. บนอาหาร SXE เปรียบเทียบกับอาหาร NA

7. **การตรวจหาเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ SXE**

7.1 การตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ SXE

ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้โดยใช้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่มีความเข้มข้นต่าง กัน บนหน้าวัวพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งมีใบ 3-5 ใบต่อต้น โดยก่อนปลูกเชื้อทำความสะอาดผิวใบหน้าวัวโดยการล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย วัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ 10 – 10^8 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฉีดพ่นบนใบหน้าวัวให้กระจายเท่ากันทั่วทุกใบในแต่ละต้น ปล่อยให้แห้ง ทำการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* โดยตัดใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ กันมาจำนวน 3 ใบขนาดใบละ 3 ตารางเซนติเมตร นำมาบดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวหน้าอาหาร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล โดยในแต่ละความเข้มข้นให้ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเปรียบเทียบกับอาหาร NA

7.2 การตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะ SXE

ทำการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากตัวอย่างใบหน้าวัวและใบบอนสีที่แสดงอาการโรค วัสดุปลูก และน้ำจากแปลงปลูกหน้าวัวที่มีการระบาดของโรค โดยนำใบหน้าวัวและบอนสีมาทำความสะอาดตัวอย่างโดยล้างผ่านน้ำไหล ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 5x5 ตารางมิลลิเมตร แช่ในสารละลายคลอร็อก 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

อีก 2 ครั้ง ใช้ลูปลนไฟจนร้อนแดงตักใส่หลอดทดลองซึ่งมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใช้แท่งแก้วลนไฟที่ปล่อยให้เย็นบดขยี้ตัว อย่างจนละเอียด ได้สารแขวนลอยแบคทีเรีย ส่วนวัสดุปลูกนำมาผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ได้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรีย จากนั้นดูดน้ำจากแปลงปลูกและสารแขวนลอยแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดลงบนผิวหน้าอาหาร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล โดยในแต่ละตัวอย่างให้ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเปรียบเทียบกับอาหาร NA อาหาร PSA และ อาหาร SX agar

8. **การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

8.1 การเตรียมแอนติเจน

ทำการคัดเลือกเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการโรครุนแรงที่สุดจากข้อ 3 และผ่านการจำแนกชนิดในข้อ 4 แล้ว จำนวน 1 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว 523 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยการใช้คลื่นเสียงที่ความถี่ (frequency) 40 kHz ช่วงละ (interval) 30 วินาที รวมเวลา (total time) 10 นาที ตรวจดูการแตกของเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมแกรม และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเซลล์แตกสมบูรณ์ (sonicated cell) จาก นั้นทำการวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951) แบ่งเก็บใส่หลอดเล็ก ๆ เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

8.2 การผลิตแอนติบอดี

ทำการทดลองกับกระต่ายเพศเมียสีขาวตาแดงพันธุ์ New Zealand White อายุ 6 เดือน โดยก่อนฉีด 1 สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือดกระต่ายเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (normal rabbit serum) จากนั้นนำ sonicated cell ผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอด้านหลังของกระต่าย (subcutaneous) โดยทำการฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือดกระต่ายไปทดสอบกับแอนติเจนเพื่อตรวจดูระดับแอนติบอดี ถ้าได้ระดับไตเตอร์ (titer) ที่ต้องการ ทำการเก็บเลือดมาแยกและเก็บแอนติซีรัมโดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเลือดแข็งตัว นำไปตั้งไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเอาส่วนลิ่มเลือด (clot) ออกไป นำส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

8.3 การหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี

ทำการหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยอาศัยปฏิกิริยาแบบ simple agglutination ใน microtiter plate โดยดัดแปลงวิธีการตามคู่มือปฏิบัติการวิทยาอิมมูนทั่วไป (2541) กระทำได้โดยดูด 0.85 % NaCl ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 1 และปริมาตร 50 ไมโครลิตรในหลุมที่ 2 -12 จากนั้นดูดแอนติบอดี ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 1 ทำการเจือจางแอนติบอดีในหลุมที่ 2-11 โดยดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตรจากหลุมที่ 1 ใส่ในหลุมที่ 2 และทำวิธีการเดียวกันไปจนถึงหลุมที่ 11 และดูดทิ้งไป 50 ไมโครลิตร ส่วนหลุมที่ 12 เป็นชุดควบคุมไม่มีแอนติซีรัม จากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland nephelometer standard No. 3 ซึ่งเป็นเชื้อแอนติเจนที่ผ่านการย้อมด้วยสี coomassie blue ใส่ลงไปทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มในกล่องชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน อ่านผลไตเตอร์หลุมที่มีการรวมกลุ่มของเชื้อตกอยู่ก้นหลุม ซึ่งจะเห็นเป็นกลุ่มตะกอนสีน้ำเงิน

8.4 การตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

ทำการย้อมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เชื้อ *P. fluorescens* 3 สายพันธุ์, *Pantoea* sp. 2 สายพันธุ์, *R. solanacearum* 5 สายพันธุ์, *Erwinia* sp. 1 สายพันธุ์, *Bacillus* sp. 2 สายพันธุ์, *E. coli* 1 สายพันธุ์, *X. axonopodis* pv. *citri* 3 สายพันธุ์ และ *X. oryzae* pv. *oryzae* 2 สายพันธุ์, ด้วยสี coomassie blue จากนั้นทำการตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยปฏิบัติตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังข้อ 8.3 แต่เปลี่ยนเชื้อแอนติเจนจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังกล่าว

9. **การหาไตเตอร์ของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา**

ทำการตรวจสอบไตเตอร์ที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดยวิธี indirect immunofluorescent staining ซึ่งเทียบเคียงวิธีการตาม Goldman (1968) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 เลี้ยงบนอาหาร PSA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยย้ายเชื้อ 2 ลูป มาใส่ใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย ปริมาตรหลุมละ 2 ไมโครลิตร บนสไลด์ (multiwells slide) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปแช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจือจางแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 แล้วดูดมา 10 ไมโครลิตรหยดลงบนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นหยดแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย

สารเรืองแสงที่เจือจางด้วย PBST ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการ mount สไลด์ด้วย buffer glycerol ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยวัดระดับการเรืองแสงดังนี้

4+ มีการเรืองแสงชัดเจนมาก

3+ มีการเรืองแสงชัดเจน

2+ มีการเรืองแสงปานกลาง

1+ มีการเรืองแสงน้อย

- ไม่มีการเรืองแสง

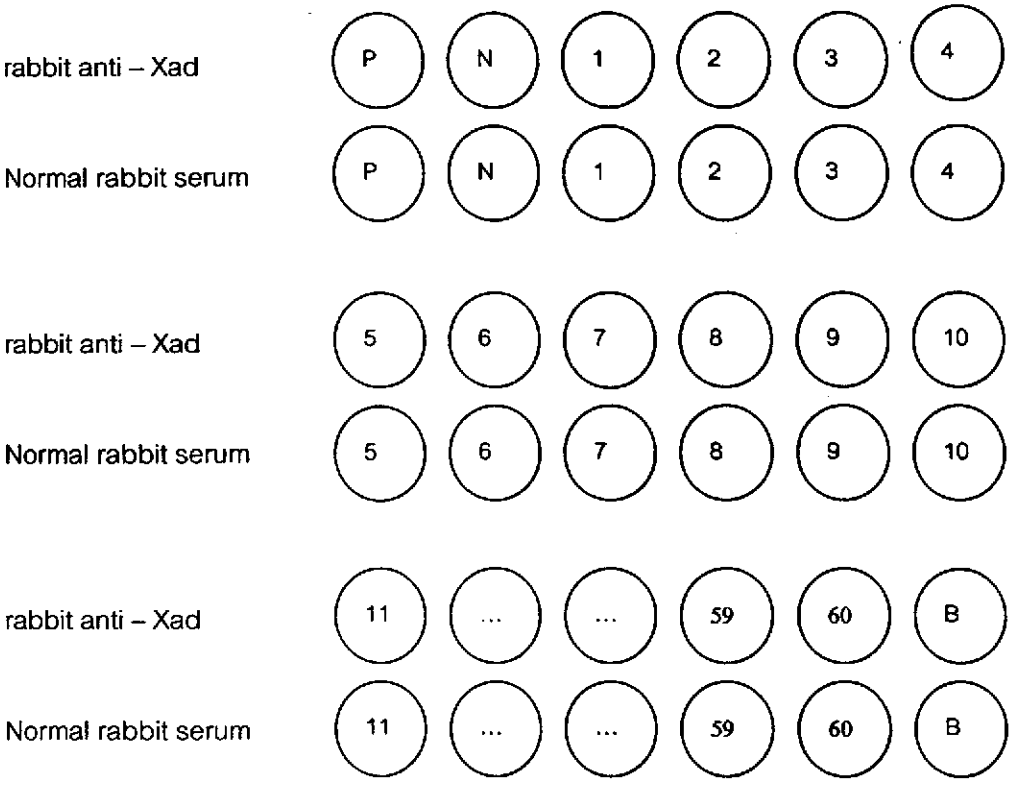
จากนั้นคัดเลือกหลุมที่มองเห็นการเรืองแสงชัดเจนเพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อไป

10. **ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดี**

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining ซึ่งเทียบเคียงวิธีการตาม Goldman (1968) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จำนวน 30 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จำนวน 30 สายพันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร YDC ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำเป็นสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยย้ายเชื้อ 2 ลูป มาใส่ใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตรหลุมละ 2 ไมโครลิตร บนสไลด์ (multiwells slide) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปแช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจือจางแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 แล้วดูดมา 10 ไมโครลิตรหยดลงบนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยดแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่เจือจางด้วย PBST ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการ mount สไลด์ด้วย buffer glycerol ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

โดยมีชุดควบคุมดังนี้ (ภาพที่ 1)

1. Positive control (P): เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*
2. Negative control (N): เชื้อ *E. coli*
3. Control system :- ใช้ PBS (B) แทน Rabbit anti - *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*
   - ใช้ normal serum คู่ไปกับ Rabbit anti - *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (rabbit anti-Xad)



ภาพที่ 1 ไดอะแกรมแสดงชุดการทดลองการตรวจเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ด้วยวิธี Indirect immunofluorescent staining

P คือ เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (positive control)

N คือ เชื้อ *E. coli* (negative control)

1 – 60 คือ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ทำการศึกษาจำนวน 60 ชนิด

B คือ PBS (Phosphate buffer saline)

11. การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบของหน้าวัวโดยใช้แอนติซีรัม

11.1 ศึกษาปริมาณเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบจากใบหน้าวัว

ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้โดยใช้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สายพันธุ์ A 082-1 ที่มีความเข้มข้นต่าง กัน บนหน้าวัวพันธุ์ Tropical อายุ 1 ปี 6 เดือน ซึ่งมีใบ 3-5 ใบต่อต้น โดยก่อนปลูกเชื้อทำความสะอาดผิวใบหน้าวัวโดยการล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย โดยวัดความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland nephelometer standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่ 10 – 10^8 cfu/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ฉีดพ่นบนใบหน้าวัวให้กระจายเท่ากันทั่วทุกใบในแต่ละต้น ปล่อยให้แห้ง ทำการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis*

pv. *dieffenbachiae* โดยตัดใบหน้าวัวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ กันมาจำนวน 3 ใบขนาดใบละ 3 ตารางเซนติเมตร นำมาบดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร และนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย ไปตรวจหาเชื้อโดยวิธี indirect immunofluorescent staining โดยหยดลงบนสไลด์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำลักษณะเดียวกัน 2 ชุด โดยชุดที่ 1 นำไปย้อมแกรมตรวจการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นสไลด์ และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ชุดที่ 2 นำมาทดสอบกับแอนติบอดีดังนี้ ทำการเจือจางแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 แล้วดูดมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยดแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่เจือจางด้วย PBST ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการ mount สไลด์ด้วย buffer glycerol ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และนับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละ field และหาค่าเฉลี่ยจากการนับจำนวน 10 field ซึ่งใน 1 field มีพื้นที่เท่ากับ 0.0143 ตารางมิลลิเมตร ที่กำลังขยาย 1000X

11.2 การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้จากใบหน้าวัวที่แสดงและไม่แสดงอาการโรค

ทำการเก็บใบหน้าวัวที่แสดงอาการโรคและไม่แสดงอาการโรค อย่างละ 50 ใบ จากแปลงที่มีการระบาดของโรค และตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้โดยนำใบหน้าวัวมาบดขยี้ลงบนสไลด์โดยตรง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปแช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำลักษณะเดียวกัน 2 ชุด โดยชุดที่ 1 นำไปย้อมแกรมตรวจการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นสไลด์ ชุดที่ 2 นำมาทดสอบกับแอนติบอดีดังนี้ ทำการเจือจางแอนติบอดีที่ได้จากกระต่ายด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 แล้วดูดมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หยดแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่เจือจางด้วย PBST ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนรอย smear นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 จำนวน 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการ mount สไลด์ด้วย buffer glycerol ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (ภาพที่ 2)

หยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนสไลด์

↓ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

แช่ใน 95 % ethanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

↓ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

หยด Rabbit anti - *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* หลุมละ 10 ไมโครลิตร

↓บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

↓ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

หยด Goat anti-rabbit Ig-FITC หลุมละ 10 ไมโครลิตร

↓บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

↓ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

หยด glycerol buffer หลุมละ 10 ไมโครลิตร

↓ปิดสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์

ตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ภาพที่ 2 **แผนภูมิแสดงวิธีการตรวจหาเชื้อ** *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* **โดยวิธี** Indirect immunofluorescent staining **ดัดแปลงจาก** Goldman (1968)