บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas*

1.1 ตัวอย่างจากพืชเป็นโรค

แยกเชื้อแบคทีเรียจากอาการใบจุด ใบไหม้บนใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงกวา เมล่อน สควอซ ข้าวโพด พริกและมะเขือเทศ จากแหล่งต่างๆ ที่นำมาตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ที่สาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี 2552 โดยเทคนิค botter test และแยกเชื้อจากอาการใบจุด ใบไหม้จากตัวอย่างใบแตงโม, น้ำเต้า, พริก, มะเขือเทศ, คื่นช่าย, ผักชีและกล้วยไม้ ที่คาดว่าจะเกิดจากการจากการเข้าทำลายของเชื้อในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* วินิจฉัยเบื้องต้น คือ ตรวจพบ bacterial ooze ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และไม่พบส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จึงนำมาแยกเชื้อบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วคัดเลือกโคโลนีของเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B (KB) และตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสง Ultraviolet (UV) ที่ความยาวคลื่นแสง 365 นาโนเมตร แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ เพื่อเป็น stock เชื้อสำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2 ตัวอย่างจากดินรอบรากพืชและดินผสมวัสดุเพาะ (แกลบดำ)

เก็บตัวอย่างดินใน 2 แหล่ง คือ ดินรอบรากพืช และดินผสมวัสดุเพาะจากแปลงปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเกษตรยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้วชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม จากนั้นเทลงในฟาสก์ (flask) ที่บรรจุน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบน shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เม็ดดินตกตะกอน แล้วใช้ปิเปตดูดส่วนน้ำใสมาทำ 10-fold serial dilution จากความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-12} แล้วดูดสารสารแขวนลอยดินที่เจือจางแต่ละระดับมา 100 ไมโครลิตร หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ KB โดยใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ spread plate ให้ทั่ว นำไปบ่มที่ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่าและนำไปตรวจการเรืองแสงภายใต้แสง UV ความยาวคลื่นแสง 365 นาโนเมตร บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล และทำการ streak plate โคโลนีของเชื้อที่เรืองแสงให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเก็บ stock เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงที่รวบรวมได้มาเพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ^{0}ซ นาน 48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยการเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแล้วใช้ loop ขูดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^{8} cfu/มิลลิลิตร สำหรับนำไปปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดเชื้อเข้าใต้ใบเลี้ยง (leaf injection) สำหรับการปลูกเชื้อกับพืชทดสอบได้แก่ แตงกวา เมลอน สควอซ แตงโม น้ำเต้าและข้าวโพด โดยใช้ syringe ปลอดเชื้อดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทงปลายเข็มเข้าที่เนื้อใบระหว่างเส้นใบโดยให้ปลายเข็มคว่ำลง แล้วฉีดสารแขวนลอยแบคทีเรียเข้าใต้ใบเลี้ยงทั้งสองใบ ซึ่งสังเกตโดยเห็นรอยช้ำน้ำแผ่เข้าไปในใบเลี้ยงพืชทดสอบทั้งสองใบ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พริกและมะเขือเทศใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการอัดสารแขวนลอยเชื้อเข้าไปในพืชทดสอบ (leaf infiltration) โดยใช้กระบอกเข็มฉีดยาพลาสติกที่ไม่มี syringe ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วออกแรงอัดสารแขวนลอยแบคทีเรียหรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้เข้าไปในเนื้อเยื่อใบพืชทดสอบ ซึ่งสังเกตโดยเห็นรอยช้ำน้ำแผ่เข้าไปในเนื้อเยื่อใบพืชที่ทำการปลูกเชื้อ ส่วนกล้วยไม้ ผักชีและคื่นฉ่ายทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีใช้เข็มหมุดปลอดเชื้อจุ่มสารแขวนลอยเชื้อจิ้มลงบนใบพืชทดสอบ (pin inoculation) จากนั้นนำพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อใส่ในกล่องพลาสติกที่ทำความสะอาดอย่างดี พร้อมกับทำการสเปรย์น้ำให้ความชื้นให้ทั่วทั้งขอบข้างในและฝากล่องพลาสติก ปิดฝากล่อง แล้วนำไปไว้ในห้องอุณหภูมิประมาณ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปิดฝากล่องและดูแลต้นพืชตามปกติ สังเกตและบันทึกผล

3. การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA

นำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* จำนวน 70 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม unknown ที่แยกได้ต้นกล้าแตง พริกและมะเขือเทศแสดงอาการเป็นโรค ทั้งกลุ่มโคโลนี สีขาวและโคโลนีสีเหลือง จำนวน 21 ไอโซเลต เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ นาน 24-48 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบแกรมด้วย 3% KOH ปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์แบคทีเรียให้เท่ากันคือมีค่าการดูดซับแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ใส่ลงในหลุมของ ELISA plate 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำ 2 หลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง บ่มข้ามคืนที่ 4 ^{0}ซ แล้วนำมาตรวจสอบตามขั้นตอนของ indirect ELISA (เพชรรัตน์และประภาษ, 2544) โดยใช้แอนติซีรั่มต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 ในอัตราส่วน 1:1,000 โดยปริมาตร และความเข้มข้น

ของ goat antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate อัตราส่วน 1:40,000 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของ substrate p-nitrophenyl 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รายงานผลการตรวจสอบด้วยเครื่อง ELISA reader (Bio Rad Model 550) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

4. การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่เป็นตัวแทนกลุ่มที่แยกได้พืชชนิดต่างๆ และกลุ่ม unknown ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบ indirect ELISA โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) เขย่าข้ามคืนนาน 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 300 ไมโครลิตร ผสมตะกอนเซลล์แบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร กับ protein sample buffer 40 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวางในน้ำแข็งทันที ก่อนนำไปแยกบนตัวกลางเจลตามระบบ discontinuous SDS-PAGE ตามวิธีการที่ได้ระบุไว้โดย Sambrook et al., 1989 โดยใช้ 12% resolving gel และ 5% stacking gell กระแสไฟฟ้า 18 mA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ใน staining solution นานข้ามคืน แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution (ภาคผนวก ค) บันทึกภาพรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจล วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ NTSYS pc version 2.0

5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

5.1 การทดสอบคุณสมบัติต่างๆ

ก. การทดสอบแกรมโดยใช้ 3% KOH

หยด 3% KOH ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ลูป (loop) ขูดโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ที่เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาผสมลงในหยดของ 3% KOH เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นขยัง loop ขึ้นลง ถ้าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะมีลักษณะหนืด แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มีลักษณะหนืดติด loop

ข. ทดสอบการสร้างสารเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B (ปริมาตร 1 ลิตร: Protose peptone 20 กรัม, $K_2HPO_4.3H_2O$ 1.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 1.5 กรัม, glycerol 15 มิลลิลิตร, Bacto agar 15 กรัม) ด้วยวิธี streak plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 365 นาโนเมตร หากตรวจพบการเรืองแสงให้ปฏิกิริยาเป็นบวก หากไม่พบการเรืองแสงให้ปฏิกิริยาเป็นลบ

ค. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase activity)

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นใช้ loop ขูดโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 2 loopfull มาเกลี่ยลงในหยดของ 3% H_2O_2 ถ้าเกิดฟองแก๊สขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดฟองแก๊ส แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

ง. ทดสอบการเจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic growth)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Hugh and Leifson (ปริมาตร 1 ลิตร: Bacto peptone 2 กรัม, NaCl 5 กรัม, KH_2PO_4 0.3 กรัม, Bromothymol blue 0.03 กรัม, Bacto agar 3 กรัม) ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ stab inoculate แบ่งออกเป็น 2 การทดสอบ คือ ปิดทับด้วยพาราฟินและไม่ปิดทับด้วยพาราฟินที่นึ่งฆ่าเชื้อบนผิวหน้าอาหารทดสอบจำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าสีอาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอดที่ปิดทับด้วยพาราฟินและไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน บันทึกผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าสีอาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน บันทึกผลการทดสอบเป็นลบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2 LOPAT test

ก. การสร้าง levan (levan production)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient sucrose agar (NSA) (ปริมาตร 1 ลิตร: Beef extract 3 กรัม, Bacto peptone 5 กรัม, Sucrose 50 กรัม, Bacto agar 15 กรัม) ด้วยวิธีการ streak plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะนูนและเป็นเมือกเยิ้ม (mucoid colony) บันทึกผลการทดสอบเป็นบวก หากไม่ปรากฏลักษณะดังกล่าวบันทึกผลการทดสอบเป็นลบ

ข. ปฏิกิริยาออกซิเดส (oxidase reaction)

ใช้สำลีพันก้านปลอดเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาป้ายหรือถู (rab) บนแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการบันทึกการเปลี่ยนสีภายใน 10 วินาที ถ้าปรากฏสีม่วงให้ปฏิกิริยาเป็นบวก และหากไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงให้ปฏิกิริยาเป็นลบ

ค. ทดสอบการเน่ากับหัวมันฝรั่ง (pectolytic activity)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NA ด้วยวิธีการ streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของหัวมันฝรั่งด้วย 10% clorox แช่นาน 10 นาที จากนั้นใช้มีดปลอดเชื้อตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม แล้วใช้ forcep ย้ายชิ้นมันฝรั่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่สะอาดและปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ loop ลนไฟให้ร้อนแดง ปล่อยให้เย็น แล้วนำมาขูดโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษามา 1 loopfull และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (สำหรับใช้เป็น control) ทาบนชิ้นมันฝรั่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว เสร็จแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าชิ้นมันฝรั่งที่ถูกทาด้วยเชื้อแบคทีเรียมีอาการเน่าบันทึกผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าชิ้นมันฝรั่งไม่แสดงอาการเน่าบันทึกผลการทดสอบเป็นลบ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

ง. การไฮโดรไลส์ arginine (arginine hydrolase activity)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Thornley's medium (ปริมาตร 1 ลิตร: Bacto peptone 1 กรัม, NaCl 5 กรัม, K_2HPO_4 0.3 กรัม, L(+) arginine HCl 10 กรัม, Phenol red 0.01 กรัม, Bacto agar 3 กรัม pH 7.2) ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารทดสอบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ stab inoculate จากนั้นใช้ปิเปตดูดพาราฟินที่นึ่งฆ่าเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหารทดสอบ จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ ป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้าสีของอาหารทดสอบเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีชมพูหรือแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก แต่ถ้าอาหารทดสอบไม่เปลี่ยนเป็นสีดังกล่าวให้ผลการทดสอบเป็นลบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จ. การทดสอบ Hypersensitivity reaction (HR) กับใบยาสูบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ บนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแล้วใช้ loop ขูดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความขุ่นเมื่อวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 โดยใช้กระบอกเข็มฉีดยาพลาสติกที่ไม่มี syringe ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต, สารแขวนลอยเชื้อ Aac. (สำหรับใช้เป็น positive control) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วออกแรงอัดสารแขวนลอยแบคทีเรียหรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้เข้าไปในเนื้อเยื่อใบพืชทดสอบ (ด้านใต้ใบ) ซึ่งสังเกตโดยเห็นรอยช้ำน้ำแผ่เข้าไปในเนื้อเยื่อใบยาสูบ *Nicotina tabacum* cv. White barley อายุ 2 เดือน จากนั้นนำพืชทดสอบใส่ในกล่องพลาสติกที่ทำความสะอาดอย่างดี พร้อมกับทำการสเปรย์น้ำให้ความชื้นให้ทั่วทั้งขอบข้างในและฝากล่องพลาสติก ปิดฝากล่อง แล้วนำไปไว้ในห้องอุณหภูมิประมาณ 28 ^{0}ซ ถ้าภายใน 24 ชั่วโมง ใบยาสูบที่ถูกอัดสารแขวนลอยแบคทีเรียเข้าแสดงอาการเนื้อเยื่อตายอย่างรวดเร็วและไม่ลุกลามต่อไปอีก บันทึกผลการทดสอบเป็น tobacco HR แต่ถ้าใบ

ยาสูบที่ถูกอัดสารละลายเชื้อแบคทีเรียเข้าไปไม่มีอาการดังกล่าวให้ผลการทดสอบเป็น no tobacco HR หลังจากนั้นประมาณ 2-3 วัน ใบยาสูบที่ไม่แสดงอาการ HR มีจุดเนื้อเยื่อตายแผ่ขยายออกไปและมีวงเหลืองล้อมรอบ บันทึกผลการทดสอบเป็น

6. การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอาหารโดยวิธีกึ่งอัตโนมัติ (Bioloq™)

เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการจำแนกตามข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 แล้ว ทำการเลือกไอโซเลตที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ ไอโซเลต MeFS001, CuFS015 และไอโซเลตที่แตกต่างออกไป ได้แก่ ไอโซเลต ToFS001, SqFS005, PeFS009, PeFS010, PeFS011, MeFS036, MeFS037, CorFB001, CeFL001, OrFL001 และ SoilF4 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบแกรมด้วย 3% KOH เพื่อเลือก Biolog plate สำหรับแบคทีเรียแกรมลบใช้ GN2 จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ความขุ่นเหมาะสมกับประเภทของเชื้อจากการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส โดยใช้สำลีพันก้านปลอดเชื้อขูดโคโลนีเชื้อแบคทีเรียมาละลายใน fluid for Biolog™ (ปริมาตร 600 มิลลิลิตร: Sodium cloride 2.4 กรัม, Pluronic-F68 0.18 กรัม, Gellan gum 0.12 กรัม) เชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นบวกจัดเป็นกลุ่ม non-enteric จะต้องเตรียมสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความขุ่นที่ 52%T ด้วยเครื่องวัดความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียส่วนแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นลบ จัดเป็นกลุ่ม enteric จะต้องเตรียมสารละลายแบคทีเรียให้ได้ความขุ่นที่ 61%T แล้วทำการปิเปตสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียหยอดลงใน Biolog plate หลุมละ 150 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 ^{0}ซ เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง *microstation reader*

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene

7.1 การสกัด genomic DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว NB อายุ 16-18 ชั่วโมง ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ลงในหลอด microcentrifuge 1,500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วย STE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 1 นาที เมื่อได้เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เติม STE buffer ลงไปในหลอด 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยการเติม 10% SDS 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกกลับไปกลับมา 10 ครั้ง นำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที แล้ววางหลอดบนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสลงในหลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน

ผสมให้เข้ากัน โดยการผลิกกลับไปมา 20 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พลิกกลับไปมาเป็นครั้งคราว ประมาณ 10 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเก็บส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ 400 ไมโครลิตร จึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 99.8% ethanol ในอัตราส่วน 2 เท่า ของปริมาตร ผสมเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ นาน 20 นาที ดูดน้ำใสทิ้งไป เก็บตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง คว่ำหลอดไว้บนกระดาษทิชชูปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร แบ่งสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจวัดความเข้มข้นโดยใช้ 5 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำ 495 ไมโครลิตร สำหรับนำไปวัดค่าการดูดซับด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และแบ่งอีก 5 ไมโครลิตร สำหรับตรวจดูคุณภาพดีเอ็นเอโดย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที จึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ด้วย UV transilluminator แล้วทำการบันทึกภาพ สารละลายดีเอ็นเอที่เหลือนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 ^{0}ซ เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

7.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

สังเคราะห์ส่วน 16S rRNA gene โดยแบ่ง genomic DNA จำนวน 1 ไมโครลิตร มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่เป็นตัวแทนกลุ่ม โดยใช้ universal primers forward (fD1) 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' และ reverse (rD1) 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3' โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้

- 5X Taq buffer	5 ไมโครลิตร
- 2.5 mM $MgCl_2$	2 ไมโครลิตร
- dNTP mixed (2.5 mM each)	2 ไมโครลิตร
- fD1 primer (50 pmol)	1 ไมโครลิตร
- rD1 primer (50 pmol)	1 ไมโครลิตร
- genomic DNA (200 ng/μl)	1 ไมโครลิตร
- *Taq* DNA polymerase	0.2 ไมโครลิตร
- dH_2O (sterile)	12.8 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนดังนี้

Step 1) initial denaturation	94 ^{0}ซ นาน 4 นาที	จำนวน 1 รอบ
Step 2) denaturation	94 ^{0}ซ นาน 1 นาที	
annealing	67 ^{0}ซ นาน 1 นาที	
extension	72 ^{0}ซ นาน 2 นาที	จำนวน 35 รอบ
Step 3) final extension	72 ^{0}ซ นาน 10 นาที	จำนวน 1 รอบ

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยนำโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้รับจากปฏิกิริยา PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร มาแยกขนาดบน 1% agarose gel โดยเทคนิค gel electrophoresis

7.3 การทำ 16S rDNA cloning

ตัดเจลที่มีแถบ PCR products ขนาดใกล้เคียงกับ 1,500 bp ซึ่งเป็นขนาดชิ้นส่วน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนกลุ่ม flurescent *Pseudomonas* มาแยกสกัดดีเอ็นเอด้วย Wizard® SV Gel and PCR clean up System (Promega) แล้วนำดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ไปโคลนเข้าในพลาสมิดพาหะ pGEMT®-T easy (Promega) ตามระบบของ TA cloning system ตามที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาและขั้นตอนดังต่อไปนี้

ปฏิกิริยาการทำ ligation มีดังนี้

- T4 DNA ligation 2X buffer	5 ไมโครลิตร
- pGEMT®-T easy vector (50 ng)	1 ไมโครลิตร
- PCR product	3 ไมโครลิตร
- T4 DNA ligase	1 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าไปในเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ^{0}ซ นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ ligation reaction ออกจากเครื่อง Thermal cycler แล้วแบ่ง ligation reaction ออกเป็น 2 ส่วนๆ ละ 5 ไมโครลิตร นำแต่ละส่วนใส่ในหลอด microcentifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วางบนน้ำแข็ง แล้วเติม competent cells (*E. coli* strain JM109) ที่เตรียมใหม่ลงไปปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปลาย tip คนเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง นาน 20 นาที จึงนำไปทำ heat shock โดยการแช่หลอด microcentrifuge ที่มีส่วนผสมของ ligation reaction และ competent cells ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 ^{0}ซ นาน 45 วินาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็งทันที นาน 20 นาที จึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ลงไป 950 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ฉ) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

แบ่งสารแขวนลอยเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร SOC หยดลงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ย (spread) ให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ เป็นเวลา 14-17 ชั่วโมง จึงเก็บโคโลนีของ recombinant *E. coli* strain JM109 ที่เกิดขึ้นบนอาหารคัดเลือก เพื่อนำมาวิเคราะห์หาโคลน (clone) ที่ต้องการวิเคราะห์ขนาดพลาสมิด ซึ่งสามารถทำได้โดยการนำ recombinant *E. coli* strain JM109 ทุกโคลน มาแยกสกัดส่วน recombinant plasmid ออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี alkaline lysis (ภาคผนวก จ) (Sambrook et al., 1989) แล้วจึงตัดแยก recombinant plasmic ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 3 ชั่วโมง ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis บน agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาพ 0.5X TBE และกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 50 นาที แล้วจึงยอมเจลด้วยสารละลาย EtBr นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที จึงนำไปตรวจสอบการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator

7.4 วิเคราะห์รูปแบบของ DNA fingerprint ของส่วน 16S rRNA gene

นำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของ 16S rDNA ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี automated DNA sequencing ตามระบบ dideoxy chain determination โดยใช้บริการจากสถาบันจีโนม แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S rDNA ที่ได้รับมาวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแต่ละโคลนที่เป็นตัวแทนของกลุ่มเชื้อที่นำมาศึกษา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม CLC gene work bench เพื่อระบุจีนัส ชนิด หรือสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำการศึกษา

8. การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ของ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค rep-PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค BOX-PCR (BOXAIR primers) โดยนำ genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค BOX-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR 5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3' ผสมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังนี้

- 5X Taq buffer	5 ไมโครลิตร
- 2.5 mM $MgCl_2$	4 ไมโครลิตร
- dNTP mixed (2.5 mM)	4 ไมโครลิตร
- BOXAIR (50 pmol)	2 ไมโครลิตร
- genomic DNA (100 ng/µl)	2 ไมโครลิตร
- *Taq* DNA polymerase	0.6 ไมโครลิตร
- dH_2O (sterile)	7.4 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนดังนี้

Step 1)	initial denaturation	95 ^{0}ซ นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ
Step 2)	denaturation	90 ^{0}ซ นาน 30 วินาที
	annealing	53 ^{0}ซ นาน 1 นาที
	extension	65 ^{0}ซ นาน 8 นาที จำนวน 35 รอบ
Step 3)	final extension	65 ^{0}ซ นาน 16 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว โดยนำโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้รับจากปฏิกิริยา PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร มาแยกขนาดบน 1.5% agarose gel ใน 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 60 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide บันทึกภาพรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล ภายใต้ gel documentation วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.0

9. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ด้วยระบบ polyphasic taxonomy

นำข้อมูลต่างๆ ที่ได้รับในข้อ 7.1, 7.2, 7.3 และข้อ 7.4 มาร่วมกันในการจัดจำแนกเชื้อทั้งในระดับจีนัส ชนิดและหรือสายพันธุ์ คล้ายกับระบบการวิเคราะห์แบบ numerical taxonomy จากการใช้คุณสมบัติด้านต่างๆ มาประมวลผลร่วมกัน โดยแปลงข้อมูลให้เป็นสัญญาณดิจิตอล แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ในลักษณะ phylogenetic relaionships โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.0

10. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa AR*-TS 003

10.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นแอนติเจน

นำ single colony เชื้อแบคทีเรียที่จำแนกเบื้องต้นโดย Biolog™ ได้ ID คือ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 1 ไอโซเลต คือ AR-TS003 (แยกได้จากต้นกล้ามะเขือเทศ) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NB บนเครื่อง shaker ที่อุณหภูมิ 28 ^{0}ซ ข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) NaCl จำนวน 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย PBS นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic sonicator ใช้อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บใส่หลอด microcentrifuge นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่ายทดลอง

10. 2 การวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการ Bradford

นำ Bovine serum albumin มาชั่งให้ได้ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน (ใช้เครื่อง vortex ช่วยในการผสมสาร) จากนั้นเจือจางครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) เพื่อใช้เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 กรัมต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร เติมในสารละลาย protein reagent 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน (ใช้น้ำกลั่นเป็นค่า blank control) จากนั้นนำ sonicated bacterial cell มาวัดหาปริมาณโปรตีน โดยทำเช่นเดียวกันกับวิธีการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐานแล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่จากกราฟปริมาณโปรตีมาตรฐาน (BSA) ที่ได้ทำไว้

10.3 การเก็บ normal serum และการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลอง

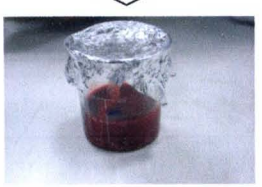
นำกระต่ายเพศเมียพันธุ์ New Zeland White มาเจาะเก็บเลือด เพื่อใช้เป็น normal serum ก่อนที่จะทำการฉีดแอนติเจนให้กับกระต่ายทดลอง หลังจากนั้น 7 วัน เตรียมการฉีดกระต่ายโดยเริ่มจากการใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย sonicated bacterial cell มา 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่ในกระบอกฉีดยาที่ยังไม่ได้ใช้ผสมกับ freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (ไม่ควรเกิน 2 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Homogenizer ปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน (เนื้อสารมีสีขาว เมื่อทดลองหยดในน้ำเปล่ายังคงเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนและจะค่อยๆ กระจายตัวออก) นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังท่อนบนของกระต่าย จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน และอีก 2 ครั้ง ใช้สารละลาย sonicated bacterial cell เพียงอย่างเดียวฉีดเข้าที่เส้นเลือดข้างใบหูอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน หลังจากฉีดครั้งสุดท้าย 10 วัน ทำการเก็บเลือดกระต่ายทุกสัปดาห์โดยใช้สำลีชุบ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดทำความสะอาดเส้นเลือดกลางใบหู ใช้มีดโกนที่คมและสะอาดโกนขนบริเวณเส้นเลือดออก ใช้นิ้วนวดเส้นเลือดที่จะทำการเจาะเก็บเลือดเพื่อให้เลือดไหลเวียนได้ดีจนสังเกตเห็นเส้นเลือดกลางใบหูแดงนูนขึ้นอย่างชัดเจน ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 แทงเข้าไปในเส้นเลือดให้ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใช้บีกเกอร์ขนาด 40 มิลลิลิตร รองรับเลือด เมื่อได้เลือดปริมาณที่เพียงพอแล้วค่อยๆ ดึงเข็มออกพร้อมกับใช้สำลีกดตรงรอยแผลเพื่อห้ามเลือด นำเลือดที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปไว้ในตู้เย็น (4 ^{0}ซ) ข้ามคืน ใช้ไมโครปิเปตดูดเก็บน้ำเลือดส่วนที่เป็นน้ำใสใส่ในหลอด microcentrifuge เติม NaN_3 0.02% และ50% (ปริมาตรต่อปริมาตร) กลีเซอรอล (ดังภาพที่ 1) นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}ซ และส่วนที่จะใช้ตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมเก็บ

ไว้ที่ 4 ^{0}ซ ทำการเก็บเลือดทุกสัปดาห์ เป็นจำนวน 12 ครั้ง (ทำการฉีดเฉพาะ sonicated bacterial cell กระตุ้นอีกครั้งหลังทำการเก็บเลือดไปแล้ว 7 ครั้ง เว้นระยะอีก 10 วัน จึงทำการเก็บเลือดต่อจนครบจำนวนครั้ง)

กระต่ายเพศเมียพันธุ์ New Zealand White

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 แทงเข้าเส้นเลือดกลางใบหู

ใช้สำลีกดแผลแล้วค่อยๆ ดึงเข็มออก



ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเลือดส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge

ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการเก็บ Normal serum

10.4 การตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัม

10.4.1 การตรวจหาค่า titer ของแอนติซีรัม (titer test)

นำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาหาค่า titer ด้วยวิธีการ indirect ELISA โดยทำการเจือจาง sonicated bacterial cell ของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 (ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียใน glycerol stock เท่ากับ 48.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วย coating buffer ครั้งละ 2 เท่า ให้ได้สารละลายแบคทีเรียความเข้มข้น 40, 20, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นหยอดลงใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เรียงตามแนวสดมภ์ (แนวตั้ง) จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย และสดมภ์สุดท้ายหยอด coating buffer นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ ข้ามคืนหรือนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง จากนั้นเจือจางแอนติซีรัมใน conjugated buffer ครั้งละ 2 เท่าในอัตราส่วน 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000, 1:64,000, 1:128,000, 1:256,000, 1:512,000, 1:1,024,000 และ 1:2,048,000 เจือจาง normal serum อัตราส่วน 1:1,000 เป็นการทดลองเปรียบเทียบ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นหยอดใน ELISA plate เรียงตามแนวนอนจากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย และสุดท้ายหยอดหลุมด้วย conjugated buffer จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ plate ใส่กล่องชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง เตรียมสารละลาย IgG anti-rabbit conjugated alkaline phosphatase อัตราส่วน 1:40,000 เท่าโดยปริมาตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายหยอดใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ plate ใส่กล่องชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง เตรียมสารละลาย p-nitrophenylphosphate conjugate ในสารละลาย substrate buffer อัตราส่วน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายหยอดใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ ELISA plate บ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่าครั้งที่ 1 ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องอีก 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าครั้งที่ 2 แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M KOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร

10.4.2 การตรวจความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (Sensitivity test)

นำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาตรวจความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายด้วยวิธีการ indirect ELISA โดยทำการเจือจาง sonicate bacterial cell ของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ไอโซเลต AR-TS003 (ความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียใน glycerol stock เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วย coating buffer ครั้งละ 2 เท่า ให้ได้สารละลายแบคทีเรียความเข้มข้น 20, 10, 5,

2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039 และ 0.0195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นหยอดลงใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เรียงตามแนวสดมภ์ (แนวตั้ง) จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย และสดมภ์สุดท้ายหยอด coating buffer นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ ข้ามคืนหรือนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง จากนั้นเจือจางแอนติซีรัมใน conjugate buffer 2 ระดับ คือ อัตราส่วนการเจือจางที่ 1:1,000 เท่าโดยปริมาตรของแอนติซีรัมทั้ง 12 lots และอัตราส่วนการเจือจางแอนติซีรัม lot 1-12 ดังนี้ 1:128,000, 1:64,000, 1:32,000, 16,000, 128,000, 64,000, 64,000, 64,000, 64,000, 32,000, 32,000 และ 32,000 เท่าโดยปริมาตร ตามลำดับ แล้วเจือจาง normal serum อัตราส่วน 1:1,000 เป็นการทดลองเปรียบเทียบ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นหยอดใน ELISA plate เรียงตามแนวนอนจากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย และสุดท้ายหยอดหลุมด้วย conjugated buffer จำนวน 200 ไมโครลิตร/หลุม นำ plate ใส่กล่องชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง เตรียมสารละลาย IgG anti-rabbit conjugate alkaline phosphatase อัตราส่วน 1:40,000 เท่าโดยปริมาตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายหยอดใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ plate ใส่กล่องชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 5 นาทีต่อครั้ง เตรียมสารละลาย p-nitrophenylphosphate conjugate ในสารละลาย substrate buffer อัตราส่วน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายหยอดใน ELISA plate จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ ELISA plate บ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปอ่านค่าครั้งที่ 1 ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องอีก 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าครั้งที่ 2 แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M KOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร

10.4.3 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ในการตรวจหาเชื้อเป้าหมาย นำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาตรวจสอบระดับความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ *P. aeruginosa* AR-TS003, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*-KK9, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas campestris* pv.*campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Serratia marcescens*, เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่แยกได้ต้นกล้าของพริกแสดงอาการใบจุดสีดำบนใบเลี้ยงเมื่อตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยเทคนิค blotter test ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ยังไม่ได้จำแนกคุณสมบัติจัดเป็นกลุ่ม unknown ทั้งกลุ่มโคโลนีสีขาวและโคโลนีสีเหลือง จำนวน 17 ไอโซเลต เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีค่าการดูดซับแสงที่ 600

นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ใส่ลงในหลุมของ ELISA plate 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำ 2 หลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง บ่มข้ามคืนที่ 4 ^{0}ซ แล้วนำมาตรวจสอบตามขั้นตอนของ indirect ELISA (เพชรรัตน์และประภาษ, 2544) โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* AR-TS003 ในอัตราส่วน 1:1,000 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของ goat antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate อัตราส่วน 1:40,000 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของ substrate p-nitrophenyl 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่อง ELISA reader (Bio Rad Model 550) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร