

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลการทดลอง	37
วิจารณ์ผลการทดลอง	70
สรุปผลการทดลอง	79
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	81
ภาคผนวก	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ลักษณะอาการผิดปกติที่พบในส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเซ้ง และผลการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR ของส้มที่แสดงอาการแตกต่างกันที่เก็บมาจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย 38
2	แบคทีเรียและแบคทีเรียโรคพืชที่มียีน <i>rpIJ</i> มีรายงานไว้แล้วใน GenBank นำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpIJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย 48
3	จำนวนตัวอย่างของส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเซ้งที่มีการเก็บมาจากแหล่งต่างๆ และผลของการตรวจสอบเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ในส้มชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค Dot blot hybridization โดยมีการนำดีเอ็นเอของพืชอื่น และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ เชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> และเชื้อ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> และเชื้อ <i>Escherichia coli</i> เพื่อใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และ DNA probes 64
4	ตัวอย่างของส้มที่เก็บมาจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งนำมาจากจังหวัดต่างๆ เมื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> โดยวิธี Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay 69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 รายชื่อพืชอาศัยสำหรับแมลงพาหะเพลี้ยไก่อั่ว <i>Diaphorina citri</i>	100
ก2 รายชื่อพืชอาศัยสำหรับเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	104
ค1 การเจือจาง bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	109
ค2 ค่าโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่วัดได้จากการดูดกลืนแสง OD ₅₉₅ ที่ความเข้มข้นของ BSA ที่แตกต่างกัน	110
ฉ1 กำหนดการฉีดแอนติเจน RPLJ โปรตีน จากเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> และการเก็บแอนติซีรัม	117

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่งที่พบบนใบส้มโอ ส้มเขียวหวาน ซึ่งเกิดจากเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	39
2 การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> จากดีเอ็นเอที่สกัดจากส้มที่เป็นโรคแสดงอาการแบบต่างๆ มีขนาด 513 คู่เบส	40
3 การสังเคราะห์ <i>rplJ</i> gene โดยใช้เทคนิค PCR สังเคราะห์โดยใช้ forward primer GB และใช้ reverse primer GE แยกขนาดดีเอ็นเอใน 0.8% agarose gel	43
4 ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยพลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy / <i>rplJ</i> gene ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ที่แยกได้จากส้มโอ และย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (GGATCC) และ <i>Eco</i> RI (GAATTC) แยกขนาดดีเอ็นเอใน 0.7% agarose gel	45
5 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสม pGEX – <i>rplJ</i> สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH 5 α ที่คัดเลือกได้บนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธี Alkaline Lysis แล้วย่อยพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยใช้ 0.8% agarose gel	46
6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ที่ได้มีการฝากไว้ใน GenBank (DQ 852665)ซึ่งเชื่อมต่อกับ GST ใน pGEX-2T expression vector ในตำแหน่ง <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI	50
7 การเปรียบเทียบการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ที่อยู่ใน pGEX-2T expression vector สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter africanus</i> โดยใช้โปรแกรม Align X ใน Vector NTI version 9 (Invitrogen)	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
8 การสร้าง Phylogenetic tree เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rplJ</i> ของเชื้อแบคทีเรียโรคพีชอื่น โดยใช้โปรแกรม Treeconw	52
9 การสังเคราะห์คอมบินেন্টโปรตีน GST – RPLJ ในเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 α โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – <i>rplJ</i> จากนั้นชักนำด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค SDS - PAGE ย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250	55
10 การแยกโปรตีน GST – RPLJ ออกจากตะกอนเซลล์ของเชื้อ <i>E.coli</i> ด้วย 8M Urea โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – <i>rplJ</i> จากนั้นชักนำด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนใสและส่วนของตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค SDS- PAGE ย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250	56
11 การแยกโปรตีน GST – RPLJ ออกจากโปรตีนของเชื้อ <i>E.coli</i> ด้วยการตัดแถบโปรตีน และแยกโปรตีนออกจากเจลและนำไปใส่ถุง dialysis และแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ เป็นเวลา 200 นาที และนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250	57
12 การสังเคราะห์ DNA probes ของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> เพื่อใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรครินนึ่งที่อยู่ในพืชต่อการจับกับดีเอ็นเอสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในส่วนของยีน <i>rplJ</i> ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ dNTPs ปกติ ผสมกับ DIG-11-dUTP ตรวจสอบผลโดยใช้ 0.8% agarose gel	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot blot hybridization โดยใช้ <i>rplJ</i> – probes ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง	62
14 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot Blot Hybridization โดยใช้ <i>rplJ</i> – probes ในการตรวจสอบความจำเพาะของ probe	63
15 การทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้โดยอ่านค่าของปฏิกิริยาด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Programmable Microplate Reader MODEL DV 990 BV 4, USA) ที่ค่า OD ₄₀₅ นาโนเมตร	67
16 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RPLJ โปรตีนของเชื้อ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLA) ที่แอนติซีรัมต่อ CLA สามารถทำปฏิกิริยาได้โดยพบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม	68
ภาพผนวกที่	
ก1 ค่า Standard Curve ของโปรตีน BSA ($\mu\text{g/ml}$) โดยวัดที่ค่าความดูดกลืนของแสง 595 นาโนเมตร (OD ₅₉₅)	110
จ1 แสดงโครงสร้างของ pGEM [®] -T Easy cloning vector และตำแหน่งของ sequence ต่างๆที่อยู่บน vector	114
จ2 ตำแหน่ง promoter และ multiple sequence ของ pGEM [®] -T Easy cloning vector ด้านบนแสดง sequence ที่เป็น RNA synthesized by T7 RNA polymerase ด้านล่าง จะเป็น RNA synthesized by SP6 RNA polymerase	115
จ3 pGEX-2T Expression Vector ที่เป็น circular map และมีตำแหน่งของ multiple cloning site	116