

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างส้มในแปลงที่มีลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่ง

ทำการเก็บตัวอย่างส้มโอที่มีลักษณะอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และที่บริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะอาการแฉับสีเขียวกระจาย และใบมีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี จากสวนส้มโอ ที่จังหวัดจันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากกิ่งพันธุ์ของส้มโอที่ยังไม่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคโดยใบจะมีสีเขียว ที่ใบอ่อนจะมีลักษณะของเส้นกลางใบที่โปร่งแสงเล็กน้อย จากโรงเรียนของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นำมาจากจังหวัดแพร่ จำนวน 50 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างส้มเขียวหวานที่มีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี ใบเหลือง และที่ใบมีแฉับสีเขียว ใบมีลักษณะอาการที่ลดรูป จากคลองสิบสาม จังหวัดปทุมธานี จำนวน 8 ตัวอย่าง เก็บส้มเขียวที่มีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี ใบมีอาการเหลือง จากจังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 2 ตัวอย่าง และ เก็บตัวอย่างของส้มโอที่มีลักษณะอาการเส้นกลางใบใส (vein clearing) ใบเหลือง เส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่างไม่ชัดเจน (mottle) จากจังหวัดปราจีนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบส้ม

แยกสกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง คัดแปลงตามวิธีของ Murray and Thompson (1980) โดยตัดชิ้นส่วนเส้นกลางใบพืชเป็นโรคให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาบดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ใช้เส้นกลางใบส้ม 0.1 กรัม บดจนละเอียด จากนั้นนำมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม 500 ไมโครลิตร CTAB buffer (2% Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), 100mM Tris-HCl, pH8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 1%PVP, 1% β -mercaptoethanol) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65^o ซ นาน 15 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,171xg นาน 10 นาที แล้วดูดน้ำใสมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่และเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,171xg นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนมาล้างด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,171xg นาน 3 นาที ดูดแอลกอฮอล์ที่เหลือทิ้งให้หมดและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20^o ซ เพื่อศึกษาต่อไป

3. การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* เทคนิค PCR

ทำการออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน *rplJ* ยีน โดยออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank accession number M94319 เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ตามวิธีของ Hoguelet *et al.* (1999) นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* โดยการทำ master mix ประกอบด้วย 10x Buffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl pH 8.3) 5 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTPs 4 ไมโครลิตร, 25mM MgCl₂ 3 ไมโครลิตร, *Taq* DNA Polymerase (4 unit/μl) 1 ไมโครลิตร และเติมไพรเมอร์ 10 μM GB forward primer ที่มี *Bam*HI linker (5' GGA TCC AAT AGA CAA GGA AAG AGC G 3') และ 10 μM GE reverse primer ที่มี *Eco*RI linker (5' GAA TTC ACC TTG CTG ATT TTT ATC CAC 3') สำหรับสังเคราะห์ยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* อย่างละ 2 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอรวมจากการสกัดได้ในข้อที่ 1 (~ 50 ng) 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่อง Thermal Cycler (PERKIN ELMER GeneAmp PCR system 2400, USA) โดยตั้งโปรแกรม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94° ซ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และอุณหภูมิ 94° ซ เป็นเวลา 30 วินาที และ 62° ซ เป็นเวลา 30 วินาที และ 72° ซ เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72° ซ เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ เพื่อเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอในส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหลังจากการทำ PCR แล้วมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 0.8 % agarose gel ใน 1x TAE buffer จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลาย Ethidium bromide (10 μg/L) ประมาณ 10 นาที แล้วนำมาล้างน้ำก่อนที่จะตรวจดูแถบดีเอ็นเอบน UV-transilluminator (Sambrook *et al.*, 1989)

4. DNA Manipulations

4.1 การเชื่อมต่อยีน *rplJ* เข้ากับพลาสมิดพาหะ

เชื่อมต่อยีน *rplJ* ที่ได้จาก PCR เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega®) ด้วยเอนไซม์ T₄ DNA Ligase (Promega®) ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ พลาสมิดพาหะ pGEM-

T Easy (50 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร ขึ้น *rpI* (200 นาโนกรัม) 3 ไมโครลิตร 2 X Rapid ligation buffer (60mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polyethylene glycol (MW8000, ACS Grade), pH 7.8) 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 weiss unit/μl) เติมน้ำให้ครบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ ชั่วโมง (16-18 ชั่วโมง) จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่ได้ย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย (transformation) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธี CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989)

4.2 การสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย

สกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979) โดยเลือกโคโลนีสีขาว ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมมาเลี้ยงในอาหาร 2XYT Broth 5 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน (100 มก/มล) 5 ไมโครลิตร ย้ายลงหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 1,680xg นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วย solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) 100 ไมโครลิตร นำไปผสมให้ตะกอนละลาย เติมน้ำ solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง เติมน้ำ solution III (5M Potassium acetate, glacial acetic acid, pH 5.2) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,720x g นาน 10 นาที ที่ 4 ° ซ ดูดส่วนใส 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ที่เตรียมไว้ เติมน้ำแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาตรเดิม นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,720xg นาน 10 นาที ที่ 4 ° ซ เทของเหลวทิ้ง เติมน้ำ 70 % เอทิลแอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,720xg นาน 5 นาที ที่ 4 ° ซ เทของเหลวทิ้ง แล้วปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำบริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตรที่เติม RNase (10 μg/ml)

4.3 การแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจล

วิธีการแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลนั้นใช้วิธีการของ Yue and Orban (2001) โดยทำการตรวจสอบดีเอ็นเอใน 1% อะกาโรสเจลใน 1XTAE buffer และตัดเจลในตำแหน่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เราต้องการ นำเจลที่ตัดแล้วมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ 6M NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักรวมของเจลที่ขังได้ อุณหภูมิ 65 ° ซ นาน 5 นาที หรือจนกว่าเจลจะหลอมละลาย จากนั้นนำมาผ่าน silica column (Promega®) และนำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วประมาณ 5 นาที แล้ว

ล้างด้วย Wash solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, and 50% ethanol, pH 7.5) จำนวน 650 ไมโครลิตร 2 ครั้ง นำ silica column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,720 g นาน 1 นาที โดยที่ดีเอ็นเอนั้นจะจับอยู่กับ silica จากนั้นนำ silica column มาวางในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,720xg ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที

4.4 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเข้าบ้านให้อยู่ในสภาพพร้อมรับพลาสมิด (Competence cell)

เตรียมตามวิธีของ Hanahan (1983) โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหารเหลว LB 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ย้ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว LB ใหม่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.25-0.3 นำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,820xg ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนในน้ำแข็งด้วย RFI buffer (100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂.4H₂O; 30 mM potassium acetate; 10 mM CaCl₂.2H₂O; 15% glycerol, ปรับ pH ให้ได้ 5.8 และกรองด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกรองเชื้อ) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C นำไปแช่น้ำแข็ง 10 นาที นำมาแยกเซลล์ออกจากสารละลายโดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,820 xg ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนด้วย RFII buffer (10 mM MOPS; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂; 15% glycerol, ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 0.2 M acetic acid และกรองด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อกรองเชื้อ) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C จากนั้นแบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร และเก็บ competence cell ไว้ที่ -80 $^{\circ}$ C

4.5 การย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเข้าบ้านและการคัดเลือก (Transformation and Selection)

ย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเข้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ด้วยวิธี CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989) ใน water bath 42 $^{\circ}$ C นาน 90 วินาที แล้วย้ายลงแช่น้ำแข็ง 2 นาที เติมหาอาหาร 2XYT Broth จำนวน 950 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่ 37 $^{\circ}$ C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 6,720xg นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้งและละลายตะกอนด้วย 2XYT Broth 200 ไมโครลิตร นำมาคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 mg/l) เติม 2% X-gal 40 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ้ำมคืน (16-24 ชั่วโมง) จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดที่มีจีนดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่โดยการคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อตรวจสอบจีนดีเอ็นเอเป้าหมายต่อไป (Sambrook *et al.*, 1989)

5. การเตรียมยีน *rplJ* และเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEX- 2T

นำพลาสมิดที่มีจีนยีน *rplJ* สอดแทรกอยู่ใน pGEM-T Easy คัดเลือกโคลนที่มีจีนดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI และนำจีนดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 513 คู่เบสมาทำให้บริสุทธิ์โดยทำตามวิธีในข้อ 4.3 จากนั้นนำยีน *rplJ* เข้าสู่ pGEX-2T expression vector (Amersham Bioscience) ที่มีขนาด 4.9 Kb ที่มียีนด้านสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินและมียีนของ *glutathione S-Transferase* (GST) อยู่ทางด้านปลาย 5' ของบริเวณที่ใช้โคลนยีนเมื่อมียีนที่สอดแทรกมีการแสดงออกเป็นโปรตีนจะได้ผลผลิตเป็นโปรตีนสองชนิดเชื่อมต่อกัน (fusion protein) ที่มี GST อยู่ทางด้าน N-terminus โดยการเปิด expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI เหมือนกับจีนยีน *rplJ* ก่อน จากนั้นนำยีน *rplJ* เชื่อมเข้าสู่ pGEX-2T expression vector โดยใช้เอนไซม์ *T*₄ DNA ligase ย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ด้วยวิธี CaCl_2 (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบโคลนที่มีจีนดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่โดยการสกัดพลาสมิดตามวิธี Alkaline lysis และตรวจสอบจีนยีนที่สอดแทรกด้วยการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดเหมือนเดิม

นำโคลนที่ตรวจสอบแล้วว่าจีนดีเอ็นเอเป้าหมายไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Lasergene 4.03 software package (DNASTAR, USA, WI; <http://www.dnastar.com/>) และใช้ Seqman ในการ assemble contigs ได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank โดยใช้โปรแกรม AlignX (Vector NTI 9, USA) และนำนิวคลีโอไทด์มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) ด้วยโปรแกรม Treecon (Van de Peer and De Wachter, 1993)

6. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ Recombinant Protein ในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดสายพสม pGEX-*rplJ* ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (100 mg/l) เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ย้ายเชื้อที่เลี้ยงลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 15 % ของอาหาร เลี้ยงเชื้อต่อไปโดยการเขย่าอีก 2 ชั่วโมง จนกระทั่งค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 จากนั้นเติม Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อ และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังจากที่เติม IPTG ที่ 2 4 และ 6 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์ (1 มิลลิลิตร) ไว้ที่ -20° ซ จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บในช่วงเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง จาก -20° ซ มาเติมน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร vortex ให้ตะกอนละลาย เติม 2x SDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β -Mercaptoethanol) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

7. การแยกสกัดโปรตีน GST – RPLJ ออกจากเซลล์แบคทีเรีย

นำเซลล์ที่ชักนำการผลิตโปรตีนในช่วงเวลา 4 ชั่วโมง (จากข้อ 6) เติม lysozyme ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำเซลล์ไปแช่ที่อุณหภูมิ -80° ซ เพื่อให้เซลล์แตกละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris – HCl pH 8.0, 8M Urea) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แช่ที่ -80° ซ นาน 15 นาที จากนั้นนำออกมาที่อุณหภูมิห้องจนละลายและเพื่อทำให้ดีเอ็นเอขาดอีกครั้งโดยผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 21 จนกระทั่งสารละลายไม่หนืด แล้วตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,600 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เก็บส่วนน้ำใส และนำไปตรวจสอบโปรตีนที่ได้โดยนำส่วนใส 100 ไมโครลิตร ไปต้ม นาน 10 นาที ใน 2x Loading dye 100 ไมโครลิตร และใช้ 15 ไมโครลิตรในการแยกบน SDS - PAGE ตรวจสอบผลโดยการย้อมเจลด้วย 0.3 M CuCl₂ เปรียบเทียบขนาดโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน ของบริษัท Fermentas (SM0431, Lithonia) ตัดเจลตรงบริเวณที่มีโปรตีนที่เราต้องการไปล้างด้วย destaining buffer (250mM EDTA pH 8.0, 500mM Tris- HCl, Lee *et al.*, 1987) นำเจลที่ได้ตัดเป็นชิ้นละเยื่อนำไปใส่ในถุง dialysis เติม Tris – glycine buffer 500 ไมโครลิตร นำถุงไปผ่านกระแสไฟฟ้าความต่าง

ศักย์คงที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที เพื่อให้โปรตีนเคลื่อนออกจากเจลด้วยเครื่อง Cosmo Bio นำโปรตีนที่ได้มาทำการ dialyze อีกครั้งด้วย 1X PBS เพื่อเจือจาง SDS จากโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C แบ่งโปรตีนที่ได้บางส่วนมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 15% SDS- polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ตรวจสอบขนาดโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

8. การตรวจสอบโปรตีนและวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

การเตรียมเจล SDS เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ Recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรียที่ดัดแปลงมาจาก Laemmli (1970)

8.1 การเตรียมเจล SDS PAGE

เตรียมเจลตามวิธีของ Laemmli (1970) ใช้อุปกรณ์ Hoefer Mini VE โดยเตรียมเจลระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองแผ่น ประกบแผ่นกระจกเข้าด้วยกันโดยใช้ spacer หนา 1 มิลลิเมตร คั่นกลางระหว่างแผ่นกระจก ตรวจสอบเพื่อไม่ให้มีรอยร้าว เตรียม 15 % separating gel ซึ่งเป็นเจลที่ใช้แยกโปรตีนจากตัวอย่าง เตรียมโดยใช้ 15% Polyacrylamide, 0.39M Tris – HCl pH 8.8, 0.1% Ammonium persulfate, 0.1% SDS ปริมาณด้วยน้ำให้ได้ 5 มิลลิเมตร เติม TEMED เป็นสารสุดท้ายเนื่องจากเป็นตัวที่ทำให้เจลแข็งตัว เทเจลลงในช่องกระจกที่เตรียมไว้ให้ได้ครึ่งหนึ่งของแผ่นกระจก แล้วปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบเท่ากันโดยใช้น้ำที่นิ่งมาเช็ดแล้ว เมื่อเจลแข็งตัวเทน้ำที่เติม 5 % stacking gel โดยเติมลงขอบด้านมุมกระจก จนเต็มขอบกระจก เสียบหวี (comb) โดยให้ขอบหวีห่างจากส่วนของ separating gel ประมาณ 5 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออกเบาๆ ทำให้เป็นช่องบรรจุตัวอย่าง นำแผ่นกระจกที่ได้ไปใส่ Tank buffer (0.025M Tris - HCl, 0.192M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) ใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ 50 โวลต์ 40 นาที จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกว่าสีของ bromophenol blue R250 จะหลุดออกเจลในแผ่นกระจก นำเจลที่ได้มาข้อมสีเพื่อตรวจสอบแถบโปรตีน

8.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนตรวจสอบใน SDS-PAGE

ตัวอย่างโปรตีนที่เก็บได้ในข้อ 6 มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ปั่นตกเก็บตะกอนเซลล์ ส่วนน้ำไล้ทิ้งและนำตะกอนเซลล์มาละลายในน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2X sample solubilizing buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoethanol, and 0.02% (w/v) bromophenol blue, 15% (v/v) glycerol) 50 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และนำตัวอย่างแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ในการตรวจสอบขนาดของโปรตีนใช้โปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาด (Fermentas®, Lithonia) จำนวน 12 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแยกในสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 30-45 นาที ในการแยกโปรตีนในเจลบน ส่วนเจลล่างใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง

8.3 การย้อมแถบโปรตีนใน SDS-PAGE ด้วย Coomassie brilliant blue R250

นำเจลที่ได้มาทำการย้อมเจลใน staining solution (0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250) ใน fixing solution (40% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid) ประมาณ 1 ชั่วโมง และล้างสีพื้นด้วยสารละลาย destaining solution I (40% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid in distilled water) นาน 1 ชั่วโมง และตามด้วย destaining solution II (5% (v/v) methanol and 7% (v/v) acetic acid in distilled water) นาน 30 นาที เขย่าบน shaker จนกระทั่งพื้นเจลใส และเห็นแถบโปรตีนติดสี น้ำเงินเด่นชัดขึ้น Molecular weight (M.W) ของโปรตีนที่ใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนมาตรฐานของบริษัท Fermentas

9. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (1976)

หาค่า Standard curve ที่ได้จะใช้โปรตีนมาตรฐาน BSA ในความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 $\mu\text{g/ml}$ (แสดงในตารางภาคผนวกที่ ค1) โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาเติม Bradford Reagent ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดโดยวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (OD_{595}) นำค่าที่ได้มาทำการ plot กราฟแต่ละความเข้มข้นของ BSA ที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นเพื่อใช้เป็น Standard curve จากนั้นวัดปริมาณโปรตีน RPLJ โดยเจือจางโปรตีนแบบ 10-fold dilution โดยนำโปรตีนที่ได้จากการเจือจางมาตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร นำมาเติม Bradford Reagent ในปริมาตร 900

ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดโดยวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (OD_{595}) โดยใช้ PBS buffer เป็น blank

10. การตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot Blot Hybridization

10.1 การติดฉลาก probe ด้วย DIG-11-dUTP โดยวิธี Polymerase Chain Reaction

ติดฉลาก probe โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยไพรเมอร์ GB และ GE ที่มีความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัม อย่างละ 1 ไมโครลิตร พลาสมิดสายผสมที่มียีน *rplJ* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัม จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10x buffer (200mM Tris-HCl, 500mM KCl pH 8.3) จำนวน 5 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ จำนวน 3 ไมโครลิตร, 10x of DIG-11-dUTP labeling kit (Roche®) จำนวน 5 ไมโครลิตร และ 2.5 U *Taq* DNA polymerase จำนวน 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้จำนวน 50 ไมโครลิตร โดยตั้งค่าของเครื่อง PCR และตรวจสอบผลเหมือนกับในข้อที่ 3

10.2 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค DNA Dot blot hybridization

การตรวจสอบเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยวิธี Dot blot hybridization (Hocquellet *et al.*, 1997) นำตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอแล้วหยดลงบนแผ่นเมมเบรน (High Bond N⁺, Roche®) ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร (~250 ng) และทำการ denature ดีเอ็นเอด้วย 0.25x SSC และ 0.25N NaOH และปล่อยให้แผ่นเมมเบรนแห้ง จากนั้น fix ให้ ดีเอ็นเอติดอยู่ในแผ่นเมมเบรนโดยใช้ UV นาน 2 นาที และนำเมมเบรนไปทำการ Pre-hybridizations ใน hybridization solution (5x SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS, 1% (w/v) blocking reagent, Roche®) ที่อุณหภูมิ 68° ซ นาน 1 ชั่วโมง และ hybridization ที่อุณหภูมิ 68° ซ นาน 12-18 ชั่วโมง ใน hybridization solution ที่เติม DIG-*rplJ* probe โดยที่ probe นั้นถูก denature แล้วด้วยความร้อน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย washing solution I (2xSSC, 0.1%SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ละครึ่ง 5 นาที และล้างด้วย washing solution II (0.1xSSC, 0.1%SDS) ที่อุณหภูมิ 65° ซ 2 ครั้ง ละครึ่ง 15 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการตรวจสอบโดยล้างด้วย washing buffer (100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.3%Tween 20) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาเติม 1% blocking reagent ใน blocking solution (0.1M Malic acid, 0.15M NaCl [pH 7.4], 1% blocking reagent) และนำไปแช่เบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่น

เมมเบรนมาเติม 1% blocking reagent ใน blocking solution ที่เติม anti-DIG-AP Fab fragment และเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย washing buffer จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างแผ่นเมมเบรนอีกครั้งด้วย detection buffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl; pH 9.5) นาน 5 นาที และในขั้นตอนสุดท้ายตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ chemiluminescent โดยการเติม CDP star (Roche®) จำนวน 1 ไมโครลิตร ใน detection buffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำ detection buffer ที่ผสมด้วย CDP star มาเคลือบบนผิวหน้าของแผ่นเมมเบรนโดยใช้เวลาประมาณ 3 วินาที และเอาออกจากแผ่นเมมเบรน จากนั้นทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (Kodak, Green 400 screen)

11. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

11.1 การเจาะเลือดเพื่อเก็บ normal serum

ใช้กระต่ายสีขาว ตาแดง พันธุ์ New Zealand White จากนั้นห่อกระต่ายในผ้าขนหนูให้กระชับ โพล์แต่ส่วนหัวออกมา หาเส้นเลือดแดงใหญ่ที่กลางใบหู จากนั้นเช็ดด้วย 70%แอลกอฮอล์ ดึงใบหูให้ตึงแล้วเจาะด้วยเข็มเบอร์ 21 เข้าหลอดเลือดแดงตรงตำแหน่งที่กำหนดโดยเริ่มจากปลายใบหูขึ้นมาประมาณ 1 ใน 2 ของความยาวของใบหูนับจากโคน เมื่อแทงเข็มเข้าหลอดเลือดแดง เลือดจะพุ่งออกจากโคนเข็ม ให้ใช้หลอดแก้วรองรับทันที หลังจากได้เลือดตามจำนวนที่ต้องการ ใช้สำลีกดเบาๆ บริเวณที่เข็มแทง แล้วดึงเข็มออก จากนั้นกดบริเวณดังกล่าวไว้สักครู่ (ประมาณ 2-5 นาที) จนแน่ใจว่าเลือดหยุดไหล ทำความสะอาดบริเวณที่เจาะเลือดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ 70 %

11.2 การเตรียมซีรัม

หลังจากเก็บเลือดให้ตั้งเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (หรือที่ 37° ซ) ประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัวและเพื่อไม่ให้ก้อนเลือดที่แข็งตัวเกาะติดกับหลอดแก้ว ให้ใช้พลาสติกเจอร์ไปเปิด หรือ คลิปหนีบกระดาษที่ถูกยึดให้เป็นเส้นตรง หรืออุปกรณ์อื่นๆที่คล้ายคลึงกัน กรีดตามขอบด้านในของหลอดแก้ว จากนั้นเก็บหลอดเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ ข้ามคืน เพื่อให้ก้อนเลือดหดตัวและบีบส่วนที่เป็นของเหลวหรือซีรัมออกมา แยกส่วนที่เป็นน้ำใสออกจากก้อนเลือดโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 6,720xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ แบ่งซีรัมใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ หรือเก็บที่

อุณหภูมิ 4 ° ซ โดยการเติม sodium azide (NaN_3) ให้ความเข้มข้น 0.02 % และ 15% glycerol (รัชณี, 2544)

11.3 การฉีดแอนติเจนด้วยวิธี Subcutaneous Injection (SI) ได้ผิวหนังบริเวณต้นคอ

ผสมแอนติเจนที่ได้จากการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ในข้อที่ 7 (~ 2 mg/ml) กับ CFA (Complete Freund's Adjuvant) ให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันในครั้งแรก ในอัตราส่วน 1: 1 โดยใช้ อุปกรณ์ Three-way valve จนเป็น emulsion ซึ่งทดสอบโดยการหยดลงไปในน้ำ ถ้าหยดของ ส่วนผสมไม่กระจายตัวในน้ำ จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาที่ทำด้วยแก้วในการฉีด กระบอกฉีดยาขนาด 1-2 มิลลิลิตร และใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20-22 ยาว 1 นิ้ว ฉีดด้วยวิธี subcutaneous injection โดยดึง บริเวณคอที่ต้องการฉีดออกมาทำความสะอาดด้วย แอลกอฮอล์ 70 % ฉีดส่วนผสมในปริมาตรไม่เกิน 1 มิลลิลิตร ลงบริเวณผิวหนังบริเวณต้นคอ 3 จุด ดึงเข็มออกและนวดบริเวณที่ฉีดเบาๆ ใช้ โปรตีนที่ทำการสกัดให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำโปรแกรมการฉีด กระด่ำยดังนี้ ฉีดในครั้งที่ 1 ฉีดโปรตีนเข้าไปในกระด่ำยปริมาตร 1 มิลลิลิตร (~1 mg) หลังจากนั้น อีก 15 วัน ก็ฉีดครั้งที่ 2 โดยผสม แอนติเจนกับ IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) โดยใช้ อัตราส่วนเช่นเดียวกับครั้งแรกและในการฉีดแต่ละครั้งใช้เวลาห่างกันทุกๆ 15 วัน โดยฉีดทั้งหมด 5 ครั้ง ฉีดโปรตีนเข้าไปในกระด่ำยปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ขั้นตอนการผลิตแอนติซีรั่มและปริมาณ โปรตีนที่ใช้ตาม ตารางผนวก ก1) ตั้งแต่ครั้งที่ 5 เป็นต้นไปจะต้องมีการเจาะเลือดทุกๆ สัปดาห์ เมื่อ ได้แอนติซีรั่มแล้วก็นำมาตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรั่มและความไวในการตรวจหา เชื้อโรคกรีนนิ่งต่อไป

11.4 การทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่ม

การตรวจสอบหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่มนั้นตรวจสอบโดยการให้ค่าของความเข้มข้น ของแอนติเจนคงที่คือใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนเริ่มต้นจาก 10 ng/หลุม โดยหยอดแอนติเจนลง ใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และนำมาเติม Blocking buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติซีรั่มที่ต้องการตรวจสอบโดยทำ การเจือจางแอนติซีรั่มแบบ 10-fold dilution โดยใช้ blocking buffer เป็นตัวทำละลายเจือจาง ดังนี้คือ

1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000, 1:10,000,000 หยอดแอนติซีรัมที่เจือจางแล้วลงในหลุมที่มีแอนติเจน นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติม Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase ความเจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และในขั้นตอนสุดท้ายเติมสับสเตรต p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 mg/ml หยอดหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 20-30 นาที ตรวจสอบผลโดยการดูสีของสับสเตรตที่เติมลงไปจะได้สีเหลืองและตรวจสอบที่ค่าความเจือจางที่สามารถตรวจสอบดูสีของสับสเตรตได้ก็จะทำให้ทราบค่าไคเตอร์ของแอนติซีรัมนั้นและเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ

12. การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

วิธี indirect ELISA ดัดแปลงมาจาก Clark and Adams (1977) โดยนำเส้นกลางใบของส้มมาบดใน Carbonate Coating buffer pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) หยดน้ำคั้นที่ได้ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยในแต่ละ plate จะมีบัพเฟอร์ที่ไม่มีแอนติเจนพืชปกติ เพื่อใช้เป็นตัว control จากนั้นนำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และนำมาเติม Blocking buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมแอนติบอดี RPLJ- IgG ที่ทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ plate ไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติม Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase ความเจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และในขั้นตอนสุดท้ายเติมสับสเตรต p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 มก/มล หยอดหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปปัมที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 20-30 นาที และนำมาอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Programmable Microplate Reader MODEL DV 990 BV 4, USA) ที่ค่า OD₄₀₅ นาโนเมตร หลังจาก 1 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และอ่านผลครั้งสุดท้ายอีกครั้ง

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างส้มในแปลงที่มีลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่ง

เก็บรวบรวมตัวอย่างส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเขียวที่แสดงอาการผิดปกติแบบต่างๆ ใบลักษณะอาการเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบมีอาการเป็นจุดสีเขียว ใบมีขนาดลดรูป และเก็บส้มโอที่มีลักษณะอาการเส้นกลางใบสี ใบเหลือง และเส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) ใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย ใบด่างไม่ชัดเจน ซึ่งลักษณะอาการนั้นส่วนใหญ่เป็นอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus tristeza virus (CTV) มาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง (ตารางที่ 1)

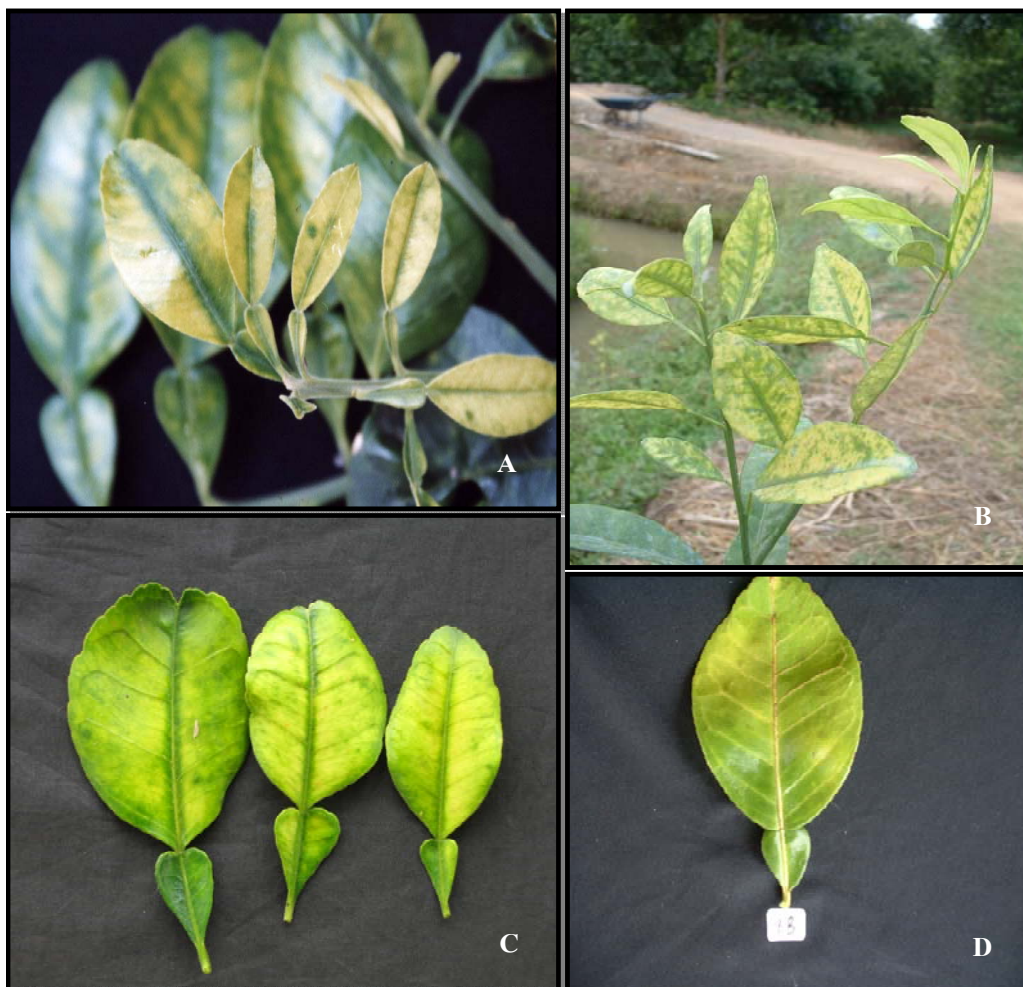
2. การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโดยเทคนิค PCR

จากการเก็บตัวอย่างของส้มมาทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด 68 ตัวอย่าง นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค PCR พบว่าทุกตัวอย่างสามารถที่จะเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 513 คู่เบส ทำการตรวจสอบส้มโอที่มีลักษณะอาการอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และที่บริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะอาการแฉกสีเขียวกระจาย ใบมีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี (ภาพที่ 1 C.) และส้มโอที่แสดงลักษณะใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียวในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง ใบม้วนงอขึ้น (ภาพที่ 1 A) สามารถเกิดผลบวก (ภาพที่ 2 ช่องที่ 5) และได้มีการเก็บตัวอย่างของส้มโอที่มีลักษณะอาการเส้นกลางใบสี ใบเหลือง และเส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย ใบด่างไม่ชัดเจน (ภาพที่ 1 D) ซึ่งลักษณะอาการนั้นส่วนใหญ่เป็นอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส CTV เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน *rpL1* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในส่วนโปรตีนของไรโบโซมของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่ง ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 513 คู่เบส (ภาพที่ 2 ช่องที่ 2) โดยลักษณะอาการส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่งเนื่องจากการเข้าทำลายของไวรัส CTV เก็บตัวอย่างจากกิ่งพันธุ์ของส้มโอที่ยังไม่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคโดยใบจะมีสีเขียว และที่ใบอ่อนจะมีลักษณะของเส้นกลางใบที่โปร่งแสงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงภาพตัวอย่าง) เมื่อนำมาทำการตรวจสอบพบว่าทุกตัวอย่างเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 513 คู่เบส เนื่องจากทุกตัวอย่างขยายพันธุ์จากต้นพันธุ์ต้นเดียวกันซึ่งเป็นต้นที่ถูกเข้าทำลายโดยโรคกรีนนิ่งทำให้ต้นที่ได้ทั้งหมดนั้นเป็นโรคและที่ยังไม่แสดงอาการชัดเจนเนื่องจากว่าใบที่เก็บมานั้นยังเป็นใบอ่อนและกิ่งพันธุ์นั้นยังมีอายุเพียง 6 เดือน ทำให้อาการของโรคยังไม่ปรากฏมาก ส่วนในตัวอย่างส้มเขียวหวานที่มีลักษณะอาการ ใบเหลือง

และที่ใบมีแต้มสีเขียว ใบมีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี (ภาพที่ 1 B.) เมื่อสกัดดีเอ็นเอ และนำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rp1J* โดยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้แสดงว่ามีเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิง (ภาพที่ 2 ช่องที่ 3) ในตัวอย่างส้มเขียวที่มีลักษณะอาการ คล้ายการขาดธาตุสังกะสี ใบมีอาการเหลือง ก็สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิงได้ เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2 ช่องที่ 4) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะอาการผิดปกติที่พบในส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเขียว และผลการตรวจสอบ โดยเทคนิค PCR ของส้มที่แสดงอาการแตกต่างกันที่เก็บมาจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย

ชื่อพืช	สถานที่เก็บ	ลักษณะอาการ	จำนวน ตัวอย่าง	ผลการ ตรวจสอบ ด้วยเทคนิค PCR
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	จ. จันทบุรี	ใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะ อาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)	5	5
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	โรงเรียนภาควิชาโรค พืช ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เก็บมาจาก จ. แพร่	เส้นกลางใบโปร่งแสง (vein clearing) ใบยังไม่แสดงอาการ ใบเหลือง (yellowing)	50	50
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	จ. ปราจีนบุรี	ใบเหลือง และเส้นกลางใบแตก นูน (vein corking) และใบมี การบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่าง (mottle)	3	3
ส้มเขียวหวาน (<i>C. reticulata</i>)	จ. ปทุมธานี	ใบเหลืองทั้งใบ และบริเวณใบ มีอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)	8	8
ส้มเขียว (<i>C. sinensis</i>)	จ. สมุทรสงคราม	ใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว และมีลักษณะแต้มเขียวบริเวณ ใบ	2	2



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรครินนิ่งที่พบบนใบส้มโอ ส้มเขียวหวาน ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Candidatus*

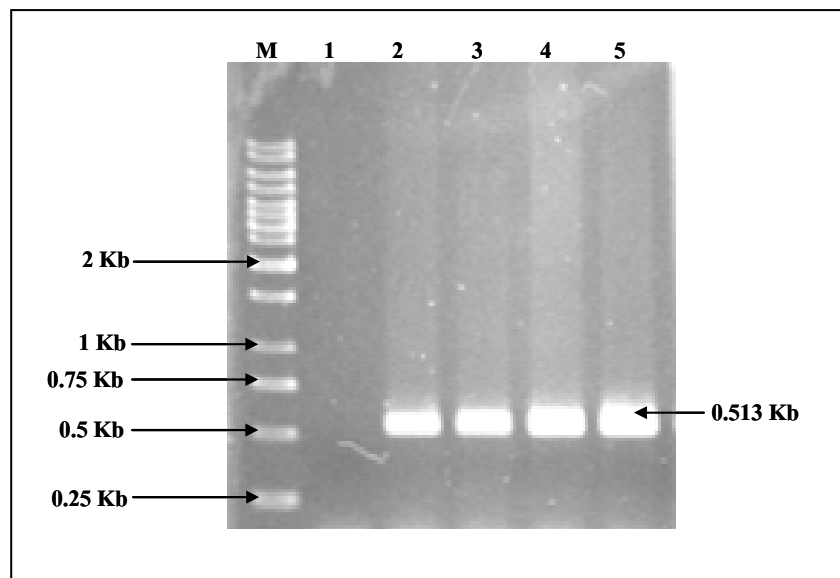
Liberibacter asiaticus

ภาพ A คือส้มโอที่แสดงอาการใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียว ในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง ใบมักตั้งชี้ขึ้น

ภาพ B คือส้มเขียวหวานลักษณะอาการใบเหลือง บริเวณใบมีจ้ำสีเขียวกระจาย (blotchy mottle) เส้นกลางใบเขียว อาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี

ภาพ C คือส้มโอที่แสดงอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบมีจ้ำสีเขียวกระจาย (blotchy mottle)

ภาพ D คือใบเหลือง และเส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่าง (mottle)



ภาพที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *rplJ* จากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* จากดีเอ็นเอที่สกัดจากส้มเป็นโรคแสดงอาการแบบต่างๆ มีขนาด 513 คู่เบส M คือ 1 Kb Ladder (Fermentas[®])

ช่องที่ 1 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของส้มโอที่ไม่เป็นโรค

ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของยีน *rplJ* จากตัวอย่างส้มโอ ที่มีลักษณะอาการใบเหลือง และเส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่าง (mottle)

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอของยีน *rplJ* จากตัวอย่างส้มเขียวหวาน ที่มีลักษณะอาการใบเหลือง บริเวณใบมีอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของยีน *rplJ* จากตัวอย่างส้มเขียวที่มีลักษณะอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว และมีลักษณะแต้มเขียวบริเวณใบ

ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอของยีน *rplJ* จากตัวอย่างส้มโอ ที่มีลักษณะอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวบริเวณใบที่เหลือง จะมีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)

3. การตรวจสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

ใช้ ไพรเมอร์ Forward - GB (5' GGA TCC AAT AGA CAA GGA AAG AGC G 3') และ Reverse- GE (5' GAA TTC ACC TTG CTG ATT TTT ATC CAC 3') พบว่าได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 513 คู่เบส (ภาพที่ 2) โดยในการออกแบบไพรเมอร์นั้นได้มีการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) และ *Eco*RI (GAATTC) เข้าไปในตำแหน่ง 5' ของไพรเมอร์เพื่อประโยชน์ในการ sub cloning เพื่อให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน RPLJ (เพื่อเตรียมทำการโคลนเข้าสู่ pGEX – 2T Expression Vector (Amersham))

นำตัวอย่างส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเซ่งที่แสดงอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวบริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling) ใบมีขนาดลดรูป ซึ่งเป็นลักษณะอาการหลักที่สำคัญของโรคกรีนนิ่งมาทำการสกัดดีเอ็นเอและนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบไพรเมอร์พบว่าทุกตัวอย่างสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rplJ* ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 513 คู่เบส (ภาพที่ 3 ก) และได้มีการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ใช้ตัวอย่างดังนี้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ

Ralstonia solanacearum, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* และ *Escherichia coli* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นกลางใบของส้มโอในข้างต้น พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ที่พบในส้มโอที่เป็นโรคกรีนนิ่งเท่านั้นโดยในตัวอย่างอื่นไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (ภาพที่ 3 ข) จากการตรวจสอบยีนใน GenBank พบว่าเชื้อทั้งสามชนิดนั้นมีส่วนของยีน *rplJ* อยู่ในส่วนของยีนสร้างโปรตีนในไรโบโซม เช่นเดียวกับเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยจากการเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งเท่านั้น

ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ยีน *rplJ* โดยใช้เทคนิค PCR สังเคราะห์โดยใช้ forward primer GB และใช้ reverse primer GE แยกขนาดดีเอ็นเอใน 0.8% agarose gel

ก. การตรวจสอบยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* จากการสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยใช้ไพรเมอร์ Forward – GB และ Reverse- GE

M คือ 1Kb Ladder (Biolab[®])

ช่องที่ 1 คือ ผลของ PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเส้นกลางใบของส้มปกติ (Healthy Plant)

ช่องที่ 2 และ 3 คือ ผลของ PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเส้นกลางใบของส้มเขียวหวาน

ช่องที่ 4 และ 5 คือ ผลของ PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเส้นกลางใบของส้มเขียวหวาน

ช่องที่ 6 และ 8 คือ ผลของ PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเส้นกลางใบของส้มโอ

ข. การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ Forward – GB และ Reverse- GE ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

M คือ 1Kb Ladder (Fermentas[®])

ช่องที่ 1 คือ น้ำ (Control)

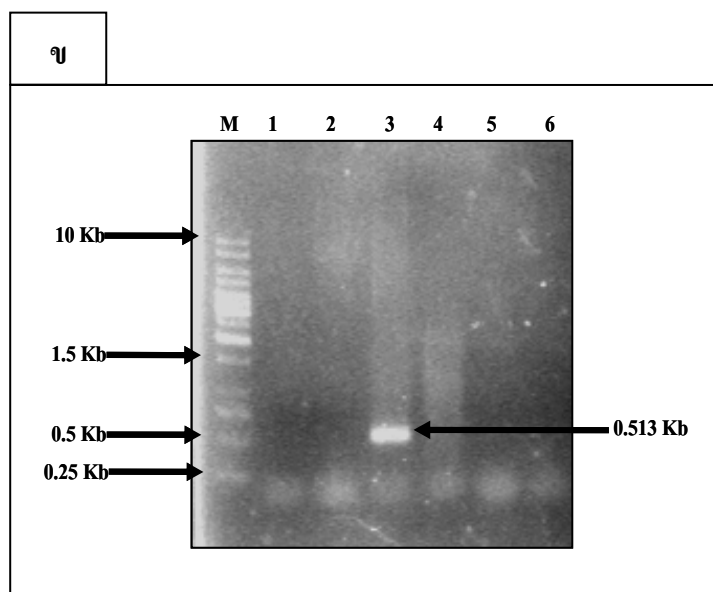
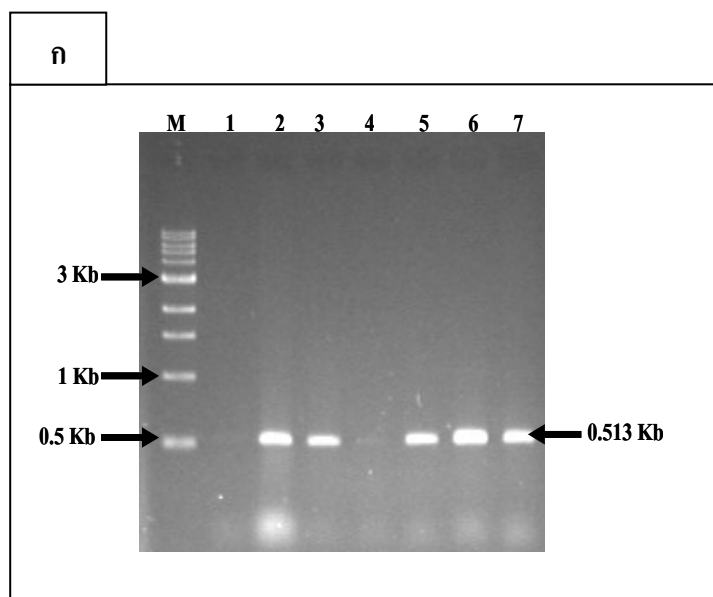
ช่องที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มไม่เป็นโรค (healthy plant)

ช่องที่ 3 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มโอที่เป็นโรคกรีนนิ่ง

ช่องที่ 4 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

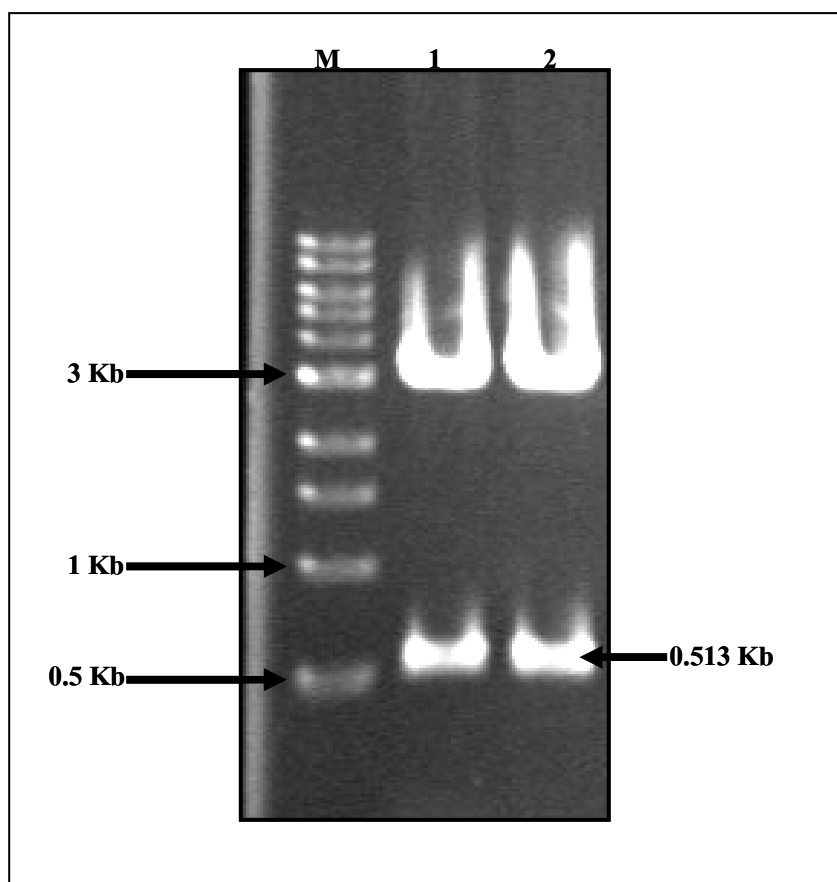
ช่องที่ 5 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *Escherichia coli*

ช่องที่ 6 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *Xanthomonas citrii* subsp. *citri*



4. การเชื่อมต่อยีน *rpIJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* กับพลาสมิดพาหะ

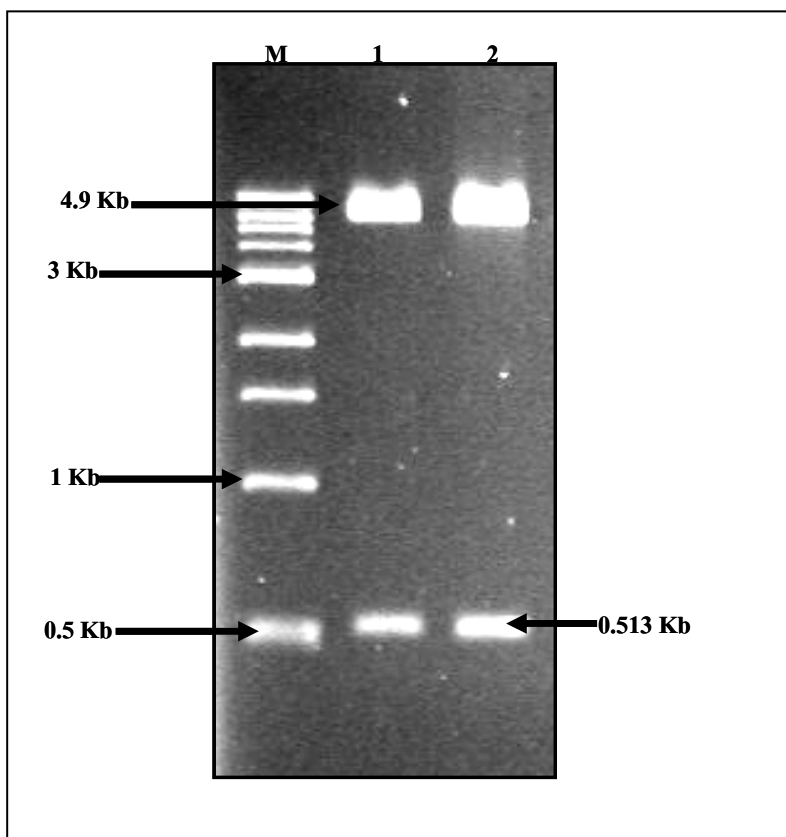
เมื่อทำการเชื่อมต่อยีน *rpIJ* ยีน ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ Forward – GB และ Reverse- GE กับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega[®]) ได้พลาสมิดสายคู่ผสม pGEM-T Easy / *rpIJ* gene เมื่อย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน แล้วได้คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดคู่ผสมมาสกัดพลาสมิดตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (GAATTC) ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 513 คู่เบส ซึ่งเมื่อเทียบกับขนาดของยีน *rpIJ* พบว่ามีขนาดใกล้เคียงจึงคาดว่ามิซีนของยีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ในพลาสมิดพาหะนั้น เมื่อตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เพิ่มเข้าไปในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ด้วย *BamHI* (GGATCC) และ *EcoRI* (GAATTC) เพื่อยืนยันผล พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 513 คู่เบส (ภาพที่ 4) จากนั้นสกัดแถบดีเอ็นเอขนาด 513 คู่เบสจากอะกาโรสเจล แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEX-2T ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* (GGATCC) และ *EcoRI* (GAATTC) การเชื่อมต่อทำให้ยีน *rpIJ* เชื่อมติดกับยีน *glutathione S – Transferase* (*GST*) ทางด้านปลาย 5' ของยีน *rpIJ* จนได้พลาสมิดสายผสม pGEX – *rpIJ* ผลจากการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α และคัดเลือกโคลนที่เจริญอยู่บนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินได้ นำโคลนที่มีพลาสมิดคู่ผสมมาทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline Lysis และย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ซึ่งเป็นตำแหน่งรอยต่อที่ด้านปลาย 5' ของยีน *rpIJ* กับพลาสมิดและย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* มีตำแหน่งคู่เบสที่ 941 ของพลาสมิด pGEX-2T ซึ่งอยู่ทางปลายด้าน 3' ของยีน *rpIJ* นำพลาสมิดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาตรวจสอบผลบน 0.8% agarose gel พบว่าโคลนที่ได้รับพลาสมิดสายผสม pGEX – *rpIJ* ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับพลาสมิด pGEX-2T โดยมีขนาด 4.9 Kb และขนาดเท่ากับยีน *rpIJ* โดยมีขนาด 513 คู่เบส (ภาพที่ 5) ในการใช้ *BamHI* และ *EcoRI* linker เพื่อใช้ในการเชื่อมยีน *rpIJ* เข้ากับ *GST* แบบบังคับทิศทาง (directional cloning)



ภาพที่ 4 ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยพลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy / *rplJ* gene ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่แยกได้จากส้มโอ และย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) และ *Eco*RI (GAATTC) แยกขนาดดีเอ็นเอใน 0.7% agarose gel

M คือ 1Kb Ladder (Biolab[®])

ช่องที่ 1 และ 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรีย และผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดเท่ากับ พลาสมิด pGEM- T Easy 3 Kb และชิ้น *rplJ* ขนาด 513 คู่เบส



ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสม pGEX – *rplJ* สกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ที่คัดเลือกได้บนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธี Alkaline Lysis แล้วย่อยพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยใช้ 0.8% agarose gel

M คือ 1Kb Ladder (Biolab[®])

ช่องที่ 1 และ 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรีย และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดเท่ากับพลาสมิด pGEX-2T 4.9 Kb และยีน *rplJ* ขนาด 513 คู่เบส

5. การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

เมื่อได้พลาสมิดสายผสมลึ่นำโคดอนนั้นไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม DNA Star ร่วมกับโปรแกรม Vector NTI แล้วนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ซึ่งเป็นยีนในส่วนของยีนสร้างโปรตีนในไรโบโซมของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 513 คู่เบส และสามารถแปลรหัสโปรตีน RPLJ ได้กรดอะมิโน 171 ตัว ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แปลรหัสเป็นโปรตีนนั้นไม่พบ stop codon (TAA, TAG, TGA) ภายในยีน มี GC ประมาณร้อยละ 38.2 กรดอะมิโนส่วนมากเป็น hydrophobic มี serine มากที่สุดคือร้อยละ 12.28 มีค่า Isoelectric point (PI) สูง คือ 10.16 เนื่องจากเป็นโปรตีนที่รวมกับไรโบโซมซึ่งเบสของ RNA จะเป็น hydrophobic และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank (M94319) พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 99.8 และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 100 และนำ นิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่ได้ฝากลงใน GenBank โดยได้เลข accession number DQ852665 (ภาพที่ 6) และเปรียบเทียบกับยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 77.4 และลำดับกรดอะมิโนมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 77.6 ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่ายีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่พบในแถบเอเชียมีค่าความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 90 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทยที่ได้เปรียบเทียบกับยีน *rplJ* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank (ตารางที่ 2) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* นั้นมีความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งสายพันธุ์ที่พบในแถบแอฟริกาพบว่ายีนในส่วนนี้มีความแตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งที่พบในแถบแอฟริกาและในแถบเอเชียนั้นมีลักษณะของยีน *rplJ* ทั้งสองสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 7) จากนั้นก็นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบโดยการทำ Phylogenetic tree พบว่ายีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* มีความแตกต่างจากยีน *rplJ* ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นๆโดยการตรวจดู phylogenetic tree พบว่ายีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus*

Liberibacter asiaticus นั้นมีความสัมพันธ์กับยีน *rpIJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* มากกว่าแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ และแม้ทั้งสองสายพันธุ์นั้นจะมีความสัมพันธ์กันแต่ก็มีความแตกต่างกันประมาณร้อยละ 20 ส่วนในแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นๆพบว่า ถ้าแบคทีเรียอยู่ในสกุลเดียวกันยีน *rpIJ* ก็จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าแบคทีเรียที่อยู่ต่างสกุลกัน (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 2 แบคทีเรียและแบคทีเรียโรคพืชที่มียีน *rpIJ* มีรายงานไว้แล้วใน GenBank นำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpIJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

ชื่อเชื้อสาเหตุ	สายพันธุ์	ชื่อย่อ	ประเทศ	Accession Number
1. <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	MRSA252	Saa	USA	NC_002952
2. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2.4.1	Rs	USA	NC_007493
3. <i>Corynebacterium jeikeium</i>	K411	Cj	Germany	NC_007164
4. <i>Ralstonia solanacearum</i>	GMI1000	Rsol	USA	NC_003295
5. <i>Rickettsia conorii</i>	Malish 7	Rc	USA	NC_003103
6. <i>Escherichia coli</i>	CFT073	Ec	USA	NC_004431
7. <i>Rickettsia typhi</i>	Wilmington	Rt	USA	NC_006142
8. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf-5	Pf	USA	NC_004129
9. <i>Rickettsia prowazekii</i>	Madrid E	Rp	Sweden	NC_000963
10. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1448A	Psp	USA	NC_005773
11. <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC10331	Xoo	Korea	NC_006834
12. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032	Cg	Japan	NC_003450
13. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	85-10	Xcv	USA	NC_007508
14. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913	Xcc	Brazil	NC_003902
15. <i>Burkholderia mallei</i>	ATCC 23344	Bm	USA	NC_006348
16. <i>Burkholderia sp</i>	383	B	USA	NC_007510
17. <i>Ralstonia eutropha</i>	JMP134	Re	USA	NC_007347
18. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	306	Xac	USA	NC_003919
19. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C5	At	USA	NC_003062

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อเชื้อสาเหตุ	สายพันธุ์	ชื่อย่อ	ประเทศ	Accession Number
20. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 isolate: U. Washington	At- U, Wal	USA	NC_003304
21. <i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	Pp	USA	NC_002947
22. <i>Pseudomonas entomophila</i>	L48	Pe	USA	NC_008027
23. <i>Candidatus Liberobacter africanus</i>	-	RPLJ CLaf	- France	U09675
24. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	PfO-1	PfO	USA	NC_007492
25. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Pst	USA	NC_004578
26. <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	SCRI1043	Eca	USA	NC_004547
27. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B728a	Pss	USA	NC_007005
28. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	Pa	USA	NC_002516

```

      N R Q G K S V E I S E L S K I F S
1  AAATAGACAAG GAAAGAGCGT AGAAATTTCT GAATTAAGTA AGATTTTTTC

      S S G S I V V A H Y K G I S V A Q
51 TTCTTCTGGA TCAATTGTTG TTGCACATTA TAAGGGAATT AGTGTTGCGC

      I K D L R K K M R E A G G G V K
101 AAATTAAGA TCTTCGAAA AAGATGCGG AAGCTGGTGG AGGTGTAAAA

      V A K N R L V K I A I R D T S I R
151 GTTGCCAAA ATCGTCTCGT CAAGATTGCT ATCCGTGATA CTAGTATCAG

      G I S D L F V G Q S L I V Y S D S
201 AGGAATATCT GATCTTTTCG TTGGGCAGTC TCTAATTGTC TATTCGGATA

      P V I A P K I S V S F S N D N N
251 GTCCTGTTAT TGCTCCTAAA ATTTCCGTTA GCTTTTCAAA TGACAATAAT

      E F R V L G G V V E K G V L N Q D
301 GAATTTAGAG TTCTTGGTGG GGTTGTAGAG AAGGGCGTCC TTAATCAAGA

      S I K Q I A S L P D L E G I R A G
351 TTCTATCAAG CAAATTGCTT CTTTACCCGA TCTTGAGGGT ATTCGAGCTG

      I I S A I Q S N A T R L V R L L
401 GTATCATAAG TGCTATCCAA TCTAATGCAA CTAGATTGGT TAGACTTCTT

      G T P Q T Q V V R A I S A F V D K
451 GGTACGCCAC AGACTCAAGT TGTTCTGCTT ATTTCTGCTT TTGTGGATAA

      N Q Q G
501 AAATCAGCAA GGT

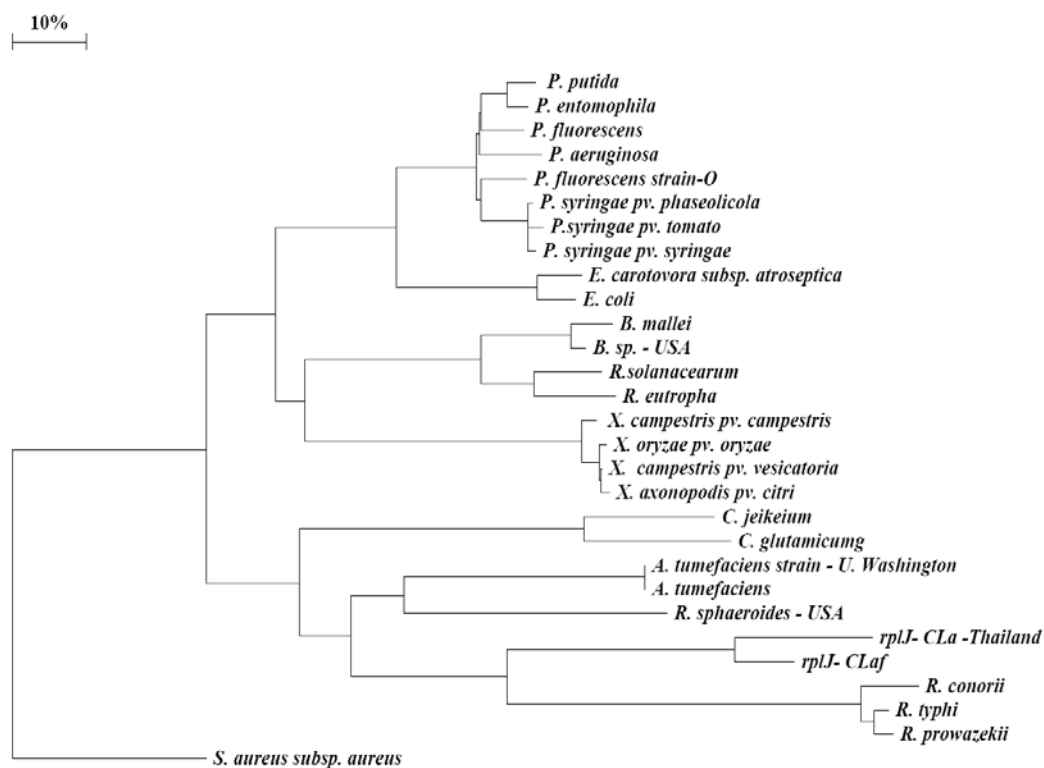
```

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus*

Liberibacter asiaticus ที่ได้มีการฝากไว้ใน GenBank (DQ 852665) โดยการตัดเอา stop codon (TAG) ออกและเติม *Bam*HI และ *Eco*RI เข้าที่ 5' และ 3' ตามลำดับ ซึ่งเชื่อมต่อกับ GST ใน pGEX-2T expression vector ในตำแหน่ง *Bam*HI และ *Eco*RI

<i>rp1J</i> - CLaf	(1)	---AATAGGCAAGAAAAGAGTGTGGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTT
<i>rp1J</i> - Thai	(1)	---AATAGACAAGGAAAGAGCGTAGAAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTT
Consensus	(1)	---AATAG*CAAG*AAAGAG*GT*GAATTTCTGAATTAAGTAAGATTTT
<i>rp1J</i> - CLaf	(51)	TTCTTCTTCTGGATCAGTTGTTGTTGCGCACTATAAGGGAATTAGTGTAG
<i>rp1J</i> - Thai	(48)	TTCTTCTTCTGGATCAATTGTTGTTGACATTATAAGGGAATTAGTGTG
Consensus	(51)	TTCTTCTTCTGGATCA*TTGTTGTTGC*CA*TATAAGGGAATTAGTGT*G
<i>rp1J</i> - CLaf	(101)	CGCAGATAAAAGATCTTCGAAAGAAAGTGCAGAGAAGCTGGTGGAGGTGTA
<i>rp1J</i> - Thai	(98)	CGCAAATTAAAGATCTTCGAAAAAGATGCGGGAAGCTGGTGGAGGTGTA
Consensus	(101)	CGCA*AT*AAAGATCTTCG*AA*AA*TCG*GAAGCTGGTGGAGGTGTA
<i>rp1J</i> - CLaf	(151)	AAGGTTGCGAAAAATCGTCTTGTAAAGATTGCCGTCAGCGATACTAGTTT
<i>rp1J</i> - Thai	(148)	AAAGTTGCCAAAAATCGTCTCGTCAAGATTGCTATCCGTGATACTAGTAT
Consensus	(151)	AA*GTTGC*AAAAATCGTCT*GT*AAGATTGC*TC*G*GATACTAGT*T
<i>rp1J</i> - CLaf	(201)	GAAGGGTGTTTCAGATCTTTTGTGGGCAATCATTGATTGTTTATTCGG
<i>rp1J</i> - Thai	(198)	CAGAGGAATATCTGATCTTTTCGTTGGGCAGTCTCTAATTGTCTATTCGG
Consensus	(201)	*A**GG**T*TC*GATCTTTT*GTTGGGCA*TC**T*ATTGT*TATTCGG
<i>rp1J</i> - CLaf	(251)	TTGACCCTATTGTTGCTCCTAAGATTTCTGTGAGCTTTGCGAATGATAAT
<i>rp1J</i> - Thai	(248)	ATAGTCCTGTTATTGCTCCTAAAAATTCGGTTAGCTTTTCAAATGACAAT
Consensus	(251)	*T***CCT*TT*TTGCTCCTAA*ATTC*GT*AGCTTT*C*AATGA*AAT
<i>rp1J</i> - CLaf	(301)	AAACAGTTTGTGGTTCTTGGCGGTATTTTGGAGAAAGATATTCTTGACCA
<i>rp1J</i> - Thai	(298)	AATGAATTTAGAGTTCTTGGTGGGGTTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAATCA
Consensus	(301)	AA**A*TTT***GTTCTTGG*GG*TT*T*GAGAA*G***T*CTT*A*CA
<i>rp1J</i> - CLaf	(351)	AGATTCTATCAAACGGATTGCTTCGTTGCCAATATTGATGGTATTTCGTT
<i>rp1J</i> - Thai	(348)	AGATTCTATCAAGCAAATTGCTTCTTTACCCGATCTTGAGGGTATTTCGAG
Consensus	(351)	AGATTCTATCAA*C*ATTGCTTC*TT*CC*AT*TTGA*GGTATTTCG**
<i>rp1J</i> - CLaf	(401)	CTATGATCATTAGTGCTATTCAATTTAATTCGACTAGATTGGTAAATCTT
<i>rp1J</i> - Thai	(398)	CTGGTATCATAAGTGCTATCCAATCTAATGCAACTAGATTGGTTAGACTT
Consensus	(401)	CT***ATCAT*AGTGCTAT*CAAT*TAAT*C*ACTAGATTGGT*A**CTT
<i>rp1J</i> - CLaf	(451)	CTTAATGCACCTCAGACTAAAAATTGTTTCGTGCTATTTCTGCTTTTGTAGA
<i>rp1J</i> - Thai	(448)	CTTGGTACGCCACAGACTCAAGTTGTTTCGTGCTATTTCTGCTTTTGTGGA
Consensus	(451)	CTT**T*C*CC*CAGACT*AA*TTGTTTCGTGCTATTTCTGCTTTTGT*GA
<i>rp1J</i> - CLaf	(501)	TAAAAATCAACAAAGT
<i>rp1J</i> - Thai	(498)	TAAAAATCAGCAAGGT
Consensus	(501)	TAAAAATCA**CA*GT

ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rp1J* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่อยู่ใน pGEX-2T expression vector สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rp1J* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* โดยใช้โปรแกรม Align X ใน Vector NTI version 9.0 (Invitrogen)



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree ของความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อแบคทีเรียโรคพืชอื่น โดยใช้โปรแกรม Treeconw

6. การสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

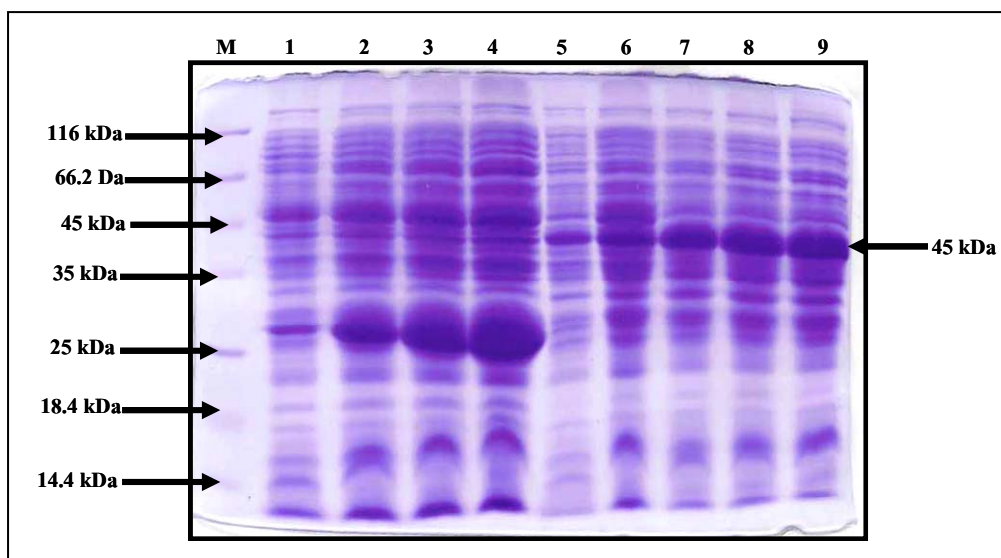
หลังจากที่มีการถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนระหว่างโปรตีน GST กับโปรตีน RPLJ ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งได้รับพลาสมิดสายผสมเลี้ยงในอาหาร 2XYT ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินนาน 12-16 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็น starter จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมและชักนำให้มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ภายหลังจากการเติม Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลาต่างๆ เติม Lysozyme เพื่อทำให้เซลล์แตก ปั่นแยกน้ำใส และเก็บกากตะกอนเซลล์ แล้วนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนและขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 15% SDS Polyacrylamide gel พบว่าภายหลังจากการเติม IPTG 4 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณมาก และรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้นั้นอยู่ในกากตะกอนเซลล์มากกว่าอยู่ในส่วนน้ำใส และจากการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า ขนาดของโปรตีนที่มีการสังเคราะห์ในเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pGEX – *rplJ* พบแถบโปรตีนเข้มที่มีขนาดสอดคล้องกับขนาดของโปรตีน RPLJ ที่คำนวณได้จากขนาดของยีน *rplJ* ซึ่งคาดว่าจะมีขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน แต่เนื่องจากบนพลาสมิดพาหะมีส่วนของโปรตีน GST ที่สามารถถอดรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 27 กิโลดาลตัน ดังนั้นแถบโปรตีนเป้าหมายนั้นจึงมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 9) จากขนาดของโปรตีน GST- RPLJ ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ยีนในปฏิกิริยาถูกโซ่มีความถูกต้อง สำหรับในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนครั้งต่อไปเลือกใช้เวลา 4 ชั่วโมงในการชักนำการสร้างโปรตีน เพื่อสกัดแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ในการทดลองต่อไป

7. การแยกสกัดโปรตีน GST- RPLJ จากเซลล์แบคทีเรีย

เพื่อการศึกษาโปรตีนนำไปเป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งเพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางเซรัมวิทยาจึงต้องมีการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีน แต่เนื่องจากโปรตีน GST- RPLJ ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์แบคทีเรียนั้นไม่สามารถแยกโปรตีนได้โดยการใช้ 10 mM imidazole และ Guanidine hydrochloride เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในตะกอนเซลล์ และได้เลือกใช้วิธีการที่ทำให้โปรตีนที่ตกตะกอนละลายได้โดยใช้สาร N- laurylsarcosine 1.5% (Frangioni and Neel, 1992) ซึ่งสารนี้มีประจุที่คล้ายกับ SDS คือมี

ประจุลบและนำสารละลายดังกล่าวไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator (ultrasonic processor, USA) พบว่าโปรตีนยังคงอยู่ในส่วนของกากตะกอนเซลล์โดยเมื่อใช้สารละลายนี้จะทำให้เกิดฟองมากและมีผลต่อการทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator แต่วิธีนี้จะทำให้ดีเอ็นเอขาดทำให้สารสกัดที่ได้ไม่เหนียวและได้กำจัดฟองโดยการปล่อยทิ้งไว้ทำให้เสียเวลามากและโปรตีนส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในตะกอนเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้วิธีที่จะสกัดเอาโปรตีน GST – RPLJ ออกจากตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้ 8M urea ซึ่งไม่มีประจุ วิธีนี้จะทำให้โปรตีนที่ได้นั้นเสียสภาพ และสามารถที่จะสกัดโปรตีนเป้าหมายออกจากตะกอนเซลล์ได้ (ภาพที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับตะกอนเซลล์ก่อนที่จะทำการละลายด้วย 8 M urea ภาพที่ 9 จากนั้นทำการแยกโปรตีน GST – RPLJ ออกจากตะกอนเซลล์โดยแยกขนาดของโปรตีนบน 15%SDS – PAGE นำเจลที่ได้มาข้อมใน 0.3M CuCl_2 แล้วทำการตัดแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน มาทำการบดเจลโดยใช้ pestle ใน 1X PBS buffer พบว่าในการบดเจlnั้นทำได้ยากและไม่ทำให้เจลเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย จากนั้นนำเจลมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกโปรตีนออกจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง Tris glycine buffer ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาสภาพของโปรตีน นำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาวิเคราะห์ขนาดอีกครั้งบน 15% SDS – PAGE สามารถตรวจพบแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST – RPLJ ที่มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11) และจากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แยกได้นั้นมีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณโปรตีนที่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองเพื่อสร้างแอนติบอดีสำหรับศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยา เนื่องจากโปรตีน GST เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำ เมื่อนำโปรตีน GST- RPLJ ที่แยกได้บริสุทธิ์ไปฉีดสัตว์ทดลองทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน RPLJ ยังคงเหมือนเดิม (Pillai *et al.*, 1995)

ก่อนที่จะมีการตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนและนำโปรตีนที่ได้เป็นแอนติเจนนั้นต้องมีการตรวจหาปริมาณของโปรตีนก่อน คือ หาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกให้บริสุทธิ์ วิธีการตรวจสอบทำได้โดยใช้วิธีวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) วัดโดยใช้ค่า OD_{595} และนำค่า OD_{595} ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin , Sigma (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (แสดงในภาคผนวก ค) และจากผลการทดลองพบว่า สารละลายโปรตีนที่ได้นั้นมีความเข้มข้น 4 มก/มล ค่าความเข้มข้นที่ได้นี้จะใช้เป็นค่ามาตรฐานของโปรตีนที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อให้สัตว์มีการสร้างแอนติบอดีและนำแอนติบอดีที่ได้มาศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยาต่อไป



ภาพที่ 9 การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST – RPLJ ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – *rplJ* จากนั้นชักนำด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมงมาวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค SDS- PAGE ย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250

M คือ โปรตีนมาตรฐาน Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®])

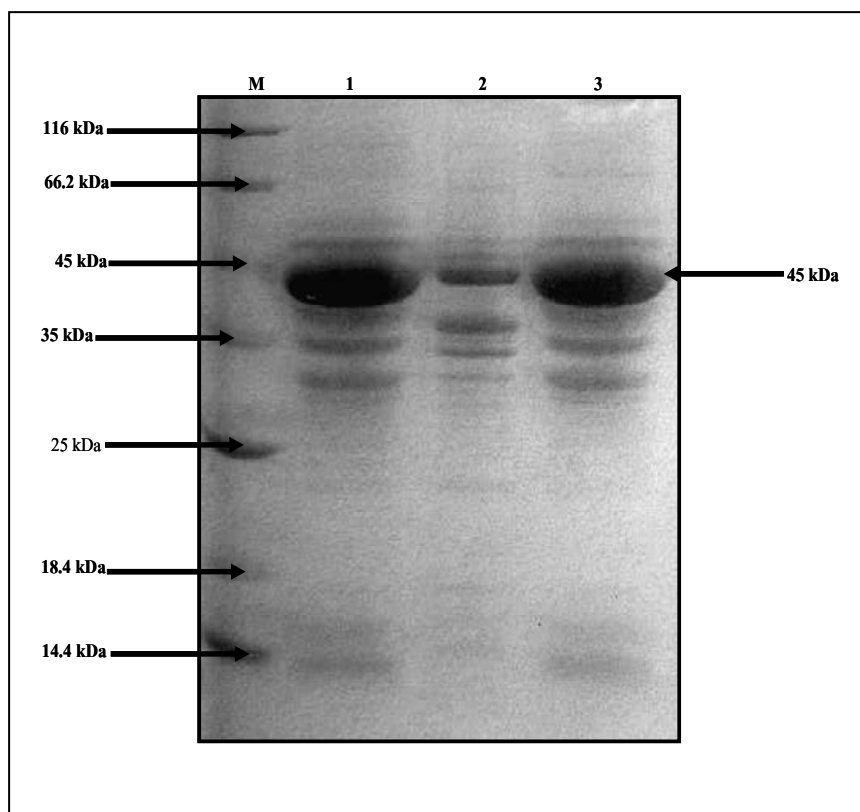
ช่องที่ 1 คือ โปรตีนจากตะกอนเซลล์ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ก่อนที่จะมีการเติมสาร IPTG

ช่องที่ 2 3 4 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีแต่พลาสมิดพาหะ pGEX- 2T ซึ่งไม่มียีน *rplJ* แทรกอยู่ เมื่อชักนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG แล้วที่ช่วงเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง

ตามลำดับ

ช่องที่ 5 และ 6 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST –RPLJ เมื่อเลี้ยงได้ 2 และ 4 ชั่วโมง ก่อนที่จะมีการเติมสาร IPTG ตามลำดับ

ช่องที่ 7 8 และ 9 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST – RPLJ เมื่อเลี้ยงได้ 2 4 และ 6 ชั่วโมง หลังจากชักนำด้วย IPTG เพื่อชักนำให้สร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน

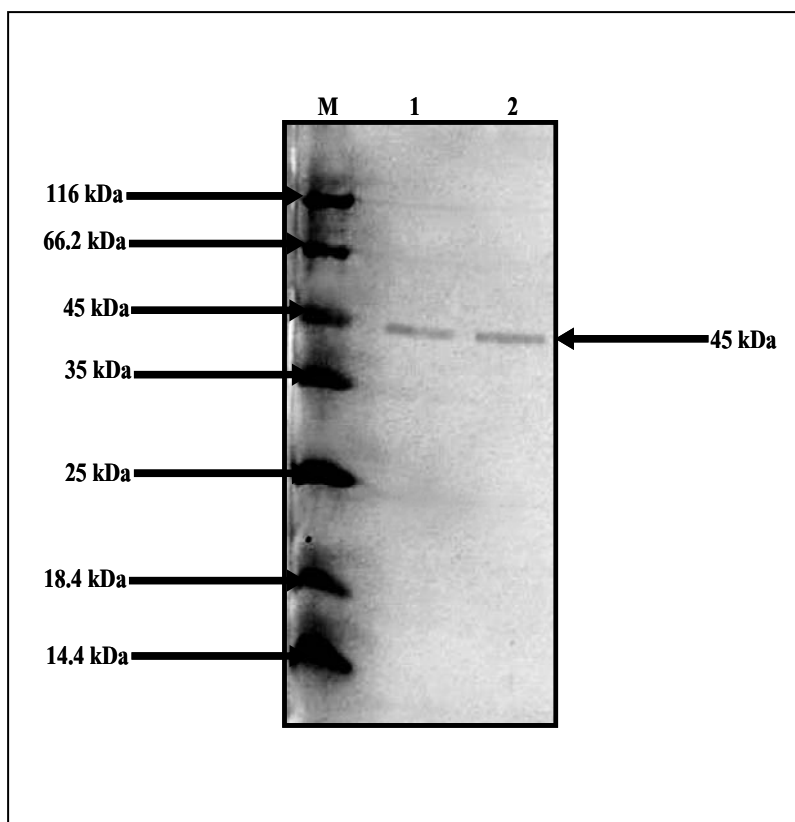


ภาพที่ 10 การแยกโปรตีน GST – RPLJ ออกจากตะกอนเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ด้วย 8M urea โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – *rplJ* จากนั้นชักนำด้วยสาร IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนใสและส่วนของตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค SDS - PAGE ย้อมเจลดด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250

M คือ โปรตีนมาตรฐาน Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®])

ช่องที่ 1 และ 3 คือ โปรตีนจากส่วนใสที่แยกจากเซลล์ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – *rplJ* สามารถตรวจพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST – RPLJ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตันพบว่าวิธีนี้สามารถขจัดโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ออกจากตะกอนเซลล์ได้มาก

ช่องที่ 2 คือ โปรตีนทั้งหมดที่ได้จากตะกอนเซลล์ที่มีพลาสมิดสายผสม pGEX – *rplJ*



ภาพที่ 11 การแยกโปรตีน GST – RPLJ ออกจากโปรตีนของเชื้อ *E. coli* ด้วยการตัดแถบโปรตีนที่แยกใน SDS-PAGE และแยกโปรตีนออกจากเจลและนำไปใส่ถุง dialysis และแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ เป็นเวลา 200 นาที และนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE ย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R250

M คือ โปรตีนมาตรฐาน Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®])

ช่องที่ 1 – 2 คือ รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST – RPLJ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน

8. การเตรียม DNA probes โดยการติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP ด้วยเทคนิค PCR

เตรียม DNA probes โดยการติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP ใช้เป็นตัวติดตามยีน *rpIJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งที่พบในประเทศไทยเพื่อใช้ในการตรวจสอบโรค ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ส่วนของยีน *rpIJ* เป็นตัวตรวจสอบจำเพาะ โดยนำโคลนที่เราทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpIJ* ใน pGEM-T Easy เป็นดีเอ็นเอต้นแบบมาทำการติดฉลากยีน *rpIJ* ด้วยสาร digoxigenin ซึ่งเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ เป็นการตรวจสอบแบบ non radioactive ที่สามารถตรวจสอบได้โดยแอนติบอดีต่อ DIG ซึ่งเชื่อมต่อกับสารที่สามารถทำให้เกิดการเรืองแสงทำให้สามารถตรวจสอบสัญญาณได้จากการประกบแผ่นฟิล์ม X-Ray ซึ่งการสังเคราะห์ probes นั้นทำโดยใช้ปฏิกิริยา PCR และใช้ dNTP ที่มี DIG- 11- dUTP ในอัตราส่วน dTTP: DIG-11-dUTP 3:1 ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ตรวจสอบผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 0.8% agarose gel พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 513 คู่เบส และเมื่อมีการติดฉลากด้วย digoxigenin จะทำให้สายนิวคลีโอไทด์มีขนาดเพิ่มขึ้นโดยขนาดของแถบดีเอ็นเอจะสูงกว่าขนาด 513 คู่เบสเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ทั้งนี้เพราะ dUTP ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin จะมีขนาดใหญ่กว่า dUTP ทั่วไป จึงมีผลทำให้ probes ที่ได้นั้นจะมีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTP ปกติทั่วไป (ภาพที่ 12) และเมื่อได้ probes แล้วตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization ต่อไป

9. การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ด้วยเทคนิค Dot Blot Hybridization

หลังจากที่ได้มีการเตรียม probes ที่จำเพาะต่อยีน *rpIJ* แล้ว ก็นำ probes ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยส้มที่เก็บมานั้นมีทั้งหมด 3 ชนิด จำนวน 68 ตัวอย่าง โดยส้มแต่ละชนิดนั้นจะมีการแสดงลักษณะอาการของโรครินนิ่ง คือ ใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling) ซึ่งตัวอย่างของส้มโอนั้นมีการเก็บมาจาก 3 แหล่ง คือ เก็บมาจากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่างซึ่งแสดงอาการของโรครินนิ่ง และเก็บมาจากโรงเรียนของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดยังไม่แสดงอาการของโรครินนิ่งโดยจากการตรวจดูลักษณะอาการพบว่า บริเวณเส้นกลางใบจะใส โปร่งแสง และตัวอย่างจากจังหวัดปราจีนบุรี พบว่าลักษณะอาการ

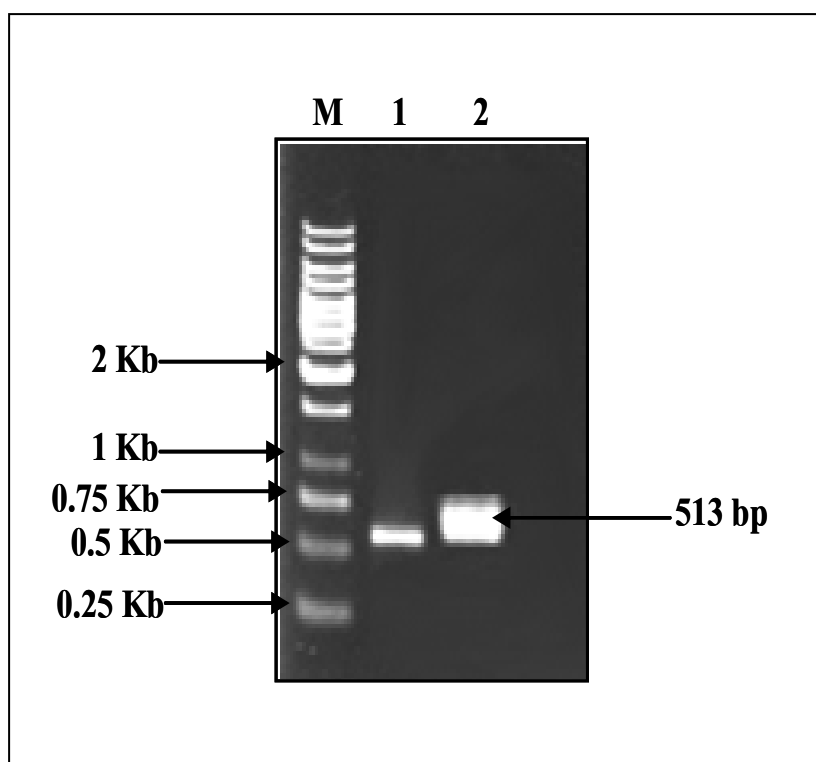
ส่วนใหญ่นั้นเป็นอาการของโรที่เกิดจากไวรัส Citrus tristeza โดยใบเหลือง และเส้นกลางใบแตก
 หนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่าง (mottle) และจากการ
 ตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization พบว่าตัวอย่างของส้มโอที่เก็บมาจากทั้งหมด 3 แหล่ง
 นั้นสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ probes ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rpIJ* ของเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งเป็น
 ตัวทดสอบในปฏิกิริยา hybridization และตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยการเติม anti-DIG-AP fab
 fragment และเติมสับสเตรต CDP star เพื่อให้เกิดการเรืองแสงบนแผ่นเมมเบรนซึ่งการตรวจสอบนี้
 เรียกว่า Chemiluminescen จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเอกซเรย์มาประกบพบว่าทุกตัวอย่างเกิดจุดสีดำเข้ม
 บนแผ่นฟิล์ม โดยผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างของส้มโอที่เก็บมานั้นเป็นโรครินนิ่งทุก
 ตัวอย่าง

ตัวอย่างของส้มเขียวหวานนั้นเก็บมาจากจังหวัดปทุมธานี ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ซึ่งทุก
 ตัวอย่างแสดงอาการของโรครินนิ่งและตรวจสอบเช่นเดียวกับส้มโอพบว่าทุกตัวอย่างนั้นเกิดจุดสีดำ
 เข้มบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ และจากผลการทดลองนี้ก็พบว่าส้มเขียวหวานที่เก็บมานั้นเป็นโรคริน
 นิ่งทุกตัวอย่าง และในส่วนของส้มเข้มนั้นเก็บมาจากจังหวัดสมุทรสงคราม เมื่อนำมาตรวจสอบ
 ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ probes เป็นตัวทดสอบก็พบว่าทั้งสองตัวอย่างนั้นเป็น
 โรครินนิ่งโดยเกิดจุดสีดำเข้มบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เก็บมา
 จากแหล่งปลูกส้มในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยมีการเข้าทำลายของโรครินนิ่งทั้งหมด (ภาพที่
 13)

ตรวจสอบความจำเพาะของ DNA probes ที่ได้โดยการตรวจสอบกับดีเอ็นเอของพืชอื่นที่
 เก็บมาจากบริเวณรอบๆแปลงปลูกส้มโอของจังหวัดจันทบุรีโดยตัวอย่างที่เก็บมาคือ ใบกฤษณา ใบ
 ต้นหว้า ใบต้นกิม ใบต้นยาง พบว่าไม่สามารถเกิดผลบวกได้กับ *rpIJ* - probes และตรวจสอบเพื่อ
 ยืนยันความจำเพาะของ probe อีกครั้งโดยการตรวจสอบกับแบคทีเรียสาเหตุโรคริน 2 ชนิดคือ เชื้อ
Ralstonia solanacearum สาเหตุโรค vascular wilt ในพืชตระกูลขิง มะเขือเทศ และเชื้อ
Xanthomonas citri subsp. *citri* สาเหตุโรค canker ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้จะมี
 ยีน *rpIJ* ที่อยู่ในส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนในไรโบโซมและเชื้ออีกชนิดหนึ่งก็นำมาใช้ในการ
 ตรวจสอบคือ *E. coli* โดยที่เชื่อนี้ก็มียีน *rpIJ* ที่อยู่ในส่วนของยีนสร้างโปรตีนในไรโบโซมด้วย
 หลังจากนั้นก็นำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมา
 ตรึงลงบนแผ่นเมมเบรนและนำไป hybridization ด้วย probes และตรวจสอบผล ซึ่งจากผลการ

ทดลองพบว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนั้นไม่สามารถจับกับ *rplJ* - probes ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งได้ (ภาพที่ 14)

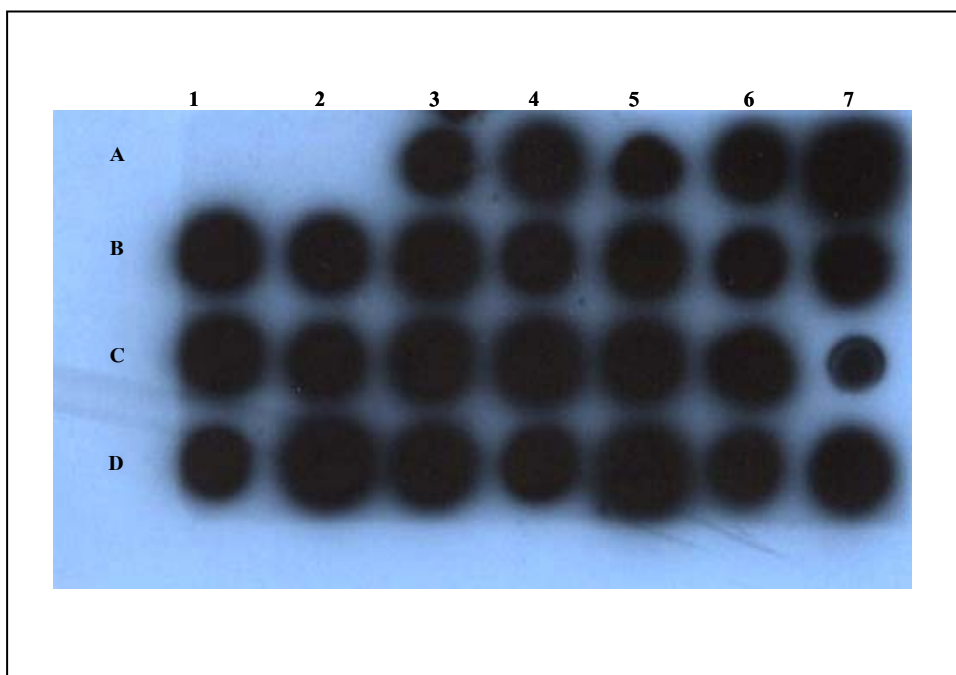
จากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค dot blot hybridization พบว่า *rplJ*-probes ที่ออกแบบมานั้นสามารถที่จะใช้ในการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพและความจำเพาะต่อโรคกรีนนิ่งเท่านั้นโดยไม่สามารถเกิดผลบวกได้กับตัวอย่างของดีเอ็นเอของเชื้ออื่นๆ หรือแม้จะเป็นดีเอ็นเอของพืชอื่นหรือพืชตระกูลส้มที่ไม่ได้เป็นโรคกรีนนิ่งก็สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจาก probes จะให้ผลบวกกับตัวอย่างที่มีการเข้าทำลายของโรคกรีนนิ่งเท่านั้น และได้เปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR และ เทคนิค dot blot hybridization พบว่าทั้งสองเทคนิคนั้นสามารถที่จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งได้โดยจากการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR สามารถเกิดผลบวกและสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดประมาณ 513 คู่เบส ทุกตัวอย่าง และนำดีเอ็นเอของตัวอย่างดังกล่าวที่สกัดได้จากเส้นกลางใบส้มมาตรวจสอบด้วยโดยเทคนิค dot blot hybridization พบว่าทุกตัวอย่างสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ probes ที่จำเพาะกับโรคกรีนนิ่ง ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยทั้ง 2 เทคนิคนี้ก็สามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ นั้นเป็นโรคกรีนนิ่งทุกตัวอย่างโดยผลการทดลองของทั้ง 2 เทคนิคนั้นให้ผลการทดลองที่มีความสอดคล้องกัน โดยแสดงสรุปการตรวจสอบด้วยเทคนิคทั้ง 2 นี้ในตารางที่ 3



ภาพที่ 12 การสังเคราะห์ DNA probes ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* เพื่อใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งที่อยู่ในพืชต่อการจับกับดีเอ็นเอสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rpL1* ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ dNTPs ปกติ ผสมกับ DIG-11-dUTP ตรวจสอบผลโดยใช้ 0.8% agarose gel M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb Ladder (Fermentas[®])

ช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rpL1* ที่สังเคราะห์โดยใช้ dNTPs ปกติ มีขนาดประมาณ 513 คู่เบส

ช่องที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน *rpL1* ที่สังเคราะห์โดยใช้ dUTP ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin โดยจะใช้เป็น probes



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot blot hybridization โดยใช้ *rplJ* – probes ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิง

หมายเลข A1 คือ น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

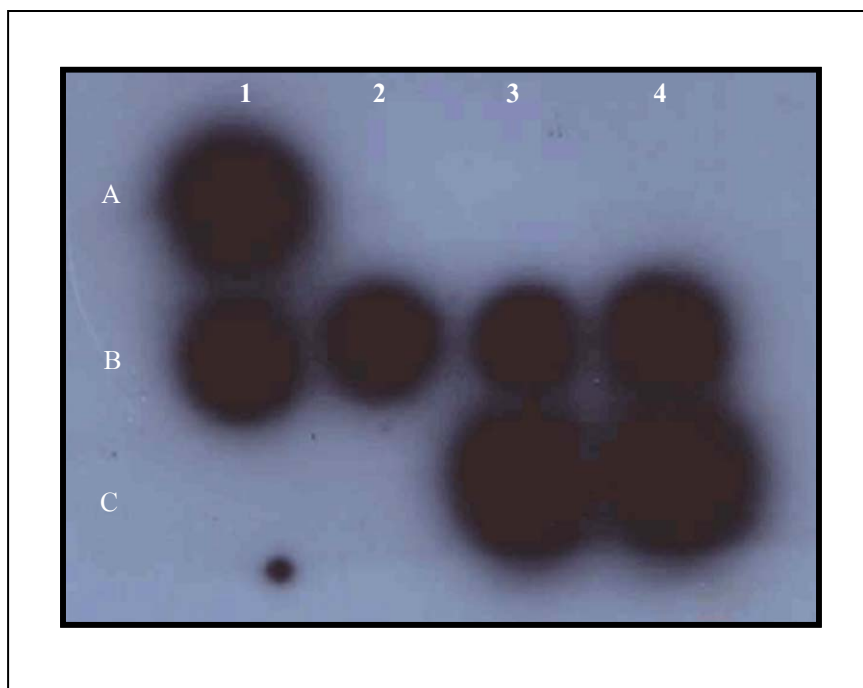
หมายเลข A2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างของส้มโอที่ไม่เป็นโรค (Healthy plant)

หมายเลข A3 คือ โคลนของพลาสมิดสายผสม pGEX-*rplJ* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วว่าเป็นยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิง ใช้เป็น positive control

หมายเลข A4-A7, B1-B7 และ C1-C7 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มโอที่แสดงอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวบริเวณใบที่เหลือง จะมีลักษณะอาการแฉกสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)

หมายเลข D1-D5 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มเขียวหวาน ที่มีลักษณะอาการใบเหลือง บริเวณใบมีอาการแฉกสีเขียวกระจาย (blotchy mottling)

หมายเลข D6-D7 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มเขียวที่มีลักษณะอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว และมีลักษณะแฉกเขียวบริเวณใบ



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot blot hybridization โดยใช้ *rpIJ* – probes ในการตรวจสอบความจำเพาะของ probe

หมายเลข A1 คือ โคลนของพลาสมิดสายผสม pGEX-*rpIJ* ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วว่าเป็นยีน *rpIJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนี้ ใช้เป็น positive control

หมายเลข A2 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *R. solanacearum* Biovar 3

หมายเลข A3 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *X. citri* subsp. *citri*

หมายเลข A4 คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli*

หมายเลข B1- B4 และ C3- C4 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส้มโอที่แสดงอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวบริเวณใบที่เหลือง จะมีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottling) เก็บมาจากจังหวัดจันทบุรี

หมายเลข C1 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบกฤษณา ซึ่งปลูกในแปลงเดียวกับส้มโอที่แสดงอาการของโรครินนี้ จากจังหวัดจันทบุรี

หมายเลข C2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบต้นหว้า เก็บมาจากแปลงปลูกส้มโอแสดงอาการของโรครินนี้ จากจังหวัดจันทบุรี

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่างของส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเซ่งที่มีการเก็บมาจากแหล่งต่างๆ และผลของการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในส้มชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค Dot Blot Hybridization โดยมีการนำดีเอ็นเอของพืชอื่น และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครากเน่า 2 ชนิด คือ เชื้อ *Ralstonia solanacearum* และเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* และเชื้อ *Escherichia coli* เพื่อใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์และ DNA probes

ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	วิธีการตรวจสอบ	
		PCR	Dot Blot Hybridization
1. ส้มโอ (<i>C. grandis</i>) จังหวัดจันทบุรี	5	5	5
2. ส้มโอ (<i>C. grandis</i>) จังหวัดนครปฐม	50	50	50
3. ส้มเขียวหวาน (<i>C. reticulata</i>) จังหวัดปทุมธานี	8	8	8
4. ส้มเซ่ง (<i>C. sinensis</i>) จังหวัดสมุทรสงคราม	2	2	2
5. Positive control (โคลนพลาสมิดสายผสมที่มียีน <i>rpIJ</i> ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว)	1	1	1
6. Negative control (ดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชอื่นเช่น ใบ กฤษณา ใบกิม ใบหว่า)	7	0	0
7. ส้มโอ (<i>C. grandis</i>) ที่ไม่เป็นโรครากเน่า	1	0	0
8. เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ <i>R. solanacearum</i>	1	0	0
เชื้อ <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> และ	1	0	0
เชื้อ <i>E. coli</i>	1	0	0
รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด	77	65	65

10. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

10.1 การเตรียมแอนติเจน

การแยกสกัดโปรตีน RPLJ ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งรวมอยู่กับโปรตีน GST ที่อยู่บนพลาสมิดพาหะจากนั้นนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) ได้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน 4 มก./มล.

10.2 การผลิตแอนติซีรัม

หลังจากฉีด GST-RPLJ แอนติเจนตามกำหนดการ (ภาคผนวก จ) เริ่มเก็บแอนติซีรัมที่ใบหูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากฉีดแอนติเจนครบ 5 ครั้ง โดยหลังจากเก็บเลือดจะนำเลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาที ใช้เข็มเขี่ยกรีดตามขอบด้านในของบีกเกอร์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน จากนั้นแยกส่วนน้ำใสจากก้อนเลือด แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,720xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เก็บน้ำใสส่วนที่เป็นแอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บแช่แข็งที่ -20°C และผสม 0.02% โซเดียมเอไซด์ เก็บที่ 4°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

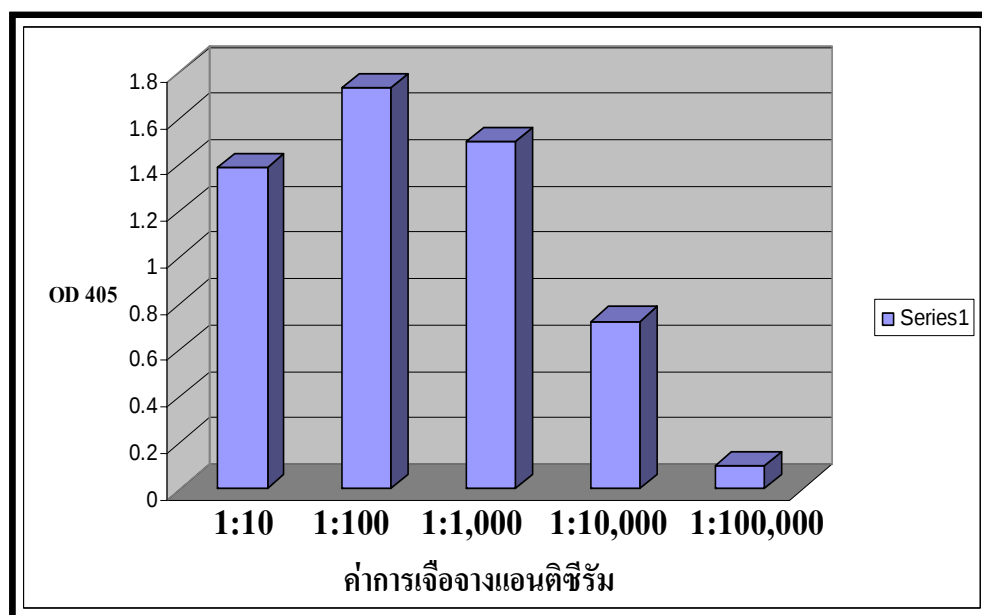
จากนั้นทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าแอนติซีรัมต่อโปรตีน RPLJ ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยมีค่าไตเตอร์ 1:10,000 โดยอ่านค่าของปฏิกิริยาโดยใช้เครื่องอ่าน ELISA reader (Programmable Microplate Reader MODEL DV 990 BV 4, USA) ได้ค่า OD₄₀₅ เท่ากับ 0.724 โดยใช้แอนติเจน 100 นาโนกรัม (ภาพที่ 15)

10.2.1 ตรวจสอบความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1:1,000 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ และแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส Citrus tristeza เชื้อ Papaya ringspot virus เชื้อ *R. solanacearum* biovar 3 เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* และเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

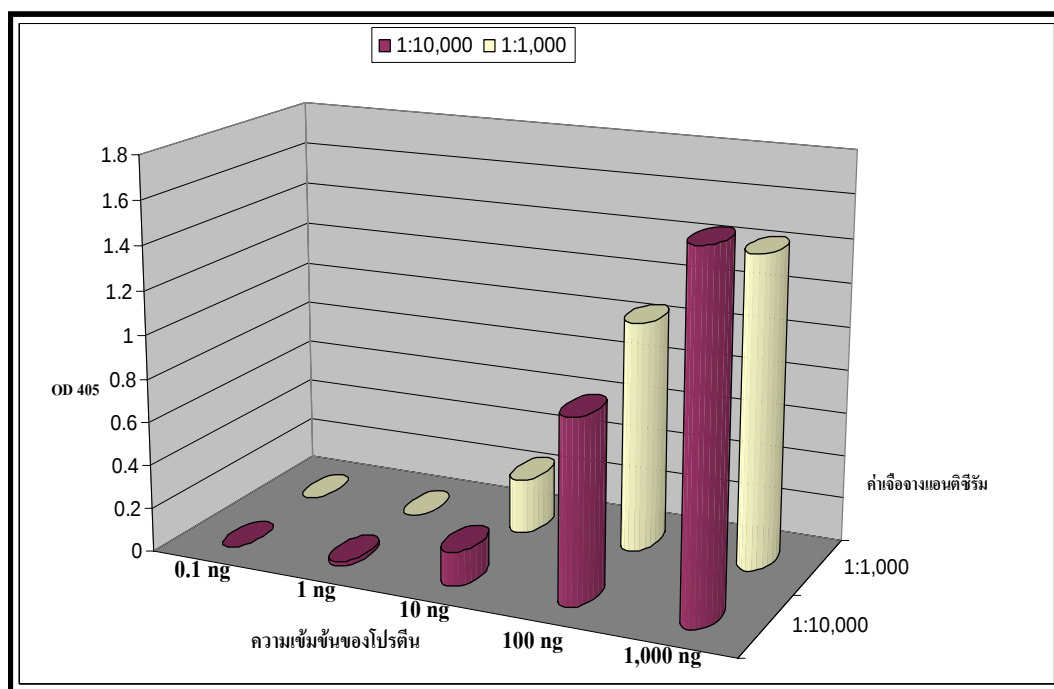
10.2.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของแอนติซีรัมในการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจนที่มีความเข้มข้นต่ำสุดคือที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม โดยจากการใช้ความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ 1:1,000 วัดค่า OD₄₀₅ ได้ค่าเท่ากับ 1.054 และ 1:10,000 วัดค่า OD₄₀₅ ได้ค่าเท่ากับ 0.833 (ภาพที่ 16) ดังนั้นในการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาปริมาณแอนติเจนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* จะต้องมีความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดสอบน้อยที่สุด 10 นาโนกรัมจึงจะสามารถตรวจสอบได้ด้วยแอนติซีรัมที่ผลิตได้ในงานทดลองนี้

11. ผลการตรวจสอบตัวอย่างสั้มด้วยวิธี **Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

จากการตรวจสอบสั้มที่ปลูกในโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทั้งหมด 3 ชนิดโดยสั้มที่ปลูกในโรงเรียนแต่ละชนิดนำมาจากจังหวัดต่างๆ คือ สั้มโคนที่นำมาจากจังหวัดจันทบุรี จำนวน 12 ตัวอย่าง สั้มโคนที่นำมาจากจังหวัดแพร่ จำนวน 24 ตัวอย่าง สั้มโพนั้ทำข่อย จำนวน 12 ตัวอย่าง สั้มเขียวหวาน จำนวน 10 ตัวอย่าง สั้มโสนอาจารย์จัม จำนวน 10 ตัวอย่าง และมะนาว จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยสั้มโคนที่เก็บมาจากทั้ง 3 แหล่งยังไม่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่ง สั้มเขียวหวานนั้นแสดงอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี และบริเวณใบแสดงอาการจ้ำเขียวกระจาย (blotchy mottle) และมะนาวแสดงอาการใบด่าง บริเวณใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบมีอาการจ้ำเขียวกระจาย นำตัวอย่างทั้งหมดตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าน้ำคั้นพืชที่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ให้เป็นผลบวก เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่แสดงอาการของโรค โดยต้นปกตินั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเมล็ด ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งให้ผลเป็นลบ แสดงว่าอาการผิดปกติที่ปรากฏบนใบสั้มชนิดต่างๆที่นำมาตรวจสอบนั้นมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง โดยในการตรวจสอบในงานทดลองนี้พบว่าตัวอย่างสั้มโคนที่นำมาจากจังหวัดจันทบุรีนั้นเกิดผลบวกต่อแอนติซีรัมทั้งหมด 6 ตัวอย่าง สั้มโคนที่นำมาจากจังหวัดแพร่ 23 ตัวอย่าง สั้มโพนั้ทำข่อย 3 ตัวอย่าง สั้มโสนอาจารย์จัม 7 ตัวอย่าง สั้มเขียวหวาน 4 ตัวอย่าง และมะนาว 7 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) จากการตรวจสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้นั้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งได้แม้จะไม่แสดงอาการของโรคและสามารถตรวจสอบได้กับเส้นกลางใบของสั้มเพียงใบเดียว (0.1 กรัม) และสามารถนำแอนติซีรัมไปตรวจสอบโรคกรีนนิ่งกับสั้มที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆได้



ภาพที่ 15 การทดสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้โดยอ่านค่าของปฏิกิริยาจากด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Programmable Microplate Reader MODEL DV 990 BV 4, USA) ที่ค่า OD₄₀₅ นาโนเมตร



ภาพที่ 16 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RPLJ โปรตีนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) ที่แอนติซีรัมต่อ CLA สามารถทำปฏิกิริยาได้โดยพบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของส้มที่เก็บมาจากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งนำมาจากจังหวัดต่างๆ เมื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยวิธี Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ชื่อพืช	แหล่งที่มา	จำนวนส้มที่นำมาตรวจสอบ (ต้น)	
		จำนวนที่ตรวจสอบ	จำนวนที่ตรวจพบ
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	จังหวัดจันทบุรี	12	6
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	จังหวัดแพร่	24	23
ส้มโอ (<i>C. grandis</i>)	สวนอาจารย์จัม	10	7
ส้มโอพันธุ์ท่าข่อย (<i>C. grandis</i>)	จังหวัดพิจิตร	12	3
ส้มเขียวหวาน (<i>C. reticulata</i>)	-	10	4
มะนาว (<i>C. aurantifolia</i>)	-	10	7
รวม		78	50

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างสัณฐานิตต่างๆ แสดงอาการผิดปกติแตกต่างกันเพื่อมาตรวจสอบโรคกรีนนิง นั้นพบอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบที่เหลือง มีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottle) ในส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเซ้ง เมื่อนำใบที่แสดงลักษณะอาการดังกล่าวมา ตรวจสอบโดยเทคนิค PCR เกิดผลบวกทุกตัวอย่าง โรคกรีนนิงที่พบในประเทศไทยเกิดจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) (ภาพที่ 1) ซึ่งลักษณะอาการที่พบนั้นตรงกับที่มีรายงาน ไว้โดย Weinert *et al.* (2004) พบว่าลักษณะอาการใบที่แตกออกมาใหม่มีอาการเหลือง ต่างและมี แต้มเขียวกระจายบริเวณใบ บริเวณเส้น กลางใบจะมีลักษณะเหลือง ซึ่งเมื่อนำมาตรวจโรคพบเชื้อ แบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิง อาการของโรคกรีนนิงที่พบในประเทศไทยจะมีลักษณะอาการ เหมือนกับโรคกรีนนิงสายพันธุ์ใหม่คือ *Candidatus Liberibacter americanus* ที่พบในประเทศ บราซิล โดยแสดงลักษณะอาการ ใบเหลือง บริเวณใบมีแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottle) บริเวณ ใบ ผลจะมีขนาดเล็ก และเมล็ดจะลีบ เมื่อนำลักษณะอาการดังกล่าวมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิง (Teixeira *et al.*, 2005)

ตัวอย่างส้มโอที่แสดงลักษณะอาการใบเหลือง และเส้นกลางใบแตกนูน (vein corking) และใบมีการบิดม้วนคล้ายรูปถ้วย (leaf cupping) ใบด่าง (mottle) ซึ่งอาการส่วนใหญ่เป็นอาการที่ เกิดจากไวรัส CTV (Paradornuwat, 2004) ที่เกิดกับพืชตระกูลส้ม เมื่อนำลักษณะอาการดังกล่าวมา ตรวจโรคโดยวิธี PCR สำหรับเชื้อ CTV และ CLA แล้วจะให้ผลบวกทั้ง 2 โรค จึงเป็นไปได้ว่า ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจาก CTV จะรุนแรงกว่าโรค CLA ทำให้พบแต่ลักษณะอาการที่เกิดจาก เชื้อ CTV แต่เพียงอย่างเดียว อาจทำให้การวินิจฉัยเกิดความผิดพลาดได้ อำไพวรรณ (2520) พบว่า ในมะนาวซึ่งเป็นพืชที่มีความอ่อนแอต่อโรคไวรัส ทำให้ลักษณะอาการที่พบส่วนใหญ่จะเป็นอาการ ที่เกิดจากไวรัสไม่ค่อยพบลักษณะอาการของโรคกรีนนิงเพราะมีไวรัสระบาดรุนแรงมากจึงอาจเป็น อาการของโรคไวรัสข่มอาการของโรคกรีนนิงและเมื่อนำมะนาวมาตรวจสอบโรคกรีนนิงพบว่า สามารถตรวจพบโรคกรีนนิงได้จากลักษณะอาการดังกล่าว

ใบส้มโอที่แสดงอาการเส้นกลางใบใส (vein clearing) จะแสดงอาการชัดเจนเมื่อใบส้มโอ ยังอ่อนหรือจากต้นมีอายุน้อยเพียง 6 เดือน (จากโรงเรียนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน) ทุกตัวอย่างสามารถตรวจสอบโดยเกิดผลบวก โดยที่ใบยังไม่แสดงอาการของโรคกรีนนิง เนื่องจาก ทุกต้นใช้กิ่งพันธุ์ที่มาจากแหล่งเดียวกันหรือต้นเดียวกัน ดังนั้นในการเลือกกิ่งที่จะใช้ในการต่อกิ่ง

หรือตอกิ่งเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์นั้นควรจะมีการตรวจสอบต้นแม่ก่อนเพื่อป้องกันการติดมาของเชื้อโรคกรีนนิ่ง และควรเลือกต้นแม่ที่มีความสมบูรณ์และกิ่งที่มีความสมบูรณ์โดยปราศจากโรคทั้งจากโรคที่เกิดจากไวรัส CTV และโรคกรีนนิ่ง โดยเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปได้อีกทางหนึ่ง

สั้มเขียวหวานที่แสดงอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี มีใบเหลืองแฉกเขียวกระจาย ขนาดลดรูป และใบมักตั้งชี้ จะพบอาการชนิดนี้มากเมื่อนำมาตรวจโรค สามารถตรวจพบเชื้อโรคกรีนนิ่ง การสกัดดีเอ็นเอพบจากเส้นกลางใบของสั้มเขียวหวานที่แสดงลักษณะอาการดังกล่าวเพียง 2-3 ใบ ให้ปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 500 ng/ μ l ที่เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค PCR โดยให้ปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 900 นาโนกรัม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) Davis *et al.* (2000) ได้นำใบสั้มที่แสดงอาการขาดธาตุสังกะสีเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง แต่จะพบเชื้ออาการของโรคกรีนนิ่งจากสั้มแสดงอาการแฉกเขียวกระจายบริเวณใบที่แสดงอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี

การเก็บตัวอย่างสั้มเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอควรเก็บใบที่เป็นใบเพศลัด เพราะจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอรวมมากเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR และไม่ควรเก็บใบที่แก่ เพราะจะทำให้ได้ปริมาณเชื้อที่น้อยอาจเนื่องมาจากใบแก่ท่อน้ำท่ออาหารจะถูกทำลายและเริ่มมีการอุดตันทำให้ปริมาณของเชื้อมีน้อย และในการสกัดดีเอ็นเอใบที่มีการตัดให้เหลือแต่เส้นกลางใบแล้ว ควรเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ - 20° ซ ส่วนใบพืชที่เก็บมาและยังไม่มีการตัดให้เหลือแต่เส้นกลางใบควรใส่ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4° ซ (Maixner *et al.*, 1995) ดีเอ็นเอเมื่อสกัดได้แล้วควรเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ - 20° ซ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพและสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน

การสังเคราะห์ยีน *rplJ* โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้งสองชนิด (GB และ GE, ภาพที่ 3) ที่ออกแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในส่วนของโอเปรอนของยีนสร้างโปรตีนในไรโบโซม (β operon) ประกอบด้วยยีน *nusG-rplKAL-rpoB* gene cluster โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank (M94319) ทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของยีน *rplJ* ของ เชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งของสั้มที่มีการปลูกในประเทศไทย ได้แถบดีเอ็นเอเดียวขนาดประมาณ 513 คู่เบส และโดยมีความจำเพาะของไพรเมอร์สูง ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rplJ* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชคือ เชื้อ *R. solanacearum*, *X. citri* subsp. *citri* และ เชื้อ *E. coli* ซึ่งเชื้อเหล่านี้มี

รายงานใน GenBank ว่ามียีน *rpIJ* (GenBank accession number: NC_003295; NC_003919; NC_003062 and NC_004431 ตามลำดับ) (ภาพที่ 3ข) แสดงว่าไพรเมอร์ GB และ GE ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียโรครินนิ่งสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย อาจเนื่องมาจากยีน *rpIJ* ของเชื้อแต่ละชนิดนั้นก็มีความแตกต่างกัน รวมถึงเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งสายพันธุ์ *Candidatus Liberibacter africanus* (CLAf) ลำดับเบสของ β operon ต่างจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งสายพันธุ์ CLA เมื่อได้ออกแบบไพรเมอร์ A2 และ J5 ที่เพิ่มปริมาณยีนในส่วนโปรตีนของไรโบโซมคือยีน *rpIA* และ *rpIJ* ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *Candidatus Liberibacter* spp. สามารถเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ CLA ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 669 คู่เบส และเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อ CLAf ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอ 703 คู่เบส และพบว่ายีนในส่วนนี้มีความต่างกันของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ประมาณ 34 คู่เบส (Hocquelliet *et al.*, 1999) ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบในการทดลองนี้มีความจำเพาะต่อยีน *rpIJ* สาเหตุโรครินนิ่งที่พบในประเทศไทยอย่างไรก็ตามควรมีการศึกษานำตัวอย่างโรครินนิ่งที่พบในประเทศอื่นแถบเอเชียอาจทดสอบว่าจะสามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpIJ* ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ การใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบยีนในส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter* spp. ใช้ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณยีนทั้งหมด 3 ชนิด คือ ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ทั้งสองสายพันธุ์ (CLA และ CLAf) ส่วนไพรเมอร์ OI2c และ OA1 เพิ่มปริมาณยีนของ CLAf เท่านั้น โดยไพรเมอร์ OI1 ได้มีการออกแบบจากตำแหน่งที่เป็น conserve region ของทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันร้อยละ 100 การนำไพรเมอร์ทั้งสามชนิดนี้มาใช้ประโยชน์เนื่องจากในการตรวจสอบโรครินนิ่งนั้นบางครั้งในแปลงปลูกอาจมีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคทั้งสองสายพันธุ์ปนกันอยู่ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจสอบได้ทั้งสองสายพันธุ์ภายในครั้งเดียวเป็นการประหยัดเวลาและตรวจสอบได้เร็ว (Jagoueix *et al.*, 1996) ในประเทศบราซิลพบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งสายพันธุ์ใหม่คือ *Candidatus Liberibacter americanus* ซึ่งได้มีการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบยีนในส่วน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer คือ ไพรเมอร์ OI1 , OI2c และ OA1 ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสามชนิดสามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของเชื้อ CLA และ เชื้อCLAf เท่านั้นแต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบส้มที่แสดงอาการของโรครินนิ่งในพื้นที่นี้เนื่องจากมีการเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งสายพันธุ์ใหม่ และได้มีการออกแบบไพรเมอร์ GB1 และ GB3 โดยไพรเมอร์นี้สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ของดีเอ็นเอได้และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ยีนในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Candidatus Liberobacter americanus* มีดีเอ็นเอในบางส่วนขาดหายไปและมีตำแหน่งของเบสในบางตำแหน่งที่มีความแตกต่างจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ทำให้

ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนในส่วนนี้ได้ (Teixeira *et al.*, 2005) การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชด้วยเทคนิค PCR บางครั้งเป็นเรื่องค่อนข้างยากเพราะว่าในขั้นตอนการทำ PCR ส่วนที่เป็น crude extract ที่ติดตามจะไปยังยังปฏิกิริยาทำให้ผลของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปหรือได้ผลที่เกิดความผิดพลาดได้ ทำให้มีการใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาตรวจสอบโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมากและประหยัดค่าใช้จ่าย โดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาดังกล่าวเป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาโดยการใช้แอนติบอดีตรวจสอบกับ plant extract ได้ดีกว่าเทคนิค PCR โดยที่ crude extract จากพืชไม่มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเหมือนกับเทคนิค PCR (Gao *et al.*, 1993) การศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุศาสตร์ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในยีน *omp* วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสัมพันธ์กับการจำแนกทางเซรุ่มวิทยา พบว่ามี 7 serogroup (Gao *et al.*, 1993) แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โดยใช้ RFLP การใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยา ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อที่พบในประเทศต่างๆค่อนข้างยาก

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* กับ *Candidatus Liberibacter africanus* (Jagoueix *et al.*, 1997) โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดจัดอยู่ใน alpha subdivision *Proteobacteria* เหมือนกันแต่ยีน *rplJ* มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ phylogenetic tree ซึ่งมีความแตกต่างกันร้อยละ 20 และเปรียบเทียบกับยีน *rplJ* ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นที่อยู่ใน subdivision *Proteobacteria* พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยยีนในส่วน of 16S/23S rRNA ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ก็มีความแตกต่างกัน โดย 16S/23S Intergenic spacer จาก rDNA operon ของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* และ *Candidatus Liberibacter africanus* สามารถจำแนกได้ว่า *Candidatus Liberibacter africanus* มียีน isoleucine tRNA (tRNA^{Ile}) และ alanine tRNA (tRNA^{Ala}) แยกจากกัน 11 นิวคลีโอไทด์ ส่วน Intergenic spacer ของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* พบยีน alanine tRNA (tRNA^{Ala}) เพียงยีนเดียว ซึ่งระดับความเหมือนของ Intergenic spacer ของ *Candidatus Liberibacter spp.* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เท่ากับร้อยละ 79.46 Ribosomal operon และ 16S/23S spacer region ที่ศึกษามานี้ น่าจะเป็นส่วนที่แสดงความแตกต่างของ 2 สายพันธุ์นี้ (Jagoueix *et al.*, 1997) ได้มีการเปรียบเทียบยีน *omp* ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิงกับแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน alpha subdivision *Proteobacteria* และ gamma subdivision *Proteobacteria* โดยพบว่าเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่เก็บตัวอย่างมาจากประเทศต่าง เช่น อินเดีย ไทย จีน เนปาล และฟิลิปปินส์ เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ phylogenetic tree จาก ดีเอ็นเอของยีน *omp* ซึ่งยีนนี้เป็นส่วนหนึ่งของ core genome โดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น พบว่าไม่มี

ความใกล้ชิดกับแบคทีเรียอื่น ยีน *omp* เชื้อ *Candidatus Liberobacter asiaticus* ทั้งหมดจัดอยู่ใน cluster เดียวกัน และมี *Candidatus Liberibacter africanus* อยู่ใน branch ด้วย สามารถจัดเชื้อ *Candidatus Liberobacter asiaticus* ได้เป็น 2 กลุ่มตามตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ กลุ่มแรกคือ จากประเทศอินเดีย เนปาล และประเทศไทย กลุ่มที่สองคือ ประเทศฟิลิปปินส์และประเทศจีน พบว่าทั้งสองกลุ่มมียีน *omp* ที่มีความเหมือนกันมาก และใช้ค่า bootstrap value น้อย เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีค่าความเหมือนร้อยละ 99.9 และมีความแตกต่างจากเชื้อ *Candidatus Liberibacter africanus* isolates South Africa- Nelspruit โดยแตกต่างกันร้อยละ 58.5 (Bastianel *et al.*, 2005)

การสังเคราะห์โปรตีน RPLJ ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α โดยพลาสมิด pGEX-2T เนื่องจากเมื่อสังเคราะห์โปรตีนจะได้ fusion โปรตีนที่มีขนาดใหญ่เพราะจะมีโปรตีน GST และโปรตีนเป้าหมาย (RPLJ) รวมกันอยู่ ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้พลาสมิด pQE 80 pQE 81 และ pQE 30 โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ซึ่งเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เข้าไปที่ตำแหน่ง 5' ของไพรเมอร์เพื่อจะได้นำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดทั้งสามชนิดที่กล่าวมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (ไม่แสดงผล) พบว่าเมื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเข้ากับ พลาสมิดทั้งสามชนิดนั้นไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากไม่มีการแสดงออกของยีน และไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน RPLJ ในระบบเซลล์ของแบคทีเรีย จึงได้มีการทดลองพัฒนาเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนยาปฏิชีวนะ และสารที่เป็นตัว inducer คือ IPTG แต่ยีน *rpLJ* ก็ยังไม่มีการแสดงออกโดยใช้พลาสมิดทั้งสามชนิดดังกล่าว พบว่ามีปัญหาในการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้มีการเปลี่ยนแบคทีเรียในหลายสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ DH 5 α และสายพันธุ์ M15 แต่ก็ไม่สามารถจะผลิตโปรตีนได้ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากความเป็นพิษของโปรตีนต่อเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ตายหลังจากการชักนำให้ผลิตโปรตีนหรือเกิดจากเซลล์สูญเสียพลาสมิดไประหว่างการเจริญเติบโต และบางกรณีพบว่าโปรตีนที่ผลิตได้ไม่คงทน อาจเกิดการถูกย่อยสลายด้วย protease ไปจึงเกิดโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนเป้าหมายและพบในปริมาณที่น้อยมาก (Williams *et al.*, 1995) เนื่องจากโปรตีน RPLJ มีขนาดเล็ก (ขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน) จึงเลือกใช้พลาสมิด pGEX-2T ซึ่งเป็น fusion โปรตีนอาจจะช่วยเสริมความคงทนของโปรตีน และง่ายต่อการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ (Williams *et al.*, 1995)

การสังเคราะห์โปรตีน RPLJ ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α โดยใช้ พลาสมิด pGEX-2T พบว่าสามารถสังเคราะห์โปรตีน RPLJ เป้าหมาย ที่เชื่อมรวมอยู่กับโปรตีน GST เป็น

จำนวนมาก แต่โปรตีนนั้นอยู่ในส่วนของกากตะกอนเซลล์ (cell debris) ทำให้ยากต่อการทำให้โปรตีนที่ได้นั้นบริสุทธิ์ จึงได้ทำการทดลองเพื่อแยกโปรตีนออกจากตะกอนเซลล์ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆที่มีคุณสมบัติในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ และละลายน้ำได้ดีขึ้น เช่น การใช้ 10 mM imidazole (Wingfield *et al.*, 1995) และ Guanidine hydrochloride เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในตะกอนเซลล์ และได้เลือกใช้วิธีการที่ขจัดโปรตีนของเชื้อ *E. coli* ออกจากตะกอนเซลล์โดยใช้สาร N-laurylsarcosine 1.5% (w/v) (Frangioni and Neel, 1992) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในตะกอนเซลล์ ไม่สามารถทำให้โปรตีนลูกผสม (GST + RPLJ) ละลายออกมาได้ ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้วิธีการที่จะขจัดเอาโปรตีนจากเชื้อ *E. coli* ออกจากตะกอนเซลล์ให้มากที่สุดโดยใช้ 8M urea ซึ่งวิธีนี้จะทำให้โปรตีนที่ได้นั้นเสียสภาพ แต่สามารถที่จะสกัดโปรตีนเป้าหมายออกจากตะกอนเซลล์ได้ จากนั้นทำการแยกโปรตีนลูกผสม GST – RPLJ ให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยแยกขนาดของโปรตีนลูกผสมบน 15% SDS – polyacrylamide gel ทำการตัดแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกโปรตีนออกจากเจลด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง Tris glycine buffer วิธีการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์จากเจลที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่ายและสามารถตรวจสอบโปรตีนโดยนำมาย้อมด้วย CuCl_2 เป็น negative staining แถบโปรตีนที่ต้องการจะสกัดกับพื้นหลังที่ขุ่น (Lee *et al.*, 1987) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่าและตัดเจล บริเวณโปรตีนที่เราต้องการได้ง่ายและไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพเหมือนกับการย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่สามารถใช้ได้กับ recombinant protein อื่นๆที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี electro-elution เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านอื่นต่อไป

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน RPLJ ด้วย SDS PAGE เพื่อตรวจสอบว่าเกิดแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียวของโปรตีน GST-RPLJ ที่มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน เพื่อจะได้นำโปรตีนที่ได้นั้นนำไปเป็นแอนติเจนในการฉีดสัตว์ทดลองต่อไป การเก็บโปรตีนที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วควรเก็บไว้ในอุณหภูมิ - 80 °C จะทำให้เก็บได้เป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าเก็บไว้ในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่านี้จะทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นโปรตีนที่เก็บไว้นานมา พบว่ามีปริมาณที่ลดลง (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นการนำโปรตีนที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆจำเป็นต้องใช้โปรตีนที่มีการสังเคราะห์ใหม่หรือผ่านการเก็บในระยะเวลาที่ไม่นาน เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพในการทดสอบคุณสมบัติต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

เทคนิค Dot blot hybridization สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นกลางใบของส้มที่เป็นโรครินนิ่ง เมื่อใช้ DNA probes ที่ติดฉลากด้วยสาร DIG-11-dUTP ได้จำเพาะดีเอ็นเอของ *Candidatus Liberibacter asiaticus* จากตัวอย่างที่แสดงอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียว บริเวณใบมีลักษณะจ้ำสีเขียวกระจายบริเวณใบ (blotchy mottle) เมื่อนำวิธีนี้มาตรวจสอบตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการก็สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุของโรครินนิ่ง และตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากไวรัส CTV เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบโดยใช้ DNA probes ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งก็สามารถตรวจสอบพบโรครินนิ่งได้ แสดงว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อทั้งสองชนิด (mixed infection) มีการเข้าทำลายของโรคที่เกิดจากไวรัสมากกว่าจึงทำให้อาการที่ปรากฏออกมาโดยคุณลักษณะอาการเป็นอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสซึ่งข่มลักษณะอาการของโรครินนิ่ง ดังนั้นจึงทำให้การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นในแปลงปลูกส้มอย่างเดียวยังไม่ได้ จึงควรใช้การตรวจสอบโรคโดย DNA probes อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้มีความไวในการตรวจสอบสูง และสามารถที่จะตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก และเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิค PCR นอกจากนี้การตรวจสอบโดยการติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP เป็นติดฉลาก DNA probes โดยใช้สารเคมี มีอันตรายน้อยกว่าการใช้สารกัมมันตรังสี ที่ใช้ในสมัยก่อน และยังมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบที่ดี การเปรียบเทียบการติดฉลาก DNA probes โดยใช้ radioactive กับการใช้ DIG-11-dUTP ซึ่งเป็น non radioactive จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าการใช้ DIG-11-dUTP ซึ่งเป็น non radioactive สามารถเกิดผลบวกได้เทียบเท่าการใช้ radioactive ซึ่งวิธีการตรวจสอบ (Hocquellet *et al.*, 1997) การใช้ non radioactive เป็นวิธีที่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพน้อยกว่าและผลการตรวจสอบก็ให้ผลที่ใกล้เคียงกันกับวิธี radioactive โดยทั้งสองวิธีสามารถให้ผลการตรวจสอบได้ประสิทธิภาพที่สูง

การตรวจสอบความจำเพาะของ DNA probes โดยการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบพืชอื่น เช่น ใบกุหลาบ ใบลูกหว้า ใบยาง ที่เป็นพืชอยู่ในสวนส้มโอที่เป็นโรครินนิ่งรวมถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ เชื้อ *R. solanacearum* และ เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* และแบคทีเรีย *E. coli* พบว่า *rplJ*- probes ที่พัฒนาได้นั้นสามารถเกิดผลบวกกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบส้มที่เป็นโรครินนิ่งเท่านั้นโดยใช้พลาสมิดสายผสม pGEX-*rplJ* เพื่อใช้เป็น positive control ซึ่งพลาสมิดนี้ ทรานส์ฟอร์มแบคทีเรีย *E. coli* ได้เรียบร้อยแล้ว ดังนั้น DNA probes ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบส้มที่เป็นโรครินนิ่งสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

การเปรียบเทียบการใช้เทคนิค PCR และเทคนิค Dot blot hybridization พบว่าในการตรวจสอบตัวอย่างโรคกรีนนิ่งที่เก็บมานั้นสามารถตรวจสอบได้ทั้งสองเทคนิคจากพืชที่ปลูก จึงแสดงว่าส้มที่ปลูกในประเทศไทยนั้นเป็นโรคกรีนนิ่งเกือบทุกพื้นที่ของประเทศ เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบตัวอย่างโรคกรีนนิ่งได้อย่างรวดเร็ว เชื่อถือได้ แต่การตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเนื่องจาก *Taq* DNA polymerase มีราคาแพง ส่วนเทคนิค Dot blot hybridization นั้นสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ทีละมาก ผลการตรวจสอบเชื่อถือได้ มีความไว (sensitive) และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบถูกกว่าแต่ใช้เวลานานกว่าการใช้เทคนิค PCR จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าทั้งสองเทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งได้ทั้งสองเทคนิค มีความไวในการตรวจสอบ ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยมากถึง 100 นาโนกรัม

การผลิตแอนติซีรัมในกระต่ายโดยโปรตีนจากยีน *rpLJ* ให้ค่าไตเตอร์ 1:10,000 และแอนติซีรัมนั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนของเชื้ออื่นๆ คือโปรตีน CP ของเชื้อไวรัส Citrus tristeza โปรตีน CP ของเชื้อไวรัส Papaya ringspot virus เชื้อ *R. solanacearum* เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยโปรตีนที่ฉีดเข้ากระต่ายมีโปรตีน GST รวมอยู่ด้วย แต่โปรตีน GST เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน RPLJ ยังคงเหมือนเดิม (Pillai *et al.*, 1995) และเชื้อแบคทีเรียที่มีโปรตีน GST ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิต ดังนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่พบในประเทศไทย เทคนิค indirect ELISA สามารถตรวจสอบส้มที่ยังไม่แสดงอาการของโรคได้เช่นกัน การבודตัวอย่างน้ำคั้นควรนำเฉพาะส่วนของเส้นกลางใบเท่านั้นเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งจะจำกัดในท่ออาหารพืช ซึ่งในการבודตัวอย่างเส้นกลางใบทำได้ยากและต้องใช้ในโตรเจนเหลว ทำให้เสียเวลาในการבודตัวอย่างค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค indirect ELISA มีข้อดีคือสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมาก และเสียค่าใช้จ่ายน้อย ใช้ง่าย และมีความไวของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจน Ohtsu *et al.* (2002) ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยทำการแยกเชื้อโรคกรีนนิ่งให้บริสุทธิ์จากใบแพงพวย นำโปรตีนแยกได้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้ากระต่ายพบว่าได้ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม 1:16 และการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมกับโปรตีนของไวรัส Citrus tristeza และพืชปกติพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา โดยการตรวจสอบแบบ microprecipitin test และ Ke *et al.* (1993) ได้มีการผลิต polyclonal ascetic antiserum และตรวจสอบโรคกรีนนิ่งจากใบแพงพวยที่มีการปลูกเชื้อไว้ พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ต่ำ และไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ในการ

ทดลองนี้พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อโรคกรีนนิงสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย สามารถนำไปใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิงกับสัณฐานิตต่างๆในการผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรคและการวินิจฉัยโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัด นอกจากนี้ยังเป็นรายงานแรกที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมของยีน *rp11* ของเชื้อโรคกรีนนิงในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และสามารถแยกให้บริสุทธิ์ที่ยังคงคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ให้ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมได้สูง 1:10,000 ซึ่งมากกว่าการใช้โปรตีนแยกได้จากเชื้อโรคกรีนนิงโดยตรง

สรุปผลการทดลอง

โรคกรีนนิ่งที่พบในส้มของประเทศไทยมีลักษณะอาการสำคัญอยู่ 2 ลักษณะ คือ ลักษณะอาการอาการใบเหลือง เส้นกลางใบเขียวชัดเจน และที่บริเวณใบที่เหลืองจะมีลักษณะอาการแต้มสีเขียวกระจาย (blotchy mottle) ใบมีลักษณะอาการคล้ายการขาดธาตุสังกะสี ส่วนอีกลักษณะ คือ ใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ ที่เส้นกลางใบมีสีเขียวในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง ใบมักตั้งชี้ขึ้น ลักษณะอาการดังกล่าวพบได้ทั้งในส้มโอ ส้มเขียวหวาน และส้มเขียว และส้มอื่นๆที่มีการปลูกในประเทศไทย

ไพรเมอร์ GB และ GE ที่ออกแบบมามีความจำเพาะต่อยีน *rplJ* ของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทย โดยสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rplJ* ได้ ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 513 คู่เบส เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีค่า GC content ร้อยละ 38.2 และแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 171 ตัว มีกรดอะมิโน serine มากที่สุด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99.8 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนเท่ากับร้อยละ 100 กับที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank (M94319) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rplJ* ที่ได้ในประเทศไทยฝากลงใน GenBank โดยได้เลข accession number DQ852665

rplJ-probes ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP ที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot blot hybridization มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งในประเทศไทยเนื่องจากการตรวจสอบกับดีเอ็นเอของพืชอื่นที่อยู่ภายในแปลงปลูกส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งและตรวจสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* และเชื้อ *E. coli* พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยากับ *rplJ*-probes โดยสามารถใช้ *rplJ*-probes นี้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทยได้ จากการเก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นมาตรวจสอบโรคกรีนนิ่งด้วย 2 เทคนิค พบว่าส้มที่ปลูกในประเทศไทยมีการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

จากการสังเคราะห์โปรตีน RPLJ ของเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทย สามารถสังเคราะห์โปรตีน RPLJ ในรูปของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน GST ทางด้านปลาย C- terminal ที่อยู่บนพลาสมิดพาหะ pGEX – 2T ได้ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α แต่เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนติดอยู่ในส่วน

ของกากตะกอนเซลล์ เพื่อที่จะแยกเอาริคอมบีแนนท์โปรตีนที่เราต้องการ จึงต้องหาวิธีที่จะกำจัดโปรตีนของเชื้อ *E. coli* ออกจากตะกอนเซลล์ให้ได้มากที่สุดซึ่งจากการทดลองใช้ 8M urea สามารถละลายโปรตีนของเชื้อ *E. coli* ออกจากตะกอนเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ทำให้ง่ายต่อการตัดเจลเอาเฉพาะส่วนของริคอมบีแนนท์ที่เราต้องการมาเชื่อมสี่เจลด้วย 0.3 M CuCl_2 ซึ่งการเชื่อมด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้กับริคอมบีแนนท์โปรตีนอื่นที่ต้องการแยกจากเจลโดยวิธี electro elution เพราะสามารถมองเห็นแถบโปรตีนที่เราต้องการได้ด้วยตาเปล่า และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพเหมือนการเชื่อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เมื่อแยกโปรตีนเหล่านี้ออกจาก polyacrylamide gel จึงได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีนของเชื้อ *E. coli* โปรตีนที่แยกได้นั้นมีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในการศึกษาในงานทางด้านอื่นและนำไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตสัตว์ทดลองในการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus*

แอนติซีรัมที่ผลิตได้นั้นมีค่าไตเตอร์ที่มีความเจือจางสูงสุดที่ 1:10,000 โดยค่าที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader ได้ค่า OD เท่ากับ 0.724 แอนติซีรัมนี้สามารถตรวจสอบกับโปรตีนของเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ที่ค่าความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุด 10 นาโนกรัม และแอนติซีรัมมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* โดยได้มีการตรวจสอบกับโปรตีนของเชื้ออื่นๆ คือโปรตีน CP ของเชื้อไวรัส Citrus tristeza โปรตีน CP ของเชื้อไวรัส Papaya ringspot virus เชื้อ *R. solanacearum* เชื้อ *X. citri* subsp. *citri* เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* พบว่าไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนของเชื้อดังกล่าว และได้นำแอนติซีรัมมาตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA กับตัวอย่างของส้มโอ ส้มเขียวหวาน และมะนาว จำนวน 78 ตัวอย่าง พบว่ามีต้นที่เป็นโรคทั้งหมด 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 64.1 ของตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด โดยตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบนั้นมีตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่งและตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรคแต่ก็สามารถตรวจสอบได้ผลบวก จากผลการทดลองนี้จะสนับสนุนผลตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค Dot blot hybridization ที่ให้ผลบวกเช่นเดียวกัน ดังนั้นการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งสามารถตรวจสอบได้ทั้ง 3 เทคนิค คือ เทคนิค PCR เทคนิค Dot blot hybridization และเทคนิค indirect ELISA ซึ่งแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีและสามารถใช้ตรวจสอบโรค กรีนนิ่งได้ แต่เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบน้อย สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก ใช้เวลาในการตรวจสอบไม่นานและผลการตรวจสอบเชื่อถือได้ จึงน่าจะเป็นวิธีการที่ควรนำไปใช้ประโยชน์โดยทั่วไป