บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของอ้อยในประเทศไทย เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างง่าย รวดเร็ว และมีราคาถูก สามารถประยุกต์ใช้ในการประเมินโรคในแปลงเบื้องต้นและห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Loop mediated DNA amplification (LAMP) และการพัฒนา Immunodiminant membrane protein (Imp) antibody

จากผลการวิจัยการพัฒนาเทคนิค LAMP ได้ชุดไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด คือไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST) และ ไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh) ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไอโซเลทบุรีรัมย์ และลำปาง ตามลำดับ และทดสอบได้ องค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาและสภาวะที่มีความเหมาะสมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ทั้งการตรวจด้วยเครื่อง Thermocycler และ Dry bath incubator เพื่อปรับอุณหภูมิคงที่ ที่ 65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 ชั่วโมง โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยการเติมสาร SYBR GreenI และยืนยันผลการตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ให้ ผลการตรวจสอดคล้องและมีความไวเทียบเท่ากับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR

การสังเคราะห์ Imp protein เพื่อใช้ผลิต Imp antibody โดยการสังเคราะห์ I*mp* gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus* Phytoplasma oryzae strain: RYD ได้โคลนของ I*mp* gene (RYD-IMP) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 501 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอมิโนได้ 164 aa ชิ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูก clone เข้า pJET vector และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้อง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่สั่งสังเคราะห์พบว่ามีความเหมือนกัน 100% เตรียม expression plasmid vector pET200 ที่เปิดด้วย *Nhe*I และ *Sac*I เพื่อนำชิ้น pJET-RYD-IMP จาก pJET เข้าเชื่อมต่อ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ก่อนนำเข้าสู่ *E. coli* strain BL21 เพื่อชักนำการผลิต RYD-IMP protein ต่อไป

คำสำคัญ: เทคนิคแลมป์, ยีน 16S rRNA, แอนติบอดี Imp, โปรตีน Imp

ABSTRACT

Loop mediated DNA amplification (LAMP) technique and antibody against Immunodiminant membrane protein (Imp) were developed for detection of sugarcane white leaf phytoplasma which is one of the most important diseases of sugarcane in Thailand. These techniques were simplicity, less time-consuming and low cost providing major advantages. They have the potential to be used as a simple assay in small laboratories.

LAMP is a rapid method that can amplify 16S rRNA gene with two sets of primers , R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST and F3-16S rDNA-SCBR-ST) and R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh and F3-16S rDNA-SCLP-HCh), designed from Burirum and Lumpang isolates respectively. The reaction was carried out at a constant temperature at 65°C for 1 h in thermocycler or simple equipment such as a regular dry bath incubator. The amplified product can be visual directly through the SYBR GreenI colorimetric assay and confirmed by agarose gel electrophoresis. Base on this work, the LAMP technique was a good technique of sensitivity and specificity by using the sets of conventional 16S rDNA phytoplasma-specific primers the same as nested PCR technique.

Imp protein was developed from the clone containing the Imp gene of *Candidatus* Phytoplasma oryzae strain: RYD (RYD-IMP). The RYD-IMP gene 501 bp was cloned into the pJET vector and sequenced. The entire predicted RYD-IMP gene encoded RYD-IMP protein composed of 164 amino acids . The RYD-IMP gene was subcloned into the *Nhe*I and *Sac*I sites or pET200 bacterial expression vector and the new construct was designated pET200-IMP and transformed to *E. coli* strain BL21 for further recombinant protein production.

Keywords: LAMP assay, 16S rRNA gene, Imp antibody, Imp protein