



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 1

เรื่อง นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.สุภาพร กลิ่นคง

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผศ.ดร.สุจินต์ ภัทรภูวดล

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รศ.ดร.คณินนิตย์ เจริญวรารกร

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดโครงการ นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สัญญาเลขที่ RDG5750035

โครงการย่อยที่ 1 “นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย”

รายงานฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อย

(ภาษาอังกฤษ) Innovative detection of sugarcane white leaf phytoplasma for sugarcane breeding

ชื่อผู้วิจัย นางสาวพร กลิ่นคง

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 034-351890/034-351890 E-mail agrsup@ku.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

งบประมาณที่ได้รับ 990,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ เดือนสิงหาคม 2557 ถึง เดือนกรกฎาคม 2558

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2558

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1.1 พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

2.1.2 พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลาตามแผน	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ข้อชี้แจง
1. เพื่อให้ได้องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐานของ Imp gene	1.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ Imp gene ด้วยเทคนิค PCR	ส.ค.57-ต.ค.57	ส.ค.57-ต.ค.57	

	1.2 สังเคราะห์และโคลน <i>Imp</i> gene	พ.ย.57-ม.ค.58	พ.ย.57-ม.ค.58	สังเคราะห์ <i>Imp</i> gene จากข้อมูล ยีนของเชื้อใน กลุ่มเดียวกับอ้อย ใบขาว คือ <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i> <i>oryzae</i>
	1.3 วิเคราะห์ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ <i>Imp</i> gene	ก.พ.58-ก.ค.58	ก.พ.58-ก.ค.58	
2. เพื่อให้ได้ วิธีการตรวจเชื้อ ไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบ ขาวอ้อยด้วย เทคนิค LAMP โดยการตรวจ ยีน 16S rRNA และ <i>secA</i>	2.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่ สำหรับการตรวจยีน 16S rRNA และ <i>secA</i> สำหรับ เทคนิค LAMP	ส.ค.57-ต.ค.57	ส.ค.57-ต.ค.57	
	2.2 ทดสอบสถานะที่ เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP	พ.ย.57-ม.ค.58	พ.ย.57-ม.ค.58	
	2.3 ทดสอบวิธีที่เหมาะสม ในการตรวจวัดยีนที่เพิ่ม ขยายขึ้นด้วยเทคนิค visual LAMP	ก.พ.58-ก.ค.58	ก.พ.58-ก.ค.58	
3. ถ่ายทอด เทคโนโลยีให้แก่ หน่วยงาน ภาครัฐและ เอกชนที่ เกี่ยวข้องกับ อุตสาหกรรม อ้อย	3.1 จัดฝึกอบรมวิธีการ ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย เทคนิค LAMP	มิ.ย.58-ก.ค.58	มิ.ย.58-ก.ค.58	

2.3 ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และที่ได้จริง

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100% ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไข ที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
1. ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับยีน <i>Imp</i> gene	100%	-
2. สังเคราะห์ <i>Imp</i> gene และได้โคลน <i>Imp</i> gene	100%	

3. ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับสำหรับยีน 16S rRNA และ secA สำหรับเทคนิค LAMP	100%	-
4. ได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยใบขาว	100%	-
5. จัดฝึกอบรมวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP	100%	

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี) -

2.5 งบประมาณที่ได้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 885,000 บาท

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ (งวดที่ 1)	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณที่ได้จ่าย (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	30,000.00	30,000.00
หมวดค่าจ้าง	0	0
หมวดค่าใช้สอย	206,000.00	187,186.06
หมวดค่าวัสดุ	235,000.00	167,031.31
รวมทั้งสิ้น	471,000.00	384,217.37

เงินคงเหลือ 471,000 – 384,217.37 = 86,782.63 บาท (ขอเกินไปใช้รวมงวดที่ 2)

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ (งวดที่ 2)	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณที่ได้จ่าย (บาท)
หมวดค่าตอบแทน	15,000.00	15,000.00
หมวดค่าจ้าง	0	0
หมวดค่าใช้สอย	214,000.00	228,491.45
หมวดค่าวัสดุ	185,000.00	257,291.18
รวมทั้งสิ้น	414,000.00	-
ยอดยกมาจากงวดที่ 1	86,782.63	-
รวมทั้งสิ้น	500,782.63	500,782.63

2.6 งานตามแผนโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป -

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข -

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว. -

(ลงนาม)

.....
(รองศาสตราจารย์สุภาพร กลิ่นคง)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 30 กันยายน 2558

รายละเอียดของผลการดำเนินงาน

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทสรุปผู้บริหาร	8
บทคัดย่อ	9
ABSTRACT	10
บทนำ	11
วัตถุประสงค์	12
การตรวจเอกสาร	12
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	23
สรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายละเอียดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Thermocycler	18
2	องค์ประกอบของสารสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP	19
3	รายละเอียดของตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler	21
4	เปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และโดยการเติมสารเรืองแสง	31
5	รายละเอียดของตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler	32
6	ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Directed-PCR และ Nested-PCR	33
7	สรุปผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคแลมป์ โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	34
8	สรุปผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคแลมป์ โดยการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain)	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงรายละเอียดของ pET200 expression vector	16
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RYD-IMP ใน pJET vector จากการใช้ไพรเมอร์ RYD-Nhe-F และ RYD- Sac-R ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์	24
3	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ subclone เข้า pJET vector เพื่อเปรียบเทียบกับที่สังเคราะห์ RYD-IMP	25
4	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากชิ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP กับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากภาพที่ 3	26
5	การตัดชิ้น Vector PET200 และ pJET-RYD-IMP ด้วย enzyme <i>NheI</i> และ <i>SacI</i> เพื่อเตรียม Vector pET200	26
6	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Directed PCR และ Nested PCR	28
7	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ออกแบบจากยีน 16S rRNA ไอโซเลทบูรีรัมย์ (16S-SCBR primers) และไอโซเลทลำปาง (16S- SCLP primers)	29
8	ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค LAMP โดยการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาของไอโซเลทบูรีรัมย์ (16S-SCBR primers) และไอโซเลทลำปาง (16S-SCLP primers)	30
9	gel electrophoresis ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบ	36
10	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Directed PCR	36
11	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Nested PCR	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วย เครื่องพีซีอาร์ (Thermalcycler) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)	38
13	ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)	38
14	ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วย เครื่องพีซีอาร์ (Thermalcycler) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)	39
15	ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)	39

นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อย

Innovative detection of sugarcane white leaf phytoplasma for sugarcane breeding

สุภาพร กลิ่นคง คณิงนิตย์ เจริญวรารกร และ สุจินต์ ภัทรภูวดล
Supaporn Klinkong Kanungnit Reanwarakorn and Sujin Patarapuwadol

บทสรุปผู้บริหาร

โรคใบขาวของอ้อยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมามีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทย ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดปีละไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านบาท โรคนี้แพร่ระบาด โดยเชื้อติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ ในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้ได้ผลแบบยั่งยืนในระยะยาวและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปในปัจจุบันคือการใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และได้มีการนำเทคนิคที่มีความไวสูง (sensitivity) มาใช้ตรวจเชื้อในตาอ้อยที่จะนำมาเพาะเลี้ยงและจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคเสริมวิทยา และเทคนิค Loop mediated DNA amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไวในการตรวจเทียบเท่าเทคนิค Nested PCR และตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว สามารถปฏิบัติงานได้ในห้องปฏิบัติการด้านพืชทั่วไปที่ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือราคาแพง เป็นการวิจัยที่จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพการตรวจเชื้อทั้งในอ้อยและแมลง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและการพัฒนาพันธุ์อ้อยต้านทานโรคในอนาคต

จากผลการวิจัยการพัฒนาเทคนิค LAMP ได้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจำนวน 2 ชุด และทดสอบได้ องค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาและสภาวะที่มีความเหมาะสมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ทั้งการตรวจด้วยเครื่อง Thermocycler และ Heat box โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยการเติมสาร SYBR Green และยืนยันการตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลายขนาดมีลักษณะคล้ายขั้นบันได ให้ผลการตรวจสอบสอดคล้องและมีความไวเทียบเท่ากับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR และอยู่ในขั้นตอนพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อสะดวกและประหยัดเวลาในการตรวจยิ่งขึ้น รวมทั้งออกแบบและทดสอบชุดไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนอื่นเช่น *secA* เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคนี้

การพัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยการสังเคราะห์ Imp gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus Phytoplasma oryzae* strain: RYD ได้โคลนของ Imp gene (RYD-IMP) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 501 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอะมิโนได้ 164 aa ขึ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูก clone เข้า pJET และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้อง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่ส่งสังเคราะห์พบว่ามีเหมือนกัน 100% เตรียม expression plasmid vector pET200 ที่เปิดด้วย *NheI* และ *SacI* เพื่อนำขึ้น pJET-RYD-IMP จาก pJET เข้าเชื่อมต่อ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ก่อนนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 เพื่อชักนำการผลิต RYD-IMP protein ต่อไป

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของอ้อยในประเทศไทย เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างง่าย รวดเร็ว และมีราคาถูก สามารถประยุกต์ใช้ในการประเมินโรคในแปลงเบื้องต้นและห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Loop mediated DNA amplification (LAMP) และการพัฒนา Immunodominant 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 และยืนยันผลการตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ให้ ผลการตรวจสอบสอดคล้องและมีความไวเทียบเท่ากับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR

การสังเคราะห์ Imp protein เพื่อใช้ผลิต Imp antibody โดยการสังเคราะห์ Imp gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus Phytoplasma oryzae* strain: RYD ได้โคลนของ Imp gene (RYD-IMP) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 501 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอะมิโนได้ 164 aa ขึ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูก clone เข้า pJET vector และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้อง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่สังเคราะห์พบว่ามีความเหมือนกัน 100% เตรียม expression plasmid vector pET200 ที่เปิดด้วย *NheI* และ *SacI* 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 Immunodominant 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

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทย มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโดยจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ 2 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura) (Wongkaew, et al. 1997; Hanboonsong, et al. 2002) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว ชนิด *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura (Hanboonsong, et al. 2006) ในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้ได้ผลแบบยั่งยืนในระยะยาวและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปนั้นคือการใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และมีการนำเทคนิคที่มีความไวสูง (sensitivity) มาใช้ตรวจเชื้อปริมาณน้อยๆ ได้แก่ การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจยีน 16S rRNA , 16S-23S ITS และ 23S rRNA ของเชื้อในตาอ้อยที่จะนำมาเพาะเลี้ยงและจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับห้องปฏิบัติการ เทคนิค PCR ที่ใช้เป็นพื้นฐานทั่วไป จะใช้เวลาในการตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไป ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงเช่น เครื่อง PCR เครื่อง real time PCR ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้แล้วในการตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ ยังจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งคือ UV Transilluminator ทำให้ยังไม่สามารถนำไปใช้ได้การตรวจสอบในจุดที่ต้องการตรวจ (Point of care) ที่ยังขาดความพร้อมในอุปกรณ์เครื่องมือราคาแพง ข้อจำกัดดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคแลมป์ หรือ LAMP (Loop mediated DNA amplification) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Bst DNA polymerase ที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว 60 °C ถึง 65 °C และใช้ไพรเมอร์ ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อลำดับเบสที่ต้องการถึง 4 ตัว ซึ่งประกอบด้วย 6 ตำแหน่งของลำดับเบสที่ต้องการเพิ่มปริมาณนั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่จำเพาะอย่างยิ่ง (Notomi et al. 2000) โดยเทคนิคแลมป์ใช้เพียงตู้บ่มเชื้อ และสามารถตรวจผลได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ ขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก และให้ผลทดสอบภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยตรวจผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้จากตัวปฏิกิริยาเอง โดยดูจาก ความขุ่น (turbidity) ที่เกิดโดยปฏิกิริยาเคมีในขณะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ การจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate ขึ้น จึงสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า แทนการตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เทคนิคนี้จึงเหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วและสามารถทำงานได้ในห้องปฏิบัติการด้านพืชทั่วไปที่ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือราคาแพง

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคเซรัมวิทยา ซึ่งป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจโปรตีนของเชื้อโดยใช้แอนติบอดี โดยในระยะแรกการผลิตแอนติบอดีทั้งแบบโพลีโคลนอล และโมโนโคลนอล ที่ผลิตจากส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อที่สกัดจากพืชเป็นโรค ซึ่งมักพบปัญหาการปะปนของโปรตีนพืช เมื่อนำโปรตีนของเชื้อที่สกัดได้ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จะมี anti-plant antibodies ในแอนติซีรัมด้วยเสมอ ทำให้ปฏิกิริยาการตรวจเชื้อในพืชไม่ชัดเจน จึงมีการพัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อไฟโตพลาสมาในหลอดทดลองด้วยกระบวนการ protein expression ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อแก้ปัญหการปะปนของโปรตีนพืช จากข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิด ได้แก่ *Candidatus Phytoplasma asteris* 2 สายพันธุ์ (OY-M และ AY-WB) (Oshima et al., 2004) *Candidatus Phytoplasma australiense* (Tran-Nguyen et al., 2008) และ *Candidatus Phytoplasma mali* (Kube et al., 2008) พบว่าเชื้อไฟโต

พลาสมามีหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อทั้งในพืชอาศัยและแมลงพาหะ โปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์มีหลายชนิด เช่น Sec protein (SecA, SecE, SecY), Arginine transporter (ArtI) และ Immunodominant membrane proteins (Imps) โดยเฉพาะ Imps เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ และอยู่ด้านนอกเซลล์ไฟโตพลาสมา (Kakizawa *et al.*, 2006) และพบว่าแอนติบอดีต่อ Imps ของเชื้อหลายกลุ่มโดยเฉพาะในกลุ่ม aster yellows และ rice yellow dwarf มีศักยภาพในการใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีเพราะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในเชื้อไฟโตพลาสมา (Kakizawa *et al.*, 2009) แม้ว่าจะไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนถึงหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ แต่สันนิษฐานว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของเชื้อและแมลงพาหะในการถ่ายทอดโรคเพราะตรวจพบโปรตีนนี้ในแมลงพาหะด้วย (Suzuki *et al.*, 2006)

คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าการศึกษาค้นคว้า Imp genes ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ rice yellow dwarf การสังเคราะห์โปรตีน Imps โดยกระบวนการ protein expression และผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน Imps เพื่อใช้ตรวจเชื้อ จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพการตรวจเชื้อทั้งในอ้อยและแมลง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและการพัฒนาพันธุ์อ้อยต้านทานโรคในอนาคต และการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อนำมาใช้กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในระดับภูมิภาคเพื่อตรวจเชื้อในแปลงขยายพันธุ์ จะเป็นประโยชน์ในกระบวนการผลิตและรับรองพันธุ์อ้อยปลอดโรค

วัตถุประสงค์

1. พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
2. พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

การตรวจเอกสาร

เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กประมาณ 200-800 นาโนเมตร จีโนมมีขนาดเล็กตั้งแต่ 530-1350 กิโลเบส (Marcone *et al.*, 1999) จัดอยู่ใน class Mollicutes, order Acholeplasmatales, family Acholeplasmataceae, genus *Candidatus Phytoplasma* เซลล์มีองค์ประกอบของ G+C ของดีเอ็นเอต่ำคือ ประมาณ 23-29 mol% (Kollar and Seemüller, 1989) และยังพบว่าอาศัยอยู่เฉพาะในส่วน of sieve element ของเซลล์ท่ออาหารพืช และพบในกระเพาะอาหาร น้ำเลือด ต่อมน้ำลาย และส่วนอื่นๆ ที่ใช้ในการเจาะดูดของแมลงพาหะ และอาจเป็นสาเหตุให้แมลงตายก่อนระยะเต็มวัย ส่วนในพืช อาจก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่ซับซ้อนด้วยลักษณะอาการที่เฉพาะ เช่น ดอกเหี่ยว แตกกพุ่มฝอย ดอกเป็นหมัน การแตกพุ่มของยอด การยืดยาวของปล้องที่ผิดปกติ อาการเหลือง แคระแกร็น รวมทั้งพบอาการใบขาวในอ้อยและหญ้า (Lee *et al.*, 2000)

การตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา เดิมจะใช้สมบัติทางชีววิทยา เช่น การศึกษา ลักษณะอาการของโรคที่เกิดบนพืช แมลงพาหะ การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะเตตราไซคลินของพืชอาศัย เช่น ถ้าพบพืชที่สงสัยว่าถูกเชื้อโรคเข้าทำลายมีอาการดีขึ้นเมื่อให้เตตราไซคลินเชื้อโรคนั้นอาจเป็นไฟโตพลาสมาได้ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวให้ผลไม่แน่นอนและใช้เวลานานในการหาข้อสรุป ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อพืชและเนื้อเยื่อแมลงพาหะ และใช้วิธีตรวจการเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตของดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา เมื่อย้อมเนื้อเยื่อพืชด้วยสารเรืองแสงบางชนิด เช่น 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Seemüller, 1976) แต่ทั้ง

สองวิธีจะให้ผลชัดเจนเมื่อเนื้อเยื่อพืชมีเชื้อในปริมาณมาก จึงเป็นข้อจำกัดประการหนึ่งสำหรับเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในท่อน้ำอาหารของพืชเท่านั้น ส่งผลให้พบปริมาณของเชื้อได้น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ ที่สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วน และทั้งสองวิธีไม่เฉพาะเจาะจงไม่สามารถบอกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ เพราะเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเห็นเพียงรูปร่างภายนอก ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละชนิดที่เข้าทำลายพืชต่างชนิดกันเมื่อดูรูปร่างภายนอกจะพบว่าเหมือนกัน ส่วนการใช้วิธี DAPI จะพบเพียงว่าที่บริเวณท่อน้ำอาหารของพืชมีการเรืองแสงเนื่องจากมีดีเอ็นเอ ซึ่งน่าจะเป็นของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดใด ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคอณูชีววิทยาในการตรวจเชื้อ เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ และสามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็ว แม่นยำ เชื่อถือได้ โดยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ยีน 16S rRNA, 16S-23S ITS และ 23S rRNA เป็นยีนเป้าหมาย ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทุกชนิด (Lee *et al.*, 1993) และมีการนำผลิตภัณฑ์จาก PCR มาผลิต DNA probe เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคราขาวของอ้อย ด้วยเทคนิค Hybridization (Klinkong and Seemuller, 1993 ; Nakashima *et al.*, 1994) ในปี ค.ศ. 2000 Notomi และคณะ ได้พัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เทคนิคนี้ได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีนสามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส และในปี ค.ศ. 2010 ได้มีรายงานการนำเทคนิค LAMP มาใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrI (aster yellows group), 16SrXXII (Cape St Paul wilt group) โดยการขยายยีน 16-23S intergenic spacer region (Tomlinson *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนา real-time LAMP เพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrII (peanut witches' broom group) และ 16SrXII (stolbur group) โดยการขยายยีน 16SrRNA และ *secA* (Bekele *et al.*, 2011a) และ ต่อมาได้พัฒนาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในพืชตระกูลหญ้ารวมทั้งโรคราขาวในอ้อยได้สำเร็จด้วยการตรวจยีน *Sec A* (Bekele *et al.*, 2011b) นอกจากนี้ยังมีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาหลายชนิดด้วยเทคนิค LAMP โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณของยีน *groEL* และ 16S rDNA โดยพบว่าการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีกว่าเทคนิค PCR ถึง 10 เท่าจึงเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจเชื้อได้อย่างจำเพาะ รวดเร็วและตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยๆได้ (Sugawara *et al.* ,2012)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคเซรัมวิทยา เป็นอีกเทคนิคหนึ่ง que พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจโปรตีนของเชื้อโดยใช้แอนติบอดี โดยในระยะแรกการผลิตแอนติบอดีทั้งแบบโพลีโคลนอล และโมโนโคลนอล ที่ผลิตจากส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อที่สกัดจากพืชเป็นโรค (Sarindu and Clark, 1993) ซึ่งพบปัญหาการปะปนของโปรตีนพืช เมื่อนำโปรตีนของเชื้อที่สกัดได้ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จะมี anti-plant antibodies ในแอนติซีรัมด้วยเสมอ ทำให้ปฏิกิริยาการตรวจเชื้อในพืชไม่ชัดเจน จึงมีการพัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อไฟโตพลาสมาในหลอดทดลองด้วยกระบวนการ protein expression ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อแก้ปัญหการปะปนของโปรตีนพืช จากข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิด ได้แก่ *Candidatus Phytoplasma asteris* 2 สายพันธุ์ (OY-M และ AY-WB) (Oshima *et al.*, 2004) *Candidatus Phytoplasma australiense* (Tran-Nguyen *et al.*, 2008) และ *Candidatus Phytoplasma mali* (Kube *et al.*, 2008) พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อทั้งในพืชอาศัยและแมลงพาหะ โปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์มีหลายชนิด เช่น Sec protein (SecA, SecE, SecY), Arginine transporter (ArtI) และ Immunodominant membrane proteins

(Imps) (Kakizawa *et al*, 2006) การศึกษา Protein translocation gene ของ Onion yellow phytoplasma พบว่ายีน *secA* gene สามารถ Express protein ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งโปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจเชื้อ Onion yellow phytoplasma ในบริเวณเซลล์ที่อาหารของลำต้นเบญจมาศที่เป็นโรคได้ ด้วยวิธี Immunohistochemical analysis (Kakizawa *et al*, 2001)

Imps protein เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ และอยู่ด้านนอกเซลล์ไฟโตพลาสมา Imps protein จัดได้เป็น 3 ประเภท คือ Immunodominant membrane protein (Imp), Immunodominant membrane protein A (IdpA) และ antigenic membrane protein (Amp) และพบว่าแอนติบอดีต่อ Imps ของเชื้อหลายกลุ่มโดยเฉพาะในกลุ่ม 16SrI (aster yellows groups) และ 16SrXI (rice yellow dwarf group) มีศักยภาพในการใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีเพราะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในเชื้อไฟโตพลาสมา (Kakizawa *et al.*, 2009) และถึงแม้ว่ายังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนถึงหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ แต่สันนิษฐานว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของเชื้อและแมลงพาหะในการถ่ายทอดโรคเพราะตรวจพบโปรตีนนี้ในแมลงพาหะด้วย (Suzuki *et al*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

1.1 การสังเคราะห์ Imp gene

1.1.1 การสังเคราะห์ Imp gene จากอ้อยใบขาว

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยเป็นโรตใบขาวด้วยวิธี CTAB (Dellaporta *et al.*, 1983) บดใบอ้อยปริมาณ 0.3 กรัม ด้วยโกร่งและใส่ไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างใบอ้อยที่บดละเอียดแล้วใส่ลงใน extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 500 mM NaCl, 2% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ ผสมให้เข้ากันกับบัฟเฟอร์ด้วย vortex นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 20% SDS (sodium dodecyl sulfate) ปริมาตร 38.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 5M CH₃COOK (potassium acetate) ปริมาตร 186.2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติม isopropanol (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ 10 ครั้ง และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มไว้ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน ล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน (ล้างตะกอนอีกครั้ง) ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% agarose gel ใน 0.5X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene®) และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนต่อไป

เพิ่มปริมาณยีน *Imp* gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ Rnc-1/PssA-1 (Kakizawa *et al.*, 2009) นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

Rnc-1: 5'-GGCATTATGACTAAAAAAGAGCTCAAGC-3')

PssA-1: 5'-ATATCAGGCGTTTGTGATATGTTTGATGG-3')

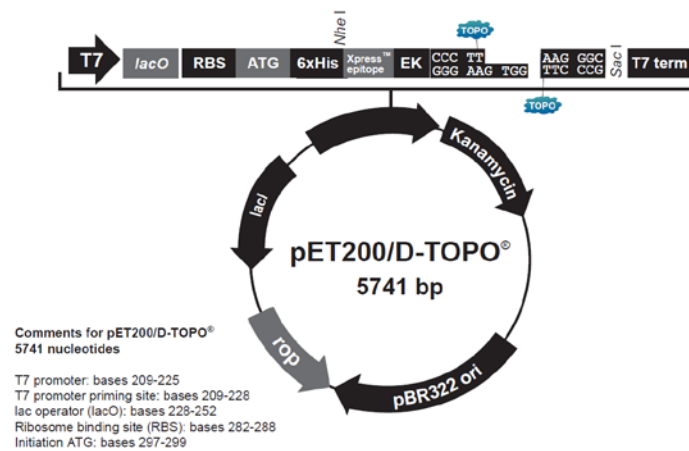
มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Dream Taq buffer 1.0 ไมโครลิตร (Fermentas, Ontario, Canada) 25 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 0.2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ reverse (10 pmol/μl) อย่างละ 0.2 ไมโครลิตร Dream Taq DNA polymerase (0.1 unit/μl) 0.2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 6.4 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/μl) 1 ไมโครลิตรโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (MJ Research-PT100) ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในรอบสุดท้ายเป็นเวลา 10 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis และนำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) โดยขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะมีขนาดประมาณ 500 bp

1.1.2 การสังเคราะห์ *Imp* gene จากข้อมูลยีนของเชื้อในกลุ่ม 16SrXI group ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับอ้อยใบขาว นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ Rice yellow dwarf ที่รายงานใน GenBank (gi|224613134:1179-1667 *Candidatus* Phytoplasma oryzae strain: RYD_489 bp) ส่งสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำโคลนที่สังเคราะห์ได้มา subcloning เข้า pJET vector โดยการใช้ restriction enzyme *NheI* และ *SacI* ทางด้าน 5' และ 3' transform เข้า *E. coli* BL21 (DE3) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำมาโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องมาโคลนเข้า expression plasmid vector pET200 โดยวิธีการดังนี้

- เตรียมชิ้นส่วน RYD-IMP gene และ expression plasmid vector pET200 (ภาพที่ 1) โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้ มาตัดชิ้นส่วน RYD-IMP gene ออกจากพลาสมิดพาหะ และตัด pET200 ด้วยวิธี Double digestion โดยใช้ restriction enzyme *NheI* และ *SacI* ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer *NheI* with BSA 2 ไมโครลิตร *Imp* gene หรือ expression plasmid vector pET200 7 ไมโครลิตร *NheI* หรือ *SacI* 10u/ul 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ไมโครลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการตัดของเอนไซม์

ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 % agarose gel จากนั้นทำชิ้นส่วน RYD-IMP gene และ pET200 ให้บริสุทธิ์ ด้วย QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามวิธีการของผู้ผลิต



ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดของ pET200 expression vector

- การเชื่อมต่อชิ้นส่วน RYD-IMP gene เข้ากับ expression plasmid vector pET200 โดยนำชิ้นส่วน expression plasmid vector pET200 ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme *Nhe* I และ *Sac* I มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย RYD-IMP gene (purified) 3 ไมโครลิตร 2X ligation buffer 10 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร expression plasmid vector pET200 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งขวด 5 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

- การโยกย้ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (transformation) โดยนำสารละลาย ligation เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook และ Russell, 2001) นำสารละลาย ligation มาผสมกับ (*E. coli*), CaCl₂ treated competent cell ผสมรวมกันทั้งหมด 6 μ l กับปริมาตรเซลล์ 50 μ l แช่น้ำแข็ง 30 นาที และทำการ transform โดยแช่น้ำที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 90 นาที และแช่น้ำแข็ง 3 นาที หลังจากนั้นเติม SOC medium 250 μ l และเขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง นำหลอดมาหมุนเหวี่ยงตะกอน เก็บตะกอนเซลล์ 12,000 rpm 1 นาที และเท SOC medium ออกให้เหลือ 50 μ l ผสมตะกอนเซลล์กับอาหารที่เหลือ และ spread บนอาหาร 2X-YT agar ที่เติม Kanamycin 50 mg/L บ่มอาหารแข็งที่ 37 °C ข้ามคืน (18-22 hr) และทำการคัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน RYD-IMP ด้วยเทคนิค PCR และยืนยันความถูกต้องโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

- นำโคลนที่ได้มาผลิต recombinant protein IMP ในขั้นตอนต่อไป

2. พัฒนารูปแบบการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

2.1 ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ทั้ง external primers, internal primers และ loop primers ตามวิธีของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V3 ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ไอโซเลท SCBR-ST (FM208259, 1247 bp) และ SCLP-HCh (FM208260, 1247 bp) จากจังหวัดบุรีรัมย์ และลำปาง ตามลำดับ

2.2 การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Thermocycler

2.2.1 การคัดเลือกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยเป็นโรตใบขาวเก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ด้วยวิธี CTAB (Dellaporta *et al.*, 1983) เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1.1 และตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอเบื้องต้นด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใน 1% อะกาโรสเจล ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30-40 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลาย ethidium bromine เป็นเวลา 15 นาที และแช่น้ำ 10 นาที แล้วนำเจลไปตรวจดูภายใต้แสง UV

ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อยเพื่อนำตัวอย่างมาใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับทดสอบการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค LAMP โดยการตรวจด้วยเทคนิค Directed PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 ตามวิธีของ Lee *et al.* (1993) และ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R16mF2/R16mR1 ในการทำปฏิกิริยารั้งที่ 1 และ R16F2/R16R2 ในการทำปฏิกิริยารั้งที่ 2 ตามวิธีของ Gundersen *et al.* (1996)

เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยาของ Directed-PCR ดังนี้ ปริมาตรรวมของแต่ละปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X DreamTaq Buffer, 2mM MgCl₂, 0.8mM dNTPs, 0.2uM forward primer, 0.2uM reverse primer, 1.25U DreamTaq DNA Polymerase (Thermo[®]) และสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2 (5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3') และ R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACA AACCCCG-3') และดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ และขั้นตอนที่ 5 Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยาของ Nested-PCR ดังนี้ ทำปฏิกิริยารั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์คู่แรกคือ R16mF2 (5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3') และ R16mR1 (5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3') ด้วยองค์ประกอบของแต่ละปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร 1X GoTaq Buffer, 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.2uM forward primer, 0.2uM reverse primer, 1.25U GoTaq DNA Polymerase (Promega[®]) และสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร และดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ และขั้นตอนที่ 5 Post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 1 มาเจือจางเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งที่อัตราส่วน 1:40 V/V จากนั้นเตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ดังนี้ ปริมาตรรวมของแต่ละปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X DreamTaq Buffer, 2mM MgCl₂, 0.8mM dNTPs, 0.2uM forward primer, 0.2uM reverse primer, 1.25U DreamTaq DNA Polymerase (Thermo®) และดีเอ็นเอต้นแบบ (ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 1) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2 และ R16R2 และดำเนินปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Thermocycler

หมายเลข	ตัวอย่าง	รายละเอียดของตัวอย่าง	หมายเหตุ
H1	อ้อยปกติ	อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	(doae#4-no.70=611-2)
H2	อ้อยปกติ	อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	(doae#4-no.88=859-3)
1	SCWL-KB_1-1/1	ส่วนยอด-อาการใบขาว	กอที่ 1 ต้นที่ 1
2	SCWL-KB_1-1/2	ใบแก่-อาการปกติ	
3	SCWL-KB_1-1/3	หน่อใหม่-อาการใบขาว	
4	SCWL-KB_2-1/1	ส่วนยอด-อาการใบขาว	กอที่ 2 ต้นที่ 1
5	SCWL-KB_2-1/2	ใบแก่-อาการปกติ	
6	SCWL-KB_2-1/3	ตาข้าง-อาการปกติ	
7	SCWL-KB_3-1/1	ส่วนยอด-อาการใบขาว	กอที่ 3 ต้นที่ 1
8	SCWL-KB_3-1/2	ใบแก่-อาการปกติ	
9	SCWL-KB_3-1/3	ตาข้าง-อาการปกติ	
10	SCWL-KB_4-1/1	ส่วนยอด-อาการใบขาว	กอที่ 4 ต้นที่ 1
11	SCWL-KB_4-1/2	ใบแก่-อาการปกติ	
12	SCWL-KB_4-1/3	หน่อใหม่-อาการใบขาว	

2.2.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

- ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จำนวน 2 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 คือไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST)

ชุดที่ 2 คือไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh)

- เตรียมสารสำหรับปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของสารสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP

Reagents	[stock for use]	Volume (μl) /reaction
1. dH ₂ O	-	9.1
2. 10X Thermo polymerase buffer	10X	2.5
3. FIP primer	50μM	3.2
4. BIP primer	50μM	3.2
5. F3 primer	50μM	0.2
6. B3 primer	50μM	0.2
7. MgSO ₄	1M	0.1
8. dNTPs	35mM	1.0
9. Betaine	10M	2.5
10. <i>Bst</i> DNA polymerase	8U/μl	1.0
11. DNA template	-	2.0
Total volume		25 μl

- เตรียม reaction mix สำหรับทุกตัวอย่างของแต่ละชุดไพรเมอร์ จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่างแล้วจึงเติม DNA template และนำไปใส่เครื่องพีซีอาร์โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Step 1: อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Step 2: อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

- ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40-60 นาที แสงสารละลาย ethidium bromide 15 นาทีและแช่น้ำ 20 นาที จากนั้นตรวจดูภายใต้แสง UV

- ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP ด้วยสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) โดยการเติมสารเรืองแสงลงไปในผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค LAMP ในอัตราส่วนของสารเรืองแสงต่อสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เท่ากับ 1:25 (V/V)

2.3 การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler

2.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

เก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบขาวจากจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 2 กอ และเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของอ้อยแต่ละกอ ดังนี้

1. ใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาว จำนวน 3 ใบ
2. ใบอ้อยที่ไม่แสดงอาการ จำนวน 3 ใบ
3. หน่ออ้อยที่แสดงอาการใบขาว จำนวน 3 หน่อ

ซึ่งตัวอย่างย่อยของแต่ละกองจะประกอบด้วยตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างหมายเลข 1-13 คือตัวอย่างย่อยกองที่ 1 และตัวอย่างหมายเลข 14-26 คือตัวอย่างย่อยกองที่ 2 ดังแสดงรายละเอียดของตัวอย่างในตารางที่ 3

สกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างย่อยเพื่อนำตัวอย่างมาใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับทดสอบการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค LAMP โดยการตรวจด้วยเทคนิค Directed PCR และ Nested PCR ตามวิธีทดลองในข้อ 2.2.1

2.3.2 ดำเนินการทดสอบเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermocycler กับ Heat box โดยการทำให้ปฏิกิริยา LAMP ด้วยชุดไพรเมอร์ สภาวะของปฏิกิริยา และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.2.2

ไพรเมอร์ ชุดที่ 1 R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST)

ไพรเมอร์ชุดที่ 2 R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh)

ชุดทดสอบที่ A คือ การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermalcycler โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่หลอดของปฏิกิริยาลงในเครื่องและทำปฏิกิริยาตามโปรแกรมที่ตั้งไว้

ชุดทดสอบที่ B คือ การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลาจึงปรับอุณหภูมิให้เปลี่ยนเป็น 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของแลมป์ (LAMP product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมรวมกับ 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใน 2% อะกาโรสเจล ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายเอทธิเดียม 15 นาทีและแช่น้ำ 10 นาที แล้วจึงตรวจดูภายใต้แสง UV และตรวจสอบด้วยการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) โดยการเติมสารเรืองแสง (ที่มีความเข้มข้น 1:10 เจือจางด้วยน้ำ) ลงไปในผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตรในสารละลายผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอปริมาตร 20-25 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3 รายละเอียดของตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler

หมายเลข	กอที่	รายละเอียดตัวอย่าง
N1	-	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
N2	-	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเมล็ด
1	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ
2	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ
3	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ
4	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2
5	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3
6	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ
7	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ
8	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ
9	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2
10	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3
11	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-1
12	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-2
13	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-3
14	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ
15	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ
16	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ
17	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2
18	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3
19	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ
20	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ
21	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ
22	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2
23	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3
24	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-1
25	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-2
26	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-3

2.4 ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน *secA*

2.4.1 เพิ่มปริมาณยีน *secA* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP

เพิ่มปริมาณยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากอ้อยใบขาวไอโซเลทกาญจนบุรี และเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ UnisecAF/UnisecAR ซึ่งออกแบบจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสาเหตุโรค Palm lethal yellowing ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ให้ดีเอ็นเอเป้าหมายประมาณ 1,240 bp นำมาโคลน และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

UnisecAF : 5' ATG AAA ACA GGA GAA GGA AAA ACT TTA ACT TC 3'

UnisecAR : 5' TGT ACC TAA AAC AGC TAA TCC TCCTAA TTC 3'

2.4.2 นำข้อมูลยีน *secA* ที่สังเคราะห์ได้มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ทั้ง external primers, internal primers และ loop primers ตามวิธีของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V3

3. การถ่ายทอดเทคโนโลยีนวัตกรรมการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

3.1 นำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเรื่อง “การใช้เทคนิค Nested PCR และ LAMP ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย” ภายใต้โครงการ “การฝึกอบรมการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดปี 2558” จัดโดยกลุ่มส่งเสริมพันธุ์พืชปลอดภัย กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร เมื่อวันที่ 20-22 พฤษภาคม 2558 ณ จังหวัดอุดรธานี

3.2 นำเสนอเผยแพร่งานวิจัยทั้งภาคบรรยายและโปสเตอร์เรื่อง “นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย” ในการประชุมและพัฒนาเครือข่ายงานวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาลเรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน” จัดโดยโครงการ การติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาล และสำนักประสานงานชุดโครงการด้านอ้อยและน้ำตาล สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์เซ็นทรัลพลาชาลาดพร้าว กรุงเทพฯ

3.3 จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP” เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพันธุ์อ้อย เมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2558 ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

1.1 การสังเคราะห์ Imp gene

1.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *Imp* gene จากตัวอย่างอ้อยใบขาวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Rnc-1/PssA-1 พบว่ายังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากอ้อยใบขาว และได้ดำเนินการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณยีน *Imp* จากตัวอย่างอ้อยใบขาวเพิ่มเติม

1.1.2 การสังเคราะห์ *Imp* gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus Phytoplasma oryzae* strain: RYD ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 489 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอะมิโนได้ 162 aa ดังนี้

```
ATGCAAAATGAAAATTTTTGTACACAAAAAAGGTAAGATGATTATTGTTGGATCTTCGATCGCAGCAG
CATTAAATATTGTTAGGAATATTAGCTTATTTTTTAAATGGTGGCCTTTTAAATCAAATTGTTTTTGATAA
AGAATCTATAAATAAATATGCAGAAGATTTAAATTTGTAGCTGCTGATGCAACAAACGCAGCTGATAGT
AATAAAGCTAAAAAATGCGTGATGATACTGTTAAAAAATAGATGATTTTGTAAAAATATTGAAAAAT
TTAATGATAAACTAAAGACGATTCAAAAAATAAAGCAGAAACAATAAAAAATTTAGTGATTTAAGTGG
TAAAATCAAAAATGTTGAAGTTAAAGAAGGATCATCATATGCAGCAAGTGACTTTGTAACAAGTTTCAAT
GACGCTGCAAAACAAAACGATTTAGACTCGGCTTTTACTGCATTAAGCAGATCGTAAAATTGCTTAA
```

Imp protein 162 aa

```
MQNENFLYTKKGKMIIVGSSIAAALILLGILAYFFKWWPFNQIVFDKESINKYAEDLKFVAADATNAADS
NKAKKMRDDTVKKIDDFVKNIEKFNDKTKDDSKIKAETIKKFSDLGKIKNVEVKEGSSYAASDFVTSFN
DAAKQNDLDSAFTALKADRKIA
```

ยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูกโคลนเข้า pJET vector และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ RYD-Nhe-F และ RYD-Sac-R ผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น chromatogram (.abi) (ภาคผนวกที่ 1) จากทั้งสองไพรเมอร์ได้นำมา assembly (หาจุดซ้อนทับ) และตัด vector sequence ออกไป (ภาพที่ 2) แสดงผลที่ได้จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายมา assembly แล้ว ตัวอักษร lower case เป็นส่วนของ vector ส่วนอักษรตัว upper case เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RYD-IMP ลำดับเบสที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมคือ ไพรเมอร์ที่ใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งได้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ในส่วนของยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ขนาด 501 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 164 หน่วย จะมีกรดอะมิโน alanine และ serine เพิ่มขึ้นจากจุดตัดจำของ restriction enzyme NheI จุดตัดจำของ SacI นั้นอยู่ในตำแหน่งหลังจาก stop codon (TAA) ได้ขนาดดีเอ็นเอของยีน RYD-IMP เท่ากับ 501 คู่เบส


```

1  catatccatccggcgtaatacgaactcactatagggagagcggccaccagatcttccggatg
62  gctcgaagtttttcagcaagatGCTAGCATGCAGAACGAAACTTTCTGTATACCAAAAAA
A S M Q N E N F L Y T K K
123 GGCAAAATGATTATTGTGGGCAGCAGCATTGCGGCGGCGCTGATTCTGCTGGGCATTCTG
G K M I I V G S S I A A A L I L L G I L
184 GCGTATTTTTTTTAAATGGTGGCCGTTTAACCAGATTGTGTTTGATAAAGAAAGCATTAAAC
A Y F F K W W P F N Q I V F D K E S I N
245 AAATATGCGGAAGATCTGAAATTTGTGGCGGCGGATGCGACCAACGCGGCGGATAGCAAC
K Y A E D L K F V A A D A T N A A D S N
306 AAAGCGAAAAAATGCGCGATGATACCGTGAAAAAATTGATGATTTTGTGAAAAACATT
K A K K M R D D T V K K I D D F V K N I
367 GAAAAATTTAACGATAAAACCAAGATGATAGCAAAATTAAGCGGAAACCATTAAAAAA
E K F N D K T K D D S K I K A E T I K K
428 TTTAGCGATCTGAGCGGCAAAATTAACCAAGTGGAAGTGAAGAAGGCAGCAGCTATGCG
F S D L S G K I K N V E V K E G S S Y A
489 GCGAGCGATTTTGTGACCAGCTTTAACGATGCGGCGAAACAGAACGATCTGGATAGCGCG
A S D F V T S F N D A A K Q N D L D S A
550 TTTACGCGCTGAAAGCGGATCGCAAAATTGCGTAAGAGCTCcatctttctagaagatctc
F T A L K A D R K I A -
ctacaatatctcagctgccatggaaaatcgatgttcttcttttattctctcaagatttt
caggctgtatatataaaacttatattaagaactatgctaaccacctcatcaggaaccgttg
taggtggcgtg

```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RYD-IMP ใน pJET vector จากการใช้ไพรเมอร์ RYD-Nhe-F และ RYD-Sac-R ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมา assembly ให้หาจุดเชื่อมต่อซ้อน อักษรตัวเขียนเล็ก (lower case) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pJET vector และอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ (upper case) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RYD-IMP และแปลรหัสได้ต่อเนื่องจากจุดจดจำของ NheI จนถึง SacI ตัวอักษรในกรอบสี่เหลี่ยมคือ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

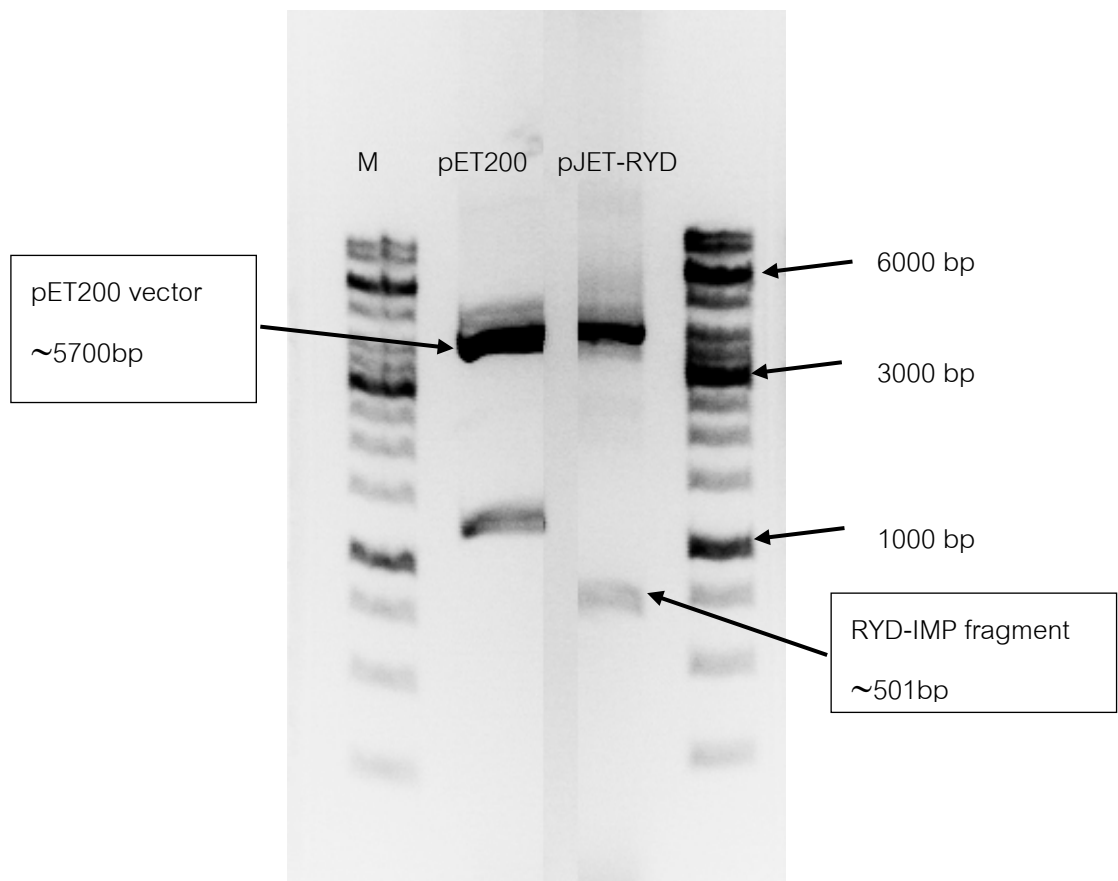
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่สังเคราะห์เหมือนกัน 100% (ภาพที่ 3) เช่นเดียวกับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 100% ในส่วนของ RYD-IMP ไม่รวมส่วนที่เป็น NheI และ SacI ที่ใช้เป็น linker ในการทำ directional cloning (ภาพที่ 4) สำหรับในภาพที่ 5 เป็นการเตรียมตัดพลาสมิด pET200 ที่เป็น expression vector และตัด pJET-RYD-IMP ที่มีชั้นยีน RYD-IMP อยู่ด้วย โดยใช้เอนไซม์ NheI และ SacI เพื่อแยกเอา pET200 Vector (lane 1 แถบบน) และ RYD-IMP (lane 2 แถบล่าง) เพื่อนำมา Ligate ต่อไป

		1	50
Ryd-syn	(1)	-----ATGCAGAACGAAAACTTTCTGTATACCAAAAAAGGCAAAATGAT	
Ryd-syn-pJETseq	(1)	GCTAGCATGCAGAACGAAAACTTTCTGTATACCAAAAAAGGCAAAATGAT	
Consensus	(1)	ATGCAGAACGAAAACTTTCTGTATACCAAAAAAGGCAAAATGAT	
		51	100
Ryd-syn	(45)	TATTGTGGGCAGCAGCATTGCGGCGGCGCTGATTCTGCTGGGCATTCTGG	
Ryd-syn-pJETseq	(51)	TATTGTGGGCAGCAGCATTGCGGCGGCGCTGATTCTGCTGGGCATTCTGG	
Consensus	(51)	TATTGTGGGCAGCAGCATTGCGGCGGCGCTGATTCTGCTGGGCATTCTGG	
		101	150
Ryd-syn	(95)	CGTATTTTTTTTAAATGGTGGCCGTTTAACCAGATTGTGTTTGATAAAGAA	
Ryd-syn-pJETseq	(101)	CGTATTTTTTTTAAATGGTGGCCGTTTAACCAGATTGTGTTTGATAAAGAA	
Consensus	(101)	CGTATTTTTTTTAAATGGTGGCCGTTTAACCAGATTGTGTTTGATAAAGAA	
		151	200
Ryd-syn	(145)	AGCATTAACAAATATGCGGAAGATCTGAAATTTGTGGCGGCGGATGCGAC	
Ryd-syn-pJETseq	(151)	AGCATTAACAAATATGCGGAAGATCTGAAATTTGTGGCGGCGGATGCGAC	
Consensus	(151)	AGCATTAACAAATATGCGGAAGATCTGAAATTTGTGGCGGCGGATGCGAC	
		201	250
Ryd-syn	(195)	CAACGCGGCGGATAGCAACAAAGCGAAAAAAATGCGCGATGATACCGTGA	
Ryd-syn-pJETseq	(201)	CAACGCGGCGGATAGCAACAAAGCGAAAAAAATGCGCGATGATACCGTGA	
Consensus	(201)	CAACGCGGCGGATAGCAACAAAGCGAAAAAAATGCGCGATGATACCGTGA	
		251	300
Ryd-syn	(245)	AAAAAATTGATGATTTTGTGAAAAACATTGAAAAATTTAACGATAAAACC	
Ryd-syn-pJETseq	(251)	AAAAAATTGATGATTTTGTGAAAAACATTGAAAAATTTAACGATAAAACC	
Consensus	(251)	AAAAAATTGATGATTTTGTGAAAAACATTGAAAAATTTAACGATAAAACC	
		301	350
Ryd-syn	(295)	AAAGATGATAGCAAAATTTAAAGCGGAAACCATTAAAAAATTTAGCGATCT	
Ryd-syn-pJETseq	(301)	AAAGATGATAGCAAAATTTAAAGCGGAAACCATTAAAAAATTTAGCGATCT	
Consensus	(301)	AAAGATGATAGCAAAATTTAAAGCGGAAACCATTAAAAAATTTAGCGATCT	
		351	400
Ryd-syn	(345)	GAGCGGCAAAATTTAAAAACGTGGAAGTGAAAGAAGGCAGCAGCTATGCGG	
Ryd-syn-pJETseq	(351)	GAGCGGCAAAATTTAAAAACGTGGAAGTGAAAGAAGGCAGCAGCTATGCGG	
Consensus	(351)	GAGCGGCAAAATTTAAAAACGTGGAAGTGAAAGAAGGCAGCAGCTATGCGG	
		401	450
Ryd-syn	(395)	CGAGCGATTTTGTGACCAGCTTTAACGATGCGGCGAAACAGAACGATCTG	
Ryd-syn-pJETseq	(401)	CGAGCGATTTTGTGACCAGCTTTAACGATGCGGCGAAACAGAACGATCTG	
Consensus	(401)	CGAGCGATTTTGTGACCAGCTTTAACGATGCGGCGAAACAGAACGATCTG	
		451	500
Ryd-syn	(445)	GATAGCGCGTTTACCGCGCTGAAAGCGGATCGCAAAATTGCGTAA-----	
Ryd-syn-pJETseq	(451)	GATAGCGCGTTTACCGCGCTGAAAGCGGATCGCAAAATTGCGTAAAGAGCT	
Consensus	(451)	GATAGCGCGTTTACCGCGCTGAAAGCGGATCGCAAAATTGCGTAA	
		501	
Ryd-syn	(490)	-	
Ryd-syn-pJETseq	(501)	C	
Consensus	(501)		

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการ subclone เข้า pJET vector เพื่อเปรียบเทียบกับที่
สังเคราะห์ RYD-IMP

		1	50
Ryd-JETSeq	(1)	ASMQNENFLYTKKGKMIIVGSSIAAALILLGILAYFFKWPFNQIVFDKE	
Ryd-synthetic	(1)	--MQNENFLYTKKGKMIIVGSSIAAALILLGILAYFFKWPFNQIVFDKE	
Consensus	(1)	MQNENFLYTKKGKMIIVGSSIAAALILLGILAYFFKWPFNQIVFDKE	
		51	100
Ryd-JETSeq	(51)	SINKYAEDLKFVAADATNAADSNKAKKMRDDTVKKIDDFVKNIEKFNDKT	
Ryd-synthetic	(49)	SINKYAEDLKFVAADATNAADSNKAKKMRDDTVKKIDDFVKNIEKFNDKT	
Consensus	(51)	SINKYAEDLKFVAADATNAADSNKAKKMRDDTVKKIDDFVKNIEKFNDKT	
		101	150
Ryd-JETSeq	(101)	KDDSKIKAETIKKFSDSLGGIKNVEVKEGSSYAASDFVTSFNDAAKQNDL	
Ryd-synthetic	(99)	KDDSKIKAETIKKFSDSLGGIKNVEVKEGSSYAASDFVTSFNDAAKQNDL	
Consensus	(101)	KDDSKIKAETIKKFSDSLGGIKNVEVKEGSSYAASDFVTSFNDAAKQNDL	
		151	164
Ryd-JETSeq	(151)	DSAFTALKADRKIA	
Ryd-synthetic	(149)	DSAFTALKADRKIA	
Consensus	(151)	DSAFTALKADRKIA	

ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากจีนยีนสังเคราะห์ RYD-IMP กับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากภาพที่ 3



ภาพที่ 5 การตัดชิ้น Vector PET200 และ pJET-RYD-IMP ด้วย enzyme *NheI* และ *SacI* เพื่อเตรียม Vector pET200 (lane1 แถบบน) ขนาด ~5700 bp และชิ้น RYD-IMP (lane 2 แถบล่าง) ขนาด ~501bp; M, 1 kb DNA standard marker

2. พัฒนารูปแบบการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

2.1 ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA

จากการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA สำหรับเทคนิค LAMP โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V3 ได้ชุดไพรเมอร์ ดังนี้

ชุดที่ 1 คือไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST)

ชื่อไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ (5'-->3')
BIP-16S rDNA-SCBR-ST	AGC AAT ATA GTG GAG GTT ATC AGG GAA CAT CTC ACG ACA CGA G
FIP-16S rDNA-SCBR-ST	GCA GAG TAT GTC AAG ACC TGG TAA GGT GGA TCA TGT TGT TTA ATT CG
B3-16S rDNA-SCBR-ST	TAA TGA CAA GGG TTG CGC
F3-16S rDNA-SCBR-ST	AGG AAT TGA CGG GAC TCC

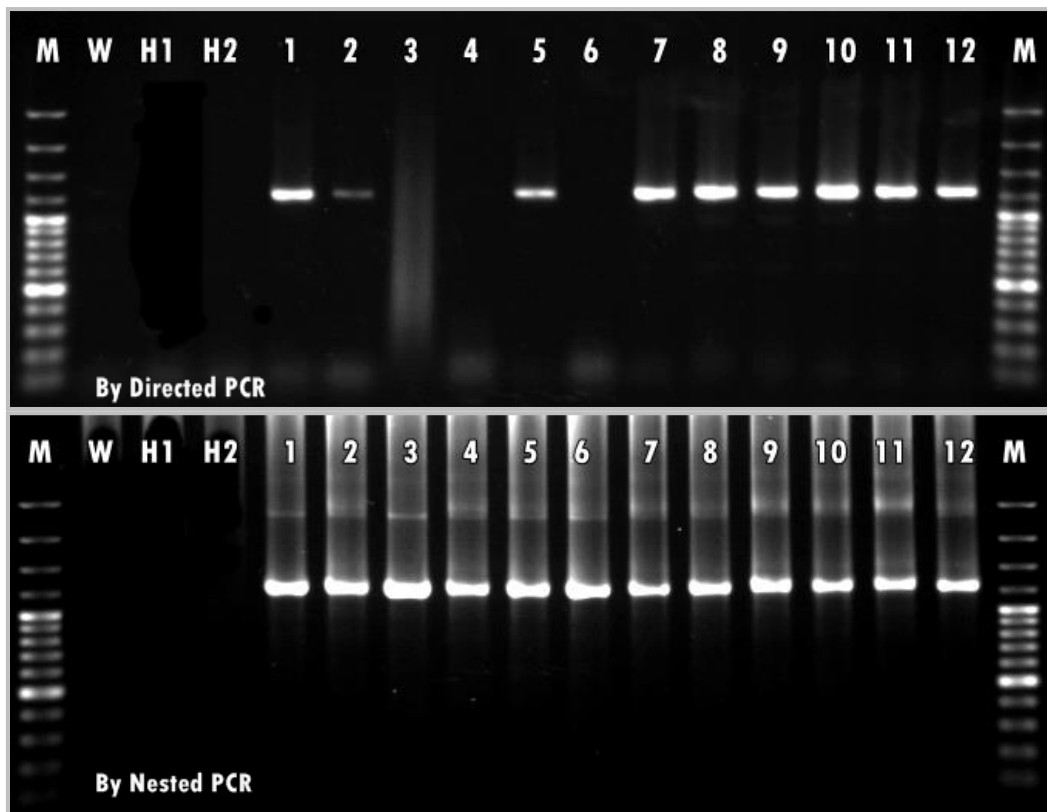
ชุดที่ 2 คือไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh)

ชื่อไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ (5'-->3')
BIP-16S rDNA-SCLP-HCh	AGC AAT ATA GTG GAG GTT ATC AGG GTA ACA TCT CAC GAC ACG AG
FIP-16S rDNA-SCLP-HCh	GCA GAG TAT GTC AAG ACC TGG TAA GGC GGT GGA TCA TGT TGT T
B3-16S rDNA-SCLP-HCh	TAA TGA CAA GGG TTG CGC
F3-16S rDNA-SCLP-HCh	AGG AAT TGA CGG GAC TCC

2.2 การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Thermocycler

2.2.1 การคัดเลือกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในจังหวัดกาญจนบุรีพบว่าเทคนิค Directed PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคได้จำนวน 9 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค Nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ R16mF2/R16mR1 ในการทำปฏิกิริยารั้งที่ 1 และใช้คู่ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 ในการทำปฏิกิริยารั้งที่ 2 สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคได้จำนวน 12 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6) นำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อจากตัวอย่างที่ได้จากอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ H1 และ H2 ด้วยเทคนิคนี้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค LAMP



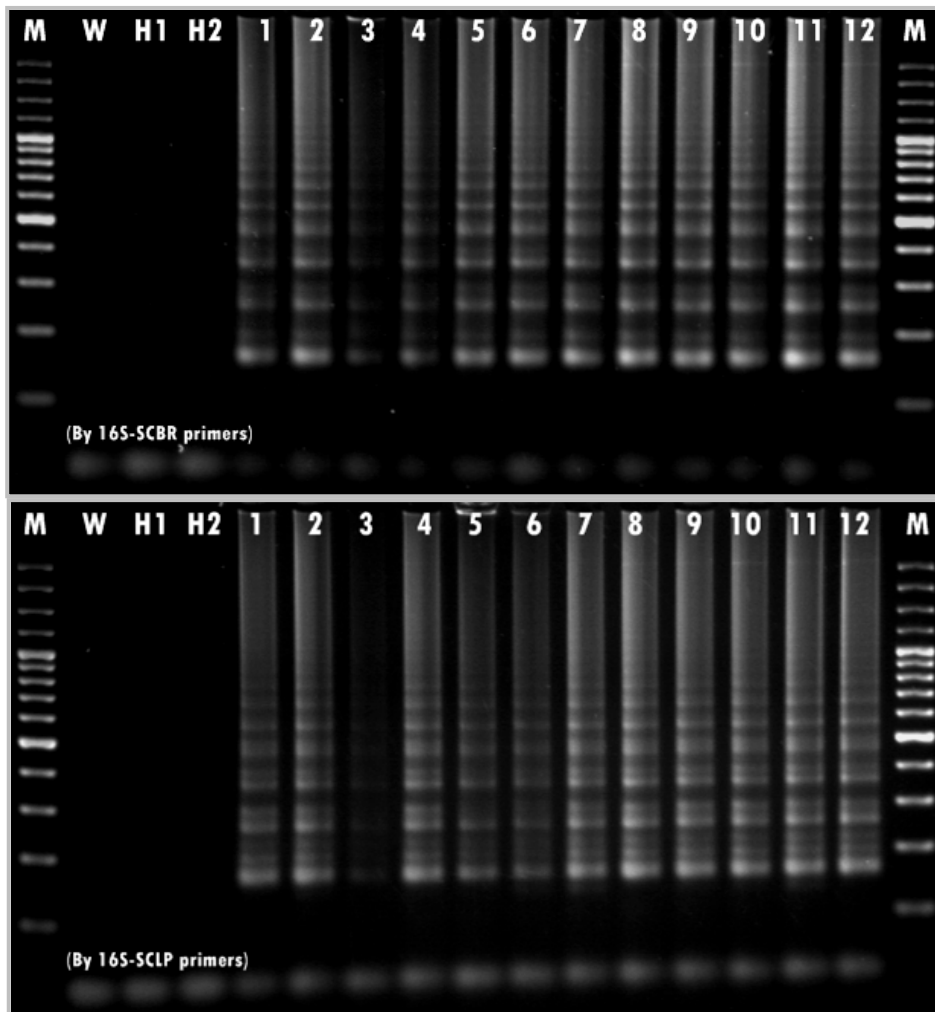
ภาพที่ 6 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Directed PCR และ Nested PCR

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ W	น้ำกลั่นหนึ่งขวด
แถบ H1,H2	อ้อยปกติจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
แถบ 1-12	ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดกาญจนบุรี

2.2.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา

จากการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยออกแบบไพรเมอร์ส่วนของชุดที่ 1 คือ ไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16s rDNA-SCBR-ST, FIP-16s rDNA-SCBR-ST, B3-16s rDNA-SCBR-ST และ F3-16s rDNA-SCBR-ST) และ ชุดที่ 2 คือไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16s rDNA-SCLP-HCh, FIP-16s rDNA-SCLP-HCh, B3-16s rDNA-SCLP-HCh และ F3-16s rDNA-SCLP-HCh) ทดสอบการปรับความเข้มข้นขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา และปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้เหมาะสม (ตารางที่ 3) ทำปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง Thermal cycler

- การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองชุดและองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยานี้มีความเหมาะสมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย โดยตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคแลมป์ให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลายขนาด มีลักษณะคล้ายขั้นบันได (ภาพที่ 7) โดยให้ผลการตรวจสอบคล้อยกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR (ภาพที่ 6) ซึ่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป และในขั้นตอนต่อไปจะทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยใช้เครื่อง water bath ที่ตั้งอุณหภูมิคงที่ ที่ 65 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 7 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ออกแบบจากยีน 16S rRNA ไอโซเลทบูรีรัมย์ (16S-SCBR primers) และไอโซเลทลำปาง (16S- SCLP primers)

แถบ M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

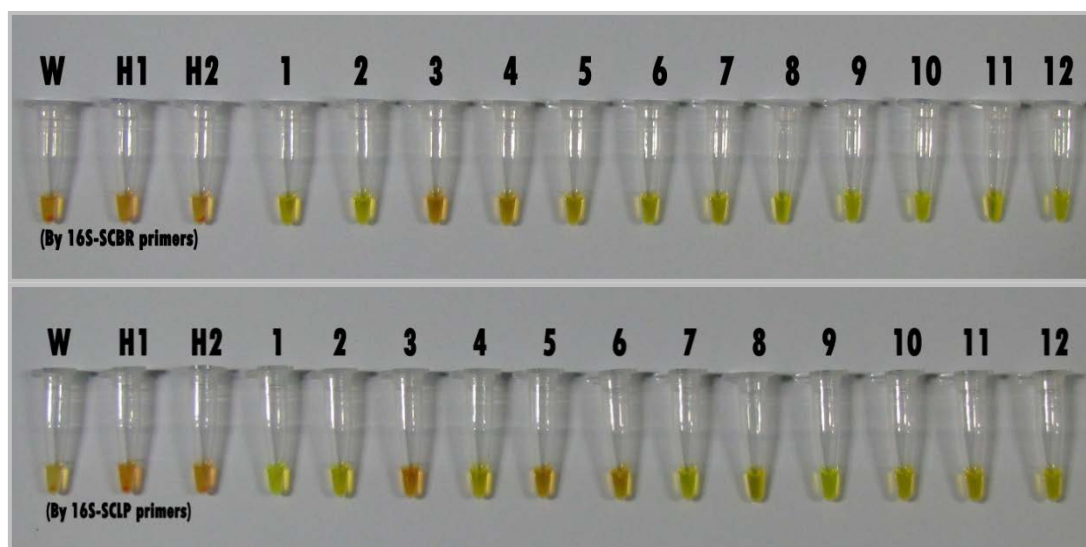
แถบ W น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

แถบ H1,H2 อ้อยปกติจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แถบ 1-12 ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดกาญจนบุรี

- การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค LAMP ด้วยสารเรืองแสง

จากการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาข้างต้นด้วยเทคนิคแลมป์ต้องอาศัยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการทำปฏิกิริยาลิ้นสุด ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจสอบและต้องใช้เวลาในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอีกประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งนับว่าไม่มีความแตกต่างจากเทคนิค PCR แต่เทคนิค LAMP นั้นมีข้อได้เปรียบนอกเหนือจากความไว ความจำเพาะ และความรวดเร็วกว่าเทคนิค PCR ปกติแล้วนั้น เราสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเกตความขุ่น (turbidity) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลาย ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR โดยผลความขุ่นที่ปรากฏนั้นสามารถแปลผลได้โดยตรงจากหลอดทดลอง ซึ่งความขุ่นที่เกิดขึ้นเป็นตัวชี้วัดให้เห็นว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบผลความขุ่นกับหลอดทดลองควบคุมลบ (non-DNA template) แต่อย่างไรก็ตามการสังเกตความขุ่นด้วยตาเปล่ามักเกิดความลำเอียงในการรายงานผล จึงจำเป็นต้องอาศัยสารเคมีอื่นช่วยให้การแสดงผลชัดเจนยิ่งขึ้นโดยการเติมสารเรืองแสง SYBR Green I 1:25 ภายหลังปฏิกิริยา LAMP เสร็จสิ้น การตรวจสอบการเรืองแสงของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในหลอดปฏิกิริยา LAMP ที่เพิ่มได้ของไพรเมอร์ทั้งสองชุดพบว่าให้ผลตรวจที่ไม่สอดคล้องกันในตัวอย่างที่ 4 ,5 และ 6 และไม่สอดคล้องกับผลตรวจผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและผลตรวจด้วยเทคนิค nested PCR ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่มากพอจะทำให้เกิดการเรืองแสงด้วยสาร SYBR Green สังเกตได้จากภาพที่ 7 จากตัวอย่างที่ 3 ที่พบดีเอ็นเอน้อยกว่าตัวอย่างอื่นๆทั้งสองไพรเมอร์ เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจการเรืองแสงจึงให้ผลลบคือไม่พบการเรืองแสง ขั้นตอนการแก้ไขต่อไปคือด้วยการเติม SYBR Green เพิ่มขึ้นหรือทดสอบสารเรืองแสงชนิดอื่นๆ ต่อไป (ภาพที่ 8 และตารางที่ 4)



ภาพที่ 8 ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค LAMP โดยการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ 25 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาของไอโซเลทบริสุทธิ์ (16S-SCBR primers) และไอโซเลทลำปาง (16S-SCLP primers)

ตารางที่ 4 เปรียบผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP โดยวิธีเจลอิลีกโตรโฟรีซิส และโดยการเติมสารเรืองแสง

หมายเลข	ชุดไพรเมอร์ R16-SCBR		ชุดไพรเมอร์ R16SCLP	
	วิธีเจลอิลีกโตรโฟรีซิส	การเติมสารเรืองแสง	วิธีเจลอิลีกโตรโฟรีซิส	การเติมสารเรืองแสง
W	-	-	-	-
H1	-	-	-	-
H2	-	-	-	-
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	-	+	-
4	+	-	+	+
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+

2.3 การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler

ตัวอย่างอ้อยที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมีจำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ของอ้อย แต่ละกอ จำนวน 2 กอ กอละ 13 ตัวอย่าง และตัวอย่างของอ้อยที่ไม่เป็นโรค (negative control) จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอ (total DNA) มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค เจลอิลีกโตรโฟรีซิส พบว่า ทุกตัวอย่างมีดีเอ็นเอที่ได้จากการดำเนินการสกัดในครั้งนี้ (ภาพที่ 9) และเมื่อนำไปตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Directed-PCR และ Nested-PCR ก็พบว่า ตัวอย่างอ้อยที่ไม่เป็นโรค (N1 และ N2) ไม่ปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอเป้าหมาย ในขณะที่ทั้ง 26 ตัวอย่างที่เป็นส่วนต่าง ๆ ของอ้อยกอที่แสดงอาการใบขาว (หมายเลข 1-26) ปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ขนาด ~1,250 bp เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus Ladder DNA marker, Fermentus®) (ตารางที่ 6, ภาพที่ 10 และ 11)

การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคแลมป์ เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค เจลอิลีกโตรโฟรีซิส พบว่าในตัวอย่างของอ้อยที่ไม่เป็นโรค (N1 และ N2) ไม่ปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอใด ๆ ในขณะที่ตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของอ้อยกอที่แสดงอาการใบขาว (หมายเลข 1-26) ปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอหลาย ๆ ขนาดในลักษณะของคั้นบันได (Ladder) ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 7, ภาพที่ 12, 13, 14 และ 15) และจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยการเติมสารเรืองแสง SYBR Green I 1:25 พบว่า

หลังการเติมสารเรืองแสงตัวอย่างของอ้อยที่ไม่เป็นโรค (N1 และ N2) จะเกิดเป็นสารละลายที่มีสีส้ม ซึ่งเป็นสีเดิมของสารเรืองแสงที่ใช้ ส่วนตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของอ้อยกอที่แสดงอาการใบขาว (หมายเลข 1-26) จะเกิดเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง (เปลี่ยนจากสีส้มที่เป็นสีเดิมของตัวสารเรืองแสง กลายเป็นสีเหลือง) ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 8,ภาพที่ 12, 13, 14 และ 15)

ตารางที่ 5 รายละเอียดของตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง Dry bath incubator (Heat box) เปรียบเทียบกับเครื่อง Thermocycler

หมายเลข	กอที่	รายละเอียดตัวอย่าง
N1	-	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
N2	-	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเมล็ด
1	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ
2	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ
3	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ
4	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2
5	1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3
6	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ
7	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ
8	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ
9	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2
10	1	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3
11	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-1
12	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-2
13	1	หน่อที่แสดงอาการขาว-3
14	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ
15	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ
16	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ
17	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2
18	2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3
19	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ
20	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ
21	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ
22	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2
23	2	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3
24	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-1
25	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-2
26	2	หน่อที่แสดงอาการขาว-3

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Directed-PCR และ Nested-PCR

หมายเลข	ตัวอย่าง	เทคนิคการตรวจสอบ	
		Directed PCR	Nested PCR
N	น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	-	-
N1	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	-	-
N2	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเมล็ด	-	-
1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	+	+
2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	+	+
3	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	+	+
4	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	+	+
5	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	+	+
6	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	+	+
7	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	+	+
8	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	+	+
9	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	+	+
10	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	+	+
11	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	+	+
12	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	+	+
13	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	+	+
14	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	+	+
15	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	+	+
16	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	+	+
17	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	+	+
18	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	+	+
19	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	+	+
20	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	+	+
21	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	+	+
22	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	+	+
23	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	+	+
24	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	+	+
25	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	+	+
26	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	+	+

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา
เครื่องหมาย - หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา

ตารางที่ 7 สรุปผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคแลมป์ โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

รหัส	ตัวอย่าง	ชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR		ชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP	
		เครื่องพีซีอาร์	เครื่อง heat box	เครื่องพีซีอาร์	เครื่อง heat box
N	น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	-	-	-	-
N1	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	-	-	-	-
N2	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเมล็ด	-	-	-	-
1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	+	+	+	+
2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	+	+	+	+
3	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	+	+	+	+
4	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	+	+	+	+
5	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	+	+	+	+
6	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	+	+	+	+
7	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	+	+	+	+
8	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	+	+	+	+
9	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	+	+	+	+
10	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	+	+	+	+
11	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	+	+	+	+
12	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	+	+	+	+
13	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	+	+	+	+
14	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	+	+	+	+
15	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	+	+	+	+
16	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	+	+	+	+
17	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	+	+	+	+
18	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	+	+	+	+
19	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	+	+	+	+
20	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	+	+	+	+
21	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	+	+	+	+
22	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	+	+	+	+
23	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	+	+	+	+
24	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	+	+	+	+
25	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	+	+	+	+
26	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	+	+	+	+

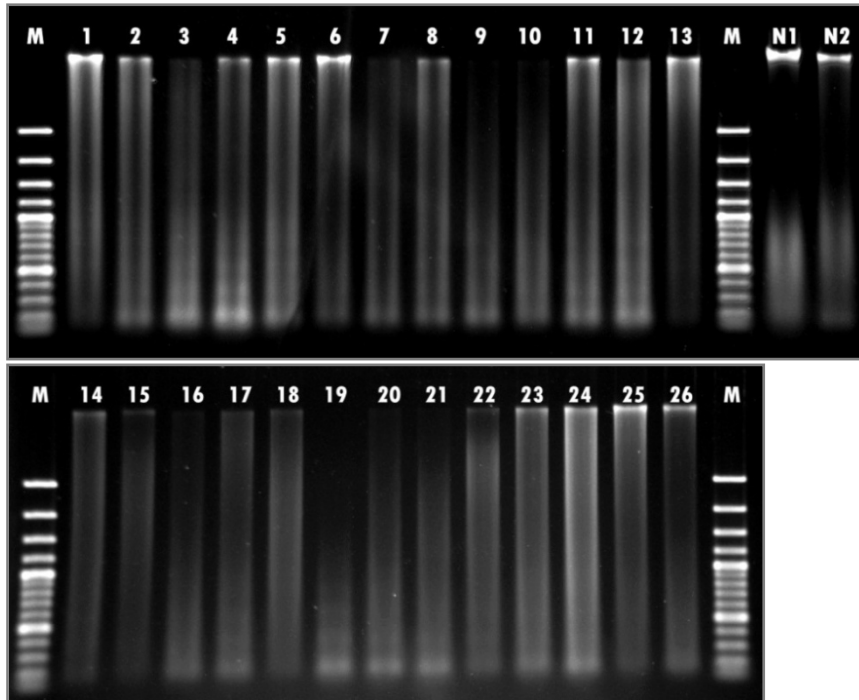
หมายเหตุ: เครื่องหมาย + หมายถึง ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา

เครื่องหมาย - หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา

ตารางที่ 8 สรุปผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคแลมป์ โดยการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain)

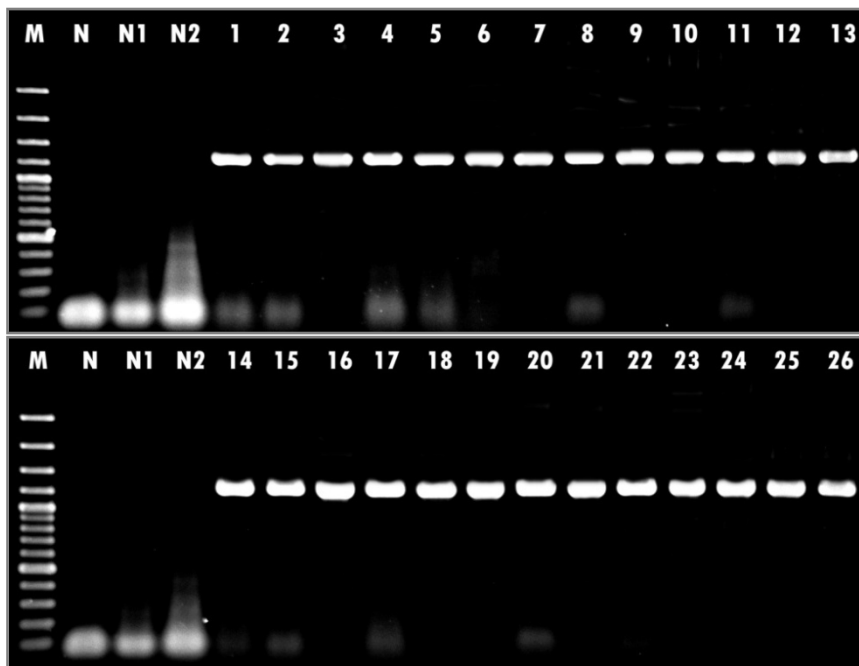
รหัส	ตัวอย่าง	ชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR		ชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP	
		เครื่องพีซีอาร์	เครื่อง heat box	เครื่องพีซีอาร์	เครื่อง heat box
N	น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	O	O	O	O
N1	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	O	O	O	O
N2	อ้อยไม่เป็นโรคที่เป็นอ้อยเพาะเมล็ด	O	O	O	O
1	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	Y	Y	Y	Y
2	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	Y	Y	Y	Y
3	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	Y	Y	Y	Y
4	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	Y	Y	Y	Y
5	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	Y	Y	Y	Y
6	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	Y	Y	Y	Y
7	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	Y	Y	Y	Y
8	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	Y	Y	Y	Y
9	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	Y	Y	Y	Y
10	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	Y	Y	Y	Y
11	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	Y	Y	Y	Y
12	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	Y	Y	Y	Y
13	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	Y	Y	Y	Y
14	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 ปลายสุดของใบ	Y	Y	Y	Y
15	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 กลางใบ	Y	Y	Y	Y
16	ใบที่แสดงอาการใบขาว-1 โคนใบ	Y	Y	Y	Y
17	ใบที่แสดงอาการใบขาว-2	Y	Y	Y	Y
18	ใบที่แสดงอาการใบขาว-3	Y	Y	Y	Y
19	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 ปลายสุดของใบ	Y	Y	Y	Y
20	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 กลางใบ	Y	Y	Y	Y
21	ใบที่ไม่แสดงอาการ-1 โคนใบ	Y	Y	Y	Y
22	ใบที่ไม่แสดงอาการ-2	Y	Y	Y	Y
23	ใบที่ไม่แสดงอาการ-3	Y	Y	Y	Y
24	หน่อที่แสดงอาการขาว-1	Y	Y	Y	Y
25	หน่อที่แสดงอาการขาว-2	Y	Y	Y	Y
26	หน่อที่แสดงอาการขาว-3	Y	Y	Y	Y

หมายเหตุ: Y (Yellow) คือ หลังการเติมสารเรืองแสงสารเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง บ่งชี้ว่าตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา
O (Orange) คือ หลังการเติมสารเรืองแสงสารไม่เปลี่ยนสี บ่งชี้ว่าตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา



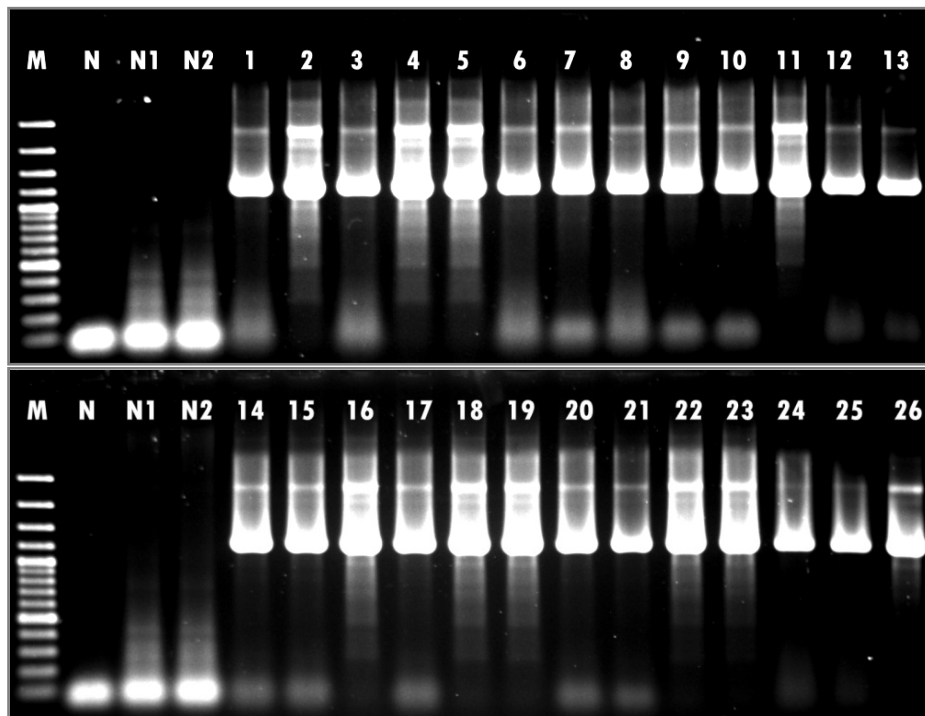
ภาพที่ 9 gel electrophoresis ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดตัวอย่างอ้อยที่นำมาทดสอบ

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ N1,N2	อ้อยปกติจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
แถบ 1-26	ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดกาญจนบุรี



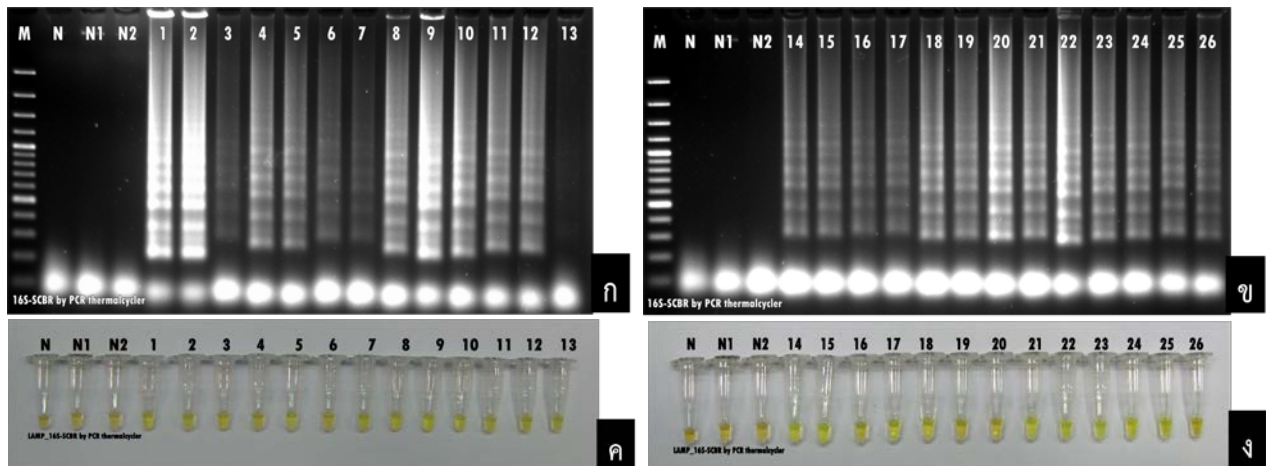
ภาพที่ 10 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Directed PCR

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)		
แถบ N	น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	แถบ N1,N2	อ้อยปกติจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
แถบ 1-26	ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดกาญจนบุรี		

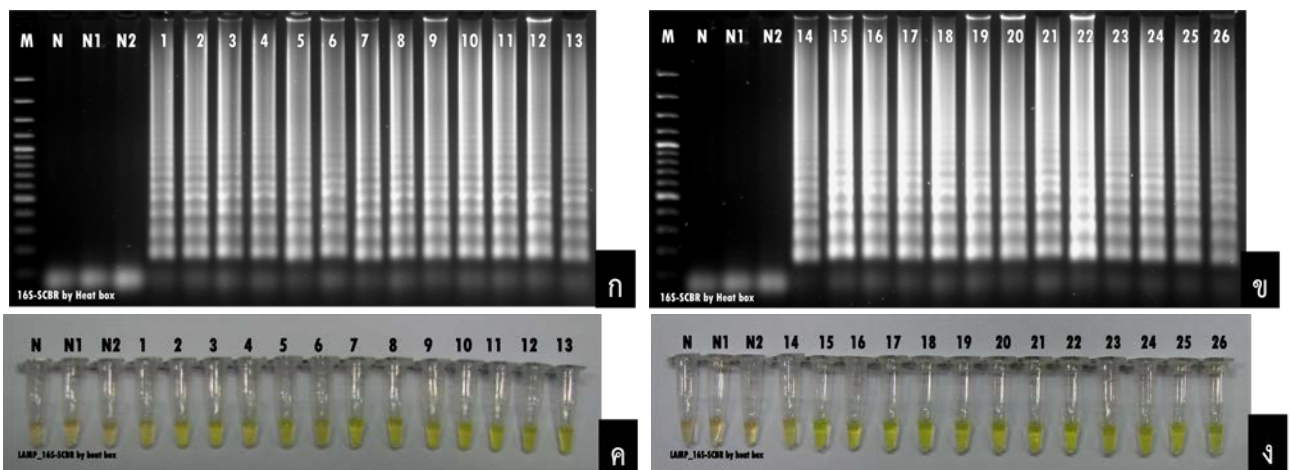


ภาพที่ 11 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Nested PCR

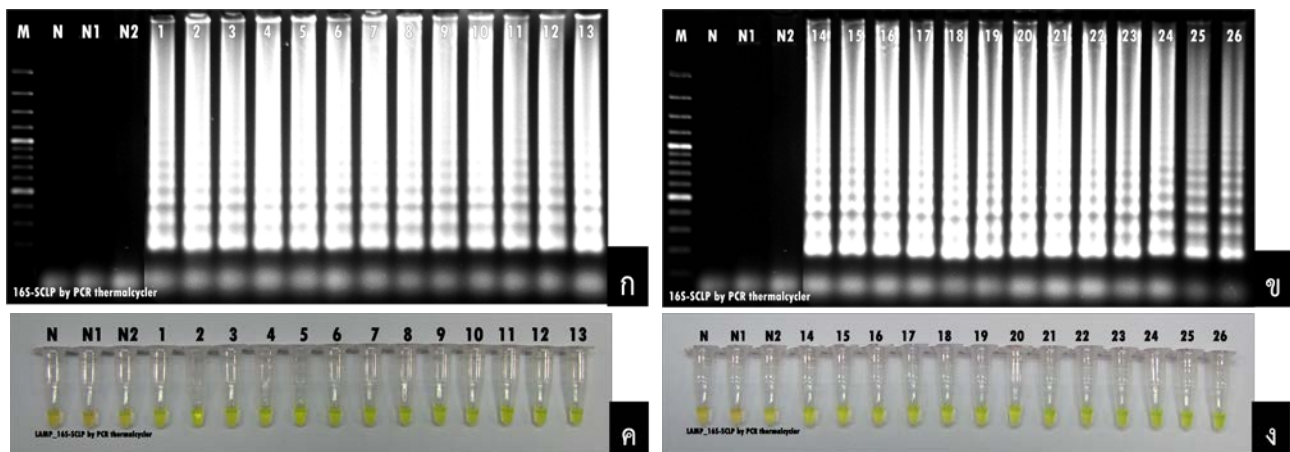
- | | |
|-----------|---|
| แถบ M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas) |
| แถบ N | น้ำกลั่นหนึ่งขวด |
| แถบ N1,N2 | อ้อยปกติจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ |
| แถบ 1-26 | ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดกาญจนบุรี |



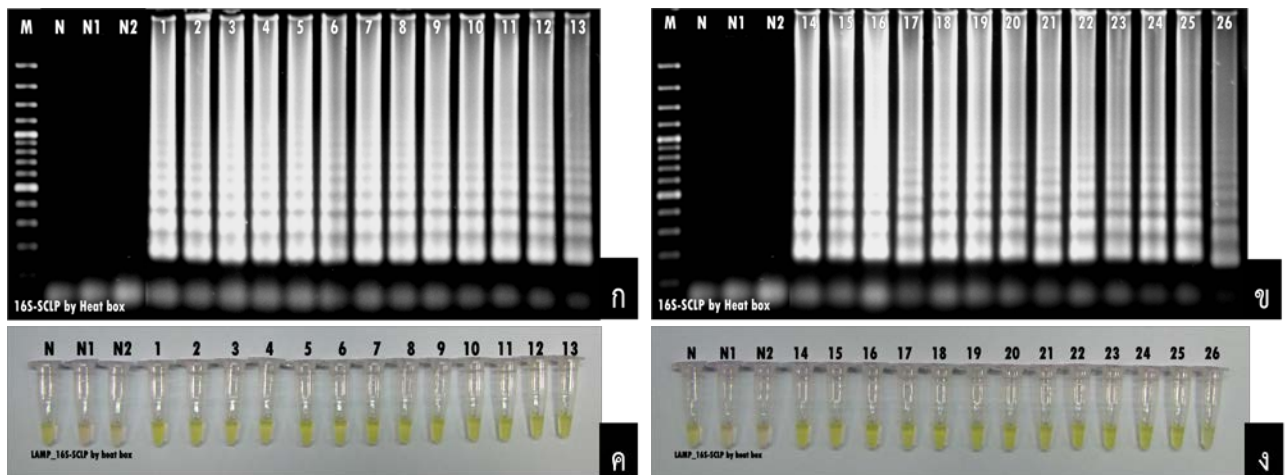
ภาพที่ 12 ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ (Thermalcycler) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)



ภาพที่ 13 ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCBR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel strain) (ค. และ ง.)



ภาพที่ 14 ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ (Thermalcycler) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) (ค. และ ง.)



ภาพที่ 15 ผลตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคแลมป์ ซึ่งใช้การดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat box) โดยชุดไพรเมอร์ 16S-SCLP ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ก. และ ข.) และการเติมสารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) (ค. และ ง.)

2.4 เพิ่มปริมาณยีน *secA* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP

2.4.1 ผลจากการเพิ่มปริมาณยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้ชุดไพรเมอร์ UnisecAF/UnisecAR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ไอโซเลท SCWL_KB-*secA* จากจ.กาญจนบุรี และ SCWL_NP-*secA* จากจ.นครปฐม ได้โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,230 และ 1,237 bp ตามลำดับ

>SCWL_KB-*secA* (1230 bp)

```
ATGAAACAGGAGAAGGAAAACTTTAACTTCTGTTATGCCAGCTTATTTAAATGCATTAAGTGGCGAAAGTGTTTCATATT
GTAAGTGTGAATGAATATTTAGCTCAAAGAGAAGCTAAAGGTATTATTAGCGAAATTTTTATTTTTTTAGGACTTACAGTA
GGTTTAAATATTAAGAATATAATATAGAAGAAAAACAAAAAGCTTATAATTGCGATATTCTTTATACTACAAACAGTGAA
ATAGGATTTGATTATTTGAGAGATAATATCGAAAAAAGAATCTAATTTATTAATGAAGAGAGATTATAATTATGTTATT
ATTGATGAAGTAGATTTCAGTATTAATTGATGAAGCTAGAACTCCTTTAATAATTTCAAGTTATGCTAAAAAAGAAAAAAG
TTTTATATGGATGCTAATCGTTTTGCTAAAATTTTAAACCTCATCATTATATTATTGATTTAGAAGCTAATAGTATTGAAT
TGACAGAAGAAGGGATAAAGAAAGGTGAAAACTTTTTCAAATTCCTAATTTATATGATAGCAATAATATTGTTTTATTGC
ATTGTATAAAAAATGCTTTAAAGCTCATTTTTATTATGAATAAAAAATAAGATTATTTGGTATATAAAAAATAATGTTTTGAT
AATAGATCAATTTACAGGAAGAACATTAGAAGGAAGACAGTTTAGTGATGGATTACATCAAGCCTTAGAAGCTAAAGAAG
GTTGTATTATCAAAGAAGAAACAGAAATTGCTGCAACTATAACTTATCAAATTTTTTAGAAATTATAAAAAAATTCAGG
GATGACTGGGACAGCTAAAACCGAAGAAAAAGAATTTAAAGACCTTTTTAAAATAAAAGTTATTGAAATTCCTACTAATAA
ACCCATGGTTTAGAAAAGATGAACCAATTTTGTTTTTCTACTCTTAAAGAAAAATGGAATGGTTTAATCCAAGAAATAG
AAACAAGACTTGAAAAAGGCCACCTATTTTAATTGGTACAATTACTGTAAAAGTATCTGAACAAATATCTAAAATTTTAA
AAAAAAAAAATCCCCGAAGTTCTAAAGGTTAAAAAATTTCAAAGAAGCAGAAATAATTTCAAAGCTGGCCAAAAAGGT
TCTATAACTATAGCCACTAATATGGCTGGTCGTGGTACAGATATTAAATTAGGCGAGGGAGTTATAGAATTAGGAGGATT
AGCTGTTTTAGGTACA
```

>SCWL_NP-*secA* (1237 bp)

```
ATGAAACAGGAGAAGGAAAACTTTAACTTCTGTTATGCCAGCTTATTTAAATGCATTAAGTGGCGAAAGTGTTTCATATT
GTAAGTGTGAATGAATATTTAGCTCAAAGAGAAGCTAAAGGTATTATTAGCGAAATTTTTATTTTTTTAGGACTTACAGTA
GGTTTAAATATTAAGAATATAATATAGAAGAAAAACAAAAAGCTTATAATTGCGATATTCTTTATACTACAAACAGTGAA
ATAGGATTTGATTATTTGAGAGATAATATTGAAAAAAGAATCTAATTTATTAATGAAGAGAGATTATAATTATGTTATT
ATTGATGAAGTAGATTTCAGTATTAATTGATGAAGCTAGAACTCCTTTAATAATTTCAAGTTATGCTAAAAAAGAAAAAAG
GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTTGCTAAAATTTTAAACCTCATCATTATATTATTGATTTAGAAGCTAATAGTATTGAA
TTGACAGAAGAAGGGATAAAGAAAGGTGAAAACTTTTTCAAATTCCTAATTTATATGATAGCAATAATATTGTTTTATTG
CATTGTATAAAAAATGCTTTAAAGCTCATTTTTATTATGAATAAAAAATAAGATTATTTGGTATATAAAAAATAATGTTTTGA
TAATAGATCAATTTACAGGAAGAACATTAGAAGGAAGACAGTTTAGTGATGGATTACATCAAGCCTTAGAAGCTAAAGAA
GGTTGTATTATCAAAGAAGAAACAGAAATTGCTGCAACTATAACTTATCAAATTTTTTTAGAATTTATAAAAAAATTCAG
GGTATGACTGGTACAGCTAAAACCGAAGAAAAAGAATTTAAAGACATATATAAAATAAAAGTTATTGAAATTCCTACTAAT
AAACCAATGATTAGAAAAGATGAACAGATTCGTTTTTCTACTCTTAAAGAAAAATGGAATGCTTTAATCCAAGATATA
GAAACAAGACATGAAAAAGGTCAACCTATTTTAATTGGTACAATTACTGTAGAAGTATCTGAACAAATATCTAAAATTTTA
AAAAAAAAAAGAATATCGCATGAAGTTCTAAATGCTAAAAATAATTACAAAGAAGCAGAAATAATTTCAAAGCTGGCCA
AAAAGGTTCTATGACTATAGCCACTAATATGGCTGGTCGTGGTACAGATATTAAATTAGGCGAGGGAGTTATAGAATTAG
GAGGATTAGCTGTTTTAGGTACA
```

2.4.2 นำข้อมูลยีน *secA* ที่สังเคราะห์ได้มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ทั้ง external primers, internal primers และ loop primers ตามวิธีของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer V3 ได้ชุดไพรเมอร์ secA-SCWL-KB (FIP-secA-SCWL-KB, BIP-secA-SCWL-KB, F3-secA-SCWL-KB, B3-secA-SCWL-KB)

ชื่อไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ (5'-->3')	จำนวนเบส (bp)
BIP-secA-SCWL-KB	AAC TAT AGC CAC TAA TAT GGC TGG TAT TCT ATA ACT CCC TCG CCT AA	47
FIP-secA-SCWL-KB	GGC CAG CTT TTG AAA TTA TTT CTG CAA AAA GAA TAT CGC ATG AAG TTC	48
B3-secA-SCWL-KB	CCT AAA ACA GCT AAT CCT CCT A	22
F3-secA-SCWL-KB	ACG GTA GAA GTT TTT GAA CAA	21

3. การถ่ายทอดเทคโนโลยีนวัตกรรมการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

3.1 นำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเรื่อง “การใช้เทคนิค Nested PCR และ LAMP ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย” ภายใต้โครงการ “การฝึกอบรมการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดปี 2558” จัดโดยกลุ่มส่งเสริมพันธุ์พืชปลอดภัย กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร เมื่อวันที่ 20-22 พฤษภาคม 2558 ณ จังหวัดอุดรธานี (ภาคผนวกที่ 2) มีผู้เข้าร่วมอบรมจำนวน 80 คน จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่

กรมส่งเสริมการเกษตร (กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย, ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร, ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านอารักขาพืช, สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตร, สำนักงานเกษตรจังหวัดอุดรธานี นครราชสีมาหนองบัวลำภูขอนแก่นมหาสารคามบุรีรัมย์สุพรรณบุรีกาญจนบุรีชลบุรีสระแก้วพิษณุโลกอุตรดิตถ์กำแพงเพชร)

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย (ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 1 กาญจนบุรี, ภาคที่ 2 กำแพงเพชร, ภาคที่ 3 ชลบุรี และภาคที่ 4 อุดรธานี)

โรงงานน้ำตาล (โรงงานน้ำตาลเอราวัณ, โรงงานน้ำตาลพิษณุโลก, โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์, โรงงานน้ำตาลมหาวัง, บริษัทอุตสาหกรรมอ่างเวียง, บริษัทไร่ด่านช้าง)

3.2 นำเสนอเผยแพร่ผลงานวิจัยทั้งภาคบรรยายและโปสเตอร์เรื่อง “นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย” ให้แก่ภาคเอกชนและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องได้รับทราบในการประชุมและพัฒนาเครือข่ายงานวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาลเรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน” จัดโดยโครงการ การติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาล และสำนักประสานงานชุดโครงการด้านอ้อยและน้ำตาล สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์เซ็นทรัลพลาซา ลาดพร้าว กรุงเทพฯ (ภาคผนวกที่ 3)

3.3 จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP” เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP ให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพันธุ์อ้อยทั้งภาครัฐและภาคเอกชน นำไปปรับใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในกระบวนการผลิตอ้อยปลอดโรค จัดเมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2558 ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม (ภาคผนวกที่ 4) มีผู้เข้าร่วมอบรมจำนวน 23 คน จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่

กองส่งเสริมการอารักขาพืชและการจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร
ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย
สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี
บริษัทอีเอสวิจียและพัฒนา จำกัด
บริษัทน้ำตาลบ้านโป่ง จำกัด
บริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม จำกัด
บจม.เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซูการ์ คอร์ปอเรชั่น
โรงงานน้ำตาลราชบุรี
โรงงานน้ำตาลเอราวัณ

สรุปและข้อเสนอแนะ

พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ทำการสังเคราะห์ Imp gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus Phytoplasma oryzae* strain: RYD ได้โคลนของ Imp gene (RYD-IMP) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 501 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอะมิโนได้ 164 aa ขึ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูก clone เข้า pJET และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่สังเคราะห์พบว่ามีความเหมือนกัน 100% เตรียม expression plasmid vector pET200 ที่เปิดด้วย *NheI* และ *SacI* เพื่อนำขึ้น pJET-RYD-IMP จาก pJET เข้าเชื่อมต่อ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ก่อนนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 เพื่อชักนำการผลิต RYD-IMP protein ต่อไป

การ เพิ่มปริมาณยีน Imp gene จากตัวอย่างอ้อยใบขาวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Rnc-1/PssA-1 พบว่ายังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากอ้อยใบขาว และอยู่ระหว่างดำเนินการทดสอบไพรเมอร์คู่อื่นและสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณยีน Imp จากตัวอย่างอ้อยใบขาวเพิ่มเติม

พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

การตรวจยีน 16S rRNA ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1247 bp ได้ชุดไพรเมอร์ ดังนี้

ชุดที่ 1 คือไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST) ออกแบบจากไอโซเลทบุรีรัมย์

ชุดที่ 2 คือไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh) ออกแบบจากไอโซเลทลำปาง

ทดสอบได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยการปรับความเข้มข้นขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองชุดและองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยามีความเหมาะสมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ทั้งการตรวจด้วยเครื่อง Thermocycler และ Heat box สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการเรืองแสงเมื่อเติมสาร SYBR Green และยืนยันการตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคเจลอเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลายขนาดมีลักษณะคล้ายขั้นบันได และผลการตรวจสอบสอดคล้องกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR

การตรวจยีน secA เพิ่มปริมาณยีน secA โคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ได้โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,230 และ 1,237 bp ของเชื้อไฟโตพลาสมา 2 ไอโซเลท ได้แก่ SCWL_KB-secA จากจ.กาญจนบุรี และ SCWL_NP-secA จากจ.นครปฐม ตามลำดับ ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน secA ได้ชุดไพรเมอร์ secA-SCWL-KB (FIP-secA-SCWL-KB, BIP-secA-SCWL-KB, F3-secA-SCWL-KB, B3-secA-SCWL-KB) และอยู่ระหว่างการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจยีน secA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเช่นเดียวกับการทดสอบยีน 16S rRNA

เอกสารอ้างอิง

- Bekele, B., Hodgetts, J., Tomlinson, J., Boonham, N., Nikolić, P., Swarbrick, P., & Dickinson, M. (2011a). Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathol.* 60(2): 345-355.
- Bekele, B., Abeysinghe, S., Hoat, T. X., Hodgetts, J., Dickinson, M., Bertaccini, A., & Maini, S. (2011b). Development of specific secA-based diagnostics for the 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of the Gramineae. *Bulletin of Insectology* 64: S15-S16.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Gundersen, D. E. and I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 114-151.
- Hanboonsong Y., C. Choosai, S. Panyim and S. Damak. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) . *Insect Molecular Biology* 11 (1): 97-104.
- Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai and P. Sarithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *Journal of Economic Entomology* 99: 1531-1537.
- Kakizawa, S; K. Oshima and S. Namba. 2006. Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol* 14: 254-256.
- Kakizawa, S; K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H.Y. Jung, T. Sawayanagi, T. Tsuchizaki, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. 2001. Cloning and expression analysis of Phytoplasma Protein translocation genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 : 1043-1050.
- Kakizawa, S; K. Oshima, Y. Ishii, A. Hoshi, K. Maejima, H.Y. Jung, Y. Yamaji and S. Namba. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their *in planta* expression. *FEMS Microbiol letter* 293: 92-101.
- Klinkong, S. and E. Seemuller. 1993. Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA probe. *Kasetsart Journal* 27: 98-103.
- Kollar, A. and E. Seemuller. 1989. Base composition of the DNA of Mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J. Phytopath.* 127: 177-186.
- Kube. M., B. Schneider, H. Kuhl, T. Dandekar, K. Heitmann, A.M. Migdoll, R. Reingardt and E. Seemuller. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma *Candidatus Phytoplasma mali*. *BMC Genomics* 9: 306.
- Lee, I.-M., R.E. Davis and D.E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221-225.

- Lee, I-M., R.W. Hammond, R.E. Davis and D.E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lisa, W., S. Harper and G. Clover. 2010. Development of a LAMP assay for *Xylella fastidiosa*. Ministry of Agriculture and Forestry, New Zealand. 31p.
- Maccone, C., H. Neimark, A. Ragozzino, U. Lauer and E. Seemuller. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 150-154.
- Nakashima, K., W. Chaleeprom, P. Wongkew and P. Sirithorn. 1994. Detection of mycoplasma-like organisms associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probe. *JIRCAS J.* 1: 57-67.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: E63.
- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa et al. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet* 36: 27-29.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarindu, N. and M.F. Clark. 1993. Antibody production and identity of MLOs associated with sugar-cane whiteleaf disease and Bermuda-grass whiteleaf disease from Thailand. *Plant Pathology* 42: 396-402.
- Seemuller, E. 1976. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort.* 67: 108-112.
- Sugawara, K., Himeno, M., Keima, T., Kitazawa, Y., Maejima, K., Oshima, K., & Namba, S. (2012). Rapid and reliable detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification targeting a housekeeping gene. *Journal of General Plant Pathology*, 78(6), 389-397.
- Susuki, S., K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, H.Y. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, M. Ugaki and S. Namba. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4252-4257.
- Tran-Nguyen, L.T., M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt and K.S. Gibb. 2008. Comparative genome analysis of *Candidatus Phytoplasma australiense* (subgroup tuf-Australia

l; rp-A) and *Candidatus Phytoplasma asteris* Strains OY-M and AY-WB. J. Bacteriol 190: 3979-3991.

Tomlinson, J.A., N. Boonham and M. Dickinson. 2010. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasma. Plant Pathology 59: 465-471.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithorn, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana R. Kitchareonpanya and S. Damak. 1997. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot by RFLP analysis and sequencing. Theoretical and Applied Genetic 95: 660-663.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

Chromatogram จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ RYD-Nhe-F และ RYD-Sac-R ที่ cloned ใน pJETบริเวณ highlight สีเหลืองเป็นตำแหน่งของไพรเมอร์ forward และ reverse และมีการแปรรหัสเป็นกรดอะมิโน (แบบสามตัวอักษร)

ภาคผนวกที่ 2

นำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเรื่อง “การใช้เทคนิค Nested PCR และ LAMP ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย” ภายใต้โครงการ “การฝึกอบรมการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดปี 2558” จัดโดยกลุ่มส่งเสริมพันธุ์พืชปลอดภัย กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร เมื่อวันที่ 20-22 พฤษภาคม 2558 ณ จังหวัดอุดรธานี

ภาคผนวกที่ 3

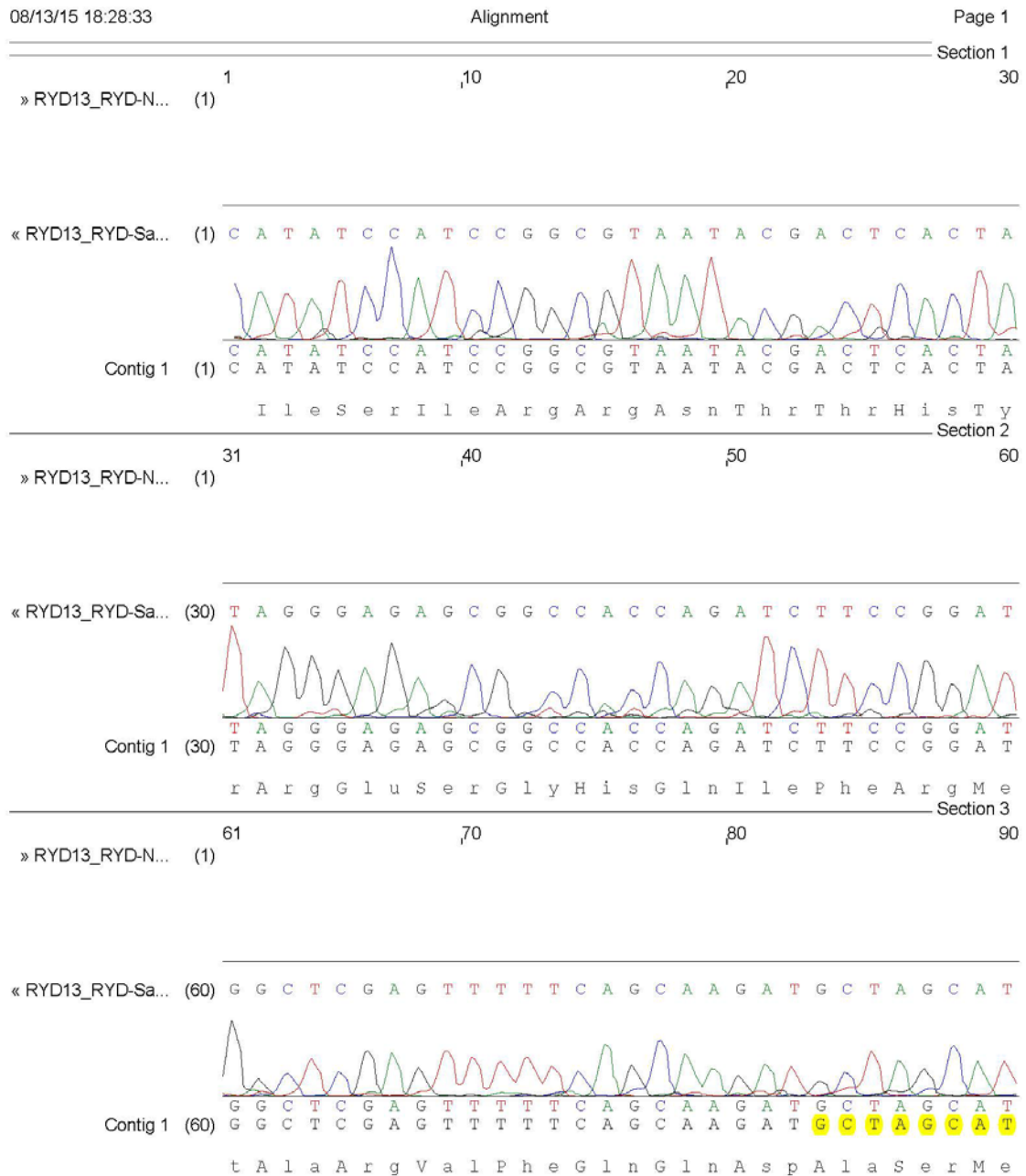
นำเสนอเผยแพร่ผลงานวิจัยทั้งภาคบรรยายและโปสเตอร์เรื่อง “นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย” ให้แก่ภาคเอกชนและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องได้รับทราบในการประชุมและพัฒนาเครือข่ายงานวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาลเรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน” จัดโดยโครงการ การติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยด้านอ้อยและน้ำตาล และสำนักประสานงานชุดโครงการด้านอ้อยและน้ำตาล สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์เซ็นทรัลพลาซา ลาดพร้าว กรุงเทพฯ

ภาคผนวกที่ 4

จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP” เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP ให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพันธุ์อ้อยทั้งภาครัฐและภาคเอกชน นำไปปรับใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในกระบวนการผลิตอ้อยปลอดภัย จัดเมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2558 ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ภาคผนวกที่ 1

Chromatogram จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ RYD-Nhe-F และ RYD-Sac-R ที่ cloned ใน pJET บริเวณ highlight สีเหลืองเป็นตำแหน่งของไพรเมอร์ forward และ reverse และมีการแปรรหัสเป็นกรดอะมิโน (แบบสามตัวอักษร)



» RYD13_RYD-N... (1) 91 ,100 ,110 Section 4 120

« RYD13_RYD-Sa... (90) G C A G A A C G A A A A C T T T C T G T A T A C C A A A A A

Contig 1 (90) G C A G A A C G A A A A C T T T C T G T A T A C C A A A A A
t G l n A s n G l u A s n P h e L e u T y r T h r L y s L y

» RYD13_RYD-N... (1) 121 ,130 ,140 Section 5 150 G C A T

« RYD13_RYD-Sa... (120) A G G C A A A A T G A T T A T T G T G G G C A G C A G C A T

Contig 1 (120) A G G C A A A A T G A T T A T T G T G G G C A G C A G C A T
s G l y L y s M e t I l e I l e V a l G l y S e r S e r I l

» RYD13_RYD-N... (4) 151 ,160 ,170 Section 6 180 T G C G G C G G C G C T G A T T C T G C T G G G C A T T C T

« RYD13_RYD-Sa... (150) T G C G G C G G C G C T G A T T C T G C T G G G C A T T C T

Contig 1 (150) T G C G G C G G C G C T G A T T C T G C T G G G C A T T C T
e A l a A l a A l a L e u I l e L e u L e u G l y I l e L e

Section 7

» RYD13_RYD-N... (34) 181 190 200 210
 G G C G T A T T T T T T A A A T G G T G G C C G T T T A A

« RYD13_RYD-Sa... (180)
 G G C G T A T T T T T T T A A A T G G T G G C C G T T T A A
 G G C G T A T T T T T T T A A A T G G T G G C C G T T T A A

Contig 1 (180)

G G C G T A T T T T T T T A A A T G G T G G C C G T T T A A
 G G C G T A T T T T T T T A A A T G G T G G C C G T T T A A
 u A l a T y r P h e P h e L y s T r p T r p P r o P h e A s

Section 8

» RYD13_RYD-N... (64) 211 220 230 240
 C C A G A T T G T G T T T G A T A A A G A A A G C A T T A A

« RYD13_RYD-Sa... (210)
 C C A G A T T G T G T T T G A T A A A G A A A G C A T T A A
 C C A G A T T G T G T T T G A T A A A G A A A G C A T T A A

Contig 1 (210)

C C A G A T T G T G T T T G A T A A A G A A A G C A T T A A
 C C A G A T T G T G T T T G A T A A A G A A A G C A T T A A
 n G l n I l e V a l P h e A s p L y s G l u S e r I l e A s

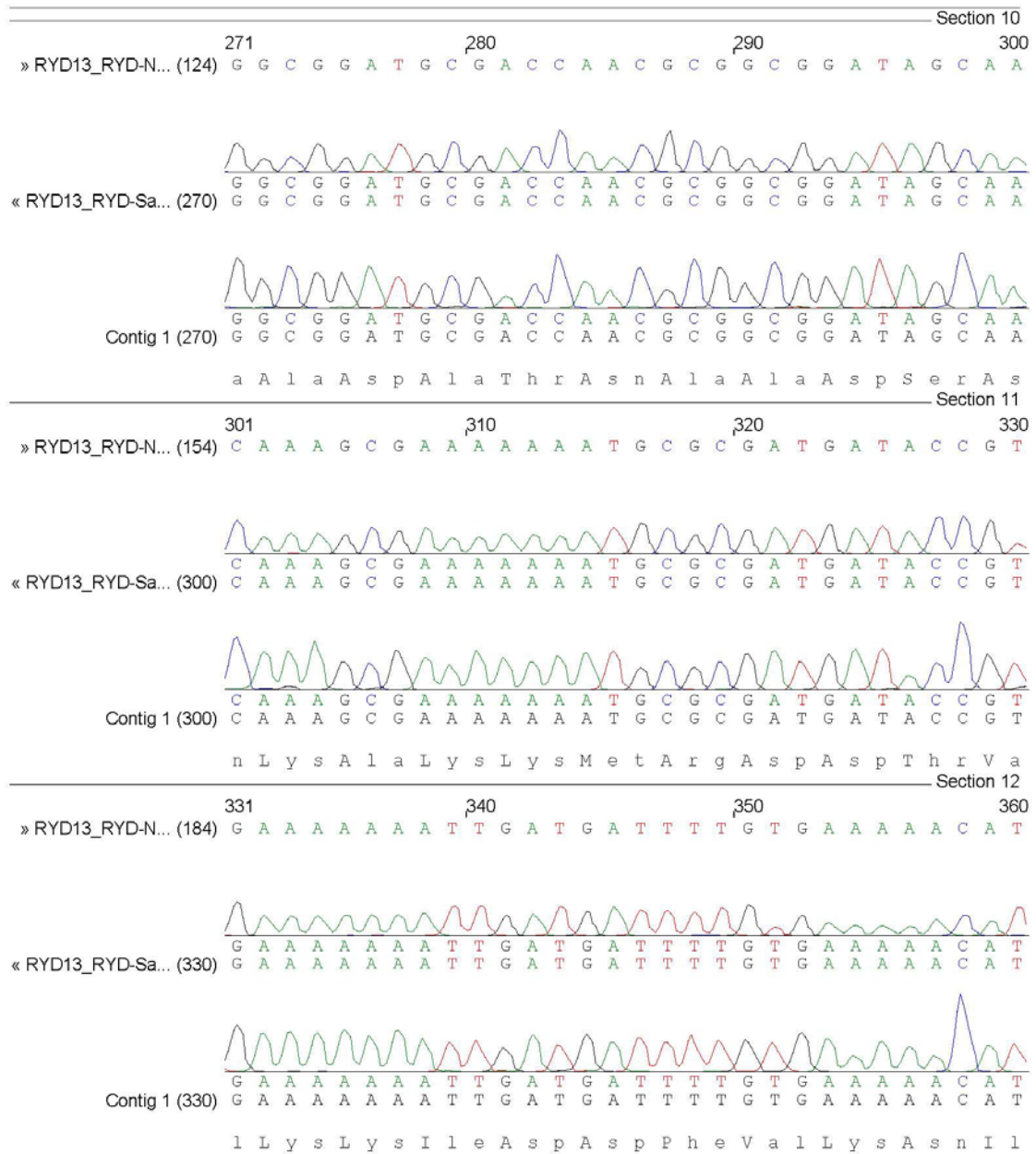
Section 9

» RYD13_RYD-N... (94) 241 250 260 270
 C A A A T A T G C G G A A G A T C T G A A A T T T G T G G C

« RYD13_RYD-Sa... (240)
 C A A A T A T G C G G A A G A T C T G A A A T T T G T G G C
 C A A A T A T G C G G A A G A T C T G A A A T T T G T G G C

Contig 1 (240)

C A A A T A T G C G G A A G A T C T G A A A T T T G T G G C
 C A A A T A T G C G G A A G A T C T G A A A T T T G T G G C
 n L y s T y r A l a G l u A s p L e u L y s P h e V a l A l



Section 13

» RYD13_RYD-N... (214) 361 370 380 390
 T G A A A A A T T T A A C G A T A A A A C C A A A G A T G A

« RYD13_RYD-Sa... (360)
 T G A A A A A T T T A A C G A T A A A A C C A A A G A T G A
 T G A A A A A T T T A A C G A T A A A A C C A A A G A T G A

Contig 1 (360)
 T G A A A A A T T T A A C G A T A A A A C C A A A G A T G A
 T G A A A A A T T T A A C G A T A A A A C C A A A G A T G A

e G l u L y s P h e A s n A s p L y s T h r L y s A s p A s

Section 14

» RYD13_RYD-N... (244) 391 400 410 420
 T A G C A A A A T T A A A G C G G A A A C C A T T A A A A A

« RYD13_RYD-Sa... (390)
 T A G C A A A A T T A A A G C G G A A A C C A T T A A A A A
 T A G C A A A A T T A A A G C G G A A A C C A T T A A A A A

Contig 1 (390)
 T A G C A A A A T T A A A G C G G A A A C C A T T A A A A A
 T A G C A A A A T T A A A G C G G A A A C C A T T A A A A A

p S e r L y s I l e L y s A l a G l u T h r I l e L y s L y

Section 15

» RYD13_RYD-N... (274) 421 430 440 450
 A T T T A G C G A T C T G A G C G G C A A A A T T A A A A A

« RYD13_RYD-Sa... (420)
 A T T T A G C G A T C T G A G C G G C A A A A T T A A A A A
 A T T T A G C G A T C T G A G C G G C A A A A T T A A A A A

Contig 1 (420)
 A T T T A G C G A T C T G A G C G G C A A A A T T A A A A A
 A T T T A G C G A T C T G A G C G G C A A A A T T A A A A A

s P h e S e r A s p L e u S e r G l y L y s I l e L y s A s

Section 16

» RYD13_RYD-N... (304) 451 460 470 480
 C G T G G A A G T G A A A G A A G G C A G C A G C T A T G C

« RYD13_RYD-Sa... (450)

 C G T G G A A G T G A A A G A A G G C A G C A G C T A T G C
 C G T G G A A G T G A A A G A A G G C A G C A G C T A T G C

Contig 1 (450)

 C G T G G A A G T G A A A G A A G G C A G C A G C T A T G C
 C G T G G A A G T G A A A G A A G G C A G C A G C T A T G C
 n V a l G l u V a l L y s G l u G l y S e r S e r T y r A l

Section 17

» RYD13_RYD-N... (334) 481 490 500 510
 G G C G A G C G A T T T T G T G A C C A G C T T T A A C G A

« RYD13_RYD-Sa... (480)

 G G C G A G C G A T T T T G T G A C C A G C T T T A A C G A
 G G C G A G C G A

Contig 1 (480)

 G G C G A G C G A T T T T G T G A C C A G C T T T A A C G A
 G G C G A G C G A
 a A l a S e r A s p P h e V a l T h r S e r P h e A s n A s

Section 18

» RYD13_RYD-N... (364) 511 520 530 540
 T G C G G C G A A A C A G A A C G A T C T G G A T A G C G C

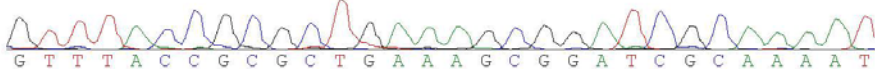
« RYD13_RYD-Sa... (488)

 T G C G G C G A A A C A G A A C G A T C T G G A T A G C G C

Contig 1 (510) T G C G G C G A A A C A G A A C G A T C T G G A T A G C G C
 p A l a A l a L y s G l n A s n A s p L e u A s p S e r A l

Section 19

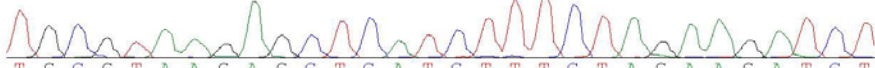
» RYD13_RYD-N... (394) 541 550 560 570
 G T T T A C C G C G C T G A A A G C G G A T C G C A A A A T

« RYD13_RYD-Sa... (•488)

 G T T T A C C G C G C T G A A A G C G G A T C G C A A A A T

Contig 1 (540) G T T T A C C G C G C T G A A A G C G G A T C G C A A A A T
 a P h e T h r A l a L e u L y s A l a A s p A r g L y s I l

Section 20

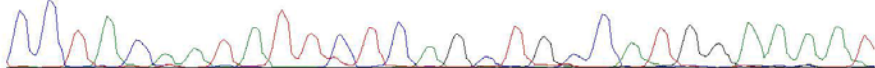
» RYD13_RYD-N... (424) 571 580 590 600
 T G C G T A A G A G C T C A T C T T T C T A G A A G A T C T

« RYD13_RYD-Sa... (•488)

 T G C G T A A G A G C T C A T C T T T C T A G A A G A T C T

Contig 1 (570) T G C G T A A G A G C T C A T C T T T C T A G A A G A T C T
 e A l a * * * G l u L e u I l e P h e L e u G l u A s p L e

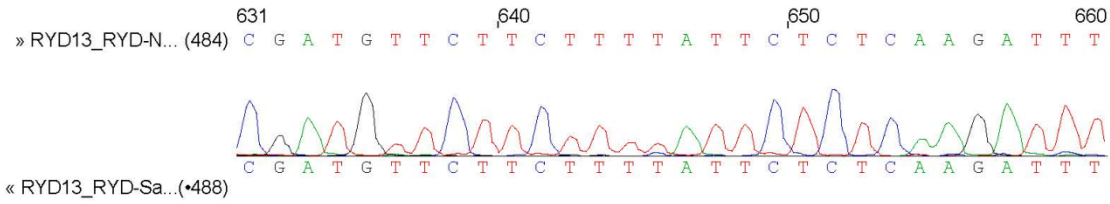
Section 21

» RYD13_RYD-N... (454) 601 610 620 630
 C C T A C A A T A T T C T C A G C T G C C A T G G A A A A T

« RYD13_RYD-Sa... (•488)

 C C T A C A A T A T T C T C A G C T G C C A T G G A A A A T

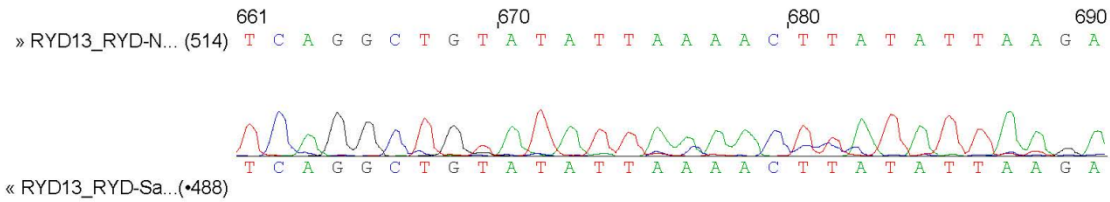
Contig 1 (600) C C T A C A A T A T T C T C A G C T G C C A T G G A A A A T
 u L e u G l n T y r S e r G l n L e u P r o T r p L y s I l

Section 22



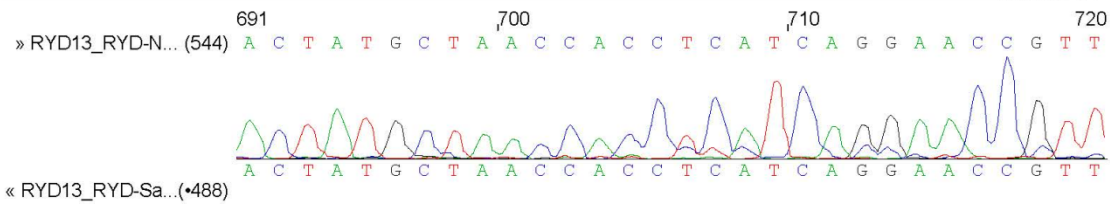
Contig 1 (630) C G A T G T T C T T C T T T A T T C T C T C A A G A T T T
e A s p V a l L e u L e u L e u P h e S e r G l n A s p P h

Section 23



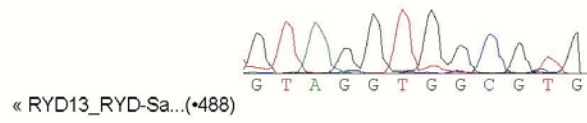
Contig 1 (660) T C A G G C T G T A T A T T A A A C T T A T A T T A A G A
e G l n A l a V a l T y r * * * A s n L e u T y r * * * G l

Section 24



Contig 1 (690) A C T A T G C T A A C C A C C T C A T C A G G A A C C G T T
u L e u C y s * * * P r o P r o H i s G l n G l u P r o L e

» RYD13_RYD-N... (574) 721 732
G T A G G T G G C G T G



Contig 1 (720) G T A G G T G G C G T G
u * * * V a l A l a