

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อ *Streptomyces*-PR15 และการใช้ตรวจติดตามเชื้อรอบผิวนอกต้นกล้าพริก

Production of polyclonal antiserum specific to *Streptomyces*-PR15 and detection of target bacteria in rhizoplane of chilli seedlings

วีรกรณ์ แสงไสย¹ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล^{1,2*}

Weerakorn Saengsai¹ and Petcharat Thummabenjapone^{1,2*}

บทคัดย่อ: เชื้อแบคทีเรีย สเตรปโตมัยซีส-PR15 (*Streptomyces* -PR15) เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์กว้าง ใช้ควบคุมทั้งเชื้อรา และแบคทีเรียสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ เพื่อพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับใช้ตรวจติดตามเชื้อ *Streptomyces* -PR15 ในชีวภัณฑ์ และในสภาพแวดล้อมรอบต้นพืช จึงได้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ *Streptomyces*-PR15 โดยการฉีดแอนติเจนที่เตรียมจากเซลล์เชื้อ *Streptomyces* -PR15 ที่ทำให้เซลล์แตกด้วย ultrasonicator นำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อขาหลังของกระต่ายสีขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ ไร่ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นฉีดเฉพาะแอนติเจนเข้าเส้นเลือดกลางใบหู 2 ครั้ง เก็บเลือด จำนวน 8 ครั้ง หลังจากเก็บเลือดครั้งที่ 8 แล้วจึงฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยแอนติเจน เข้าบริเวณเส้นเลือดกลางใบหู 1 ครั้ง หลังจากนั้น 10 วัน จึงเก็บเลือด 2 ครั้ง พบว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ มีค่า titer สูงสุดเป็น 1:200,000 ในสัปดาห์ที่ 7 และ 10 มีความไวในการตรวจหาโปรตีนจากเซลล์เชื้อ *Streptomyces* -PR15 ที่ระดับ 0.312 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces*-PR13, *Streptomyces*-PR22, *Streptomyces*-PR33, *Bacillus* spp., แบคทีเรียจากผิวใบพืช แบคทีเรียแยกจากดิน ปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมัก เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช แต่มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาปานกลางกับเชื้อ *Streptomyces* ปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลต (PR87, PR84 และ PR78) เมื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *Streptomyces*-PR15 บริเวณผิวนอกของต้นกล้าพริก พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ได้ที่ระดับ 10^4 cfu/ml

คำสำคัญ: ELISA polyclonal antiserum จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ABSTRACT: The antagonistic *Streptomyces*-PR15 is a broad spectrum against various plant pathogenic fungi and bacteria of economic crops. To develop the ELISA technique for detection the *Streptomyces*-PR15 in bioproducts and plant surrounding environment, the production of polyclonal antiserum against *Streptomyces*-PR15 was carried out. The antigen prepared from *Streptomyces*-PR15 whole cell proteins was mixed with Freund's incomplete adjuvant (1:1, v/v) was injected to in New Zealand White rabbit with immunization program as follows, intramuscular injection for 3 times then only antigen was intravenous injected for 2 times. Bleeding was done at 10 days after final immunization and then at weekly interval for 8 weeks. The antigen was re-intravenous injected at 14 days after 7th bleeding.

¹ สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Plant Pathology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources , Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

² ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Agricultural biotechnology research center for sustainable economy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

* Corresponding author: petsir@kku.ac.th.

Bleeding was done after 10 days and addition by weekly for 2 weeks. Titer of STPR15 As was increased to 1:200,000 at week 7th and week 10th. The sensitivity of STPR15 As for detection whole cell proteins was 0.312 ug/ml. The STPR15 As was moderately serological related to 3 isolates of antagonistic *Streptomyces* spp. (PR87, PR84 and PR78) but not reacted with various isolates of *Bacillus* spp., bacteria from leaves surface, bacteria from soil, manure and compost and plant pathogenic bacteria. The STPR15 As could be used for reliable detection *Streptomyces*-PR15 in rhizoplane of chilli seedling at 10^4 cfu/ml.

Keywords: ELISA, polyclonal antiserum, antagonist

บทนำ

Streptomyces เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชได้ โดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ปฏิบัติการ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญของพืชวงศ์แตง และวงศ์พริก-มะเขือเทศ (เมธาวิ และคณะ, 2550) จึงมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชในเชิงพาณิชย์ ในการนำเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ไปใช้ควบคุมโรคพืชในแปลงปลูกพืชได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีการศึกษาติดตามการดำรงอยู่ของเชื้อภายหลังจากการพ่นหรือใส่ให้กับต้นพืชไปแล้ว ดังนั้นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามเชื้อปฏิบัติควรเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำในการตรวจ มีความจำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติเป้าหมาย และมีความไวในการตรวจสอบหาเชื้อเป้าหมายในสภาพแวดล้อมต่างๆ รอบต้นพืชปลูกที่นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติมาใช้ควบคุมโรคพืช นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ประหยัดของ *Streptomyces*-PR15 หรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Streptomyces* -PR15 ในตัวอย่างชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์ที่จะพัฒนาขึ้นมาภายหลัง เทคนิคการตรวจติดตามที่เข้ากรอบเกณฑ์พิจารณาต่างๆ ดังกล่าว และปฏิบัติได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่อการทดสอบอยู่ในระดับยอมรับได้ (ไม่แพงเกินไป) คือเทคนิค indirect ELISA อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายจึงจะสามารถดำเนินการได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อ *Streptomyces*-PR15 และทดสอบคุณภาพของแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ และทดลองใช้

ติดตามเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ในตัวอย่างรากพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA เพื่อนำไปสู่การติดตามสภาพการดำรงชีพของเชื้อ *Streptomyces*-PR15 รอบรากและผิวใบพืชเพื่อกำหนดปริมาณการใช้เชื้อ *Streptomyces*-PR15 ที่เหมาะสมสำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคที่สำคัญของพริกและติดตามเชื้อใน ชีวภัณฑ์ *Streptomyces*-PR15 ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้น

นำเชื้อ *Streptomyces* -PR15 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินซึ่งผ่านการศึกษาคูสมบัติด้านการเป็นปฏิสัมพันธ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมาแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร AGMA (*Dhingra and Sinclair, 1995*) โดยวิธี streak plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร AGMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร/flask 250 ml ที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 5 วัน เขย่าที่ 150 rpm เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 9, 100 g นาน 15 นาที ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วย sterile PBS pH 7.4 นำตะกอนเซลล์มาต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ นาน 10 นาที แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย ultrasonicator ที่ 50 °ซ นาน 5 นาที (Sangdee et al., 2012) ได้เป็น sonicated cells นำตะกอนเซลล์มาผสมใน PBS pH 7.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 100 g นาน 5 นาที และกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำโปรตีนที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และทำการเจือจางให้ได้ 0.5 mg/ml ด้วย PBS pH 7.4 (เพชรัตน์ และ

ประภาส, 2544) มาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดในกระต่ายทดลอง โดยดัดแปลงวิธีการเตรียมแอนติเจนและโปรแกรมการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่ายจาก Kirby and Rybicki (1986) และ Ridell and Whilliam (1983) โดยนำโปรตีนจากเซลล์ *Streptomyces*-PR15 ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ไปผสม กับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมจนเข้ากันดีโดยใช้เครื่อง homogenizer

การผลิตโพลีคอนอลแอนติบอดี *Streptomyces*-PR15

นำกระต่ายเพศเมียพันธุ์ New Zealand White มาเจาะเก็บเลือดก่อน เพื่อใช้เป็น normal serum แล้วจึงฉีดแอนติเจนเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ที่เตรียมไว้ข้างต้นฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของกระต่ายทุก 7 วัน จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นฉีดเฉพาะโปรตีนจากเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิกรัมเข้าบริเวณเส้นเลือดกลางใบหู 2 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน เก็บเลือดมาตรวจสอบความเข้มข้นของ IgG ที่จำเพาะกับเชื้อ *Streptomyces*-PR15 หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้ายแล้ว 10 วัน ทำการเก็บเลือดกระต่ายทุกสัปดาห์ นำเลือดที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จึงนำไปไว้ในตู้เย็น (4 °C) ข้ามคืน ดูดเก็บส่วนน้ำเลือด แล้วเติม NaN_3 0.002% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยเก็บต่อเนื่องทุก 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง หลังจากเก็บเลือดครั้งที่ 8 ไปแล้ว 14 วันจึงฉีดแอนติเจนเข้าเส้นเลือดที่ใบหูอีกครั้ง แล้วเริ่มเก็บเลือดที่ 10 วันหลังจากการฉีดกระตุ้นเก็บเลือดทุกสัปดาห์จำนวน 2 ครั้งต่อกัน

การตรวจคุณภาพของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *Streptomyces*-PR15

การหาค่า Titer ของแอนติซีรั่ม: นำแอนติซีรั่มที่ผลิตได้(STPR15As) มาหาค่า titer ด้วยวิธีการ indirect ELISA (เพชรรัตน์และประภาส, 2544)โดย เจือจางโปรตีนจากเซลล์ *Streptomyces*-PR15 ที่ใช้เตรียมแอนติเจน ด้วย conjugated buffer ที่ระดับ 100, 10,

1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแอนติซีรั่ม STPR15As ใน conjugated buffer ที่ระดับ 1:1,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:40,000, 1:80,000, 1:100,000 และ 1:200,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ เจือจาง normal serum ในอัตราส่วน 1:1,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นการทดลองเปรียบเทียบ

ความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่ม: นำแอนติซีรั่ม STPR15As ที่ผลิตได้มาตรวจความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางแอนติเจนด้วย coating buffer ให้ได้ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.0781, 0.039, และ 0.0195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วหยดลงใน ELISA plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เรียงตามแนวสดมภ์ (แนวตั้ง) จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย และหลุมสุดท้ายในแต่ละสดมภ์หยด coating buffer เจือจางแอนติซีรั่มที่นำมาทดสอบในระดับ 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:10,000, 1:12,000 และ 1:14,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) และ normal serum ในอัตราส่วน 1:1,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นการทดลองเปรียบเทียบ ดำเนินการตามขั้นตอนการตรวจด้วยเทคนิค indirect ELISA (เพชรรัตน์และประภาส, 2544)

ความจำเพาะ (specificity) ของแอนติซีรั่ม: นำแอนติซีรั่ม STPR15As ที่ผลิตได้มาตรวจสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ กลุ่มที่ 1 เชื้อ *Streptomyces* ปฏิบัติ มี 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces*-PR15, -PR87, -PR84, -PR78, -PR33, -PR22 และ -PR13 กลุ่มที่ 2 *Bacillus* sp. กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Acidovorax citrulli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pectobacterium carotovorum* กลุ่มที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบพืชจำนวน 28 ไอโซเลต และ กลุ่มที่ 5 เชื้อแบคทีเรียแยกจากดิน ปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมักไม่ได้จำแนกระบุชนิด จำนวน 26 ไอโซเลต และ *Serratia marcescens* ที่แยกได้จากดิน นำมาเตรียมสาร

แขวนลอยเซลล์ใน coating buffer มีค่าการดูดซับแสงเท่ากับ 0.1 เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดลองจำนวนอย่างน้อย 2 ซ้ำ เปรียบเทียบกับ normal antiserum และ healthy plant extract, coating buffer, positive control และ negative control นำมาหยอดลงในหลุม ELISA แล้วตรวจด้วย STPR15 As เจือจาง 1:1,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วยเทคนิค indirect ELISA (เพชรรัตน์ และ ประภาษ, 2544)

ประสิทธิภาพการตรวจติดตามเชื้อ *Streptomyces-PR15* รอบฉีกรากพืช

แช่เมล็ดพืชในน้ำอุ่น และพริกชี้ฟ้าพันธุ์ ซุปเปอร์ฮอต (Super hot) ในสารแขวนลอยเชื้อ *Streptomyces-PR15* ที่มีค่า OD เท่ากับ 60 เปรียบเทียบกับเมล็ดที่แช่ในน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง แล้วนำมาเพาะบนกระดาษเพาะ เมื่อต้นกล้าออก อายุ ได้ 14 วัน จึงนำส่วนของราก 0.5 กรัม มาใส่ในหลอด microcentrifuge tube เติมน้ำละลาย coating buffer 0.5 มิลลิลิตร และ Tween-20 จำนวน 1 หยด เขย่าบนเครื่อง vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 g นาน 3 นาที (ดัดแปลงตามวิธีของ Benizri et al., 1997) ดูดส่วนน้ำใสไปหยอดใน ELISA plate และตรวจหาเชื้อ *Streptomyces-PR15* ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรัม STPR15 As อัตรา 1:1,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทดสอบกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ใช้ coating buffer เป็นหลุมเปรียบเทียบ (blank) มีตัวอย่างเชื้อ *Streptomyces-PR15* positive control ที่มีเซลล์เชื้อ *Streptomyces-PR15* เท่ากับ 10^4 , 10^5 , 10^6 และ 10^7 cfu/ml ตามลำดับ ดำเนินการตามขั้นตอนของ indirect ELISA (เพชรรัตน์ และ ประภาษ, 2544) เปรียบเทียบกับวิธี serial dilution plating โดยดูดน้ำล้างราก 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ AGMA ที่เติมสาร 50 ppm benomyl กับ 50 ppm Ampicillin บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ตรวจ

นับประชากรเชื้อ *Streptomyces-PR15* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษา

คุณภาพของโพลิโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Streptomyces-PR15*

โปรแกรมการฉีดแอนติเจน เข้าในกระต่ายทดลอง ได้ผลดีในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายทดลอง โดยเลือดที่เก็บในสัปดาห์แรกเมื่อสิ้นสุดโปรแกรม immunization มีค่า titer 1:10,000 สัปดาห์ที่ 2 เพิ่มขึ้นเป็น 1:40,000 สัปดาห์ที่ 3- 5 เพิ่มขึ้นเป็น 1:80,000 สัปดาห์ที่ 6 เพิ่มขึ้นเป็น 1:100,000 สัปดาห์ที่ 7 เพิ่มขึ้นเป็น 1:200,000 และสัปดาห์ที่ 8 ลดลงเป็น 1: 80,000 เมื่อใช้โปรตีนจากเซลล์เชื้อ *Streptomyces-PR15* ในอัตรา 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า titer เพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งหลังจากการฉีดแอนติเจนกระตุ้นครั้งที่สอง คือ สัปดาห์ที่ 9 เป็น 1:100,000 และมีค่าสูงที่สุดเป็น 1:200,000 ในสัปดาห์ที่ 10 (Figure 1)

คุณภาพของแอนติซีรัม STPR15As

STPR15As มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *Streptomyces-PR15* เมื่อเจือจาง STPR15As ด้วย conjugated buffer ที่ระดับ 1:1,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถตรวจหาเชื้อเป้าหมายได้ที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่ 0.312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ระดับเจือจาง 1:14,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจได้ที่ปริมาณโปรตีนเชื้อเป้าหมายได้ต่ำสุดที่ 0.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 2) STPR15As มีความจำเพาะกับเชื้อ *Streptomyces-PR15* และมีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาปานกลางกับเชื้อ *Streptomyces-PR87*, -PR84 และ-PR78 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Streptomyces-PR13*, -PR22, -PR33, *Bacillus* spp. แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่นำมาทดสอบ แบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบที่แยกได้จากผิวใบพืช ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก และ *Serratia marcescens* (Table1)

สรุปและวิจารณ์

คุณภาพของแอนติซีรัม STPR15As ที่ผลิตได้นี้มีค่า titer สูงสุดถึง 1:200,000 ในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งสูงกว่า STPR78 As และ STPR84 As ที่มีค่า titer 1: 64,000 และ 32,000 (Sangdee et al., 2012) มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Streptomyces* -PR15 โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *Bacillus* spp. และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบพืช จากดิน ปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก มีความไวในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายดีเพียงพอสำหรับนำไปใช้ตรวจหาเชื้อ *Streptomyces*-PR15 รอบผิวรากพืชและในชีวภัณฑ์ได้ ถึงแม้ว่าจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Streptomyces*-PR84,-PR78 และ-PR87 ได้ปานกลาง ซึ่งผลการตรวจด้วย ELISA สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณที่เกิดขึ้นได้ การที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่ใกล้ชิดกันนี้ได้เป็นเหตุการณ์ปกติสำหรับโพลีโคลนอลแอนติซีรัมเนื่องจากอาจมีบางส่วนของโปรตีนจากเซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกัน จึงทำให้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถเข้าจับรวมกันได้ ในการนำไปใช้ตรวจหาเชื้อ *Streptomyces*-PR15 ที่เป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์แล้วสามารถเจือจางแอนติซีรัม STPR15As ได้ที่ระดับ 1:14,000 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แต่ในกรณีที่ต้องตรวจหาเชื้อรอบผิวรากพืชควรใช้ในอัตราส่วน 1:1,000 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเตรียมน้ำล้างรากพืชในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากผลการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อ *Streptomyces*-PR15 รอบผิวรากต้นกล้าพริกโดยเทคนิค indirect ELISA มีความไวในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายดีกว่าการใช้เทคนิคการแยกเชื้อบนอาหารทดสอบ

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยตามโครงการบัณฑิตศึกษา ร่วมกับมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยในโครงการบ่มเพาะนักวิจัยเพื่อให้อำนาจผลงาน

วิจัยในระดับนานาชาติ ประจำปี 2553 (ครั้งที่ 2) และขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้อนุญาตให้เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. *Streptomyces* อีกมิติ หนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. แกนเกษตร 30: 20-27.
- เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และประภาส กาวีชา. 2544. การตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค ELISA. ใน: รายงานการสัมมนาวิชาการเกษตร 26-27 มกราคม 2544. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- เมธาวี ธิมาศ, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัสนี ปาจิโนบุรวรรณ์. 2550. ความคงตัวและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในแนวกว้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ปฏิบัติ. ใน: รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8 20-22 พฤศจิกายน 2550. โรงแรมอัมรินทร์ลากูน, พิษณุโลก.
- Ball, E.M., R.O. Hampton, S.H. De Boer and N.W. Schaad. 1990. Polyclonal antibodies. P. 33-54. In: R.O. Hampton, E.M. Ball, S.H. and De Boer (eds). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, a Laboratory Manual, APS Press. St. Paul Minnesota.
- Benizri, E., A. Schoeny, C. Picard, A. Courtade and A. Guckert. 1997. External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: Enumeration by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). J. Current Microbiol. 34: 297-302.
- Dhingra, O.D., and J.B. Sinclair. 1995. Basic Plant Pathology Methods (Second Ed.). CRC Press Lewis Publishes, Florida.
- Kirby, R. and E.P. Rybicki. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a means of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. J. Gen. Microbiol. 132: 1891-1894.
- Sangdee, K., P. Thummabenjapone and A. Sangdee. 2012. Evaluation of Antigen Preparation Methods for Polyclonal Antibody Production against *Streptomyces* spp. J. British Microbiol. Res. 2: 137-145.