การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้ม

Development of Lateral immunoassay for tristeza disease in citrus spp.

แสนชัย คำหล้า และ กาญจนา วาระวิชะนี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Citrus tristeza disease is an important infectious disease of Citrus spp. caused by *Citrus tristeza virus* (CTV) belonging to *Clostervirus*. This disease can be found all citrus groves in Thailand. CTV can transmit via plant propagation material and aphids as its vector. Several methods were invented and developed based on biological properties, immonological and nucleic molecules. Strip test is a type of Lateral Flow Immunnoassay (LFIA) that was based on immunology together with the advancement in nanoparticle and membrane development. This research use polyclonal antibody procduced from recombinant CTV-coat protein as detector antibody. Lime infected CTV samples were tested and shown best on CN140 nitrocellulose as analytical membran while use standard 14 as conjugate release membrane. Stript test is the perk for detection outdoor envonments.

Keywords: Citrus tristeza, Citrus disease, Lateral flow immunoassay, LFIA, CTV

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โรคทริสเทซ่า (Citrus tristeza disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) จัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* พบระบาดได้ทั่วไปในสวนพืชตระกูลส้มของประเทศไทย เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดได้การติดตา ทาบกิ่ง เสียบยอด และมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ การตรวจสอบเชื้อไวรัสสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การอาศัยคุณสมบัติทางชีววิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และสารพันธุกรรม การใช้ชุดตรวจ

(strip test) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งของ Lateral Flow Immunoassay (LFIA) โดยอาศัยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา การทดลองนี้ใช้โพลีโคนอลแอนติบอดีซึ่งผลิตโดยใช้รีคอมบิแนนท์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเป็นแอนติเจน เมื่อนำมาตรวจตัวอย่างมะนาวเป็นโรคไวรัสทริสเทซ่าพบว่าชุดตรวจที่ใช้แผ่นเมมเบรน CN140 เป็นเมมเบรนสำหรัสเส้นทดสอบ (test line) และเส้นควบคุม (control line) ร่วมกับการใช้เมมเบรน standard 14 เป็น conjugate realse pad ให้ผลการตรวจดีที่สุด การพัฒนาชุดตรวจทำให้ตรวจได้รวดเร็วและสะดวกสำหรับการนำไปตรวจในสภาพแปลง

คำหลัก: โรคทริสเทซ่า, ชุดตรวจไวรัสโรคส้ม, ไวรัสส้ม

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-10-61

คำนำ

โรคทริสเทซ่า (Tristeza disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ เกรฟฟรุต มะนาว เลมอน เป็นต้น เกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2515 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรี, 2534) เชื้อไวรัสสาเหตุโรคจัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* วงศ์ *Closteroviridae* จัดเป็นไวรัสขนาดใหญ่ที่สุดที่เข้าทำลายพืชมีลักษณะอนุภาคยาวคล้ายเส้นด้าย (thread-liked particle) ขนาดอนุภาค 11 x 2,000 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก (plus single strand RNA, อยู่หนาแน่นเฉพาะภายในระบบลำเลียงของพืชโดยเฉพาะท่ออาหารของพืช (phloem) ในปัจจุบันมีเชื้อไวรัส CTV ประมาณ 67 ชนิด ที่ได้รับการหาลำดับเบสทั้งจีโนมรวมถึงในประเทศไทย (กีรติ, 2554)

ลักษณะอาการของโรคมีอาการใบเหลืองซีดคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ใบมีขนาดเล็ก หนาผิดปกติ ขอบใบม้วนเข้า ในใบอ่อนเส้นใบจะแสดงอาการเป็นขีดโปร่งแสง (vein clearing) ส่วนใบแก่เส้นใบจะนูนแข็งและแตก ต้นที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการแคระแกร็น ให้ผลผลิตต่ำและตายไปใน การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสามารถเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ การติดไปกับกิ่งพันธุ์ซึ่งได้มาจากต้นแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส การติดตาทาบกิ่งจากการใช้ตาที่ไม่ปลอดโรค และการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน มีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricida*), เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*), เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Toxoptera aurantii)* และเพลี้ยอ่อนผัก (*Apis spiraecola*) วิธีการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุ โดยการใช้พืชทดสอบ การติดตา ทาบกิ่ง อาการบนพืชทดสอบเริ่มปรากฏหลังการถ่ายทอดโรคแล้วอย่างน้อย 1-2 เดือน หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค RT-PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบตาหรือกิ่งพันธุ์ส้มเป็นจำนวนมาก สำหรับเทคนิคทางซีรัมวิทยา เช่น เทคนิค ELISA เป็นวิธีการที่

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิค PCR แต่ต้องอาศัยเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่อง Microplate reader และสารเคมีต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ -20 องศาเซลเซียส ถึง 4 องศาเซลเซียส เช่น แอนติบอดี, substrate (p-nitrophenyl phosphate) หรือสารบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เช่น Coating buffer, Assay buffer, Washing buffer ในการตรวจสอบต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ไม่สามารถนำไปใช้งานในแปลงปลูกพืชได้ ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาชุดตรวจแบบ strip test แบบ Lateral Flow immunoassay (ยุพา, 2556) ซึ่งอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ ELISA แต่เปลี่ยนตัวกลางเป็นเมมเบรนชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำให้สะดวกในการเคลื่นย้ายหรือเก็บรักษา สามารถทำไปใช้งานในภาคสนามได้และให้ผลการตรวจรวดเร็วภายในเวลา 5 – 15 นาที

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. โปรตีนลูกผสมโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Citrus tristeza virus*
3. สัตว์ทดลองกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit)
4. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - เข็มเบอร์ 21 และกระบอกฉีดยา (Syringe)
   - โกร่งบดตัวอย่าง
   - วัสดุที่ใช้ประชุดตรวจสอบ Immuno Strip เช่น nitrocellulose membrane AE99 (NCM, AE99) sample pad, conjugate pad, absorption pad, backing pad
   - ปากกาหมึกซึม, พู่กัน, ไม้บรรทัด
   - หลอดไมโครทิวป์ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
   - ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
   - เครื่องชั่งละเอียด
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
   - เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
   - เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Scientific Multiskan GO, Finland)
5. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)
   - Potassium carbonate (K_2CO_3)
   - Freund's incomplete adjuvant
   - Complete Freund's adjuvant
   - Goat anti-rabbit IgG
   - สารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold)

ศูนย์วิทยการเกษตร

วิธีการ

1. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV ในสัตว์ทดลอง (as-CTV)

ทำการเก็บซีรั่มปกติ (Normal serum, Ns) จากกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) อายุประมาณ 5 เดือน เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมก่อนการฉีดแอนติเจน หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารละลายโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ซึ่งใช้เป็นแอนติเจน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวนรวม 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยผสมแอนติเจนกับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันจนเป็นสารแขวนลอย (emulsion) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection, IM) ปริมาตร 1 มล หลังจากนั้นทำการฉีดกระตุ้น อีก 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ โดยผสมสารละลายโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV กับ Freund's incomplete adjuvant อัตรา 1:1 ส่วน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใบหู 14 วัน เพื่อแยกเก็บซีรั่มหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย 20 วัน (Nurhadi *et al.*, 2003; รัชนี, 2558)

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของเชื้อไวรัส CTV

ใช้ as-CTV ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 5 นาที เพื่อขจัดตะกอนโปรตีนที่อาจปะปนอยู่ในซีรัมแล้วละลายตะกอน (pellet) ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (dH_2O) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ลงไปให้สารละลายมีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร จนมีตะกอนสีขาวขุ่นเกิดขึ้น แล้วนำสารละลายไปกวนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเข้ากันดีแล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน CTV-IgG ที่ความเร็ว 10,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วย ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ปริมาตร 300 – 500 ไมโครลิตร (0.3 – 0.5 เท่าของปริมาตรแอนตีซีรัมที่ใช้เริ่มต้น) จากนั้นนำสารละลายไปกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ด้วยวิธีการไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ (½ Phosphate buffer saline pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ (CTV-IgG) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง µDrop™ Plate (Thermo scientific, USA) เพื่อหาความเข้มข้นของ crude CTV-IgG ที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง (สุรภี และคณะ, 2551; Ching, 2015)

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การเชื่อมต่อ CTV-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

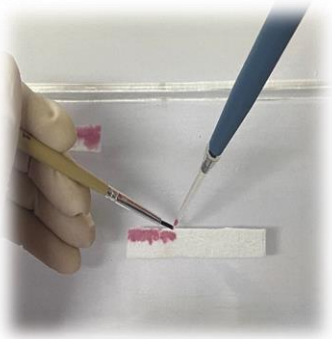
ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอนุภาคทอง colloidal gold (Denovation, USA) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วย 0.2M K_2CO_3 ให้ค่าเอชอยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 โดยใช้กระดาษลิตมัส (PH Test Strip) จากนั้นเตรียมสารละลาย IgG ให้มีความเข้มตั้งแต่ 5 – 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย IgG แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายอนุภาคทองที่ได้ปรับค่าพีเอชเรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปกวนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการเติมสารละลาย 10% NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง และเลือกหลอดทดลองที่ใช้ความเข้มข้น IgG ต่ำสุด ที่สารละลายอนุภาคทองยังคงมีสีออกชมพู (pinkish) และไม่มีการตกตะกอนของอนุภาคทอง จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 523 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermal Scientific Go, Finland) ทำการเชื่อม asCTV-IgG กับอนุภาคทอง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอนุภาคทองปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากขวดสต็อค ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 และเติม asCTV-IgG ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอนแล้วผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% Bovine serum Albumin (1% BSA) แล้วทำการกวนสารละลายต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายใส่ลงในไมโครทิวป์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 1%BSA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ จากนั้นละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 0.25% BSA, 2% Nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้สารละลายอนุภาคทองที่มี acCTV-IgG เชื่อมติดอยู่ สำหรับใช้ในขั้นตอนการทำชุดตรวจในขั้นตอนถัดไป (Ching, 2015)

3 การผลิตชุดตรวจแบบ Strip Test

3.1 การเตรียมแผ่น Conjugated Release Pad (CRP)

ตัดแผ่นเมมเบรน conjugated release pad 3 ชนิด Standard 14, Standard 17, และ Fusion5 (Cytiva, USA) ให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน ใช้พู่กันระบายสารละลายอนุภาคทองที่เชื่อมกับ asCTV-IgG (colloidal gold conjugated-asCTV-IgG) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร (ภาพที่ 1) หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่บรรจุสารดูดซับความชื้น (silica gel) (Ching, 2015) เพื่อกันความชื้นในระหว่างรอประกอบชุดตรวจ (strip test)

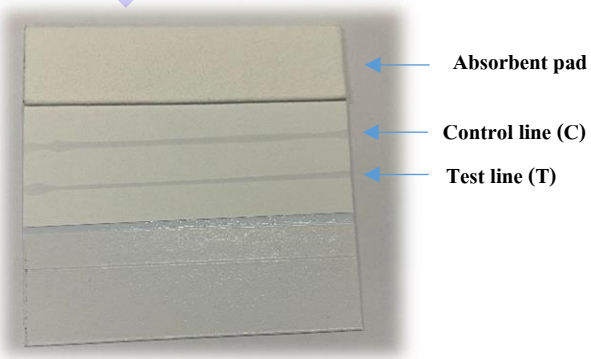
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ระบายสารละลาย asCTV-IgG-Gold conjugated บนเมมเบรน conjugated release pad

3.2 การทดสอบชนิดแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสสำหรับชุดตรวจ

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ชนิด AE99 และ CN140 (Sartorius, USA) ให้มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน ทำการขีดเส้นควบคุม (control line, c) ด้วยปากกาหมึกซึม (fountain pen) โดยใช้ส่วนปลายปากกาจุ่มลงในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย (GAR-IgG, Merk, USA) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปากกาแตะลงบนเมมเบรนเบาๆ แล้วขีดลากเส้นให้ห่างจากขอบด้านบนของแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 เซนติเมตร และระวังไม่ให้เส้นที่ขีดขาด หรือหนามากเกินไป ควรให้มีความสม่ำเสมอตลอดทั้งแนวเส้น สำหรับเส้นตรวจ (test line, t) ทำเช่นเดียวกับเส้นควบคุมแต่ใช้สารละลาย as-CTV แทน และมีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยตำแหน่งอยู่ถัดจากเส้นควบคุมทางด้านแผ่น conjugated release pad ประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) จากนั้นพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำแผ่นเมมเบรนเข้าอบในตู้บ่ม (force air drying oven) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่บรรจุสารดูดซับความชื้น (silica gel) เพื่อกันความชื้นในระหว่างรอประกอบชุดตรวจ (strip test)

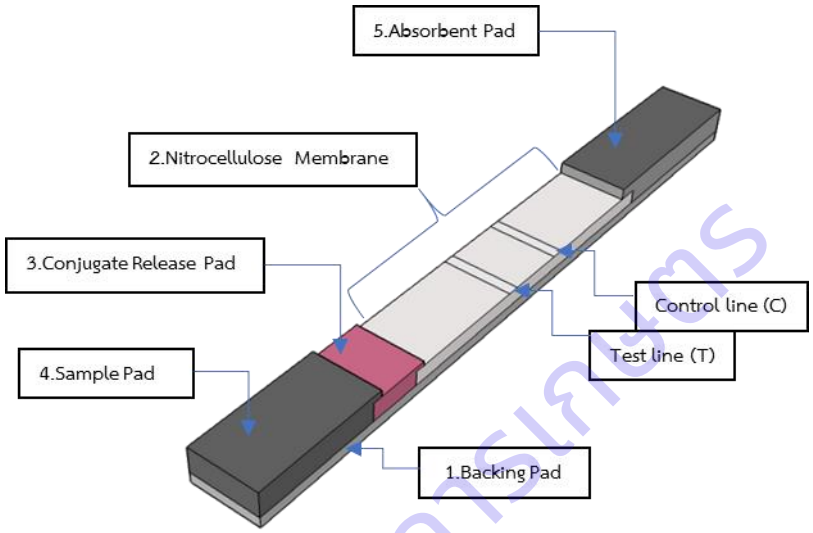


ภาพที่ 2 การเตรียมเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C)

กรมวิชาการเกษตร

3.3 การประกอบชุดตรวจ (Strip Test)

การประกอบชุดตรวจโดยวางแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ลงบนแผ่นพลาสติก Backing card แล้ววางแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อมาวางแผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช Sample Pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ประมาณ 2 มิลลิเมตร และวางแผ่น Absorbent sink ทางด้านปลายของชุดตรวจโดยให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3) เมื่อประกอบเสร็จแล้วทำการตัดชุดตรวจสอบให้มีขนาดประมาณ 0.4 x 6 เซนติเมตร บรรจุชิ้น Strip Tests ลงในตลับพลาสติก (Ching, 2015)



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA) แบบ Strip Test

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือน ตุลาคม 2561 สิ้นสุดเดือน ตุลาคม 2563

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV ในสัตว์ทดลอง (as-CTV)

ฉีดแอนติเจน (CTV recombinant coat protein) เข้ากล้ามเนื้อกระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) จำนวน 4 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 3 ครั้งได้ปริมาตรน้ำเลือด รวม 30 มิลลิลิตร แยกเก็บแอนติซีรัมได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions อัตราตั้งแต่ 1:128 - 1:131,072 เท่า เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร มีค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่ระดับประมาณ 500 - 4,000 เท่า ทั้งนี้ ค่าความเจือจางของแอนติซีรัมเชื้อไวรัส CTV สำหรับใช้ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA อัตราประมาณ 1: 1024 เท่า ให้ค่าดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร เท่ากับ 3.651

2. การผลิตชุดตรวจสอบ (Strip test)

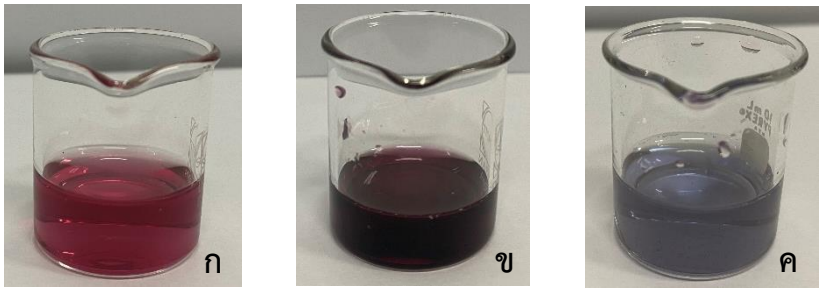
2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของเชื้อไวรัส CTV

สกัด Immunoglobulin G (IgG) จากแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัส CTV สาเหตุโรคทริสเทซา จำนวน 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟสอิ่มตัว ได้ crude CTV-IgG ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบประสิทธิภาพ crude CTV-IgG ด้วยวิธี Indirect ELISA ค่าไตเตอร์ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ug/ml เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร อ่านผลที่ 30 นาที สามารถเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองและแสดงค่า O.D.405 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ และพบว่าความเข้มข้นที่ตั้งแต่ 50 ug/ml มีค่า O.D.405 ได้สูง (> 3.0) เมื่อเทียบกับค่า O.D.405 ของพืชปกติ (0.74) เมื่ออ่านผลที่ 60 นาที จากผลทดสอบเลือกค่าเจือจาง crude CTV-IgG ที่ความเข้มข้น 50 ug/ml สำหรับใช้เป็นความเข้มข้นสำหรับติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold)

2.2 การเชื่อม CTV-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

การเชื่อม CTV-IgG เข้ากับอนุภาคทอง มีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ทำให้ IgG เข้าจับกับอนุภาคทองโดยปกติจะค่าใกล้เคียงกับค่า Isoelectric point (PI) ของ IgG ซึ่งเป็นค่าที่ประจุรวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์ และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณ IgG ที่เติมลงในสารละลายอนุทองแล้วไม่ทำให้เกิดการตกตะกอน สำหรับการทดลองนี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude CTV-IgG เพื่อเชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร พบว่า crude CTV-IgG ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารละลายอนุภาคทองยังมีสีออกชมพูออกม่วงเล็กน้อย (pinkish) ไม่เกิดการตกตะกอน (ภาพที่ 4) ซึ่งสารละลายแขวนลอยของทองที่ถูกเชื่อมด้วย 30 ug/ml ของ crude CTV-IgG แล้วมีค่า O.D.523 เท่ากับ 0.428 สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการเตรียมแผ่น conjugate release pad (CPR) ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นวัสดุกักเก็บรักษาและปลดปล่อย detector antibody

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4 ลักษณะทางกายภาพสารละลายอนุภาคทองก่อนและหลังเติมสารละลาย crude CTV-IgG

ก : สารละลายอนุภาคทองที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 100 นาโนเมตร มีสีออกแดง

ข : หลังเติม crude CTV-IgG (30 ug/ml) อนุภาคทองเปลี่ยนสีออกแดง-ม่วง

ค : หลังเติม crude CTV-IgG (>40 ug/ml) อนุภาคทองเปลี่ยนสีฟ้า-เทาและตกตะกอน

3 การผลิตชุดตรวจ (Strip Test)

ในการประกอบเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปมีอุปกรณ์ ดังนี้ 1. แผ่นพลาสติกรองรับ (backing card) 2. แผ่นเมมเบรน (analytical membrane) สำหรับเส้นตรวจ (control line) และเส้นควบคุม (control line) 3. แผ่นเมมเบรนรองรับตัวอย่าง (sample pad) 4. แผ่นเมมเบรนสำหรับกักเก็บรักษาและปลดปล่อย detector antibody (conjugate release pad) 5. แผ่นเมมเบรนสำหรับดูดซับสารละลายตัวอย่าง (absorbent sink) 6. กรอบพลาสติก (cassettes) สำหรับเตรียม conjugate release pad ใช้กระดาษเมมเบรน 3 ชนิด คือ Standard 14, Standard 17, และ Fusion5 (Cytiva, USA) (ตารางที่ 1) พบว่ากระดาษเมมเบรน Standard 14 มีความเหมาะสามารถดูดซับและปล่อยสารละลายอนุภาคทองที่เชื่อมกับ asCTV-IgG (colloidal gold conjugated-asCTV-IgG) ได้ดี เลือกใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) 3 ชนิด คือ AE98, AE100 (Cytiva, USA) และ CN140 (Sartorius, USA) สำหรับเตรียมเส้น test line และ control line (analytical membrane) จากการทดสอบประสิทธิภาพและความไว (sensitivity) ของชุดตรวจโดยใช้ตัวอย่างมะนาวเป็นโรคไวรัส CTV (ภาพที่ 5) พบว่าเมมเบรนชนิด CN140 แสดงผลปฏิกิริยาได้ชัดเจนทั้งในส่วนของเส้น test line และ control ดีกว่าแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE98 และ AE100 ผลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นประมาณ 5-15 นาที (ภาพที่ 6)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติเมมเบรน (Conjugate Release Pad) จำนวน 3 ชนิด

ชนิด CRD	ความหนา um@53kPA	อัตราน้ำเคลื่อนที่ผ่าน (s/4cm)	อัตราน้ำถูกดูดซับ (mg/cm)	อัตราการปลดปล่อย GC-IgG (after 90 s)
Standard 14	355	23.1	50.9	75
Standard 17	370	34.5	44.9	75
Fusion5	370	43.9	42.3	>94

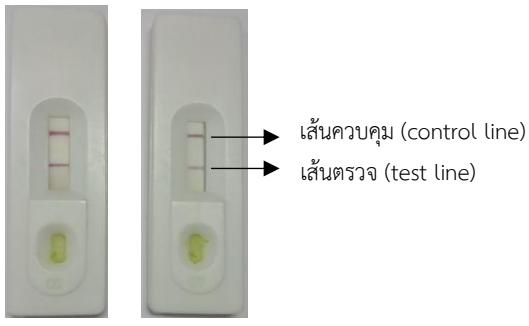
ที่มา : Cytiva, USA

ภาพที่ 5 ตัวอย่างมะนาวเป็นโรคไวรัสทริสเทซ่า

(ก) ใบมะนาวแสดงอาการตามแนวเส้นใบมีลักษณะสีซีดจาง

(ข) เส้นกลางใบมะนาวสำหรับนำไปตรวจด้วยชุดตรวจ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 6 แสดงการตรวจโรคไวรัส CTV จากตัวอย่างมะนาว

(ก) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (analytical membrane) ชนิด CN140

(ข) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (analytical membrane) ชนิด AE98

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้มแบบชุดตรวจ (strip test) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่า (*Citrus tirsteza virus*) เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) และแยกเก็บแอนติซีรัมได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร เมื่อนำไปตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่ามีค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่ระดับประมาณ 500 - 4,000 เท่า และค่าความเจือจางของแอนติซีรัมเชื้อไวรัส CTV ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เท่ากับ 1: 1024 มีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude CTV-IgG เพื่อเชื่อมเข้ากับอนุภาคทองเท่ากับ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าการใช้ standard 14 เป็น conjugate release ร่วมกับเมมเบรนชนิด CN140 (analytical memebrane) แสดงผลปฏิกิริยาได้ชัดเจน ดีกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE98 และ AE100 และผลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นประมาณ 5-15 นาที สำหรับการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าแบบ strip test ช่วยให้การตรวจสอบทำได้รวดเร็ว สะดวกโดยเฉพาะกับการนำไปตรวจในสภาพแปลง

เอกสารอ้างอิง

กีรติ สินธวาชีวะ. 2554. จีโนมเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในประเทศไทยและการตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในวัชพืชโดยใช้เทคนิค RT-PCR และ Dot Blot Hybridization. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารวิชาการเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.

รัชนี ฮงประยูร. 2558. เทคนิคทางซีรัมวิทยาในการวินิจฉัยโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: เพชรเกษมพริ้นติ้งกรุ๊ป จำกัด. 88 น.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพานิชย์. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

ยุพา โพธิ์แก้ว. 2556. การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Ching H. K. 2015. Lateral Flow Immunoassay. p. 127-137. In: Hnasko R. (eds.), ELISA Methods and Protocols. Human Press, New York, USA.

กรมวิชาการเกษตร

Nurhadi Nurhadi, Kamaruzaman Sijam, Inon Sulaiman.2003. Production of polyclonal antibody to the coat protein of Citrus tristeza virus in chicken eggs. Indonesian Jouranal od Agricultural Science 4(1) : 18 -26.

กรมวิชาการเกษตร