ผลิตชุดตรวจสอบ(Strip Test) จากแอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

Development of strip test based on antibody of SecA recombinant protein against Sugar cane white leaf phytoplasma

กาญจนา วาระวิชะนี แสนชัย คำหล้า

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล ภูวนารถ มณีโชติ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

SecA-SWL Kit was developed to detect phytoplasma causal agent of sugarcane white leaf disease. Lateral Flow Immunoassay (LFIA) technique based on serology and sample flow along nitrocellulose membrane. A polyclonal antibody was obtained from partial SecA recombinant protein of sugarcane white leaf injecting into intramuscular of New Zealand white rabbit. Sera were collected and immunoglobulin G (IgG) of SecA-IgG was extracted with saturated ammonium sulfate yielded 3.0 ug/ul (A280). Detecting antibody labelling with colloidal gold at pH 7.3 and SecA-IgG concentration was 30 ug/ul without precipitation of colloidal gold. Strip kit tested against normal sugarcane and sugarcane white leaf samples. Only control line was appeared in red color and there is no signal on test line.

Keywords: White leaf, Phytoplasma, Lateral flow immunoassay, LFIA

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งของ Lateral Flow Immunoassay (LFIA) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและการเคลื่อนย้ายของสารละลายบนแผ่น nitrocellulose membrane (lateral flow technique) โพลีโคนอลแอนติบอดีผลิตจากโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยใช้เป็นแอนติเจนเพื่อฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายสีขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เมื่อเก็บแอนติซีรัมนำมาสกัด SecA-IgG ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ($(NH_4)_2SO_4$) วัดค่า OD280 ได้ความเข้มข้น crude SecA-IgG เท่ากับ 3.0 mg/ml เมื่อเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold) ด้วยค่า pH 7.3 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 30 ug/ul ของ SecA-IgG สารละลายอนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอน ทำการเตรียมอุปกรณ์เพื่อประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test) สำเร็จรูป และทดสอบคุณภาพกับน้ำคั้นใบพืชจากต้นที่เปนโรคใบขาว พบวา ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit ที่พัฒนาขึ้นเป็นต้นแบบ (Prototype) ครั้งนี้ แสดงผลปฏิกิริยาเฉพาะเส้นควบคุม (control line, C) เท่านั้น แต่ไม่สามารถแสดงผลปฏิกิริยาการตรวจสอบบนเส้นตรวจ (test line, T)

คำหลัก : โรคใบขาว, ชุดตรวจโรคใบขาว, ไฟโตพลาสมา

รหัสการทดลอง **03-31-60-01-02-00-09-61**

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ปัญหาการระบาดของโรคใบขาวอ้อยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยในภาพรวมของประเทศอย่างมากตั้งแต่ปี 2495 จนถึงปัจจุบัน คิดพื้นที่ความเสียหายกว่า 200,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายกว่า 1,000 ล้านบาท และถือเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพของผลผลิตอ้อยลดลงและเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรสูงขึ้นจากการรื้อแปลงเดิมทิ้งเพื่อปลูกใหม่ เชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวสามารถติดไปได้กับส่วนขยายพันธุ์หากเกษตรกรนำไปปลูกจึงเป็นการแพร่กระจายโรคในพื้นที่นั้นๆ และพื้นที่ใกล้เคียงได้อย่างดีเนื่องจากมีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลช่วยถ่ายทอดโรค รวมทั้งปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหาโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ในขณะนี้มีการควบคุมการแพร่ระบาดเน้นการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการแปลงที่ดีและเฝ้าระวังแมลงพาหะ ทั้งนี้ ระหว่างกระบวนการผลิตพืชปลอดโรคค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลาค่อนข้างนาน และค่าใช้จ่ายสูง แต่คุ้มค่าต่อการลงทุน ดังนั้น ก่อนผลิตพืชปลอดโรคควรมีวิธีตรวจสอบพืชเริ่มต้นว่าปลอดเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาสามารถตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุได้ถึงระดับยีนและให้ผลการตรวจแม่นยำ แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของเทคนิคนี้มีอยู่หลายประการ เช่น ผู้ปฏิบัติต้องมีความเชี่ยวชาญ ต้นทุนการตรวจสอบ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้จำเฉพาะ เป็นต้น ดังนั้น จึงนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุดังกล่าว ข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่ไม่มีความซับซ้อนในการปฏิบัติงานเท่าเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา สามารถตรวจตัวอย่างต่อครั้งได้จำนวนมากและยังคงให้ผลการตรวจค่อนข้างแม่นยำ Shen and Lin (1993) หลักการของเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาอาศัยความจำเพาะระหว่างโปรตีนโครงสร้างของเชื้อสาเหตุต่อแอนติซีรั่มของเชื้อสาเหตุชนิดนั้น ๆ เทคนิคที่นิยม คือ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) แต่เซลล์เชื้อไฟโตพลาสมาเองมีข้อจำกัดในเรื่องการแยกสกัดหากได้แอนติเจนที่ไม่บริสุทธิ์จะส่งผลให้แอนติบอดีที่ผลิตคุณภาพไม่ดี เมื่อนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ได้ ทั้งนี้ จากรายงานของ Kakizawa *et. al.* (2001) สังเคราะห์ SecA protein ของเชื้อ Onion yellow phytoplasma จากการ expression protein โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แก้ปัญหาเรื่องการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีได้

จึงเป็นที่มาของงานวิจัยทำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม SecA (SecA recombinant protein) จาก *secA gene* โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปแบบ strip test แบบ Lateral Flow immunoassay โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ ELISA สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้ง่ายในทางปฏิบัติแสดงการตรวจสอบได้รวดเร็วภายในเวลา 5 – 20 นาที รวมทั้งไม่จำกัดกลุ่มผู้ใช้ โดยเฉพาะเกษตรกร บริษัทเอกชน รวมถึงนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. โปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein สาเหตุโรคใบขาวอ้อย
3. สัตว์ทดลองกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit)
4. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - เข็มฉีดยาเบอร์ 21
   - กระบอกฉีดยาปริมาตร 1 ไมโครลิตร
   - วัสดุประกอบชุดตรวจสอบ Immuno Strip ได้แก่ nitrocellulose membrane (NCM), sample pad, conjugated release pad (CRP), absorption pad, backing pad
   - วัสดุประกอบเส้นตรวจสอบ ได้แก่ ปากกาหมึกซึม 0.5-0.7 มิลลิเมตร, พู่กันเบอร์ 1,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
   - Freund’s incomplete adjuvant
   - Complete Freund’s adjuvant
   - Goat anti-rabbit IgG
   - สารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold)
   - Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)
   - Potassium carbonate (K_2CO_3)

ศรีวิชาการเกษตร

วิธีการ

1. การผลิตแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของยีน SecA (partial SecA recombinant protein)

ทำการผลิตโพลีโคนอลแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในสัตว์ทดลองกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) อายุประมาณ 3 เดือน ทำการเก็บซีรั่มปกติ (Normal serum, Ns) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารละลายโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันจนเป็นสารแขวนลอย (emulsion) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection, IM) หลังจากนั้นทำการฉีดกระตุ้น อีก 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ โดยผสมสารละลาย partial SecA recombinant protein กับ Freund's incomplete adjuvant อัตรา 1:1 ส่วน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใบหูหลังฉัดแล้ว 20 วัน แล้วนำมาแยกเก็บแอนติซีรั่ม (Nurhadi *et al.*, 2003; รัชนี, 2558)

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของ SecA-IgG ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ($(NH_4)_2SO_4$) นำแอนติซีรั่มปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 5 นาที เพื่อขจัดตะกอนโปรตีนอื่นๆที่อาจปะปนอยู่ในซีรัม ทำการละลายตะกอน (pellet) ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (dH_2O) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ละหยดจนพบตะกอนสีขาวขุ่นเกิดขึ้นและเติมให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน SecA-IgG ที่ความเร็ว 10,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย ½ Phosphate buffer saline, pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง µDrop™ Plate (Thermo scientific, USA) เพื่อหาความเข้มข้นของ crude SecA-IgG ที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง (สุรภี และคณะ, 2551; Ching, 2015)

2.2 การเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold, Denovation, USA) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายอนุภาคทองปริมาตร 1 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 และเติม SecA-IgG ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอนแล้วผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% Bovine serum Albumin (1% BSA) แล้วทำการกวนสารละลายต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที จากนั้นละลายตะกอน Gold conjugated SecA-IgG ด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 1%BSA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที และละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 0.25% BSA, 0.02% Sucrose ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (Ching, 2015)

3 การประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test)

กรมวิชาการเกษตร

3.1 การเตรียมแผ่น Conjugated Release Pad (CRP) ตัดแผ่นเมมเบรน conjugated release pad ให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน ใช้สารละลาย Gold conjugated SecA-IgG ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ระบายลงบนแผ่น CRP ด้วยพู่กันเบอร์ 1 **(Fig 1)** นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่แห้ง

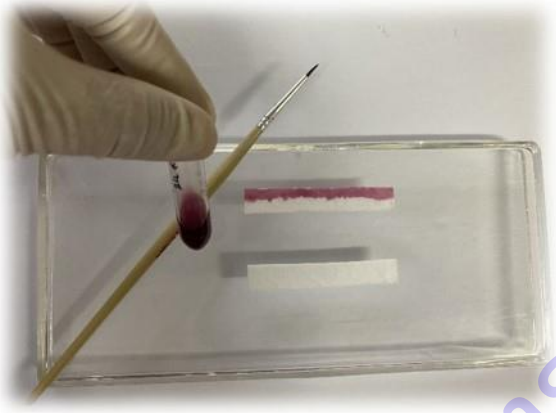


Fig 1 SecA-IgG labelling with colloidal gold was applied into conjugated release pad

3.2 การทำเส้น test line และ control line โดยตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ให้มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน โดยเป็นตำแหน่งเส้นควบคุม (control line, C) ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น NCM ประมาณ 1 เซนติเมตร และ เส้นตรวจ (test line, T) อยู่ถัดลงมาจากเส้นควบคุม (control line, C) ห่างกันที่ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้ส่วนปลายปากกาจุ่มลงในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย (GAR-IgG, Merk, USA) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลากเป็นแนวเส้นตรงด้วยไม้บรรทัด สำหรับเส้นตรวจ (test line, T) ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารละลาย SecA-IgG แทน ที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่แห้ง

3.3 การประกอบชุดตรวจ (Strip Test) วางแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose (NCM) ลงบนแผ่นพลาสติก Backing card แล้ววางแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อมาวางแผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (Sample application pad , SAP) ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad (CRP) ประมาณ 2 มิลลิเมตร และวางแผ่น Absorbent pad (AP) ทางด้านปลายของชุดตรวจโดยให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร **(Fig 2)** (Ching, 2015) บรรจุชุดตรวจลงตลับ และทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้นในครั้งนี้ด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างอ้อยเป็นโรคใบขาวอ้อย **(Fig 3)**

กรมวิชาการเกษตร

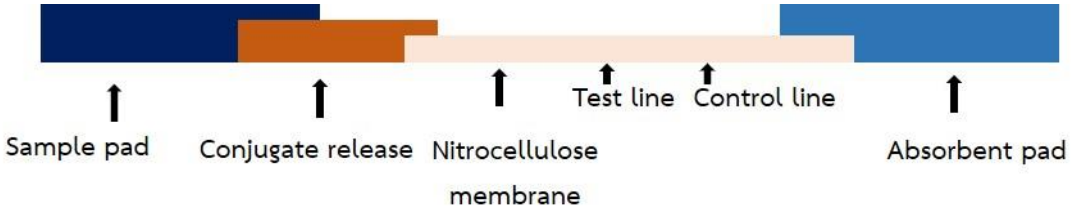
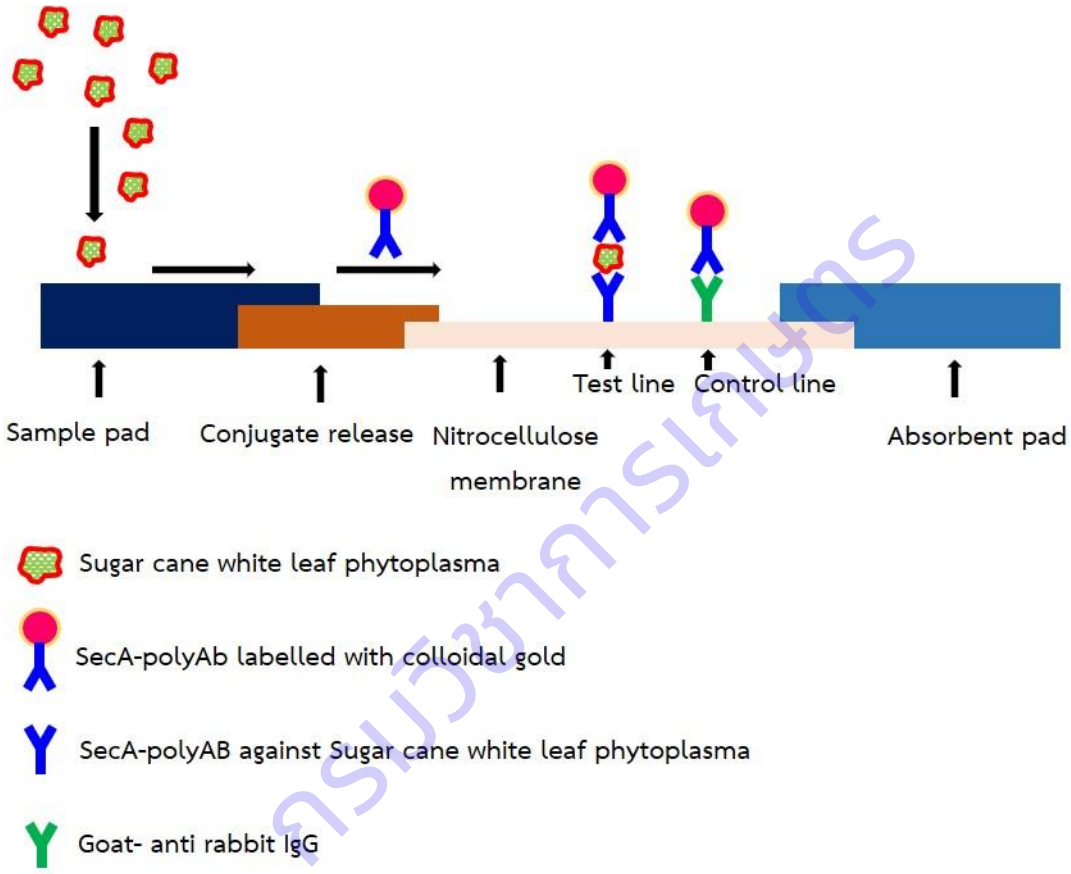


Fig 2. Schematic of a lateral flow immunoassay (Strip Test)



กรมวิชาการเกษตร

Fig 3 LFIA format, sample applied on sample pad and a labelled detector antibody flows through nitrocellulose membrane with immobilized antibody on test line and control line.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือน ตุลาคม 2561 สิ้นสุดเดือน ตุลาคม 2563

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของยีน SecA (partial SecA recombinant protein)

ฉีดสารละลายโปรตีนลูกผสมของ partial SecA ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) จำนวน 1 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 1 ครั้งได้ปริมาตรน้ำเลือด รวม 10 มิลลิลิตร แยกเก็บแอนติซีรัมได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions ด้วยวิธี Indirect ELISA เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร มีค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่ระดับประมาณ 500 - 1000 เท่า

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของ SecA-IgG ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ($(NH_4)_2SO_4$, saturated) วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง μDrop™ Plate (Thermo scientific, USA) ได้ความเข้มข้น crude SecA-IgG เท่ากับ 3.0 mg/ml

2.2 การเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold; Denovation, USA) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร โดยทำการปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับ IgG ให้มีค่าใกล้เคียงกับค่า Isoelectric point (PI) ของ IgG และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณ IgG ที่เติมลงในสารละลายอนุทองแล้วไม่ทำให้เกิดการตกตะกอน สำหรับการทดลองนี้ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.3 เมื่อวัดค่าด้วยกระดาษลิตมัสและความเข้มข้น 30 ug/ml เหมาะสมสำหรับใช้เชื่อมต่อกับ Colloidal Gold เพราะสารละลายอนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอน **(Fig 4)**

กรมวิทยาศาสตร์

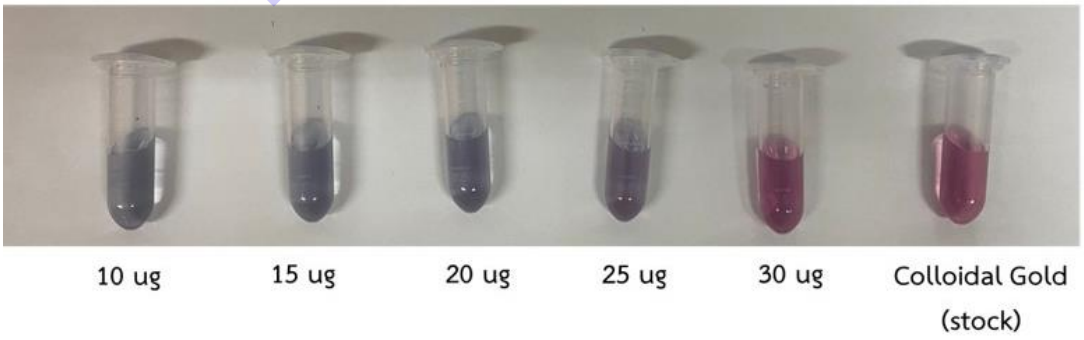
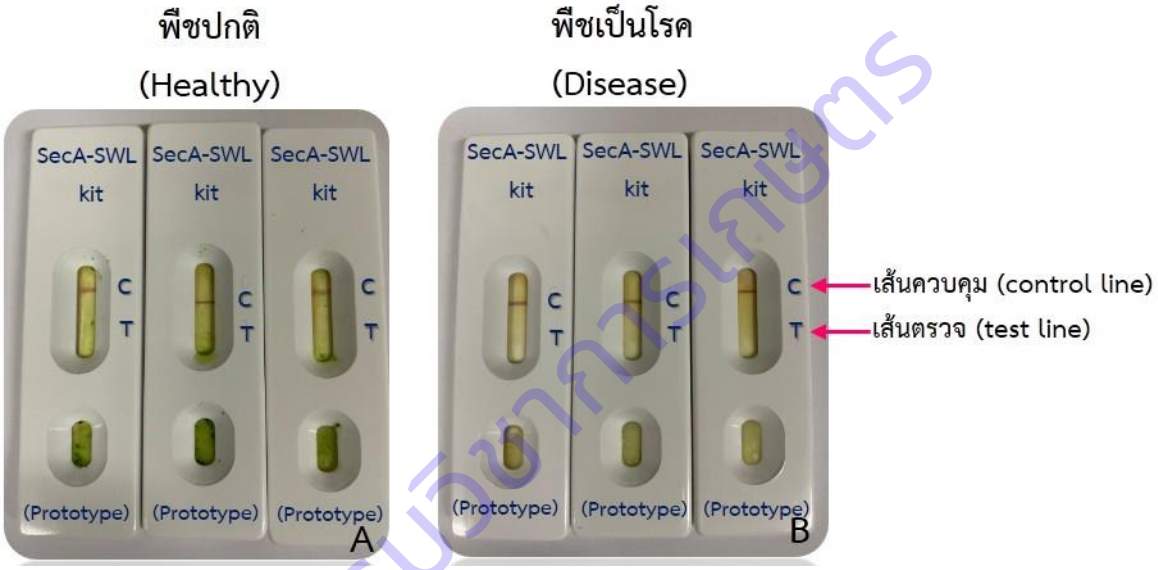


Fig 4 Colloidal gold participation affected from different amount of crude SecA-IgG, at 30 ug/ml without precipitation of colloidal gold

3 การประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test)

เตรียมอุปกรณ์ประกอบ ชุดตรวจสอบ (Strip Test) สำเร็จรูป ดังนี้ 1.แผ่นพลาสติกรองรับ (backing card) 2.แผ่น Conjugated Release Pad (CRP) ที่ถูกระบายด้วยสารละลาย Gold conjugated SecA-IgG ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร 3.แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ที่ถูกขีดด้วยเส้นควบคุม (control line, C) และเส้นตรวจ (test line, T) 4.แผ่นเมมเบรนรองรับตัวอย่าง (sample pad) 5. แผ่นเมมเบรนสำหรับดูดซับสารละลายตัวอย่าง (absorbent pad) ทำการประกอบชุดตรวจ (Strip Test) ตามวิธีการข้อ 3.3 และบรรจุชุดตรวจลงตลับพลาสติก เมื่อทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบ (Strip Test) สำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างอ้อยเป็นโรคใบขาวอ้อยและน้ำคั้นใบอ้อยปกติอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าแสดงผลเฉพาะเส้นควบคุม (control line, C) ได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 5-10 นาที แต่ไม่สามารถแสดงผลของเส้นตรวจ (test line, T) **(Fig 5)**



กรมวิชาการเกษตร

Fig. 5 Sugarcane white leaf disease and normal sugar cane samples detect with SecA-SWL prototype kits

A : Normal sugar cane sample showed red color only on control line (C)

B : Sugarcane white leaf sample showed color only on control line (C)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาต้นแบบ (Prototype) ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในครั้งนี้ ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้ เนื่องจากการแสดงผลปรากฏสีเฉพาะเส้นควบคุม (control line, C) ได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 5-10 นาที แต่ไม่ปรากฏสีของเส้นตรวจ (test line, T) ปัญหาอาจเกิดจากประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตมีความเข้มข้นไม่เหมาะสำหรับนำมาพัฒนาชุดตรวจสอบ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตไปใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แทนได้ และในทางกลับกันแสดงให้เห็นว่าวิธีการเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold) ด้วยค่า pH 7.3 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 30 ug/ul ของ SecA-IgG มีประสิทธิภาพเหมาะสมเพราะสามารถแปลผลปฏิกิริยาสีบนเส้นควบคุม (control line, C) ได้อย่างชัดเจน จึงสามารถนำไปใช้พัฒนาต่อได้

สำหรับต้นแบบ (Prototype) ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit ต้องได้รับการปรับปรุงในส่วนการผลิตแอนติเจน เพื่อให้นำมาใช้ผลิตแอนติซีรัมให้มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้นและสามารถใช้พัฒนาต่อยอดการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางเซรัมวิทยาได้อย่างมีคุณภาพต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and S. Namba. 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 14(9) : 1043-1050.

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.

Shen,W.C. and C.P. Lin. 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organisms associated with sweetpotato witches'broom. Phytopathol. 83 : 671-675.

กรมวิชาการเกษตร