การผลิตชุดตรวจสอบ *Bean yellow mosaic virus* สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

Production of Gold labeling IgG flow test for detecting *Bean yellow mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล กาญจนา วาระวิชะนี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษา Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) ในการตรวจเชื้อ *Bean yellow Mosaic virus* (BYMV) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ใช้ทดสอบ 7 ชนิด เลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ BYMV ทำการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line แต่ control line เกิดในทุกชนิดของ nitrocellulose membrane ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray การ conjugate กับ IgG ของ BYMV หรือปรับความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาให้สามารถตรวจและเกิดปฏิกิริยาได้แถบแบนชัดเจน ก่อนที่จะทำการประกอบและตรวจสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-07-56

คำนำ

แกลดิโอลัสมีมากกว่า 150 ชนิด มีทั้งกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่น ปัจจุบันมีพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าเกือบ 3,000 พันธุ์ สำหรับพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยไม่แน่นอน เพราะได้มีการสั่งพันธุ์ แกลดิโอลัสใหม่ ๆ เข้ามาปลูกอยู่เสมอ เพราะต้องการให้ตรงกับความนิยมของผู้ใช้ และคุณภาพ ของพันธุ์ที่ได้จากการเก็บหัวพันธุ์มาปลูกจะลดลง แกลดิโอลัสจัดเป็นไม้ดอกเมืองหนาว ที่มีการผลิตเป็นการค้ามาไม่นาน ตลาดยังไม่กว้างขวาง ราคาของดอกแกลดิโอลัสจะแตกต่างไปตามคุณภาพ ซึ่งเป็นไปตามขนาดความยาวของก้านดอกเป็นสำคัญ ราคาเฉลี่ยจะอยู่ระหว่าง 1-8 บาท ต่อช่อดอก ปัจจุบันแกลดิโอลัสหรือซ่อนกลิ่นฝรั่ง เป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมสูงมีสีสันสะดุดตา เช่น สีขาว เหลือง ชมพู แดง ม่วง ส้ม มีช่อดอกยาว เหมาะสำหรับปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้า เพราะสามารถตัดช่อดอกได้ตั้งแต่ดอกยังไม่บาน และปัจจุบันนี้พื้นที่การปลูกแกลดิโอลัสส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น อ.ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และในพื้นที่บริเวณเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนใหญ่แกลดิโอลัสที่ปลูกจะส่งมาขายยังตลาด ในกรุงเทพมหานคร และส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศอีก เช่น ซาอุดิอาระเบีย แคนาดา ซึ่งประสบปัญหาเกี่ยวกับดอกไม่สม่ำเสมอ ค่าขนส่งสูง ปลายช่อดอกโค้งงอ รวมทั้งปัญหาของโรคและแมลงที่ทำให้คุณภาพดอกลดลง โดยเฉพาะโรคใบด่างดอกด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งเชื้อสามารถติดมากับหัวพันธุ์ที่นำเข้า รวมทั้งมีเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ ทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็ว ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของดอกแกลดิโอลัส โดยจะมีอาการปรากฏชัดบนใบและดอก โดยจะเห็นรอยด่างเป็นทางทำให้ดอกไม่มีคุณภาพและไม่สมบูรณ์

Arneodo *et al.* (2005) ได้รายงานถึงการตรวจสอบในขั้นต้นของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิธีซีรัมและ RT-PCR ในการตรวจสอบจากใบของแกลดิโอลัสจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า BYMV มีอนุภาคเป็น flexuous ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร กว้าง 12-15 นาโนเมตร และยังพบ BYMV ใน faba bean (*Vicia faba* L.), Pae (*Pisum sativum* L.) และ Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) เป็นพืชอาศัยด้วย Meenu *et al.* (2002) ได้ศึกษา *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส 32 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค ELISA, Immono electron microscopy และ RT-PCR โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ BYMV จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระจายของเชื้อ BYMV ในต้นแกลดิโอลัสจะมีการกระจายในพันธุ์ที่มีลำต้นสูงและมีใบยาว Stein *et al.* (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ไม่สามารถตรวจในหัวพันธุ์ได้ ทั้งวิธี ELISA และ RNA hybridization แต่จะตรวจสอบได้ในน้ำคั้นพืชจากส่วนของหัวพันธุ์ที่ตัดหรือเกิดบาดแผลมาแล้ว 2-5 อาทิตย์ เนื่องจากเชื้อไวรัส BYMV ในหัวพันธุ์ของแกลดิโอลัสนั้น จะมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำ ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญต่อการตรวจสอบและคัดเลือกหัวพันธุ์ที่ปลอดโรค

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ติดมากับหัวพันธุ์ จึงจัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ที่ติดมากับหัวพันธุ์แกลดิโอลัส ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อให้ได้หัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและ

ปลอดโรค และเพื่อส่งเสริมการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ เป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, Goat-anti mouse (GAM), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ BYMV โดยนำแอนติซีรัม BYMV (ซื้อแอนติซีรัมจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ) จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^{0}C ละลายตะกอน ด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

2. การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold)

เตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ เพื่อให้ได้อนุภาคทองที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร นำสารละลาย 1% ของ Gold chloride หรือ chloroauric acid ($HAuCl_4$, $AuCl_3$) จำนวน 1.2 ml ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 174 ml ที่ต้มเดือดแล้วนาน 2 นาที แล้วเติม Sodium citrate ลง 2 ml กวนต่อนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นให้เย็นลง นำไปวัด OD 530 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 แล้วปรับเป็น pH 7.3 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ที่เตรียมใหม่และใช้ทันที (Hampton *et al*.,1990) แล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของ BYMV

3. การติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ BYMV เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ BYMV ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 20 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent ให้มีความเข้มข้นของสารละลาย

เป็น 0.5 ที่ OD 540 แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl/cm

การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ BYMV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 μl/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ BYMV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ BYMV ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 μl/cm ส่วนการเตรียมเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) โดยการพ่น GAR ในอัตรา 1.0 μl/cm ลงบน NCM ในตำแหน่งห่างจาก test line ขึ้นไปด้านบนของ dip stick 0.5 cm แล้วนำไปอบแห้งเช่นเดียวกับ Conjugate Release pad (CRP) นาน 2 ชั่วโมง control line ทำไว้เพื่อให้ Gold labeling IgG ของ Rabbit IgG ละลายออกมาแล้วไหลไปจับกับ control line เพื่อเป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี

5. การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ PVA บนเส้น test line

ได้ทดลองใช้เมมเบรน 7 ชนิด คือ

1. Unisart CN 95
2. AE 100
3. AE 99
4. AE 98 Fast
5. Millipore HF 13504
6. Prisma 60
7. Unisart CN 140

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ BYMV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 2 μl/cm ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

6. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ

PBS pH 7.4
PBS-T pH 7.4
TBS pH 7.4

TBS-T pH 7.4
extraction buffer 1 pH 8.6
extraction buffer 2 pH 7.5
general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)

7. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาวออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกย ด้านล่างของแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) ไว้ด้านบนของ NCM ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไป จนสุดปลายด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ

8. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้น ในอัตรา 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วนำ Lateral flow test strip จุ่มลงในน้ำคั้นในปริมาณที่เท่ากัน อ่านผลปฏิกิริยาเปรียบทียบกัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2557
สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ BYMV เท่ากับ 6.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold

2. การติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทอง

ภายหลังจากการกวนกับ Sodium citrate จะได้สารละลายของ Colloidal Gold เป็นสี cherry red ซึ่งเป็นผลจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al*.,1990) ผลจากการทดลองหยอด Gold labeling IgG ในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 μl/cm พบว่าทุกอัตราไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line

3. การเตรียม test line และ การเตรียม control line

พบว่าการใช้ IgG ของ BYMV spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5, 2.0 μl/cm ผลของปฏิกิริยาไม่ขึ้นแถบสี อาจเนื่องมาจากชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดี แม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG BYMV ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

4. การทดสอบคัดเลือกชนิดของแผ่น ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ BYMV บนเส้น test line

NCM / line	Unisart CN 95	AE 100	AE 99	AE 98 Fast	Millipore HF 13504	Prisma 60	Unisart CN 140
BYMV	-	-	-	-	-	-	-
Control line	++	+++	+++	+++	++	++	++

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาในทุกชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ซึ่งปัญหานี้อาจเนื่องมาจากชนิดของบัพเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ และได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการพัฒนาและปรับปรุงชุดตรวจสอบ ก่อนที่จะทำการประกอบและตรวจสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ BYMV พบว่าการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) และทำการติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทองขนาดประมาณ 40 nm เมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ BYMV รวมทั้งชนิดของบัพเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ปริมาณในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไป แล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนความ ปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง

ในการทดลองผลิต Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส BYMV โดยเลือกใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของสารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลส

เมมเบรนดังกล่าว เกิดลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการที่แอนตีบอดี้ที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน และการเคลื่อนย้ายของของเหลวในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือจากซ้ายไปขวาในลักษณะ lateral flow จะช่วยให้แอนติเจนหรือตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเคลื่อนย้ายเข้าหาแอนติบอดี (Haber and Knapen, 1989; Tseda *et al.*, 1992 and Tseda *et al.*, 1993) เมื่อเป็นชนิดเดียวกันย่อมเกิดปฏิกิริยาบน strip สังเกตเห็นแถบสี (band) ของอนุภาคและมีคุณสมบัติสามารถต่อเชื่อมกับแอนติซีรัมได้ ปฏิกิริยานี้ถูกกำหนดให้ไปเกิดขึ้นบน strip ชัดเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส

เอกสารอ้างอิง

Arneodo, J.D., S. de Breuil, S.L. Lenardon, V.C. Conci and L.R. Conci. 2005. Detection of *Bean yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting gladiolus in Argentina. AGRISCIENTIA, VOL. XXII (2): 87-89.

Haber,S. and H.Knapen, 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero –diagnosis of plant viruses. Can. J. plant Pathol. 11:109-113.

Meenu Katoch, Raja Ram, A. A. Zaidi and I. D. Garg, 2002. Status of *Bean yellow mosaic virus* on Gladiolus.

Stein A., A. Rosner and J. Hammond. 1994. Detection of *Bean yellow mosaic virus* in Gladioli Corms.

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and K.Tomaru. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid mmunofilter paper assay (RIPA), plant Dis. 76:466-469

Tsuda,S., kameya-lwaki, M.,hanada, K.,Kouda, Y.,Hikata, M.,Fujisawa I and K.Tomaru. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. Ann. phythopath. Soc. Japan 59:200-203.