

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง
Development for detecting of PVY PVX PVS in Potato

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล^{1/} วิวัฒน์ ภาณุอำไพ^{2/}

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

บทคัดย่อ

การศึกษา Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) ในการตรวจเชื้อ PVY PVX และ PVS โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ใช้ทดสอบ 7 ชนิด เลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVY PVX และ PVS ทำการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ยังไม่ชัดเจน แลบบนไม่เข้ม ส่วน control line เกิดในทุกชนิดของ nitrocellulose membrane จึงทำการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG และทำการ conjugate กับ IgG ของ PVY PVX และ PVS ใหม่เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-08-56

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปีและปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ฝ่ายวิชาการกักพืชทำหน้าที่กักตรวจศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน ที่ติดเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน แต่จากการที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจมีปริมาณมาก ทั้งการตรวจก่อนนำเข้าและการเฝ้าระวังหลังนำเข้าโดยออกสำรวจและเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งมีรายงานจากต่างประเทศที่ตรวจพบเชื้อไวรัสทั้ง PVY PVX และ PVS โดย Gray *et al.* (2003) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบต่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการต่างอย่างชัดเจนและ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นต่างๆ ไป และทำการตรวจทางเซรัมวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามี การเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *et al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVW, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ กิตติศักดิ์และคณะ (2532) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบรวดเร็วและแม่นยำ ดีกว่าอีก 2 วิธี Tsuda *et al.* (1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆชนิด ด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIP) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรัมวิทยา

ซึ่งจากจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจมีปริมาณมากทำให้การตรวจมีปัญหาและทำให้ล่าช้า และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง หรือพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว ซึ่งจาก

เดิมได้พัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสอย่างง่ายของเชื้อไวรัส PVY บนหัวพันธุ์มันฝรั่งไป แล้วบนชุดตรวจสอบ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์มันฝรั่งได้ 3 ชนิด พร้อมกันในหนึ่งชุด คือ PVY PVX และ PVS จึงเป็นสิ่งที่ดีและมีความจำเป็น เพื่อให้สามารถตรวจได้มากขึ้น เร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อรองรับการนำเข้ามาพันธุ์มันฝรั่งที่มีปริมาณมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรั่ม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80°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. การเตรียมแอนติซีรั่มและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS

สกัด IgG จากแอนติซีรั่มของเชื้อ PVY PVX และ PVS โดยนำแอนติซีรั่ม PVY PVX และ PVS 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°C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ $\frac{1}{2}$ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน $\frac{1}{2}$ เท่า PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ $\text{OD}_{280} = 1.4$ 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 PVY PVX และ PVS

3. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ PVY PVX และ PVS เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidal Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ PVY PVX และ PVS 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 Colloidal Gold conjugated IgG ที่ติดสลากรด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 $\mu\text{l}/\text{cm}$

การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 $\mu\text{l}/\text{cm}$ แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดทดสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 $\mu\text{l}/\text{cm}$ ส่วนการเตรียมเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) โดยการพ่น GAR ในอัตรา 1.0 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 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. 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)

6. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกยด้านล่างของแผ่น 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

7. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS

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

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ PVY PVX และ PVS เท่ากับ 6.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD²⁶⁰ เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold

2. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS 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 $\mu\text{l/cm}$ พบว่าทุกอัตราไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line

3. การเตรียม test line และการเตรียม control line

พบว่าการใช้ IgG ของ PVY PVX และ PVS spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{l/cm}$ ผลของปฏิกิริยาไม่ขึ้นแถบสี อาจเนื่องมาจากชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 $\mu\text{l/cm}$ เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีแม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG PVY PVX และ PVS ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดลอง Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส PVY PVX และ PVS โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของ

สารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรัมวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวตั้งไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าว เป็นลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง ซึ่งการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคมักด้วยกันหลายวิธี เช่นการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jesen and Gold, 1951) การตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay) (Clark and Adams, 1977) และการตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนซีโรวิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปในการวินิจฉัยโรคอาจต้องพิจารณาจากหลากหลายวิธีประกอบกัน และควรวางวิธีการใหม่ๆมาช่วยเพิ่มการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการที่แอนติบอดีที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน 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 วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส แต่จากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ยังไม่ชัดเจน จาง แถบแบนไม่เข้ม ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากแอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS รวมทั้งชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กীরติยะอังกูร สุรภี กীরติยะอังกูร และ นवलจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 103-109.
- Clark, M.F and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475-483.
- Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board.

- 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.
- Hampton, H., E. Ball, and S. De Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. 389 pp.
- Hochleitner,K. and H. Kraus. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand . 180 pp.
- Jesen, D.D. and A.H. Gold. 1951. A virus ringspot of odontoglossum orchid symptom, transmission, and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.
- Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.
- 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.