การผลิตชุดตรวจสอบ Potato virus A สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

Production of Gold labeling IgG flow test for detecting *Potato virus* A

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/] ปรียพรรณ พงศาทิชณ์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) มาปรับใช้ในการตรวจเชื้อ Potato virus A โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยการเลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVA ที่ใช้แอนติบอดี จากตัวแทนจำหน่ายของบริษัท โดยปรับให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดเกิดปฏิกิริยาสีแดงเข้มได้ แม้จะทำการปรับ gold labeling IgG ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นผลของปฏิกิริยายังไม่ดี ไม่เกิดแถบสีของปฏิกิรยา ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีทำให้เกิดสีแดงเข้มของปฏิกิริยา จากการเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบ ที่แตกต่างกันที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive ส่วนปฏิกิริยาบนเส้น test line ของเชื้อ PVA นั้น พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาในทุกชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ sample buffer ในทุกชนิด ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Potato virus A* (PVA) จากบริษัทตัวแทนจำหน่าย ที่ผลิตมาเพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี ELISA ไม่เหมาะในการนำมาทำเป็นชุตรวจสอบ Gold labeling IgG flow test เนื่องจากได้นำแอนติซิรัมดังกล่าวมาทดสอบในการตรวจด้วยวิธี ELISA นั้นสามารถตรวจได้ผลชัดเจน ดังนั้นจึงควรศึกษาและทดลองต่อไปด้วยการผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Potato virus A* ขึ้นเอง แล้วนำแอนติซิรัมที่ผลิตได้มาพัฒนาและทดสอบการผลิตชุดตรวจสอบไวรัส Gold labeling IgG flow test และเป็นการลดการนำเข้าและซื้อแอนติซิรัมจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายทั้งในและนอกประเทศที่มีราคาแพง ให้สามารถตรวจเชื้อไวรัส PVA ได้ด้วยวิธี ELISA ได้อย่างมีคุณภาพที่ดีกว่าหรือทัดเทียมกับต่างประเทศ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-01-54

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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน และในต่างประเทศนั้นได้มีการสำรวจโรคไวรัส โดย Gray *et.al.* (2003) สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *at al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, 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 *at al.*(1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆ ชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIPA) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา สุรภีและคณะ(2533) ใช้วิธีและขั้นตอนการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสของกล้วยไม้และทำการแยกให้

ได้ไวรัสที่บริสุทธิ์ นำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพที่ดีแล้วทดลองนำวิธีการตรวจสอบแบบ NCM ELISA มาปรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่รวดเร็ว

ซึ่งจากที่ประเทศไทยมีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้การตรวจจึงมีปริมาณมาก ทำให้รวมทั้งไทยมีข้อกำหนดไม่ให้มีการติดเชื้อไวรัส PVA เข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่งและฝ่ายวิชาการกักพืชมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวดจริงจังทำให้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามามีคุณภาพดี ปลอดโรคไวรัสมากขึ้น แต่ในภาวะปัจจุบันที่ประเทศไทยต้องสั่งหัวพันธุ์จากประเทศต่างๆ เข้ามาจำนวนมากทุกปี จึงจำเป็นต้องมีการสุ่มตรวจหัวพันธุ์ก่อนนำเข้า รวมถึงการรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสที่เป็นศัตรูพืชกักกันซึ่งอาจจะหลุดเข้ามาในประเทศได้ จึงต้องมีการพัฒนาเครื่องมือสำหรับตรวจเชื้อไวรัส PVA ที่ติดมากับหัวพันธุ์ เพื่อช่วยตรวจสอบหัวพันธุ์ที่นำเข้าซึ่งมีปริมาณมาก ฉะนั้นการนำเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสได้รวดเร็วและถูกต้อง จะสามารถช่วยให้การตรวจสอบมีคุณภาพและมีมาตรฐาน และสามารถตรวจหัวพันธุ์ที่นำเข้าคราวละมากๆ ได้ และยังเป็นการป้องกันการนำโรคที่ไม่มีรายงานภายในประเทศให้เข้ามาได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการหรือเครื่องมือสำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสที่ติดมากับหัวพันธุ์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อเป็นการกักกันหรือป้องกันศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศ ไม่ให้เข้ามาหรือติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งได้และเพื่อลดปัญหาการตรวจมีปัญหา ล่าช้า ซึ่งเกิดจากปริมาณตัวอย่างมีมาก และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง รวมทั้งจากต้นที่ปลูกอยู่ในแปลงของเกษตรกรเพื่อให้สามารถตรวจได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว สะดวกในการนำไปใช้ และยังเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) และวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ไวรัสของมันฝรั่ง และเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Potato virus A* (PVA)
- 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 Potato *virus A* (PVA)

สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ PVA โดยนำแอนติซีรัม PVA (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 PVA

3. การติดสลาก IgG ของ PVA ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ PVA เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ PVA ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย 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 ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 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 PVA ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 µl/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ

PVA มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

เลือกใช้เมมเบรน AE 99 ซึ่งได้ใช้ในชุดตรวจมันฝรั่ง ทำให้เส้น test line และ control line มีปฏิกิริยาดีมากและสามารถใช้ AE 100 ทดแทนได้ ให้ผลในระดับดี โดยเชื้อ PVA จะมีลักษณะอนุภาคใกล้เคียงกับเชื้อ PVX และ PVY และเชื้อไวรัสมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถผลิตชุดตรวจไวรัสโดยเลือกใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิดเดียวกัน

การเตรียม test line ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ PVA 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/เซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ PVA พ่นเป็น test line ในปริมาณ 2 µl/เซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้

ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดง เกิดจากปฏิกิริยาของ 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 PVA

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ PVA 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

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Potato virus A* (PVA)

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ PVA 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 PVA 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 PVA 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 ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีแม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG PVA ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

4. การทดสอบคัดเลือกชนิดของแผ่น ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line

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

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด ในการตรวจสอบ เชื้อ PVA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาในทุกชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ซึ่งปัญหานี้อาจเนื่องมาจาก ชนิดของบัพเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ และได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line เพื่อการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

5. การเปรียบเทียบสารละลายบัพเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

การเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ จำนวน 7 ชนิด พบว่าบัพเฟอร์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line ได้ และไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line หรือปฏิกิริยาข้าม และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่าการใช้ extraction buffer 2 pH 7.5 ให้ผลดีที่สุด ซึ่งไม่ทำให้เกิดสีเขียวบน NCM ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สะอาดอ่านผลได้ชัดเจนบนเส้น control line ส่วนเมื่อใช้บัพเฟอร์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบนั้นจะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างพืชและมี background สีเข้มและสกปรก

6. การประกอบและตรวจสอบ

ผลการประกอบส่วนประกอบของชุดตรวจ GLIFT เป็น dipstick อย่างถูกต้องตามลำดับและซ้อนเกยกันอย่างพอดี เมื่อจุ่มชุดทดสอบลงในน้ำคั้นของพืชเป็นโรค การไหลของสารละลายต่างๆเป็นไปอย่างต่อเนื่องและสมบูรณ์ เกิดปฏิกิริยาที่เส้น control line ภายในเวลา 3-5 นาที แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาที่เส้น test line ซึ่งสาเหตุที่เส้น test line ไม่เกิดปฏิกิริยาจากการศึกษาทั้งการเปรียบเทียบชนิดไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน บัพเฟอร์ การปรับความเข้มข้นและอัตราในการ sprayของเส้น test line และการ conjugate กับ IgG ของไวรัส ทำให้คาดการได้ว่าสาเหตุจึงน่าจะเป็นที่แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Potato virus A* (PVA) และจึงไม่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVA ต่อไปเนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาที่เส้น test line

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการทดลองผลิต Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส PVA 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 ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าว เกิดเป็นลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซน

วิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง ซึ่งการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคมีด้วยกันหลายวิธี เช่นการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jesen and Gold, 1951) การตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Enyzme Linked-Immuno Sorbent Assay) (Clark and Adam,1977) และการตรวจสอบด้วยวิธีอณูชีววิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปในการวินิจฉัยโรคอาจต้องพิจารณาจากหลากหลายวิธีประกอบกัน และควรหาวิธีการใหม่ๆมาช่วยเพิ่มการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น 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 วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV)

แต่จากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ PVA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Potato virus A* (PVA) จากบริษัทตัวแทนจำหน่าย ที่ผลิตมาเพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี ELISA ไม่เหมาะในการนำมาทำเป็นชุดตรวจสอบ Gold labeling IgG flow test เนื่องจากได้นำแอนติซิรัมดังกล่าวมาทดสอบในการตรวจด้วยวิธี ELISA นั้น สามารถตรวจได้ผลชัดเจน

ดังนั้นผู้ทดลองจึงได้ทำการวางแผนเพื่อศึกษาทดลองต่อไปด้วยการผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Potato virus A* ขึ้นเอง เพื่อเป็นการลดการนำเข้าและซื้อแอนติซิรัมจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายทั้งในและนอกประเทศที่มีราคาแพง ให้สามารถตรวจเชื้อไวรัส PVA ได้ด้วยวิธี ELISA ได้อย่างมีคุณภาพที่ดีกว่าหรือทัดเทียมกับต่างประเทศ รวมทั้งเพื่อนำแอนติซิรัมที่ผลิตได้ มาพัฒนาและทดสอบการผลิตชุดตรวจสอบไวรัส Gold labeling IgG flow test ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 103-109.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Anonymous. 2004. Cucumber Mosaic Virus. 2 p. Available at : www.avrdc.org/pdf/pepper/CMV.pdf

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.