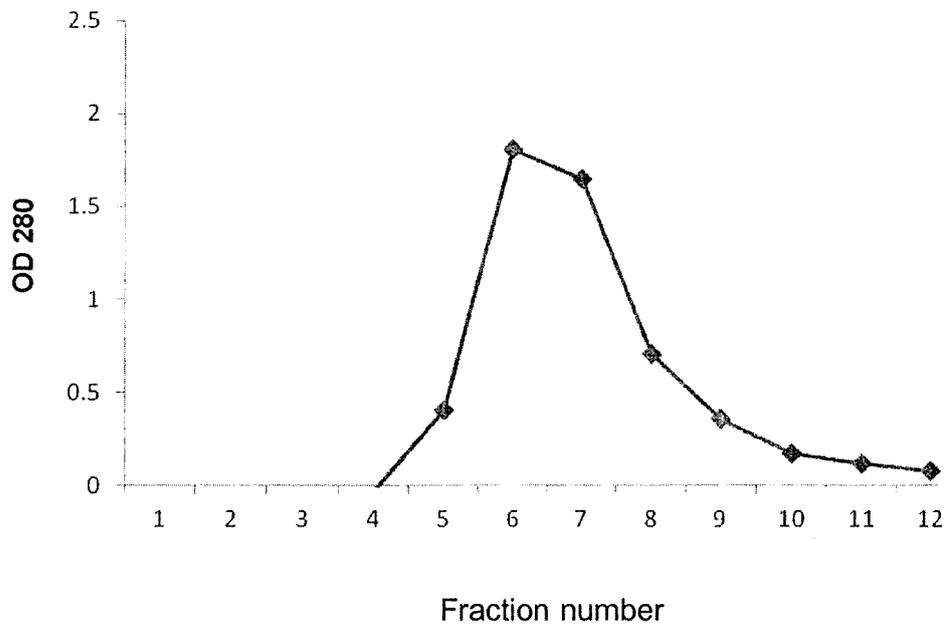




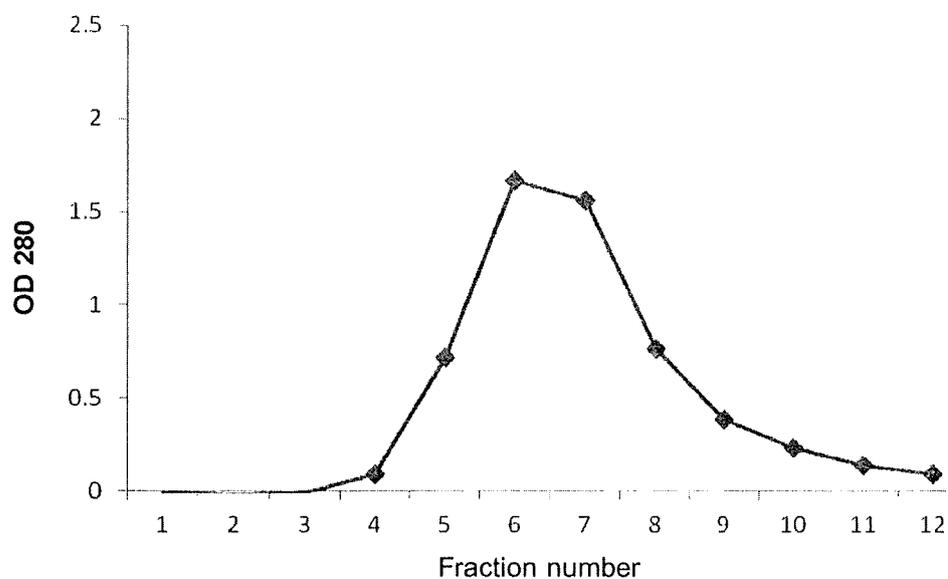
ผลการวิจัย

1) การสกัดอิมมูโนโกลอบบูลิน (CTV-IgG)

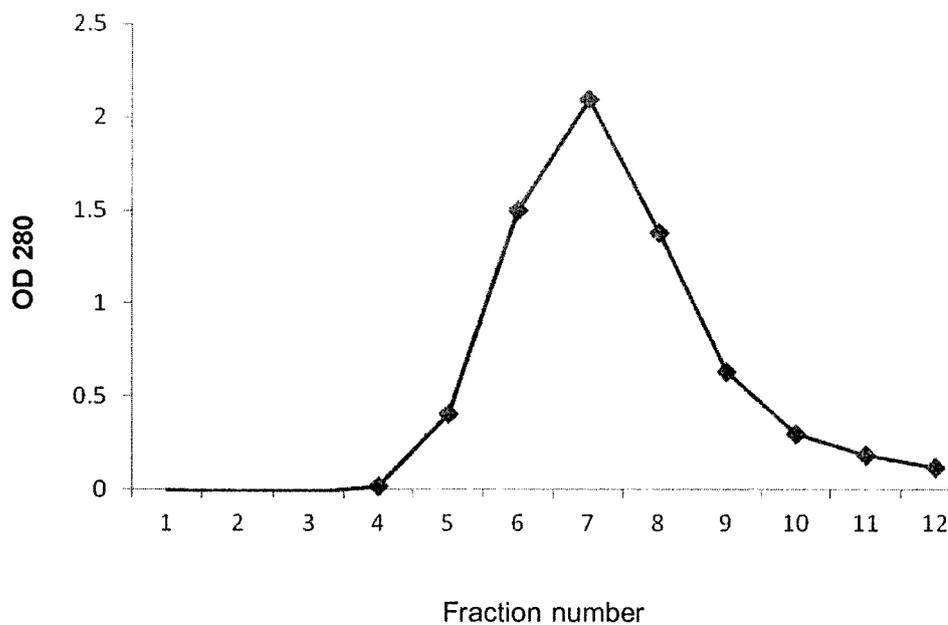
ผลการสกัดแอมมูโกลอบบูลิน (CTV-IgG) ออกจากโพลีแอนติบอดีที่ละลายอยู่ในแอนติเซรัม (crude antiserum) ต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ พบ IgG ใน fraction ที่ 4-9 (ภาพที่ 1-6) สำหรับ IgG ของ fraction 6-8 มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อประเมินจากค่าดูดกลืนแสง OD 280:250 (ตารางที่ 1) และผลผลิตของ IgG ที่สกัดได้เฉลี่ย 3.245 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแอนติเซรัม (ตารางที่ 1)



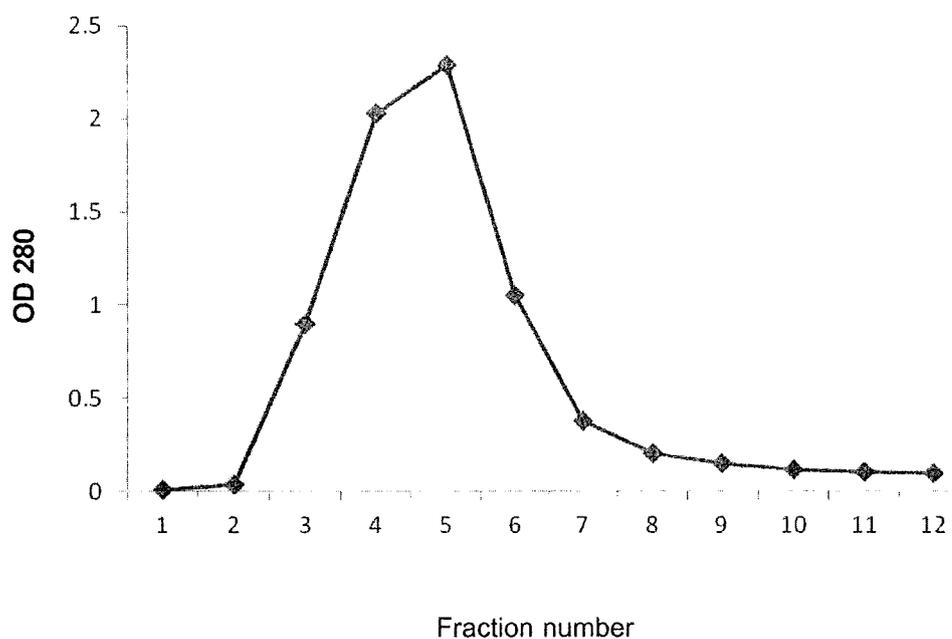
ภาพที่ 1 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 1



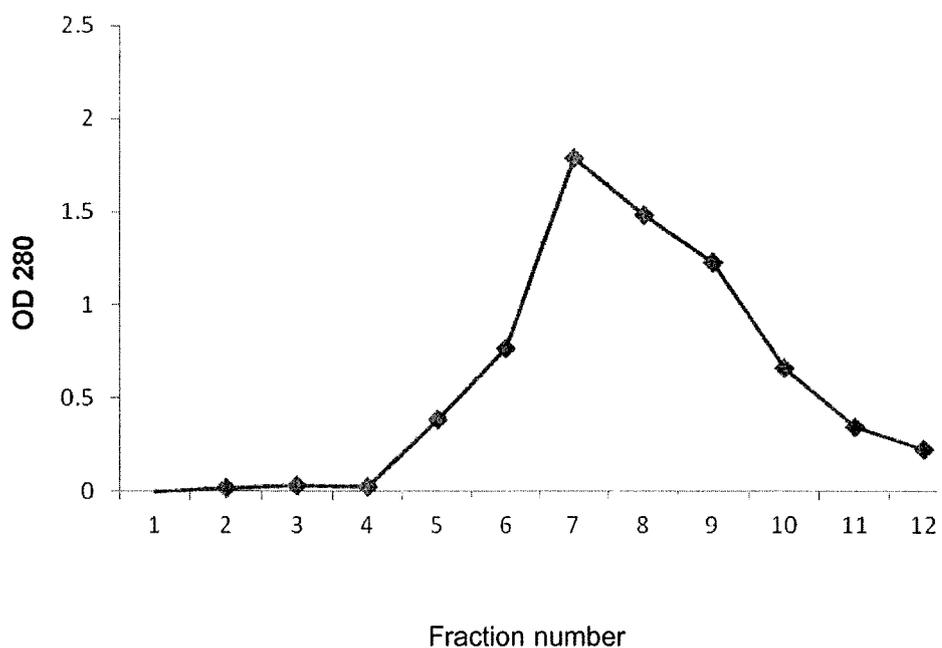
ภาพที่ 2 การดูค่าการดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตรชาไวรัสบริสุทธุ์ครั้งที่ 2



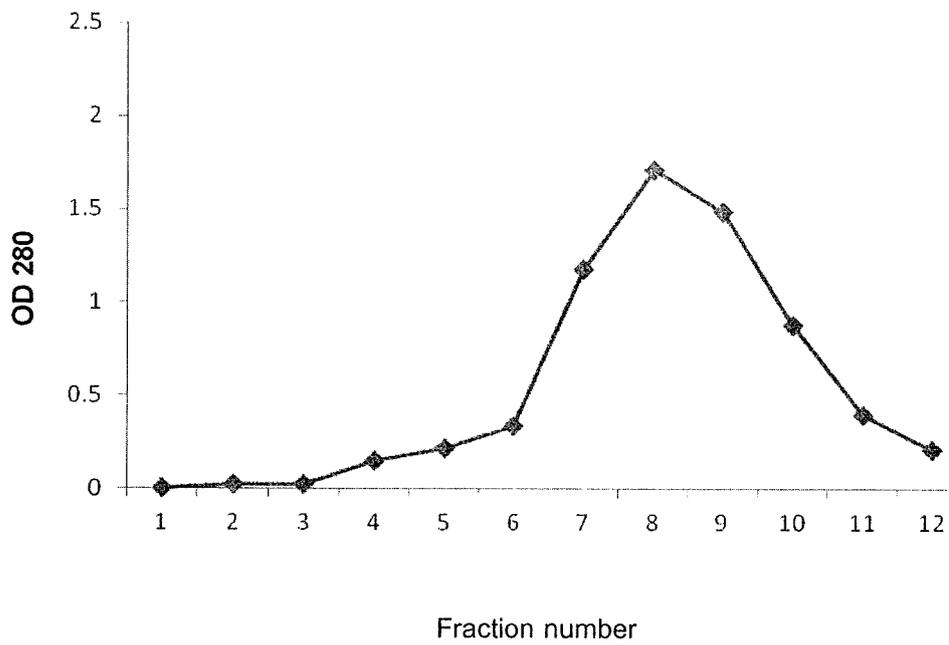
ภาพที่ 3 การดูค่าการดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตรชาไวรัสบริสุทธุ์ครั้งที่ 3



ภาพที่ 4 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธุ์ครั้งที่ 4



ภาพที่ 5 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธุ์ครั้งที่ 5



ภาพที่ 6 การดูคลื่นแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตชาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 6

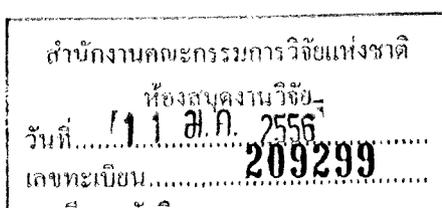
ตารางที่ 1 ปริมาณและคุณภาพของแกมมาโกลบูลิน (IgG) สกัดจากแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์

การสกัดครั้งที่	Fraction no ^{1/}	OD280 : 250 ^{2/}	IgG (mg/ml) ^{3/}
1	F6	2.26	1.29
	F7	2.30	1.18
	F8	2.61	0.50
	รวม		2.97
2	F6	2.19	1.19
	F7	2.30	1.12
	F8	2.32	0.55
	รวม		2.86
3	F6	2.33	1.07
	F7	2.23	1.50
	F8	2.28	0.99
	รวม		3.56
4	F4	2.32	1.45
	F5	1.96	1.63
	F6	1.66	0.75
	รวม		3.83
5	F7	2.72	1.28
	F8	2.68	1.06
	F9	2.71	0.88
	รวม		3.22
6	F7	2.68	0.84
	F8	2.70	1.23
	F9	2.66	1.06
	รวม		3.13
ผลผลิตเฉลี่ยของ CTV-IgG			3.245

^{1/} ลำดับของ fraction ซึ่งชะล้าง (elute) เพื่อแยก IgG ออกจาก DEAE column

^{2/} IgG บริสุทธิ์มีค่า OD280:250 = 2.5-2.7

^{3/} ปริมาณของ IgG คำนวณจาก OD280 (IgG 1 mg/ml มีค่า OD280 = 1.4) โดยสกัดจากแอนติบอดีของเชื้อทริสเตซาไวรัส



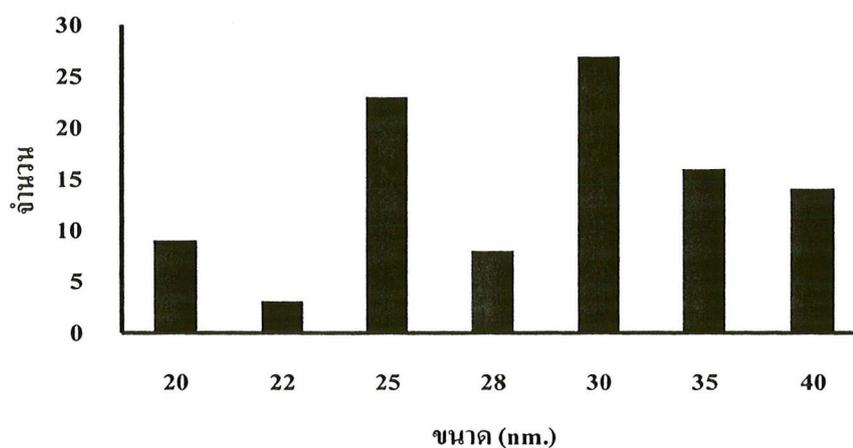
จากการนำ CTV-IgG ที่แยกได้มาทดสอบความไวและประสิทธิภาพโดยอีไลซา (Plate Trapped ELISA) พบว่ามีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสค่อนข้างสูง และไม่ตอบสนองต่อมะนาวปกติ เมื่อใช้ IgG ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าดูดกลืนแสง (OD 405) ของปฏิกิริยา ELISA ที่เกิดจากการตอบสนองของแกมมา globulin (CTV-IgG) ต่อแอนติเจนของทริสเตซาไวรัส

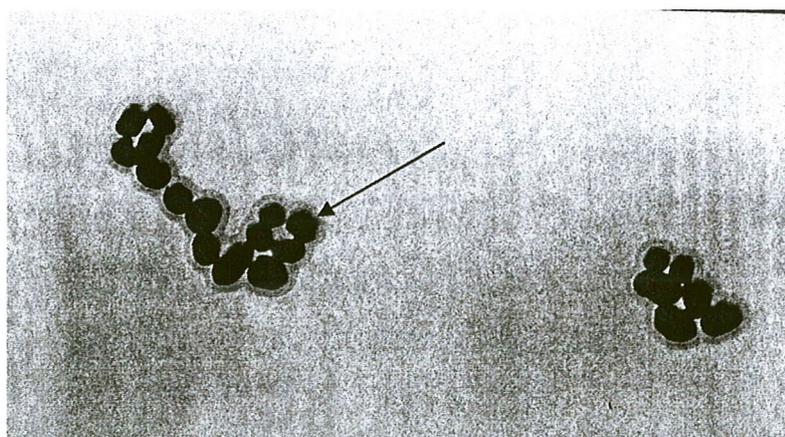
การสกัด IgG ครั้งที่	Fraction no ^v	ELISA OD 405 ($\bar{x} \pm SD$)
1	F5	1.109 ± 0.009
	F6	1.214 ± 0.016
	F7	1.514 ± 0.060
	F8	1.826 ± 0.642
	F9	1.111 ± 0.050
2	F5	1.266 ± 0.028
	F6	1.020 ± 0.033
	F7	1.487 ± 0.038
	F8	1.372 ± 0.010
	F9	1.178 ± 0.172
3	F5	1.096 ± 0.032
	F6	1.104 ± 0.071
	F7	1.318 ± 0.035
	F8	1.201 ± 0.046
	F9	1.053 ± 0.044
4	F5	1.400±0.025
	F6	1.562±0.021
	F7	2.107±0.040
	F8	1.563±0.008
	F9	1.470±0.018
5	F6	1.652±0.013
	F7	2.030±0.072
	F8	1.444±0.000
	F9	1.389±0.084
6	F7	1.550±0.007
	F8	2.324±0.020
	F9	1.399±0.000
	F10	1.065±0.010

2) การเตรียมอนุภาคทอง (Colloidal gold particle)

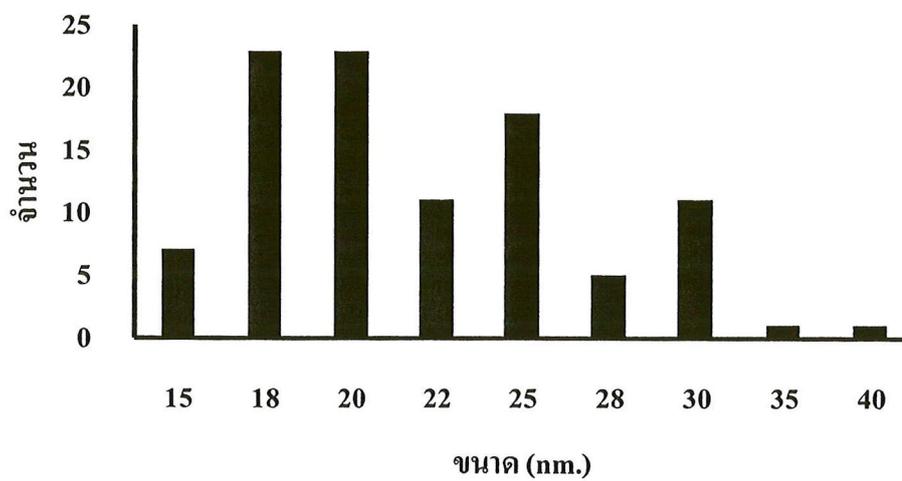
ผลการเตรียมสารแขวนลอยทองอนุภาคขนาด 30 นาโนเมตร เมื่อนำสารแขวนลอยไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แล้วสุ่มวัดขนาดอนุภาคทองที่ตรวจพบจำนวน 100 อนุภาคต่อกริดพบว่าประชากรส่วนใหญ่ของอนุภาคทองคือประมาณ 27 % มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 30 nm ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 สำหรับผลการเตรียมสารแขวนลอยทองอนุภาคขนาด 15 นาโนเมตร เมื่อตรวจวัดขนาดพบอนุภาคทองที่ ขนาด 18 และ 20 nm ชนิดละ 25% ของประชากรรวม และอนุภาคทองขนาด 15 nm เพียง 8 % (ภาพที่ 9 และ 10)



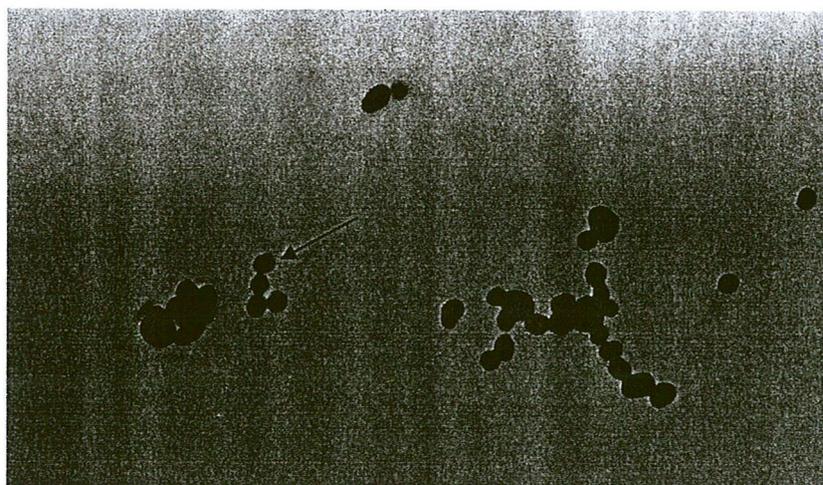
ภาพที่ 7 แสดงจำนวนและขนาดของอนุภาคทองที่ตรวจพบในสารแขวนลอยทอง CG-30 nm



ภาพที่ 8 แสดงอนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร (ลูกศร) กำลังขยาย 750,000 เท่า



ภาพที่ 9 แสดงจำนวนและขนาดของอนุภาคทองที่ตรวจพบในสารแขวนลอยทอง CG-15 nm



ภาพที่ 10 แสดงอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร (ลูกศร) กำลังขยาย 750,000 เท่า

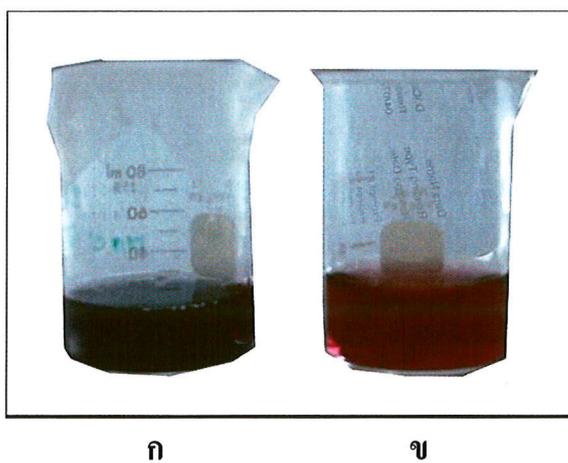
3) การเชื่อมอิมมูโนโกลอบบูลิน (IgG) เข้ากับอนุภาคทอง (Colloidal Gold, CG)

ผลการเชื่อมอนุภาคทอง (CG) เข้ากับแอนติบอดีเชื้อไวรัสเตซาไวรัส (CTV-IgG) พบว่าการเชื่อมอนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร กับ CTV-IgG เข้มข้น 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารละลายแขวนลอยของทองให้ผลผลิตเม็ดทองเชื่อมด้วยแอนติบอดี (CG-IgG) ที่ใกล้เคียงกันคือมีค่า OD 540 =3.11, OD 540 =3.01 และ OD 540 =3.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อใช้อนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทอง พบว่าเกิดการตกตะกอนของอนุภาคทองเนื่องจากสารละลายแขวนลอยของทองเปลี่ยนเป็นสีม่วง (ภาพที่ 11) ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ คือ OD 540 = 1.61 และ OD 540 = 1.89 ตามลำดับ เมื่อนำ CG-IgG ไปทดสอบตรวจเชื้อไวรัสเตซาไวรัส พบว่า CG-IgG ที่ใช้ขนาดทอง 30 นาโนเมตร และใช้ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทอง ให้ผลผลิตดีที่สุดเพราะปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 12)

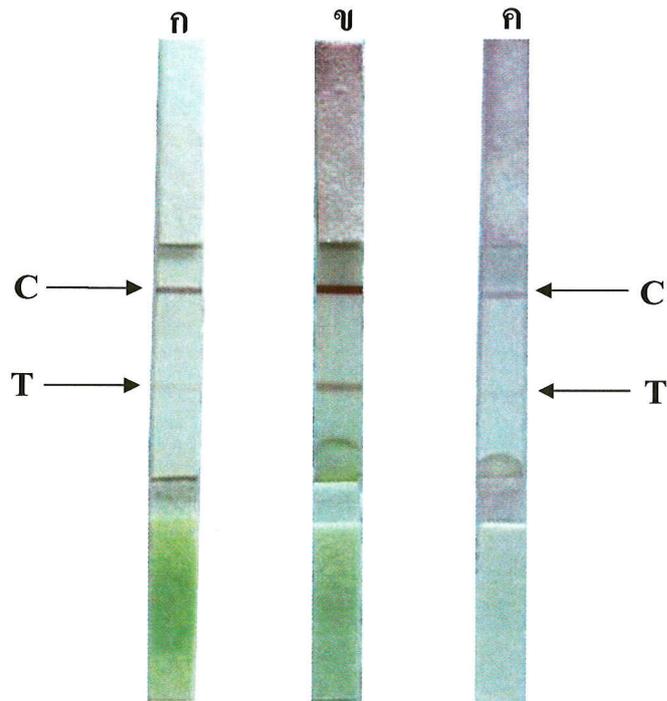
ตารางที่ 3 แสดงผลผลิตการเชื่อมอนุภาคทอง (CG) กับแอนติบอดีของเชื้อไวรัสเตซาไวรัส (CTV-IgG)

ขนาด CG (nm)	ความเข้มข้น CTV-IgG ($\mu\text{g/ml}$)	ผลผลิต CG-IgG (OD 540) ¹
30	5	3.11
30	10	3.01
30	50	3.07
15	5	1.61
15	10	1.89
15	50	NA

¹ NA = Not applicable (ไม่ได้ทำการทดลอง)



ภาพที่ 11 ลักษณะสีที่ป้องกันการตกตะกอนของอนุภาคทองเมื่อเติมแอนติบอดี (ก) เปรียบเทียบกับสภาพปกติของสารละลายแขวนลอยของทอง (ข)



ภาพที่ 12 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 3 ระดับ: T (Test line, T) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อCTV (CTV-IgG) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร); C (Control line) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ(GAR-IgG) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ก. IgG เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเม็ดทอง
- ข. IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารแขวนลอยเม็ดทอง
- ค. IgG เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเม็ดทอง

4) การทดสอบขนาดทอง (CG) ขนาดเมมเบรน และระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG) ที่ใช้เตรียมชุดตรวจ Immunochromatographic lateral flow test strip

ผลการทดลองขนาดอนุภาคทอง ชนิดของเมมเบรน และความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ขีดเส้นตรวจ ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 4 พบว่าขนาดของอนุภาคทอง (CG) เป็นปัจจัยที่ทำให้การเกิดสีแดงบนเส้นตรวจมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ภาคผนวก ข) ขณะที่ปัจจัยของเซลล์โลสเมมเบรนที่มีอัตราความเร็วจำเพาะในการเคลื่อนที่ที่ต่างกันไม่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของสีบนเส้นตรวจ และปัจจัยทั้งสองไม่มีปฏิริยาสัมพันธ์ (ภาคผนวก ข) ทั้งนี้แผ่นตรวจซึ่งใช้อนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร ในการเชื่อมกับแอนติบอดี โดยใช้เมมเบรน CN 140 ซึ่งมีอัตราความเร็วจำเพาะในการเคลื่อนที่ของของเหลว (capillary speed specification) 110-165 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร และขีดเส้นตรวจ (T) ด้วยแอนติบอดี (CTV-IgG) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการตรวจดีที่สุดที่สุด เมื่อใช้ตรวจหาทริสเตซาไวรัส น้ำคั้นจากมะนาวติดเชื้อไวรัสไอโซเลท SM 4 เนื่องจากปรากฏสีแดงชัดเจนที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าบนเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C) ดังภาพที่ 13 ภายในเวลา 3 นาที 39 วินาที (219 วินาที) และ 54.2 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยสีแดงบนเส้นตรวจมีระดับความเข้มข้นสูงกว่าเส้นตรวจของแผ่นตรวจที่ใช้อนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร ซึ่งใช้เมมเบรน CN 140 หรือเมมเบรน CN 95 (ตารางที่ 4 ภาพที่ 14) นอกจากนี้พบว่าการใช้แอนติบอดีที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชีดเส้นตรวจ ไม่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในน้ำคั้น เนื่องจากไม่ปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจภายหลังหยดด้วยน้ำคั้นของไวรัสลงบนแผ่นตรวจ (ภาพที่ 15) แอนติบอดีของเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ผ่านการขจัด (cross absorbed) การปนเปื้อนแอนติบอดีของโปรตีนพืช โดยการเติมน้ำคั้นของมะนาวปกติเจือจาง 1:10 ด้วย PBS buffer ลงในแอนติบอดีของไวรัส เพื่อให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เตรียมแผ่นตรวจ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีไม่ทำปฏิริยาข้ามกับน้ำคั้นของมะนาวปกติ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 4 แสดงผลตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นของมะนาวติดเชื้อไอโซเลท SM4 โดยแผ่นตรวจ (test strip) ระบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโพล์

เมมเบรน ^{1/}	ทริทเมนต์		การปรากฏของ สีแถบ ^{4/}		ค่าความเข้มของสี แถบบนเส้น T ^{5/} ($\bar{x} \pm SD$)	ระยะเวลาปรากฏของสี (วินาที) ^{6/}	
	CG ^{2/} (nm)	CTV-IgG ^{3/} (mg/ml)	T	C		T	C
CN 140	15	1.0	+	+	0.342±0.065	142.8	52.8
CN 95	15	1.0	+	+	0.254±0.067	111.0	43.6
CN 140	30	1.0	+	+	0.488±0.225	219.0	54.2
CN 95	30	1.0	+	+	0.388±0.149	192.6	46.6

^{1/} เซลลูโลสเมมเบรน (working membrane) ที่ใช้ขีดเส้นตรวจ (Test line, T) และเส้นควบคุม (Control line, C) มี capillary speed specification อัตราการเคลื่อนที่ของของเหลวบนเมมเบรน ดังนี้ CN 140 = 110-165 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร , CN 95 = 90-135 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร

^{2/} ขนาดของ colloidal gold (CG) ที่เชื่อมกับแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG) โดยใช้ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ CG

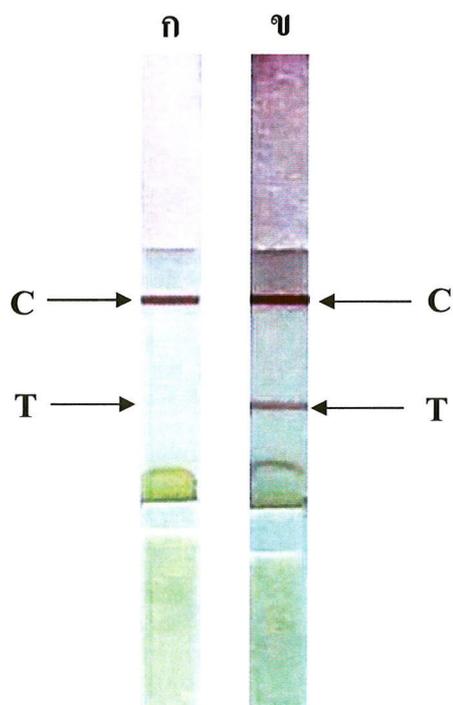
^{3/} ระดับความเข้มของ CTV-IgG ที่ใช้ขีดเส้นตรวจ (Test line, T)

^{4/} เส้น T (+) = สีแดงตรวจพบไวรัส, (-) = ไม่มีสีไม่พบไวรัส

เส้น C (+) = สีแดงมีการเคลื่อนที่ของ CG บนเมมเบรน, (-) = ไม่มีสีไม่มีการเคลื่อนที่ของ CG

^{5/} ค่าความเข้มของสีแถบบนเส้น T วัดโดยเครื่อง Color Meter, Hunter Lab, Virginia เฉลี่ยจาก 5 แผ่นตรวจต่อทริทเมนต์

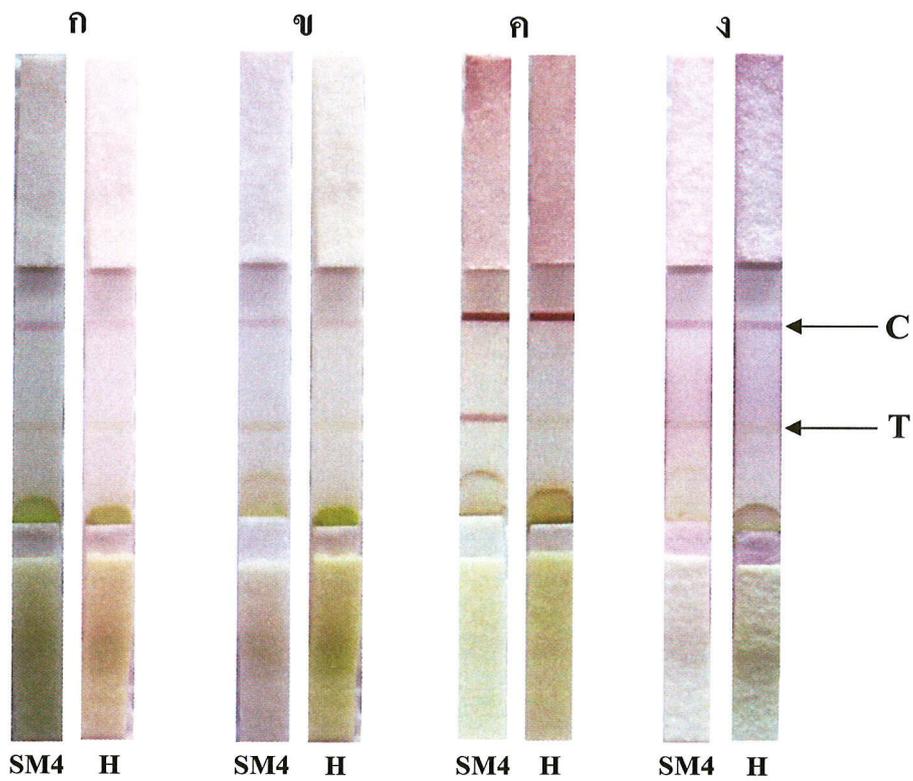
^{6/} ระยะเวลาการปรากฏสีแถบบนเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C) เฉลี่ยจาก 5 แผ่นตรวจต่อทริทเมนต์



ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้มีดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทอง: T (Test line) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (CTV-IgG) 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร; C (Control line) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ (GAR-IgG) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก. ทดสอบด้วยน้ำคั้นมะนาวปกติ

ข. ทดสอบด้วยน้ำคั้นมะนาวติดเชื้อ CTV ไอโซเลท SM4



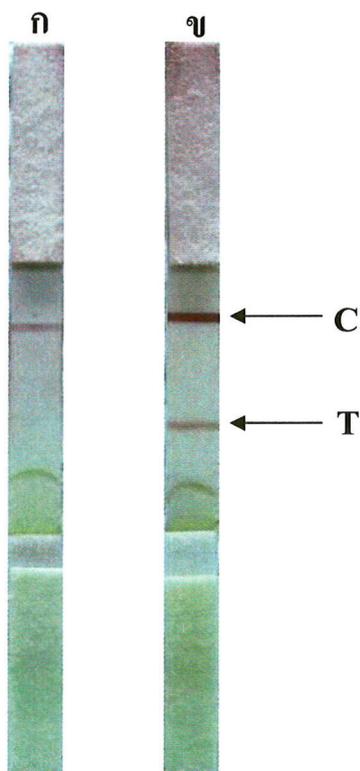
ภาพที่ 14 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) เมื่อใช้เมมเบรน CN 140 และ CN 95 เม็ดทอง (CG) ขนาด 15 และ 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของทอง: SM4 = มะนาวติดเชื้อ CTV, H = มะนาวปกติ

ก. เมมเบรน CN 140, CG 15 nm

ข. เมมเบรน CN 95, CG 15 nm

ค. เมมเบรน CN 140, CG 30 nm

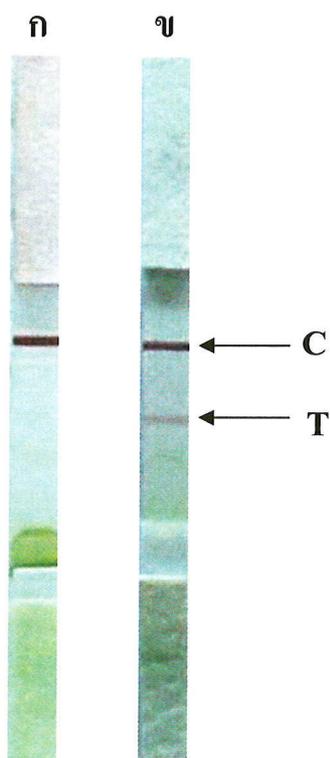
ง. เมมเบรน CN 95, CG 30 nm



ภาพที่ 15 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทอง เส้นตรวจ (T) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (CTV-IgG) ที่เข้มข้น 2 ระดับ และเส้นควบคุม (C) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ (GAR-IgG) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก. เส้นตรวจ (T) ชีดด้วย CTV-IgG เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. เส้นตรวจ (T) ชีดด้วย CTV-IgG เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 16 แสดงเส้นตรวจซึ่งขีดด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (CTV-IgG) เมื่อใช้ตรวจน้ำคั้นของมะนาวปกติ

ก. CTV-IgG ผ่านการ cross absorbed ด้วยโปรตีนของมะนาวปกติ

ข. CTV-IgG ไม่ผ่านการ cross absorbed ด้วยโปรตีนของมะนาวปกติ