



วิธีดำเนินการวิจัย

1) การสกัดอิมมูโนกลอบบูลิน (CTV -IgG)

สกัดอิมมูโนกลอบบูลิน (CTV-IgG) จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสซึ่งผลิตในโครงการวิจัย การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย ซึ่งผ่านการทดสอบโดยเทคนิค ELISA และพบว่ามียุทธวิธีจำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับส้มปกติ และเชื้อสาเหตุโรคชวงลงบึง (รัตนา สดุดี และคณะ 2551) ด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนไอออนในคอลัมน์ DEAE ตามวิธีการของ Sdoodee (1989) โดยนำแอนติบอดีเจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 มล. มาตกตะกอนด้วยสารละลายอิมมัวแอมโมเนียมซัลเฟต (Saturated ammonium sulphate) ปริมาตร 10 มล. แล้วเก็บตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนใน PBS buffer 2 มล. แล้วนำไป dialyse ใน 0.5 เท่า PBS buffer 3 ครั้ง จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE เก็บ fraction ของอิมมูโนกลอบบูลินที่ชะล้างออกจากคอลัมน์ไปตรวจการดูดกลืนแสงที่ OD280 และ OD250 นำ fraction ที่มีอัตราดูดกลืนแสง 280:250 ที่มีค่า 2.5-2.7 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก) ก่อนทำอิมมูโนกลอบบูลินที่สกัดได้ไปใช้ขีดเส้นตรวจ (test line) สำหรับแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ (Goat antirabbit, GAR-IgG) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (control line) ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Promega และเติม NaN_3 ลงใน CTV-IgG ที่สกัดได้ในอัตรา 0.2% แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนการใช้งาน

2) การเตรียมอนุภาคทอง (Colloidal gold particle)

การเตรียมอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร (CG-15)

เติม 1% HAuCl_4 ปริมาตร 1.5 มล. ลงในน้ำขจัดไอออน (deionized water) ปริมาตร 95 มล. ผสมให้เข้ากันดีแล้วต้มให้เดือดแล้วเติม 1% Sodium acetate ปริมาตร 1.5 มล. และคนให้เข้ากันและต้มต่อไปอีก 10 นาที ทิ้งให้เย็นก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมอนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร (CG-30)

เติม 1% HAuCl_4 ปริมาตร 1 มล. ลงในน้ำขจัดไอออน 97.5 มล. ต้มส่วนผสมให้เดือดนาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตรวจขนาดอนุภาคทองที่เตรียมได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission electron microscope) จำนวน 100 อนุภาค แล้วหาค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคทอง เพื่อพิสูจน์ขนาดของอนุภาคทองที่เตรียมได้

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

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของIgGที่จะเชื่อม(conjugate)เข้ากับอนุภาคทองโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Byzova *et al.* (2009) และ Solomone *et al.* (2004) โดยใช้ CTV-IgG เข้มข้น 5, 10, และ 50 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรสารแขวนลอยของเม็ดทอง (CG) เติม CTV-IgG ลงในทองแล้วคนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 20 mM borate buffer pH 8.0 ที่มีส่วนผสมของ Bovine Serum Albumin (BSA) 1% นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 39,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนทองที่ได้ด้วย 20 mM borate buffer pH 8.0 ที่มีส่วนผสมของBSA 1% แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำละลายตะกอนทองที่ได้ละลายใน 2 mM borate buffer pH 8.0 ที่มีส่วนผสมของBSA 0.1% หมุนเหวี่ยงที่ อัตราความเร็วและเวลาเท่าครั้งที่แล้ว ตะกอนทองที่ได้ครั้งนี้นำไปละลายด้วย PBS buffer ที่มีส่วนผสมของ 2% sucrose 1% BSA และ 0.25% Tween 20 อัตรา 1 มิลลิลิตร PBS buffer ต่อ 10 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยทองที่ใช้ตั้งต้นในการเตรียม แต่ครั้งก่อนนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ OD 540

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

ใช้อนุภาคทองขนาด CG-15 nm และ CG-30 nm เชื่อมกับแอนติบอดีของไวรัสที่ระดับความเข้มข้นซึ่งเป็นผลจากการทดลองในข้อ 3 นำอนุภาคทองซึ่งเชื่อมกับแอนติบอดี(CTV-IgG-CG conjugate) นี๊ดพ่นแผ่น conjugate pad (Whatman GF 33 Glass fiber, Whatman, Manchester ,UK) ในอัตรา 10 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรของconjugate pad การเตรียมเส้นตรวจ (Test line,T) และเส้นควบคุม(Control line, L)ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG)และแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ (Goat antirabbit, GAR-IgG) ตามลำดับ ชีดพ่นเส้นด้วยปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อซม.ของแผ่นตรวจไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน สำหรับ GAR-IgG (Sigma-Aldrich, MO, USA)ใช้ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นดูดซับตัวอย่าง (sample pad)ใช้ Millipore C048 (Millipore, MA, USA) และแผ่นซับ (absorbent pad)ใช้ Whatman 470 (Whatman, Manchester, UK) ตัดและประกอบแผ่นตรวจ(test strip)เข้าด้วยกันตามวิธีการของ Salmone และคณะ(2004) โดยมีความกว้างของแผ่นตรวจ 0.4 มิลลิเมตร ยาว 60 มิลลิเมตร และวางแผนการทดลองแบบ Factorial design มี 3 ปัจจัยคือ

A ขนาดของ CG (A1= IgG-CG15, A2 =IgG-CG30)

B ความเข้มข้นของCTV- IgG บน test line (B1 = เข้มข้น 1 mg/ml, B2 = เข้มข้น 0.1 mg/ml)

C แผ่นตรวจ Nitrocellulose membrane (C1 = CN 140 membrane ที่มี capillary reaction speed 110-165 sec/4cm, C2 = CN 95 membrane ที่มี capillary reaction speed 90-135 sec/4 cm)

ทรีทเมนต์	A1B1C1
ทรีทเมนต์	A1B2C1
ทรีทเมนต์	A1B1C2
ทรีทเมนต์	A1B2C2
ทรีทเมนต์	A2B1C1
ทรีทเมนต์	A2B2C1
ทรีทเมนต์	A2B1C2
ทรีทเมนต์	A2B2C2

โดยทำ 5 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ และใช้น้ำคั้นที่สกัดจากเปลือกเขียวของกิ่งมะนาวที่ติดเชื้อทริสเตซาไวรัสไอโซเลท SM4เจือจาง 1:10 เป็นตัวทดสอบ วัดค่าสีแดงที่ปรากฏบน test line ของแผ่นตรวจแต่ละทรีทเมนต์ ด้วยเครื่อง color meter (Hunter Lab, Virginia, USA) นำค่าความเข้มของสีที่วัดได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SASS เพื่อหาขนาดของ CG และความเข้มข้นของ CTV-IgG ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัส