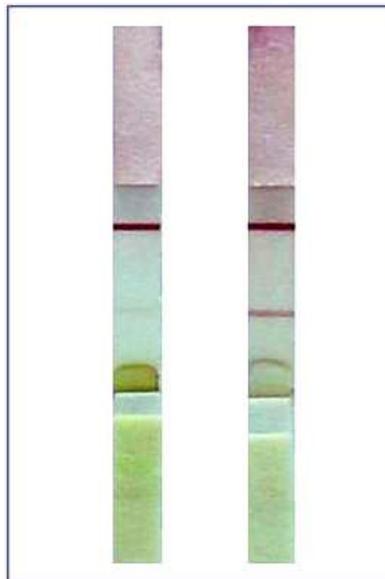




รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาการตรวจโรคทริสเตซาของส้มโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโต
กราฟีคลาเทอรัลโพล์



โดย

รัตนา สดุดี

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปี 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาการตรวจโรคทริสเทซาของส้มโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโต
กราฟีคลาเทอรัลโพล์

โดย

รัตนา สดุดี

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปี 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555 โดยความร่วมมือจาก
ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงใคร่ขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

(รศ.ดร.รัตนา สคูดี)

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

ซิทริสทริสเตชาไวรัส (CTV) เชื้อสาเหตุโรคทริสเตชาซึ่งเป็นโรคที่ร้ายแรงของพืชตระกูลส้ม การตรวจพบเชื้อไวรัสในระยะแรกของการเกิดโรค ทำให้สามารถควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้น การพัฒนาการตรวจโรคทริสเตชาโดยระบบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคลาเทอรัลโฟล์ (ICLF) ช่วยให้การตรวจโรคทริสเตชาทำได้ง่ายขึ้นและทราบผลในเวลาอันรวดเร็ว ในการพัฒนาแผ่นตรวจเชื้อทริสเตชาไวรัสโดยระบบ ICLF ครั้งนี้ ใช้นุภาคทองเป็นตัวบ่งชี้ (dye marker) ขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับแอนติบอดีของเชื้อไวรัสเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอนุภาคทอง ชีตเส้นตรวจ (test line, T) ด้วยแอนติบอดีของเชื้อไวรัส (CTV-IgG) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชีตเส้นควบคุม (control line, C) ด้วยแอนติบอดีของเซรัมกระต่ายปกติ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนแผ่นเซลลูโลสเมมเบรนที่มีอัตราการความเร็วจำเพาะของการเคลื่อนที่ของเหลว 110-165 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร ผลิตแผ่นตรวจ (test strip) ให้ผลตรวจดีที่สุด เนื่องจากเมื่อนำไปใช้ตรวจเชื้อทริสเตชาไวรัสในน้ำคั้นจากมะนาวติดเชื้อไอโซเลท SM4 เจือจาง 1:10 ปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจและเส้นควบคุมซึ่งหมายถึงตรวจพบไวรัสซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าภายในเวลาเฉลี่ย 3 นาที 39 วินาที (219 วินาที) และ 54.2 วินาที ตามลำดับ แต่เมื่อใช้นุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตรโดยมีเงื่อนไขอื่นเช่นเดิมเตรียมแผ่นตรวจ พบว่าสีบนเส้นตรวจและเส้นควบคุมจางลง และผลการวัดระดับความเข้มของสีแดงบนเส้นตรวจที่ใช้ทองขนาด 30 นาโนเมตร วัดได้ 0.488 ซึ่งสูงกว่าสีแดงที่เกิดจากการใช้ทองขนาด 15 นาโนเมตร วัดได้ 0.388 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แผ่นตรวจซึ่งเตรียมโดยใช้แอนติบอดีของทริสเตชาไวรัสที่ผ่านการจัดการปนเปื้อนของแอนติบอดีต่อโปรตีนพืช เมื่อใช้ตรวจน้ำคั้นของมะนาวปกติไม่เกิดสีบนเส้นตรวจหรือให้ผลลบ

Abstract

Citrus tristeza virus (CTV) is a causal pathogen of the most destructive diseases of citrus. Early detection of CTV is essential for prevention of disease epidemic. CTV detection using Immuno Chromatographic Lateral Flow (ICLF) system has been developed for rapid and simple diagnosis of tristeza disease. In this experiment, a test strip using 30 nm colloidal gold (CG) conjugated with 10 µg/ml of CG as dye marker and 1 mg/ml of CTV-IgG for test line (T) and 0.5 mg/ml of goat antirabbit IgG for control line (C) sprayed on cellulose membrane with capillary speed specific 110-165 sec/4 cm gave the best result. When the test strips were assayed for the virus in sap extract diluted 1:10 from the CTV (SM4 isolate) infected acid lime, red color as assessed by naked eyes appeared on both T and C within 3 min 39 sec (219 sec) and 54.2 sec, respectively. However, when 15 nm of CG was used with the same conditions to prepare the test strip resulted in the color on T and C were faded. Results confirmed that CG-30 nm produced color intensity (0.488) on the test line which was statistical significantly higher than the intensity obtained from CG-15 nm (0.388). Moreover, it was found that test strips using CTV-IgG previously cross absorbed with plant protein to eliminate the contamination of plant protein antibodies gave negative result with sap from a healthy acid lime.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
วิธีดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิจัย	9
สรุปและวิจารณ์	26
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก ก.	30
1. สูตรเตรียม ELISA บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร	30
2. วิธีการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA	31
ภาคผนวก ข.	32
1. ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ (ANOVA analysis)	32

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 1	9
2 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 2	10
3 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 3	10
4 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 4	11
5 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 5	11
6 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 6	12
7 แสดงจำนวนและขนาดของอนุภาคทองที่ตรวจพบในสารแขวนลอยทอง CG-30 nm	15
8 แสดงอนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร (ลูกศร) กำลังขยาย 750,000 เท่า	15
9 แสดงจำนวนและขนาดของอนุภาคทองที่ตรวจพบในสารแขวนลอยทอง CG-15 nm	16
10 แสดงอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร (ลูกศร) กำลังขยาย 750,000 เท่า	16
11 ลักษณะสีที่บ่งชี้การตกตะกอนของอนุภาคทองเมื่อเติมแอนติบอดี	18
12 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 3 ระดับ	19
13 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของทอง	22

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) เมื่อใช้เมมเบรน CN 140 และ CN 95 เม็ดทอง (CG) ขนาด 15 และ 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทอง	23
15 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตรของทอง เส้นตรวจ (T) ชีดด้วยแอนติบอดี ต่อเชื้อ CTV (CTV-IgG) ที่เข้มข้น 2 ระดับ และเส้นควบคุม (C) ชีดด้วยแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่ายปกติ (GAR-IgG) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	24
16 แสดงเส้นตรวจซึ่งชีดด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (CTV-IgG) เมื่อใช้ตรวจน้ำคั้นของมะนาวปกติ	25

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณและคุณภาพของแกมมาглоบบูลิน (IgG) สกัดจากแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัส บริสุทธิ์	13
2	ค่าดูดกลืนแสง (OD 405) ของปฏิกิริยา ELISA ที่เกิดจากการตอบสนองของแกมมากลอบูลิน (CTV-IgG) ต่อแอนติเจนของทริสเตซาไวรัส	14
3	แสดงผลผลิตการเชื่อมอนุภาคทอง (CG) กับแอนติบอดีของเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG)	17
4	แสดงผลตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นของมะนาวติดเชื้อไอโซเลท SM4 โดยแผ่นตรวจ (test strip) ระบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโฟล	21

บทนำ

พืชตระกูลส้มเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคตลาดมีความต้องการสูงทั้งภายในประเทศและภายนอกประเทศ (อภิชาติ, 2545) ทำให้เป็นที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายในทุกภาคของประเทศไทย ในการผลิตส้ม โรคเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง โรคที่เกิดกับพืชตระกูลส้มมีหลายชนิดแต่ที่สำคัญและทำความเสียหายมาก คือ โรคทริสเตซา ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Citrus Tristeza *Closterovirus* (CTV) พบว่าเป็นกับส้มทุกพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาวหรือมะกรูด และความรุนแรงของโรคนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ส้มและสายพันธุ์ของเชื้อที่เข้าทำลาย (รัตนา, 2537) การทำลายมีทั้งที่ทำให้ต้นส้มแห้งตายอย่างเฉียบพลัน หรือทำให้เกิดอาการลำต้นนวม ส่งผลให้ต้นส้มทรุดโทรม ผลผลิตและคุณภาพลดต่ำลง โรคทริสเตซาแพร่กระจายไปยังต้นส้มโดยติดไปกับท่อนขยายพันธุ์ และโดยแมลงพาหะ ปัจจุบันได้มีความพยายามป้องกันการเกิดของโรคโดยใช้กิ่งพันธุ์ปลอดโรคในการผลิตส้มแต่พบว่า การระบาดของโรคทริสเตซายังคงแพร่หลายในแหล่งปลูกทั่วประเทศทั้งนี้ เนื่องจากยังขาดวิธีการควบคุมพาหะของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ควบคู่กับการขาดความรู้เกี่ยวกับการสะสมของเชื้อสาเหตุในแปลงปลูกตลอดจนขาดประสบการณ์ในการวินิจฉัยโรคในเบื้องต้นของเกษตรกรผู้ปลูก และที่สำคัญยังไม่มีเครื่องมือในการตรวจสอบโรคที่ใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาในเชิงพาณิชย์ (Commercial CTV-diagnostic kit) ซึ่งเป็นที่ยอมรับและได้มีการนำไปใช้กันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น ชุดตรวจของ Plant Print Diagnosis SL, Valencia, Spain ชุดตรวจวินิจฉัยโรคทริสเตซามีการผลิตในหลายรูปแบบ มีทั้งชุดตรวจโรคที่ใช้เทคนิค DAS-ELISA เทคนิค Tissue Print-ELISA และเทคนิค Immunostrip ชุดตรวจโรคทริสเตซาซึ่งใช้เทคนิค Immunostrip มีขั้นตอนในการตรวจไม่ยุ่งยาก และได้ผลการตรวจภายในเวลาไม่เกิน 15 นาที

ทั้งนี้ได้มีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคทริสเตซาซึ่งใช้แผ่นตรวจ Immunostrip โดย รัตนา และคณะ (2551) แต่ในการพัฒนาชุดตรวจครั้งนี้พบการอุดตันของเม็ดลาเท็กซ์สีชมพูที่ปลายแผ่นตรวจ ซึ่งปัญหาการอุดตันดังกล่าวอาจเกิดจากขนาดของเม็ดลาเท็กซ์สีชมพู (280 nm) ไม่เหมาะสมกับขนาดช่อง (porosity) ในแผ่นตรวจซึ่งขนาดที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ คือ มีขนาด 1 ใน 10 ของช่องในแผ่นตรวจ (Bang, 1997) ปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นสืบเนื่องจากข้อจำกัดของขนาดเม็ดลาเท็กซ์ซึ่งผลิตเพื่อการค้า ดังนั้นจึงเป็นที่มาของข้อเสนอโครงการการพัฒนาชุดตรวจโรคทริสเตซาของส้มโดยใช้ระบบ Immunochromatographic Lateral Flow ซึ่งเป็นการใช้หลักการทางเซอรัมมิทาร์ร่วมกับการใช้ของสารละลายในเมมเบรน และเปลี่ยนไปใช้ตัวบ่งชี้ (dye marker) จำพวกอนุภาคทอง (colloidal gold) ซึ่งมีความหลากหลายของขนาดมากกว่าเม็ดลาเท็กซ์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกขนาดช่องของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาค Citrus tristeza virus (CTV)
2. เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Immunoglobulin (IgG) ที่ใช้ตรวจหาเชื้อ CTV
3. เพื่อคัดเลือกขนาดที่เหมาะสมของอนุภาคทอง (colloidal gold) ที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ IgG เพื่อเกิดสีที่ชัดเจนในการตรวจเชื้อ CTV

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาของส้ม โดยใช้ระบบตรวจแบบ Immunochromatic Lateral Flow และใช้อนุภาคทอง (colloidal gold) เป็นตัวบ่งชี้ (dye marker) ทั้งนี้จะนำแอนติเซรัมของเชื้อ CTV ซึ่งผลิตได้จากโครงการวิจัย “การพัฒนาวิธีการทางเซรัมวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย” มาใช้ในการทดลองครั้งนี้

ตรวจเอกสาร

โรคทริสเตซา

โรคส้มที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Citrus Tristeza *Closterovirus* (CTV) (Bar-Joseph and Lee, 1981) มีการรายงานครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้ ในปี ค.ศ. 1946 โรคได้ทำลายต้นส้มนับล้านต้นใน อาร์เจนตินา บราซิล แคลิฟอร์เนีย ฟลอริดา และสเปน ต่อมาโรคได้กระจายออกไปยังพื้นที่ปลูกส้มในแถบ เอเชีย และแอฟริกาใต้ (Roistacher, 1991) สำหรับประเทศไทยมีรายงานโรคทริสเตซาเกิดขึ้นกับ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มตรา ส้มจุก ส้มโชกุน และมะนาว โรคทริสเตซาทำให้เกิดอาการใบสี เส้นใบแตก ลำต้นบวม ต้นส้มทรุดโทรมและแห้งตายจากปลายยอด จากการรายงานโรคทริสเตซาในพื้นที่ปลูกส้มทั่วประเทศไทยระหว่างปี 2547-2552 พบการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ลำต้นบวม (Citrus Tristeza virus-stem pitting strain, SP) ซึ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงในส้มหลายชนิดรวมทั้งส้มโอซึ่งปลูกในจ.ราชบุรี และ จ.สงขลา ซึ่งสายพันธุ์ไวรัสชนิดนี้ทำให้ต้นส้มโอแคระแกรน เนื่องจากเกิดโพรงขนาดเล็กในลำต้นบริเวณ vascular cambium ทำให้ท่อน้ำ (xylem vessel) ขาดหายไป ซึ่งโพรงดังกล่าวนี้ คือ ร่องบวมที่ปรากฏในเนื้อไม้ของลำต้นและกิ่งของต้นส้ม (รัตนา และคณะ, 2552) จากการสำรวจโรคส้มในพื้นที่ปลูกส้มทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย (ภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ และ จ.เชียงราย, ภาคกลาง จ.ปทุมธานี และ จ.สมุทรสงคราม, ภาคตะวันออก จ.ตราด และ จ.ระยอง และภาคใต้ จ.นครศรีธรรมราช, จ.กระบี่, จ.ตรัง, จ.พัทลุง, จ.สงขลา และ จ.ยะลา) รวม 143 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 64 คิดเชื้อสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งก่อให้เกิดอาการลำต้นบวมในระดับรุนแรง และทำให้ต้นส้มแคระทำให้ผลผลิตลดลงประมาณ 50% (รัตนา และคณะ, 2551)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา

การแพร่ระบาดของโรคทริสเตซาพบในแหล่งปลูกทั่วประเทศ (รัตนา และคณะ, 2551) ทั้งนี้เนื่องจากการขาดประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคในเบื้องต้นของเกษตรกรผู้ปลูก ในหลายประเทศใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Clark and Adam, 1977; Roistacher, 1991; Sdoodee *et al.*, 2008) เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อทริสเตซา ต่อมาได้มีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สามารถปฏิบัติได้ด้วยตัวเองโดยไม่ต้องการความชำนาญเป็นพิเศษ และใช้เวลาสั้น (15 นาที) โดยใช้หลักการของ Immunochromatographic lateral flow (IGLF) ซึ่งมีทั้งที่ใช้ latex bead (Tsuda *et al.*, 1992) และใช้ colloidal gold เป็นตัวบ่งชี้ (Byzova *et al.*, 2009) หลักการของ Immunochromatographic assay ที่ใช้ latex bead เป็นตัวบ่งชี้ เตรียมแผ่นตรวจ (immunostrisp) โดยใช้เม็ดลาเท็กซ์ (latex bead) เป็นตัวกลาง (solid phase) ที่ยึดติดของแอนติบอดี ทั้งนี้ใช้เม็ดลาเท็กซ์สองชนิด (white and pink latex) เม็ดลาเท็กซ์สีขาวจะถูกเคลือบไว้ด้วย

แกมมากลอบบูลิน (IgG) จากแอนติเซรัมของเชื้อไวรัส และป้ายไบบนแผ่นตรวจซึ่งเป็นกระดาษกรองเมื่อปล่อยให้แห้งเม็ดลาเท็กซ์จะถูกตรึงไบบนแนวที่ป้ายไว้ ส่วนเม็ดสีชมพูทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ (dye marker) โดยเม็ดลาเท็กซ์สีชมพูจะดักจับไวรัสที่ปรากฏในน้ำคั้นแล้วเคลื่อนที่โดยการดูดซึมของเหลว (capillary action) ของแผ่นกระดาษกรองไปจนถึงแนวของเม็ดลาเท็กซ์สีขาว แกมมากลอบบูลินบนเม็ดลาเท็กซ์สีขาวจะยึดจับอนุภาคไวรัสทำให้เม็ดลาเท็กซ์สีชมพูไม่สามารถเคลื่อนที่ต่อไปได้ จึงเกิดเป็นแถบสีชมพูปรากฏให้เห็นบนแผ่นตรวจ ซึ่งหมายถึงการตรวจพบไวรัส การตรวจเชื้อไวรัสโดยวิธีนี้ได้มีการพัฒนาและประสบความสำเร็จในการตรวจเชื้อไวรัสหลายชนิดทั้งไวรัสที่มีอนุภาคกลม (Cucumber Mosaic Virus และ Tomato Spotted Wilt Virus) และอนุภาคเป็นท่อนยาว (Tobacco Mosaic Virus , Cymbidium Mosaic Virus และ Zucchini yellow mosaic virus) (Tsuda *et al.*, 1993) ต่อมา รัตนา และคณะ (2551) รายงานการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยใช้แผ่นตรวจ Immunostrip ซึ่งใช้หลักการของ IGFL โดยใช้สีของเม็ดลาเท็กซ์เป็นตัวบ่งชี้ และพบว่าแกมมากลอบบูลินซึ่งสกัดจากแอนติเซรัมของเชื้อ CTV ที่มีความเข้มข้น 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใช้เคลือบบนเม็ดลาเท็กซ์สีขาวและเม็ดลาเท็กซ์สีชมพู (marker) พบว่าเม็ดลาเท็กซ์สีขาวที่ความเข้มข้น 0.5% ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ซึ่งป้ายไบบนแผ่นตรวจอิมมูโนสตริปและเม็ดลาเท็กซ์สีชมพูเข้มข้น 0.05% สามารถใช้ตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ปรากฏในน้ำคั้นเจือจาง 1:5, 1:10, 1:50 และ 1:100 โดยปรากฏแถบสีชมพูบนแผ่นตรวจที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ทั้งนี้การตรวจในน้ำคั้นเจือจาง 1:5 ให้แถบสีชมพูที่มองเห็นชัดเจนที่สุดโดยมีความเข้มข้นของสีสูงสุด 1.391 เมื่อวัดด้วยเครื่องตรวจวัดสี (color meter) และในการทดลองความคงทนของแผ่นตรวจซึ่งป้ายเม็ดลาเท็กซ์สีขาวเป็นระยะเวลา 1 วัน 1 สัปดาห์ 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 7°C และ 28°C พบว่าแผ่นตรวจที่เก็บรักษาไว้ทุกระยะเวลายังคงทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสให้แถบสีชมพูที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ทั้งนี้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7°C ให้ความเข้มข้นของแถบสีลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นตรวจที่เก็บไว้ที่ 28°C จากผลการทดลองได้พัฒนาชุดตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยอิมมูโนสตริปซึ่งตรวจประกอบด้วยแผ่นตรวจ 5 แผ่น น้ำยาสกัดน้ำคั้น 5 หลอด น้ำยาตรวจเชื้อ 5 หลอด แท่งบดเนื้อเยื่อ 5 แท่ง พร้อมคู่มือแสดงวิธีการตรวจ

Byzova และคณะ (2009) ได้พัฒนาชุดตรวจโรคไวรัสในพืชด้วยเทคนิค Immunostrip โดยใช้หลักการของ Immunochromatographic assay มาใช้ในการตรวจไวรัสในพืชที่มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ carnation mottle virus (CarMV), bean mild mosaic virus (BMMV), tobacco mosaic virus (TMV), potato viruses X (PVX) และ potato viruses Y (PVY) โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ IgG ของไวรัสในพืชทั้ง 5 ชนิด จากการทดสอบได้คัดเลือก IgG ของไวรัสในพืชที่ความเข้มข้น 10, 10, 14, 20 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ ใน TMV, PVX, PVY, CarMV และ BMMV ตามลำดับ มาเชื่อมต่อกับอนุภาคของทอง (Colloidal gold) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในน้ำคั้นของพืช โดยจะทำการทดสอบคัดเลือกขนาดของอนุภาคทอง

ที่เหมาะสมที่จะนำเชื่อมต่อกับ IgG ของไวรัส โดยได้ทำการเตรียมอนุภาคทองที่ 2 ขนาด คือ 15 และ 30 นาโนเมตร จากการทดสอบได้เลือกอนุภาคของทองที่มีขนาด 30 นาโนเมตร มาใช้ในการเชื่อมต่อกับ IgG ของไวรัส จากพืชแต่ละชนิด และใช้ goat antibodies against rabbit IgG (Arista Biologicals, United States) มาเป็น control line ที่ความเข้มข้น 0.75 mg/ml ทำให้เห็นการปรากฏของแถบสีที่ชัดเจนภายใน 10 นาที สำหรับในการทดลองครั้งนี้จะใช้ ImmunoStrip ที่ผลิตโดยบริษัท Agdia ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการทดสอบโดยหยดน้ำคั้นของพืชลงบนแผ่นตรวจ ถ้าพืชติดเชื้อไวรัสก็จะปรากฏแถบสีบริเวณ test line และ control line

Hong-Ji Su (2008) ได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) ด้วย strip ซึ่งให้ผลที่รวดเร็วและแน่นอน สำหรับการพัฒนาในครั้งนี้ใช้ Monoclonal antibodies ต่อเชื้อ CTV ซึ่งผลิตที่มหาวิทยาลัยในประเทศไต้หวัน ใช้ strip ที่มีการพัฒนาขึ้นจากบริษัท Meikang Biological โดยจะใช้อนุภาคทอง (Colloidal gold) มาเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจ ใช้แอนติบอดีของไวรัสมาเป็น test line และใช้ anti-mouse antibody มาเป็น control line ทดสอบโดยตัดเนื้อเยื่อจากเส้นกลางใบแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก จากนั้นบรรจุลงในหลอด แล้วเติม extraction buffer ลงไป 0.8 มล. บดให้ละเอียดด้วยแท่งที่ใช้สำหรับบด แล้วนำ strip จุ่มลงไป ในหลอด จากการทดลองจะปรากฏแถบสีชมพูภายใน 2-3 นาที โดยความชัดเจนของแถบสีที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ CTV ในน้ำคั้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1) การสกัดอิมมูโนโกลบูลิน (CTV -IgG)

สกัดอิมมูโนโกลบูลิน (CTV-IgG) จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสซึ่งผลิตในโครงการวิจัย การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย ซึ่งผ่านการทดสอบโดยเทคนิค ELISA และพบว่ามามีปฏิกิริยาจำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับส้มปกติ และเชื้อสาเหตุโรคชวงลงบิง (รัตนา สดุดี และคณะ 2551) ด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนไอออนในคอลัมน์ DEAE ตามวิธีการของ Sdoodee (1989) โดยนำแอนติบอดีเจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 มล. มาตกตะกอนด้วยสารละลายอัมมัวแอมโมเนียมซัลเฟต (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 ของอิมมูโนโกลบูลินที่ชะล้างออกจากคอลัมน์ไปตรวจการดูดกลืนแสงที่ OD280 และ OD250 นำ fraction ที่มีอัตราดูดกลืนแสง 280:250 ที่มีค่า 2.5-2.7 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก) ก่อนทำอิมมูโนโกลบูลินที่สกัดได้ไปใช้ขีดเส้นตรวจ (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. ลงในน้ำจืดไอออน (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. ลงในน้ำจืดไอออน 97.5 มล. ต้มส่วนผสมให้เดือดนาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตรวจขนาดอนุภาคทองที่เตรียมได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission electron microscope) จำนวน 100 อนุภาค แล้วหาค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคทอง เพื่อพิสูจน์ขนาดของอนุภาคทองที่เตรียมได้

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

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของIgGที่จะเชื่อม(conjugate)เข้ากับอนุภาคทองโดยคัดแปลงจากวิธีการของ Byzova *et al.* (2009) และ Solomone *et al.* (2004) โดยใช้ CTV-IgG เข้มข้น 5, 10, และ 50 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรสารแขวนลอยของเม็ดทอง (CG) เดิม 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 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยทองที่ใช้ตั้งต้นในการเตรียมแต่ละครั้ง ก่อนนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ OD 540

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

ใช้อนุภาคทองขนาด CG-15 nm และ CG-30 nm เชื่อมกับแอนติบอดีของไวรัสที่ระดับความเข้มข้นซึ่งเป็นผลจากการทดลองในข้อ3 นำอนุภาคทองซึ่งเชื่อมกับแอนติบอดี(CTV-IgG-CG conjugate) ฉีดผ่านแผ่น 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 ปิดพื้นเส้นด้วยปริมาตร 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)

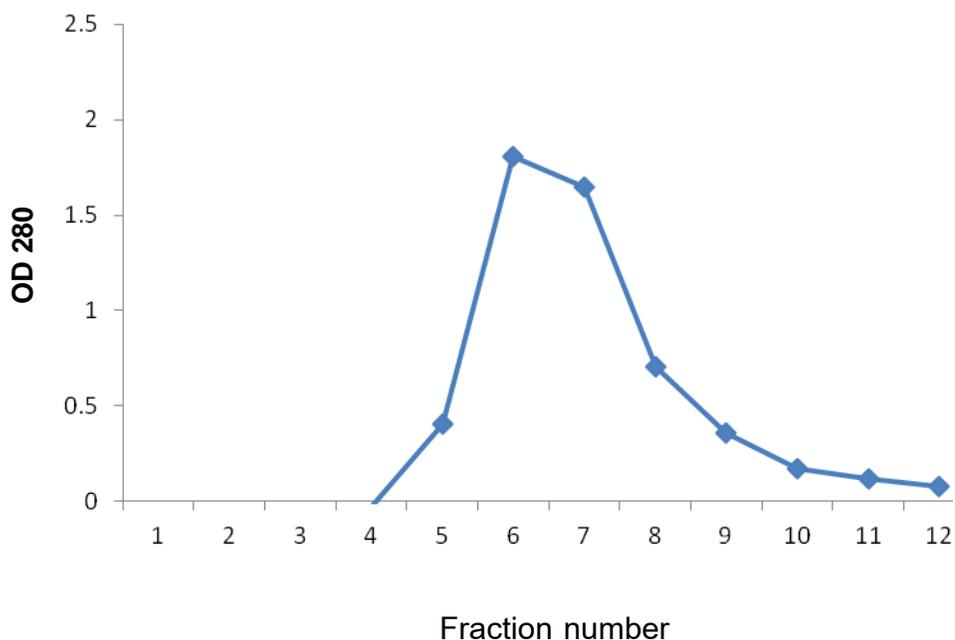
ทริทเมนต์	A1B1C1
ทริทเมนต์	A1B2C1
ทริทเมนต์	A1B1C2
ทริทเมนต์	A1B2C2
ทริทเมนต์	A2B1C1
ทริทเมนต์	A2B2C1
ทริทเมนต์	A2B1C2
ทริทเมนต์	A2B2C2

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

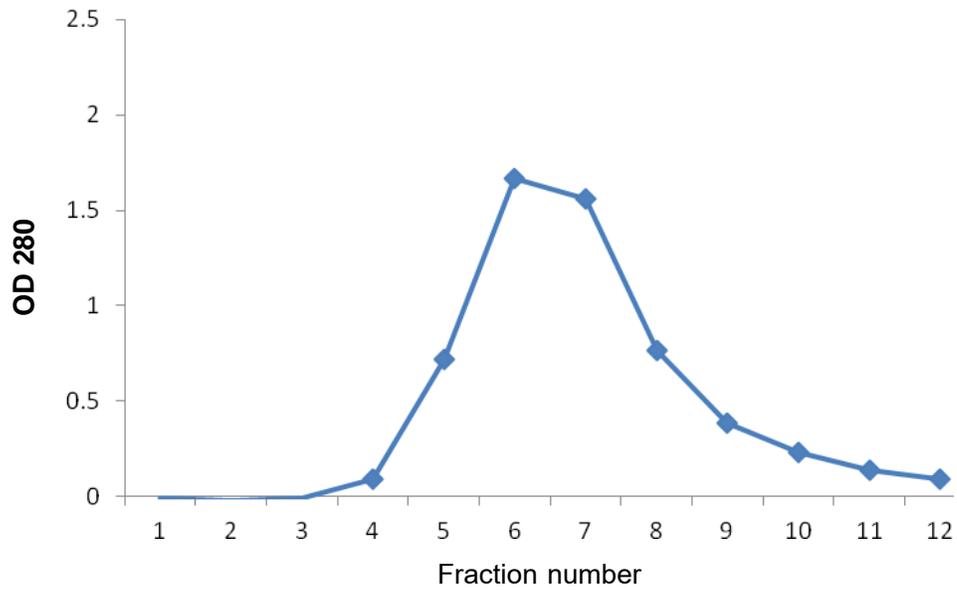
ผลการวิจัย

1) การสกัดอิมมูโนโกลอบบูลิน (CTV-IgG)

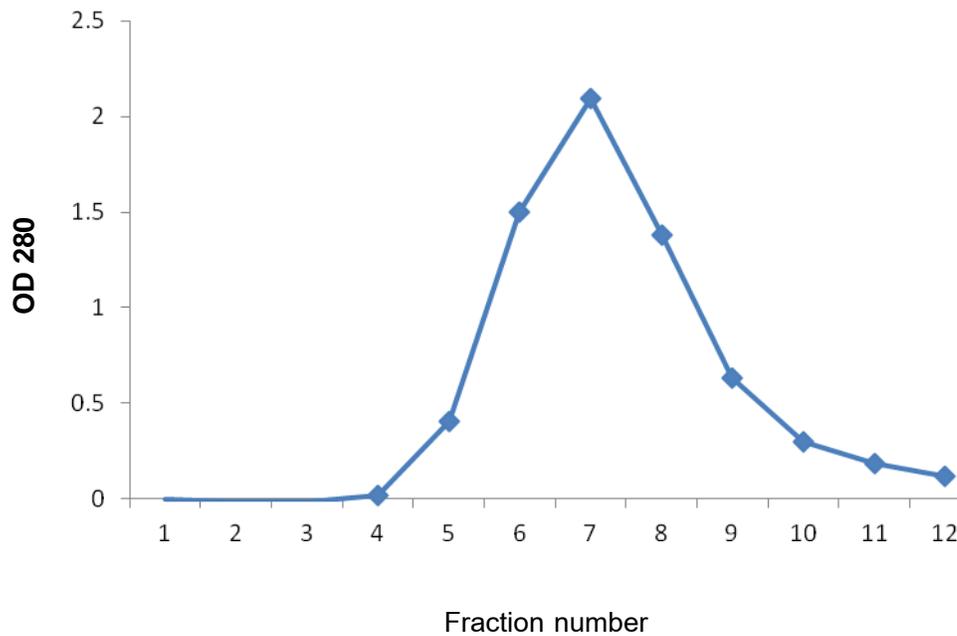
ผลการสกัดแอมมามากلوبบูลิน (CTV-IgG) ออกจากโพลีแอนติบอดีที่ละลายอยู่ในแอนติเซรัม (crude antiserum) ต่อเชื้อทริสเตรซาไวรัสบริสุทธิ์ พบ IgG ใน fraction ที่ 4-9 (ภาพที่ 1-6) สำหรับ IgG ของ fraction 6-8 มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อประเมินจากค่าดูดกลืนแสง OD 280:250 (ตารางที่ 1) และผลผลิตของ IgG ที่สกัดได้เฉลี่ย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



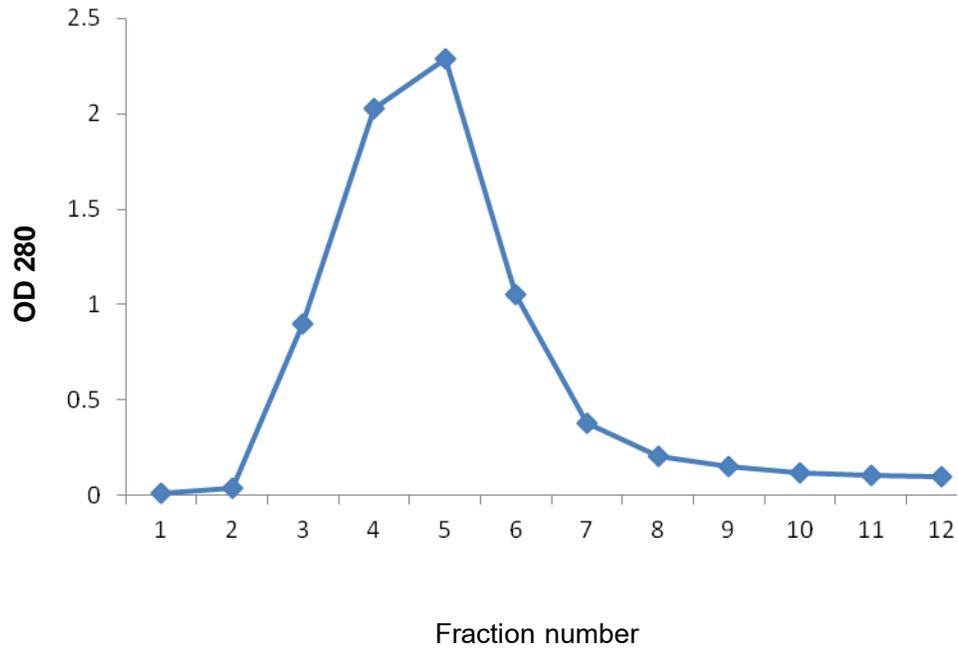
ภาพที่ 1 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตรซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 1



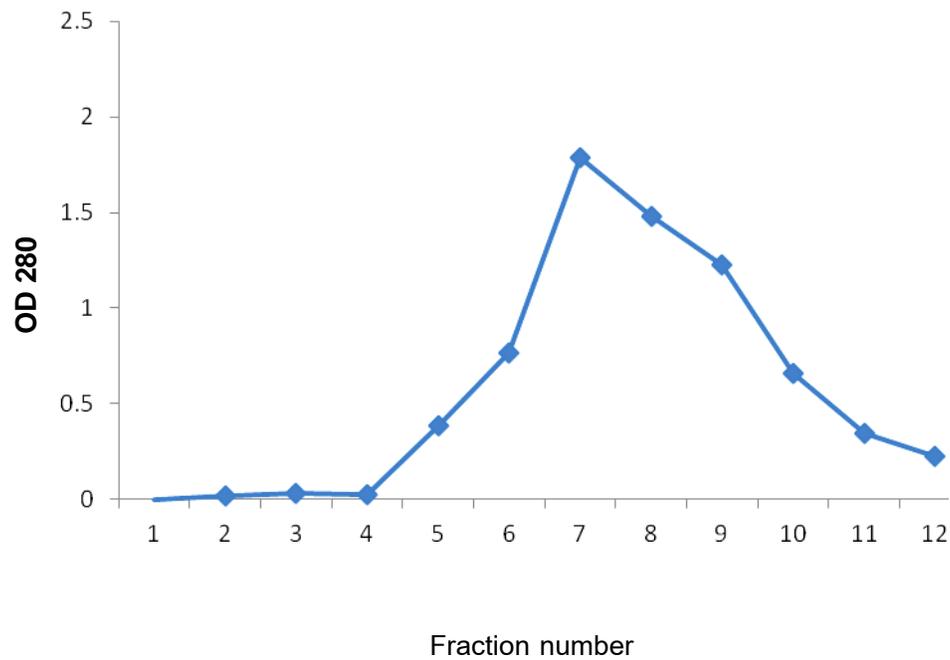
ภาพที่ 2 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 2



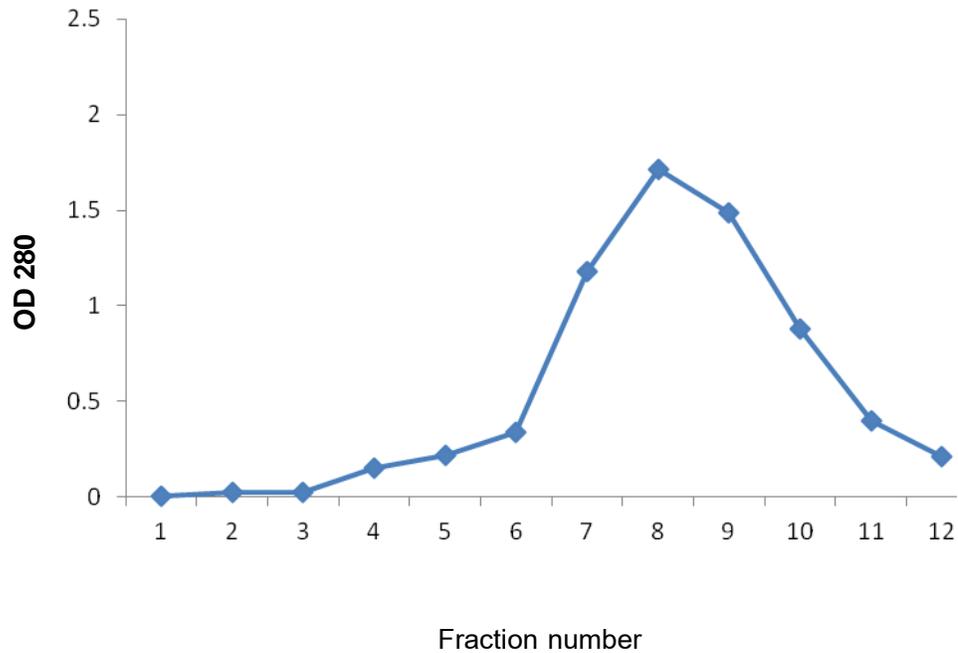
ภาพที่ 3 การดูดกลืนแสง OD280 ของ Fraction ซึ่งชะล้าง (elute) จาก DEAE column เพื่อแยก IgG จากแอนติเซรัม (crude antiserum) ของเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์ครั้งที่ 3



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



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



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

ตารางที่ 1 ปริมาณและคุณภาพของแกมมาไกลอบบูลิน (IgG) สกัดจากแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตชาไวรัสบริสุทธิ์

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) โดยสกัดจากแอนติบอดีของเชื้อทริสเตชาไวรัส

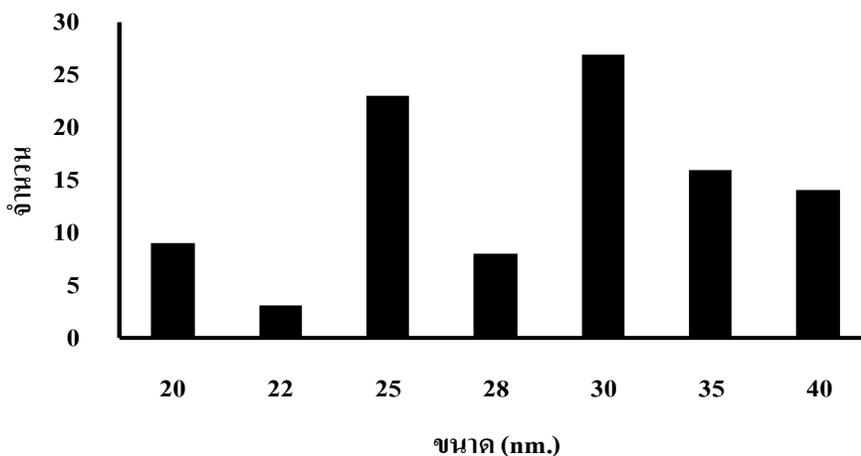
จากการนำ CTV-IgG ที่แยกได้มาทดสอบความไวและประสิทธิภาพโดยอีไลซา (Plate Trapped ELISA) พบว่ามีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสค่อนข้างสูง และไม่ตอบสนองต่อมะนาวปกติ เมื่อใช้ IgG ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

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

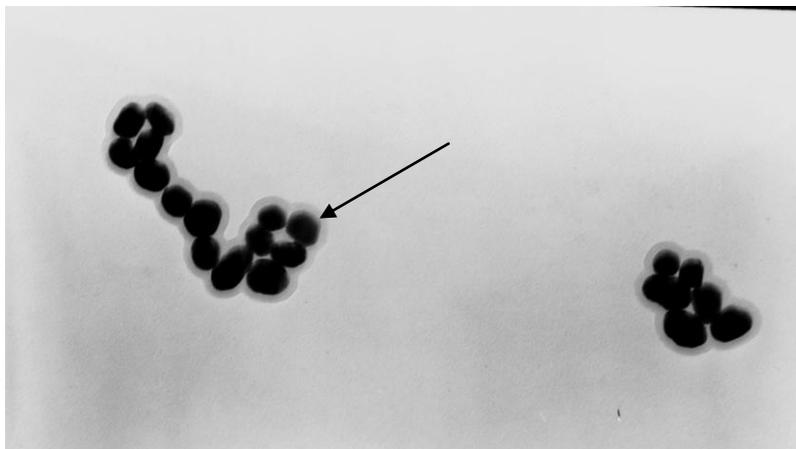
การสกัด IgG ครั้งที่	Fraction no ^{1/}	ELISA OD 405 ($\bar{x} \pm SD$)
1	F5	1.109 ± 0.009
	F6	1.214 ± 0.016
	F7	1.514 ± 0.060
	F8	1.826 ± 0.642
	F9	1.111 ± 0.050
2	F5	1.266 ± 0.028
	F6	1.020 ± 0.033
	F7	1.487 ± 0.038
	F8	1.372 ± 0.010
	F9	1.178 ± 0.172
3	F5	1.096 ± 0.032
	F6	1.104 ± 0.071
	F7	1.318 ± 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)

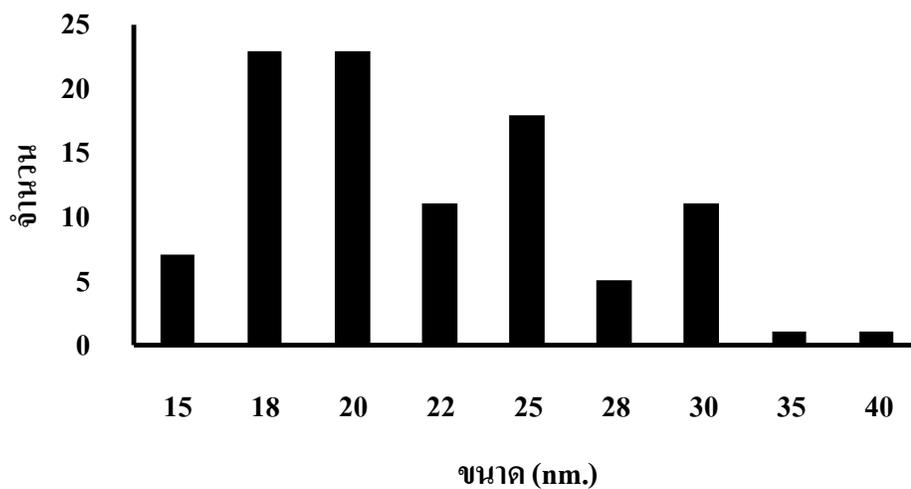
ผลการเตรียมสารแขวนลอยทองอนุภาคขนาด 30 นาโนเมตร เมื่อนำสารแขวนลอยไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แล้วสุ่มวัดขนาดอนุภาคทองที่ตรวจพบจำนวน 100 อนุภาคต่อกริดพบว่าประชากรส่วนใหญ่ของอนุภาคทองคือประมาณ 27 % มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 30 nm ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 สำหรับผลการเตรียมสารแขวนลอยทองอนุภาคขนาด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



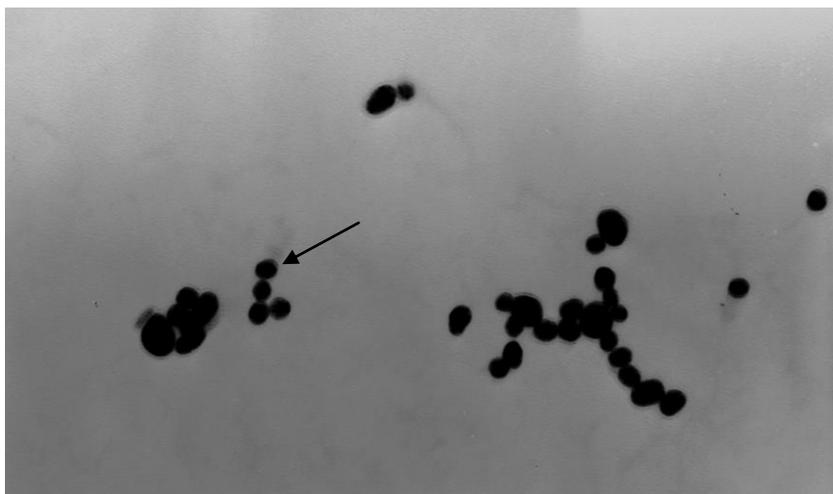
ภาพที่ 7 แสดงจำนวนและขนาดของอนุภาคทองที่ตรวจพบในสารแขวนลอยทอง CG-30 nm



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

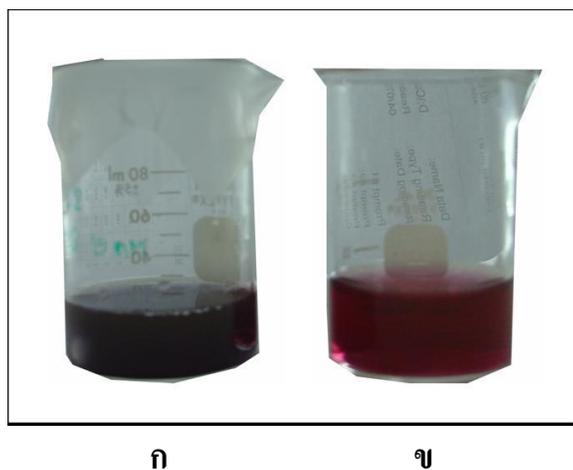
3) การเชื่อมอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) เข้ากับอนุภาคทอง (Colloidal Gold, CG)

ผลการเชื่อมอนุภาคทอง (CG) เข้ากับแอนติบอดีเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG) พบว่าการเชื่อมอนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร กับ CTV-IgG เข้มข้น 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรของทอง พบว่าเกิดการตกตะกอนของอนุภาคทองเนื่องจากสารละลายแขวนลอยของทองเปลี่ยนเป็นสีม่วง (ภาพที่ 11) ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ คือ OD 540 = 1.61 และ OD 540 = 1.89 ตามลำดับ เมื่อนำ CG-IgG ไปทดสอบตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส พบว่า CG-IgG ที่ใช้ขนาดทอง 30 นาโนเมตร และใช้ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรของทอง ให้ผลผลิตดีที่สุดเพราะปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 12)

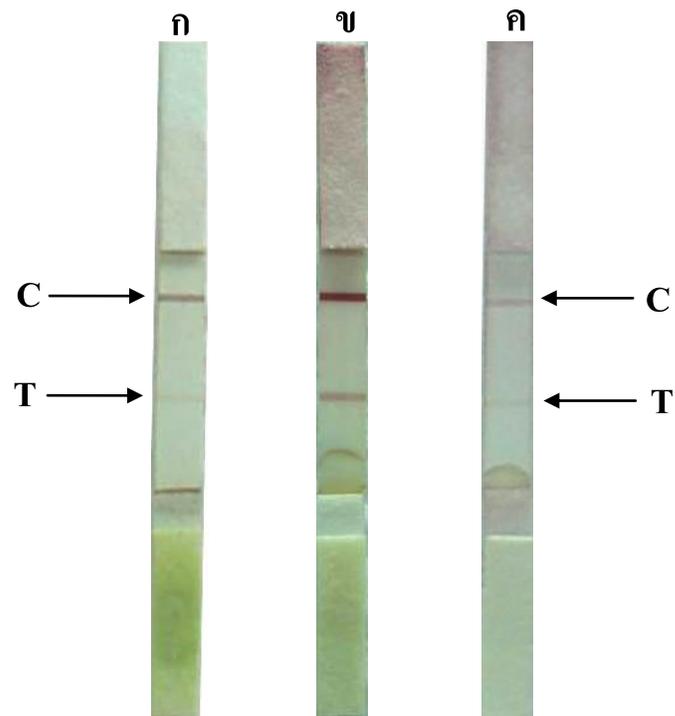
ตารางที่ 3 แสดงผลผลิตการเชื่อมอนุภาคทอง (CG) กับแอนติบอดีของเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV-IgG)

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

^L NA = Not applicable (ไม่ได้ทำการทดลอง)



ภาพที่ 11 ลักษณะสีที่บ่งชี้การตกตะกอนของอนุภาคทองเมื่อเติมแอนติบอดี (ก) เปรียบเทียบกับสภาพปกติของสารละลายแขวนลอยของทอง (ข)



ภาพที่ 12 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทอง
 ขนาด 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ IgG เข้มข้น 3 ระดับ: T (Test line, T) ชีคด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อCTV
 (CTV-IgG) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร); C (Control line) ชีคด้วยแอนติบอดีต่อเซรัมของกระต่าย
 ปกติ(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) ขณะที่ปัจจัยของเซลล์ูโลสเมมเบรนที่มีอัตราความเร็วจำเพาะในการเคลื่อนที่ที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อระดับความเข้มของสีบนเส้นตรวจ 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 ให้ผลการตรวจดีที่สุด เมื่อใช้ตรวจหาทริสเตซาไวรัส น้ำคั้นจากมะนาวติดเชื้อไวรัสไอโซเลท SM 4 เนื่องจากปรากฏสีแดงชัดเจนที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าบนเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C) ดังภาพที่ 13 ภายในเวลา 3 นาที 39 วินาที (219 วินาที) และ 54.2 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยสีแดงบนเส้นตรวจมีระดับความเข้มกว่าเส้นตรวจของแผ่นตรวจที่ใช้อนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร ซึ่งใช้เมมเบรน CN 140 หรือเมมเบรน CN 95 (ตารางที่ 4 ภาพที่ 14) นอกจากนี้พบว่าการใช้แอนติบอดีที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดเส้นตรวจ ไม่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในน้ำคั้น เนื่องจากไม่ปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจภายหลังหยดด้วยน้ำคั้นของไวรัสลงบนแผ่นตรวจ (ภาพที่ 15) แอนติบอดีของเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ผ่านการขจัด (cross absorbed) การปนเปื้อนแอนติบอดีของโปรตีนพืช โดยการเติมน้ำคั้นของมะนาวปกติเจือจาง 1:10 ด้วย PBS buffer ลงในแอนติบอดีของไวรัสเพื่อให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วบ่มแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เตรียมแผ่นตรวจ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีไม่ทำปฏิริยาข้ามกับน้ำคั้นของมะนาวปกติ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 4 แสดงผลตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นของมะนาวติดเชื้อไอโซเลท SM4 โดยแผ่นตรวจ (test strip) ระบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโฟล์

ทริทเมนต์			การปรากฏของ สีแดงบน ^{4/}		ค่าความเข้มของสี แดงบนเส้น T ^{5/} ($\bar{x} \pm SD$)	ระยะเวลาปรากฏของสี (วินาที) ^{6/}	
เมมเบรน ^{1/}	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

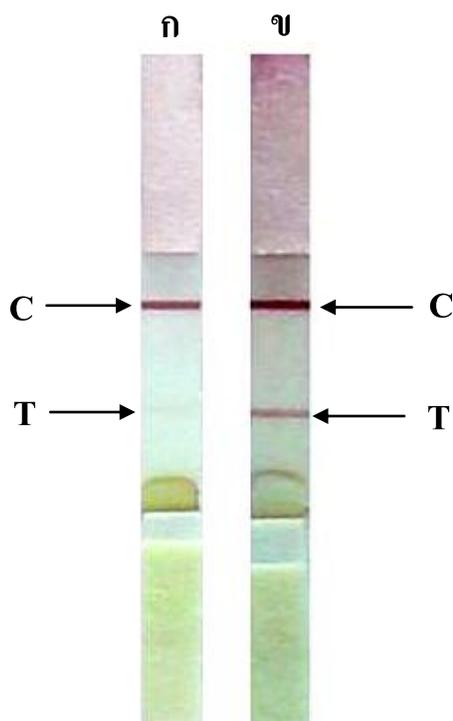
^{3/} ระดับความเข้มของ CTV-IgG ที่ใช้ขีดเส้นตรวจ (Test line, T)

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

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

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

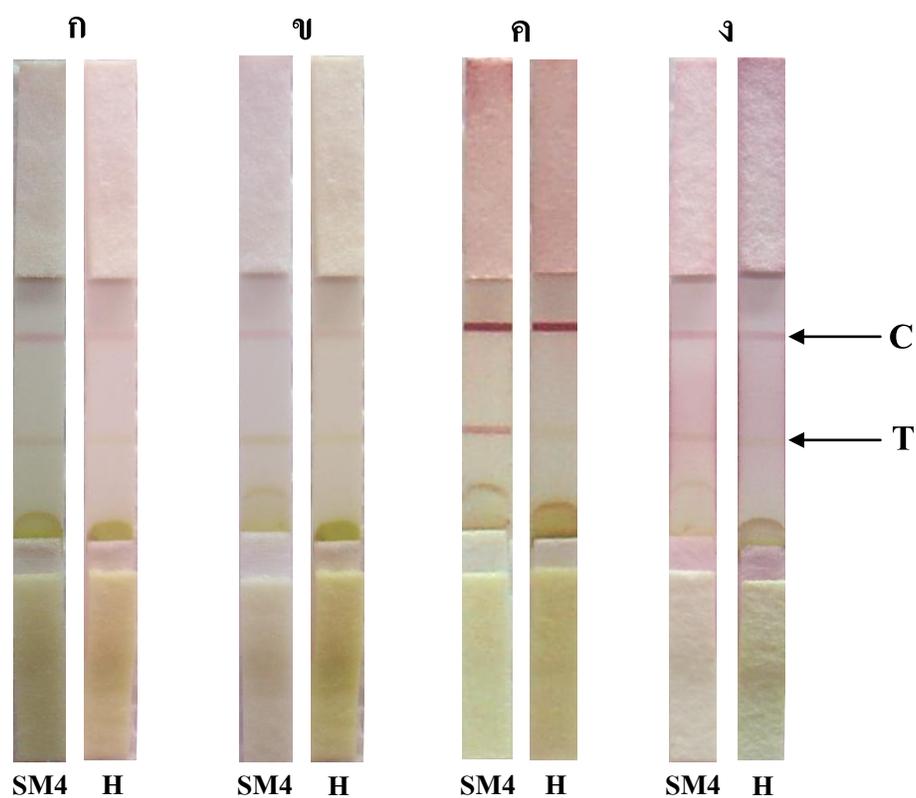
^{6/} ระยะเวลาการปรากฏสีแดงบนเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C) เฉลี่ยจาก 5 แผ่นตรวจต่อทริทเมนต์



ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) ด้วยแผ่นตรวจ (test strip) ซึ่งใช้เม็ดทองขนาด 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



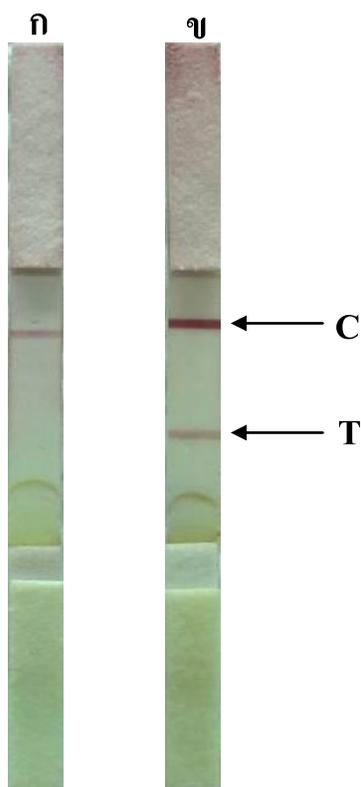
ภาพที่ 14 แสดงผลการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) เมื่อใช้เมมเบรน CN 140 และ CN 95 ฝึคทอง (CG) ขนาด 15 และ 30 นาโนเมตร เชื่อมกับ CTV-IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของทอง: SM4 = มะนาวติดเชื้อ CTV, H = มะนาวปกติ

ก. เมมเบรน CN 140, CG 15 nm

ข. เมมเบรน CN 95, CG 15 nm

ค. เมมเบรน CN 140, CG 30 nm

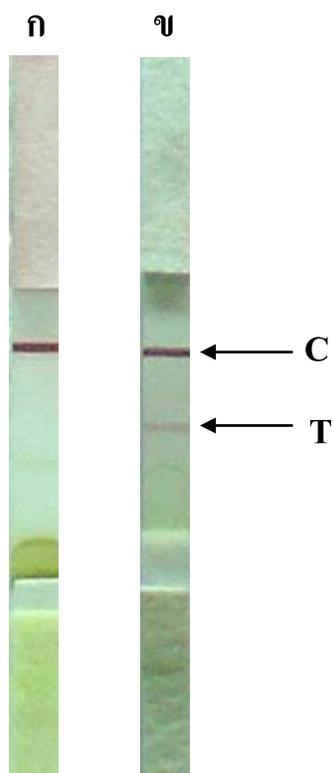
ง. เมมเบรน CN 95, CG 30 nm



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

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

ข. เส้นตรวจ (T) จี๊ดด้วย 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

สรุปและวิจารณ์

ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทริสเทซาโดยระบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโฟล์ (ICFL) ครั้งนี้ พบว่าขนาดของอนุภาคทอง (CG) ซึ่งใช้เชื่อมกับแอนติบอดีของทริสเทซาไวรัส (CTV-IgG) เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดสีบนเส้นตรวจ (Test line) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (dye marker) ของการตรวจพบเชื้อไวรัส ดังจะเห็นได้ว่าการใช้อนุภาคทองขนาด 30 นาโนเมตร ให้สีแดงชัดเจนกว่าการใช้อนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร (ภาพที่ 14 และตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของการตรวจเชื้อทริสเทซาไวรัสโดยใช้แผ่นตรวจระบบ lateral flow โดย Salmone และคณะ (2004) ทั้งนี้ชนิดของเมมเบรนที่ใช้ขีดเส้นตรวจ (Test line) เป็นปัจจัยรอง ดังผลการวิเคราะห์ความเข้มของสีแดงบนเส้นตรวจที่ใช้เมมเบรน CN 140 และ CN 95 กับอนุภาคทองขนาดเดียวกันบ่งชี้ว่าสีแดงบนเส้นตรวจของ CN 140 เข้มกว่า CN 95 แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และ ภาคผนวก ข) และพบว่าเกิดการเกิดสีบนเส้นตรวจของเมมเบรน CN 95 เร็วกว่า CN 140 (ตารางที่ 4) ทั้งนี้เนื่องจากเมมเบรน CN 95 มีอัตราการเคลื่อนที่ของของเหลว (capillary speed specification) ที่ 90-135 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตรซึ่งเร็วกว่า เมมเบรน CN 140 ซึ่งมีอัตราความเร็วที่ 110-165 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร แต่ในทางกลับกันเมมเบรน CN 140 มีความจำเพาะของการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนสูงกว่าเมมเบรน CN 95 เนื่องจากความเข้มของสีบนเส้นตรวจของเมมเบรน CN 140 โดยเฉลี่ยสูงกว่าสีที่เกิดบนเมมเบรน CN 95 (ตารางที่ 4 ภาพที่ 14) ทั้งนี้เกิดจากสองปัจจัยคือปัจจัยแรก เมมเบรน CN 140 ยึดจับแอนติบอดีที่อัตรา 30 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรของเมมเบรน ซึ่งมากกว่าการยึดจับของเมมเบรน CN 95 มีการยึดจับที่อัตรา 28 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรของเมมเบรน ปัจจัยที่สองเกิดจากเมมเบรน CN 140 มีการเคลื่อนที่ของของเหลวที่ช้ากว่าทำให้เพิ่มโอกาสการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีบนเส้นตรวจกับแอนติเจน ซึ่งจับกับอนุภาคทอง (CG -IgG conjugate) และเคลื่อนที่มาพร้อมกับของเหลว ขณะที่เมมเบรน CN 95 มีอัตราการเคลื่อนที่ของของเหลวที่ 90-135 วินาทีต่อ 4 เซนติเมตร ทำให้โอกาสการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนลดลง

จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า แผ่นตรวจที่ใช้ CG 30 nm-IgG conjugate ที่มี IgG เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทอง และขีดเส้นตรวจด้วย IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนเมมเบรน CN 140 ให้ผลตรวจดีที่สุด เนื่องจากสีแดงที่ปรากฏบนเส้นตรวจสามารถมองเห็นชัดเจนด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 13 ,14 และ 15) และเกิดขึ้นภายในเวลาอันรวดเร็วเฉลี่ย 3 นาที 39 วินาที หรือ 219 วินาที (ตารางที่ 4) ซึ่งใกล้เคียงกับชุดตรวจโรคกลัวไม้ที่เกิดจากไวรัส (สุรภี และคณะ 2547) และการเกิดสีแดงบนเส้นควบคุม (C) เมื่อใช้เมมเบรน CN 140 และเมมเบรน CN 95 บ่งชี้ว่าเมมเบรนทั้งสองชนิดมีขนาดช่องทำให้โมเลกุลของ CG- IgG conjugate

เคลื่อนที่ผ่านไปได้ทำให้ผลตรวจเป็นที่น่าเชื่อถือ (สุรภิ และคณะ 2547 กิตติศักดิ์ และคณะ 2549 และ Byzova *et al.*, 2009)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าความจำเพาะเจาะจงของแผ่นตรวจระบบ ICFL ขึ้นอยู่กับคุณภาพของ แอนติบอดีของทริสเตซาไวรรัส (CTV-IgG) คือปราศจากการปะปนของแอนติบอดีต่อโปรตีนของพืชปกติเมื่อเปรียบเทียบการใช้แอนติบอดีที่ผ่านและไม่ผ่านการ cross absorbed ด้วยโปรตีนของมะนาวปกติ ก่อนนำไป เชื่อมกับทองหรือนำไปจิดเป็นเส้นตรวจ (T) พบว่าแผ่นตรวจที่ใช้แอนติบอดีซึ่งผ่านการ cross absorbed ไม่ทำ ปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติเนื่องจากเมื่อนำแผ่นตรวจไปทดสอบกับน้ำคั้นของมะนาวปกติไม่เกิดสีบนเส้นตรวจ (ภาพที่ 16 ก) ขณะที่แผ่นตรวจที่ใช้แอนติบอดี ที่ไม่ผ่านการ cross absorbed เกิดสีจางๆบนเส้นตรวจ (ภาพที่ 16 ข)

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร, สุรภี กิริติยะอังกูร และเขาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT เพื่อตรวจสอบเชื้อ Potato virus y ในมันฝรั่ง. *วารสารวิชาการเกษตร* 24(2) : 168-177.
- รัตนา สดุดี. 2537. โรคโทรมของส้ม (*Citrus reticulata* Blanco) : เชื้อสาเหตุและปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงของโรค *วารสารสงขลานครินทร์* 16 (4) : 353-367.
- รัตนา สดุดี, สมปอง เตชะโต และ John Milne. 2551. โครงการ การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (สกว.). 118 หน้า.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้. *วารสารโรคพืช* (1-2) : 1-14.
- อำไพวรรณ ภราคร์นุวัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล วิเชียร กำจายภัย สุพัฒน์ อรรถธรรม และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2527. โรคส้มในประเทศไทย ห้างหุ้นส่วนจำกัดพันนิพัลชีชิ่ง กรุงเทพฯ 126 หน้า.
- อภิชาติ ศรีสอาด. 2545. 8 เชื้อนสวนส้ม. นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ. 138 หน้า.
- Bang, L. B. 1997. Immunological Application of Microsphere. The Latex Course, Bang Laboratories, Inc.
- Bar-Joseph, M., and Lee, R.F. 1981. Citrus tristeza virus: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 353.
- Byzova, N. A., Safenkova, I. V., Chirkov, S. N., Zherdev, A. V., Blintsov, A. N., Dzantiev, B.B. and Atabekov, I. G. 2009. Development of Immunochromatographic Test Systems for Express Detection of Plant Viruses. *Applied Biochemistry Microbiology* Vol 45 (2):204-209.
- Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquín, C., Román, M. P., Olmos, A. Martínez, M. C., de Mendoza, A.H., Lo'pez, A. and Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71: 85–95.
- Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475- 483.
- Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible disease of Citrus : Handbook for Detection and Diagnoses. International Organization of Citrus Virologist, FAO, Rome, 286 p.
- Salomone, A., Mongelli, M., Roggero, P. and Boscia, D. 2004. Reliability of detection *Citrus tristeza virus* by an immunochromatographic lateral flow assay in comparison with ELISA. *Journal of plant Pathology* 86(1): 43-48.

- Sdoodee, R. 1989. Biological and physicochemical properties of tobacco streak virus. Ph. D Thesis, The University of Queensland, Australia, 185 pp.
- Sdoodee, R. Sriboonkong, N. and Sutdhikaranya, Y. 2008. Production of disease-free mother trees and budwood of 'Neck Orange' in Southern Thailand. *Acta Hort.* 773: 45-50.
- Su, H. J. 2008. Production and Cultivation of Virus-free Citrus Saplings for Citrus Rehabilitation in Taiwan. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi and Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, Bangkok, 51 pp.
- Tsuda, S., Lwaki-Kameya, M., Hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M. and Tomaru, K. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: rapid immunofilter paper assay (RIPA). *Plant Disease.* 76 :466-469.
- Tsudu, S. Kameya_Lwaki., Handa, K., Fujisawa, L., and Tomaru, K. 1993. Simultaneous diagnosis for plant infected with multiple virus employing rapid immunofilter paper assay (RIPA) with two-step method; Multi-RIPA. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* Vol 59 (2):200-203.

ภาคผนวก ก

1. สูตรเตรียม ELISA บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร (Roistacher, 1991)

1.1 Coating buffer

Na_2CO_3	1.59	กรัม
--------------------------	------	------

NaHCO_3	2.93	กรัม
------------------	------	------

NaN_3	0.20	กรัม
----------------	------	------

(pH 9.6)

1.2 Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.00	กรัม
---------------	------	------

KH_2PO_4	0.20	กรัม
--------------------------	------	------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.90	กรัม
--	------	------

KCl	0.20	กรัม
--------------	------	------

(pH 7.2 – 7.4)

1.3 Washing buffer (PBS-T)

PBS	1.0	ลิตร
-----	-----	------

Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

1.4 Conjugate buffer

PBS-T	1.0	ลิตร
-------	-----	------

Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000	20	กรัม
--------------------------------	----	------

1.5 Substrate buffer

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
----------------	----	-----------

NaN_3	0.2	มิลลิลิตร
----------------	-----	-----------

(ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl)

1.6 Reaction stopping solution

NaOH	120	กรัม
---------------	-----	------

2. วิธีการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (Roistacher, 1991)

- 2.1 บดเส้นกลางใบหรือเปลือกซึ่งลอกจากกิ่งของตัวอย่างส้มในบัฟเฟอร์ (coating buffer) ในอัตรา 1:10 ด้วยครกบดจนได้น้ำคั้น (sap extract) นำน้ำคั้นไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 2.2 ใส่น้ำคั้นลงในหลุม (Polystyrene ELISA plate) ตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง (หรือหนึ่งคืน)
- 2.3 เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำคั้นทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
- 2.4 ใสแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัส (ผลิตโดย DSMZ ประเทศเยอรมันนี) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ให้มีระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบัฟเฟอร์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มแอนติเซรัมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- 2.5 เมื่อครบกำหนดเวลาเทแอนติเซรัมทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
- 2.6 ใสแอนติบอดี (Goat antirabbit conjugate with alkaline phosphatase, ZYMED) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ในอัตรา 1:4,000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- 2.7 เมื่อครบกำหนดเวลาเทแอนติบอดีทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที
- 2.8 ใส substrate (p – nitrophenyl phosphate, ZYMED) ซึ่งละลายด้วยบัฟเฟอร์ (substrate buffer) ในอัตราความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบัฟเฟอร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาของแอนติบอดี (stopping reagent) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ก่อนนำไปปฏิบัติ ELISA ไปดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (OD405) ด้วยเครื่อง ELISA Reader

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ (ANOVA analysis)

ปัจจัย ^{1/}	df	SS	MS	F	Pr>F ^{2/}
ปัจจัย A	1	0.0432	0.0432	2.11	0.1654 ^{ns}
ปัจจัย B	1	0.0994	0.0994	4.86	0.0425 [*]
ปัจจัยสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B	1	0.0001	0.0001	0.01	0.9387 ^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	16	0.3275	0.0205		
รวม	19	0.4703			

^{1/} ปัจจัย A ชนิดของเซลลูโลสเมมเบรน A1 = CN 140, A2 = CN 95

ปัจจัย B ขนาดของ colloidal gold (CG) B1 = CG 15 nm, B2 = CG 30 nm

^{2/} ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, * = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05