



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Cymbidium Mosaic Virus* และการตรวจสอบ
ทางซีรัมวิทยา

Production of Monoclonal Antibodies against *Cymbidium Mosaic Virus* and Serological
Detection

นามผู้วิจัย นางสาววิภาวี ทองศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี องประยูร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ศศิวิรรณ บุรีคำ, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ, D.Agr.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Cymbidium Mosaic Virus* และ
การตรวจสอบทางซีรัมวิทยา

Production of Monoclonal Antibodies against *Cymbidium Mosaic Virus* and
Serological Detection

โดย

นางสาววิภาวี ทองศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2552

วิภาวี ทองศรี 2552: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Cymbidium Mosaic Virus* และการตรวจสอบทางซีรัมวิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D. 85 หน้า

Cymbidium mosaic virus (CymMV) เป็นไวรัสที่เข้าทำลายกล้วยไม้และพบการแพร่ระบาดมากที่สุดในโลก วิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการตรวจสอบส่วนขยายพันธุ์กล้วยไม้ปลอดโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CymMV และพัฒนาวิธี ELISA สำหรับการตรวจสอบ จากการเชื่อมเซลล์มัยอิโดมากับเซลล์ม้ามของหนูเมาส์และคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV ได้ไฮบริโดมาจำนวน 4 โคลน คือ Cy1, Cy2, Cy3 และ Cy4 ซึ่งทุกโคลนผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CymMV โดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่นและพืชปกติ ในการตรวจสอบเชื้อ CymMV โดยเปรียบเทียบวิธี indirect, direct และ sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า วิธี indirect PTA-ELISA มีความไวในการตรวจสอบสูงสุดคือสามารถตรวจเชื้อได้ถึงระดับ 0.25 นาโนกรัม การเปรียบเทียบความแม่นยำของวิธีทางซีรัมวิทยาที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบทางการค้า GLIFT kit โดยใช้ตัวอย่างจากต้นกล้วยไม้หายมาตามและเนื้อเยื่อกล้วยไม้จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าวิธี 3 วิธี ตรวจพบเชื้อ CymMV เท่ากัน จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 76.67% ของตัวอย่างทั้งหมด โดยครึ่งหนึ่งของจำนวนนี้ตรวจพบการสะสมของเชื้อ CymMV ที่รากมากกว่าที่ใบอ่อน จากผลการวิจัยพบว่าวิธีทางซีรัมวิทยาที่พัฒนาขึ้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณภาพดี มีความจำเพาะเชื้อ CymMV สูง สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบกล้วยไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Wipawee Thongsri 2009: Production of Monoclonal Antibodies against *Cymbidium Mosaic Virus* and Serological Detection. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assitant Professor Ratchanee Hongprayoon, Ph.D. 85 pages.

Cymbidium mosaic virus (CymMV) is the most prevalent virus infecting orchids worldwide. Reliable detection method is required to investigate for virus-free orchid propagation materials. This study aimed to produce monoclonal antibodies (MAbs) against CymMV and develop the detection protocol in ELISA format. Four hybridoma cell lines producing anti-CymMV antibodies were obtained from fusions namely Cy1, Cy2, Cy3 and Cy4. All of them were highly specific to CymMV and no cross reaction with other plant viruses or healthy sap was observed. Comparison of direct, indirect and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of CymMV demonstrated that indirect PTA-ELISA gave highest sensitivity which as low as 0.25 ng virus could be detected. Thirty young leaf and root samples from *Dendrobium* spp. and tissue culture were used in the experiment to compare the efficiency of our developed ELISA with commercially available GLIFT kit. All of the samples gave the same results in which 76.67% of the samples were positive by 3 methods. Interestingly the signals showed higher virus accumulation in root than leaf samples among 50% of the positive samples. This study confirmed the efficiency these serological detection by using high quality and specific MAbs for the detection of this virus in orchids.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.รัชนิ สงประยูร ที่ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้การเอาใจใส่ดูแล และให้คำปรึกษาที่ดีในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขเล่มปัญหาพิเศษจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร. ศิริวรรณ บุรีคำ กรรมการวิชาเอกที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างพืช ผศ.ดร. พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ กรรมการวิชาการ ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการเซรุ่มวิทยา อาคารปฏิบัติการวิจัยศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ เสมอมา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ได้อบรมสั่งสอนให้เป็นคนดี ให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์แก่ผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

วิภาวี ทองศรี
กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	58
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	67
ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	76
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมจากหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการฉีดกระตุ้น และทดสอบด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA ใช้ไวรัสบริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นแอนติเจน	32
2	อัตราการเกิดเซลล์ไฮบริโดมาใน fusion plate ของการเชื่อมเซลล์ 3 ครั้ง และจำนวนไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV	34
3	ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไฮบริโดมา 4 โคลน ด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA	36
4	ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไฮบริโดมา 4 โคลน โดยใช้น้ำคั้นพืชที่เป็นโรค ด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA	37
5	อิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี rec-Protein G-Sepharose column chromatography	38
6	การหาไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นแอนติเจน	40
7	การเจือจางน้ำคั้นกล้วยไม้หวายมาตามที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CymMV ทดสอบด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA	40
8	ความไวในการตรวจเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ ด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาได้	41
9	การหาไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ ด้วยวิธี Direct PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นแอนติเจน	44
10	การเปรียบเทียบค่า S/N ratio ของการตรวจเชื้อ CymMV จากกล้วยไม้หวายมาตามด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาได้	46
11	ผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ CymMV ในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้หวายมาตาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay โดยใช้ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:1,000	48
12	อัตราการเจือจางแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ CymMV ด้วยวิธี ELISA และ TBIA	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13 ผลการตรวจเชื้อ CymMV จากตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตาม 30 ตัวอย่างด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA, TBIA และ GLIFT kit	51
 ตารางผนวกที่	
ข1 อัตราเจือจางน้ำคั้นพืชที่ใช้ และเวลาในการทำ cross absorb ในแต่ละหน่วยทดลอง (treatments) ทดสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA	77
ข2 อัตราเจือจาง MAb-Cy1 ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา Indirect PTA-ELISA	78
ข3 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา Direct PTA-ELISA	79
ข4 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:500	80
ข5 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:1,500	81
ข6 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:3,000	82
ข7 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:5,000	83
ข8 อัตราเจือจาง primary antibody (MAb-Cy2) ต่อ secondary antibody (MAb-Cy1-AP) ในปฏิกิริยา DAS-ELISA	84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กล้วยไม้หวายมาดามที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการทาง ซีรัมวิทยา	26
2	กล้วยไม้หวายมาดามที่แสดงอาการโรคจากเชื้อ CymMV และลักษณะอนุภาคของ เชื้อ CymMV ที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV โดยวิธี IEM	30
3	ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CymMV วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting	31
4	การเปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1-AP ในการตรวจเชื้อ CymMV ในใบ อ่อน ใบแก่ และราก ของกล้วยไม้หวายมาดาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay	47
5	ผลการตรวจเชื้อ CymMV จากกล้วยไม้หวายมาดาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay โดยใช้ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:1,000 เปรียบเทียบกับ GLIFT kit	53
6	ผลการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดามที่ให้ผลบวกและผลลบกับวิธี indirect ELISA และ TBIA โดยวิธี one-step RT-PCR	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A_{405}	= Absorbent at 405 nanometer wavelength
A_{260}	= Absorbent at 260 nanometer wavelength
A_{280}	= Absorbent at 280 nanometer wavelength
AP	= Alkaline phosphatase
BCIP	= 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
C	= Concentration
CB	= Carbonate coating buffer
cDNA	= complementary DNA
CMF Hanks	= Calcium and magnesium free Hanks balanced salt solution
CP	= Coat protein
CymMV	= <i>Cymbidium mosaic virus</i>
CymMV-CP-F	= CymMV-Coat Protein-Forward primer
CymMV-CP-R	= CymMV-Coat Protein-Reverse primer
CymMV-K1	= CymMV-Korea strain 1
CymMV-K2	= CymMV-Korea strain 2
CymMV-R	= CymMV-Reunion isolate
CymMV-S1	= CymMV- Singapore strain 1
CymMV-S2	= CymMV-Singapore strain 2
CymMV-TW	= CymMV-Taiwan strain
D	= Diseased sap
DAS-ELISA	= Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
DEP	= Dilution end point
Direct PTA-ELISA	= Direct plate-trapped antigen ELISA
Direct TBIA	= Direct tissue blot immunoassay
DMRT	= Duncan's Multiple Range Test
$\epsilon^{0.1\%}_{260\text{ nm}}$	= extinction coefficient
ELISA	= Enzyme-linked immunosorbent assay
FAM	= 6-carboxyfluorescein

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

GLIFT kit	= Gold labeling IgG flow test
H	= Healthy sap
HAT medium	= Hypoxanthine thymidine aminopterin medium
HT medium	= Hypoxanthine thymidine medium
IEM	= Immunoelectron microscopy
IgG	= Gamma-Immunoglobulin
IgY	= Yolk immunoglobulin
Indirect PTA-ELISA	= Indirect plate-trapped antigen ELISA
IP	= Intraperitoneal injection
kDa	= Kilo Dalton
LC/MS	= Liquid chromatography/mass spectrometry
LIV	= Longevity <i>in vitro</i>
M	= Molecular weight
MAb	= Monoclonal antibody
MAb-Cy1-AP	= Monoclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase
MAb-Cy1	= Anti-CymMV monoclonal antibody from hybridoma clone Cy2
MAb-Cy2	= Anti-CymMV monoclonal antibody from hybridoma clone Cy1
MALDI	= Matrix-assisted laser desorption-ionization
<i>nad5</i>	= The plant mitochondrial NADH dehydrogenase gene
NBT	= Nitro blue tetrazolium salt
NCM	= Nitro cellulose membrane
ORSV	= <i>Odontoglossum ringspot virus</i>
P	= Purified virus
PAb-CymMV	= Anti-CymMV polyclonal antibodies
PBS	= Phosphate buffer saline
PBST	= Phosphate buffer saline with 0.05% Tween-20
PCR	= Polymerase chain reaction
PEG	= Polyethylene glycol

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PMV	= <i>Papaya mosaic virus</i>
pNPP	= <i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PVX	= <i>Potato virus x</i>
QCM	= Quartz Crystal Microbalance
RdRp	= RNA-dependent RNA polymerase
RIPA	= Rapid immunofilter paper assay
RPMI 1640	= Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	= Reverse transcription polymerase chain reaction
S_{20W}	= Sedimentation coefficient
SDS-PAGE	= Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
Sk	= Skimmed milk
S/N ratio	= Signal-to-noise ratio
TAMRA	= 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
TBE	= Tris borate EDTA
TBS	= Tris-buffer saline
TBST	= Tris-buffer saline with 0.05% Tween-20
TD/RT-PCR	= Touch-down reverse transcriptase PCR
TET	= Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
TGB	= Triple Gene Block
TIP	= Thermal inactivation point
TMV-O	= <i>Tobacco mosaic virus orchid strain</i>
TSWV	= <i>Tomato spotted wilt virus</i>
UV	= Ultraviolet
WCIMV	= <i>White clover mosaic virus</i>

**การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Cymbidium Mosaic Virus* และ
การตรวจสอบทางซีรั่มวิทยา**

**Production of Monoclonal Antibodies against *Cymbidium Mosaic Virus* and
Serological Detection**

คำนำ

กล้วยไม้เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในรูปของไม้ตัดดอกและกล้วยไม้กระถาง มูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดเมื่อปี พ.ศ. 2551 มีมากกว่า 2,400 ล้านบาท และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2551) แต่การผลิตกล้วยไม้มักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคกล้วยไม้ ซึ่งทำให้คุณภาพของสินค้าลดลง ผลผลิตต่ำ ปริมาณของผลผลิตไม่สม่ำเสมอ โรคที่สำคัญ และพบการแพร่กระจายทั่วไปในแหล่งปลูกกล้วยไม้ ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) ซึ่งสร้างความเสียหายให้กล้วยไม้มากที่สุด (Khentry *et al.*, 2006) เชื้อ CymMV เป็นไวรัสในวงศ์ *Flexiviridae* สกุล *Potexvirus* มีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ความยาวเฉลี่ยประมาณ 480 นาโนเมตร เข้าทำลายกล้วยไม้ได้เกือบทุกชนิด ทำให้เกิดลักษณะอาการที่หลากหลายขึ้นกับสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปมักพบอาการด่าง (mosaic) หรือจุดด่างเป็นสีเหลือง (chlorotic fleck) ยอดบิด (twisty top) ดอกเล็กและช่อดอกสั้น ผลผลิตน้อยไม่คุ้มกับการลงทุน คุณภาพของดอกไม้ได้มาตรฐาน กล้วยไม้ที่เป็นโรคแสดงอาการช่อดอกสั้น กลีบดอกบิด ดอกมีสีซีด หรือดอกด่าง มูลค่าของผลผลิตลดลง เชื้อ CymMV ถ่ายทอดได้โดยวิธีกลและสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ หรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการเกษตรต่างๆ วิธีตรวจเชื้อ CymMV ที่ได้รับความนิยมมีสองวิธีการ คือการตรวจด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา ได้แก่ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และการตรวจโดยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้แก่ วิธี Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) แต่วิธีทางซีรั่มวิทยาเป็นวิธีที่สะดวก สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมากๆ และรวดเร็ว จึงสะดวกต่อการใช้งาน หากแอนติบอดีคุณภาพดี มีความจำเพาะสูง จะทำให้การตรวจสอบมีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ เหมาะกับการพัฒนาไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อเชื้อ CymMV และพัฒนาวิธีการทางซีรั่มวิทยาที่มีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ ในการตรวจสอบตัวอย่างต้นกล้วยไม้และกล้วยไม้ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CymMV
2. พัฒนารูปแบบการตรวจเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้ ที่มีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจเอกสาร

1. กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในอยู่ในวงศ์ออร์คิดาซีอี (Family Orchidaceae) ซึ่งจัดเป็นวงศ์ของพืชมีดอกที่ใหญ่ที่สุด ปัจจุบันพบว่ามีประมาณ 880 สกุล มากกว่า 25,000 ชนิด และมีขอบเขตความหลากหลายของรูปร่าง ลักษณะ ตลอดจนอุปนิสัยแตกต่างกัน ซึ่งสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ของแหล่งกำเนิดที่มีการกระจายอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามในแถบศูนย์สูตรของโลกซึ่งเป็นเขตร้อนและมีความชุ่มชื้นสูง เราจะพบกล้วยไม้ตามธรรมชาติ ทั้งในด้านปริมาณและชนิดต่างๆ มากกว่าพื้นที่ซึ่งอยู่นอกเหนือไปจากนี้ (ระพี, 2542) เมื่อจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโตจะแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) ประเภทโมโนโพเดียล (Monopodial) เป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตทางยอดหรือไม่แตกกอ เช่นกล้วยไม้สกุลแวนดา (*Vanda*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) และ 2) ประเภทซิมโพเดียล (Sympodial) คือ กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตทางด้านข้าง หรือมีการแตกกอ เช่น กล้วยไม้สกุลแคทลียา (*Cattleya*) สกุลเดินโดรเบียม (*Dendrobium*)

กล้วยไม้สกุลเดินโดรเบียม หรือ หวาย เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศไทย นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ และรวบรวมกล้วยไม้ชนิดนี้ที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิด มีรูปร่างลักษณะทั้งดอกใบ และลำลูกกล้วยแตกต่างกันออกไป เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่ และเป็นกอ ใบแข็งแรงสีเขียว ดอกมีกลีบชั้นนอกคู่บน และคู่ล่างขนาดยาวพอๆ กัน โดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเป็นกลีบเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่าง และส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันจะปลูดยอดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า เดือยดอก สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2541)

โรคกล้วยไม้เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการค้ากล้วยไม้ โดยโรคที่สำคัญที่พบในกล้วยไม้ได้แก่โรคที่เกิดจากเชื้อรา และเชื้อไวรัส ตัวอย่างของโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคเน่าดำเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* โรคดอกสนิมหรือจุดสนิมเกิดจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* โรคใบปื้นเหลืองเกิดจากเชื้อ *Pseudocercospora dendrobii* แต่โรคที่เกิดจากเชื้อราเมื่อพบต้นที่เป็นโรค

ก็จะสามารถควบคุมและกำจัดได้ง่ายกว่าโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งยังไม่มีวิธีการใดรักษาโรคได้ และยังเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคไปได้กว้างขวาง (Lawson and Ali, 1975)

2. ไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของกล้วยไม้

ไวรัสที่พบระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในปัจจุบันมีหลายกลุ่ม คือ *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Rhabdovirus*, *Tabamovirus*, *Tombusvirus* และ *Tospovirus* (Gibbs *et al.*, 2000) แต่ไวรัสกล้วยไม้ที่สำคัญและพบการแพร่ระบาดมากในต่างประเทศ และในประเทศไทย ซึ่งทำความเสียหายกับกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้า มีเพียง 2 ชนิด คือ *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) และ *Tobacco mosaic virus- orchid strain* (TMV-O) หรือเรียกว่า *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (Jensen and Gold, 1953; Lawson and Ali, 1975; ชีระ, 2532)

วัชรินทร์ (2525) พบว่าโดยทั่วไปเชื้อ CymMV และ ORSV จะเข้าทำลายร่วมกัน และมักพบว่า CymMV เป็นสาเหตุหลักของโรคของกล้วยไม้ในสกุลต่างๆ เกือบทุกสกุล ส่วน ORSV จะพบในบางสกุล เช่น แคทลียา และ ออนซิเดียม

เชื้อ CymMV

มีรายงานการพบโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้เป็นครั้งแรกโดย Jensen ในปี 1950 ซึ่งพบว่าเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้ซิมบิเดียม (*Cymbidium*) ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกาและทำความเสียหายกับผลผลิตราว 15-70% ของกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้า ซึ่งการแพร่ระบาดของเชื้อ CymMV พบได้ทั่วไปอย่างกว้างขวางทั้งในสหรัฐอเมริกา อังกฤษ ฝรั่งเศส และประเทศอื่นๆ ที่มีการปลูกกล้วยไม้ ในประเทศไทยมีการศึกษาโรคไวรัสในกล้วยไม้ในปี พ.ศ. 2510 โดย ดร. ชีระ สุตะบุตร โดยพบว่าเชื้อ CymMV ทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้สกุลต่างๆ หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสกุลเด็นโดรเบียม และเชื้อ CymMV เป็นเชื้อไวรัสพืชชนิดแรกในประเทศไทยที่มีการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาวิจัยโรคไวรัสพืชในประเทศไทยอย่างกว้างขวางจนถึงปัจจุบัน (ชีระ, 2532)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

CymMV เป็นไวรัสในวงศ์ (Family) Flexiviridae สกุล (Genus) *Potexvirus* มีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) โดยมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 480 นาโนเมตร และกว้างประมาณ 13 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสประกอบด้วยสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) ประมาณ 6% และส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณ 94% คิดเป็นโปรตีนขนาด 27.6 กิโลดาลตัน (kDa) (Francki and McLean, 1968)

สมบัติทางกายภาพ

CymMV มีค่า sedimentation coefficient ที่ $120 S_{20W}$ มีความคงทนต่อความร้อนในสภาพน้ำคั้น (thermal inactivation point, TIP) ได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ความคงทนของอนุภาคไวรัสในสภาพน้ำคั้นที่อุณหภูมิห้อง (longivity *in vitro*, LIV) นาน 25 วัน และความสามารถในการก่อโรคมียุทธศาสตร์ความเจือจางสูงสุด (dilution end point, DEP) ที่ 1:10,000 ถึง 1:100,000 (Kado and Jensen, 1964) อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280}/A_{260} เท่ากับ 0.91 $\pm$ 0.02 และมีค่า extinction coefficient เท่ากับ 2.97 (Frowd and Tremaine, 1977)

ชีววิทยาระดับโมเลกุล

CymMV มีจีโนม (genome) เป็นอาร์เอ็นเอสายบวก (monopartite positive sense RNA) ขนาดยาวประมาณ 8.1 กิโลเบส (Frowd and Tremaine, 1977) ทางด้านปลาย 5' ต่อด้วย cap ($m^7 G 5' ppp$) และพบตำแหน่งของ poly (A) ด้านปลาย 3' และส่วนของปลาย 3' มีการสร้าง subgenomic mRNA ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein, CP) และโปรตีนสำหรับการเคลื่อนที่ของอนุภาคไวรัส (cell-to-cell movement protein) (Matthews, 1922) และจากการศึกษาในสภาพทดลองพบว่าจีโนมของ CymMV ประกอบด้วยบริเวณที่แปลรหัสเป็นโปรตีน (open reading frame, ORF) 5 ตำแหน่ง ควบคุมการสร้างโปรตีน 5 ชนิด คือบริเวณตำแหน่งเบสที่ 73 ถึง 4326 แปลรหัสให้โปรตีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ขนาด 147 kDa มีหน้าที่ในการเพิ่มปริมาณไวรัสบริเวณตำแหน่งเบสที่ 4333 ถึง 5478 แปลรหัสให้ cell-to-cell movement protein เรียกว่า Triple Gene Block (TGB) เนื่องจากแบ่งส่วนการสร้างโปรตีนออกเป็น 3 ชนิด โดยการสร้าง subgenomic mRNA ได้โปรตีนขนาด 26 kDa, 13 kDa และ 10 kDa ตามลำดับ บริเวณ

ตำแหน่งเบสที่ 5481 ถึง 6152 แปลรหัสให้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ขนาดประมาณ 26 kDa (Wong *et al.*, 1997)

เมื่อทดลองเปรียบเทียบความเหมือนของการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค CymMV กับไวรัสในกลุ่ม *Potexvirus* ได้แก่ *Papaya mosaic virus* (PMV), *Potato virus X* (PVX), *White clover mosaic virus* (WCIMV) พบว่ามีความเหมือนคิดเป็น 24.65%, 31.39% และ 39.47% ตามลำดับ (นัญวรรณ, 2538) และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเชื้อ CymMV ไอโซเลตต่างๆ ที่เข้าทำลายกล้วยไม้ โดยใช้ส่วนของยีน CP Chen *et al.* (2005) ศึกษาจากไอโซเลตในกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบสายนิวคลีโอไทด์ และสายเปปไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลยีน CP ของเชื้อ CymMV ใน GenBank มีความเหมือนกันถึง 92-98% และ 98-99% ตามลำดับ

Chia *et al.* (1992) ศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีน CP ของเชื้อ CymMV ที่พบในประเทศไทย สิงคโปร์ โดยสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลออนซีเดียม (*Oncidium Gower Ramsey*) พบว่ายีน CP อยู่บริเวณปลายด้าน 3' ประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์ขนาด 660 คู่เบส แปลเป็นโปรตีนได้ 220 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 23.6 kDa และเมื่อเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสในกลุ่ม *Potexvirus* ด้วยกันคือเชื้อ PVX และ WCIMV พบว่ามีความเหมือนกันสูงเฉพาะตรงกลางสายเปปไทด์ แต่โดยรวมทั้งหมดนั้นค่าความเหมือนอยู่ในระดับต่ำโดยคิดเป็นร้อยละ 39 และ 37 ตามลำดับ

สมบัติทางชีววิทยาของเชื้อ CymMV

CymMV เป็นแอนติเจนที่ดีสามารถนำไปผลิตแอนติซีรัมได้ดีและให้ค่าไตเตอร์สูง ในการตรวจสอบส่วนต่างๆ ของต้นกล้วยไม้โดยวิธี ELISA จากส่วนต่างๆ ของพืช พบเชื้อ CymMV ทั้งในใบ ก้านช่อดอก ราก และเกสรตัวผู้ การตรวจหาเชื้อ CymMV จากใบสามารถใช้วิธีการตกตะกอนในของเหลวและผ่านตัวกลางกึ่งแข็ง (ธีระ, 2532) และไม่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์ทางชีววิทยากับเชื้อไวรัสในจีนัสเดียวกัน เช่นเชื้อ PVX และ WCIMV

Vejaratpimol *et al.* (1998) ศึกษาเชื้อ CymMV จำนวน 22 ไอโซเลต จากกล้วยไม้ที่เป็นโรคจำนวน 35 ตัวอย่าง ทำการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV และนำมาตรวจสอบพบไวรัสจาก

22 ไอโซเลท โดยใช้แอนติบอดีซึ่งผลิตจากกระต่าย (IgG) และไก่ (IgY) พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับไวรัส CymMV จำนวน 18 และ 20 ไอโซเลท จาก 22 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กันทางซีรัมวิทยาของไอโซเลทต่างๆ และพบว่าจากการตรวจด้วย IgY ให้ผลการตรวจที่ชัดเจนมากกว่า IgG

Gourdel and Leclercq-Le Quillec (2001) ศึกษาการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ในเชื้อ CymMV จำนวน 12 ไอโซเลท ที่ได้จาก *Vanilla fragrans* บนเกาะ Reunion (CymMV-R) พบว่ามีความเหมือนกันอย่างมาก จึงสรุปได้ว่ามีเชื้อ CymMV มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่ระบาดอยู่บนเกาะดังกล่าว และการเปรียบเทียบไอโซเลท CymMV-R กับสายพันธุ์ของเชื้อ CymMV ในทวีปเอเชีย พบว่ามีความเหมือนกันอย่างมากกับสายพันธุ์ CymMV-K2 ที่ได้จากประเทศเกาหลี และสายพันธุ์ CymMV-S2 จากประเทศสิงคโปร์ และพบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย carboxy-terminal ของยีน CP กับสายพันธุ์ CymMV-K1 และสายพันธุ์ CymMV-S1

Wang and Lin (2004) ศึกษาลำดับเบสจากจีโนมของเชื้อ CymMV สายพันธุ์ไต้หวัน [CymMV-Taiwan (TW)] โดยการโคลนนิ่ง (accession number: AY571289) ความยาว 6,227 นิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เกาหลี [CymMV-Korea (K2)] และสิงคโปร์ [CymMV-Singapore (S1)] พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความเหมือนกัน 97% ซึ่งจีโนมประกอบด้วย 5'-NTR, 5 ORFs และ 3' NTR ความเหมือนกันของลำดับเบสตรงบริเวณ ORFs ของยีน RdRp, TGB2, TGB3 และ CP และความแปรผันของลำดับเบสตรง ORF ของยีน TGB1 และบริเวณ NTRs ซึ่งจำแนกเชื้อ CymMV ทั้งสามสายพันธุ์ออกจากกัน แต่จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนกันอย่างมากภายในสปีชีส์ และพบว่า CymMV-TW มีความใกล้เคียงกับ CymMV-S1 มากกว่า CymMV-K2 ในการวิเคราะห์โดย phylogenetic analysis

Sherpa *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายของยีน CP ของเชื้อ CymMV ที่เข้าทำลายกล้วยไม้ตามธรรมชาติในบริเวณต่างๆ ของประเทศอินเดีย จำนวน 9 ไอโซเลท จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน กับไอโซเลทต่างๆ ที่มีรายงานใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกัน 85-100% และ 65-100% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าส่วนยีน CP เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตเป็นชุดตรวจสอบโรค และสามารถใช้ในการผลิตพืชต้านทานจากเชื้อ CymMV ได้ และ

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ CymMV 1 ไอโซเลท จากกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียม มีการผสมรวมของลำดับเบสระหว่างไอโซเลทจากประเทศเกาหลีและไทย

3. พืชอาศัยและลักษณะอาการ

CymMV มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์ Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Gramineae, Leguminosae, Caesalpinioideae, Orchidaceae, Solanaceae, และ Tropaeolaceae ส่วนอาการที่เกิดกับกล้วยไม้สกุลต่างๆ ในวงศ์ Orchidaceae จะแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของกล้วยไม้ ส่วนใหญ่แสดงอาการใบด่างตามความยาวของใบ (chlorotic streak)

ลักษณะอาการบนกล้วยไม้สกุลเด่นโครเบียม

หาวมาดามปอมปาด้ว (*Dendrobium Madam Pompadour*) แสดงอาการแบบแพร่กระจายไปทั่วต้น และสามารถเห็นอาการได้ชัดเจนในลำที่เกิดใหม่หรือยอดอ่อน ลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อ CymMV มีหลายแบบ เช่น อาการ chlorotic streak อย่างรุนแรงตามความยาวของใบ ผิวใบขรุขระ แสดงอาการเหมือนกันทุกใบของหน่อกล้วยไม้หรือลำหน้าสุด อาการจุดประสีขาเป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวตลอดต้นไปทั้งใบ มักพบบนใบที่โตเต็มที่ ส่วนใบบริเวณยอดแสดงอาการใบด่างเป็นทาง ซึ่งที่พบมากกับกล้วยไม้หาวมาดาม บางครั้งพบอาการดอกด่างเห็นได้ชัดเจนที่บริเวณกลีบดอก กล้วยไม้มีอาการยอดบิดเป็นเกลียว แสดงอาการด่างไม่ชัดเจน (mild mottling) สังเกตอาการได้ยาก หรือพบอาการเป็นเส้นนูนขึ้นมาบนแผ่นหน้า ใบคล้ายๆ กับใบซ้อนขึ้นมาใหม่ แต่มีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียวเล็ก หรือมีอาการด่างแบบ mottle เป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวของใบ (ธีระ, 2532)

หาวซีซาร์ (*Dendrobium Caesar*) แสดงอาการของโรครุนแรงทั้งในลำที่เริ่มแตกใหม่และลำที่เจริญเต็มที่แล้ว ใบของลำใหม่ที่บริเวณยอดอ่อนแสดงอาการด่างเป็นทางสีเขียวสลับเหลือง เนื้อใบบางและมีสีอ่อนกว่าใบปกติ ใบบริเวณที่เป็นสีเขียวมักมีสีเข้มและเนื้อใบหนาทำให้เนื้อใบไม่เรียบ บางต้นขอบใบมีสีม่วงโดยเฉพาะใบของลำใหม่ ถ้าอาการรุนแรงใบจะบิดม้วนและห้อยลง ส่วนในลำที่เจริญเต็มที่พบว่าใบแสดงอาการด่างอย่างชัดเจน ใบหนา กระด้างและตั้งขึ้น ขี้อปถ้องสั้น โดยเฉพาะบริเวณยอดช่อดอก รูปร่างของดอกปกติ แต่ในบางต้นให้ดอกประเภทปลายกลีบม่วง

พบว่าบริเวณสีม่วงมีรอยค่างเล็กน้อยและบางครั้งดอกมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงผิดปกติไปจากดอกปกติ (ธีระ, 2532)

หาวอินโดนีเซีย (*Dendrobium Indonesia*) อาการคล้ายคลึงกับหาวซีซาร์ อาการค่างชัดเจนทั้งใบแก่และใบอ่อน โดยมีสีเขียวสลับเหลือง บริเวณสีเขียวจะมีสีเขียวเข้มมากและหนา ส่วนต่างเหลืองจะเป็นร่องทำให้เนื้อใบไม่เรียบ ใบหนาและแข็ง ดอกสีม่วงอ่อน เห็นอาการค่างบนดอกชัดเจน รูปร่างของดอกปกติ (ธีระ, 2532)

ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

คีนโปเดียม (*Chenopodium amaranticolor*) และ ลำโพง (*Datura stramonium*) เกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง พัฒนาอย่างช้าๆ หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 10 วัน และไม่เกิดการกระจายทั่วต้น แต่มีรายงานพบว่าถ้าสายพันธุ์เชื้อ CymMV ที่รุนแรง อาจทำให้เกิดอาการขอบใบแห้ง และอาการจุดไหม้กระจายทั่วทั้งต้นได้ ซีเหล็กเทศ (*Cassia occidentalis*) แผลจุดขนาดเล็กเฉพาะแห่งสีเหลืองอ่อนขนาดเล็ก หลังปลูกเชื้อสองวัน 2 วันต่อมาจุดจะเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลปนแดงมีสีเหลืองล้อมรอบ (chlorosis) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และจะแสดงอาการชัดเจนภายใน 3-5 วัน (Faccioli and Marani, 1979; ธีระ, 2532)

4. การถ่ายทอดโรค

CymMV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการสัมผัสทำให้มีการแพร่กระจายโรคไปสู่ต้นปกติได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถเกิดได้โดยติดไปกับเครื่องมือที่ใช้ในขณะที่ทำการตัดแต่งต้น หรือทำการเก็บเกี่ยวดอก เช่น กรรไกร หรือมีด และการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับความนิยมและมีโอกาสที่ไวรัสจะสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (Jensen, 1951; Zettler *et al.*, 1990)

รายงานของ Porter *et al.* (1996) ที่พบว่าเชื้อ CymMV ไม่มีการถ่ายทอดทางเมล็ด โดยศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ CymMV จากเมล็ดไปยังต้นอ่อนในกล้วยไม้สกุลเด็นโดรเบียมพันธุ์ลูกผสม สุ่มเก็บตัวอย่างจากต้นอ่อนที่เกิดจากต้นพ่อและต้นแม่ที่เป็นโรค จำนวน 7,050 ตัวอย่าง และทำการตรวจด้วยวิธี ELISA ไม่พบว่าต้นอ่อนดังกล่าวมีเชื้อ CymMV แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ด

ในช่วงปี 1988-1991 ประเทศสิงคโปร์มีรายงานการสำรวจเชื้อ CymMV และเชื้อ ORSV โดยเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ 12 สกุล จากรังกล้วยไม้ขนาดใหญ่ 4 แห่ง นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายของเชื้อ CymMV และ ORSV คิดเป็น 56% และ 4% ตามลำดับ พบการเข้าทำลายร่วมกันคิดเป็น 14.2% จากการสำรวจโรคในโรงเรือนโดยตรวจสอบกล้วยไม้ 29 สกุล พบเชื้อ CymMV และ ORSV เข้าทำลายคิดเป็น 34.5% และ 0.3% ตามลำดับ ส่วนการเข้าทำลายร่วมกันคิดเป็น 8.3% นอกจากนี้ยังพบว่ามีต้นกล้วยไม้จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ CymMV ถึง 50.05% และพบเชื้อ CymMV ร่วมกับเชื้อ ORSV ประมาณ 0.5% (Wong *et al.*, 1994)

ในช่วงปี 1992-1994 ประเทศไทยมีรายงานการสำรวจเชื้อ CymMV และ ORSV โดยเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จำนวน 442 ต้น แบ่งเป็น 24 สกุล โดยเก็บตัวอย่างจาก 43 โรงเรือนใน 8 จังหวัดทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตรวจเชื้อ CymMV และ ORSV ด้วยวิธี rapid immunofilter paper assay (RIPA) จากผลการตรวจพบไวรัสทั้ง 2 ชนิด ในทุกพื้นที่ โดยพบเชื้อ CymMV จากกล้วยไม้ 17 สกุล ใน 93% ของโรงเรือนที่ทดสอบ และเชื้อ ORSV จากกล้วยไม้ 4 สกุล ได้แก่ *Arachnis*, *Cattleya*, *Oncidium* และ *Vanda* ใน 40% ของโรงเรือนที่ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าในประเทศไทยเชื้อ CymMV มีการระบาดมากกว่าเชื้อ ORSV ซึ่ง 95% ของการเข้าทำลายกล้วยไม้โดยเชื้อ ORSV จะพบเชื้อ CymMV เข้าทำลายร่วมด้วย ดังนั้นการเข้าทำลายกล้วยไม้ของไวรัสจึงแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ เชื้อ CymMV เข้าทำลายเพียงชนิดเดียว และ เข้าทำลายร่วมกันทั้ง 2 เชื้อ ใน *Cattleya* และ *Oncidium* ในสกุล *Oncidium* พบการเข้าทำลายของเชื้อ CymMV เพียงชนิดเดียว 79% ของพืชที่ไม่แสดงอาการ ในขณะที่ 90% ของพืชที่แสดงอาการต่าง และจุดไหม้บนใบ เป็นการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัสทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าอาการที่ปรากฏ *Oncidium* นั้นอาจเกิดจากการเข้าทำลายของไวรัสร่วมกันทั้ง 2 ชนิด

Khentry *et al.* (2006) สำรวจสถานการณ์การเข้าทำลายของเชื้อในกล้วยไม้สกุลเด่นโดรเบียมในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย จากการสุ่มตรวจตัวอย่างต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 280 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ CymMV คิดเป็น 65.4% และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ ORSV จากการตรวจในกลุ่มหวายตัดดอกจำนวน 19 สายพันธุ์ พบเชื้อ CymMV คิดเป็น 18.6% จากการตรวจในกลุ่มหวายกระถางพบเชื้อ CymMV คิดเป็น 8.7% และตรวจไม่พบเชื้อทั้งสองชนิดจากการตรวจในกล้วยไม้หวายพันธุ์พื้นเมืองที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ท่อนพันธุ์ที่ปลอดโรคในการขยายพันธุ์ นำมาซึ่งการเสนอแนะให้มีการตรวจท่อนพันธุ์ก่อนการนำมาขยายพันธุ์

5. การตรวจสอบและวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ CymMV

วิธีการตรวจเชื้อ CymMV ในอดีตนั้นใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งถือเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากต่อมาได้พัฒนาไปสู่การใช้วิธีการทางซีรัมวิทยา (serological technique) และ การใช้เทคนิคทางโมเลกุล (molecular technique) การวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา ซึ่งเป็น ที่นิยม ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) วิธีนี้สามารถตรวจตัวอย่างปริมาณ มากในเวลาสั้น การใช้วิธีทางซีรัมวิทยาร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (immunoelectron microscopy, IEM) ทำให้ตรวจหาอนุภาคไวรัสได้ง่ายขึ้น และมีความไวสูงขึ้น (สุพรรณ, 2535)

วัชรพร (2525) เปรียบเทียบวิธีการทางซีรัมวิทยาในการตรวจหาเชื้อ CymMV โดยวิธีการ ตกตะกอนผ่านวุ้น พบว่าจากตัวอย่างที่นำมาตรวจ 300 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เป็นน้ำคั้นพืชที่นำมาทดสอบทันทีจะให้ผลที่ดีกว่าน้ำคั้นที่บดไว้ค้างคืน

โชคพิศิษฐ์ (2528) รายงานว่าวิธีการทดสอบหาเชื้อ CymMV ในพืชทำได้หลายวิธี เช่น การใช้พืชทดสอบ (plant test or bioassay procedure) วิธีทางซีรัมวิทยา และวิธีทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ CymMV โดยใช้พืชทดสอบ จี๋เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis* L.) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าการใช้พืชทดสอบสามารถ ตรวจสอบไวรัสได้ในน้ำคั้นที่เจือจางถึง 1:10,000 ขณะที่ตรวจไม่พบด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน ซึ่งสามารถตรวจพบอนุภาคไวรัสได้ในน้ำคั้นที่เจือจางสูงสุด 1:1,000

สุรภิ และคณะ (2532) ตรวจสอบเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธี Dot-ELISA ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่ใช้ nitro cellulose membrane (NCM), Millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เป็นที่รองรับปฏิกิริยา โดยใช้ส่วนผสมของ Naphthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2 toluidinediazonium chloride hemizene chloride) เป็น สับสเตรท สามารถตรวจพบปริมาณ ของเชื้อไวรัสในน้ำคั้นของพืชที่เจือจางไปได้มากกว่า 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วย DAS-ELISA (double-antibody sandwich ELISA) ธรรมดาซึ่งใช้ polystyrene microtiter plate เป็นที่รองรับปฏิกิริยา และมี *p*-nitrophenyl phosphate เป็นสับสเตรท เป็นปฏิกิริยาบนแผ่น NCM ที่ฝัง แห้งแล้วสามารถเก็บไว้ตรวจผลได้เป็นเวลานาน โดยสีชมพูของปฏิกิริยายังคงเดิม ทั้งยังสามารถ ตรวจสอบตัวอย่างได้รวดเร็วและคราวละมากๆ เช่น เดียวกับ DAS-ELISA

กลอยใจ (2534) ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primary antibody (IgG) น้ำคั้นพืช (sap) และ secondary antibody ในการทำปฏิกิริยา ELISA และ IEM พบว่าค่าการเจือจางที่ 1:500 1:10, 1:50 และ 1:1000 ตามลำดับ เป็นค่าที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

Vejaratpimol *et al.* (1998) ศึกษาเชื้อ CymMV 22 ไอโซเลท จากตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคจำนวน 35 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบวิธีการตรวจ พบว่าวิธี IEM เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงกว่าวิธี electron microscopy และการปลูกเชื้อให้กับพืชทดสอบ คือลำโพง ตามลำดับ

ปัจจุบันการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลเด่นโครเปียมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่นิยมมาก ซึ่งมีสาเหตุจากความต้องการกล้วยไม้ปลอดเชื้อ แต่เชื้อ CymMV นั้น ถ่ายทอดโดยวิธีกล และเป็นวิธีที่ถ่ายทอดได้ง่ายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ถ้าส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์ไม่ปลอดเชื้อ ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้มีรายงานการพบเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้สกุลเด่นโครเปียมมากกว่าชนิดอื่นๆ ซึ่งมีอัตราการปลูกขยายมากกว่า 80% ของกล้วยไม้ทั้งหมด และจากรายงานการสำรวจอาการของกล้วยไม้ที่ได้รับเชื้อ CymMV พบว่าส่วนมากในระยะแรกๆ จะไม่แสดงอาการของโรค (Zettler *et al.*, 1990) จึงต้องมีการตรวจสอบ โดยวิธีการที่นิยมมากที่สุด และมีรายงานว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้ในพืชที่ไม่แสดงอาการ คือ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Chung *et al.*, 1996), ELISA (Kiratiya-angul *et al.*, 1991; Ryu *et al.*, 1998) และ RIPA (Tanaka *et al.*, 1997) แต่ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบในเบื้องต้น วิธีที่ให้ผลแม่นยำ และสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมากพร้อมกันนั้นวิธีการทางชีววิทยาคือเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย และมีราคาถูกกว่า โดยอาศัยหลักความจำเพาะระหว่างเชื้อกับแอนติบอดีที่นำมาใช้ (Narayanasamy, 1997)

Lim *et al.* (1993) ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการตรวจหา CymMV โดยใช้ไพรเมอร์แบบ oligo nucleotide primers 2 เส้น ออกแบบมาจากตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่อนุรักษ์ในกลุ่ม potexvirus จับกับ RNA ที่สกัดได้จากไวรัส พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถตรวจพบไวรัสได้ในความเข้มข้นเพียง 10 เฟมโตกรัม

Hu and Wong (1998) ตรวจหาเชื้อ CymMV และ ORSV ด้วยเทคนิค slot-blot hybridization โดยใช้ DIG-labelled cDNA probes พบว่าสามารถตรวจพบไวรัส CymMV และ ORSV ในน้ำคั้นพืชได้ถึงระดับความเจือจาง 3125 และ 625 เท่า ตามลำดับ

Seoh *et al.* (1998) ทดลองตรวจหาเชื้อ CymMV และ ORSV พร้อมกันด้วยวิธี Touch-down reverse transcriptase polymerase chain Reaction (TD/RT-PCR) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) 1 คู่ ที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อ CymMV และ ORSV พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจหาเชื้อได้ทั้ง 2 ชนิดในเวลาเดียวกัน

Vejaratpimol *et al.* (1998) ทำการพัฒนาวิธี DAS-ELISA ในตรวจหาเชื้อ CymMV พบว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ในการเคลือบ ELISA plate ก่อน และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากไข่ไก่ (IgY) เป็นแอนติบอดีตัวตรวจจะทำให้เพิ่มความสามารถในการตรวจพบไวรัสได้ถึงระดับ 6.25 นาโนกรัม และสามารถตรวจไวรัส ในน้ำคั้นพืชได้ถึงระดับความเจือจาง 1024 เท่า

Eun *et al.* (2000) ตรวจหาเชื้อ CymMV โดยวิธี TaqMan® real-time RT-PCR ซึ่งเป็นเทคนิค RT-PCR ร่วมกับการตรวจสอบสารเรืองแสง โดยทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายสั้น (probe) จำนวน 4 ชนิด ที่ใช้ในการติดตามส่วนของยีน RdRp และ CP ของเชื้อ CymMV และ ORSV โดยเชื่อม anti-CymMV กับสารเรืองแสง FAM (6-carboxyfluorescein) และเชื่อม anti-ORSV กับสารเรืองแสง TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein) ที่ปลาย 5' ของ DNA probe และที่ปลาย 3' ติดฉลากด้วย TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) พบว่าสามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ ในระดับ 5 เฟมโตกรัม

Tan *et al.* (2000) ทดลองตรวจหาเชื้อ CymMV โดยการทำให้ Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) และ matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) ซึ่งเป็นการตรวจหาอนุภาคของไวรัสตามน้ำหนักของ coat protein พบว่าใช้ ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจเพียง 1 กรัม ก็สามารถตรวจพบเชื้อได้

Eun *et al.* (2002) ตรวจหาเชื้อ CymMV ด้วย Quartz Crystal Microbalance (QCM) Immunosensors โดยอาศัยหลักการวัดการสะท้อนกลับของคลื่นความถี่จากผิวของ QCM เมื่อมีอนุภาคไวรัสติดอยู่ ซึ่งช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหาไวรัส โดยทำการขยายสัญญาณของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ CymMV ได้ในระดับ 1 นาโนกรัม

กรมวิชาการเกษตร (2549) ผลิตภัณฑ์ตรวจเชื้อ CymMV ทางการค้าโดยใช้หลักการของ Immunochromatographic strip test หรือชื่อทางการค้าว่า GLIFT kit (gold labeling IgG flow test) โดยใช้หลักการทางซีรัมวิทยา ร่วมกับการเชื่อมต่อ IgG ที่จำเพาะต่อไวรัสเข้ากับอนุภาคของสารมีสีในตัว ได้แก่ อนุภาคทอง (colloidal gold) ซึ่งสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจน เพียงหยดน้ำคั่นตัวอย่างพืชทดสอบลงบนชุดทดสอบ จำนวน 3 หยด รอผลอ่านภายในเวลา 3-5 นาที

Lee and Chang (2006) ตรวจเชื้อ CymMV และ ORSV โดยพัฒนาวิธี Multiplex RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ (primer) 3 คู่ ในการทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด และไพรเมอร์ 1 คู่ที่นำมาใช้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *nad5* ในไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (control) พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ CymMV และ ORSV ได้ที่ระดับ 1 พิโคกรัม และ 10 พิโคกรัม ตามลำดับ และการทดลองแสดงให้เห็นถึงปัญหาในการตรวจตัวอย่างด้วยวิธี PCR เนื่องจากให้ผลตรวจลงได้ค่อนข้างมาก ดังนั้นการมี control ที่ดีจึงมีความจำเป็นเพื่อเป็นสิ่งที่ยืนยันผลการตรวจ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ เพื่อเป็นแอนติเจน

1.1 การเก็บตัวอย่างและตรวจสอบเชื้อ CymMV

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดาม (*Dendrobium Madam Pompadour*) ที่แสดงอาการโรคจากเชื้อ CymMV คือแสดงอาการด่างแบบ mottle เป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวของใบ ในเขตจังหวัดนครปฐม และตรวจสอบเชื้อ CymMV ในตัวอย่างกล้วยไม้ด้วย anti-CymMV PAb (PAb-CymMV) (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุวรรณา กลัดพันธุ์ หน่วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ กลาง สถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน) โดยวิธี indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay หรือ indirect PTA-ELISA (Clark and Adams, 1977) และแยกเชื้อไวรัสโดยวิธีการของ Vejaratpimol *et al.* (1999)

1.2 การแยกเชื้อ CymMV ให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อไวรัสโดยวิธีการของ Vejaratpimol *et al.* (1999) โดยนำไปฟุ้งที่เป็นโรคมาบดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราส่วนฟุ้งต่อบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:2 กรองเอาส่วนของน้ำคั้นไปปั่นตกตะกอนเศษซากพืชที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสเดิมส่วนของ chloroform-butanol ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อตกตะกอนโปรตีนพืชโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำใสมาตกตะกอนไวรัสที่ 30,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2 วิเคราะห์หาความเข้มข้นเชื้อ CymMV โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} และ A_{280} นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัส จากนั้นวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ purified virus จากค่า A_{280}/A_{260} (Frowd and Tremaine, 1977) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) และ Western blotting (Hammond, 1990) ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอนุภาคไวรัสด้วยวิธี Immunoelectron microscopy (IEM) (Milne and Lesemann, 1978) โดยทำปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคไวรัสกับ PAb-CymMV

$$\text{ความเข้มข้นของไวรัส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{260}}{\epsilon^{0.1\%}_{260 \text{ nm}}}$$

ค่า Extinction coefficient ($\epsilon^{0.1\%}_{260 \text{ nm}}$) ของเชื้อ CymMV เท่ากับ 2.9

1.3 การตรวจสอบเชื้อ CymMV ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay โดยใช้ PAb-CymMV

วิธี indirect PTA-ELISA ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Clark และ Adams (1977) ทำโดยเคลือบ ELISA plate ด้วยน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามทีเจือจางใน phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 และเจือจางเพิ่มใน carbonate coating buffer (CB) อัตราส่วน 1:5 ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้นนาน 1.5 ชั่วโมง หรือ ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเทและล้างเอาสารส่วนเกินออกด้วย PBS-Tween 20 (PBST) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที นำ PAb-CymMV ซึ่งเป็น IgG ที่สกัดโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการ cross absorb กับน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติมาทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยเจือจางแอนติบอดีเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1% skimmed milk (Sk) ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างสารส่วนเกินออกด้วย PBST 3 ครั้ง เติม goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase (AP) (Sigma, USA) เจือจาง 1:10,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ใส่สับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 10% Diethanolamine ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยากับ 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Labsystems/Multiskan EX) พิจารณาค่า A_{405} ที่อ่านได้โดยค่าที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก (ตรวจพบเชื้อไวรัส) คำนวณได้จากสองเท่าของค่า A_{405} ของพืชปกติ

เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีในข้อ 1.3 โดยใช้ PAb-CymMV พบว่าแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้ามได้กับโปรตีนของกล้วยไม้ปกติ ซึ่งให้ค่า A_{405} นาโนเมตร สูงมากกว่า 0.4 ดังนั้นจึงต้องทำการ cross absorb แอนติบอดี เพื่อลดปฏิกิริยาข้าม โดยเริ่มต้นเจือจางน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติใน PBS อัตราส่วนน้ำคั้นต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:20 ทำ cross absorb

โดยผสม PAb-CymMV ในอัตราส่วนแอนติบอดีต่อน้ำคั้น เท่ากับ 1:100 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลใน CRD ทดลองวิธีการละ 2 ซ้ำ นำค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) มาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Halli *et al*, 2001)

$$\text{ค่า S/N ratio} = \frac{\text{ค่า } A_{405} \text{ ของพืชเป็นโรค}}{\text{ค่า } A_{405} \text{ ของพืชปกติ}}$$

1.4 การวิเคราะห์ขนาดและชนิดของโปรตีนโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis และ Western Blotting

การทำ SDS-PAGE และ Western blotting ใช้ตัวอย่างในการทดสอบ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ 1) เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ (P) 2) น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติ เจือจาง 1:1 ใน PBS และ 3) น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรคเจือจาง 1:1 ใน PBS นำตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง มาแยกขนาดโปรตีนใน 6% stacking gel และ 12% running gel โดยใช้ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 2x loading dye ในอัตราส่วน 1:1 ต้มส่วนผสมในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ นาน 120 นาที นำแผ่นเจลด้านหนึ่งมาย้อมสีด้วย staining solution (0.2% coomassie blue R-250 ที่ละลายใน 50% methanol และ 70% acetic acid นาน 10 นาที และล้างด้วย destaining solution (25% methanol และ 7% acetic acid) ส่วนแผ่นเจลอีกด้านหนึ่งนำมาทำ Western blotting โดยเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ด้วยเครื่อง Transfer protein electrophoretic apparatus (BIO-RAD, USA) บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ transfer buffer (25 mM Tris-base, 150 mM glycine, pH 8.3) (เตรียมใหม่เสมอ) โดยวางให้แผ่นเจลอยู่ทางด้านขั้วลบ และแผ่นเมมเบรนอยู่ทางด้านขั้วบวก จากนั้นทำการย้ายโปรตีนใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 400 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ 40 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที ควรทำในที่เย็นเพื่อป้องกันโปรตีนจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้รับการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลแล้วแช่ใน Tris-buffer saline (TBS) ที่เติม 0.05% Tween-20 (TBST) ประมาณ 10 นาที นำโปรตีนที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV เข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางใน 3% Sk เป็นเวลา 45 นาที

ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนแช่ใน goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย AP เจือจาง 1:10,000 ใน TBST เป็นเวลา 45 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายสับสเตรท nitro blue tetrazolium (NBT) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Zymed, USA) โดยผสม NBT/BCIP อย่างละ 1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 8 มิลลิลิตร ซึ่งทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่า ยกเว้นขั้นตอนการเกิดสีของปฏิกิริยาทำในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เมมเบรนในน้ำนาน 5 นาที และปล่อยให้แผ่นเมมเบรนแห้ง

1.5 การตรวจอนุภาคไวรัสด้วยวิธี Immunoelectron microscopy

โดยเจือจางเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ด้วย 0.1 M PBS, pH 7.4 แล้วหยดเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม คั่วกริดด้านที่เคลือบฟอรัมวาและคาร์บอนให้สัมผัสกับไวรัส นาน 5 นาที ล้างกริดด้วยน้ำ 30 หยด คั่วกริดบน หยด PAb-CymMV ที่เจือจาง 1:500 ใน 0.1 M PBS, pH 7.4 บ่มนาน 60 นาที จากนั้นคั่วกริดขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น 30 หยด และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Milne and Lesemann, 1978)

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

2.1 การฉีดกระตุ้นหนูพันธุ์ BALB/c

ดัดแปลงจากวิธีการของ Hsu *et al.* (2000) ฉีดกระตุ้นหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c อายุ 1½ เดือน ด้วยเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ ปริมาณ 100 ไมโครกรัม ใน PBS 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 ตัว เข้าทางหน้าท้องหนู (intraperitoneal injection, IP) โดยทำการฉีดทุกสัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เจาะเลือดจากบริเวณปลายหางของหนูในสัปดาห์ที่ 5 เพื่อทดสอบการผลิตแอนติบอดี จำเพาะต่อเชื้อ CymMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ฉีดกระตุ้น (boost) หนูอีกครั้งโดยใช้ปริมาณไวรัส 200 ไมโครกรัม PBS 200 ไมโครลิตร ก่อนเชื่อมเซลล์ (fusion) 3 วัน

2.2 การเตรียมเซลล์มัยอิโลมา (Myeloma cell)

นำเซลล์มัยอิโลมาสายพันธุ์ P3-X63-Ag8.653 มาเลี้ยงคัดเลือกในอาหาร complete medium (CM) ที่เติม 10% 8-azaguanine (8-Ag) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์มัยอิ

โคม่าที่คัด เลือกได้ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^5 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน CO_2 incubator (5% CO_2) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80% ระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเซลล์ประมาณ 1-2 สัปดาห์ โดยให้เซลล์อยู่ในระยะ exponential phase (Liddell and Cryer, 1991)

2.3 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (Feeder cell)

เตรียมเซลล์พี่เลี้ยงโดยใช้เซลล์จากต่อมธัยมัส หรือม้ามของหนูเมาส์พันธุ์ BALB/c ปกติ ฆ่าในตะแกรงลวดขนาด 80 mesh ล้างด้วยบัฟเฟอร์ calcium and magnesium free Hanks balanced salt solution (CMF Hanks) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI) ปั่นตะกอนเซลล์ที่ $1,500 \times g$ รอบต่อนาที นาน 10 นาที และละลายตะกอนเซลล์ด้วย RPMI ที่เติม hypoxanthine และ thymidine (HT) หยดเซลล์ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม นำไปเก็บในตู้ CO_2 incubator (Liddell and Cryer, 1991)

2.4 การเชื่อมเซลล์ (Fusion) และการโคลนเซลล์ด้วยวิธี Limiting Dilution

วิธีเชื่อมเซลล์และโคลนเซลล์ดัดแปลงจาก Liddell and Cryer (1991) โดยเชื่อมเซลล์บี ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ที่เตรียมได้จากหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ CymMV โดยทำตามวิธีใน ข้อ 2.3 กับเซลล์มัยอีโคม่าที่เตรียมได้ในข้อ 2.2 ในอัตราส่วน 1:2 โดยใช้ polyethylene glycol (PEG), MW 1,400 จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยเลี้ยงในอาหาร HAT (HT ที่เติม aminopterin) บ่มเซลล์ไฮบริโดมาในตู้ CO_2 incubator ตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้หลังจากทำการเชื่อมเซลล์ 14-21 วัน ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน ตามวิธีในข้อ 1.3 โคลนเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ด้วยวิธี limiting dilution 3 ครั้ง คัดเลือกโคลนที่มีการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ CymMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้แอนติเจน 5 ชนิด คือ 1) เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ 2) expressed coat protein ของเชื้อ CymMV (CymMV-CP) 3) expressed coat protein ของเชื้อไวรัส ORSV (ORSV-CP) (CymMV-CP และ ORSV-CP ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน) 4) น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาดามที่เป็นโรค และ 5) น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาดาม ปกติ นำโคลนที่มีการผลิตแอนติบอดีที่ต้องการไปเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง ใน ขั้นตอนต่างๆ เมื่อคัดเลือกโคลนผลิตแอนติบอดีที่ต่อเชื้อ CymMV ได้ จะแบ่งเก็บเซลล์โดยแช่แข็ง เซลล์ในไนโตรเจนเหลว

การแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหาร HT ให้เซลล์อยู่ในระยะ exponential phase จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ และละลายเซลล์ในอาหารแช่แข็ง (freezing medium) ให้มีความเข้มข้น 10^7 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส ในกล่องโฟมข้ามคืน จากนั้นทำการย้ายลงในถังไนโตรเจนเหลว (Liddell and Cryer, 1991)

2.5 การเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์

เพิ่มปริมาณเซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV ตามวิธีการของ Liddell and Cryer (1991) โดยย้ายเซลล์ลูกผสมลงในฟลาस्कเลี้ยงเซลล์ในอาหาร HT medium จาก 10 มิลลิลิตร เป็น 20, 50, 100 และ 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.1 การตรวจสอบชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (Isotyping)

ตรวจสอบชนิดอิมมูโนโกลบูลิน ของ MAbs ที่ผลิตได้ว่าเป็น ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM หรือ IgA และสร้าง kappa (K) light chain หรือ lamda (λ) light chain โดยใช้ชุดตรวจสอบ Mouse Mono Ab kit ด้วยวิธี indirect ELISA (ZYMED, USA) เพื่อเลือกโคลนัล และวิธีการที่เหมาะสมสำหรับแยกสกัดแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

3.2 การศึกษาความจำเพาะต่อเชื้อ CymMV ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทดสอบความจำเพาะของ MAbs ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส CymMV และไวรัสชนิดอื่น โดยทดสอบกับเชื้อไวรัสทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Potato virus Y* (PVY), *Brome mosaic virus* (BMV) และ *Cucumber mosaic virus* (CMV) โดยวิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีการข้อ 1.3

4. การสกัดอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ด้วย Rec-Protein G Column Chromatography

แยก immunoglobulin G (IgG) บริสุทธิ์ด้วย rec-Protein G column chromatography (Zymed, USA) โดยการนำเซลล์มาปั่นตกตะกอนสิ่งเจือปนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 อัตราส่วนของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 จากนั้นเตรียมคอลัมน์โดยเติม rec-Protein G-Sepharose (Zymed, Cat. No. 10-1242, USA) ลงในกระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร ที่มีแผ่น miracloth รองอยู่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมให้ผิวหน้าของคอลัมน์เสมอกัน ล้างด้วย washing buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0) ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ปล่อยให้บัฟเฟอร์อยู่ที่ระดับผิวหน้าของคอลัมน์ จึงเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปิดคอลัมน์และบ่มปฏิกิริยาไว้ประมาณ 30 นาที แล้วล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเริ่มเก็บ fraction ที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด สะคอลัมน์ด้วย elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 2.7 หรือ 0.1 M acetic acid, pH 2.8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลงในหลอดที่เติม 2 M Tris-HCl, pH 8.0 อัตราส่วน 1:10 ของปริมาตร fraction ที่ต้องการเก็บเพื่อปรับค่า pH ของสารให้เป็นกลาง วัดความเข้มข้นโปรตีนในแต่ละ fraction โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของ IgG แบ่งเก็บ IgG ที่ 2-8 องศาเซลเซียส และเติม 0.05% Na₂S₂O₃ ในกรณีเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ให้เติม 50% glycerol ลงไปในสารละลายแอนติบอดี

$$\text{ความเข้มข้นของ IgG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่า } A_{280}}{1.4}$$

4.1 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ใช้วิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีข้อ 1.3 โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับ MAb ที่เตรียมให้เป็น IgG บริสุทธิ์ด้วย rec-Protein G column chromatography ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางแบบ 2 เท่า (2-fold dilutions) เริ่มต้นที่ 1:400 และเจือจางจนถึง 1:409,600

5. การเชื่อมโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์กับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

ใช้ MAb จากไฮบริโดมาโคลน Cy1 (MAb-Cy1) ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ alkaline phosphatase (Zymed, 01-2201) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 140 ไมโครลิตร อัตราส่วนแอนติบอดีต่อเอนไซม์ เท่ากับ 1:2 นำไป dialyse ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH. 6.8 ข้ามคืน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ 3 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 M ethanolamine ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที แล้วนำมา dialyse ใน 0.1 M Tris-HCl pH. 8.0 ข้ามคืน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัด glutaraldehyde เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Campbell, 1991)

6. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ CymMV โดยวิธีการทางซีรั่มวิทยา

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาโดยวิธี indirect PTA-ELISA, direct PTA-ELISA, double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) และ Tissue blot immunoassay (TBIA) และเปรียบเทียบความจำเพาะต่อเชื้อ CymMV และความไวในการตรวจเชื้อ CymMV ของวิธีการในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค เพื่อเลือกวิธีการที่ดีที่สุด และเพื่อศึกษาคำแนะนำของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ CymMV

6.1 การทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay

6.1.1 ค่าการเจือจางของน้ำคั้นพืชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ELISA

ทดลองหาค่าการเจือจางน้ำคั้นจากกล้วยไม้หายมาตามที่ใช้ในการตรวจตัวอย่างด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีในข้อ 1.3 เคลือบ ELISA plate ด้วยน้ำคั้นพืชที่เจือจางอัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1: 160 และ 1:320 ใน CB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้นนาน 90 นาที หรือ ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเทและล้างเอาสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที นำ MAb-Cy1 ที่เจือจางอัตราส่วน 1:6,400 ใน 1% Sk ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ล้างสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง เติม goat anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย AP เจือจางที่ 1:5,000 ใน PBS (Sigma, USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ขึ้นตอนต่อไปทำตามวิธีในข้อ 1.3

6.1.2 ค่าการเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยา

ELISA

เลือกใช้ MAb-Cy1 และ MAb-Cy2 เนื่องจากให้ค่า S/N ratio สูงสุดและ รองลงมาตามลำดับ เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากทั้ง 2 โคลนมาทดสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA (ตารางที่ 2) โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จาก rec-Protein G-Sepharose column chromatography มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1.4 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำ MAb มาเจือจางแบบ 2-fold dilutions เริ่มต้นที่ 1:400 และเจือจางจนถึง 1:409,600 จากนั้นเลือกค่าการเจือจางที่ให้ค่า A_{405} สูงมากกว่า 1 มาใช้ในการทดสอบการทำปฏิกิริยา ELISA ต่อไป

เปรียบเทียบความเข้มข้นของ blocking buffer ได้แก่ Sk 3 ความเข้มข้น คือ 1% Sk, 3% Sk และ 5% Sk ในการทำปฏิกิริยา indirect PTA-ELISA, direct ELISA และ DAS-ELISA วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติตามวิธีข้อ 1.3

6.1.3 Indirect PTA-ELISA

ในปฏิกิริยานี้ใช้ MAb-Cy1 โดยบดชิ้นส่วนพืชที่ต้องการตรวจใน CB อัตราส่วน พืชต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:20 ใส่ตัวอย่างลงในหลุม ELISA plate ตามตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้น นาน 90 นาที หรือ ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เทและล้างสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy1 ที่เจือจางใน 1% Sk อัตราส่วน MAb ต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:6,000 ใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เทและล้างสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง เติม goat anti-mouse IgG ที่ติดฉลากด้วย AP ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ใส่สับสเตรท pNPP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 10% diethanolamine ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่า A_{405} นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader

6.1.4 Direct PTA-ELISA

ทำตามวิธีในข้อ 6.1.3 โดยขั้นตอนของการเติม primary antibody ใช้ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:1,000 ใน 3% Sk และตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการเติมสับสเตรท pNPP และอ่านผลเช่นเดียวกับวิธี indirect PTA-ELISA

6.1.5 Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA)

เคลือบ ELISA plate ด้วย MAb-Cy2 ที่เจือจางใน CB อัตราส่วน MAb ต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:5,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้นนาน 90 นาที หรือที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เทและล้างสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที นำ MAb-Cy1-AP มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยเจือจางใน 3% Sk อัตราส่วน MAb ต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:500 จากนั้นเติมสับสเตรท pNPP และอ่านผลปฏิกิริยา

6.2 การเปรียบเทียบความไวของวิธี indirect PTA-ELISA, direct PTA-ELISA และ DAS-ELISA ในการตรวจเชื้อ CymMV บริสุทธิ์

เปรียบเทียบความไวของวิธี ELISA ที่พัฒนาได้ 3 วิธี ได้แก่ indirect PTA-ELISA, direct PTA-ELISA และ DAS-ELISA (ข้อ 6.1) โดยเจือจางเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ใน CB แบบ 2-fold dilution ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางจนถึง 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับ MAb โดยหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติเจนที่ MAb สามารถทำปฏิกิริยาได้

6.3 การตรวจเชื้อไวรัส CymMV ด้วยวิธี Tissue Blot Immunoassay (TBIA)

ในการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี TBIA ใช้ตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรคโดยตรวจจากวิธี indirect PTA-ELISA ตามข้อ 6.1.3 จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยตัดส่วนใบอ่อน ใบแก่ และราก ตรวจตัวอย่างด้วยวิธี TBIA ที่ดัดแปลงจาก Martin *et al.* (2002) กดผิวหน้ารอยตัดชิ้นพืชส่วนต่างๆ ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ปล่อยให้แห้งแล้วแช่แผ่นเมมเบรนใน MAb-Cy1-AP โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ใช้ คือ 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 เจือจางใน blocking buffer (Sk ที่ละลายใน TBST) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นเวลา 45 นาที แล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมสับสเตรท NBT และ BCIP บ่มปฏิกิริยาในที่มืด 3-5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำ อ่านผลการทดลองโดยพิจารณาความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP ที่สามารถเห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่สุด เพื่อมาใช้ในการตรวจสอบส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ ดอก ก้านชูดอก ลำต้น และราก เพื่อพิจารณาดำแหน่งของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่เกิดปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่สุด

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี ELISA และ TBIA กับชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ทางการค้า GLIFT kit

โดยใช้ตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามจำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างต้นกล้วยไม้หวายมาตามที่แสดงอาการใบด่าง และไม่แสดงอาการ (ภาพที่ 1) โดยเป็นต้นที่ซื้อจากร้านค้า อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 22 ตัวอย่าง และตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 8 ตัวอย่าง ส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาตรวจ ได้แก่ ใบอ่อนและราก

8. การตรวจหาเชื้อไวรัส CymMV ด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

เปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้จากวิธีในข้อ 7 กับวิธี RT-PCR เพื่อเป็นการยืนยันผลโดยวิธี RT-PCR ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lim *et al.* (1993) ในขั้นตอนนี้ได้ทำการสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกและให้ผลลบ จำนวน 10 ตัวอย่าง ตรวจเพื่อยืนยันผลตามวิธี one-step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CymMV-CP-F และ CymMV-CP-R ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP (ลำดับของไพรเมอร์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน)



ภาพที่ 1 กล้วยไม้หวายมาตามที้นำมาใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการทางชีววิทยา

(ก) ใบที่ไม่แสดงอาการโรค

(ข) ใบด่างแบบ mottle ตามความยาวของใบ

(ค) ต้นกล้วยไม้หวายมาตามจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ไพรเมอร์ CymMV-CP-R มีลำดับเบส คือ 5' GAA TCC ATG GGA GAG CCC ACT 3'
 ไพร์เมอร์ CymMV-CP-F มีลำดับเบส คือ 5' AAG CTT TTA TTC AGT AGG GGG GGC 3' ซึ่งจะ
 ให้ดีเอ็นเอขนาด 672 คู่เบส

การสกัดอาร์เอ็นเอด้วย TLES buffer

ดัดแปลงจากวิธีของ Shi *et al.* (1995) นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่คัดเลือกไว้มาชั่งน้ำหนัก
 ตัวอย่างละ 1 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5
 มิลลิลิตร เติม TLES buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.0) ที่
 ใส่ 2% Na₂SO₃ ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (PCI,
 อัตราส่วน 25:24:1) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที นำหลอด microtube เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วย
 ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสในหลอด
 microtube หลอดใหม่ เติม 4 M LiCl₂ ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสผสมให้เข้ากัน และเก็บที่
 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
 ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตกตะกอน
 อาร์เอ็นเอโดยเติม absolute ETOH ปริมาตร 2.5 เท่า ของส่วนใส เติม 2.5 M CH₃COONa, pH 6
 ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000
 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยนำไปปั่น
 เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
 และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ หลอดละ 20 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ -20
 องศาเซลเซียส

เตรียม 0.8% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer (45 mM Tris-borate และ 1 mM EDTA) แยก
 ขนาดอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง GelMate2000 gel electrophoresis (Toyobo, Japan) เตรียมตัวอย่างอาร์
 เอ็นเอที่สกัดได้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โหลลงในช่อง
 เจล และใช้ 100 bp 3000 plus DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight marker) แยก
 ขนาดอาร์เอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที ใน 0.5x TBE buffer เมื่อครบเวลานำ
 แผ่นเจลแช่ในสารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้ว
 นำมาแช่ในน้ำกลั่น นาน 10 นาที นำเจลไปตรวจดูแถบอาร์เอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel
 Documentation UV-transilluminator (Vilber Lourmat, USA)

ปฏิกิริยา One-step Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 1.2 ไมโครลิตรมาเป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วนของยีน CP ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยเติม 5x PCR buffer 4 ไมโครลิตร Enzyme Mix 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 0.5 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ CymMV-CP-F และ CymMV-CP-R เข้มข้น 10 pmol ต่อไมโครลิตร อย่างละ 0.8 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (PTC-100 Thermal cycler, Thermospectronic, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิ ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 95 นาน 4 นาที ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอนที่ 5 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที กำหนดให้ทำปฏิกิริยาถูกโซ่จากขั้นตอนที่สองถึงขั้นตอนที่สี่เป็นจำนวน 35 รอบ จากนั้นขั้นตอนที่ 6 ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเก็บหลอดปฏิกิริยาที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งผลจากปฏิกิริยาจะให้ดีเอ็นเอขนาด 672 คู่เบส

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและตรวจวินิจฉัย อาคารปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ระยะเวลาทำการทดลอง

ใช้ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2548 ถึง มีนาคม 2551

ผลและวิจารณ์

1. เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ที่เตรียมได้

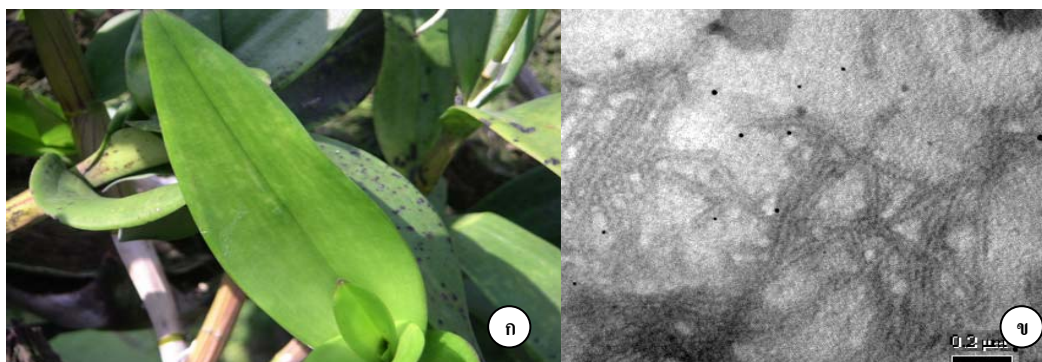
จากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามที่มีอาการของโรคจากเชื้อ CymMV คือแสดงอาการด่างแบบ mottle เป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวของใบ (ภาพที่ 2ก) ในเขตจังหวัด นครปฐม และตรวจสอบเชื้อ CymMV ในตัวอย่างกล้วยไม้ในเบื้องต้นด้วย PAb-CymMV โดยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้ น้ำคั้นจากใบเจือจาง 1:5 พบว่าให้ค่า A_{405} เฉลี่ยเท่ากับ 2.259 โดยตัวอย่างควบคุม คือตัวอย่างจากน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค และตัวอย่างจากน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติ ให้ค่า A_{405} เฉลี่ยเท่ากับ 1.875 และ 0.091 ตามลำดับ

เชื้อ CymMV ที่เตรียมให้บริสุทธิ์จากให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} และ A_{280} นาโนเมตร เท่ากับ 2.113 และ 1.905 ตามลำดับ คำนวณค่าความเข้มข้นของไวรัสได้เท่ากับ 0.71 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร คิดเป็นไวรัสทั้งหมดที่เตรียมได้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อใบพืช 100 กรัม ค่า A_{280}/A_{260} เท่ากับ 0.90 ใกล้เคียงกับที่ Frowd และ Tremaine (1977) รายงานไว้ คือ 0.9 ตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นท่อนยาวคดขนาด 480 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV โดยวิธี IEM (ภาพที่ 2ข)

โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CymMV วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีขนาดประมาณ 26.2 kDa ใกล้เคียงกับ 26 kDa ที่รายงานโดย Wong *et al.* (1997) ตรงกับแถบโปรตีนของไวรัสที่พบในกล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค แต่ไม่พบในกล้วยไม้ปกติ (ภาพที่ 3ก) และทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV โดยวิธี Western blotting (ภาพที่ 3ข)

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

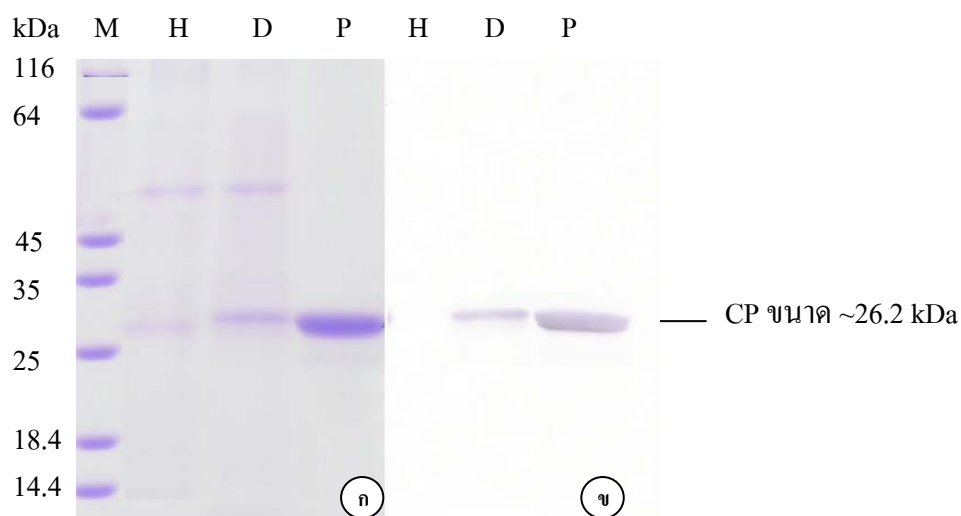
การฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว ด้วยเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 2.1 หาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในเลือดหนูหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งแรกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่าค่าไตเตอร์ของหนูทั้ง 5 ตัวมีค่า ประมาณ 12,800-25,600 (ตารางที่ 1) เลือกหนูตัวที่ให้ค่าไตเตอร์ 25,600 มาทำการเชื่อมเซลล์มัยอิโลมา



ภาพที่ 2 กล้วยไม้หวายมาตามทีแสดงอาการ โรคจากเชื้อ CymMV และลักษณะอนุภาคของเชื้อ CymMV ที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV โดยวิธี IEM

(ก) อาการใบด่างแบบ mottle ตามความยาวของใบ

(ข) อนุภาคของเชื้อ CymMV บริสุทธิ์มีลักษณะท่อนยาวคด ขนาดประมาณ 480 นาโนเมตร ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 60,000 เท่า



ภาพที่ 3 ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CymMV วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

(ก) แถบโปรตีนขนาดประมาณ 26.2 kDa ในตัวอย่างพืชที่เป็นโรค และมีขนาดตรงกับเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ที่สกัดได้

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

H คือ น้ำคั้นจากใบกล้วยไม้หวายมาตามปกติ

D คือน้ำคั้นจากใบกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค

P คือ เชื้อ CymMV บริสุทธิ์

(ข) ตำแหน่งของการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CymMV โดยวิธี Western blotting

ตารางที่ 1 การหาไตเตอร์ของแอนติซีรัมจากหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการฉีดกระตุ้น และทดสอบด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA ใช้ไวรัสบริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน

หนูตัวที่	ค่าการเจือจางซีรัมแบบ 2 fold dilution									Control	
	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,600	1:51,200	D ^{1/}	H ^{1/}
1	2.772 ^{2/}	2.227	1.427	0.799	0.502	0.340	0.216	0.145	0.111	3.173	0.093
2	2.888	2.482	1.756	0.994	0.653	0.371	0.248	0.1795	0.130	3.110	0.083
3	3.126	3.112	2.705	2.154	1.394	0.935	0.577	0.250	0.172	2.910	0.090

^{1/} D = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค H = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติ

^{2/} ค่า A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติมสับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

เชื่อมเซลล์ทั้งหมดรวม 3 ครั้ง ได้ผลดังนี้

การเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1 มีไฮบริโดมาเจริญขึ้นมา 106 หลุม คิดเป็น 22.55% และมีจำนวน หลุมที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV จำนวน 1 หลุม แต่หลังจากการทำ limiting dilution ไม่พบ เซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้

การเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 2 มีไฮบริโดมาเจริญขึ้นมา 470 หลุม คิดเป็น 100% และหลุมที่ทำ ปฏิกริยาให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกริยากับน้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรคมียาจำนวน 11 หลุม ให้ค่า A_{405} อยู่ในช่วง 0.427–1.207 แต่มีไฮบริโดมาจำนวน 7 หลุม ที่ทำปฏิกริยากับน้ำคั้นจาก กล้วยไม้หวายมาตามปกติ โดยให้ค่า A_{405} สูง เหลือไฮบริโดมาที่นำมาทำ limiting dilution จำนวน 4 หลุม แต่หลังจากการทำ limiting dilution ครั้งที่ 1 ไม่พบเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อเชื้อ CymMV

การเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ได้ไฮบริโดมาจำนวน 338 หลุม คิดเป็น 71.9% พบว่าหลุมที่ทำ ปฏิกริยากับเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ มีจำนวน 11 หลุม ให้ค่า A_{405} อยู่ระหว่าง 0.444–3.234 เลือก 4 หลุม ที่มีค่า A_{405} มากกว่า 1.0 นำมาทำ limiting dilution ให้ได้ไฮบริโดมาโคลนเดี่ยว

จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าไฮบริโดมาส่วนใหญ่ที่ได้มานั้นให้ค่า A_{405} ต่ำ และทำปฏิกริยากับพืชปกติ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแอนติเจนที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลองมีความเข้มข้น ของไวรัสต่ำเกินไป ดังนั้นจึงได้ใช้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ใหม่ เข้มข้น 2.534 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และมีค่า A_{280}/A_{260} เท่ากับ 0.91 ในการ boost หนูตัวที่ 3 เพื่อทำการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ต่อไป

ข้อสังเกตจากการเชื่อมเซลล์ทั้ง 3 ครั้ง พบว่ามีจำนวนไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV น้อย ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุที่ไฮบริโดมาพัฒนามาจากการเชื่อมรวมของเซลล์ตั้งแต่ 2 เซลล์ ขึ้นไป ซึ่งเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส ทำให้มีโอกาสสูงที่จะพบการสูญเสียโครโมโซมในการสร้าง แอนติบอดีไป อัตราการสูญเสียโครโมโซมในการสร้างแอนติบอดีมีประมาณ 10^3 ถึง 10^4 เซลล์ต่อ การแบ่งตัว 1 ครั้ง อย่างไรก็ตามส่วนมากพบว่าถ้าฉีดกระตุ้นหนุอย่างเหมาะสมจะได้เซลล์ที่สร้าง แอนติบอดีประมาณ 1-10% (วิชัย, 2540) จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าจำนวนหลุมที่เกิดไฮบริโดมาคิด

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดเซลล์ไฮบริโดมาใน fusion plate ของการเชื่อมเซลล์ 3 ครั้ง และจำนวนไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV

ครั้งที่	จำนวนหลุมที่เกิดเซลล์ไฮบริโดมา ต่อจำนวนหลุมทั้งหมด	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์	จำนวนหลุมที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV
1	106/470	22.55%	1
2	470/470	100%	4
3	338/470	71.9%	11
ผลรวม	910/1410	64.82%	16

เป็นเปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ยได้เท่ากับ 64.82% และจำนวนไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.13%

เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีจากโคลนที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3 ในเบื้องต้นพบว่าไฮบริโดมาทั้ง 4 โคลน คือ Cy1, Cy2, Cy3 และ Cy4 ทำปฏิกิริยาได้ดีมากกับเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ และ CymMV-CP แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ ORSV-CP และพืชปกติ เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A_{405} ของพืชเป็น โรคต่อพืชปกติ หรือค่า S/N ratio พบว่าโคลนที่ให้ค่าสูงที่สุด 2 โคลน คือ Cy2 และรองลงมาคือ Cy1 จึงนำมาใช้ในการทดลองต่อไป (ตารางที่ 3)

3. การตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจสอบชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (Isotype) ของ MAbs จำนวน 4 โคลน พบว่าโคลน Cy1, Cy2 สร้างแอนติบอดีชนิด IgG2a ส่วน Cy3, Cy4 สร้างแอนติบอดีชนิด IgG1 แต่ทุกโคลน สร้าง Kappa light chain

ผลการทดสอบความจำเพาะของ MAbs จาก 4 โคลน โดยให้ทำปฏิกิริยากับไวรัสสาเหตุโรคพืช 11 ชนิด พบว่าทุกโคลนมีความจำเพาะสูงกับเชื้อไวรัส CymMV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นกล้วยไม้หวายมาดามปกติหรือไวรัสชนิดอื่นในน้ำคั้นพืชที่นำมาทดสอบ ได้แก่ TSWV, TMV, CGMMV, CVMV, MCMV, MDMV, SCMV, PVY, BMV และ CMV (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองพบว่า MAbs ที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ CymMV เพียงชนิดเดียว และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับกล้วยไม้ปกติ เช่นที่พบในการทำปฏิกิริยาของ PAb ซึ่งตรงตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ทั้งนี้เนื่องจาก MAbs มีความจำเพาะต่อ epitope ชนิดเดียว ส่วน PAb ประกอบด้วยแอนติบอดีหลายๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อ epitope ต่างๆ กันบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้น PAb จึงเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่า (ธารารักษ์, 2543)

4. การสกัดอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ด้วย Rec-Protein G Column Chromatography

ผลการเตรียม MAbs บริสุทธิ์ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน Cy1 และ Cy2 พบว่า IgG ถูกชะออกมาใน fraction E1 และ E2 ทั้ง 2 โคลน (ตารางที่ 5) คำนวณความเข้มข้นของ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไฮบริโดมา 4 โคลน ด้วยวิธี
Indirect PTA-ELISA

แอนติเจน	รหัสไฮบริโดมา			
	Cy1	Cy2	Cy3	Cy4
เชื้อ CymMV บริสุทธิ์	3.192 ^{1/}	2.992	2.631	2.599
CymMV-CP	1.091	1.236	1.019	0.998
ORSV-CP	0.099	0.104	0.099	0.111
กล้วยไม้หวายมาดามเป็นโรค	1.392	1.878	1.260	1.211
กล้วยไม้หวายมาดามปกติ	0.100	0.108	0.106	0.105
S/N ratio	13.9a ^{2/}	17.4a	11.9a	11.5a

^{1/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติม
สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{2/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกัน
ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากไฮบริโดมา 4 โคลน โดยใช้ น้ำคั้นพืชที่เป็นโรค ด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA

ไวรัสในน้ำคั้นพืชทดสอบ	รหัสโมโนโคลนอลแอนติบอดี			
	Cy1	Cy2	Cy3	Cy4
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	1.601 ^{1/}	1.352	1.670	0.701
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	0.089	0.077	0.082	0.081
<i>Tobacco mosaic virus</i>	0.081	0.084	0.128	0.085
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	0.095	0.095	0.131	0.085
<i>Chili veinal mottle virus</i>	0.081	0.080	0.102	0.073
<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	0.086	0.091	0.105	0.073
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	0.093	0.085	0.101	0.082
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	0.085	0.081	0.091	0.082
<i>Potato virus Y</i>	0.082	0.075	0.099	0.074
<i>Brome mosaic virus</i>	0.148	0.133	0.147	0.096
<i>Cucumber mosaic virus</i>	0.100	0.098	0.110	0.084
กล้วยไม้หวายมาดามปกติ	0.086	0.089	0.106	0.087

^{1/} ค่า A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติม สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติถือว่าเป็นบวก

ตารางที่ 5 อิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี Rec-Protein G-Sephrose Column Chromatography

Fraction ^{1/}	โมโนโคลนอลแอนติบอดี			
	Cy1		Cy2	
	A ₂₈₀ นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ IgG ^{2/} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	A ₂₈₀ นาโนเมตร	ความเข้มข้นของ IgG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
W1	0.936	0.669	0.925	0.661
W2	0.824	0.588	0.879	0.628
W3	0.116	0.083	0.895	0.639
E1	1.624	1.160	1.385	0.989
E2	2.454	1.753	2.415	1.725
E3	0.407	0.290	0.158	0.113
E4	0.076	0.054	0.051	0.036
E5	0.034	0.024	0.028	0.020
E6	0.064	0.046	0.055	0.039

^{1/} W คือ fraction ที่ได้จากการล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer E คือ fraction ที่ได้จากการล้างคอลัมน์ด้วย elution buffer

^{2/} ความเข้มข้นของ IgG คำนวณจากสูตร = $\frac{\text{ค่า}A_{280}}{1.4} = \text{IgG (มก.มล)}$

แอนติบอดีภายหลังนำไป dialysis ได้เท่ากับ 1.457 และ 1.357 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตรโคลนละ 2 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าในส่วนของ fraction W ยังคงมีโปรตีนอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่าเป็นแอนติบอดีต่อเชื้อ CymMV

การทดสอบค่าไตเตอร์ของ IgG บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่า MAb รหัส Cy1 และ Cy2 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 409,600 และ 102,400 (ตารางที่ 6)

5. การเชื่อมโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์กับเอนไซม์ Alkaline phosphatase (MAb-AP)

เมื่อนำ MAb-AP มาหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี direct PTA-ELISA พบว่าได้ค่าไตเตอร์ประมาณ 6,400 (ตารางที่ 7) เลือกค่าการเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสม คือ 1:500, 1:1,000 และ 1:2000 มาใช้ในการพัฒนาวิธีการทดสอบต่อไป

6. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ CymMV โดยวิธีการทางชีววิทยา

6.1 การทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay

6.1.1 ค่าการเจือจางของน้ำคั้นพืชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ELISA

การทดลองหาค่าการเจือจางน้ำคั้นพืชอัตราส่วน 1:5 ถึง 1:320 ในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่าการเจือจาง 1:20 ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด คือ 15.1 รองลงมา คือค่าการเจือจาง 1:40, 1:80, 1:10, 1:5 และ 1:160 ตามลำดับ แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติแต่เลือกใช้การเจือจาง 1:20 สำหรับการทดสอบต่อไปเนื่องจากมีค่า S/N ratio สูงสุด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 การหาไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน

ไฮบริโดมา	ค่าการเจือจาง MAb แบบ 2 fold dilution							Control	
	โคลน	1:6,400	1:12,800	1:25,600	1:51,200	1:102,400	1:204,800	1:409,600	
								D ^{1/}	H ^{1/}
	Cy1	1.811 ^{2/}	1.578	1.202	0.911	0.624	0.436	0.287	2.971 0.115
	Cy2	1.229	0.828	0.569	0.351	0.232	0.164	0.123	2.874 0.113

^{1/} D = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค H = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติ

^{2/} ค่า A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติม สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

ตารางที่ 7 การหาไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ ด้วยวิธี Direct PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CymMV บริสุทธิ์ เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน

ซ้ำ	ค่าการเจือจางของ MAb-AP แบบ 2 fold dilution							Control	
	ที่	1:800	1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:12,800	1:25,600	1:51,200	
									D ^{1/} H ^{1/}
	1	2.293 ^{2/}	1.520	0.971	0.577	0.390	0.243	0.171	1.246 0.226

^{1/} D = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค H = น้ำคั้นจากกล้วยไม้หวายมาตามปกติ

^{2/} ค่า A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติม สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

ตารางที่ 8 การเจือจางน้ำคั้นกล้วยไม้หวายมาตามที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CymMV ทดสอบด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA

ค่าการเจือจาง	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio
	น้ำคั้นหวายมาตามเป็นโรค	น้ำคั้นหวายมาตามปกติ	
1:5	1.539 ^{1/}	0.113	13.6a ^{2/}
1:10	1.304	0.095	13.7a
1:20	1.425	0.095	15.1a
1:40	1.340	0.090	14.9a
1:80	1.359	0.098	13.9a
1:160	1.223	0.093	13.1a
1:320	1.188	0.099	12.1a

^{1/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติถือว่าเป็นโรค

^{2/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

6.1.2 ค่าการเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยา

ELISA

6.1.2.1 Indirect PTA-ELISA

เปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1 กับความเข้มข้นของ blocking buffer พบว่าหน่วยทดลองที่จัดอยู่ในกลุ่ม A มี 5 หน่วยทดลอง คือ a1b3, a1b1, a1b2, a2b3 และ a2b1 โดยค่า S/N ratio เท่ากับ 15.5, 15.2, 14, 13.1 และ 12.9 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ ข 2) ดังนั้นจึงเลือกหน่วยทดลองที่ a2b1 คือ เจือจางที่ 1:6,000 ใน 1% Sk ในการทดลองต่อไป เนื่องจากการเจือจาง MAb สูงที่สุด และยังให้ค่าความแตกต่างของผลการตรวจฟิเป็นโรค และ ฟิซปกติที่สูง

6.1.2.2 Direct PTA-ELISA

เปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1-AP กับความเข้มข้นของ blocking buffer พบว่าค่าการเจือจาง 1:1,000 ใน 3% Sk ที่ให้ผลการวิเคราะห์ค่า S/N ratio สูงสุด เท่ากับ 21.1 รองลงมา คือเจือจาง 1:500 ใน 3% Sk และ เจือจาง 1:500 ใน 1% Sk ซึ่งให้ค่าเฉลี่ย S/N ratio เท่ากับ 20.1 และ 19.6 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกค่าการเจือจางที่ 1:1,000 ใน 3% Sk สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ blocking buffer จะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะได้ (ตารางผนวกที่ ข3) (Crowther, 2001)

6.1.2.3 DAS-ELISA

เปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1-AP กับความเข้มข้นของ blocking buffer ที่เหมาะสม ที่ใช้เป็น secondary antibody ในปฏิกิริยา DAS-ELISA พบว่าเจือจาง 1:500 ใน 3% Sk ให้ผลการวิเคราะห์ค่า S/N ratio สูงที่สุด รองลงมา คือเจือจาง 1:1,000 ใน 3% Sk และเจือจาง 1:500 ใน 1% Sk ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 10.7, 8.9 และ 7.8 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ ข7) ดังนั้นจึงเลือกค่าการเจือจางดังกล่าวทั้ง 3 ค่า เพื่อนำมาทำปฏิกิริยาต่อไป

เปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1-AP (secondary antibody) ในการทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy2 (primary antibody) ด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่าเจือจาง MAb-Cy2 1:5,000 ทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:500 ใน 3% Sk ให้ผลการวิเคราะห์ค่า S/N ratio สูงที่สุด รองลงมา คือ เจือจาง MAb-Cy2 1:3,000 ทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:500 ใน 3% Sk และเจือจาง MAb-Cy2 1:5,000 ทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:500 ใน 1% Sk ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 10.7, 9.8 และ 8.9 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ ข8) ดังนั้นจึงเลือกเจือจาง MAb-Cy2 1:5,000 ที่ทำปฏิกิริยากับ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:500 ใน 3% Sk มาใช้ในวิธี DAS-ELISA เนื่องจากให้ค่า S/N ratio สูง

6.2 ความไวของวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay ในการตรวจตัวอย่างกล้วยไม้

ทดสอบความไวของการตรวจเชื้อ CymMV ด้วยวิธี ELISA 3 แบบ ได้แก่ indirect PTA-ELISA, direct PTA-ELISA และ DAS-ELISA ในตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตาม พบว่าวิธี indirect PTA-ELISA มีความไวสูงสุด คือสามารถตรวจพบไวรัสได้ที่ระดับ 5 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร หรือเท่ากับปริมาณไวรัส 0.25 นาโนกรัม ใน 50 ไมโครลิตรของตัวอย่าง รองลงมา คือ DAS-ELISA และ direct PTA-ELISA ตามลำดับ ดังนั้นวิธีการที่ควรเลือกใช้จึงเป็น indirect PTA-ELISA (ตารางที่ 9)

ครุณี (2535) ผลิต MAb ต่อเชื้อ CymMV และเปรียบเทียบวิธีที่เหมาะสมในการตรวจ 3 วิธี ได้แก่ indirect ELISA, immunoelectron microscopy และ tissue printing technique พบว่า วิธี indirect ELISA เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจมากที่สุด คือสามารถตรวจพบไวรัสเข้มข้น 31 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรายงานของ Vejaratpimol และคณะ (1998) พบว่าความสามารถในการตรวจพบเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ MAb อยู่ที่ประมาณ 50-100 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าวิธี indirect PTA-ELISA ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้โดยใช้ MAb-Cy1 มีความไวในการตรวจเชื้อ CymMV มากกว่า และสามารถตรวจพบไวรัสได้มากกว่ารายงานของ Meng *et al.* (2007) ที่ผลิต MAb ต่อเชื้อ CymMV เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี antigen-coated plate (ACP)-ELISA พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสบริสุทธิ์ได้ในปริมาณ 0.487 นาโนกรัม

ตารางที่ 9 ความไวในการตรวจเชื้อ CymMV บริสุทธิ์ ด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้น

วิธีการ	ความเข้มข้นของแอนติเจน (ng/ml)									Control	
	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	D ^{1/}	H ^{1/}
Indirect PTA- ELISA	3.01 ^{2/}	2.76	1.99	1.23	0.85	0.61	0.34	0.31	0.29	2.88	0.11
Direct PTA- ELISA	0.29	0.20	0.16	0.13	0.12	0.11	0.10	0.09	0.09	2.48	0.08
DAS ELISA	0.29	0.26	0.22	0.17	0.15	0.14	0.12	0.11	0.10	2.90	0.08

^{1/} D คือ กล้วยไม้ห่วยมาตามเป็นโรค H คือ กล้วยไม้ห่วยมาตามปกติ

^{2/} ค่า A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม
สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

จากงานวิจัยนี้พบว่า MAb ที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจเชื้อ CymMV สูงกว่าที่เคยมีรายงานถึงแม้วิธี indirect PTA-ELISA และ direct PTA-ELISA จะให้ค่า S/N ratio ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 10) แต่มีความไวในการตรวจสอบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน สาเหตุอาจเกิดจากวิธีการ indirect PTA-ELISA ใช้ secondary antibody ช่วยขยายสัญญาณของปฏิกิริยาทำให้มีความไวในการตรวจมากกว่า ในขณะที่วิธีการ direct PTA-ELISA และ DAS-ELISA เป็นวิธีที่แอนติเจนจับกับแอนติบอดีโดยตรงจึงมีความจำเพาะมากกว่า (Crowther, 2001) แต่การเชื่อมแอนติบอดีกับเอนไซม์อาจทำให้แอนติบอดีที่ได้นั้นเสียสภาพไปบางส่วนซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจน ทำให้ความไวของวิธีการลดลง (Boonekamp and Pomp, 1986)

6.3 การตรวจเชื้อ CymMV ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay

จากการทดสอบด้วยวิธี TBIA โดยเปรียบเทียบการสะสมไวรัสในตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ ก้านช่อดอก ใบอ่อน ใบแก่ ลำต้น และราก ของกล้วยไม้หวายมาดามที่เป็นโรค พบว่าเมื่อใช้ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:500 ให้สีของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ 1:1,000 และ 1:2,000 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อเจือจาง 1:1,000 ยังเห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ และให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกับค่าการเจือจาง 1:500 ทุกตัวอย่าง ดังนั้นจึงเลือกค่าการเจือจาง 1:1,000 มาใช้ในการทดลองต่อไป

ผลการตรวจเชื้อ CymMV ในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้หวายมาดาม พบว่ารากของกล้วยไม้ทั้ง 4 ตัวอย่างให้สีของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ ลำลูกกล้วย ช่อดอก ใบอ่อน ใบแก่ และดอก ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ซึ่งผลสอดคล้องกับวิธี indirect PTA-ELISA โดยให้ค่า A_{405} ที่รากสูงกว่าส่วนอื่น บางตัวอย่างพบว่าในส่วนของใบและดอกที่แสดงอาการให้ค่าสูง ดังเช่นตัวอย่างที่ 2 และ 3 ซึ่งการแพร่ของเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้หวายมาดามนั้น Borth และคณะ (2006) รายงานว่า CymMV แพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วโดยเคลื่อนที่ในระบบท่อลำเลียงของพืช ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hu และ Wong (1997) ที่ศึกษาการสะสมของเชื้อ CymMV ในใบยาสูบ และใบแคทลียาที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย โดยวิธี DIG-labelled cRNA พบว่าเชื้อ CymMV มีการสะสมอยู่ที่ส่วนของก้านใบ และลำต้น ดังนั้นจะเห็นว่าส่วนของท่อลำเลียงเป็นส่วนที่มีไวรัสอยู่มาก ซึ่งรากจัดอยู่ในระบบท่อลำเลียงของพืช การทดลองนี้พบการสะสมของไวรัสอยู่มากในราก จึงเป็นข้อแนะนำในการเลือกส่วนของรากมาใช้ในการตรวจเชื้อ CymMV ในกล้วยไม้

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบค่า S/N ratio ของการตรวจเชื้อ CymMV จากกล้วยไม้หวายมาดามด้วยวิธี ELISA ที่พัฒนาได้

วิธีการ	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio ^{1/}
	กล้วยไม้หวายมาดามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาดามปกติ	
Indirect PTA-ELISA	1.610 ^{2/}	0.090	17.9a ^{3/}
Direct PTA-ELISA	1.547	0.082	18.9a
DAS-ELISA	1.642	0.111	14.8a

^{1/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม
 สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{2/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ

ตัวอย่าง ที่	ค่าการเจือจาง MAb-Cy1-AP								
	1:500			1:1,000			1:2,000		
	ใบอ่อน	ใบแก่	ราก	ใบอ่อน	ใบแก่	ราก	ใบอ่อน	ใบแก่	ราก
1									
2									
3									
4									
D ^{1/}									
H ^{1/}									

ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบค่าการเจือจางของ MAb-Cy1-AP ในการตรวจเชื้อ CymMV ในใบอ่อน ใบแก่ และราก ของกล้วยไม้หวายมาดาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay

^{1/} D คือ กล้วยไม้หวายมาดามที่เป็นโรค

H คือ กล้วยไม้หวายมาดามปกติ

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ CymMV ในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้หวายมาดาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay โดยใช้ MAb-Cy1-AP เจือจาง 1:1,000

วิธีการ		ตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดามที่											
		1		2		3		4		D ^{1/}		H ^{1/}	
		LS ^{2/}	CS ^{2/}	LS	CS	LS	CS	LS	CS	LS	CS	LS	CS
ใบ อ่อน	T ^{3/}												
	E ^{3/}	0.178		0.307		1.193		0.358		0.812		0.099	
ใบแก่	T												
	E	0.115		0.113		0.113		0.135		0.252		0.113	
ดอก	T												
	E	0.515		1.168		0.456		0.599		0.467		-	
ช่อดอก	T												
	E	0.167		0.539		0.699		0.158		0.411		-	
ลำลูกกล้วย	T												
	E	0.770		1.069		0.334		0.879		0.879		0.096	
ราก	T												
	E	1.171		1.064		1.230		1.208		1.289		0.107	

^{1/} D = ตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดามที่เป็นโรค H = ตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดามปกติ

^{2/} LS = ตัดชิ้นพืชตามยาว (longitudinal-section) CS = ตัดชิ้นพืชตามขวาง (cross-section)

^{3/} T = TBIA E = ELISA

ตารางที่ 12 อัตราการเจือจางแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ CymMV ด้วยวิธี ELISA และ TBIA

แอนติบอดี	วิธีการ			
	Indirect PTA- ELISA	Direct PTA- ELISA	DAS-ELISA	TBIA
Primary antibody	MAb-Cy1	MAb-Cy1-AP	MAb-Cy2	MAb-Cy1- AP
	1:6,000 ใน 1% Sk	1:1,000 ใน 3% Sk	1:5,000 ใน PBS	1:1,000 ใน 3% Sk
	GAM ^{1/}	-	MAb-Cy1-AP	-
Secondary antibody	1:5,000 ใน PBS	-	1:500 ใน 3% Sk	-

^{1/} GAM คือ goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี ELISA และ TBIA กับชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ทางการค้า GLIFT kit

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect PTA-ELISA และ TBIA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจสอบทางการค้าการ GLIFT kit โดยใช้ตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง โดยเป็นต้นกล้วยไม้หวายมาตามอายุประมาณ 2-3 ปี ที่ซื้อจากร้านค้า ซึ่งแสดงอาการใบด่าง จำนวน 20 ต้น และไม่แสดงอาการ จำนวน 2 ต้น และตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามในขุดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่แสดงอาการโรค จำนวน 8 ตัวอย่าง ผลการเปรียบเทียบพบว่าทั้ง 3 วิธีการให้ผลการตรวจเชื้อ CymMV ที่สอดคล้องกัน คือตรวจพบเชื้อ CymMV 23 ตัวอย่าง และตัวอย่างปกติ 7 ตัวอย่าง

จากตารางที่ 13 ใช้วิธี indirect PTA-ELISA, TBIA และ GLIFT kit ตรวจต้นกล้วยไม้หวายมาตามจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8 ต้น พบว่าตรวจพบเชื้อ CymMV จำนวน 1 ต้น (ตัวอย่างที่ 4) ส่วนตัวอย่างต้นกล้วยไม้หวายมาตามตรวจพบเชื้อ CymMV ทุกตัวอย่าง ไม่ว่าจะแสดงอาการหรือไม่ โดยค่า A_{405} ที่ได้ไม่แปรผันตามลักษณะอาการ เช่น ตัวอย่างที่ 21 ซึ่งไม่แสดงอาการ แต่มีค่า A_{405} ที่ 0.460 และ ที่รากสูงถึง 1.674 ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างต้นกล้วยไม้ที่แสดงอาการบางตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่าหลายตัวอย่างให้ค่าที่รากสูงกว่าที่ใบถึง 4 เท่า (ตัวอย่างที่ 15, 21 และ 24) ซึ่งสอดคล้องกับวิธี TBIA ที่พบว่าในส่วนรากให้ผลการตรวจที่ชัดเจนกว่าส่วนใบ และพบว่า GLIFT kit ให้แถบ Test line ที่ชัดเจนเช่นเดียวกับวิธี TBIA (ภาพที่ 5)

8. ตรวจหาเชื้อไวรัส CymMV ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างโดยวิธี indirect PTA-ELISA และ TBIA ด้วยวิธี one-step RT-PCR โดยสุ่มตรวจจากตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ CymMV 5 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 4, 5, 6 และ 7 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 9, 13, 17, 26 และ 28

จากผลการตรวจด้วยวิธี one-step RT-PCR (ภาพที่ 6ก) พบว่าการสกัด total RNA สามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 10 ตัวอย่าง เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CymMV-CP-F และ CymMV-CP-R เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 672 คู่เบส (ภาพที่ 6ข) ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ ELISA และ TBIA รวมทั้ง 3 ตัวอย่างที่ให้ผลลบ ได้แก่ ตัวอย่างเบอร์ 1, 4

ตารางที่ 13 ผลการตรวจเชื้อ CymMV จากตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตาม 30 ตัวอย่างด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA, TBIA และ GLIFT kit

ตัวอย่างกล้วยไม้ที่	อาการ	Indirect PTA-ELISA		TBIA	GLIFT kit ^{2/}
		L ^{1/}	R ^{1/}		
ตัวอย่าง กล้วยไม้หวาย มาตามจาก ขวดเพาะเลี้ยง เนื้อเชื้อ	1	SL ^{3/}	0.085 ^{4/}	0.082	- ^{5/}
	2	SL	0.079	0.073	-
	3	SL	0.088	0.076	-
	4	SL	0.634	1.265	+
	5	SL	0.085	0.081	-
	6	SL	0.111	0.075	-
	7	SL	0.097	0.075	-
	8	SL	0.091	0.079	-
ตัวอย่างต้น กล้วยไม้หวาย มาตาม	9	mottle	0.609	1.106	+
	10	mottle	0.556	0.457	+
	11	mottle	0.441	0.523	+
	12	mottle	0.444	0.396	+
	13	mottle	0.469	0.495	+
	14	mottle	0.590	0.714	+
	15	mottle	0.434	1.628	+

^{1/} L = ใบอ่อน R = ราก

^{2/} GLIFT kit = ชุดตรวจสอบ gold labeling IgG ตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง และจุดประดำของกล้วยไม้ (CymMV และ ORSV) กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

^{3/} SL = symptomless คือ กล้วยไม้หวายมาตามที่ไม่แสดงอาการโรค

^{4/} A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{5/} - หมายถึงตรวจไม่พบเชื้อ CymMV + หมายถึงตรวจพบเชื้อ CymMV

ตารางที่ 13 (ต่อ) ผลการตรวจเชื้อ CymMV จากตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาดาม 30 ตัวอย่างด้วยวิธี Indirect PTA-ELISA, Direct TBIA และ GLIFT kit

ตัวอย่างกล้วยไม้เบอร์		อาการ	Indirect PTA-ELISA		TBIA	GLIFT kit ^{2/}
			L ^{1/}	R ^{1/}		
ตัวอย่างต้น กล้วยไม้หวาย มาดาม	16	mottle	0.908 ^{4/}	0.393	+ ^{5/}	+
	17	mottle	0.820	0.664	+	+
	18	mottle	0.631	0.894	+	+
	19	mottle	0.435	0.440	+	+
	20	SL ^{3/}	0.484	0.378	+	+
	21	SL	0.460	1.674	+	+
	22	mottle	0.886	0.514	+	+
	23	mottle	0.528	0.596	+	+
	24	mottle	0.714	2.860	+	+
	25	mottle	0.474	0.408	+	+
กล้วยไม้หวายมาดามเป็นโรค	26	mottle	0.440	0.412	+	+
	27	mottle	0.894	0.451	+	+
	28	mottle	0.419	0.421	+	+
	29	mottle	0.600	0.363	+	+
	30	mottle	1.147	1.542	+	+
กล้วยไม้หวายมาดามปกติ		-	0.079	0.076	-	-

^{1/} L = ใบอ่อน R = ราก

^{2/} GLIFT kit = ชุดตรวจสอบ gold labeling IgG ตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง และจุดประคำของกล้วยไม้ (CymMV และ ORSV) กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

^{3/} SL = symptomless คือ กล้วยไม้หวายมาดามที่ไม่แสดงอาการโรค

^{4/} A₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติถือว่าเป็นบวก

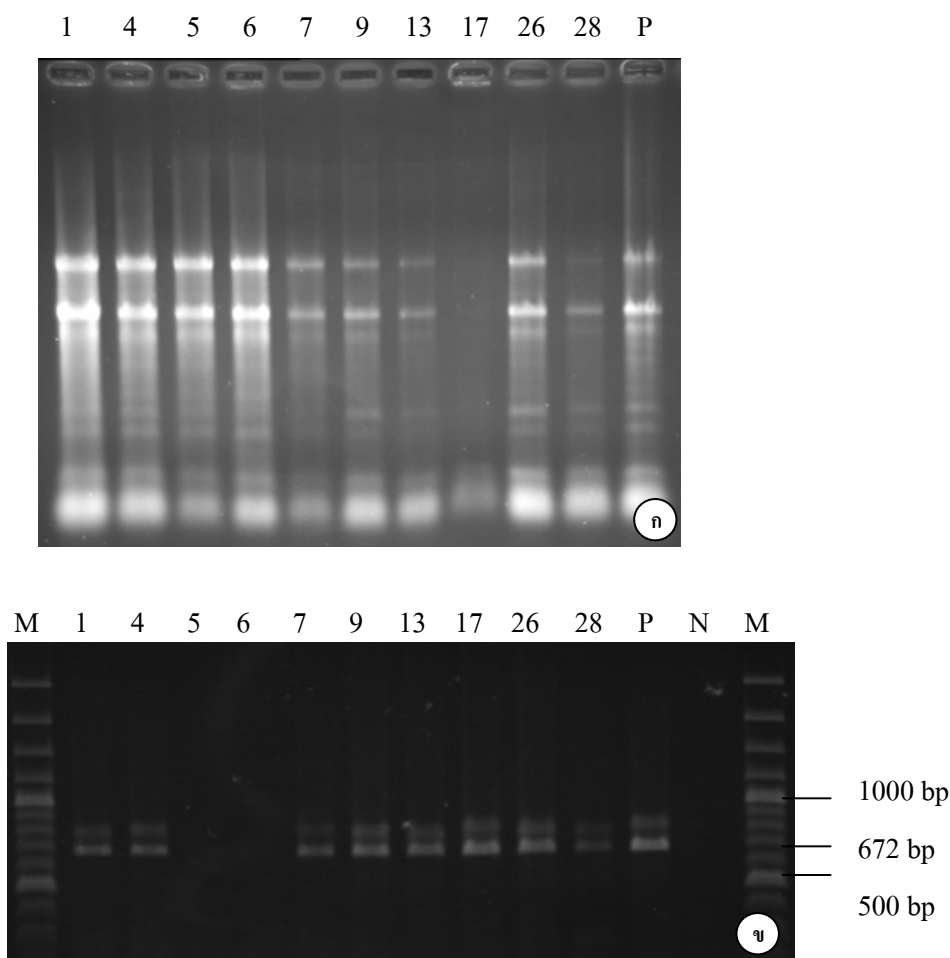
^{5/} - หมายถึงตรวจไม่พบเชื้อ CymMV + หมายถึงตรวจพบเชื้อ CymMV

No.	TBIA		kit	No.	TBIA		kit	No.	TBIA		kit
	L ^{1/}	R ^{1/}			L	R			L	R	
1				11				21			
2				12				22			
3				13				23			
4				14				24			
5				15				25			
6				16				26			
7				17				27			
8				18				28			
9				19				29			
10				20				30			
D				H							

ภาพที่ 5 ผลการตรวจเชื้อ CymMV จากกล้วยไม้หวายมาดาม ด้วยวิธี Tissue blot immunoassay

โดยใช้ MAbs-Cy1-AP เจือจาง 1:1,000 เปรียบเทียบกับ GLIFT kit

^{1/} L = ใบอ่อน R = ราก



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามที่ให้ผลบวกและผลลบกับวิธี indirect ELISA และ TBIA โดยวิธี one-step RT-PCR

(ก) RNA ของเชื้อไวรัส CymMV ที่สกัดได้จากตัวอย่างกล้วยไม้หวายมาตามตัวอย่างที่ 1, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 26, 28 และ P คือตัวอย่างควบคุมที่เป็นบวก ได้แก่ กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค โดยแยกขนาดใน 8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 x TBE buffer และย้อมสีด้วย ethidium bromide

(ข) แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา one-step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CymMV-CP-R และไพรเมอร์ CymMV-CP-F แยกขนาดใน 8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer และย้อมสีด้วย ethidium bromide

M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (100 bp DNA ladder)

P คือกล้วยไม้หวายมาตามที่เป็นโรค

N คือน้ำกลั่น

และ 7 ดังนั้น one-step RT-PCR สามารถตรวจพบเชื้อ CymMV ได้มากกว่าวิธี indirect PTA-ELISA และ TBIA จำนวน 2 ตัวอย่าง

อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยโรคกล้วยไม้เบื้องต้นยังคงนิยมวิธี ELISA เนื่องจากมีความยุ่งยากน้อยกว่าวิธี PCR และตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากๆ ในคราวเดียวกันได้ เช่นเดียวกับรายงานจุฑามาศ (2545) ซึ่งเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CymMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection 4 วิธี ได้แก่ Western blot analysis, tissue printing, dot blot analysis และ ELISA กับเทคนิค RT-PCR พบว่า ELISA เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดี และมีความเหมาะสมมากกว่าวิธีอื่น ส่วน RT-PCR เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำมากที่สุด แต่ขั้นตอนหลายขั้นตอน และทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือทางชีวโมเลกุลพร้อม จึงเป็นวิธีการที่ยุ่งยากกว่า

ทั้งนี้แอนติบอดีที่มีคุณภาพดีที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาไปเป็นชุดตรวจสอบซึ่งมีหลายรูปแบบ เช่น ELISA และ immunostrip เป็นต้น โดยจะช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานใช้เวลาในการทำงานลดลง และสะดวกมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบให้ครอบคลุมตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมเชื้อ CymMV บริสุทธิ์จากใบกล้วยไม้หวายมาตามที่ได้แสดงอาการโรค ได้ไวรัสบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 0.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งสิ้น 10 มิลลิกรัม จากใบพืช 100 กรัม มีค่า A_{280}/A_{260} เท่ากับ 0.90 จากการตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี IEM พบอนุภาคไวรัสท่อนยาวคดขนาดความยาว 480 นาโนเมตร สามารถทำปฏิกิริยากับ PAb-CymMV ได้อย่างจำเพาะ การศึกษาขนาดและตำแหน่งของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting พบว่ามีขนาดประมาณ 26.2 kDa
2. การผลิต MAbs ที่จำเพาะต่อเชื้อ CymMV โดยการเชื่อมเซลล์มัยอิโดมา กับเซลล์ม้ามของหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c ได้ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะสูง และทำปฏิกิริยาได้ดีกับเชื้อ CymMV จำนวน 4 โคลน คือ Cy1, Cy2, Cy3 และ Cy4 เลือกโคลน Cy1 และ Cy2 มาเพิ่มปริมาณ MAbs เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
3. การทดสอบความจำเพาะของ MAbs โดยการทดสอบกับไวรัสชนิดอื่นในน้ำคั้นพืชเป็นโรค ได้แก่ *Tomato spotted wilt virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Chili veinal mottle virus*, *Maize chlorotic mottle virus*, *Maize dwarf mosaic virus*, *Sugarcane mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Brome mosaic virus* และ *Cucumber mosaic virus* พบว่าแอนติบอดีจากทุกโคลนมีความจำเพาะกับเชื้อ CymMV สูง ไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติและไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ
4. พัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ CymMV โดยศึกษาถึงความเข้มข้นของแอนติบอดี ชนิดของ blocking buffer และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาในวิธี indirect PTA-ELISA, direct PTA-ELISA และ DAS-ELISA จากนั้นเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบ พบว่า วิธี indirect PTA-ELISA มีความไวในการตรวจสอบสูงสุด คือสามารถตรวจได้ถึงระดับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 4 ชั่วโมง
5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect PTA-ELISA และ TBIA ในการตรวจตัวอย่างใบอ่อนและรากของกล้วยไม้หวายมาตามจำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากขุดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8 ตัวอย่าง ตรวจแล้วให้ผลบวก 1 ตัวอย่าง ส่วนอีก 22 ตัวอย่าง จากต้นกล้วยไม้ 20

ต้นที่แสดงอาการ และ 2 ต้นที่ไม่แสดงอาการนั้น ให้ผลบวกทุกตัวอย่าง โดยวิธี ELISA และ TBIA ให้ผลที่สอดคล้องกัน เมื่อทดลองนำชุดตรวจสอบทางการค้า GLIFT kit มาเปรียบเทียบกับให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มตัวอย่างกล้วยไม้ที่ให้ผลบวก 23 ตัวอย่างนั้นมีประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนตัวอย่างที่ให้ค่า A_{405} ในรากสูงกว่าใบอ่อน โดยในบางต้นให้ค่า A_{405} สูงถึง 4 เท่าของค่า A_{405} ที่ได้จากใบอ่อน เช่นเดียวกับผลการตรวจโดยวิธี TBIA แสดงว่ามีการสะสมของไวรัสที่รากเป็นจำนวนมาก ดังนั้นรากจึงเป็นส่วนของต้นกล้วยไม้ที่น่าจะนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบได้ดี ซึ่งจะไม่กระทบกับความงามของต้นกล้วยไม้ โดยควรใช้รากที่ไม่แก่เกินไป หรือแห้ง เนื่องจากอาจตรวจพบไวรัสได้ในปริมาณน้อยกว่าที่ควร

6. การเปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างโดยวิธี indirect PTA-ELISA, TBIA และ one-step RT-PCR โดยสุ่มตรวจจากตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ CymMV โดยวิธี indirect PTA-ELISA และ TBIA จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 4, 5, 6 และ 7 และตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 9, 13, 17, 26 และ 28 นำมาตรวจด้วยวิธี one-step RT-PCR พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพิ่มจากวิธีทางซีรัมวิทยาอีก 2 ตัวอย่าง โดยเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 672 คู่เบส แม้ว่าวิธี one-step RT-PCR จะมีความแม่นยำในการตรวจเชื้อ CymMV มากกว่าวิธี indirect PTA-ELISA และ direct TBIA เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสทำให้สามารถตรวจตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสอยู่น้อยมากได้ อย่างไรก็ตามวิธีการ indirect PTA-ELISA และ TBIA ที่ใช้แอนติบอดีที่มีคุณภาพดี และมีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสสูง ก็สามารถใช้ในการตรวจสอบกล้วยไม้ในเบื้องต้น หรือการตรวจสอบตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้วิธี ELISA และ TBIA ที่พัฒนาขึ้นยังใช้เวลาการทดสอบน้อย และไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อน หรือห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล เช่นเดียวกับวิธี PCR

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มเกษตรกรสัจจร. 2541. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 5. ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

กลอยใจ สำเร็จวานิชย์. 2534. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Cymbidium Mosaic Virus* (CymMV) และการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑามาศ เพี้ยชัย. 2545. การยับยั้งเชื้อ *Odontoglossum Ringspot Tobamovirus* โดยใช้สายเปปไทด์สังเคราะห์ melittin. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ชัยวัฒน์ กิตติกุล. 2540. เอกสารประกอบการสอน โรคติดเชื้อ และภูมิคุ้มกัน (infection and immunity). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: <http://micro.sci.ku.ac.th/fscicvk/mab.htm>, 20 ธันวาคม 2551.

ดรุณี วงศ์ศิริธร. 2535. **Comparison of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in detection of *Cymbidium Mosaic Virus*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีระ สุตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟีนีฟับบลิซซิ่ง, กรุงเทพฯ.

ธารารักษ์ ธารากุล และ สิริฤกษ์ ทรงศิริไ. 2543. โมโนโคลนัลแอนติบอดี. ใน: สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, บรรณาธิการ. อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. พีพีเอส ซาชน์เทคนิคัล, กรุงเทพฯ.

ณัฏฐวรรณ รุ่งโรจน์. 2538. การโคลนยีน การศึกษาการจัดเรียงลำดับเบส และการตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค *Cymbidium mosaic virus* และ *Odontoglossum ring spot virus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ระพี ศาคริก. 2544. กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. โครงการส่งเสริมคุณธรรมและการศึกษา, กรุงเทพฯ.
- รัชนิ์ องประยูร. 2545. ปฏิบัติการเชรุ่มวิทยาทางด้านโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 4, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- วัชรินทร์ ชูศิลป์. 2525. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางซีรัมวิทยาในการตรวจสอบ *Cymbidium mosaic virus* และ *Tobacco mosaic virus-orchid strain* ของกล้วยไม้ชนิดต่างๆ . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2535. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุรภี กิตติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิตติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา, 2532. การตรวจ *Cymbidium mosaic virus* ด้วยวิธี Dot-ELISA และ DAS-ELISA. วารสารวิชาการเกษตร. 7 (1). แหล่งที่มา: <http://it.doa.go.th/journal/php/detail.php?id=192>, 25 ธันวาคม 2550.
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. การผลิตชุดตรวจสอบไวรัสพืชเพื่อใช้เอง GLIFT kit. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. 2551. ดอกกล้วยไม้สด:ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/export/1301OC.xls>, 9 กุมภาพันธ์ 2552.
- Boonekamp, P.M. and H. Pomp. 1986. Problems concerning the production of monoclonal antibodies for plant diagnostic purposes. **Acta Hort.** 177:103-110.
- Borth, W.B., K. Barry, K. Obsuwan, M.Q. Xu, R.W. Liu, A.R. Kuehnle and J.S. Hu. 2006. Movement of *Cymbidium Mosaic Virus* and Transgenic Resistance in *Dendrobium* Orchids. **XI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants.** 46 (1). Available Source: http://www.pubhort.org/actahort/books/722/722_17.htm, March 1, 2008.

- Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chua. 1992. Characterization of *Cymbidium mosaic virus* coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. **Plant. Mol. Biol.** 18: 1091-1099.
- Chung, S.Y., K. E. Yoon, K.H. Ryu and W.M. Park. 1996. Detection of *Cymbidium mosaic virus* from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of the viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. **J. Kor. Soc. Hort. Sci.** 37: 158-165.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34: 475-483.
- Crowther, J.R. 2001. **The ELISA Guidebook**. Humana Press Inc. Totowa.
- Eun, A.J.C., L. Huang, F.T. Chew, S.F.Y. Li and S.M. Wong. 2002. Detection of two orchid viruses Using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. **J. Virol. Meth.** 99 (1-2): 71-79.
- Eun, A.J.C., M.L. Seoh and S.M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan[®] real-time RT-PCR. **J. Virol. Meth.** 87 (1-2): 151-160.
- Faccioli, G. and F. Marani. 1979. *Cymbidium mosaic virus* associated with flower necrosis in *Cattleya* orchids. **Phytopathologia Med.** 18: 21- 25.
- Francki, R.I.B., McLean GD. 1968. Purification of *potato virus X* and preparation of infectious ribonucleic acid by degradation with lithium chloride. **Aust J. Biol Sci.** 21 (6):1311-1318.
- Frowd, J.A. and J.H. Tremaine. 1977. Physical, chemical, and serological properties of *cymbidium mosaic virus*. **Phytopathology** 67: 43-49.

- Gibbs, A., A. Mackenzie, A. Blanchfield, P. Cross, C. Wilson, E. Kitajima, M. Nightingale and M. Clements. 2000. Viruses of orchids in Australia: their identification, biology and control. **Australian Orchid Review**. 65: 10–21.
- Gourdel, S. and F. Leclerc-Le Quillec. 2001. Coat protein gene of *Cymbidium mosaic virus* from *Vanilla fragrans* in Reunion Island. **J. Phytopathol.** 149: 561-564.
- Hammond, J. and R.L. Jordan. 1990. Dot blots (viruses) and colony screening, pp. 237-248. In R. Hampton and S. de Boer, eds. **Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens**. The American Phytopathological Society, Minnesota USA.
- Hu, W.H. and S.M. Wong. 1998. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tabamovirus* (ORSV) in orchids. **J. Virol. Meth.** 70 (2): 193-199.
- Hsu, H.T., L. Barzuna, Y.H. Hsu, W. Bliss and K.L. Perry. 2000. Identification and Subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with Mouse Monoclonal Antibody. **Phytopathology** 90: 615-620.
- Jensen, D. D. 1950. Mosaic of *Cymbidium* orchids. **Phytopathology** 40: 966-967
- Jensen, D. D. 1951. Mosaic black streak disease of *Cymbidium* orchids. **Phytopathology** 41: 410-414.
- Jensen, D. D. 1959. **Virus disease of orchids**. In: C. L. Withner, Editor. The Orchids: A Scientific Survey. Ronald Press, New York, USA. pp. 431–458.
- Kado, C.I. and D.D. Jensen. 1964. *Cymbidium mosaic virus* in *Phalaenopsis*. **Phytopathology** 54: 974-977.

- Khentry, Y., A. Paradornuwat, S. Tantiwiwat, S. Phansiri and N. Thaveechai. 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. **Crop Prot.** 25 (9): 926-932.
- Kim, K.K., J.T. Kunisaki and Y. Sagawa. 1970. Shoot tip culture of dendrobiums. **Amer. Orch. Soc. Bull.** 39: 1077-1080.
- Kiratiya-angul, S., K. Kiratiya-angul and N. Dema. 1991. Antiserum production and detection of TMV-O on *Dendrobium* and *Oncidium*, **Annual Report of the Division of Plant Pathology and Microbiology**. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok. 53–60 pp.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lawson, R. H. and S. Ali. 1975. Orchid viruses and their detection by bioassay, serology and electron Microscopy. **Handbook on Orchid Pests and Disease No. 4 of Amer. Orchid Soc.** 112 pp.
- Lee, S.C. and Y.C. Chang. 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nda5* mRNA. **Plant Pathol. Bull.** 15: 187-196.
- Liddell, J. E. and A. Cryer. 1991. **A Practical Guide to Monoclonal Antibody**. John Wiley and Sons, Inc. New York. 188 pp.
- Lim, S.T., S.M. Wong, C.Y. Yeong, S.C. Lee and C.J. Goh. 1993. Rapid detection of cymbidium Mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). **J. Virol. Meth.** 41 (1): 37-46.

- Martin, S., D. Alioto., R. G. Milne, J. Guerri and P. Moreno. 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field tree by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. **Plant Pathol.** 51: 134-141.
- Meng, CM., J.X. Wu, L. Xie , J.K. Zheng and J. Hong. 2007. Production of monoclonal antibodies to *Cymbidium mosaic virus* and application in orchids virus detection. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 47 (5): 928-31.
- Milne, R.G. and D. E. Lesemann. 1978. An immuno-electron microscope investigation of oat sterile dwarf and related viruses. **Virology** 9: 299-304.
- Noordam, D. 1973. **Identification of plant viruses : Method &experiments.** Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 207 pp.
- Porter, K.G., A. R. Kuehnle and J. S. Hu. 1996. Lack of seed transmission of *Cymbidium mosaic virus* in dendrobium. *Lindleyana.* 11: 211–213.
- Ryu, K.H., S. J. Kim and W. M. Park. 1998. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in Cymbidium and other orchids in Korea. **J. Kor. Soc. Hort. Sci.** 39: 213–217.
- Seoh, M.L., S.M. Wong and L. Zhang. 1998. Simultaneous TD/RT-PCR detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* with a single pair of primers. **J. Virol. Meth.** 72 (2): 197-204.
- Sherpa, A.R., V. Hallan, P. Pathak and A.A. Zaidi. 2006. Characterization of the coat protein gene of Cymbidium mosaic virus isolates from India. **J. Phytopathol.** 154: 275–280.

- Shi, N., M. Zhu, J. Chen, R. Stratford, T.M.A. Wilson, J.F. Antoniw, I.J. Foulds, S.A. Macfarlane and M.J. Adams. 1995. Molecular characterisation of UK isolates of barley yellow mosaic bymovirus. **Virus Res.** 38: 193–204 pp.
- Tan, S.W.L., S.M. Wong and R.M. Kini. 2000. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. **J. Virol. Meth.** 85 (1-2): 93-99.
- Tanaka, S., H. Nishii, S. Ito, M. K. Iwaki and P. Sommartya. 1997. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. **Plant Dis.** 81: 167–170.
- Vejaratpimol, R., C. Channuntapirat, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka and N. Minamiura. 1998. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Cymbidium mosaic virus* in orchids. **J. Ferment. Bioeng.** 86 (1): 65–71.
- Vejaratpimol, R., C. Channantapipat, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka and N. Minamiura. 1999. Detection and serological relationships of *Cymbidium mosaic potexvirus* isolates. **J. Biosci. And Bioeng.** 87: 161-168.
- Wang, H.L., and W.C. Lin. 2004. Molecular sequencing and analysis of the viral genome of *Cymbidium mosaic virus* Taiwan strain. Accession number: AY571289. **Plant Pathol. Bull.** 17: 221-232.
- Webster, C.G., S.J. Wylie and M.G.K. Jones. 2004. Diagnosis of plant viral pathogen. **Current Science.** 86: 1604-1607.
- William, L. and M.A. Oshiro. 2003. Gene products encoded by *Cymbidium mosaic virus* RNA: protein translated *in vitro*. **Plant Sci.** 72 (1): 141-147.

- Wong, S.M., C.G. Chng, Y.H. Lee, K. Tan and F.W. Zetter. 1994. Incidence of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot viruses* and their significance in orchid cultivation in Singapore. **Crop. Prot.** 13 (3): 235–239.
- Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliott and S.M. Wong. 1990. Viruses of orchid and their control. **Plant Dis.** 74: 621–625.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

HT (hypoxanthine และ thimidine) stock 100 เท่า

- Hypoxanthine (M.W. 136.1 :sigma)	136.1	มิลลิกรัม
(6-hydroxypurine)		
- Thymidine (M.W. 242.2 : sigma)	37.8	มิลลิกรัม
- น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

A (aminopterin) stock 100 เท่า

- Aminopterin (M.W. 440.4 : sigma)	1.76	มิลลิกรัม
(4-amino folic acid; 4-aminopteroyl glutamic acid)		
- น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ หยดสารละลาย 1.0 M NaOH ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ให้ aminopterin ละลายปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วยสารละลาย 1.0 M HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ให้ถูกแสง

G (glutamine) stock 100 เท่า

- Glutamine	2.92	กรัม
- น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย glutamine ให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Penicillin stock 100 เท่า

ละลาย penicillin (1,000,000 unit) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ penicillin สุดท้ายเท่ากับ 100 U/มิลลิลิตร

Streptomycin stock 100 เท่า

ละลาย streptomycin 7.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ streptomycin สุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

2-Mercaptonethanol (2-ME) stock 100x

- 2-Mercaptonethanol	70	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่น (maxima)	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน และนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ละลาย RPMI 1640 (GIBCO) 1 ซอง ในน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติม Na_2HPO_4 2 กรัม เติม penicillin และ streptomycin stock 100 เท่า ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น กรองอาหารด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ขวดมาเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารสำหรับการเก็บเซลล์ในสภาพแช่แข็ง (Freezing medium)

- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	7	มิลลิลิตร
-Fetal calf serum	2	มิลลิลิตร
- Dimethylsulphoxide (DMSO)	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้

อาหารเลี้ยงเซลล์ CM (complete medium)

- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	89	มิลลิลิตร
- Glutamine stock 100 เท่า	1	มิลลิลิตร
- Fetal calf serum	10	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

- อาหารเลี้ยงเซลล์ CM	99	มิลลิลิตร
- HT stock 100 เท่า	1	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

- อาหารเลี้ยงเซลล์ HT	99	มิลลิลิตร
- A stock 100 เท่า	1	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

การเตรียมสารสำหรับการทดสอบ ELISA**Carbonate coating buffer (CB), pH 9.6**

- Na_2CO_3	1.59	กรัม
- NaHCO_3	2.93	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

- NaCl	8.00	กรัม
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.90	กรัม
- KH_2PO_4	0.20	กรัม
- KCl	0.20	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หากเตรียม washing buffer (PBST) ให้เติม 0.05% Tween-20

Substrate buffer, pH 9.8

- Diethanolamine	97.00	มิลลิลิตร
- Sodium azide	0.20	กรัม
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Extraction buffer

- PBS	100.00	มิลลิลิตร
- DIECA	20.0	มิลลิกรัม

Tris-buffer saline (TBS), pH 7.4

- Trisma-base	6.05	กรัม
- NaCl	8.76	กรัม
- NaN_3	0.10	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หากต้องการเตรียม TBST ให้เติม 0.05% tween-20

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

Separating buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

- Tris-base	45.50	กรัม
- ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	250	มิลลิลิตร

Stacking buffer (1.0 M Tris-HCl, pH 6.8)

- Tris-base	30.30	กรัม
-------------	-------	------

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

acrylamide solution

- acrylamide	30.00	กรัม
- bis-acrylamide	0.80	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร		

loading buffer 2 เท่า

- 2-mercaptonethanol	0.20	มิลลิลิตร
- glycerol	2.00	มิลลิลิตร
- 2%SDS	2.00	มิลลิลิตร
- bromophenol blue	0.25	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด		

Running buffer 10 เท่า, pH 8.3

-Tris-base	30.00	กรัม
- Glycine	144.00	กรัม
- 10%SDS	100.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร		

stain solution

- Commissie brilliant blue-R 2500.	25%
- methanol	45.0%
- acetic acid	10.0%
ปรับปริมาตรด้วยน้ำ	

Destain solution

- Methanol	25.0%
- acetic acid	7.0%
ปรับปริมาตรด้วยน้ำ	

12% separating gel (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

- acrylamide solution	4.00	มิลลิลิตร
- 1.5 M tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	3.30	มิลลิลิตร
- 10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
- 10% ammonium persulfate	0.10	มิลลิลิตร
- TEMED	0.004	มิลลิลิตร

6% stacking gel (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร)

- acrylamide solution	0.60	มิลลิลิตร
- 1.0 M tris-HCl, pH 6.8	0.83	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	3.40	มิลลิลิตร
- 10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
- 10% ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
- TEMED	0.005	มิลลิลิตร

Transfer buffer, pH 8.3

- 25 mM Tris-base

- 150 mM glycine

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.02% SDS

การเตรียมสารสำหรับทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์**20 mM Sodium Phosphate buffer, pH 7.0**

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.27	กรัม
- KH_2PO_4	0.94	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7

- Glycine-HCl	11.1	กรัม
- น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 2.7 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

0.1 M Acetic acid, pH 2.8

- Glacial Acetic Acid	5.72	กรัม
- น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 2.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารสำหรับเชื่อมโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับเอนไซม์
alkaline phosphatase

sodium phosphate buffer, pH 6.8

stock solution

- A : 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- B : 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

ผสมสาร A และ B อัตราส่วน 1:2 แล้วปรับ pH ด้วยสาร A หรือ B

0.1 M NaCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

- glutaraldehyde	1%	
- stock glutaraldehyde(50%)	0.02	มิลลิลิตร

ผสมน้ำปริมาตร 0.98 มิลลิลิตร

1 M ethanolamine

- stock ethanolamine	0.06	มิลลิลิตร
----------------------	------	-----------

ผสมน้ำปริมาตร 0.94 มิลลิลิตร

ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primer CymMV-CP-R

Sequence 5'-3'	GAA TCC ATG GGA GAG CCC ACT
Total bases	21 bases
MW	6452 g / mol
OD / ml	11.6
Concentration	59,089.0 pmol
	381.2 µg
Tm	68 °C

Primer CymMV-CP-F

Sequence 5'-3'	AAG CTT TTA TTC AGT AGG GGG GGC
Total bases	24 bases
MW	7459 g / mol
OD / ml	11.2
Concentration	49,625.2 pmol
	370.2 µg
Tm	72 °C

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ข1 อัตราเจือจางน้ำคั้นพืชที่ใช้ และเวลาในการทำ cross absorb ในแต่ละหน่วย
ทดลอง (treatments) ทดสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

Treatments	ค่า A_{405} nm		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	0.124 ^{2/}	2.737	22.157i ^{3/}
a1b2	0.120	2.826	23.549f
a1b3	0.113	2.801	24.929d
a1b4	0.123	2.793	22.808g
a2b1	0.152	2.755	18.130m
a2b2	0.215	2.776	12.952p
a2b3	0.125	2.739	22.003j
a2b4	0.105	2.789	26.690b
a3b1	0.133	2.755	20.762k
a3b2	0.124	2.764	22.282h
a3b3	0.111	2.765	24.990c
a3b4	0.090	2.764	30.923a
a4b1	0.165	2.899	17.555n
a4b2	0.114	2.812	24.866e
a4b3	0.160	2.749	17.186o
a4b4	0.141	2.886	20.489l

^{1/} a = เวลาที่ใช้ในการทำ cross absorb แอนตบอดี โดย a1=1, a2=1.5, a3=2 ชั่วโมง และ a4=O/N
และ b = ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำคั้นพืช โดย b1=1:2, b2=1:5, b3=1:10 และ b4=1:20

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม
สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติถือว่าเป็นโรค

^{3/} ค่า signal-to-noise ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่
เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple
Range Test (DMRT)

ตารางผนวกที่ ข2 อัตราเจือจาง MAb-Cy1 ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา
Indirect PTA-ELISA

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	1.695 ^{2/}	0.112	15.2 ab ^{3/}
a1b2	1.414	0.101	14 abc
a1b3	1.531	0.099	15.5 a
a2b1	1.243	0.097	12.9 abcd
a2b2	1.291	0.108	12 bcd
a2b3	1.312	0.101	13.1 abcd
a3b1	1.183	0.100	11.9 cde
a3b2	0.835	0.096	8.8 efg
a3b3	1.167	0.099	11.9 cde
a4b1	1.181	0.097	12.2 bcd
a4b2	1.029	0.099	10.4 def
a4b3	0.710	0.104	6.9 gh
a5b1	0.920	0.093	10 def
a5b2	0.805	0.100	8.1 fgh
a5b3	0.522	0.101	5.2 h

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1 โดย a1=1:3,000, a2=1:6,000, a3=1:8,000,

a4=1:10,000 และ a5=1:12,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม
สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่
เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple
Range Test (DMRT)

ตารางผนวกที่ ข3 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา
Direct PTA-ELISA

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	3.043 ^{2/}	0.136	19.6 a ^{3/}
a1b2	2.489	0.116	20.1 a
a1b3	1.053	0.101	10.1 c
a2b1	2.928	0.146	19.0 a
a2b2	2.691	0.119	21.1 a
a2b3	1.364	0.101	13.8 bc
a3b1	2.981	0.143	19.3 a
a3b2	1.814	0.098	17.8 ab
a3b3	1.275	0.113	11.4 c

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP โดย a1=1:500, a2=1:1,000 และ a3=1:2,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม
สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่
เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple
Range Test

ตารางผนวกที่ ข4 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:500

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	1.334 ^{2/}	0.273	4.4 ab ^{3/}
a1b2	1.106	0.172	6 a
a1b3	0.147	0.117	1.8 c
a2b1	0.672	0.168	3.8 b
a2b2	0.539	0.092	5.3 ab
a2b3	0.125	0.115	1.4 c

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP โดย a1=1:500, a2=1:1,000 และ a3=1:2,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม

สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ ข5 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:1,500

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	1.603 ^{2/}	0.207	7.8 a ^{3/}
a1b2	1.546	0.172	8.2 a
a1b3	0.172	0.134	2.1 c
a2b1	1.031	0.16	6.2 b
a2b2	0.788	0.14	5.5 b
a2b3	0.129	0.102	1.7 c

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP โดย a1=1:500, a2=1:1,000 และ a3=1:2,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ ข6 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:3,000

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	2.076 ^{2/}	0.263	6.7 ab ^{3/}
a1b2	1.786	0.154	9.8 a
a1b3	0.147	0.126	1.5 c
a2b1	0.941	0.138	5.8 b
a2b2	0.717	0.097	6.5 b
a2b3	0.15	0.104	1.7 c

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP โดย a1=1:500, a2=1:1,000 และ a3=1:2,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม

สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ ข7 อัตราเจือจาง MAb-Cy1-AP ต่อความเข้มข้นของ blocking buffer ในปฏิกิริยา DAS-ELISA ที่ MAb-Cy2 เท่ากับ 1:5,000

Treatments	ค่าเฉลี่ย A_{405} นาโนเมตร		S/N ratio
	กล้วยไม้หวายมาตามเป็นโรค	กล้วยไม้หวายมาตามปกติ	
a1b1 ^{1/}	2.075 ^{2/}	0.204	8.9 ab ^{3/}
a1b2	1.858	0.147	10.7 a
a1b3	0.164	0.144	1.5 c
a2b1	1.131	0.131	7.8 ab
a2b2	0.882	0.106	7.3 b
a2b3	0.128	0.09	1.8 c

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP โดย a1=1:500, a2=1:1,000 และ a3=1:2,000

b = ความเข้มข้นของ blocking buffer โดย b1=1% Sk, b2=3% Sk และ b3=5% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม

สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกล้วยไม้เป็นโรคต่อ A_{405} ของกล้วยไม้ปกติ ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ตารางผนวกที่ ข8 อัตราเจือจาง primary antibody (MAb-Cy2) ต่อ secondary antibody (MAb-Cy1-AP) ในปฏิกิริยา DAS-ELISA

Treatments	S/N ratio
a1b1 ^{1/}	6 cde ^{2/}
a1b2	5.2 de
a1b3	4.4 e
a2b1	8.2 abcd
a2b2	5.5 de
a2b3	7.8 abcd
a3b1	9.8 ab
a3b2	6.5 cde
a3b3	6.7 cde
a4b1	10.7 a
a4b2	7.3 bcde
a4b3	8.9 abc

^{1/} a = ความเข้มข้นของ MAb-Cy2 โดย a1=1:500, a2=1:1,500, a3=1:3,000 และ a4=1:5,000

b = ความเข้มข้นของ MAb-Cy1-AP ที่เจือจางใน blocking buffer ที่เหมาะสมที่เลือกมาได้ โดย b1=MAb-Cy1-AP เข้มข้น 1:500 ใน 3% Sk, b2=MAb-AP เข้มข้น 1:1,000 ใน 3% Sk และ b3=MAb-Cy1-AP เข้มข้น 1:500 ใน 1% Sk

^{2/} ค่า A_{405} ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม สับสเตรท และตัวอย่างที่มีค่า A_{405} มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติถือว่าเป็นบวก

^{3/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า A_{405} ของกลัยไมเป็นโรคต่อ A_{405} ของกลัยไมปกติตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววิภาวี ทองศรี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 26 มกราคม 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	ปี พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) (เกียรตินิยม อันดับ 1) ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปี พ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ปี พ.ศ. 2547 ได้รับทุนการศึกษาและวิจัยจากศูนย์ความ เป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ