ศรีหรรษา มลิจารย์ 2551: การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแตงโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D. 80 หน้า

พัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี (อิมมูโนสตริป) เพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแตง ใช้แอนติบอดี 3 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแตง (MAb-CMV, PAb-CMV) และโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเม้าส์ (RAM) นำ MAb-CMV มาพ่วงกับอนุภาคทองเพื่อเป็นตัวจับแอนติเจนที่บริเวณ conjugate release pad (CRP) ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเคลื่อนย้ายต่อไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Prima 40) ซึ่งถูกเคลือบด้วย PAb-CMV และ RAM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในบริเวณ test line และ control line ตามลำดับ ใช้ 33 glass fiber และ 470 cotton linter เป็นส่วนของ sample application pad (SAP) และ wicking pad (WP) ตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต อิมมูโนสตริปมีขนาด 0.5 x 6.0 ตารางเซนติเมตร การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบยาสูบที่เติมเชื้อไวรัสใบด่างแตง เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบยาสูบปกติและบัฟเฟอร์ พบว่า ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมีความไวที่ระดับ 0.048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติและบัฟเฟอร์ การตรวจสอบใช้เวลา 6-15 นาที ซึ่งความเข้มสีของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของไวรัสในตัวอย่าง

การศึกษาการเตรียมอิมมูโนไลโปโซมเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทดแทนอนุภาคทองในชุดตรวจสอบ เตรียมได้จากเลซิติน คอเลสเตอรอล และฟอสฟาติดิลเอทานอลามินในอัตราส่วน 8:10:1 ได้อิมมูโนไลโปโซมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 256 นาโนเมตร โดยบรรจุสี Sulforhodamine B (SRB) อยู่ภายใน และสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสใบด่างแตงบริสุทธิ์ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคทองและอิมมูโนโกลบูลินต่อหนูเม้าส์โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

Srihunsa Malichan 2008: Development of Rapid Test Kit for Detection of *Cucumber Mosaic Virus* by Immunochromatographic Technique. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Ratchanee Hongprayoon, Ph.D. 80 pages.

A rapid immunochromatographic assay (immunostrip) was developed for the detection of *Cucumber mosaic virus* (CMV). The system employed three antibodies including anti-CMV monoclonal and polyclonal antibodies (MAb-CMV, PAb-CMV) and rabbit anti-mouse polyclonal antibody (RAM). MAb-CMV was conjugated with colloidal gold particles for antigen capture at the conjugate release pad (CRP). The antigen-antibody complex was capillarily transported onto the Prima 40 nitrocellulose membrane where PAb-CMV and RAM were immobilized at the concentration of 1 mg/ml on test line and control line, respectively. A 33 glass fiber and 470 cotton linter were used as sample absorption pad (SAP) and wicking pad (WP) according to the manufacturer. The strip size was 0.5 x 6 cm^2. The efficiency test of the developed immunostrip was assessed by testing with CMV-contaminated tobacco sap. The sensitivity at 0.048 μg/ml showed clear test line and no cross reaction to healthy sap or extraction buffer was observed. This assay can be completed in 6-15 min and the intensity of the reaction was proportional to virus concentration in the sample.

The possibility to replace gold particles with dye-entrapped liposome as a detection reagent in the strip was studied. The liposome was prepared from lecithin, cholesterol and phophatidylethanolamine in a molar ratio of 8: 10: 1. Sulforhodamine B (SRB) fluorescence dye was entrapped. Transmission electron micrograph showed an average size at 256 nanometer in diameter of the SRB-sntrapped liposome. The reaction of immunoliposome was determined by Dot immunobinding assay (DIBA) with purified CMV, CMV coat protein and rabbit anti-mouse IgG.