



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแคงโดยใช้เทคนิค
อิมมูโนโครมาโทกราฟี

Development of Rapid Test Kit for Detection of *Cucumber Mosaic Virus* by
Immunochromatographic Technique

نامผู้วิจัย นางสาวศรียรรษา มลิจารย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์พุทธพร ส่องศรี, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิชัย โมนิรัตน์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแตง
โดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

Development of Rapid Test Kit for Detection of *Cucumber Mosaic Virus*
by Immunochromatographic Technique

โดย

นางสาวศรียรรษา มลิจารย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

ศิริพรรณา มลิจารีย์ 2551: การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส
ใบด่างแดงโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับ
บัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร,
Ph.D. 80 หน้า

พัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี (อิมมูโนสตริป) เพื่อ
การตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแดง ใช้แอนติบอดี 3 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีและ
โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง (MAb-CMV, PAb-CMV) และโพลีโคลนอล
แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเมาส์ (RAM) นำ MAb-CMV มาพ่วงกับอนุภาคทองเพื่อ
เป็นตัวจับแอนติเจนที่บริเวณ conjugate release pad (CRP) ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและ
แอนติบอดีจะเคลื่อนย้ายต่อไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (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 ตาราง
เซนติเมตร การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบยาสูบที่เติม
เชื้อไวรัสใบด่างแดง เปรียบเทียบกับน้ำคั้นใบยาสูบปกติและบัฟเฟอร์ พบว่า ชุดตรวจสอบที่
พัฒนาขึ้นมีความไวที่ระดับ 0.048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ
และบัฟเฟอร์ การตรวจสอบใช้เวลา 6-15 นาที ซึ่งความเข้มสีของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ
ความเข้มข้นของไวรัสในตัวอย่าง

การศึกษาการเตรียมอิมมูโนไลโปโซมเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทดแทนอนุภาคทองในชุด
ตรวจสอบ เตรียมได้จากเลซติน คอเลสเตอรอล และฟอสฟาติดีลเอทานอลามีนในอัตราส่วน
8:10:1 ได้อิมมูโนไลโปโซมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 256 นาโนเมตร โดยบรรจุสี
Sulforhodamine B (SRB) อยู่ภายใน และสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์
โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคทองและอิมมูโนโกลบูลินต่อหนูเมาส์โดยการตรวจสอบด้วยวิธี
Dot immunobinding assay (DIBA)

Srihunsu 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 cm². 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 phosphatidylethanolamine 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-entrapped liposome. The reaction of immunoliposome was determined by Dot immunobinding assay (DIBA) with purified CMV, CMV coat protein and rabbit anti-mouse IgG.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิ สงประยูร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณามอบความรู้ การเอาใจใส่ดูแล และให้คำปรึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลงได้ด้วยดี ตลอดจนกรุณาตรวจแก้ไขเล่มปัญหาพิเศษจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พุทธพร ส่องศรี กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โหมสินธุ์ กรรมการวิชารอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลศิริ ช. กรับส์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่า และดร. ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และร่วมตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและทุนการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาวและพี่ชาย ผู้มอบความรัก กำลังใจ และทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ทั้งในอดีตและปัจจุบัน ขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการเซรุ่มวิทยา เพื่อนสนิทและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ คำแนะนำต่างๆ เสมอมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และคณาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศรียรรษา มลิจารย์

ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	68
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการแยกอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดงด้วย recProtein G-Sepharose 4B conjugate column chromatography	34
2 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่มต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง จากการเจาะเลือด 13 ครั้ง	37
3 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรั่มต่อหนูเม้าส์ จากการเจาะเลือด 18 ครั้ง	39
4 ผลการทำปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี TAS- ELISA	41
5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรของการหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับอนุภาคทอง	42
6 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของน้ำคั้นพืชบนชุดตรวจสอบที่ใช้ sample absorption pad และ wicking pad รูปแบบต่างๆ	47
7 การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาบน control line ในชุดตรวจสอบ	48
8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแดงในตัวอย่างมะเขือเทศ เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี ELISA	53

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิด Double Antibody Sandwich Assay (ก) และ Competitive Assay (ข)	8
2 รูปแบบการทำปฏิกิริยา Triple-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay โดยใช้ MAb หรือ PAb เป็น coating antibody	22
3 รูปแบบการประกอบชุดตรวจสอบเพื่อศึกษาชนิดของวัสดุที่ใช้เป็น wicking pad และ sample pad	24
4 แผนผังการประกอบชุดตรวจสอบ	27
5 ไวรัส CMV ที่เตรียมให้บริสุทธิ์จากใบยาสูบเป็นโรค ด้วยวิธี sucrose gradient centrifugation และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	31
6 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสใบค่างแดง ไอโซเลต KPS10 ที่เตรียมได้จากใบยาสูบเป็นโรคโดยใช้วิธี SDS-PAGE (ก) และ western blotting (ข)	31
7 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ recombinant protein CMV-CP ที่ผ่าน Ni-NTA column โดยใช้วิธี SDS-PAGE	33
8 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG ที่ผ่าน recProtein G-Sepharose 4B conjugate column chromatography โดยใช้วิธี SDS-PAGE	35
9 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลิน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย rec-Protein A column Sepharose 4B conjugate column chromatography โดยใช้วิธี SDS-PAGE	37
10 การหาปริมาณแอนติบอดี (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับอนุภาคทอง	43
11 การเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคทองก่อน (ก) และหลัง (ข) การเชื่อมด้วยแอนติบอดี ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 200,000 เท่า	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การกระจายของขนาดอนุภาคทองคำก่อนและหลังการเชื่อมด้วยแอนติบอดี	44
13	การตรวจสอบปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำก่อนและหลังการเชื่อม MAb-CMV กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี DIBA	45
14	ความเข้มข้นที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง rabbit anti mouse IgG (RAM) บริเวณ control line กับแอนติบอดีที่เชื่อมกับอนุภาคทองคำที่ถูกละลายตะกอนด้วย storage buffer ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน คือ 0.15 (ก) 0.3 (ข) และ 0.6 (ค) เท่าของปริมาตรทองคำเริ่มต้น	47
15	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ เมื่อใช้ sample buffer ที่แตกต่างกัน (ก) TBS, pH 7.4 (ข) TBST, pH 7.4 (ค) PBS, pH 7.4 (ง) PBST, pH 7.4 (จ) PB, pH 7.4 (ฉ) PBT, pH 7.4 (ช) DOA extraction buffer1, pH 7.4 (ซ) DOA extraction buffer2, pH 8.6 (ณ) BIOREBA extraction buffer, pH 7.4 (ญ) Agdia general extraction buffer, pH 7.4	50
16	การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ในการตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแดงในน้ำคั้นใบยาสูบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50, 25,..., 0.012 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการเจือจางแบบ 2 เท่า	51
17	ผลการเคลื่อนที่บนตัวกลางของฟอสฟาติลเอสอีรานอลามีน (PE) ก่อนและหลังการเชื่อมด้วย sulfo-SMCC cross linker โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography	56
18	การแยกไลโปโซมที่บรรจุสี SRB โดยใช้ Sephadex G50-300 gel filtration column เปรียบเทียบสีของไลโปโซมก่อน (ก) และหลัง (ข) การผ่านคอลัมน์ ได้ไลโปโซมลักษณะสีม่วงขุ่นใน fraction แรก ในขณะที่ fraction อื่นๆ เป็นสี sulforhodamine B ที่ไม่ถูกบรรจุในอนุภาคไลโปโซม	57
19	อิมมูโนไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ กำลังขยาย 100 เท่า โดยไลโปโซมที่บรรจุสี sulforhodamine Bเรืองแสงสีแดงเป็นจุดเล็กๆ ภายใต้ความยาวคลื่น 586 นาโนเมตร	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	การตรวจดูไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบกับไลโปโซมที่ไม่บรรจุสี (ก) และบรรจุสี SRB (ข)	58
21	การตรวจสอบปฏิกิริยาของไลโปโซมก่อนและหลังการเชื่อม MAb-CMV กับ แอนติเจน ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี DIBA	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

As	=	Antiserum
BCIP	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CB	=	Carbonate coating buffer
CFA	=	Complete Freund's adjuvant
CM	=	Complete medium
CMV	=	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CMV-CP	=	Recombinant <i>Cucumber mosaic virus</i> coat protein
CMV-KPS10	=	<i>Cucumber mosaic virus</i> Kamphaeng Saen No.10
DIBA	=	Dot immunobinding assay
DIECA	=	Diethylthiocarbamic acid sodium salt
DOPE	=	1, 2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-ethanolamine
$E_{260\text{ nm}}^{0.1\%}$	=	Extinction coefficient
GAM	=	Goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase
GAR	=	Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase
IFA	=	Incomplete Freund's adjuvant
IgG	=	Gamma-immunoglobulin
IP	=	Intraperitoneal injection
M	=	Protein molecular weight markers
MW	=	Molecular weight
NBT	=	Nitro blue tetrazolium salt
NC	=	Nitrocellulose membrane
Ns	=	Normal serum
O.D. ₂₆₀	=	Optical density at 260 nanometer wavelength
O.D. ₂₈₀	=	Optical density at 280 nanometer wavelength
O.D. ₄₀₅	=	Optical density at 405 nanometer wavelength
O.D. ₄₁₂	=	Optical density at 412 nanometer wavelength
O.D. ₅₂₀	=	Optical density at 520 nanometer wavelength
O.D. ₅₉₅	=	Optical density at 595 nanometer wavelength
PAb	=	Polyclonal antibody

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PAb-CMV	=	anti-CMV polyclonal antibody
PB	=	Phosphate buffer
PBT	=	Phosphate buffer with 0.05% Tween-20
PBS	=	Phosphate buffer saline
PBST	=	Phosphate buffer saline with 0.05% Tween-20
PC	=	Phosphatidylcholine
PE	=	Phosphatidyl ethanolamine
PEG	=	Polyethylene glycol
PNPP	=	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
RAM	=	Rabbit anti-mouse IgG
SAS	=	saturated ammonium sulfate
SC	=	Subcutaneous injection
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SK	=	Skim milk
SMCC	=	4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester sodium salt
SMCC-PE	=	Phosphatidyl ethanolamine conjugated with SMCC
Sulfo-SMCC	=	4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt
TAS-ELISA	=	Triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
TBS	=	Tris buffer saline
TBST	=	Tris buffer saline with 0.05% Tween-20

การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแตงโดยใช้ เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี

Development of Rapid Test Kit for Detection of *Cucumber Mosaic Virus* by Immunochromatographic Technique

คำนำ

เชื้อไวรัสใบด่างแตงหรือ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สามารถก่อโรคให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชล้มลุก ไม้พุ่มและไม้ยืนต้น ได้ถึง 1,200 ชนิด เนื่องจากสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ที่พบในปัจจุบันมีจำนวนมากและแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคไปยังพืชอาศัยได้หลายวิธี จึงทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายโดยตรงคือพืชตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเนื่องจากความผิดปกติของระบบภายในต้นพืช และโดยอ้อมคือส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตได้มากถึง 15-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างแตงเพื่อลดการแพร่ระบาดจึงมีความจำเป็นอย่างมากในการรักษาปริมาณและคุณภาพผลผลิตของพืช ทั้งนี้หนทางการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้มีได้หลายวิธีเช่น การใช้สารเคมีฉีดพ่นกำจัดเพลี้ยอ่อนแมลงพาหะ หรือการใช้พืชต้านทานโรค อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้นมีข้อเสียคือการใช้สารเคมีนอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้ใช้โดยตรงแล้วยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย ในขณะที่การสร้างพืชต้านทานต้องใช้ระยะเวลานานในการศึกษา ทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่มีความแม่นยำ รวดเร็วและไม่ยุ่งยากมาใช้ โดยเฉพาะเทคนิคทางด้านชีววิทยา เช่น Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) , Immunochromatographic strip (อิมมูโนสตริป) เพื่อการตรวจสอบส่วนของพืชก่อนการปลูกหรือขยายพันธุ์ เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งสามารถใช้ในการเฝ้าระวังเพื่อตรวจสอบและวางแผนการควบคุมโรคไม่ให้เกิดการระบาดเมื่อมีการปลูกพืชไปแล้ว ทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดโรค นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ปฏิบัติได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้าน ทำให้การตรวจสอบโรคเป็นไปได้กว้างขวางมากยิ่งขึ้น ส่งผลดีต่อการผลิตโดยภาพรวม

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแดงโดยใช้เทคนิค immunochromatography และการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้ไลโปโซมแทนอนุภาคทองในการติดฉลากแอนติบอดี

วัตถุประสงค์

1. การพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแดงโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี
2. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้ไลโปโซมแทนอนุภาคทองในการติดฉลากแอนติบอดี
เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ในชุดตรวจสอบ

การตรวจเอกสาร

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อไวรัสใบด่างแตง

เชื้อไวรัสใบด่างแตงหรือ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในสกุล *Cucumovirus* วงศ์ *Bromoviridae* (Roossinck, 2002) มีรายงานพบครั้งแรกในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค. ศ. 1900 (Brunt *et al.*, 1996) อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างทรงกลม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 29 นาโนเมตร จีโนมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) แบบ positive sense ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคไวรัสที่ $O.D._{260}/O.D._{280}$ เท่ากับ 1.7 (Brunt *et al.*, 1996) เชื้อไวรัส CMV สามารถทนต่อความร้อน (Thermal inactivation point, TIP) ได้ 55-70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ความสามารถในการก่อโรคมียาค่าความเจือจางสูงสุด (Dilution end point, DEP) ที่ 1:10,000–1:100,000 และความคงทนของอนุภาคไวรัสในสภาพห้องปฏิบัติการ (Longevity *in vitro*, LIV) นาน 12-15 ชั่วโมง (ธีระ, 2532; Brunt *et al.*, 1996) ไวรัสชนิดนี้พบได้ในทุกส่วนของพืชที่ติดเชื้อ พบ inclusion bodies ของเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นแบบผลึก (crystals) (Brunt *et al.*, 1996; Gallitelli, 2000)

ปัจจุบันพบเชื้อไวรัส CMV หลายสายพันธุ์ (strains) และแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านชนิดของพืชอาศัย อาการโรค ความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ จากความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อไวรัส CMV ในลักษณะดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีการจำแนกเชื้อไวรัส CMV ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ subgroup I และ subgroup II ตามชนิดและอาการที่พบในพืชอาศัยและความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (Singh *et al.*, 1995) แต่ผลการศึกษา peptide mapping ในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค nucleic acid hybridization และการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ที่ไม่แปลรหัส (5' NTR) บน RNA-3 ของเชื้อ CMV สามารถแบ่ง subgroup I ได้อีก 2 กลุ่มย่อย คือ subgroup IA และ subgroup IB ที่เรียกโดยทั่วไปว่ากลุ่ม Asian strains เนื่องจากสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม IB มักพบทำความเสียหายให้กับพืชอาศัยโดยทั่วไปในแถบเอเชีย (Gallitelli, 2000)

พืชอาศัยของเชื้อไวรัส CMV ในปัจจุบันมีรายงานว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถก่อโรคให้กับพืชได้ถึง 1,200 ชนิด ใน 100 วงศ์ (Roossinck *et al.*, 2001) ประกอบด้วยพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ พืชล้มลุก ไม้พุ่มและไม้ยืนต้น (Stephen and Rebecca, 2004) ความเสียหายของพืชที่ได้รับเชื้อไวรัส CMV นอกจากเป็นเพราะชนิดของพืชอาศัย สายพันธุ์เชื้อไวรัสแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับ satellite (sat-

RNA) ของไวรัสที่มีผลต่อการพัฒนาอาการของโรคโดยการลดความรุนแรงของโรคหรือชักนำให้เกิดอาการของโรคแบบใหม่ๆ ที่รุนแรงกว่าเดิมดังเช่นการรายงานของ Kearney *et al.* (1990) พบว่ามะเขือเทศในประเทศฝรั่งเศสที่แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาล (necrosis) และต้นมะเขือเทศตายอย่างรวดเร็วเป็นผลมาจากติดเชื้อไวรัส CMV ที่มี sat-RNA ร่วมอยู่ด้วย

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส CMV สามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยวิธีกล การถ่ายทอดโดยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อนกว่า 60 ชนิด ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสกับแมลงพาหะเป็นแบบ non-persistent ที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae* Sulz.) (Brunt *et al.*, 1996; Montasser *et al.*, 1991) ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัส CMV ไปยังพืชในวงศ์ Solanaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Compositae และอีกชนิดหนึ่งคือเพลี้ยอ่อนฝ้ายหรือเพลี้ยอ่อนแดง (*Aphis gossypii*) (Brunt *et al.*, 1996; Montasser *et al.*, 1991) นอกจากความสามารถในการถ่ายทอดเชื่อดังกล่าวข้างต้นแล้วนั้น เชื้อไวรัส CMV ยังสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด (seed-transmission) ในวงศ์ Leguminosae เช่น *Phaseolus vulgaris* ถั่ว lentil (*Lens culinaris* L.) และ ถั่ว lupin และ วงศ์ Cruciferae ซึ่งปัจจุบันเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการกำหนดคุณภาพของธุรกิจการส่งออกเมล็ดพันธุ์

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแดง

การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคที่ถูกต้องถือเป็นกระบวนการที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการป้องกันกำจัดและควบคุมโรค วิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและแม่นยำจะส่งผลให้การป้องกันโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน ปัจจุบันเทคโนโลยีที่เรียกว่า diagnostic technology ได้เข้ามามีบทบาทต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแดงอย่างมาก เช่น เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก และเทคนิคอีไลซ่า (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) โดยการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody, PAb) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody, MAb) ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวมีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อไวรัสได้ถึงระดับนาโนกรัม อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีมีข้อจำกัดคือต้องใช้เวลาในการตรวจสอบอย่างน้อย 2-3 ชั่วโมงและกระบวนการตรวจสอบต้องอาศัยผู้ชำนาญการเฉพาะทางมาทำการวิเคราะห์ แม้ว่าปัจจุบันชุดตรวจสอบ (detection kits) ที่ได้นำวิธีการทางด้านอิมมูโนวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (immunochematography) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพืชจะให้ผลการอ่านค่าเร็ว มี

ประสิทธิภาพ และสะดวกแล้วก็ตาม แต่ชุดตรวจสอบดังกล่าวยังจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง ทำให้ชุดตรวจสอบดังกล่าวยังไม่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย

การตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี (Immunochromatographic Assay)

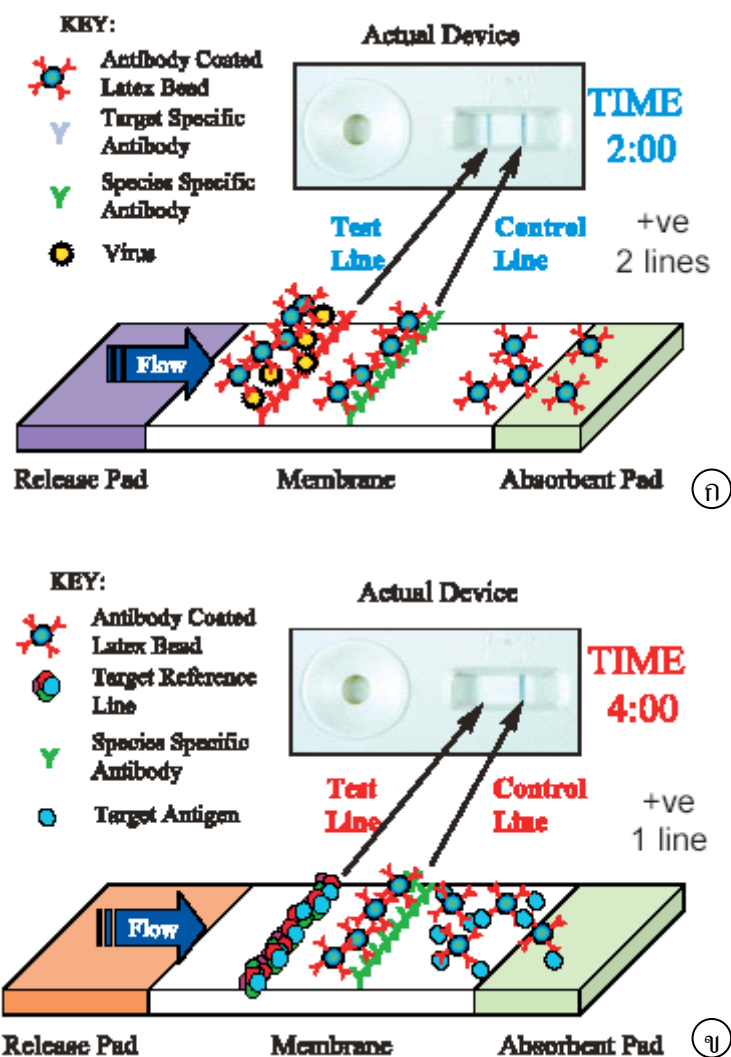
เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีหรือ lateral flow test ได้ถูกพัฒนาขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิคคือ latex agglutination tests, sandwich assay และโครมาโทกราฟี โดย Yallow and Berson (1959) เพื่อใช้ตรวจหา anti-insulin antibodies ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือด จากแนวคิดที่ว่าแอนติบอดี 2 ชนิดมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันบนแอนติเจน ดังนั้นหากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งมาติดกับ solid support แล้ว เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่ติดกับ solid support แอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีนี้ จะถูกตรวจโดยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดบนอนุภาค bead ที่มีขนาดต่างกันเช่น latex bead, erythrocytes, colloidal dyes หรือ metal solution ทำให้สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาได้ง่ายจากสี bead ที่เกิดขึ้น (Garland *et al*, 1986; Borque *et al*, 1995) ทั้งนี้วัตถุประสงค์ของการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวก็เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ง่ายต่อการนำไปใช้ ให้ผลการตรวจสอบในระยะเวลาที่รวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ด้วยตนเองและไม่จำกัดอยู่ในกลุ่มผู้ใช้กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง (Ronald and Stimson, 1998; [http://www. bangslabs.com](http://www.bangslabs.com))

หลักการของเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีคือการนำแอนติบอดีมาติดบนอนุภาค bead ที่มีสี เมื่อให้แอนติบอดีที่ติดบนอนุภาคทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะแล้วจะเกิดเป็น antigen-antibody complex โดย complex ดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปบน solid support ด้วยแรง capillary flow จนมาถึงตำแหน่งบน solid support ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีอีกชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจน บริเวณนี้เรียกว่า test line ซึ่ง complex ข้างต้นจะถูกจับอยู่ที่ test line เกิดให้เห็นเป็นแถบสี การเกิดแถบสีจะแปรผันตามปริมาณแอนติเจนที่พบในตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก complex หรือแอนติบอดีที่เหลือจากการจับกันตรงตำแหน่ง test line ที่จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนไปถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (secondary antibody, 2^o Ab) เรียกบริเวณนี้ว่า control line ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีตัวแรกและแอนติบอดีที่ control line นี้จะทำให้เกิดแถบสีอีกแถบหนึ่ง (Garland *et al*, 1986; Borque *et al*, 1995; [http://www. bangslabs.com](http://www.bangslabs.com))

หลักการของปฏิกิริยาในเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ (1) แบบ Double antibody sandwich assay (DAS) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้กับการตรวจแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่ และมี antigenic sites หลายชนิด สำหรับหลักการของวิธีการนี้เหมือนกับหลักการดังกล่าวข้างต้น (ภาพที่ 1ก) และ (2) แบบ competitive inhibition วิธีนี้นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและมี antigenic sites เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้น หลักการของวิธีนี้คล้ายกับแบบ DAS แต่ที่แตกต่างคือ ตำแหน่งของ test line จะถูกเคลือบด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่มากพอ แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนจนหมด และไม่เหลือพอที่จะจับกับแอนติเจนที่ test line เพราะฉะนั้นตำแหน่ง test line จะไม่เกิดแถบสีให้เห็น (ภาพที่ 1ข) ทั้งนี้ผลที่อ่านได้จะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่าง (http://www.csl.gov.uk/prodserv/rds/lateral_flow_devices.htm.)

จากผลการตรวจสอบที่นอกจากสามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่า (yes/no) ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว สะดวกต่อการพกพาและการใช้ นอกจากจะสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตนเองแล้ว ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีให้สามารถตรวจสอบเชื้อได้มากกว่าหนึ่งเชื้อโดยใช้แอนติบอดีติดฉลากกับเม็ดสีที่แตกต่างกันได้สำเร็จ ทำให้วิธีการตรวจสอบโดยใช้หลักการโครมาโทกราฟีได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบในงานทางด้านการแพทย์ สัตว์ การเกษตร อุตสาหกรรมอาหารและสภาพแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น (Van Weeman and Schuurs, 1971; Stimson and Sinclair, 1974)

แม้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น immunocapture-polymerase chain reaction (IC-PCR) (Varveri and Boutsika, 1999) และเทคนิคอื่นๆ ได้แก่ immunosensor เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบให้สูงมากก็ตาม (Ronald and Stimson, 1998) แต่จากข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและการอ่านผลที่มีราคาแพง ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจและอ่านผลจึงทำให้ค่าบริการสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างสูงตามไปด้วย ดังนั้นในปัจจุบันเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีจึงได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยอย่างแพร่หลายแม้ความไวในการตรวจสอบบางอย่างจะน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ที่นิยมใช้กันในปัจจุบันแต่ก็สามารถนำวิธีการนี้มาใช้คัดกรองตัวอย่างจำนวนมากในเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ Smits *et al.* (2001) ใช้เทคนิค lateral flow assay ตรวจสอบ immunoglobulin M (IgM) จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Leptospira* sp. เปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA แล้วพบว่าเทคนิค lateral flow assay สามารถตรวจสอบตัวอย่าง IgM จากผู้ป่วยได้ใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แม้จะมีความไวและความจำเพาะ (specificity) เพียง 85.8 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีชนิด Double Antibody Sandwich Assay (ก) และ Competitive Assay (ข)

ที่มา: http://www.csl.gov.uk/prodserv/rds/lateral_flow_devices.htm. June 15th, 2005

และ 93.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเทียบกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA ที่มีความไว 89.3 เปอร์เซ็นต์ และมีความจำเพาะ 94.2 เปอร์เซ็นต์

ต่อมา Salomone and Roggero (2002) ได้นำเทคนิค lateral flow assay มาใช้ร่วมกับเทคนิค ELISA ในงานการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Pepino Mosaic Virus* สาเหตุโรคพืชโอโซเลทที่พบในประเทศอิตาลี แล้วพบว่าเทคนิค lateral flow assay มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อไวรัสได้เทียบเท่ากับเทคนิค ELISA ในทุกตัวอย่าง

จากนั้นในปี ค.ศ. 2003 เทคนิค lateral flow assay ได้ถูกนำมาใช้ในงานตรวจสอบเกี่ยวกับเชื้ออหิวาต์ได้สำเร็จ (Anne and Leonard, 2003) นอกจากนี้ Buhner-Sekula *et al.* (2003) ยังได้ประยุกต์ใช้เทคนิค lateral flow assay เพื่อตรวจสอบและจำแนกเชื้อ Leprosy เช่นเดียวกับ Greenwald *et al.* (2003) และ Cazacu *et al.* (2003) ที่ใช้เทคนิค lateral flow assay ตรวจสอบเชื้อ *Mycobacterium bovis* ที่ก่อโรครักกับ Badger และเชื้อ *Influenza virus* ได้ด้วยเช่นกัน

สำหรับประเทศไทยเทคนิค lateral flow assay ได้ถูกนำมาใช้ในงานตรวจสอบทางด้านการแพทย์อย่างกว้างขวางแล้วเช่นกัน ดังการรายงานของ Buddhirakkul *et al.* (2004) ที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสอบ lateral flow assay เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (*Hepatitis B Virus*) จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อว่าใกล้เคียงกับผลการตรวจด้วยวิธี ELISA และการรายงานของประสิทธิ์ (2547) ที่สามารถผลิตชุดตรวจสอบอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้สำเร็จเป็นรายแรกของเอเชีย ทั้งนี้ชุดตรวจสอบดังกล่าวมีความไวสามารถตรวจพบสารพิษได้แม้มีสารพิษในตัวอย่างเพียง 20 พีพีบี ซึ่งนอกจากชุดตรวจสอบที่ผลิตนี้จะมีราคาถูกกว่าชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่ายถึง 70 บาทต่อการตรวจสอบหนึ่งตัวอย่างแล้ว ผู้ใช้ได้แก่ โรงงานอาหารสัตว์ กลุ่มค้าวัตถุดิบอาหารสัตว์ เกษตรกร ผู้ผลิตธัญพืชต่างๆ และหน่วยบริการควบคุมคุณภาพ สามารถใช้งานได้ง่ายเพียงแค่นำตัวอย่างในแอลกอฮอล์แล้วเจือจางด้วยน้ำ นำไปหยดลงไปในแถบทดสอบ ในระยะเวลาเพียง 20 นาที ถ้ามีสารอะฟลาทอกซินจะปรากฏแถบสีม่วงเพียง 1 แถบ ในขณะที่ถ้าไม่มีสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างก็จะปรากฏแถบสีม่วงให้เห็น 2 แถบ

แม้ผลความไวและความจำเพาะของการตรวจสอบด้วยเทคนิค lateral flow assay ที่ได้ในบางครั้งยังไม่สามารถเทียบเคียงกับผลจากวิธี ELISA ก็ตาม แต่จากข้อดีของเทคนิคดังกล่าวข้างต้นทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายพยายามที่จะศึกษาและปรับปรุงองค์ประกอบซึ่งเป็นระบบของ lateral flow เทคนิคอยู่เสมอ

องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีคสตริป

โครงสร้างของชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า อิมมูโนโครมาโทกราฟีคสตริป หรืออิมมูโนสตริป มีส่วนประกอบสำคัญได้แก่ backing pad, sample pad, releasing pad (CRP), detector, nitrocellulose และ absorption pad (AP) (<http://www.millipore.com>. 2005)

ส่วนของ backing pad ทำหน้าที่ค้ำจุน (support) องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ sample pad, releasing pad, nitrocellulose และ absorption pad ให้เป็นโครงสร้างของชุดตรวจสอบที่สมบูรณ์ backing pad ที่ใช้ส่วนใหญ่ทำมาจากโพลีเอสเตอร์ (polyester) หนาประมาณ 0.25-1 มิลลิเมตร (<http://www.millipore.com>. 2005)

sample pad มีหน้าที่รับตัวอย่างโดยตรง และเกี่ยวข้องกับการควบคุมอัตราการไหลของตัวอย่างไปยังส่วนของ releasing pad โดยทั่วไป sample pad ที่ใช้จะมีอยู่ 2 แบบ คือ woven meshes และ cellulose filters (Buddhirakkul *et al.*, 2004; <http://www.bangslab.com>. 2005) ซึ่ง woven meshes หรือบางครั้งเรียกว่า screens มีคุณสมบัติที่ดีซึ่งทำให้ตัวอย่างมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บน SAP มีความแข็งแรงเมื่อเปียกน้ำ ไม่ฉีกขาด แต่มี sample volume หรือความสามารถในการรับตัวอย่างได้ต่ำ คือ ประมาณ 1-2 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร และราคาแพงเมื่อเทียบกับวัสดุชนิดอื่น ส่วน cellulose filter มีคุณสมบัติตรงข้ามคือ มีความหนา (> 250 ไมครอน) ไม่แข็งแรง แต่ราคาไม่แพง สามารถรองรับตัวอย่างได้มาก คือ มากกว่า 25 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งคุณสมบัตินี้เหมาะกับตัวอย่างบางชนิดที่ต้องการให้สามารถรองรับตัวอย่างปริมาณสูงได้ เช่น การตรวจตัวอย่างในปัสสาวะผู้ป่วย เป็นต้น (<http://www.millipore.com>. 2005)

releasing pad มีหน้าที่สำคัญนอกจากจะเป็นส่วนที่เก็บรักษา detector (antibody conjugate) แล้วยังทำหน้าที่เสมือนตัวส่ง detector ไปยัง test line และ control line เพราะฉะนั้นการเลือก releasing pad ชนิดใดมาใช้ในงานทดลองจึงถือเป็นส่วนสำคัญ ทั้งนี้ในปัจจุบันชนิดของ releasing pad ที่นำมาใช้ได้แก่ชนิดที่เป็น cellulose glass และ plastic (เช่น polyester และ polypropylene เป็นต้น) (<http://www.millipore.com>. 2005)

nitrocellulose ที่ใช้ในเทคนิคด้าน lateral flow assay นอกจากจะถูกลอกแบบมาให้ยึดเกาะกับโปรตีน (แอนติบอดีและแอนติเจน) ได้ดีแล้ว ขนาดรูพรุนของแผ่น nitrocellulose แต่ละชนิดก็

แตกต่างกันตามไปด้วย ทั้งนี้ขนาดรูพรุนของแผ่น nitrocellulose จะแปรผันตามอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารละลายกล่าวคือแผ่น nitrocellulose ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่การเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่างจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งในบางครั้งอาจเร็วมากจนทำให้แอนติบอดีและแอนติเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยากันได้ อาจมีผลต่อความไวของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ปัจจัยทางโครงสร้างดังกล่าวแล้ว ความหนาของแผ่น nitrocellulose ก็ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับอัตราเร็วในการไหลของสารละลายที่ต้องคำนึงถึงด้วยเช่นกัน

(<http://www.millipore.com>. 2005)

absorption pad มีหน้าที่ช่วยเพิ่มแรงดึงของแรง capillary เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ ดังนั้นข้อดีของการใช้ absorption pad คือช่วยเพิ่มปริมาตรและระยะเวลาของสารละลายที่เคลื่อนที่ผ่าน test line และ control line มากขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีมากยิ่งขึ้น (<http://www.millipore.com>. 2005)

อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาของอิมมูโนโครมาโทกราฟีจะเกิดไม่ได้ถ้าขาดส่วนของ detector ที่ประกอบด้วย 2 องค์ประกอบที่สำคัญคือ แอนติบอดีและ bead สีต่างๆ

แอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกิริยาสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ 1) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจน และใช้เคลือบส่วนของ test line 2) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนและใช้ติดฉลากกับ bead โดยจะเคลือบอยู่ในส่วนของ releasing pad และ 3) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่ถูกติดฉลาก ซึ่งเคลือบอยู่ที่ส่วนของ control line ทั้งนี้การเลือกใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน 2 ชนิด มีข้อจำกัดอยู่ที่การมีตำแหน่งจับกับ antigenic site บนผิวของแอนติเจนที่ต่างกันด้วย ซึ่งอาจใช้แอนติบอดีชนิดที่เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีหรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิด ร่วมกันก็ได้ (<http://www.millipore.com>. 2005) ดังเช่นการพัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโทกราฟีเพื่อตรวจสอบโรคไวรัสตับอักเสบบีของ Buddhirakkul *et al.* (2004) ได้มีรายงานการใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบีคือ HB3 มาใช้ติดฉลากกับ beads และ HB4 ซึ่งถูกนำมาเคลือบ test line แล้วประสบความสำเร็จสามารถนำมาใช้ตรวจแอนติซีรัมจากผู้ป่วยได้

นอกจากปัจจัยสำคัญข้างต้นที่กล่าวแล้ว ปัจจัยสุดท้ายที่เป็นตัวบ่งชี้ (marker) การทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีคือ เม็ดสีชนิดต่างๆ ได้แก่ latex bead, erythrocytes, colloidal dyes หรือ metal solution (Garland *et al*, 1986; Borque *et al*, 1995) และเมื่อไม่นานมานี้

ได้มีการประยุกต์ใช้ไลโปโซมมากักเก็บสี (dye) เพื่อใช้เป็น marker แทนเม็ดสีที่มีจำหน่ายในรูปทางการค้า เนื่องจากเม็ดสีดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งจะส่งผลให้ราคาค้นทุนในการผลิตชุดตรวจสอบสูงตามไปด้วย

ไลโปโซม

ไลโปโซม (liposome) มีลักษณะเป็นถุงเล็ก (vesicle) ของสารไขมันที่กระจายในน้ำภายในบรรจุสารละลาย ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Bangham *et al* ในปี ค.ศ. 1965 โครงสร้างของไลโปโซมเกิดจากโมเลกุลของสารไขมันประเภทฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ตัวอย่างได้แก่ ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine, PC) และเลซิธิน (lecithin) ที่สามารถจัดเรียงตัวเป็นผนังลิปิด 2 ชั้น สลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำ ซึ่งในขณะที่เกิดไลโปโซมจะมีการกักเก็บสารไว้ภายในอนุภาคเกิดขึ้นพร้อมกัน หากพิจารณาจากการจัดเรียงตัวของผนังลิปิดดังกล่าวสามารถกำหนดประเภทของไลโปโซมตามขนาดและจำนวนผนังลิปิด 2 ชั้นของไลโปโซมได้ 3 ประเภท คือ ไลโปโซมขนาดเล็กที่มีลิปิดสองชั้นเพียงแถวเดียว (small unilamella vesicle, SUVs) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีลิปิดสองชั้นเพียงแถวเดียว (Large unilamella vesicle, LUVs) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100-1,000 นาโนเมตร และไลโปโซมประเภทที่มีลิปิดสองชั้นหลายแถว (multilamellar vesicle, MLVs) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร จนถึงหลายไมโครเมตร (New, 1990; Jean and Pierre, 1995) ซึ่งการเกิดไลโปโซมจะเป็นประเภทใดนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม

การเตรียมไลโปโซมสามารถทำได้ง่ายและหลายวิธี อาจเริ่มตั้งแต่การเตรียมโดยการละลายส่วนผสมของสารไขมันในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำมาระเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ออกภายใต้ระบบสุญญากาศ จนเหลือไขมันเคลือบเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ที่ผิวของภาชนะ เติมสารที่ต้องการกักเก็บลงไปแล้วเขย่าด้วยมือ แผ่นฟิล์มจะค่อยๆ หลุดออกจากผิวภาชนะจะได้สารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด MLVs (Bangham *et al.*, 1965) นอกจากนี้สามารถทำได้ด้วยการนำส่วนผสมของไขมันผสมกับสารละลายที่ต้องการกักเก็บมาผ่านเข้าเครื่องโฮโมจิไนซ์ความดันสูง 2,000-20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (high pressure homogenization) ในระหว่างที่ส่วนผสมผ่านเข้าเครื่องโฮโมจิไนซ์จะเกิดแรงเฉือนทำให้โมเลกุลไขมันในสารละลายเกิดเป็นไลโปโซมประเภท SUVs ที่กักเก็บสารไว้ภายในได้ (Brandl *et al.*, 1993) หรือการใช้เครื่องคลื่นความถี่สูง (sonicator) ซึ่งเป็นวิธีเตรียมไลโปโซมชนิด SUVs จาก MLVs โดยการนำไลโปโซมชนิด MLVs มาใส่ในเครื่องคลื่นความถี่สูง คลื่นเสียงจะทำให้ไลโปโซมแตกออกแล้วกลับมาเรียง

กันใหม่ทำให้ได้ไลโปโซมชนิด SUVs (Singh *et al.*, 2000) ทั้งนี้การจะเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีใดก็ขึ้นอยู่กับชนิดของไลโปโซมที่ต้องการจะได้และวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้

นอกจากคุณสมบัติที่สามารถกักเก็บโมเลกุลของสารได้จำนวนมากไว้ภายในอนุภาคได้แล้ว บนผิวของไลโปโซมยังมียุทธศาสตร์ที่สามารถยึดติดกับโมเลกุลชนิดใดก็ได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวได้มีการนำไลโปโซมมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ ดังเช่น Park and Durst (2000) ได้ประยุกต์ใช้ไลโปโซมในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเต้านมการใช้รังสี โดยติดฉลากไลโปโซมที่กักเก็บยารักษาโรคมะเร็งเข้ากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งคือ anti-HER2 monoclonal antibody เมื่อไลโปโซมถูกนำส่งเข้าสู่ร่างกายจะไปจับกับเซลล์มะเร็งได้โดยตรงจากความจำเพาะของ anti-HER2 MAb ที่เกาะอยู่บนผิวของไลโปโซม ด้วยที่อยู่ในไลโปโซมจะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งวิธีดังกล่าวจะช่วยเพิ่มความจำเพาะในการรักษามากยิ่งขึ้น ต่อมา Liang *et al.* (2003) ได้ใช้ไลโปโซมแทนการใช้ adjuvant โดยให้ไลโปโซมกักเก็บ recombinant protein hepatitis B surface antigen (HBsAg) ซึ่งใช้เป็นวัคซีนและนำส่งเข้าสู่ร่างกายคนแทนการฉีดวัคซีนเข้าไปในร่างกายโดยตรง เป็นต้น นอกจากนี้ไลโปโซมได้ถูกนำมาใช้ทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารโดยกักเก็บสารที่ให้รสและสีหรือแม้กระทั่งสารกันเสียเพื่อรักษาคุณภาพของอาหารให้ดียิ่งขึ้น Picon *et al.* (1994) รายงานว่าใช้ไลโปโซมที่เตรียมได้จากเลซิตินของถั่วเหลืองมากักเก็บเอนไซม์ chymosin, neutral proteinase และ cryopsin เพื่อช่วยเร่งการบ่มเนยแข็งได้เร็วกว่าการเติมเอนไซม์ปกติ สำหรับในด้านผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอาง ได้มีรายงานการใช้ไลโปโซมในการกักเก็บยาปฏิชีวนะ amphoteric B และ ยา tetracaine (Tungjaiyukkandee, 1993; Chantasart, 1996) และสารที่ให้ความชุ่มชื้น ชะลอการเกิดริ้วรอยก่อนวัย เช่น วิตามินอีและซี เป็นต้น (Bernhard *et al.*, 1991; Kirby and Gregoriadis, 1984; Philippot and Schuber, 1995; Ruyschaert *et al.*, 2004; Gomez-Hens and Fernandez-Romero, 2005) นอกจากบทบาทของไลโปโซมดังกล่าวข้างต้นแล้ว ปัจจุบันได้มีการนำไลโปโซมมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการตรวจสอบ (detection) ทางอิมมูโนวิทยาที่เรียกว่าเทคนิคอิมมูโนไลโปโซมเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

การประยุกต์ใช้ไลโปโซมในการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนวิทยา

คุณสมบัติของไลโปโซมที่สามารถกักเก็บโมเลกุลของสารได้จำนวนมาก (large number) ประกอบกับบริเวณผิวของไลโปโซมที่สามารถยึดติด (conjugate) กับโมเลกุลขนาดเล็กได้หลายชนิด ใช้ระยะเวลาในการเตรียมไม่นานและสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาที่ยาวนาน (Roberts and Durst, 1995; Park and Durst, 2000; Gomez-Hens and Fernandez-Romero, 2005) จึงได้มี

ผู้นำไลโปโซมมาใช้ในงานด้านการตรวจวินิจฉัยทางด้านอิมมูโนวิทยา เพื่อเพิ่มความจำเพาะและความไวของปฏิกิริยาในการตรวจสอบให้เพิ่มมากขึ้น ดังรายงานของ Kubotsu *et al.* (1992) ที่ใช้เทคนิค liposome immunoassay เพื่อตรวจหา phenytoin (PHT) , phenobarbital (PB) และ ยา carbamazepine (CBZ) ซึ่งใช้รักษาโรคมะเร็ง จากซีรัมของผู้ป่วย โดยดูจากปฏิกิริยาการรั่วซึม (immunolysis) ของสาร glucose-6-phosphate dehydrogenase ที่กักเก็บในไลโปโซม

ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Tsukagoshi *et al.* ได้ใช้วิธี immunoliposome assay ร่วมกับวิธี chemiluminescence system ตรวจหา albumin protein จากคน โดยการติดฉลาก human serum albumin (HSA) กับไลโปโซมที่ให้กักเก็บสารเรืองแสง fluorescamine (FR) ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาระหว่าง albumin protein กับ HSA (bound/free) จากการเรืองแสงของ FR ผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจ albumin protein ได้ถึง 1×10^{-6} - 5×10^{-4} โมลาร์ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวสามารถขจัดปัญหาของผลที่เป็น false positive ได้อีกด้วย หลังจากนั้น Singh *et al.* (2000) ได้นำวิธีการดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบ gangliosides ซึ่งเป็น receptor ของสารพิษ cholera toxin ที่มีความเป็นพิษต่อระบบหายใจ ซึ่งผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* พบว่าการใช้วิธีการ immunoliposome assay ร่วมกับวิธี chemiluminescence system ช่วยเพิ่มความไวของการตรวจมากขึ้นถึง 10^{-8} โมลาร์

Alfonta *et al.* (2001) ประยุกต์ใช้ไลโปโซมโดยการติดฉลากกับ biotin และ horseradish peroxidase เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบแอนติเจน dinitrophenyl-L-cysteine ของ anti-dinitrophenyl antibody ซึ่งสามารถตรวจ dinitrophenyl -L-cysteine ได้ต่ำกว่า 6.5×10^{-13} M ในขณะที่ใช้ anti-dinitrophenyl antibody ความเข้มข้นเพียง 1×10^{-11} มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2004 Ho *et al.* รายงานว่าได้ใช้วิธี immunoliposome assay ร่วมกับวิธี immunosensor ตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* O157: H7 ซึ่งผลที่ได้พบว่าวิธีการดังกล่าวมีความไวสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแม้มีเพียง 360 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เทคนิคอิมมูโนไลโปโซมกับการประยุกต์ตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

มีรายงานการนำเทคนิค immunoliposome มาใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจสอบแบบ immunochromatography เริ่มตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1995 โดย Roberts and Durst ที่ประสบความสำเร็จในการตรวจสาร polychlorinated biphenyl (PCBs) ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการกลั่นน้ำมัน และพบปนเปื้อนในสภาพแวดล้อม โดยใช้ไลโปโซมกักเก็บสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence)

แล้วอ่านผลการตรวจสอบจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง PCBs ซึ่งติดฉลากอยู่กับไลโปโซมกับ anti-PCBs antibody จากปฏิกิริยาการเกิด lysis (competitive) ของสารเรืองแสงเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบแบบ non-competitive พบว่าวิธีการ competitive มีความไวในการตรวจสอบสาร PCBs ได้ถึง 0.4 นาโนโมลล์ ในเวลา 8 นาที ในขณะที่วิธีการตรวจสอบแบบ non-competitive มีความไวสามารถตรวจสอบสาร PCBs ได้ถึง 2.6 พิโคโมลล์ ในเวลา 23 นาที

จากนั้นในปีค.ศ. 2000 Park and Durst ได้รายงานความสำเร็จในการใช้เทคนิค immunoliposome assay ร่วมกับเทคนิค immunochromatography ในรูปแบบปฏิกิริยา non-competitive ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* O157: H7 พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดถึง 10^4 CFU/ml โดยใช้เวลาเพียง 8 นาที

ต่อมาในปีค.ศ. 2002 Ho and Roberts ได้ใช้ปฏิกิริยาแบบ competitive ตรวจสอบสารพิษ aflatoxin B1 (AFB1) โดยใช้เทคนิค immunoliposome-immunochromatography พบว่าสามารถตรวจสอบสารพิษ AFB1 ได้ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 18 นาโนกรัม

ในปีค.ศ. 2005 Chen *et al.* ได้ทดลองใช้ protein G ติดฉลากกับแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157: H7 เพื่อเพิ่มความแข็งแรง (stable) ของปฏิกิริยา ก่อนที่จะนำแอนติบอดีมาติดฉลากกับไลโปโซมที่ให้กักเก็บสารเรืองแสง sulforhodamine G และตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค immunochromatography ในรูปแบบปฏิกิริยา non-competitive พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *E. coli* O157: H7 ได้ที่ระดับความเข้มข้น 100 CFU/ml ในเวลาเพียง 30 นาที จากงานทดลองดังกล่าว Chen *et al.* สามารถสรุปได้ว่า protein G ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของปฏิกิริยาระหว่างไลโปโซมกับแอนติบอดีเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การตรวจสอบมีความไวมากขึ้นกว่าเดิมดังการรายงานของ Park and Durst (2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การแยกเชื้อไวรัสใบด่างแดงให้บริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณเชื้อ ไอโซเลท KPS10 (CMV-KPS) (ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.สุจินต์ ภัทรภูวดล) เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยปลูกเชื้อลงบนยาสูบ *Nicotiana tabacum* อายุ 30 วัน หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14-21 วัน เก็บใบยาสูบมาล้างและผึ่งให้หมาด แยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mossop *et al.* (1976) โดยบดใบยาสูบใน extraction buffer pH 8.0 [0.1 M Na_2HPO_4 buffer, 0.1% Na-diethyldithiocarbamic acid sodium salt (Na-DIECA) (w/v), 0.1% Thioglycolic acid (v/v)] อัตราส่วนใบยาสูบ 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร กรองน้ำคั้นด้วยผ้าขาวบาง ปั่นตกตะกอนเศษซากพืชที่ 8,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส เติม Triton-X-100 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% กวนต่อเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสที่ 78,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย extraction buffer ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสเติมลงบนสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10% ใน resuspension buffer (0.1 M Na_2HPO_4 , pH 8.0) โดยเติมเบาๆ ให้แยกชั้นกับสารละลายซูโครส ปั่นตกตะกอนไวรัสที่ความเร็ว 144,000 xg ละลายตะกอนที่ได้ใน resuspension buffer (1 มิลลิลิตร/ 15 กรัมของน้ำหนักพืชเริ่มต้น) จะได้ไวรัสใบด่างแดงค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified virus) เพื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยวิธี sucrose gradients centrifugation ต่อไป

เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 25, 15, 10 และ 5% ใน resuspension buffer คัดสารละลายซูโครสปริมาตร 3.63, 3, 3 และ 2.23 มิลลิลิตร ตามลำดับความเข้มข้น เติมลงในหลอดปั่นชนิดใส (ultraclear centrifuge tube) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเติมสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ที่ผิวหน้าของชั้นซูโครส ปั่นเหวี่ยงที่ 96,000 xg อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง ใน swinging bucket rotor (SW.41 Ti rotor) คัดแถบไวรัส นำมาเจือจางด้วย resuspension buffer ปริมาตรที่เหมาะสม ปั่นตกตะกอนไวรัสที่ 78,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง ละลายตะกอนใน storage buffer (10mM sodium borate buffer, pH 7.5) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของไวรัสด้วยเครื่องสเปก

โทรโฟโตมิเตอร์ที่ทำการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัสที่สกัดได้ตามสูตร $C = O.D._{260} / E_{260 \text{ nm}}^{0.1\%}$ โดยค่า $E_{260 \text{ nm}}^{0.1\%}$ ของเชื้อ CMV เท่ากับ 5.0 (Franki *et al.*, 2004) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และคำนวณหาความบริสุทธิ์ของไวรัสจากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ $O.D._{260} / O.D._{280}$ ซึ่งเท่ากับ 1.7 (Brunt *et al.*, 1996)

1.2 การสกัดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างแดงจาก *Escherichia coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายยีน

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค จาก recombinant expression vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน CMV-CP (pQE80L-CMV-CP) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณสรรัช จันทะจร) ไอโซเลท SG โดยเลี้ยงในอาหาร LB 50 มิลลิลิตร เติมนิโคตินิกแอซิด 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกานามัยซิน 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถ่ายเชื้อที่ได้ในอาหารชนิดเดียวกัน ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ในขวด 2 ลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมนิโคตินิกแอซิด Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM ลงใน bacterial culture และเลี้ยงต่อไปอีก 5 ชั่วโมง ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 4,000 xg นาน 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน lysis buffer (8 M urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl pH 8.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร freeze – thaw สารละลายเซลล์ 3 ครั้ง นำมา sonicate ครั้งละ 15 วินาที 6 ครั้ง โดยสลับด้วยการแช่บนน้ำแข็ง ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตกตะกอนส่วนน้ำใส ด้วยสารละลาย saturated ammonium sulfate (SAS) อัตราส่วน soluble protein : SAS = 3:2 (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40%) กวนเป็นเวลา 1 ชม. ที่ 4 องศาเซลเซียส ปั่นตกตะกอนโปรตีนในสารละลาย ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนใน 0.5x PBS (phosphate buffer saline, pH 7.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ Ni-NTA (Nickel-nitriloacetic acid) agarose (Qiagen, USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยล้างคอลัมน์ด้วย lysis buffer pH 8.0 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ก่อนการผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ หลังจากผ่านสารละลายโปรตีนในคอลัมน์แล้ว ล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย washing buffer (8 M Urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl, pH 6.3 + 10% Ethanol) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย elution buffer (8 M Urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl, pH 4.5) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เก็บ eluate fraction จำนวน 12 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (Sambrook and Russell,

2001) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE อัตราส่วน 6% stacking gel และ 12% separating gel และวัดความเข้มข้นของ recombinant protein CMV-CP ที่ได้ด้วยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (BSA ความเข้มข้น 0.04-2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2. แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง

แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody, PAb-CMV) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง (monoclonal antibody, MAb-CMV) และแอนติบอดีต่อหนูเม้าส์ (rabbit anti-mouse IgG antibody, RAM)

2.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง

MAb-CMV ที่ใช้ในการทดลองผลิตจากไฮบริโดมาโคลน CM2 ที่สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ได้ทั้ง subgroup I และ subgroup II (มณีรัตน์, 2547) โดยใช้ ascitic fluid ที่ผลิตขึ้น (Johann and Baugarten, 1992) มีค่าไตเตอร์จากการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA (Clark and Adam; 1976) เท่ากับ 80,000 เมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส CMV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG₁ ซึ่งประกอบด้วย light chain ชนิด kappa (K) นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน CM2 มาตกตะกอนแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย Saturated ammonium sulfate (SAS) จำนวน 2 รอบ โดยเติม SAS ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50% กวนเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.5x PBS ปริมาตรครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น ทำ dialysis ข้ามคืนใน 0.5x PBS คำนวณความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลินที่แยกได้จากสูตร $O.D._{280}/1.4 = X$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการของ Clark and Adams (1977)

เนื่องจากแอนติบอดีจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควรและมีสัดส่วนของ heavy (H) chain และ light (L) chain subunit ไม่สมดุลกัน จึงได้แยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี recProtein G affinity column chromatography (Zymed-Invitrogen, USA) โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากโคลน CM2 ที่ทำการปรับ pH โดย dialyse ใน 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 มาข้ามคืนผ่าน recProtein G affinity column chromatography จากนั้นล้างโปรตีนอื่นๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 10 เท่า

ของปริมาตรคอลัมน์ และชะ (elute) IgG ออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M Glycine-HCl pH 2.7 เก็บสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดทดลองที่มี 2 M Tris, pH 8.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ของแอนติบอดีให้เป็นกลาง กำหนดความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร $O.D_{280}/1.4 = X$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark and Adams, 1977)

2.1.1 การตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ที่แยกได้

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลินได้ใช้วิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) อัตราส่วน 6% stacking gel และ 12% running gel (Laemmli, 1970) นำตัวอย่างสารละลาย IgG ที่แยกได้จาก fraction ต่างๆ ในข้อ 2.1 ผสมกับ 2x loading buffer (50% Glycerol, 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05% Bromphenol blue และเติม 5% Mercaptoethanol ก่อนใช้) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาให้รับแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลาย IgG หลุมละ 15 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ 40 นาที สำหรับ stacking gel และ 100 โวลต์ 100 นาที สำหรับ running gel ย้อมสีเจลด้วย staining solution (0.25% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25% methanol + 7% acetic acid) จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีน IgG ที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (LabAid; protein molecular weight marker #SM0431)

2.1.2 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ที่แยกสกัดได้กับไวรัสใบด่างแดง

หาค่าไตเตอร์ของ IgG ที่แยกได้ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค indirect ELISA ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adams (1977) โดยเคลือบหลุม microtiter plate ด้วยเชื้อ CMV-KPS บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer (pH 9.0) ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST (Phosphate buffer saline + 0.5% Tween 20) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม blocking buffer (2% skimmed milk ใน PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่ม 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นเติม anti-CMV MAbs (IgG) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม goat anti-mouse IgG ที่เชื่อมกับ alkaline phosphatase (GAM) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ตรวจดูปฏิกิริยาโดยเติมสารตั้งต้น p-

nitrophenyl phosphate (PNPP) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยกำหนดค่าสิ้นสุดไตเตอร์คือค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าสองเท่าของค่าที่อ่านได้จาก carbonate coating buffer ทำปฏิกิริยากับ IgG ซึ่งใช้เป็น negative control

2.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง

PAb-CMV ที่ใช้ในการทดลองได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand ด้วยเชื้อ CMV บริสุทธิ์ ไอโซเลท KPS10 ที่แยกได้ในข้อ 1.1 โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม/ครั้ง จำนวนสองครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ เก็บแอนติซีรัมทั้งสิ้น 13 ครั้ง ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA

2.2.1 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.1.2 โดยเจือจางแอนติซีรัมแต่ละครั้งใน PBS แบบ 2 เท่า (2-fold dilution) เริ่มจาก 1:400 จนถึง 1: 102,400 ใช้ goat anti-rabbit IgG ที่เชื่อมกับ alkaline phosphatase (GAR) เจือจาง 1:10,000 ใน PBS เป็น secondary antibody โดยมี negative control คือ normal serum ทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV และ แอนติซีรัมเจือจาง 1:400 ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบยาสูบปกติ

2.2.2 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วย Protein A column chromatography

นำแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ครั้งที่ 7 ที่ผ่านการลดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบยาสูบโดยการทำ cross absorption กับน้ำคั้นพืชปกติ (Rodrigues-Alvarado *et al.*, 2002) และตกตะกอนแอนติบอดีด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50% dialysis แอนติบอดีที่ได้ใน 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) ข้ามคืน ผ่าน recProtein A affinity column chromatography คำนวณความเข้มข้นและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลิน เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1

2.2.3 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสใบด่างแดง

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบยาสูบปกติ และ carbonate coating buffer เป็น negative control

2.3 แอนติบอดีต่อ IgG ของหนูเม้าส์ (Rabbit anti-mouse IgG antibody, RAM)

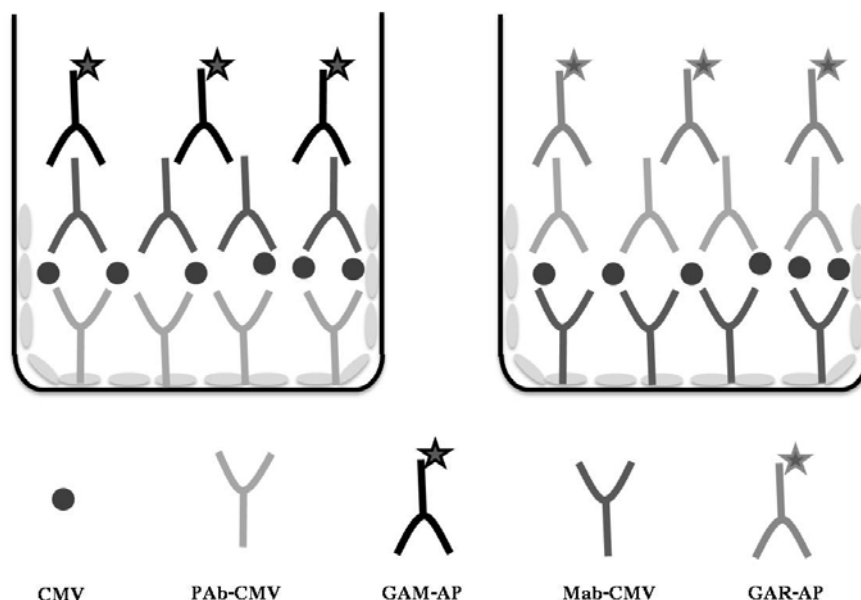
การผลิต RAM ที่ใช้ในการทดลองได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand ด้วย IgG บริสุทธิ์ของหนูเม้าส์ ปริมาณ 320 ไมโครกรัม จำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีในข้อ 2.2.1 โดยใช้ IgG บริสุทธิ์ของหนูเม้าส์เป็นแอนติเจน ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย recProteinA affinity column chromatography ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG (ข้อ 2.2.2) และทดสอบค่า dilution end point ของ IgG ที่แยกได้ (ข้อ 2.2.3)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแดงโดยวิธี

Triple antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA)

ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในเบื้องต้น เพื่อนำข้อมูลไปใช้พัฒนา อิมมูโนสตริป เลือกใช้วิธี TAS-ELISA เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้หลักการ sandwich ในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับหลักการของเทคนิค immunoassay อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่ายเหมาะสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น โดยเริ่มจากเติม PAb-CMV ที่เจือจางใน carbonate coating buffer pH 9.0 แบบ 2 เท่า ความเข้มข้น 20 – 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลุม ELISA ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง เติม blocking buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง เติมเชื้อ CMV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง เติม MAb-CMV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง เติม GAR หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยเติมสับสเตรท PNPP บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบการใช้ MAb เป็น coating antibody และใช้ PAb-CMV เป็น secondary antibody (ภาพที่ 2) กำหนดค่าการดูดกลืน

แสงที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าสองเท่าของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จาก negative control คือ น้ำคั้นใบยาสูบปกติ



ภาพที่ 2 รูปแบบการทำปฏิกิริยา Triple-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay โดยใช้ MAb หรือ PAb เป็น coating antibody

4. การติดฉลากอนุภาคทองกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ใช้อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) ในการติดฉลากกับ MAb-CMV ที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 โดยปรับ pH ของแอนติบอดีให้ได้ 9.0 โดย dialyse ใน 2 mM sodium borate buffer, pH 9.0 ปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำ titration โดยการผสมแอนติบอดีปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 0-50 ไมโครลิตร กับสารแขวนลอยอนุภาคทอง (ปรับให้ได้ pH 9.0 ด้วย 0.2 M KCO_3) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 10% NaCl 100 ไมโครลิตร บ่มอีก 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร สร้างกราฟระหว่างปริมาณของแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสง ปริมาตรของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือค่าของกราฟที่ขนานกับแกน X (www.schleicher-schuell.com, 2006; Paek *et al.*, 2000)

4.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง

คำนวณปริมาตรของอนุภาคทองและแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจากการทำ titration จากนั้นกวนอนุภาคทองอย่างรวดเร็วโดยใช้ magnetic stirrer ในบีกเกอร์ เติมแอนติบอดีที่ละลายลงในอนุภาคทอง กวนต่อไปอีก 10 นาที เติม 10% BSA (Bovine serum albumin) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% กวนเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000xg เป็นเวลา 45 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วย storage buffer (Tris buffer saline + 0.5% Tween 20 + 1% BSA + 0.02% sodium azide) กรองแอนติบอดีที่ติดผลึกด้วย cellulose acetate membrane filter 0.2 um และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคทอง

4.2.1 การตรวจวัดขนาดของอนุภาคทองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เปรียบเทียบขนาดของอนุภาคทองก่อนและหลังการเชื่อมด้วยแอนติบอดี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน โดยการหยดอนุภาคทองลงบนแผ่นกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอล์วและคาร์บอน ตรวจดูที่กำลังขยาย 200,000 เท่า วัดขนาดอนุภาคทอง ดูการกระจายของขนาดอนุภาค และหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางจากอนุภาคทอง 100 อนุภาค

4.2.2 การทดสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสใบด่างแดง

ทดสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV บริสุทธิ์และ CMV-CP ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) (Ramandeep *et al.* 2002) โดยหยดเชื้อไวรัสใบด่างแดงลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทิ้งให้แห้ง เคลือบด้วย 1%BSA ใน TBST (Tris buffer saline + 0.5% Tween 20) ล้างเมมเบรนด้วย TBST และทำปฏิกิริยากับอนุภาคทองที่เชื่อมกับแอนติบอดี เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

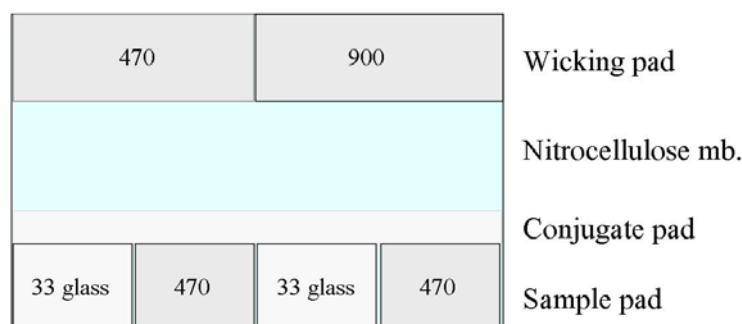
5.1 การเตรียมแผ่น backing pad เพื่อใช้ในการทดลอง

ชนิดของแผ่น backing pad ที่ใช้ในการทดลองคือ Selfadhesive Polyester Backing (ARCARE 7823) ใช้ดินสอขีดเส้นเพื่อกำหนดตำแหน่งบนแผ่น backing pad มีขนาดความยาวนับจากปลายดังนี้คือ 0-1.5, 1.5-2, 2-4.5 และ 4.5-6 เซนติเมตร สำหรับการประกอบส่วนของ sample

absorption pad (SAP), conjugate release pad (CRP), nitrocellulose membrane (NB) และ wicking pad (WP) ตามลำดับ (Hochleitner and Kraus, 2002)

5.2 การศึกษาชนิดของ Sample absorption pad (SAP) และ Wicking pad (WP) ที่มีผลต่ออัตราการไหลบนชุดตรวจสอบ

ศึกษาอัตราการไหลของน้ำคั้นพืชบนชุดตรวจสอบที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ จากการประกอบโดยใช้ SAP ที่ต่างกัน 2 ชนิด (SAP 33 glass และ SAP 470 cotton linter) และ WP ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดเช่นกัน คือ WP 470 และ WP 900 ตัดให้มีขนาด 1.6 เซนติเมตร ประกอบชุดตรวจสอบลงบนแผ่น backing pad โดยมี 4 รูปแบบดังนี้คือ SAP 33 glass กับ WP 470, SAP 470 กับ WP 470, SAP 33 glass กับ WP 900 และ SAP 470 กับ WP 900 (ภาพที่ 3) ใช้ 33 glass และ Prima 40 เป็น CRP และ NB ตามลำดับ วางแต่ละชิ้นส่วนให้ซ้อนทับกัน 1 มิลลิเมตร ตัดชุดตรวจสอบด้วยเครื่อง Guillotine cutting system ทำให้ได้ชุดตรวจสอบขนาด 0.5x6 เซนติเมตร จุ่มชุดตรวจสอบลงในน้ำคั้นไผ่ยาสูบ จับเวลาการเคลื่อนที่ของสารจนถึงปลายสุดชุดตรวจสอบ



ภาพที่ 3 รูปแบบการประกอบชุดตรวจสอบเพื่อศึกษาชนิดของวัสดุที่ใช้เป็น wicking pad และ sample pad

5.4 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการพ่นลงบน Conjugate release pad

พ่นอนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรกับ MAb-CMV ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร เติม 10%BSA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% กวนเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000xg เป็นเวลา 45 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย storage buffer (TBST + 1% BSA + 0.02% sodium azide) อัตราส่วน 0.15 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจาง

อนุภาคทองใน storage buffer แบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 (0.3 เท่า) และ 1:4 (0.6 เท่า) ฟันสารละลายอนุภาคทองแต่ละความเจือจางลงบน CRP33 glass releasing pad (Schleicher & Schuell, USA) ขนาด 0.5 x 3 เซนติเมตร โดยใช้ Airjet (Biodot, USA) อัตรา 15 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วประกอบเข้ากับชุดตรวจสอบซึ่งแผ่นไนโตรเซลลูโลสถูกเคลือบด้วย RAM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer pH 8.0 ด้วย Biojet (Biodot, USA) อัตรา 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เปรียบเทียบความเข้มสีบนเส้น control line ที่เหมาะสม

5.5 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลส

ศึกษาปฏิกิริยาบนไนโตรเซลลูโลสที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ PRIMA 40 (8.0 um), AE98 (5.0 um), AE99 (8.0 um) และ AE100 (10 um) ทำเครื่องหมายที่ 1 และ 1.5 เซนติเมตรจากปลายด้านหนึ่งของแผ่นเมมเบรน กำหนดเป็น test line และ control line ตามลำดับ นิดฟัน RAM ลงบนตำแหน่ง control line ตามลำดับ โดยใช้ Biojet (Biodot, USA) ปล่อยให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ประกอบเข้ากับชุดตรวจสอบที่ CRP ถูกเคลือบไว้ด้วย MAb-CMV-gold ความเข้มข้น 0.6 เท่าจากปริมาตรเริ่มต้น ตัดให้มีขนาด 0.5 x 6 เซนติเมตร จุ่มชุดตรวจลงในบัฟเฟอร์ เปรียบเทียบความเข้มสีที่เกิดขึ้นบน control line

6. การศึกษาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการบดตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบอิมมูโนสตริป

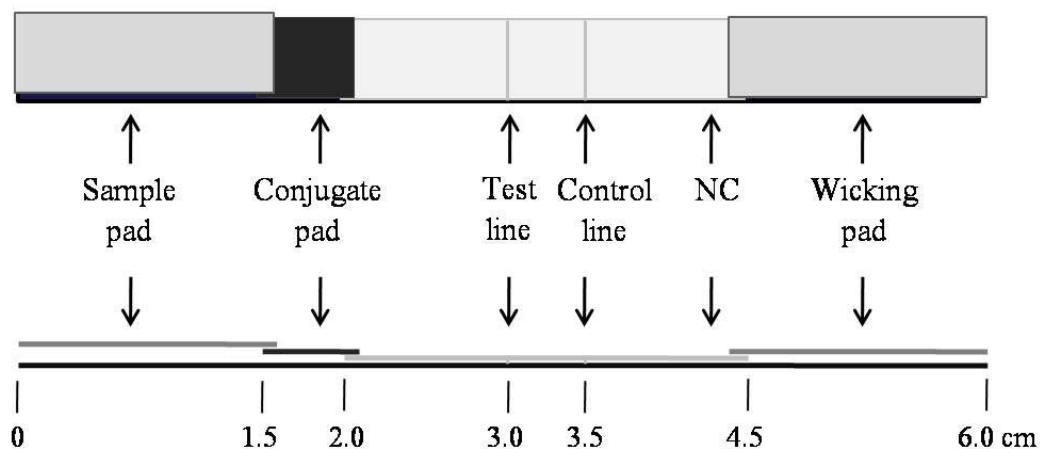
ฟัน PAb-CMV และ RAM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer ด้วย Biojet (Biodot, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ลงบน Prima40 ที่ตำแหน่ง test line และ control line ตามลำดับ ฟัน conjugate release pad ด้วยอนุภาคทองที่พ่วงกับ MAb-CMV ที่ความเจือจาง 1:4 ปล่อยให้แห้ง ประกอบชุดตรวจสอบ โดยใช้ SAP 470 และ 33 glass เป็น WP และ SAP ตัดชุดตรวจสอบให้มีขนาด 0.5 x 6 เซนติเมตร จากนั้นบดตัวอย่างพืชทดสอบคือใบยาสูบปกติ และใบยาสูบที่ติดเชื้อ CMV ในบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 10 ชนิดคือ (1) 1x TBS pH 7.4, (2) 1x TBST pH 7.4, (3) 1x PBS pH 7.4, (4) 1x PBST pH 7.4, (5) 10 mM phosphate buffer pH 7.4, (6) 10 mM phosphate buffer pH 7.4 + 0.05% Tween 20, (7) DOA extraction buffer1 pH 7.5, (8) DOA extraction buffer2 pH 8.6 (สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช, 2550), (9) BIOREBA general extraction buffer pH 7.4 (www.bioreba.com), (10) Agdia extraction buffer pH 7.4

(www.agdia.com) จุ่มชุดตรวจสอบที่ได้ในน้ำคั้นพืช ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากน้ำคั้นในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด

7. การตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

7.1 การเตรียมชุดตรวจสอบ

เตรียมชุดตรวจสอบโดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยของอนุภาคทองที่พ่วงกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน Storage buffer อัตราส่วน 0.6 เท่าของปริมาตรอนุภาคทองเริ่มต้น ลงบน CRP33 glass releasing pad (Whatman, USA) จนอิ่มตัว (Air jet: XYZ Dispensing System) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เคลือบ PAB-CMV ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ RAM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (prima 40) ที่ตำแหน่ง test line และ control line (0.7 และ 1.2 มิลลิเมตร จากปลายแผ่น) ตามลำดับ ด้วยอัตรา 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร (Biojet: XYZ Dispensing System) ปล่อยให้แห้ง ประกอบชุดตรวจสอบลงบนแผ่น backing pad โดยมีระยะจากปลายของสตริปด้าน SAP ดังนี้ 0-1.6 (sample pad), 1.5-2.1 (conjugate release pad), 2.0-4.5 (nitrocellulose) และ 4.4-6.0 เซนติเมตร สำหรับแผ่น wicking pad ตามลำดับ ให้แผ่น releasing pad ซ้อนเข้าไปในส่วน of แผ่น absorption pad 1 มิลลิเมตร และแผ่นไนโตรเซลลูโลสซ้อนเข้าไปในส่วน of releasing pad และแผ่น wicking pad ข้างละ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) ตัดชุดตรวจสอบด้วยเครื่อง Guillotine cutting system ทำให้ได้ชุดตรวจสอบขนาด 0.5x6 เซนติเมตร



ภาพที่ 4 แผนผังการประกอบชุดตรวจสอบ

7.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

เตรียม อิมมูโนสตริป ตามวิธีการในข้อ 7.1 นำมาทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ CMV โดยทดสอบกับเชื้อ CMV บริสุทธิ์ที่เจือจางในน้ำคั้นไวยาสุบปกติแบบ 2 เท่า จำนวน 13 ความเข้มข้น ($50 - 0.012$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยมีน้ำคั้นไวยาสุบปลอดโรค และ บัฟเฟอร์ (PBS) เป็น negative control จับเวลาเมื่อเริ่มจุ่มชุดตรวจสอบลงในน้ำคั้นพืชจนเห็นปฏิกิริยาชัดเจน และเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยการเคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อ CMV ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CMV ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

8. การเตรียมอิมมูโนไลโปโซม

8.1 การเชื่อม Heterobifunctional cross-linker เข้ากับไดโอเลิลฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (DOPE)

เชื่อม DOPE (1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine) กับ sulfo-SMCC cross linker [4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt] ดัดแปลงจากวิธีการของ Hermanson (1995) โดยละลาย

DOPE ใน reaction buffer (anhydrous methanol + Triethanolamine 100 ไมโครโมล) ให้ได้ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในตู้ดูดควัน ภายใต้สภาพไนโตรเจน เติม sulfo-SMCC 10 มิลลิกรัม ลงในสารละลาย DOPE ผสมให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาพไนโตรเจน วิเคราะห์ความสำเร็จในการเชื่อมด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ใช้ silica gel 60-F₂₅₄ plate (Merck, USA) โดยมีตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 65: 25:4 (โดยปริมาตร) ระเหยเมทานอลออกจากสารละลาย SMCC-PE ด้วย rotary evaporation จากนั้นละลาย SMCC-PE คลอโรฟอร์ม ระเหยคลอโรฟอร์มออก และเก็บฟิล์มไขมันที่ -20 องศาเซลเซียส

8.2 การเตรียมอนุภาคไลโปโซม

เตรียมไลโปโซมจากฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine, PC) ความบริสุทธิ์ 70.6% (เลซิดิน) คัดแปลงจากวิธีการของ Park and Durst (2000) โดยละลายฟอสฟาติดีลโคลีน คอเลสเตอรอลและ SMCC-PE ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ในอัตราส่วน 8:10:1 (โดยน้ำหนักโมเลกุล) (Hermanson, 1995) ละลายส่วนผสมที่ได้ 43 ไมโครโมลในสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (2:1) ปริมาตร 4.2 มิลลิลิตร อุ่นสารละลายไขมันในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติม 150 mM sulforhodamine B (SRB) ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ลงในสารละลายไขมัน กวนของผสมให้เข้ากันในตู้ดูดควันจะได้มีลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil) ลดขนาดไลโปโซมชนิดรูปกลมกลวงซ้อนกันหลายชั้นที่เตรียมได้ให้เป็นไลโปโซมขนาดเล็กชั้นเดียว (small unilamellar vesicles; SUVs) ตามวิธีการของ Singh *et al.* (2000) โดยนำไลโปโซมที่เตรียมได้แช่ลงในอ่างคลื่นความถี่สูง (sonicator) นาน 8 นาที ภายใต้สภาพไนโตรเจน ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วย rotary evaporation ที่ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งหมดฟอง จะได้เจลไขมันสีม่วงเข้ม เติม SRB ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร sonicate อีกครั้งนาน 6 นาที ลดขนาดของไลโปโซมโดย extrude ผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 และ 0.2 ไมครอนตามลำดับ แยกไลโปโซมออกจากสารละลายสี SRB ที่ไม่ถูกไลโปโซมโอบหุ้ม ด้วย Sephadex G50-300 gel filtration column 1.5x25 เซนติเมตร ที่ เก็บในขวดที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความสามารถในการบรรจุ SRB ภายในอนุภาคไลโปโซมจากการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 586 นาโนเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus BX51, Australia) และศึกษาขนาดของไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JOEL 1200 EX (Jeol Ltd., Tokyo, Japan)

8.3 การติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยหมู่ sulfhydryl group

ดัดแปลงจากวิธีการของ Hermanson (1995) โดยเติม 14.5 mM Traut's reagent (2-iminothiolane) ปริมาตร 91.6 ไมโครลิตรใน MAb-CMV IgG (ผ่านการ dialysis ใน 50 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 8.0) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กวนสารละลายภายใต้สภาพไนโตรเจน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น dialysis เพื่อแยก excess iminothiolane ออก โดยใช้ 20 mM sodium phosphate, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0 วัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เตรียมได้ในสารละลายที่ $O.D_{280}$ และประเมินปริมาณ sulfhydryl group ด้วยวิธี Ellman's assay (Aitken and Learmonth, n.d.)

8.4 การเชื่อมต่อไลโปโซมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำตามวิธีการของ Hermanson (1995) โดยบ่มไลโปโซมที่เตรียมได้จากข้อ 8.2 กับ MAb-SH (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เตรียมได้จากข้อ 8.3 อัตราส่วน 1: 1 (โดยปริมาตร) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 16 ชั่วโมง ภายใต้สภาพไนโตรเจน แยกไลโปโซมกับ unreacted MAb โดยใช้ Sephadex G 25 gel filtration column ตรวจสอบการเตรียม immunoliposome โดยใช้เทคนิค DIBA

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารปฏิบัติการวิจัยศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

ใช้ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2548 ถึงเดือนกันยายน 2551

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการทดลอง

แอนติเจนที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นยาสูบ และ Recombinant protein CMV-CP ที่สกัดจากแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี และทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในการทดลอง

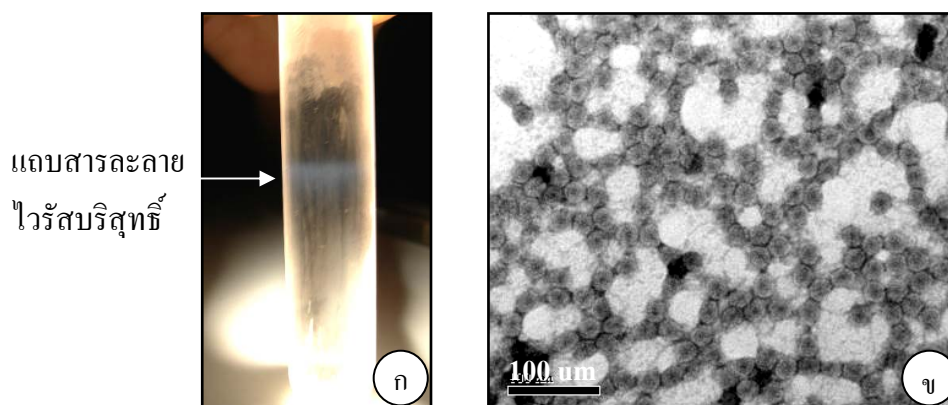
1.1 การแยกเชื้อไวรัสใบด่างแดงให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อไวรัสใบด่างแดงจากใบยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV-KPS10 คำนวณความเข้มข้นของไวรัสบริสุทธิ์ได้ 3.259 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รวมปริมาณไวรัสทั้งสิ้น 9.779 มิลลิกรัมจากใบยาสูบ 110 กรัม เมื่อนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากการคำนวณค่า $O.D._{260}/O.D._{280}$ ได้เท่ากับ 1.58 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่ามาตรฐานของเชื้อไวรัสใบด่างแดงคือ 1.7 (Brunt *et al.*, 1996) แสดงว่าเชื้อไวรัสใบด่างแดงที่เตรียมได้ปนเปื้อนโปรตีนพืช เมื่อตรวจสอบอนุภาคไวรัสด้วยวิธี dip preparation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 29 นาโนเมตร (ภาพที่ 5)

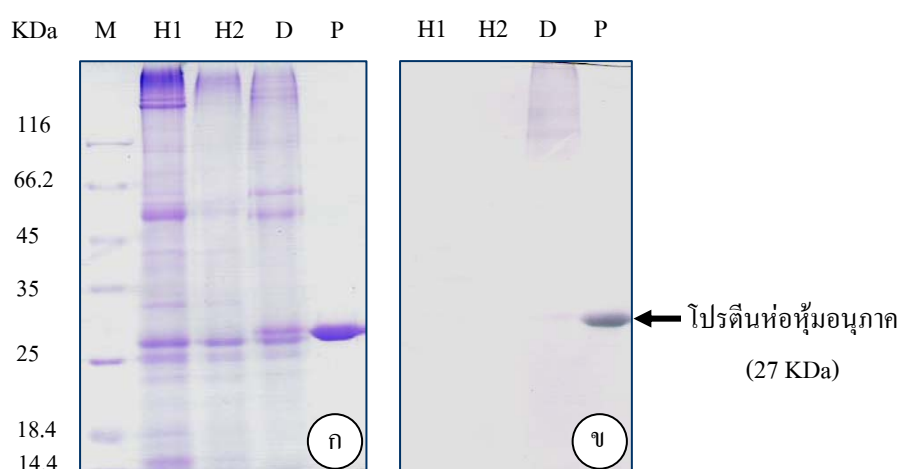
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่แยกได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของไวรัสขนาดประมาณ 27 KDa ซึ่งตรงกับแถบที่พบในพืชเป็นโรคแต่ไม่พบในพืชปกติ ตามรายงานของมณีรัตน์ (2547) และใกล้เคียงกับรายงานของ Gioria *et al.* (2002) ซึ่งศึกษาโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ CMV จาก *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (yellow passion fruit) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 6)

1.2 การสกัดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างแดงจาก *E. coli* (DH5α) ที่ได้รับการถ่ายยีน

นอกจากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์จากพืชแล้ว ได้ผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ CMV (CMV-CP) จากการชักนำการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคโดยใช้ recombinant plasmid



ภาพที่ 5 ไวรัสใบด่างแดงที่เตรียมให้บริสุทธิ์จากใบยาสูบเป็นโรค ด้วยวิธี sucrose gradients centrifugation และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
 (ก) แถบสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ โดยวิธี sucrose gradient centrifugation
 (ข) อนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์ ที่กำลังขยาย 60,000 เท่า
 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 29 นาโนเมตร



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสใบด่างแดง ไอโซเลท KPS10 ที่เตรียมได้จากใบยาสูบเป็นโรคโดยใช้วิธี SDS-PAGE (ก) และ Western blotting (ข)

M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)
 H1-H2 ยาสูบปกติ
 D ยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัสใบด่างแดง
 P เชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์

pQE80L-CMV-CP เพื่อเป็นแอนติเจนในการทดลองด้วย โดยหลังจากสกัดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างแดง (CMV-CP) แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนออกมาใน Eluate fraction ที่ 4- 12 ซึ่งมีความเข้มข้นสูง แต่มีแถบโปรตีนชนิดอื่นปนอยู่บ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 7) ความเข้มข้นเฉลี่ยของ recombinant protein ที่รวบรวมจากทุก eluate fraction ที่วัดด้วยวิธี Bradford assay เท่ากับ 2.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 34.83 มิลลิกรัมจากปริมาตรรวม 17 มิลลิลิตร จากอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น 4 ลิตร ซึ่งได้โปรตีนน้อยเมื่อเทียบกับรายงานการแยกสกัด recombinant protein ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin (Sambrook and Russell, 2001)

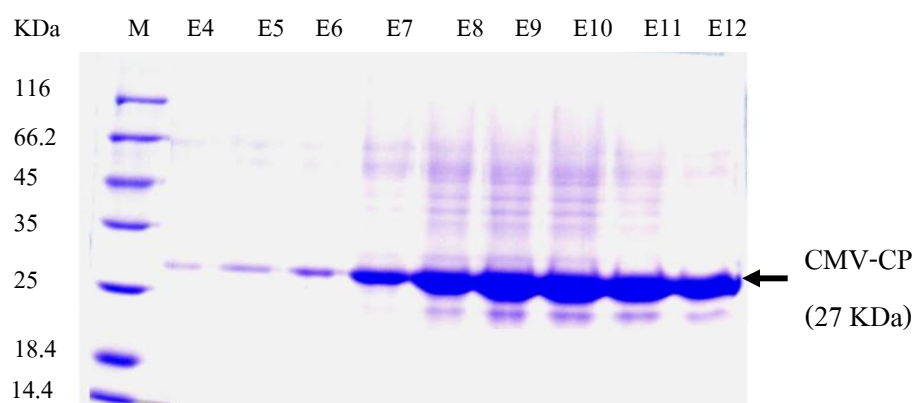
2. การเตรียมแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง

การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยการผ่านอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน CM2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงใน recProtein A-Sepharose 4B conjugate column พบว่า IgG ถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์หมดใน 4 fraction คือ Eluate 2-5 โดยมีความเข้มข้นของโปรตีน 1.52, 1.71, 0.6 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการผ่านคอลัมน์ (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์ ได้ค่าไคเตอร์ของ Eluate ที่ 2-5 เท่ากับ 32,768; 32,768; 16,382 และ 4,096 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และเมื่อนำ fraction ต่างๆ ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่ามีความบริสุทธิ์มาก มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 53 และ 29 KDa ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

2.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง

โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง (PAb -CMV) และ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเมาส์ (RAM) เพื่อใช้เคลือบเป็น test line และ control line บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตามลำดับ



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ recombinant protein CMV-CP ที่ผ่าน Ni-NTA column โดยใช้วิธี SDS-PAGE

M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

E4-E12 Eluate 4 – Eluate 12

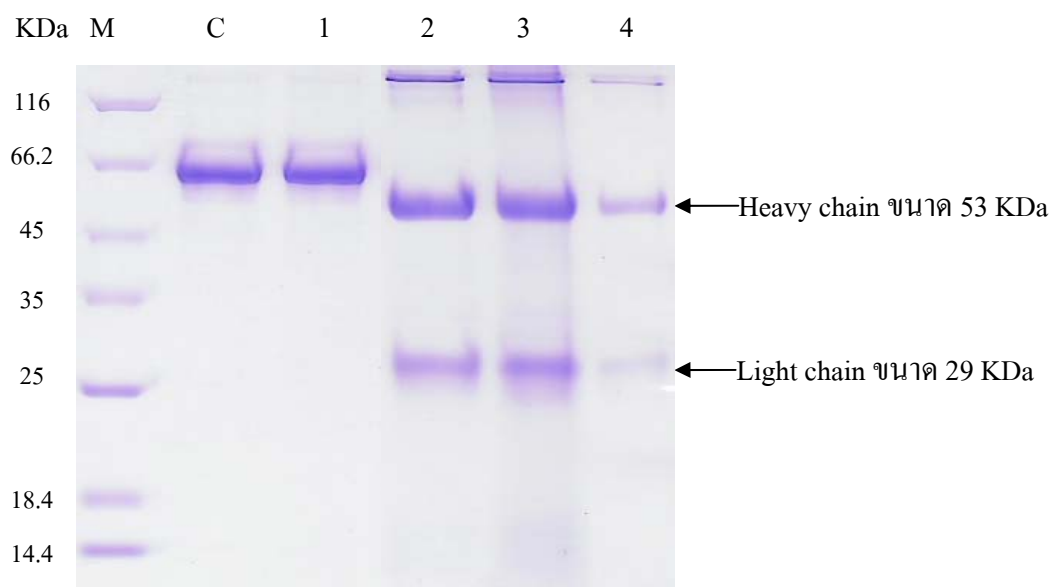
ตารางที่ 1 การแยกอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง
ด้วยวิธี recProtein G-Sepharose 4B conjugate column chromatography

Fraction ^{/1}	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีน ^{/2} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไทเตอร์
w1	2.08	1.48	8
w2	0.27	0.20	16
w3	0.00	0.00	0
w4	0.00	0.00	0
w5	0.00	0.00	0
E1	0.01	0.00	0
E2	2.13	1.52	32,768
E3	2.40	1.71	32,768
E4	0.84	0.60	16,382
E5	0.11	0.08	8,192
E6	0.00	0.00	0
E7	0.00	0.00	0
E8	0.00	0.00	0
E9	0.00	0.00	0
E10	0.00	0.00	0
อาหารเลี้ยงเซลล์ ไฮบริโดมา	2.79	2.00	512

^{/1} W fraction ที่เก็บจากการล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer

E fraction

^{/2} ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากสูตร $O.D._{280}/1.4$



ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG ที่ผ่าน recProtein G-Sepharose 4B conjugate column chromatography โดยใช้วิธี SDS-PAGE

M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

C อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา CM2

1 Wash fraction 1

2 Eluate fraction 2

3 Eluate fraction 3

4 Eluate fraction 4

2.2.1 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง

ผลิต PAb-CMV ในกระต่ายโดยใช้เชื้อ CMV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน เก็บแอนติซีรั่มจำนวน 13 ครั้ง ตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรั่มจากวิธี indirect ELISA พบว่า PAb-CMV มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบยาสูบปกติสูงมาก ($O.D_{405} = 1.979$) แต่หลังจากทำ cross absorption กับน้ำคั้นใบยาสูบปกติ สามารถลดปฏิกิริยาข้ามได้ ($O.D_{405} = 0.127$) โดยมีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,600 – 25,600 ค่าไตเตอร์สูงที่สุดในครั้งที่ 7 (25,600) (ตารางที่ 2) ใช้แอนติซีรั่มตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไปในการเตรียม Ig บริสุทธิ์ต่อไป

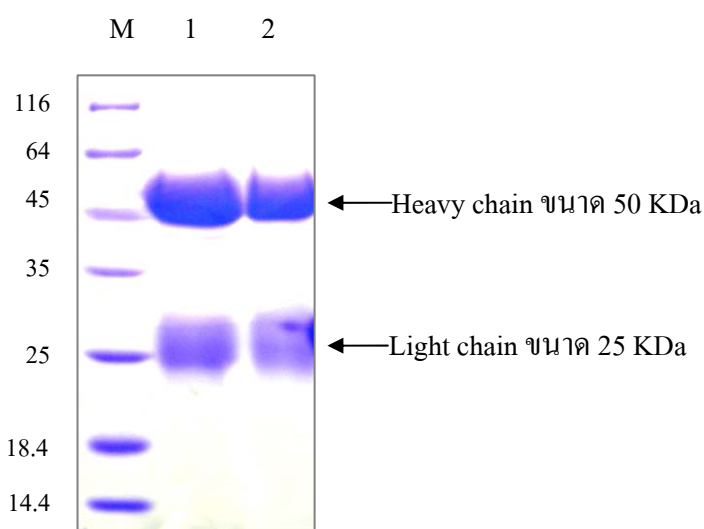
การเตรียม IgG บริสุทธิ์จาก PAb-CMV โดยใช้แอนติซีรั่มครั้งที่ 7 ที่ผ่านการ cross absorption แล้ว มาผ่าน recProtein A-Sepharose 4B conjugate column chromatography ได้ IgG ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณทั้งสิ้น 12.6 มิลลิกรัมจากแอนติซีรั่ม 5 มิลลิลิตร การตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 2 แถบ ขนาด 50 KDa (Heavy chain) และขนาด 25 KDa (light chain) และไม่พบแถบโปรตีนอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าอิมมูโนโกลบูลินที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง (ภาพที่ 9)

การตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ด้วยวิธี indirect ELISA พิจารณาจากการทำปฏิกิริยาที่ยังให้ค่า $O.D_{405}$ เป็นสองเท่าของ negative control พบว่า ได้ไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับ CMV บริสุทธิ์ เท่ากับ 32,768 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ

ตารางที่ 2 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสใบด่างแดง จากการเจาะเลือด 13 ครั้ง

แอนติซีรัมครั้งที่	ไตเตอร์ ^{/1}	แอนติซีรัมครั้งที่	ไตเตอร์ ^{/1}
1	1,600	8	25,600
2	1,600	9	25,600
3	1,600	10	25,600
4	6,400	11	25,600
5	12,800	12	25,600
6	12,800	13	25,600
7	25,600		

^{/1} ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตเป็นเวลา 30 นาที



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลิน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย recProtein A column Sepharose 4B conjugate column chromatography โดยใช้วิธี SDS-PAGE

M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentus, SM0431)

1 อิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่จำเพาะต่อไวรัสใบด่างแดง

2 อิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเมาส์

2.2.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเม้าส์

โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Rabbit anti-mouse IgG, RAM) ที่ใช้ในการทดลองได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand ด้วยอิมมูโนโกลบูลินของหนูเม้าส์บริสุทธิ์ isotype IgG1 ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมเข้าใต้ผิวหนัง เก็บแอนติซีรัมจำนวน 18 ครั้ง หลังจากการตรวจค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าซีรัมมีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000 – 128,000 สูงสุดในครั้งที่ 10 (128,000) (ตารางที่ 3) นำแอนติซีรัมที่เจือจาง 1:1,000 ไปทำปฏิกิริยากับ IgG1 และ IgG2a จาก MAb-CMV และ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Potato virus Y* (PVY) พบว่า RAM สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 subclass ของ IgG

การเตรียม RAM-IgG โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 10 และใช้ recProtein A-Sepharose 4B conjugate column ใส่อิมมูโนโกลบูลินความเข้มข้น 1.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนทั้งสิ้น 14.3 มิลลิกรัมจากแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร การตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์ 524,288

ตารางที่ 3 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อหนูเมาส์ จากการเจาะเลือด 18 ครั้ง

แอนติซีรัมครั้งที่	ไตเตอร์ ^{/1}	แอนติซีรัมครั้งที่	ไตเตอร์ ^{/1}
1	1000	10	128,000
2	8000	11	64,000
3	4000	12	16,000
4	16,000	13	16,000
5	64,000	14	16,000
6	64,000	15	16,000
7	64,000	16	16,000
8	64,000	17	16,000
9	64,000	18	16,000

^{/1} ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตเป็นเวลา 30 นาที

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแดงโดยวิธี Triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent Assay (TAS-ELISA)

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีต่อเชื้อ CMV ด้วยวิธี TAS-ELISA โดยเปรียบเทียบการใช้ PAb-CMV หรือ MAbs-CMV เคลือบ ELISA plate พบว่าการเคลือบ ELISA plate ด้วย PAb ให้ผลดีกว่า MAbs โดยให้ค่า O.D.₄₀₅ เป็นบวก เมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อใบด่างแดงบริสุทธิ์ และมีค่า O.D.₄₀₅ (0.420-0.844) แปรผันตามปริมาณ PAb ที่ใช้เคลือบถาด (1.25–20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) ส่วนการใช้ MAbs เคลือบถาดให้ค่า O.D.₄₀₅ ระหว่างการทำปฏิกิริยากับพืชเป็นโรคและพืชปกติไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ PAb ในการเคลือบถาด (coating antibody) และใช้ MAbs ในการทำปฏิกิริยาหลังจากเติมแอนติเจนแล้ว (detecting antibody) (ตารางที่ 4)

4. การติดตามอนุภาคทองกับโมนิโคลนอลแอนติบอดี

การทำ Titration เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการปฏิกริยากับอนุภาคทอง พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร แปรผันตรงกับปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้ทำปฏิกริยา และเริ่มคงที่เมื่อใช้แอนติบอดี (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร โดยค่าการดูดกลืนแสงไม่เพิ่มขึ้นแม้จะเพิ่มปริมาณของแอนติบอดีให้มากขึ้นก็ตาม (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 10) ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณแอนติบอดีและอนุภาคทองที่เลือกเพื่อการติดตามต่อไปคือ 3: 50

การศึกษขนาดของอนุภาคทองก่อนและหลังติดตามด้วยแอนติบอดีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กําลังขยาย 200,000 เท่า พบว่า อนุภาคทองที่เชื่อมกับแอนติบอดีมีขนาดโดยเฉลี่ยใหญ่กว่าอนุภาคทองก่อนการเชื่อมด้วยแอนติบอดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 21.0 ± 4.18 และ 19.0 ± 4.43 นาโนเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ 12) และสามารถทำปฏิกริยากับเชื้อ CMV บริสุทธิ์และ CMV-CP โดยวิธี DIBA (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 4 ผลการทำปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับไวรัสใบด่างแดง
บริสุทธิ์ โดยวิธี TAS-ELISA

Secondary antibody ^{/1} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ชนิดของ Coating antibody ^{/2}	
	PAb-CMV	MAb-CMV
20	0.841 ^{/3}	0.426
10	0.729	0.405
5	0.661	0.381
2.5	0.571	0.357
1.25	0.420	0.336
น้ำคั้นใบยาสูบปกติ ^{/4}	0.025	0.348
Coating buffer	0.000	0.000

^{/1} แอนติบอดีตัวบนในปฏิกิริยา TAS-ELISA ซึ่งจะตรงกันข้ามกับชนิดของแอนติบอดีที่ใช้เคลือบ ELISA plate (coating antibody) ทำปฏิกิริยาโดยเจือจางแอนติบอดีแบบ 2 เท่า

^{/2} แอนติบอดีที่ใช้ในการเคลือบ ELISA plate ในปฏิกิริยา TAS-ELISA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

^{/3} ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หลังจากการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทเป็นเวลา 60 นาที

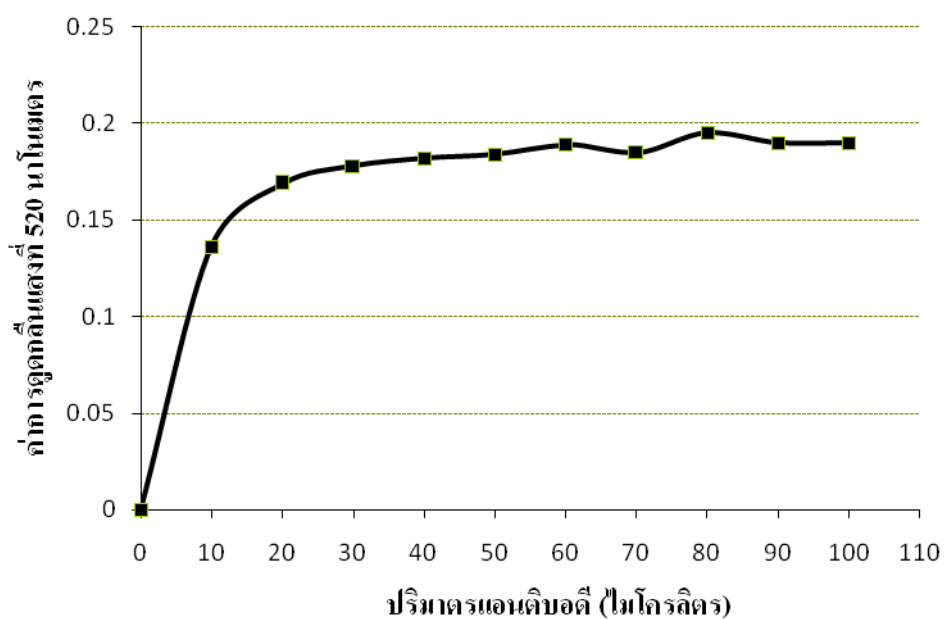
^{/4} บดใบยาสูบใน PBS อัตราส่วน 1:10

ตารางที่ 5 การหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับอนุภาคทอง โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

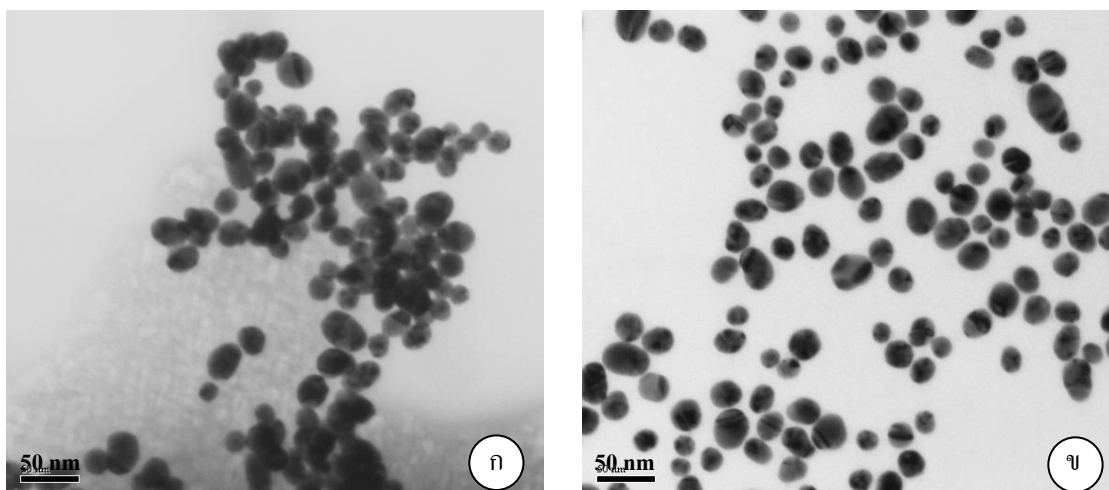
แอนติบอดี ^{1/} (ไมโครลิตร)	Dialysis buffer (ไมโครลิตร)	อนุภาคทอง (ไมโครลิตร)	10% NaCl (ไมโครลิตร)	O.D. ₅₂₀ ^{2/}
0	100	500	100	0
10	90	500	100	0.136
20	80	500	100	0.169
30	70	500	100	0.178
40	60	500	100	0.182
50	50	500	100	0.184
60	40	500	100	0.189
70	30	500	100	0.185
80	20	500	100	0.195
90	10	500	100	0.190
100	0	500	100	0.190

^{1/}ใช้ MAb-CMV ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

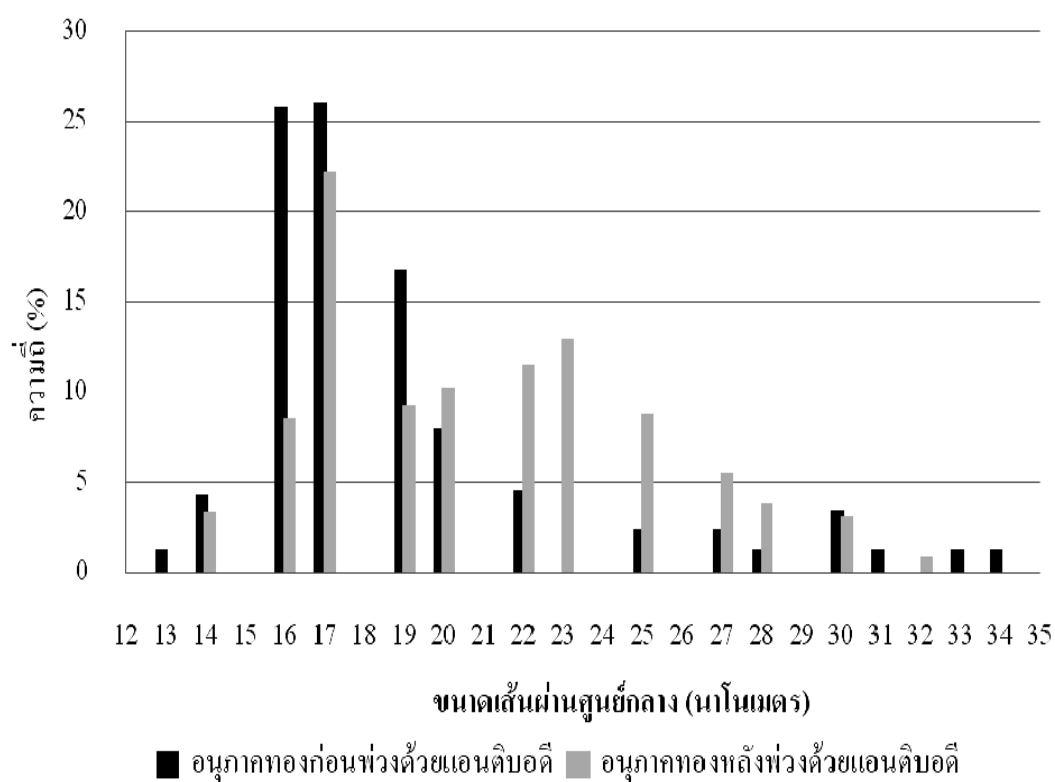
^{2/}ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสารแขวนลอยอนุภาคทอง



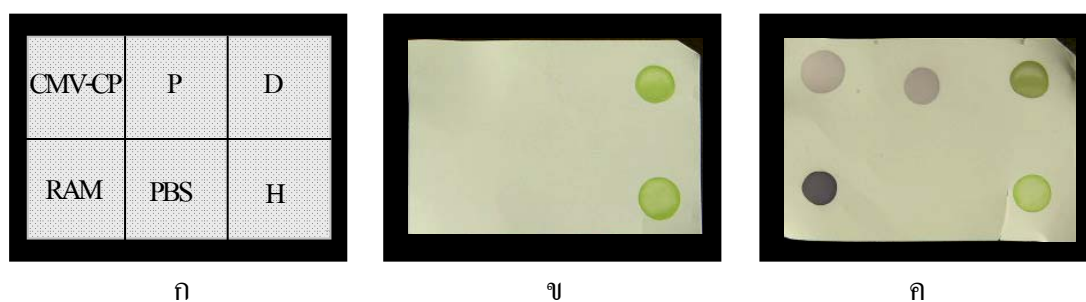
ภาพที่ 10 กราฟแสดงการหาปริมาณแอนติบอดี (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับอนุภาคทอง



ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบขนาดของอนุภาคทองคำก่อน (ก) และหลัง (ข) การเชื่อมด้วยแอนติบอดี ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 200,000 เท่า โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 19 ± 4.43 นาโนเมตร และ 21 ± 4.18 นาโนเมตร ตามลำดับ



ภาพที่ 12 ขนาดและความถี่ของอนุภาคทองคำก่อนและหลังการเชื่อมด้วยแอนติบอดี



ภาพที่ 13 การตรวจสอบปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำก่อนและหลังการเชื่อม MAb-CMV กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot immunobinding assay

(ก) แผนผังการทดลอง กำหนดให้

CMV-CP	recombinant coat protein ของเชื้อไวรัสใบด่างแตง
P	เชื้อไวรัสใบด่างแตงบริสุทธิ์
D	ใบยาสูบเป็นโรค
RAM	แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเมาส์
PBS	phosphate buffer saline
H	ใบยาสูบปกติ

(ข) ผลการทำปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำก่อนการเชื่อม MAb-CMV

(ค) ผลการทำปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำหลังการเชื่อม MAb-CMV จุดสีม่วงแสดงผลการตรวจที่ให้ผลเป็นบวก

5. การเตรียมชุดตรวจสอบ

5.1 การศึกษาชนิดของ sample absorption pad (SAP) และ wicking pad (WP) ที่มีผลต่ออัตราการไหลบนชุดตรวจสอบ

จากการศึกษาความไวในการไหลของน้ำคั้นพืชบนชุดตรวจสอบที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ (1) SAP 33 glass fiber กับ WP 470 cotton linter, (2) SAP 470 cotton linter กับ WP 470 cotton linter, (3) SAP 33 glass fiber กับ WP 900 cotton linter และ (4) SAP 470 cotton linter กับ WP 900 cotton linter พบว่า น้ำคั้นพืชสามารถเคลื่อนที่บนชุดตรวจสอบที่มี SAP ชนิด 33 glass fiber (แบบที่ 1 และ 3) ได้เร็ว โดยไม่มีความแตกต่างกันในรูปแบบที่มี WP เป็น 470 cotton linter และ 900 cotton linter โดยใช้เวลาในการเคลื่อนที่ถึง wicking pad เท่ากับ 46 และ 48 วินาที ตามลำดับ ในขณะที่รูปแบบที่ใช้ 470 cotton linter เป็น SAP (แบบที่ 2 และ 4) มีอัตราการไหลช้ากว่า คือ 100 วินาที ในรูปแบบที่ใช้ WP 470 cotton linter และ 86 วินาทีในรูปแบบที่ใช้ WP 900 cotton linter (ตารางที่ 6) ดังนั้นรูปแบบของชุดตรวจสอบที่น้ำคั้นพืชสามารถเคลื่อนที่ได้ดีคือการใช้ SAP ชนิด 33 glass fiber โดยสามารถใช้ WP ได้ทั้งสองชนิด คือ 470 หรือ 900 cotton linter โดยมีความไวไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจาก cotton linter ชนิด 900 มีความหนามาก ขากต่อการตัดและประกอบ จึงเลือกใช้รูปแบบที่มี SAP ชนิด 33 glass fiber และ WP ชนิด 470 cotton linter ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

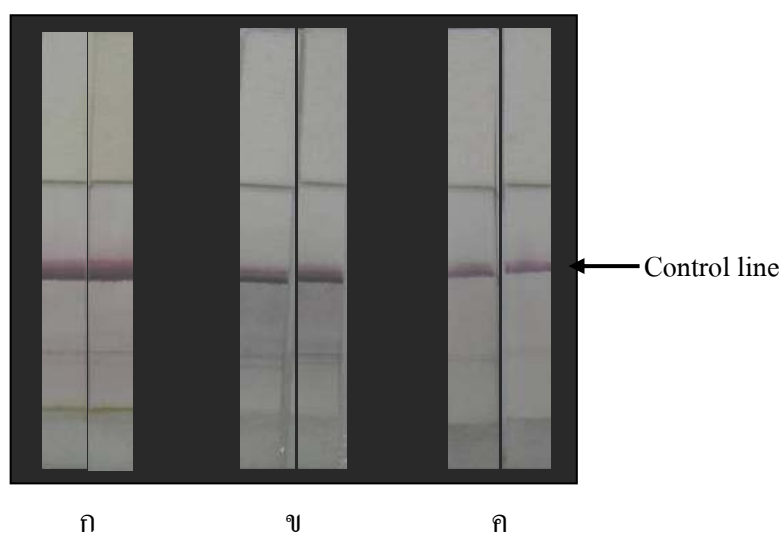
5.2 การหาปริมาณของสารแขวนลอยอนุภาคทองที่เหมาะสมในการพ่นลงบน conjugate release pad

หลังจากพ่นอนุภาคทองกับ MAb-CMV (MAb-conjugate) โดยใช้อัตราส่วน 3: 50 ปั่นตกตะกอนส่วนผสมดังกล่าว และละลายตะกอนใน storage buffer ปริมาตร 0.15, 0.3 และ 0.6 เท่าของปริมาตรสารแขวนลอยอนุภาคทองเริ่มต้น นำอิมมูโนสตริปไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับ RAM ที่บริเวณ control line พบว่าความเข้มสีบนเส้น control line แปรผันตามความเข้มข้นของสารแขวนลอยอนุภาคทอง โดยการละลายอนุภาคทองด้วย storage buffer อัตราส่วน 0.15 เท่าของปริมาตรเริ่มต้นให้ความเข้มสีของ control line มากกว่าความเข้มสีที่เกิดจากการละลายอนุภาคทองที่ 0.3 และ 0.6 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น ประมาณ 2 และ 3 เท่า ตามลำดับ แต่เนื่องจากความเข้มข้นที่ 0.6 เท่าจะให้เส้น control line ที่คมชัดและเพียงพอสำหรับการบ่งชี้ปฏิกิริยา จึงเลือกใช้อัตราส่วน 0.6 เท่าในการละลายอนุภาคทองเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของน้ำคั้นพืชบนชุดตรวจสอบที่ใช้ sample absorption pad และ wicking pad รูปแบบต่างๆ

รูปแบบของ SAP-WP ที่ประกอบในชุดตรวจสอบ	เวลา (วินาที) ^{/1}
(1) 33 glass fiber – 470 cotton linter	46
(2) 470 cotton linter – 470 cotton linter	100
(3) 33 glass fiber – 900 cotton linter	48
(4) 470 cotton linter – 900 cotton linter	89

^{/1} ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาดังแต่เริ่มจุ่มชุดตรวจสอบลงในน้ำคั้นพืชจนน้ำคั้นพืชเคลื่อนที่ถึง wicking pad โดยทดสอบทั้งสิ้น 4 ซ้ำ



ภาพที่ 14 ความเข้มสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง rabbit anti mouse IgG (RAM) บริเวณ control line กับแอนติบอดีที่เชื่อมกับอนุภาคทองที่ถูกละลายตะกอนด้วย storage buffer ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน คือ 0.15 (ก) 0.3 (ข) และ 0.6 (ค) เท่าของปริมาณทองเริ่มต้น

5.3 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ต่อเวลาที่ใช้และความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ พบว่า ปฏิกริยาบนเส้น control line เกิดได้เร็วที่สุดบนชุดตรวจสอบที่ใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 (48 วินาที) ซึ่งแตกต่างจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE ทั้ง 3 แบบอย่างเห็นได้ชัด ความไวในการเกิดปฏิกริยาบนชนิด AE แปรผกผันกับขนาดของช่องว่างเฉลี่ยภายในแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน สอดคล้องกับการรายงานของ Hechleitner and Kraus (2002) โดย AE98 (5 ไมครอน) ใช้เวลาในการเกิดปฏิกริยานานที่สุด คือ 190 วินาที รองลงมาคือ AE99 (8 ไมครอน) และ AE100 (10 ไมครอน) ซึ่งใช้เวลาในการเกิดปฏิกริยา 140 และ 100 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกไนโตรเซลลูโลสชนิด Prima 40 ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกริยาบน control line ในชุดตรวจสอบ

ชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลส	เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกริยาบน control line (วินาที) ¹
Prima40 (8 ไมครอน) ²	48
AE98 (5 ไมครอน)	190
AE99 (8 ไมครอน)	140
AE100 (10 ไมครอน)	96

¹ ค่าเฉลี่ยระยะเวลาตั้งแต่เริ่มจุ่มชุดตรวจสอบลงในบัฟเฟอร์จนเกิดปฏิกริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยทดสอบทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

² ขนาดรูพรุนของไนโตรเซลลูโลส

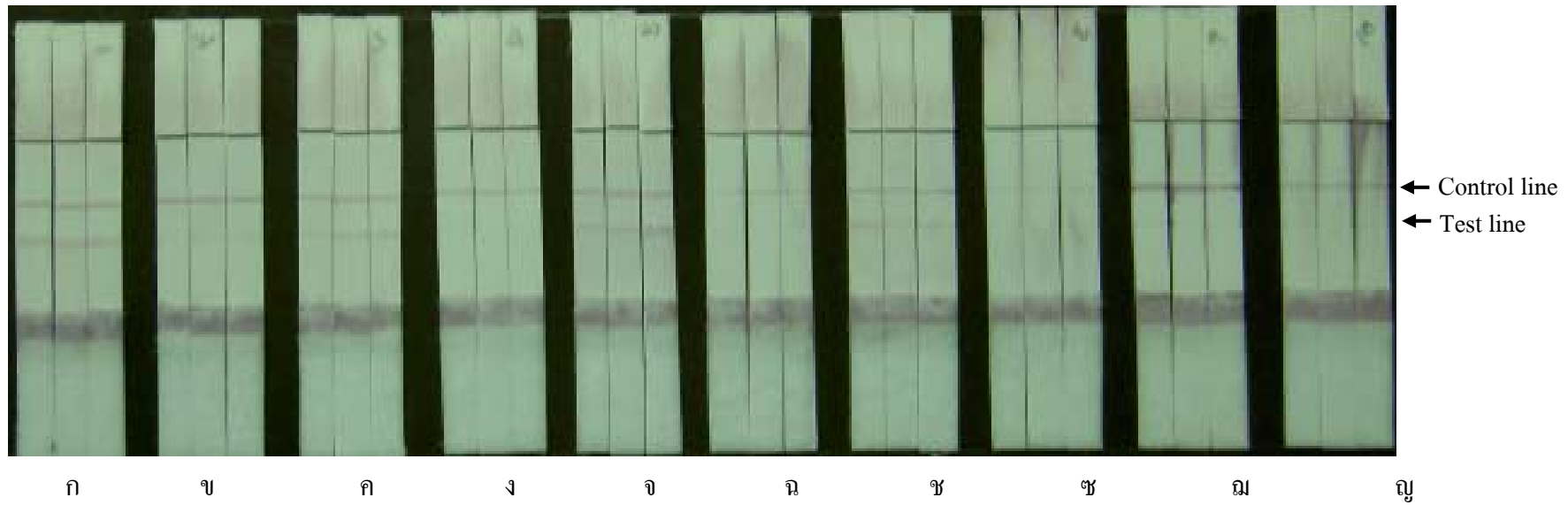
5.4 การศึกษาชนิดของ sample buffer ที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยใช้บัฟเฟอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่า บัฟเฟอร์ทุกชนิดสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line ได้ ยกเว้น DOA extraction buffer 2 แต่เมื่อจุ่มสตริปลงในบัฟเฟอร์ TBS, PBS, PB และ DOA extraction buffer 1 พบปฏิกิริยาแบบ false positive คือ เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line จากการทดลอง พบว่า การเติม Tween 20 ลงในบัฟเฟอร์ 5 ชนิดที่มีปัญหาดังกล่าว จะช่วยลดปฏิกิริยาข้ามได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่า การใช้ BIOREBA extraction buffer ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ Agdia general extraction buffer (ภาพที่ 15)

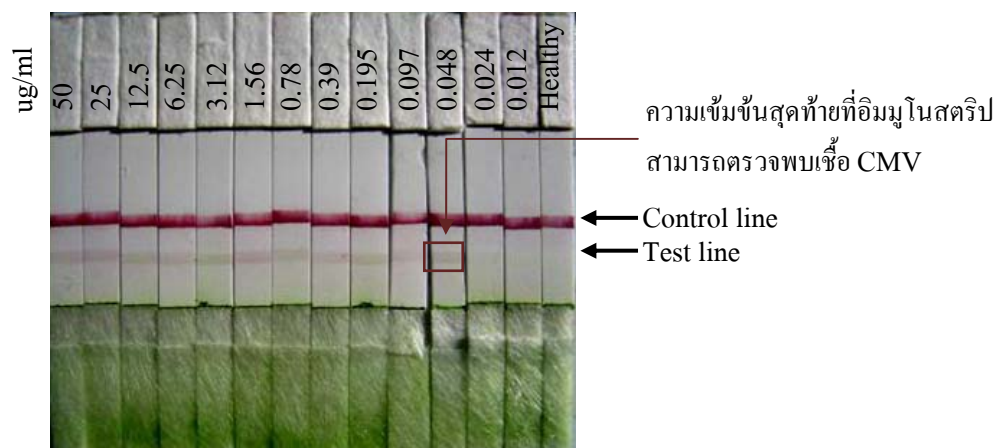
6. การตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่พัฒนาได้

การทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบยาสูบปกติที่เติมเชื้อไวรัสใบด่างแตงบริสุทรีให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50, 25, 12.5, 6.25, ..., 0.012 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำคั้นใบยาสูบปกติและบัฟเฟอร์ เป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบมีความไวที่ระดับ 0.048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นยาสูบปกติและบัฟเฟอร์ ความเข้มสีของ test line ลดลงเมื่อความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสลดลง (ภาพที่ 16) ชุดตรวจสอบสามารถอ่านค่าได้ภายในเวลาเพียง 5-8 นาที ขึ้นกับความเข้มข้นของไวรัส แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาบน test line ยังคงถูกรบกวนด้วยสีเขียวของน้ำคั้นพืช ซึ่งพบว่าเมื่อเติม 1% Triton X-100 จะช่วยลดการรบกวนของสีเขียวได้

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ อิมมูโนสตริป กับวิธี indirect ELISA ในการตรวจเชื้อ CMV โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อไวรัสใบด่างแตงความเข้มข้นต่างๆ คือ 50, 25, 12.5, 6.25, ..., 0.012 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าวิธี indirect ELISA ที่ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวทำปฏิกิริยามี sensitivity ในตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างแตงที่ระดับความเข้มข้น 0.039 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบในเบื้องต้นโดยจุ่มสตริปลงในตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร พบว่าเป็นปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยา เนื่องจากการใช้ปริมาณมากกว่านี้มีผลให้เกิดการย้อนกลับของตัวอย่างได้



ภาพที่ 15 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ เมื่อใช้ sample buffer ที่แตกต่างกัน (ก) TBS, pH 7.4 (ข) TBST, pH 7.4 (ค) PBS, pH 7.4 (ง) PBST, pH 7.4 (จ) PB, pH 7.4 (ฉ) PBT, pH 7.4 (ช) DOA extraction buffer1, pH 7.4 (ซ) DOA extraction buffer2, pH 8.6 (ฅ) BIOREBA extraction buffer, pH 7.4 (ญ) Agdia general extraction buffer, pH 7.4



ภาพที่ 16 การทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป ในการตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างแตง
ในน้ำคั้นใบยาสูบที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50, 25,..., 0.012 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
โดยการเจือจางแบบ 2 เท่า ใช้ตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร

การตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยการตรวจหาเชื้อ CMV ในตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 21 ตัวอย่าง เทียบกับวิธี indirect ELISA พบว่า ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปให้ผลบวกในตัวอย่างที่มีค่า $O.D_{405}$ สูงกว่า 0.366 และให้ผลลบเมื่อค่า $O.D_{405}$ ต่ำกว่า 0.238 ตรวจพบเชื้อ CMV 13 ตัวอย่างจากจำนวน 16 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี indirect-ELISA ไม่พบ false positive ในการตรวจตัวอย่างด้วยวิธีอิมมูโนสตริป (ตารางที่ 8) มีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ CMV เท่ากับ 81.25% เมื่อเทียบกับวิธี indirect ELISA ดังนั้นชุดตรวจสอบนี้จึงเหมาะสำหรับการคัดกรองตัวอย่างก่อนการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป

8. การเตรียมอิมมูโนไลโปโซม

การเชื่อม DOPE กับ sulfo-SMCC cross linker วิเคราะห์ความสำเร็จในการเชื่อมด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) และตรวจดูการเคลื่อนที่บนตัวกลาง silica ด้วยแสง ultraviolet พบว่า PE หลังการเชื่อมด้วย SMCC (SMCC-PE) มีการเคลื่อนที่แตกต่างกับ unmodified PE (ภาพที่ 17) โดยมีค่าความสัมพัทธ์ของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารกับระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้น (R_f) เท่ากับ 0.27 และ 0.96 ตามลำดับ (Hermanson, 1995)

การเตรียมไลโปโซมจากฟอสฟาติดีลโคลีน คอเลสเตอรอล และ SMCC-PE ได้ไลโปโซมที่บรรจุสี SRB (liposome-SRB) จากคอลัมน์ใน fraction แรก ปริมาตรทั้งสิ้น 5 มิลลิลิตร ลักษณะเป็นสารแขวนลอยขุ่นมีสีม่วงอ่อน ในขณะที่ SRB ที่ไม่ถูกบรรจุจะมีสีแดงเหลืองและใส (ภาพที่ 18) การตรวจดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า ไลโปโซมที่บรรจุสี SRB จะเรืองแสงสีแดงเป็นจุดเล็กๆ ภายใต้อาบริความยาวคลื่น 586 นาโนเมตร ในขณะที่ไลโปโซมที่ไม่บรรจุสี ไม่ปรากฏจุดเรืองแสงให้เห็น (ภาพที่ 19) ไลโปโซมที่เตรียมได้มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 256 นาโนเมตร (ภาพที่ 20)

การติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยหมู่ sulfhydryl group (MAb-SH) แล้วตรวจความเข้มข้นของแอนติบอดีที่พ่วงกับ SH โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่า MAb-SH มีความเข้มข้น 6.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งสิ้น 4.2 มิลลิลิตร จากแอนติบอดีความเข้มข้นเริ่มต้น 9.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ประเมินปริมาณ sulfhydryl group ด้วยวิธี Ellman's assay พบว่า มี free sulfhydryl group ความเข้มข้น 0.224 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจหาเชื้อไวรัส
ใบด่างแดงในตัวอย่างมะเขือเทศ เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่าง มะเขือเทศ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร	วิธีการตรวจสอบ	
		Indirect ELISA ^{/1}	อิมมูโนสตริป
1	0.096	-	-
2	1.460	+++ ^{/2}	+++ ^{/3}
3	0.916	++	++
4	0.096	-	-
5	0.231	+	-
6	0.238	+	-
7	0.106	-	-
8	0.565	++	+/-
9	0.722	++	+
10	0.756	++	+
11	0.457	+	+/-
12	0.228	+	-
13	0.548	++	+
14	1.112	+++	+++
15	1.024	+++	++
16	0.098	-	-
17	0.916	++	+
18	1.253	+++	++
19	1.053	+++	++
20	0.185	-	-
21	0.366	+	+/-
22	0.137	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

^{/1} negative control คือมะเขือเทศปกติทำปฏิกิริยากับ MAb-CMV ซึ่งได้ค่า $O.D_{405} = 0.093$

^{/2} การตรวจสอบที่ให้ผลบวกในวิธี indirect ELISA แบ่งเป็น 3 ระดับได้แก่

(+) ค่า $O.D_{405}$ ต่ำกว่า 0.5

(++) ค่า $O.D_{405}$ ตั้งแต่ 0.5 - 1.0

(+++) ค่า $O.D_{405}$ ตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป

^{/3} การตรวจสอบที่ให้ผลบวกในวิธีอิมมูโนสตริปแบ่งเป็น 4 ระดับได้แก่

(+/-) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ไม่ชัดเจน

(+) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจน

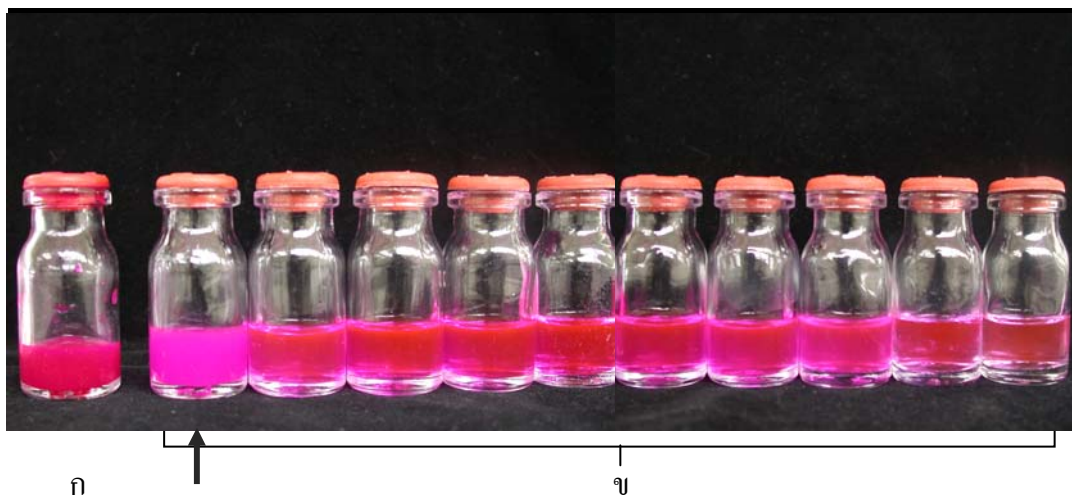
(++) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจนดี

(+++) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจนดีมาก

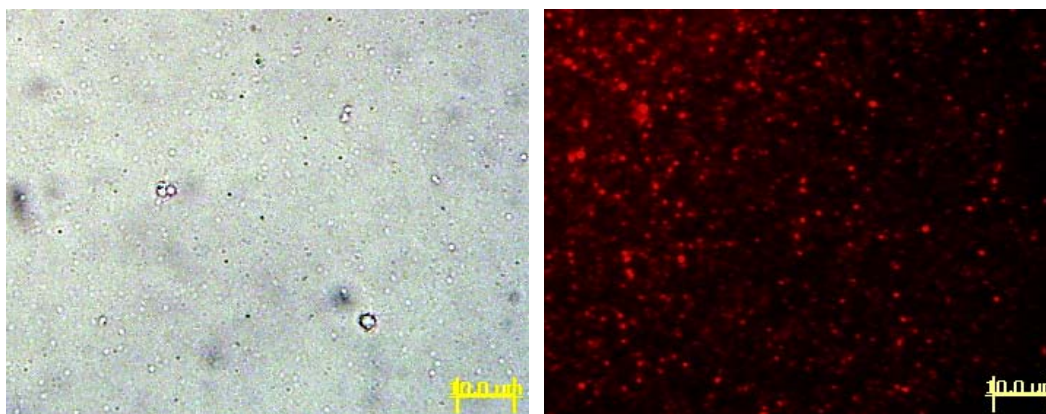
การเตรียม immunoliposome โดยเชื่อม MAb-CMV โดยเชื่อม MAb-SH กับ liposome-SRB และตรวจสอบการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค DIBA พบว่าอิมมูโนไลโปโซมที่เตรียมได้สามารถทำปฏิกิริยากับ CMV-CP เชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์และ RAM ได้โดยไม่มีปฏิกิริยากับ PBS ซึ่งใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติไม่ชัดเจน เนื่องจากสีเขียวของน้ำคั้นพืชบดบังทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างของปฏิกิริยาได้ (ภาพที่ 21)



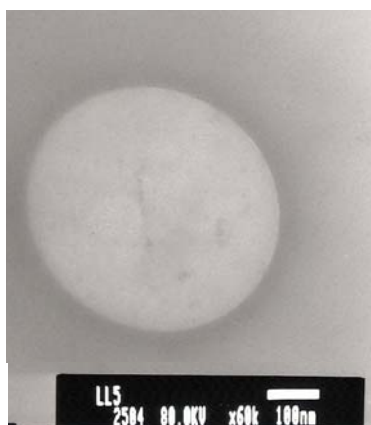
ภาพที่ 17 ผลการเคลื่อนที่บนตัวกลางของฟอสฟาติดิลเอธานอลามีน (PE) ก่อนและหลังการเชื่อมด้วย sulfo-SMCC cross linker (SMCC-PE) โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography



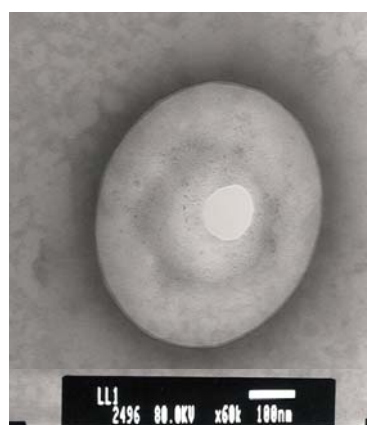
ภาพที่ 18 การแยกไลโปโซมที่บรรจุสี SRB โดยใช้ Sephadex G50-300 gel filtration column เปรียบเทียบสีของไลโปโซม (ก)ก่อนการผ่านคอลัมน์ซึ่งมีสีแดงขุ่น และ(ข) หลังการผ่านคอลัมน์ ได้ไลโปโซมที่บรรจุสี SRB มีลักษณะเป็นสีชมพูขุ่นใน fraction แรก (ลูกศรชี้) ในขณะที่ fraction อื่นๆ เป็นสีแดงใสของ sulforhodamine B ที่ไม่ถูกบรรจุในอนุภาคไลโปโซม



ภาพที่ 19 อิมมูโนไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 100 เท่า โดยไลโปโซมที่บรรจุสี sulforhodamine Bเรืองแสงสีแดงเป็นจุดเล็กๆ ภายได้ความยาวคลื่น 586 นาโนเมตร



ก



ข

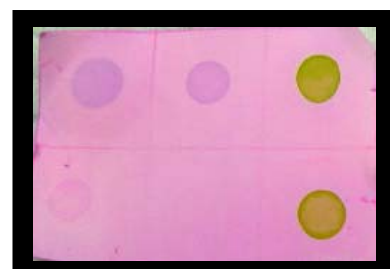
ภาพที่ 20 การตรวจดูไลโปโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบ
ไลโปโซมที่ไม่บรรจุสี (ก) และบรรจุสี SRB (ข)

CMV-CP	P	D
RAM	PBS	H

ก



ข



ค

ภาพที่ 21 การตรวจสอบปฏิกิริยาของไลโปโซมก่อนและหลังการเชื่อม MAb-CMV กับแอนติเจน
ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี DIBA

(ก) แผนผังการทดลอง กำหนดให้

CMV-CP	recombinant coat protein ของเชื้อไวรัสใบด่างแดง
P	เชื้อไวรัสใบด่างแดงบริสุทธิ์
D	ใบยาสูบเป็นโรค
RAM	แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูเมาส์
PBS	phosphate buffer saline
H	ใบยาสูบปกติ

(ข) ผลการทำปฏิกิริยาของอนุภาคทองก่อนการเชื่อม MAb-CMV

(ค) ผลการทำปฏิกิริยาของอนุภาคทองหลังการเชื่อม MAb-CMV จุดสีชมพูแสดงผลการ
ตรวจที่ให้ผลเป็นบวก

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1 การเตรียมแอนติเจนโดยการแยกเชื้อไวรัสใบด่างแดงจากต้นยาสูบได้ไวรัสบริสุทธิ์ 9.779 มิลลิกรัม จากใบยาสูบ 100 กรัม มีค่า $O.D._{260}/O.D._{280}$ เท่ากับ 1.58 การตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 27 กิโลดาลตัน

1.2 การเตรียมแอนติเจนโดยสกัดโปรตีน CMV-CP จาก recombinant plasmid pQE80L-CMV-CP ได้โปรตีนความเข้มข้น 2.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 34.83 มิลลิกรัม พบแถบโปรตีนความเข้มข้นสูง ขนาด 27 กิโลดาลตันตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE

2. การผลิตแอนติบอดี

2.1 การผลิต MAbs-CMV จากไฮบริโดมา โคลน CM2 โดยการเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเซลล์ แยก IgG บริสุทธิ์โดยใช้ recProtein G-Sepharose 4B conjugate column chromatography ได้อิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ 4 fraction คือ eluate fraction ที่ 2-5 ความเข้มข้น 1.52, 1.71, 0.6 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 32,768; 32,768; 16,382 และ 4,096 ตามลำดับ นำ fraction ที่ 2 และ 3 มาใช้ในกระบวนการผลิตอิมมูโนสตริป

2.2 การผลิต PAb-CMV โดยใช้เชื้อ CMV บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน พบว่ามีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ แต่หลังการทำ cross absorption สามารถลดปฏิกิริยาข้ามได้ มีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,600 – 25,600 การแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ recProtein A-Sepharose 4B conjugate column chromatography ได้ IgG ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 12.6 มิลลิกรัมจากแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร

2.3 การผลิต RAM โดยใช้ mouse IgG มีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000-128,000 สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 subclass ของ Ig คือ IgG1 และ IgG2a การแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ได้แอนติบอดีความเข้มข้น 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนทั้งสิ้น 14.3 มิลลิกรัม จากแอนติซีรัม 5 มิลลิลิตร

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีด้วยเทคนิค TAS-ELISA เพื่อศึกษาชนิดของ coating antibody ที่เหมาะสม พบว่า การเคลือบ ELISA plate ด้วย PAb ให้ผลดีกว่า MAbs และไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ และได้นำรูปแบบของปฏิกิริยานี้ไปใช้ในการผลิตอิมมูโนสตริป

4. การเตรียมแอนติบอดีที่พ่วงกับอนุภาคทอง พบว่าควรใช้อัตราส่วนระหว่าง MAbs-CMV ต่อสารแขวนลอยอนุภาคทอง (MAb conjugate) เท่ากับ 3:50 ละลาย MAb conjugate ด้วย storage buffer ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น เมื่อนำแอนติบอดีที่พ่วงกับอนุภาคทองไปทำปฏิกิริยา DIBA พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV บริสุทธิ์ CMV-CP น้ำคั้นพืชเป็นโรค และ RAM โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับบัพเฟอร์และน้ำคั้นพืชปกติ

5. การเตรียมชุดตรวจสอบใช้ MAb conjugate ฟันลงบน CRP จนอิมมูโนดีฟน์ test line และ control line ด้วย PAb-CMV และ RAM ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การประกอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปโดยใช้ 33 glass fiber เป็น sample absorbion pad (SAP) และ conjugate release pad (CRP), 470 cotton linter เป็น wicking pad (WP) และใช้ Prima40 nitrocellulose membrane เป็น analyte membrane ในการประกอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป sample buffer ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในชุดตรวจสอบคือ BIOREBA general extraction buffer ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ CMV ในน้ำคั้นใบยาสูบที่ความเข้มข้น 48 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบพืชปกติและบัพเฟอร์

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจหาเชื้อ CMV ในตัวอย่างมะเขือเทศพบว่า อิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อ CMV ให้ผลบวกในตัวอย่างที่มีค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 0.366 มีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ 81.25% เทียบกับวิธี ELISA โดยไม่มี false positive กับน้ำคั้นพืชปกติ

7. การศึกษาการเตรียมอิมมูโนไลโปโซมคัดแปลงจากวิธีการของ Hermanson (1995) และ Park and Durst (2000) โดยเตรียมจากเลซิดิน คอเรสเตอรอล และ SMCC-PE บรรจุที่ sulforhodamine B อยู่ภายในอนุภาค แยกอิมมูโนไลโปโซมโดยใช้ Sephadex G50-300 พบว่าได้ liposome ใน fraction แรก มีขนาดเฉลี่ย 256 นาโนเมตร และสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV บริสุทธิ์ CMV-CP และ RAM ได้โดยใช้วิธี DIBA

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ธีระ ฤตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วน
จำกัด ฟีนีฟับลิชชิง, กรุงเทพฯ. 309 หน้า.
- ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์. 2547. ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซิน. สำนักงานพัฒนา
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ. 10400.
13 หน้า
- มณีนันท์ คูหาพิทักษ์ธรรม. 2547. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 80 หน้า.
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. การ
ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสพืชเพื่อใช้เอง GLIFT kit. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 50 หน้า.
- Aitken, A. and M. Learmonth. Estimation of disulfide bonds using ELLman's reagent, pp. 595-
596. In Walker, J.M., ed. **The protein protocols handbook**. Humana Press, Totowa,
New Jersey.
- Alfonta, L., Singh, A. K. And I. Willner. 2001. Liposomes labeled with biotin and horseradish
peroxidase: a probe for the enhanced amplification of antigen-antibody or
oligonucleotide-DNA sensing processes by the precipitation of an insoluble product on
electrodes. **Anal. Chem.** 73: 91-102.
- Anne, H.P. and F. P. Jr. Leonard. 2003. Immunological methods for detection and identification
of infectious disease and biological warfare agents. **Clinical and Diagnostic
Laboratory Immunology** 10 (4): 506-513.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. and S.C. Watkins. 1965. Diffusion of univalent ion across the
lamella of swollen phospholipid. **J. Mol. Biol.** 13: 238-252.

- Bernhard, V.L., Haynes, L.C., Levine, H., Otterburn, M.S., Mathewson, P. and J. Finley. 1991. **Extrusion Baking of Cookies Having Liposome Encapsulated Ingredients**. US patent 4999208.
- Borque, L., Olivan, V. and F. Iguaz. 1995. Development and validation of an automated particle enhanced nephelometric immunoassay method for the measurement of human plasma C1Q. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 9: 302-307.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitivity method of measuring microorganism quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. **Anal. Biochem.** 72: 248-264.
- Brandl, M.M., Bachmann, D., Drechsler, M. and K.H. Bauer. 1993. Liposome preparation using high-pressure homogenizer, pp. 49-63. *In* Gregoriadis, G., ed. **Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques**. 2nd ed., CRC. Press, London.
- Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson. 1996. **Viruses of plants: Description and list from the VIDE database**. Wallingford, Oxon: CAB International. 1484 pp.
- Buddhirakkul, N., K. Balachandra, P. Pumthong, S. Chaelermntaranukul and P. Sawanpanyalert. 2004. Development of a simple strip test for the detection of Hepatitis B surface antigen. **Thai J. Health Res.** 18 (1): 40-47.
- Buhrer-Sekula, S., Smits, H.L., Gussenhoven, G.C., Leeuwen, J.V., Amador, S., Fujiwara, T., Klatser, P.R. and L. Oskam. 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology** 41 (5): 1991-1995.
- Cazacu, A.C., Greer, J., Taherivand, M. and G.J. Demmler. 2003. Comparison of Lateral-Flow Immunoassay and Enzyme Immunoassay with Viral Culture for Rapid Detection of

- Influenza Virus in Nasal Wash Specimens from Children. **Journal of Clinical Microbiology** 41 (5): 2132-2134.
- Chantasart, D. 1996. Physicochemical properties of tetracaine liposomes prepared by CHCl_3 film method. M.Sc. **Thesis**, Mahidol University, Bangkok.
- 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.
- Gallitelli, D. 2000. The ecology of *cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. **Virus Res.** 71: 9-21.
- Garland, D.L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophylline with the Abbott TDX and high pressure liquid chromatography methods. **Clinical Chemistry** 32: 1104.
- Gomez-Hens, A. and J.M. Fernandez-Romero. 2005. The role of liposomes in analytical processes. **Trends in Analytical Chemistry** 24 (1): 9-19.
- Greenwald, R., J. Esfandiari, S. Lesellier, R.Houghton, J. Pollock, C. Aagaard, P. Andersen, R.G. Hewinson, M. Chamber and K. Lyashchenko. 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badger (*Meles meles*) using multiantigen test formats. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 46: 197-203.
- Hermanson, G. T. 1995. **Bioconjugate techniques**. Academic Press. Inc., San Diego, California. 785 pp.
- Ho, Ja-an. A., Hsu, H.-W. and M. R. Huang. 2004. Liposome-based micropipillary immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157: H7. **Analytical Biochemistry** 330: 342-349.

- Hochleitner, K. and H. Kraus. 2002. Rapid assay formats, components and materials. pp. 10-45. *In* Awiruttakarn C., ed. **Introductory workshop on rapid diagnostic tests**. Biogenomed co.ltd., Bangkok.
- Johann, H.P. and H. Baumgarten. 1992. **Monoclonal antibodies**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 488 pp.
- Kearney, C.M., T.A. Zitter and D. Gonsalves. 1990. A field survey for serogroup and satellite RNA of *cucumber mosaic virus*. **Phytopathology** 80: 1238-1243.
- Kirby, C.J. and G. Gregoriadis. 1984. A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild condition, pp. 19-27. *In* Gregoriadis G., ed. **Liposome Technology: Preparation of Liposomes**. 4th ed., Press, Florida.
- Kubotsu, K., S. Goto, M. Fujita, H. Tuchiya, M. Kida, S. Takano, S. Matsuura and I. Sakurabayashi. 1992. Automated homogeneous liposome immunoassay system for anticonvulsant drugs. **Clin. Chem.** 38 (6): 808-812.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Liang, R., F. Zhuang, Z. Meng, M. Deng, C. Zheng and M. Duan. 2003. A new potent route of DNA vaccine inoculation: DNA-liposome complexes on bare skin induce antigen-special antibody responses. **Molecules** 8: 120-126.
- Montasser, M.S., M. E. Tousignant and J. M. Kaper. 1991. Viral Satellite RNAs for the prevention of *cucumber mosaic virus* (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. **Plant Dis.** 82: 1298-1303.

- Mossop, D.W., R. Francki and C.J. Grivell. 1976. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses V. Purification and properties of a cucumber mosaic virus inducing severe chlorosis. **Virology** 74: 544-546.
- Paek, S.H., S.H. Lee, J.H. Cho and Y.S. Kim. 2000. Development of rapid one step immunochromatographic assay. **Method** 22: 53-60
- Park, S. and R.A. Durst. 2000. Immunoliposome sandwich assay for the detection of *Escherichia* O157:H7. **Analytical Biochemistry** 280: 151-158.
- Philippot, J.R. and F. Schuber. 1995. **Liposome as tools in basic research and industry**. CRC Press, Inc. London. 277 pp.
- Picon, A., P. Gaya, M. Medina and M. Nurez. 1994. The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. **J. Dairy Sci.** 77: 16-23.
- Ramandeep, K., K.L. Dikshit and M. Raje. 2002. Optimization of immunogold labeling TEM: an ELISA-based method for evaluation of blocking agents for quantitative detection of antigen. **J. Histochem. Cytochem.** 50(6): 863-873.
- Roberts, M.A. and R.A. Durst. 1995. Investigation of liposome-based immunomigration sensors for the detection of polychlorinated biphenyls. **Anal. Chem.** 67: 482-491.
- Rodriguez-Alvarado, G., S. Fernandez-Pavia, R. Creamer and C. Liddell. 2002. Pepper mottle virus causing disease in Chile peppers in Southern New Mexico. **Plant Dis.** 86(8): 603-605.
- Ronald, A. and W.H. Stimson. 1998. The evolution of immunoassay technology. **Parasitology** 117: 13-27.

- Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. **Mol. Plant Pathol.** 2(2): 59-63.
- _____. 2002. Evolution history of *cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. **J. Virol.** 76: 3382-3387.
- Ruysschaert, T., Germain, M., Pereira de Silva Gomes, J.F., Fournier, D., Sukhorukov, G.B., Meier, W. and M. Winterhalter. 2004. Liposome-Based Nanocapsules. **IEEE Transactions on Nanobioscience** 3 (1): 49-55.
- Salomone, A. and P. Roggero. 2002. Host range seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino Mosaic Virus*. **J. Plant Pathol.** 84 (1): 65-68.
- Sambrook J. and W.R. David. 2001. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Singh, A.K., Harrison, S.H. and J.S. Schoeniger. 2000. Gangliosides as receptors for biological toxins: development of sensitivity fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. **Anal. Chem.** 72: 6019-6024.
- Singh, Z., R.A.C. Jones. and M.G.K. Jones. 1995. Identification of *cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. **Plant Dis** 79: 713-716.
- Smits, H.L., C.K. Eapen, S. Sugathan, M. Kuriakose, M.H. Gasem, C. Yersin, D. Sasaki, B. Pujianto, M. Vestering, T.H. Abdoel and C.G. George. 2001. Lateral-Flow Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 8 (1):166-171.
- Stephen, A.F. and A.B. Rebecca. 2004. *Cucumber mosaic virus crop knowledge*. Available Source: <http://extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/cucvir.htm>, May 5, 2004.

- Stimson, W. and J.M. Sinclair. 1974. An immunoassay for a pregnancy associated α -macroglobulin using antibody enzyme conjugates. **FEBS Letters** 47: 190-192.
- Tsukagoshi, K., H. Akasaka, Y. Okumura, R. Fukaya, M. Otsuka, K. Fujiwara, H. Umehara, R. Maeda And R. Nakajima. 2000. Immunoassay using chemiluminescence detection of dyestuff-containing liposomes as a labeling reagent. **Anal.Sci.** 16: 121-124.
- Tungjairukkandee, S. 1993. Physicochemical properties of liposomal amphotericin B prepared by CHCl_3 film method. M.Sc. **Thesis**, Mahidol University., Bankok.
- Van Weeman, B.K. and A.H.W.M. Schuurs. 1971. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. **FEBS Letters** 15: 232-235.
- Varveri, C. and K. Boutsika. 1999. Characterization of *cucumber mosaic cucumovirus* isolates in Greece. **Plant Pathol.** 48: 95-100.
- Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature** 184: 1648-1649.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

30% Acrylamide solution

Acrylamide	30	กรัม
Bis-acrylamide	0.80	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร		

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

Tris-base	45.50	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร		

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

Tris-base	30.30	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร		

2x sample buffer

100 mM Tris-HCl; pH 6.8
 2% SDS
 10% glycerol
 5% β -mercaptoethanol
 0.02% bromophenol blue

10x Tris–glycine electrophoresis buffer, pH 8.3

Tris-base	30	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Staining solution

Coomassie–blue R–250	0.25	กรัม
Methanol	45	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร

กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman #1) เก็บในขวดทึบแสง

Destain solution

Methanol	250	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

Separating gel (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.3	มิลลิลิตร
30% Acrylamide solution	4	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

6% Stacking gel (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่น	3.4	มิลลิลิตร
30% Acrylamide solution	0.83	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	0.65	มิลลิลิตร
10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในเทคนิค Western blotting (Liddell and Cryer, 1991)**Tris buffer saline (TBS), pH 7.4**

Tris-base	6.05	กรัม
NaCl	8.76	กรัม
NaN ₃	0.10	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร สามารถเตรียมเป็นความเข้มข้น 10xTBS และ autoclave ได้

Blocking buffer (TBS-BSA)

TBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	1	กรัม

Washing buffer (TBST)

TBS	100	มิลลิลิตร
Tween-20	0.05	มิลลิลิตร

Transfer buffer

25 mM Tris-HCl; pH 8.0

150 mM glycine

0.02% SDS หรือ 20% methanol

Reaction mixed substrate สำหรับ Western blotting (ZYMED)

น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร
Nitro blue tetrazolium salt (NBT)	1	มิลลิลิตร
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)	1	มิลลิลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในเทคนิคทาง indirect ELISA (Clark and Adams, 1977)

Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Carbonate coating buffer; pH 9.6

NaHCO ₃	2.93	กรัม
Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Blocking buffer (2% skim milk)

PBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	2	กรัม

Washing buffer (PBST)

PBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

Substrate buffer; pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด

การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์**Washing buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0)**

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	3.27	กรัม
NaH ₂ PO ₄	0.94	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Elution buffer (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7)

Glycine-HCl	11.1	กรัม
-------------	------	------

น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ปรับ pH ให้ได้ 2.7 ด้วย NaOH หรือ HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

Cleaning column buffer (1 M Acetic acid, pH 2.8)

Glacial acetic acid	57.2	มิลลิลิตร
---------------------	------	-----------

น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ปรับ pH ให้ได้ 2.8 ด้วย NaOH หรือ HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

Neutralizing buffer (2 M Tris, pH 8.0)

Tris-base	24.228	กรัม
-----------	--------	------

น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

Storage column buffer (100 mM PBS, pH 7.4, with 0.01% Proclin)

KH_2PO_4	2.6	กรัม
--------------------------	-----	------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21.7	กรัม
---	------	------

NaCl	8.77	กรัม
------	------	------

Proclin	1	มิลลิลิตร
---------	---	-----------

น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640 (GIBCO)	20	กรัม
NaHCO ₃	2	กรัม
1,000x Penicillin	1	มิลลิลิตร
1,000x Streptomycin	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ Complete medium (CM)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	445	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (GIBCO)	50	มิลลิลิตร
100x 2-Mercaptonethanol	2.5	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

1,000x Penicillin

Penicillin	1,000,000	unit
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (Syringe filter) ขนาด 0.2 ไมครอน แบ่งเก็บใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (ความเข้มข้นของ Penicillin ที่ใช้เท่ากับ 100 U/มิลลิลิตร)

1,000x Streptomycin

Streptomycin	7.7	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	10	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (Syringe filter) ขนาด 0.2 ไมครอน แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (ความเข้มข้นของ Streptomycin ที่ใช้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

100x 2-Mercaptonethanol

2-Mercaptonethanol	70	ไมโครลิตร
10x PBS	100	ไมโครลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

PBS

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.256	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.248	กรัม
NaCl	8.766	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

อาหาร LB

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และนำไป autoclave ที่ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียมบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ
ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

PBST

PBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

Tris buffer saline (TBS), pH 7.4

Trisma-base	6.05	กรัม
NaCl	8.76	กรัม
NaN ₃	0.10	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร สามารถเตรียมเป็นความเข้มข้น 10xTBS และ autoclave ได้

TBST

TBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

DOA1 Extraction buffer, pH 7.5

0.02M Tris base
0.2M NaCl
0.4% Na₂SO₃

DOA2 Extraction buffer, pH 8.6

Na ₂ BO ₃	38.1	กรัม
Triton X 100	10	มิลลิลิตร
PVP	10	กรัม
SDS	3	กรัม
NaSO ₃	4	กรัม

General extract buffer (Agdia)

Sodium sulfite (anhydrous)	1.3	กรัม
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0	กรัม
Sodium azide	0.2	กรัม
Powdered egg (chicken) albumin	2.0	กรัม
Tween-20	20.0	กรัม
PBST	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

Extraction buffer (BIOREBA)

Tris-(hydroxymethyl)aminomethane	2.40	กรัม
NaCl	8.00	กรัม
PVP (MW 24000)	20.0	กรัม
Tween 20	0.50	กรัม
KCl	0.20	กรัม
NaN ₃	0.20	กรัม
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศรียรรษา มลิจารย์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 20 มกราคม 2527
สถานที่เกิด	ปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) (เกียรตินิยม อันดับ 1) ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน - พ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- พ.ศ. 2548-2550 ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยใน โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. - พ.ศ. 2548-2551 ได้รับทุนการศึกษาและวิจัยจากศูนย์ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน