



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

.....
ปริญญา

.....
โรคพืช

.....
สาขา

.....
โรคพืช

.....
ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม

Development of Immunochromatographic Technique for Detection of
Citrus tristeza virus (CTV) in Rutaceae

نامผู้วิจัย นางสาวยุพา โพธิ์แก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์คณินันต์ย์ เจริญวรากร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(..... รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV)
ในพืชตระกูลส้ม

Development of Immunochromatographic Technique for Detection of
Citrus tristeza virus (CTV) in Rutaceae

โดย

นางสาวยุพา โพธิ์แก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2556

ยุพา โพธิ์แก้ว 2556: การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์คณินันต์ย์ เจริญวรารากร, Ph.D. 127 หน้า

โรคทริสตาไวรัสเกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) เป็นเชื้อที่เข้าทำลายพืชตระกูลส้มทั่วโลก และทำให้ผลผลิตล้มลง งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสำรวจเชื้อ CTV จากแปลงปลูกส้มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดต่างๆ จำนวน 10 จังหวัด นำมาเพิ่มปริมาณอินโพรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ด้วยวิธี RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ และอิน *p23* ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 239 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งออกแบบสำหรับการใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนของอินโพรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV ที่เป็นตัวแทน 19 ไอโซเลต กับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ระดับ 89-100 % และ 94-100 % ตามลำดับ จากการทดลองในครั้งนี้จากการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล พบว่าเชื้อ CTV ที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อสายพันธุ์รุนแรง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ CTV นำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค Triple Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (TAS-ELISA) พบว่าให้ค่า OD₄₀₅ เท่ากับ 1.320 ถึง 3.299 ในพืชเป็นโรคและในพืชปกติให้ค่า OD₄₀₅ น้อยกว่า 0.2 เมื่อทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ CTV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และไวรัสชนิดอื่นที่นำมาตรวจสอบ และเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่ผลิตทางการค้าพบว่าให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CTV อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วในพืชตระกูลส้ม โดยตกตะกอนโพลีโคลนอลแอนติบอดีจาก anti-CTV RIgG และ anti-CTV ChIgY ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต นำ anti-CTV RIgG ไปพ่วงกับอนุภาคทองและเคลือบบน conjugate release pad (CRP) เส้น test line และ control line เคลือบด้วย anti-CTV ChIgY และ goat anti-rabbit IgG ตามลำดับ ทดสอบชนิดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและชนิดของบัฟเฟอร์ พบว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 ปรากฏเส้นคมชัดสม่ำเสมอภายในระยะเวลา 90 วินาที และพบว่าการใช้บัฟเฟอร์ Na₂BO₃ ในการทำปฏิกิริยาให้เส้น control line ที่คมชัดสม่ำเสมอและไม่ทำปฏิกิริยากับเส้น test line การทดสอบความไวในน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ CTV โดยเจือจาง 1:2 ถึง 1: 64 พบว่าสามารถตรวจสอบน้ำคั้นพืชเป็นโรคได้จนถึงที่ระดับความเจือจาง 1:32 และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ ส่วนการตรวจสอบความจำเพาะของอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น พบว่าไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาตรวจสอบ

Yupa Phokaew 2013: Development of Immunochromatographic Technique for Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Rutaceae. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kanungrit Reanwarakorn, Ph.D. 127 pages.

Tristeza virus disease caused by *Citrus tristeza virus* (CTV) which is one of the most important citrus disease worldwide, causing yield loss on citrus plants. This work was CTV survey of citrus orchards in 10 provinces. By reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), CTV coat protein (CP) gene was amplified of 700 nucleotides in size. And by multiplex RT-PCR, CTV *p23* gene was amplified of 400 and 239 nucleotides in size. These both sizes were designed for detection of CTV severe and mild strains, respectively. Comparison of nucleotides and amino acid sequences of 19 CTV Thai isolates and CTV isolates from GenBank database, they were displayed 89-100% and 94-100% similarity, respectively. Base on this work, CTV Thai isolates were severe strains by molecular analysis.

Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of CTV in rabbit and chicken eggs. Then, development of detection method was performed with Triple Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (TAS-ELISA). The TAS-ELISA were shown at OD 405 between 1.320-3.299 in disease samples and less than 0.2 in healthy samples. By TAS-ELISA, these polyclonal antibodies were specifically to CTV, but they did not react with healthy plant sap and other tested viruses. To compare with the commercial detection kit, the results were no significance.

Immunochromatographic assay was developed for efficient and quick detection of CTV. Anti-CTV RIgG and anti-CTV ChIgY were prepared by ammonium sulfate precipitation from polyclonal antibody, Anti-CTV RIgG conjugated with colloidal gold particle and immobilized on a conjugate release pad (CRD). A test line and control line were coated with anti-CTV ChIgY and goat anti-rabbit IgG, respectively. Nitrocellulose membrane and buffer tests were found the Prima40 nitrocellulose membrane giving better reaction line which was clearly visualized within 90 seconds and Na₂BO₃ buffer displayed better reaction with control line, clearly visualization, but did not react with test line. Sensitivity test was performed with disease citrus sap at 1:2 to 1:64 dilution, the immunochromatographic strip showed the sensitivity at 1:32 and no cross reaction to healthy sap. Specificity test of the immunochromatographic strip was shown no reaction with other tested viruses.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณินนิตย์ เจริญวรกร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คู่มือ และให้คำปรึกษาในการเรียนการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่งตลอดมา และกราบขอบพระคุณ ดร.สุจินต์ ภัทรภูวคล ประธานการสอบ และ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ และสำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ สุภาพร กลั่นคง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิ สงประยูร ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีในการทำการทดลอง และขอขอบพระคุณคุณสรชัย จันทะจร ที่ให้คำปรึกษาชี้แนะและให้การช่วยเหลือตลอดการทดลองจนประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันทรงคุณค่าแก่ข้าพเจ้า จนกระทั่งประสบความสำเร็จในการศึกษา และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่ให้ตัวอย่างพืชมาใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ให้ทุนสนับสนุน และอำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงาน ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ห้อง A410 และห้องปฏิบัติการชีวรมวิทยา ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ซึ่งมีส่วนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดามารดาผู้มีพระคุณสูงสุด คุณตา คุณยาย พี่สาว และคุณณรงฤทธิ์ สมบูรณ์ และคณาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ทุกๆ ท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ยุพา โพธิ์แก้ว
กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	53
สรุปและข้อเสนอแนะ	103
สรุป	103
ข้อเสนอแนะ	107
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	108
ภาคผนวก	120
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	127

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจแยกตามจังหวัดและชนิดของพันธุ์ส้ม	20
2 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ CTV จากตัวอย่างพืชตระกูลส้มในประเทศไทย	59
3 ตัวอย่างเชื้อ CTV จำนวน 19 ไอโซเลต ที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในประเทศไทยและข้อมูลเชื้อ CTV ในต่างประเทศที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank	63
4 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีด CTV-CP ให้กับกระต่ายพันธุ์ New Zealand White โดยทำการเก็บแอนติซีรัม จำนวน 8 สัปดาห์ และตรวจสอบไตเตอร์ด้วยเทคนิค indirect PTA -ELISA	79
5 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดโปรตีนสายผสม CTV-CP ให้กับไก่ไข่พันธุ์ Hisex โดยทำการเก็บแอนติซีรัม จำนวน 8 สัปดาห์ และตรวจสอบไตเตอร์ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA	79
6 แสดงค่าความเจือจางของแอนติซีรัม RIgG ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติที่ระดับความเจือจางต่างๆด้วยวิธี indirect PAT-ELISA	83
7 แสดงค่าความเจือจางของแอนติซีรัม ChIgY ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติที่ระดับความเจือจางต่างๆ ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA	84
8 ผลการเปรียบเทียบการใช้ ChIgY และ RIgG ในการเคลือบ plate ด้วยวิธี TAS-ELISA	85
9 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เปรียบเทียบกับพืชปกติด้วยวิธี TAS- ELISA	86
10 ผลจากการตรวจสอบเชื้อ CTV ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะนาวด้วยวิธี TAS-ELISA	87
11 การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein (rCP) ของเชื้อ CTV กับแอนติซีรัมที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค TAS-ELISA	88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาบน control line และ test line ในชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	95
13	แสดงผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	101
14	การเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปในการตรวจหาเชื้อ CTV เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี TAS-ELISA	102

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างและองค์ประกอบของเชื้อ CTV	6
2	แสดงความแปรปรวนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>p23</i> ในส่วนของ RNA-binding domain และแสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR (Sambade <i>et al.</i> , 2003)	9
3	แสดงเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิด Double Antibody Sandwich Assay	18
4	แสดงพื้นที่ (★) ที่ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสหัดเข้าในประเทศไทย	21
5	แสดงรายละเอียดของ pGEM®-T Easy Vector (Promega)	29
6	แสดงรายละเอียดของ pQE-80L expression vector (Qiagen)	34
7	ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	49
8	ลักษณะอาการของเชื้อ CTV ที่พบบนมะนาวที่ในประเทศไทย	54
9	ลักษณะอาการของเชื้อ CTV ที่เกิดบนพืชตระกูลส้ม	54
10	แถบดีเอ็นเอของเชื้อ CTV จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน <i>p23</i> ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis	57
11	แถบดีเอ็นเอของเชื้อ CTV จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ด้วยเทคนิค RT-PCR มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ลูกศรชี้) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis	58
12	ลำดับกรดอะมิโนของ coat protein gene มีขนาด 223 เรซิดิวส์	61
13	แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV ในประเทศไทย (●) เปรียบเทียบกับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (▲) และเปรียบเทียบเชื้อมากสกุส (BYV) โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขเหนือเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 1,000 ครั้ง	65
14	แสดงแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จากการสังเคราะห์ยีน CTV-CP adapter ของเชื้อ CTV ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CPA/CPB	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แสดงแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จากการตรวจสอบโคลน <i>E. coli</i> DH5 α ที่ได้รับการถ่ายยีน CTV-CP adapter ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CPA/ CPB	67
16	แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ ของยีน CTV-CP adapter จากการตัด ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III (double digestion)	69
17	การตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ จากเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 α ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector และคัดเลือกบนอาหาร LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และให้ผลบวกทุกโคลน คือโคลนที่ 3-16	70
18	แสดงกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนลูกผสมที่เกิดจาก pQE80L expression vector จะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่ได้มีขนาดที่ยาวขึ้นเล็กน้อยโดยมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 12 เรซิดิวส์ ทางด้าน N-terminus ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งได้มาจาก vector	71
19	การวิเคราะห์ CTV-CP เกี่ยวกับคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ProtScale	72
20	วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 α ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน	74
21	การสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin ด้วยวิธี affinity column chromatography และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน	75
22	การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP ด้วยวิธี SDS-PAGE (ก) และ Western blotting (ข) โดยใช้ mouse anti-His monoclonal antibody ในการทำปฏิกิริยาพบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	อนุภาคของเชื้อ CTV ที่ได้จากการส่องภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านด้วยวิธี Derrick method ของต้นมะนาวที่ได้รับการปลูกเชื้อ CTV พบไวรัส มีขนาดประมาณ 11-13 x 1,900-2,000 นาโนเมตร (กำลังขยาย 80,000 เท่า, bar = 0.2 ไมโครเมตร)	90
24	ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ ChIgY ด้วยวิธี SDS-PAGE	92
25	ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ RIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE	92
26	แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยวิธี dot blotting immunoassay โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตจาก RIgG (ก) และ ChIgY (ข)	93
27	การทดสอบการทำปฏิกิริยา RIgG-CTV conjugated gold particles ด้วยวิธี DIBA	93
28	การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแต่ละชนิดของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	98
29	การทดสอบตัวอย่างน้ำคั้นพืชกับชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	99
30	การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	99
31	การตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืชด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป	100

การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม

Development of Immunochromatographic Technique for Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Rutaceae

คำนำ

ส้มเป็นไม้ผลที่สำคัญต่อเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทยและของโลก เป็นพืชที่มีการบริโภคภายในประเทศและการผลิตเพื่อการส่งออกค่อนข้างสูงและมีประโยชน์ต่อสุขภาพพลานามัยอย่างมาก งานวิจัยในประเทศสหรัฐอเมริกาศึกษาวิเคราะห์ประโยชน์ของส้มในการชะลอริ้วรอยแห่งวัยทำให้หน้าใส พบว่าเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น ร่างกายสังเคราะห์คอลลาเจนได้น้อยลง แต่ส้มมีคุณสมบัติช่วยเสริมสร้างคอลลาเจน ทำให้สุขภาพผิวดี ลบเลือนริ้วรอยแห่งวัย หน้าใส และยังช่วยสร้างกระดูกอ่อนให้แข็งแรงด้วย เบต้าแคโรทีนในผลส้ม เป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำลายเซลล์ผิวหนังอันเป็นบ่อเกิดของความชรา เบต้าแคโรทีนจึงช่วยชะลอความเสื่อมทำให้ผิว เส้นผม และเล็บมีสุขภาพดี และยังช่วยให้ผนังหลอดเลือดและเส้นเลือดฝอยแข็งแรงหน้าใส ช่วยลดอาการเส้นเลือดฝอยแตกตามใบหน้าและริ้วรอย นอกจากนี้การศึกษาทางการแพทย์ ของทีมวิจัยของเภสัชกรในอังกฤษ พบว่าสารในเปลือกส้มมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดยเฉพาะในเปลือกส้มเขียวหวานจะมีฤทธิ์ช่วยต้านทานมะเร็งบางอย่างได้ โดยสาร ซาลเวสโตรล คือ 40 ในเปลือกส้มเขียวหวาน สามารถทำลายเซลล์มะเร็งที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ พี 450 ซิวพี 1 บี 1 ลงได้ ซึ่งการค้นพบในครั้งนี้ก็นำไปสู่แนวทางใหม่ในการบำบัดโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งทรวงอก ปอด ต่อมลูกหมาก และรังไข่ ได้ต่อไปในอนาคต (<http://www.oknation.net/blog/monchai83/2011/03/15/entry-1>)

ส้มที่ปลูกเป็นการค้า เช่น ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มเซ้ง ส้มจี๊ด มะนาว ล้วนมีความต้องการทางตลาดสูง ส้มที่มีการปลูกมากที่สุดในประเทศไทย คือ ส้มเขียวหวาน จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดคือ จังหวัดสระบุรี นครนายก ลพบุรี และที่ภาคเหนือ คือ จังหวัดแพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงราย และกำแพงเพชร นอกจากนี้ยังมีการปลูกส้มโอในแถบจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี (อำไพวรรณ, 2545) แต่ปัจจุบันพบว่าพื้นที่การปลูกส้มลดลง เนื่องจากปัญหาโรคและแมลงซึ่งเกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการจัดการ และปัจจุบันประเทศไทยได้มีการนำเข้าส้ม

จากประเทศจีนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากจากในปี พ.ศ 2551-2554 มีมูลค่ามากกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี (เปรม และคณะ, 2555)

ความเสียหายที่เกิดขึ้นจากโรคมีความรุนแรงขึ้นจนทำให้การปลูกส้มไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งโรคที่เข้าทำลายส้มที่สำคัญคือโรคทริสเทซ่าซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชอยู่ในจีนัส *Closterovirus* และได้ทำความเสียหายให้กับการผลิตส้มทั่วโลก มีการรายงานโรคทริสเทซ่าเข้าทำลายส้มโอในประเทศไทยได้วันครั้งแรกในปี 1981 ทำให้ส้มโอมีลักษณะอาการเฉื่อยแฉะ แต่ยังไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิต ส่วนในส้มเขียวหวานและส้มอื่นๆ พบว่ามีลักษณะอาการเฉื่อยแฉะ อาการลำต้นนูนและทำให้ขนาดและคุณภาพของผลผลิตลดลง (Su and Tsai, 1991) ซึ่งความรุนแรงของอาการที่แสดงออกมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของเชื้อพืชอาศัย แมลงพาหะ และสิ่งแวดล้อม (Stewart, 2006) และยังมีการรายงานว่าโรคนี้ได้มีการระบาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกภูมิภาคที่มีการปลูกพืชสกุลส้มของโลกจนเป็นปัญหาต่อการปลูกพืชสกุลส้มจนถึงปัจจุบัน (ศิริวรรณ, 2525) และในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในพืชตระกูลส้มทุกชนิดจากทุกภูมิภาคในประเทศไทย (รัตน และคณะ, 2543)

ดังนั้นในปัจจุบันได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อ CTV ให้มีความรวดเร็วและให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้กระต่ายและไก่เป็นสัตว์ทดลองให้ได้แอนติบอดีที่มีคุณภาพดีและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชื้อ CTV โดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี (Immunochromatographic assay) ที่สามารถตรวจสอบเชื้อได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ และเกษตรกรสามารถนำไปใช้ในสภาพแปลงปลูกได้ นำไปสู่การควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อและกำจัดโรคเพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับการปลูกส้มในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจโรค tristeza ของส้มที่เกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV
3. ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยเชื้อ CTV ให้มีประสิทธิภาพต่อไป
4. พัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อ CTV โดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี (Immunochromatographic assay)

การตรวจเอกสาร

1. พืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้มจัดอยู่ใน Family Rutaceae ได้แก่ ส้มโอ (pummelo หรือ shaddock) ส้มเขียวหวาน (mandarin หรือ tangerine) มะนาว (lime) มะนาวฝรั่ง (lemon) มะกรูด (leech lime) ส้มเกลี้ยง และส้มตรา (orange) ส้มกินเปลือก (kumquat) มะตูม (bael fruit) มะขวิด (wood apple) เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าส้มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่กว้างมากอีกทั้งแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ก็มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว นอกจากนี้ส้มยังจัดเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคกันทั่วทุกเขตของโลก ซึ่งใช้เป็นแหล่งของคุณค่าทางอาหารที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ วิตามิน ซี และเอ สำหรับในประเทศไทยได้ใช้พืชนี้ทั้งเพื่อเป็นผลไม้สด ประุงอาหาร เป็นเครื่องสำอาง สมุนไพร (รวิ, 2540)

มูลค่าส่งออกส้มของไทยในปี 2547 ขยายตัวอย่างมากเป็น 54 ล้านบาท เมื่อเทียบกับในปี 2546 ที่มีมูลค่าการส่งออกส้มเพียง 16.7 ล้านบาท แล้วเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 37.3 และคาดว่ามูลค่าการส่งออกจะยังคงขยายตัวอย่างต่อเนื่อง แต่ต้องเผชิญการแข่งขันอย่างรุนแรงจากส้มของจีน โดยประเภทส้มที่ไทยส่งออกมากคือ ส้มเขียวหวาน ตลาดหลักยังคงเป็นตลาดในเอเชีย เช่น อินโดนีเซียฮ่องกง สิงคโปร์ มาเลเซีย และเวียดนาม (<http://www.mof.or.th/web/agriculture.php>)

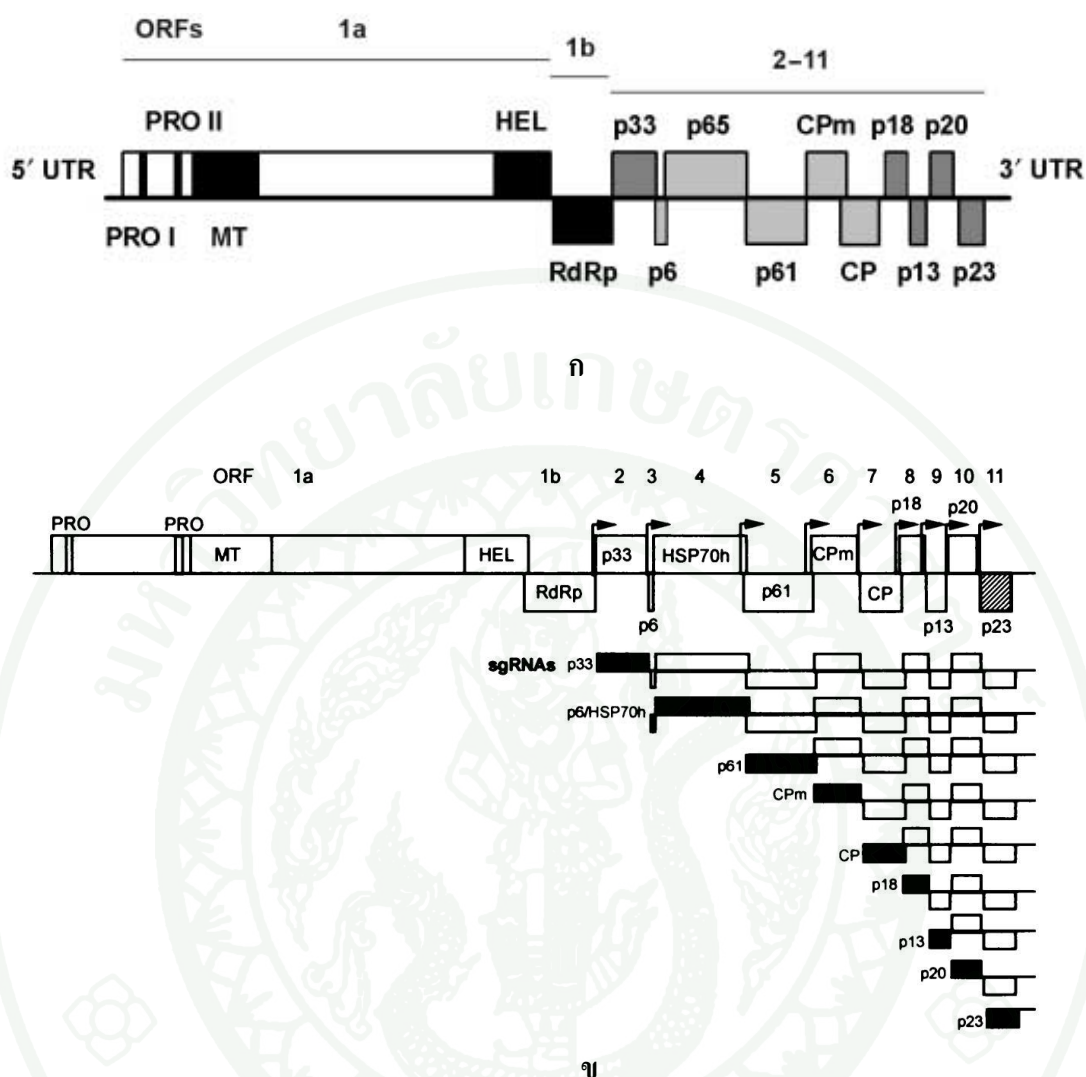
มูลค่าการนำเข้าส้มของไทยในปี 2547 เท่ากับ 44 ล้านบาท เมื่อเทียบกับในปี 2546 ซึ่งมีมูลค่าการนำเข้า 37.27 ล้านบาทแล้วเพิ่มขึ้นร้อยละ 18.1 ประเภทของส้มที่นำเข้าร้อยละ 70 เป็นการนำเข้าส้มเปลือกบาง ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 30 เป็นการนำเข้าส้มเขียวหวาน โดยจีนนับว่าเป็นแหล่งนำเข้าอันดับหนึ่งของไทย มีสัดส่วนตลาดถึงร้อยละ 88.1 ของมูลค่าการนำเข้า ซึ่งการนำเข้าส้มจากจีนมีการขยายตัวอย่างโดดเด่นตั้งแต่ปี 2546 และในปัจจุบันจีนกลายเป็นแหล่งนำเข้าส้มที่สำคัญของไทย แทนที่ออสเตรเลียและสหรัฐฯ (<http://www.mof.or.th/web/agriculture.php>)

2. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV)

โรคทริสเทซ่าเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) เป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญ และทำความเสียหายให้กับการผลิตส้มทั่วโลก จัดอยู่ในกลุ่ม *Closterovirus* อยู่ในวงศ์ *Closteroviridae* ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มของไวรัสพืช ลักษณะของอนุภาคเป็นแบบท่อนยาวคด (flexuous threadlike particle) มี

ขนาดประมาณ 2,000 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 11-13 นาโนเมตร เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดสายบวก (single-stranded ribonucleic acid; ssRNA) มีขนาดประมาณ 19.3 กิโลเบส อนุภาคของเชื้อ CTV ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein) ที่แตกต่างกันอยู่สองชนิด ได้แก่ โปรตีนห่อหุ้มที่มีขนาด 25 กิโลดาลตัน เป็นส่วนประกอบถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนห่อหุ้มที่มีขนาด 27 กิโลดาลตัน มีส่วนประกอบอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส และโปรตีนส่วนนี้จะประกอบที่ส่วนปลายด้านหนึ่งของอนุภาคทำให้อนุภาคมีรูปร่างที่เรียกว่า “rattlesnake” หรือ morphological polar structure (Lo’pez *et al.*, 1998) และมี subgenomic RNA หลายขนาด จากขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV ประกอบด้วย 12 open reading frame (ORFs) สามารถผลิตโปรตีนได้ 17 ชนิด ได้แก่ ORF 1a อยู่ส่วนปลาย 5’ เป็น polyprotein มีขนาดประมาณ 349 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ในการผลิต methyltransferase (MTR) และเอนไซม์ helicase และ ORF 1b ซึ่งจะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Karasev *et al.*, 1995) และ ส่วนของด้านปลาย 5’ ของส่วน ORF 1a ทำหน้าที่ในการผลิต papain-like proteinase (Pap-Pro) ทำหน้าที่เป็น Autocatalytic cleavage (Agranovsky *et al.*, 1994) ซึ่ง proteinase ใน BYV ทำหน้าที่ตัดระหว่างส่วนของ Gly และช่วยในการปล่อย helper component-proteinase (HC-Pro) คล้ายพวก potyviruses แต่การตัดของ Autocatalytic cleavage ในกลุ่มของ *Closteroviridae* ยังไม่ทราบหน้าที่ (Karasev *et al.*, 1994)

ด้านปลาย 3’ ในส่วนของ ORF2-11 มีการแปลรหัสจากส่วนที่เหลื่อมซ้อนกัน 10 ส่วน เป็นแบบ subgenomic mRNAs (sgRNAs) เป็นสาเหตุให้มีกระบวนการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชมีความแตกต่างกัน และมีระดับอาการที่แตกต่างกัน (Hilf *et al.*, 1995; Navas-Castillo *et al.*, 1997) ลักษณะของ *Closteroviridae* มียีนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มยีน (Dolja *et al.*, 2006) ประกอบด้วยส่วนของ ORFs หลังจากที่ยีน sgRNAs ได้แล้วจะแปลรหัสเป็นโปรตีนได้หลายชนิด เช่น *p33*, *p6*, *p65*, *p61*, *p27*, *p25*, *p18*, *p13*, *p20* และ *p23* ซึ่ง *p65* เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ heat shock proteins โดย HSP70 เป็นโปรตีนที่เป็น homologue กับยีน *p61* เป็นยีนที่สร้างส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค โปรตีน *p25* เป็นส่วนของ major coat protein และโปรตีน *p27* เป็นส่วนของ minor coat protein ตามลำดับ (Satyanarayana *et al.*, 2000) ส่วนยีน *p20* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์พืชมีรูปแบบไม่แน่นอน ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของไวรัสอาจมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไวรัส (Gowda *et al.*, 2000) สำหรับยีน *p33*, *p18* และ *p13* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่พืชอาศัยและเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่แบบจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งของไวรัสในพืชอาศัย (Tatineni *et al.*, 2008) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเชื้อ CTV (genome organization; ก และ ข) และมี subgenomic RNA หลายขนาด จากขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV ประกอบด้วย 12 open reading frame (ORFs) ORF 1a และ ORF 1b คือ Pro I และ Pro II ทำหน้าที่ในการผลิต papain-like proteinase (Pap-Pro) เช่น methyltransferase (MTR), helicase (HEL) และ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ส่วนด้านปลาย 3' UTR ผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค 2 ขนาด คือ minor coat protein (CPm) และ major coat protein (CP) สามารถเริ่มสังเคราะห์ตั้งแต่ส่วนที่มีลูกศรเป็นต้นไปในแต่ละ ORFs จนไปสิ้นสุดที่ปลายด้าน 3' (Lee, 2001)

3. ลักษณะอาการบนพืชอาศัยและสายพันธุ์ของเชื้อ

พืชอาศัยของเชื้อ CTV ส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Rutaceae เชื้อ CTV จะอาศัยอยู่ในระบบท่ออาหาร (phloem) จำกัดเฉพาะในพืชไม้ยืนต้นสกุลส้ม เช่น *Aeglopsis chevalieri*, *Alfraele paniculata* และ *Pampurus missiones* (Yoshida, 1996) จะแสดงอาการที่เกิดขึ้นบนพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) มีอาการต้นกล้าเหลืองอย่างรุนแรง อาการแคะแกร็น และอาการลำต้นบวม ส้มเปรี้ยว (sour orange; *C. aurantium* L.) มีอาการเส้นใบสีตามด้วยอาการเหลือง ใบม้วนงอ และมีการเจริญเติบโตช้า และส้มเกลี้ยง (sweet orange; *C. sinensis* Osb.) มีการเจริญเติบโตช้า มีอาการขีดเหลืองร่วมกับต้นโทรม และแสดงอาการลำต้นบวม (Barzegar *et al.*, 2006) ซึ่งอาการต้นโทรมเกิดจากเชื้อไวรัสชักนำให้เกิดอาการ necrosis ที่ budunion แล้วไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของคาร์โบไฮเดรตเพื่อไม่ให้เคลื่อนที่ไปยังระบบรากได้ทำให้ระบบรากเสื่อม อาการต้นโทรมจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ใช้เวลาหลายปีหรือบางครั้งใช้เวลาอย่างรวดเร็ว และอาการอื่นๆ ที่สามารถพบได้บนพืชอาศัยที่อ่อนแออย่างมะนาว (sour orange; *C. aurantifolia* Swing) เช่น อาการตายของกิ่งหรือปลายยอด (die-back) เส้นใบเป็นจุดประโปรงแสง เส้นใบใส (vein clearing) ใบไม่เรียบ ขอบใบบิดเบี้ยว ผิดปกติไป ใบม้วนงอขึ้นเป็นรูปถ้วย ใบหนาด้วน ใบซีดจาง ใบร่วง ผลมีขนาดเล็ก แคะแกร็น ชะงักการเจริญเติบโต ผลผลิตลดลง และตายในที่สุด (ลัดดาวัลย์, 2550) สำหรับต้นมะนาวที่มีขนาดใหญ่เมื่อใช้มีดกรีดทำการเปิดเปลือกบริเวณลำต้น จะพบรูขนาดเล็กจำนวนมากบนเนื้อไม้ (stem pitting) ส่วนบริเวณเปลือกด้านในจะมีลักษณะเป็นปมคล้ายหนามแหลมยื่นออกมาจะแสดงอาการตั้งแต่จุดเล็กๆ จนขยายไปทั่วทั้ง cambium เป็นสาเหตุให้เปลือกหนาผิดปกติ ส่วนพืชอาศัยของเชื้อ CTV ที่ไม่ใช่พืชสกุลส้ม คือ *Passiflora gracilis* Jacq., *P. coerulea* (Price, 1966; Roistacher *et al.*, 1988) และพบว่าส้มโอ (pummelo; shaddock; *C. grandis* Osb.; *C. decumanus* L.; *C. maxima* Merr.) และส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata* L.) จัดเป็นพืชอาศัยที่มีความต้านทานต่อเชื้อ CTV มากที่สุด (Xueyuan *et al.*, 2002; Ayazpour *et al.*, 2011) และพบว่ามะนาว (lime, West Indian lime, Key lime, Mexican lime, Galego lime, Kagzi lime; *C. aurantifolia* Swing.) เกรฟฟรุตและส้มเขียวหวานจัดเป็นพืชอาศัยที่มีความอ่อนแอมากที่สุด (Lee, 2001)

Barzegar *et al.*, 2006 ศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ของเชื้อ CTV ในทางเหนือของประเทศอิหร่าน โดยศึกษาลักษณะทางชีวภาพที่แสดงออกบนพืชอาศัยและใช้เทคนิคชีวโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของเชื้อ CTV ทั้ง 4 ไอโซเลท คือ Satsuma ประเทศญี่ปุ่น และ Mahdasht orchards, Mazandaran Province นำต้น sweet orange ที่มีเชื้อ CTV นำมา grafted-inoculated บนต้นกล้า Alemow (*C. macrophylla* Wester), Mexican lime, *C. hystrix* และ grapefruit พบว่ามีการแสดง

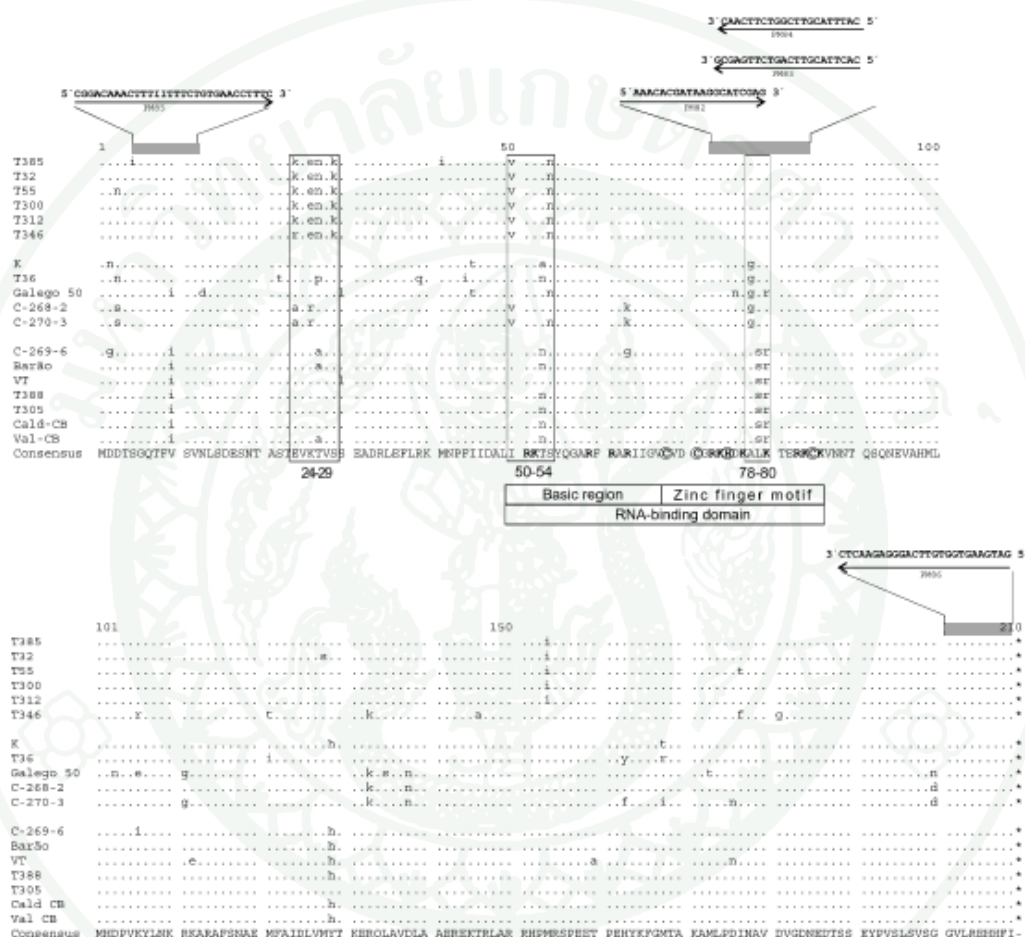
ลักษณะอาการแตกต่างกันบนพืชทดสอบ เช่น ใน Alemow, Mexican lime, *C. hystrix* มีอาการ vein clearing, stem pitting และ seedling yellowing ตามลำดับ ส่วน sour orange และ grapefruit แสดงอาการแฉะแฉริน ลักษณะอาการที่แสดงออกมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัยและลักษณะสายพันธุ์ของเชื้อ

4. การจำแนกเชื้อ CTV

เชื้อ CTV มียีนที่แปลรหัสเป็น silencing suppressor ได้ 3 ยีน คือโปรตีนยีน *p25*, *p20* และ *p23* ซึ่งโปรตีนยีน *p23* เป็น pathogenicity ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในพืชอาศัยของเชื้อ CTV เป็น RNA binding protein จับกับ Zn ควบคุมการสร้างสาย RNA ระหว่างสายบวกกับสายลบ (Satyanarayana *et al.*, 2002) และจับกับ ribosome (Dolja *et al.*, 1994) ช่วยยับยั้งกระบวนการ post-transcriptional gene silencing (Lu *et al.*, 2004) และควบคุมการแสดงออกของยีน (López *et al.*, 2000) จากงานวิจัยของ Fagoaga *et al.* (2005) ได้ศึกษาโปรตีนยีน *p23* โดยทำการ mutation ยีนตรงตำแหน่งโปรตีนยีน *p23* พบว่ามีผลต่อกรดอะมิโน Cysteine และ Histidine มีผลทำให้โปรตีนยีน *p23* ไม่สามารถไปจับกับโปรตีนชนิดอื่นได้ ดังนั้นได้มีการทำพันธุ์วิศวกรรมโปรตีนยีน *p23* และนำไปทดสอบกับพืชอาศัย เช่น Mexican lime พบว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *p23*-truncated มีลักษณะอาการที่ปกติ แต่ในขณะที่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีส่วนของโปรตีนยีน *p23* แสดงลักษณะอาการที่รุนแรงในทางตรงกันการถ่ายยีน *p23* ของเชื้อ CTV ให้กับพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย เช่น *N. tabacum* และ *N. benthamiana* พบว่ามีการสะสมของโปรตีนยีน *p23* แต่ไม่แสดงอาการผิดปกติขึ้น ซึ่งโปรตีนยีน *p23* มีหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ RNA silencing ในสายพันธุ์ของพืช แต่เนื่องจากว่าโปรตีนยีน *p23* มีปฏิสัมพันธ์กับ miRNA-regulated ที่ถูกสร้างขึ้นด้วยกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นในพืชตระกูลส้มเท่านั้น แต่จะไม่มีใน *Nicotiana* ซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ CTV แสดงให้เห็นว่าโปรตีนยีน *p23* มีบทบาทสำคัญในการเป็น pathogenicity ของเชื้อ CTV ในการก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัยที่พัฒนาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของส้มและในวงศ์ที่เกี่ยวข้องเท่านั้น

Sambade *et al.*, 2003 ศึกษาความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนยีน *p23* ตำแหน่งที่ 24-29, 50-54 และ 78-80 ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ CTV เป็นสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain) พบว่าเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 24-29 เป็น Lys²⁴, Glu²⁶ และ Lys²⁹ ขณะที่เชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Glu²⁴, Lys²⁶ และ Val²⁹ ตำแหน่งที่ 50-54 เชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Val⁵⁰, Thr⁵³ และ Asn⁵⁴ ส่วนเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Ile⁵⁰ และ Asn⁵³

ตำแหน่งที่ 78-80 เชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Ala⁷⁸, Leu⁷⁹ และ Lys⁸⁰ ส่วนเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Ala⁷⁸, Ser⁷⁹ และ Arg⁸⁰ และกลุ่มที่มีอาการทั่วไป (Atypical group) มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly⁷⁸, Leu⁷⁹ และ Lys⁸⁰ ตำแหน่งที่ 78-80 มีความจำเพาะมากที่สุดสามารถใช้ในการจำแนกกลุ่มอาการได้ในทุกไอโซเลท (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงความแปรปรวนของลำดับกรดอะมิโนของยีน p23 ในส่วนของ RNA-binding domain และแสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR (Sambade *et al.*, 2003)

5. การแพร่ระบาดโดยแมลงพาหะ

เชื้อ CTV สามารถถ่ายทอดผ่านแมลงพาหะคือเพลี้ยอ่อน (Aphid) ได้หลายชนิด เช่น *Aphis spiraecola* Patch, *A. gossypii* Glover และ *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Yokomi and Garnsey, 1987) แต่เพลี้ยอ่อน *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) เป็นแมลงพาหะที่มีการถ่ายทอดเชื้อ CTV ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และพบมากที่สุดในต้นส้ม (Niblett *et al.*, 2000) ถึงแม้ว่า *Toxoptera citricida* จะมีพืชอาศัยหลายชนิด แต่มีความจำเพาะเจาะจงในการถ่ายทอดเชื้อ CTV ได้เฉพาะในต้นส้มเท่านั้นและยังสามารถถ่ายทอดเชื้อ CTV ได้หลายสายพันธุ์รวมทั้งสายพันธุ์รุนแรงที่ทำให้เกิดอาการ stem pitting ได้ (Yokomi *et al.*, 1987, Ballester-Olmos *et al.*, 1993) การถ่ายทอดโรคเป็นแบบ semi-persistent (Roy, 2003) โดยแมลงพาหะจะอาศัยระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อให้กับพืช เพียง 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง และหลังจากที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชแมลงพาหะยังคงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ 1-3 วัน ดังนั้นรูปแบบของพืชอาศัยและพฤติกรรมการกินอาหารของเพลี้ยอ่อนจึงมีผลต่อการกระจายตัวของเชื้อ (Gottwald *et al.*, 1996) นอกจากนี้ที่เชื้อสามารถถ่ายทอดไปโดยแมลงพาหะแล้ว ยังสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล หรือโดยการติดตา การทาบกิ่ง และทางท่อนพันธุ์ ซึ่งเป็นการแพร่กระจายแบบ long-distance จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว แต่พบว่าเชื้อ CTV ไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Dolja *et al.*, 1994; Bar-Joseph *et al.*, 1989)

Moreno *et al.*, 1989 รายงานว่าเชื้อไวรัส CTV ได้มีรายงานมีการระบาดในประเทศสเปนในปี 1957 อย่างรุนแรงและไม่สามารถควบคุมได้ เชื้อจะเข้าทำลายส่วนของเนื้อไม้ มีการถ่ายทอดโรคด้วยเพลี้ยอ่อนส้ม *Aphis gossypii* Glover, *A. citricola* van der Goot และ *T. aurantii* Boyer de Fonscolombe ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการต้นโทรมและตายอย่างรวดเร็วในส้มตระกูล sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.), mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) และ grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.)

Niblett *et al.*, 2000 ศึกษาความแตกต่างทางสายพันธุ์และการแพร่ระบาดของเชื้อ CTV โดยใช้เทคนิคต่างๆในการตรวจหาและแยกความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เช่น PCR, ELISA, RFLP เป็นต้น พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อ CTV ที่มาจากประเทศโปรตุเกสเป็นเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรงจะแสดงอาการต้นโทรม ส่วนเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการ stem pitting บนส้มพันธุ์ Madeira Island และทำปฏิกิริยากับ probes ที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยมีเพลี้ยอ่อน *T. citricidus* (Kirkaldy) เป็นพาหะที่ช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อ

6. การป้องกันกำจัดและการควบคุมโรค

6.1 การควบคุมการนำเข้าเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่

โดยอาศัยการกักกันพืช (plant quarantine) หลักเกี่ยวกับการนำเข้าท่อนพันธุ์ส้มจากแหล่งปลูกที่ไม่ได้รับการรับรองได้ว่าปราศจากเชื้อทริสเทซ่าไวรัส ลดการนำเข้าพืชใหม่ๆ ที่ผิดกฎหมาย ควรมีการตรวจสอบท่อนพันธุ์ก่อนการเคลื่อนย้ายเข้ามาภายในประเทศและออกกฎหมายควบคุมท่อนพันธุ์ปลอดโรคจากภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก มาตรการนี้จะช่วยควบคุมมิให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงที่ไม่เคยมีระบาดในประเทศไทย มีโอกาสมาแพร่ระบาดหรือเกิดปฏิกิริยาร่วมกับไวรัสหรือโรคอื่น สร้างความเสียหายให้กับการปลูกส้มมากกว่าเดิม (สุพัฒน์, 2551; Frison and Taher, 1991)

6.2 การออกใบรับรองพืชปลอดโรค

ควบคุมวิธีการขยายพันธุ์ส้มอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่กระจายของเชื้อได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งส้มที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์ด้วยวิธีการติดตา ทาบกิ่ง ท่อนพันธุ์ที่ใช้ส่วนใหญ่มาจากแหล่งเดียวกันและเพาะไว้ในโรงเรือนเดียวกันจึงทำให้เชื้อ CTV มีการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรใช้ท่อนพันธุ์ส้มที่ปลอดเชื้อ CTV แล้วนำไปเพาะไว้ในโรงเรือนที่ปลอดแมลง (Navarro, 1993)

6.3 การใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค

ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อไวรัส ได้มาจากการคัดเลือกจากแปลงธรรมชาติ โดยอาศัยการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อให้แน่ใจว่าท่อนพันธุ์นั้นปราศจากเชื้อ หรือสามารถพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเฉพาะทาง เช่น การเสียบยอดต้นส้มในหลอดทดลองควบคู่ไปกับการตรวจพิสูจน์ว่าปราศจากเชื้อ ประเทศที่มีการปลูกส้มเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ มีหน่วยงานที่รับจ้างผลิตท่อนพันธุ์ส้มที่ปราศจากเชื้อไวรัสทริสเทซ่า ซึ่งจำเป็นต้องใช้มาตรการควบคุมแมลงพาหะอย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งคอยตรวจสอบดูแลต้นส้มในแปลงปลูกอย่างสม่ำเสมอ หากพบว่ามีโรคติดเชื้อต้องรีบทำการกำจัดก่อนที่เชื้อจะสามารถเกิดการแพร่กระจายในวงกว้าง (สุพัฒน์, 2551)

6.4 การกำจัดต้นที่เป็นโรคในแปลงทิ้ง

ต้องมีการกำจัดและดูแลเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการสำรวจและการตรวจสอบโรคทริสเทซาอย่างมีประสิทธิภาพก็มีความจำเป็นอย่างมากในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ CTV ไปยังแหล่งอื่นๆได้ จากนั้นต้องมีการกำจัดโดยการตัดต้นที่เป็นโรคทิ้งแบบถอนรากถอนโคน แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น เกษตรกรไม่ยินยอม และถ้าในพื้นที่นั้นๆ ยังพบว่าการแพร่ระบาดของแมลงพาหะอยู่ก็ยังไม่สามารถที่จะควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ CTV ได้เท่าที่ควร (Garnsey *et al.*, 1996)

6.5 ใช้ต้นตอที่ทนทานหรือต้านทาน

การนำต้นตอที่ต้านทานต่อเชื้อ CTV มาใช้ในการผลิตส้มทางการค้ายังมีความจำเป็นอย่างมาก ต้นส้มที่นำมาใช้เป็นต้นตอมีหลากหลาย เช่น คลีโอพัตรา (Cleopatra), ส้มแมนดาริน, รัฟเลมอน (rough lemon), แรเงอร์ไลม์ (Rangpur lime), ส้มสามใบ (trifoliate orange), สวิงเกิล ซิทรูเมโล (Swingle citrumelo), คาร์ริโซ ซิเตรนจ์ (Carrizo citranges) และ ทรอยเยอร์ (Troyer) แต่ต้นตอที่นำมาใช้ถึงแม้จะทนทานต่อเชื้อ CTV ก็ยังมีปัญหาอื่นๆเช่นไม่ทนทาน ต้านทานต่อโรคไหม้ของส้ม, ไวรอยด์, ไล่เดือนฝอย และสภาพของดิน เป็นต้น (Yokomi, 2009)

6.6 การควบคุมแมลงพาหะ

การฉีดพ่นสารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดแมลง ไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ติดไปกับท่อนพันธุ์ แต่การฉีดพ่นสารเคมีถ้าทำได้เหมาะสม จะช่วยลดประชากรของเพลี้ยอ่อนพาหะ ซึ่งทำลายช่อและดอกอ่อนของส้มจากการดูดกินน้ำเลี้ยง และป้องกันมิให้เพลี้ยอ่อนนำไวรัสสายพันธุ์อื่นเข้ามาสู่แปลงปลูกได้ซึ่งเป็นการป้องกันในเบื้องต้นเท่านั้น แต่การใช้สารเคมีให้มีประสิทธิภาพก็ยังมีข้อจำกัดคือ ใช้ในโรงเรือนหรือแหล่งที่มาของท่อนพันธุ์ และเมื่อถึงช่วงเวลาที่ต้นไม่มีการผลิใบใหม่ปริมาณเชื้อ CTV ในต้นก็มีปริมาณสูงขึ้นเช่นเดิม ซึ่งแมลงก็อาจจะมามากขึ้นในเวลานี้ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ควรหาวิธีการกำจัดแมลงให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด (สุพัฒน์, 2551; Yokomi, 2009)

6.7 การสร้างภูมิคุ้มกันให้กับต้นส้มโดยใช้ไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain cross protection)

การนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงมาปลูกเชื้อให้กับต้นพืชปกติอาจจะสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงได้ (Gonsalves and Garnsey, 1989) วิธีการนี้ใช้สำหรับควบคุมการเข้าทำลายต้นส้มของเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและการแพร่ระบาดของเพลี้ยอ่อน มีการรายงานการควบคุมโรคด้วยวิธีการทำ cross protection ในประเทศออสเตรเลียและอเมริกาใต้ในเกรฟฟรุ๊ต (Broadbent *et al.*, 1991) และในประเทศบราซิลใช้วิธีนี้ในการควบคุมเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงในพีรา สวีท ออเรนจ์ (pera sweet orange) และ กาลิโก ลิ้ม (Galego lime) (Müller and Costa, 1972; Costa and Müller, 1980) สิ่งที่จะต้องใช้ในการควบคุมโรคทริสเตซ่าโดยวิธีนี้ คือ การหาเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง ซึ่งพิจารณาได้จากอาการของโรค หรือผลผลิตที่ไม่แตกต่างจากพืชปกติมากนักแล้วนำมาปลูกเชื้อให้กับต้นพืชปกติเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันดังกล่าว ในกรณีโรคทริสเตซ่าไวรัสของส้ม สายพันธุ์ไวรัสที่ไม่รุนแรงอาจได้มาจากการทำให้ไวรัสกลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการหรือคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีระบาคอยู่ในแปลงส้มในสภาพธรรมชาติ ในกรณีหลังนี้เกษตรกรอาจนำไปประยุกต์ใช้ โดยการขยายพันธุ์จากต้นส้มที่ไม่แสดงอาการของโรค ให้ผลผลิตดีและมีความสมบูรณ์แข็งแรง แต่สามารถตรวจสอบได้ว่า มีเชื้อทริสเตซ่าไวรัสอยู่ในต้น การคัดเลือกท่อนพันธุ์โดยวิธีนี้ก่อให้เกิดประโยชน์ 2 ประการ คือ อาจจะได้ต้นส้มที่มีความต้านทานต่อโรคหรือได้เชื้อทริสเตซ่าไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงในธรรมชาติ

ในกรณีที่มีการใช้พันธุ์ส้มที่ปราศจากเชื้อทริสเตซ่าไวรัส ในสภาพแปลงปลูกที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อทริสเตซ่าไวรัสอย่างรุนแรง จำเป็นต้องพิจารณาใช้สายพันธุ์ไวรัสที่ไม่รุนแรงมาสร้างภูมิคุ้มกันให้กับท่อนพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อในระยะแรกก่อนที่พันธุ์ส้มปราศจากเชื้อไวรัสจะถูกสายพันธุ์ไวรัสที่รุนแรงเข้าทำลาย (สุพัฒน์, 2551) แต่ความยากลำบากในการทำ cross protection ก็คือการคัดเลือกสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการสร้างภูมิคุ้มกัน เนื่องจากเชื้อ CTV มีการแสดงอาการของโรคในพืชอาศัยแตกต่างกัน การแสดงออกของโรคขึ้นอยู่กับพืชอาศัยและปัจจัยอื่นๆด้วย (Moreno *et al.*, 1993) ดังนั้นการนำเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรงมาใช้ในการควบคุมเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงจะมีปฏิริยาสัมพันธ์ (Interaction) ที่จำเพาะกับเชื้อ CTV บางสายพันธุ์เท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงควรมีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของปฏิริยาสัมพันธ์ (interaction) ของเชื้อเพื่อที่จะนำไปใช้ในการทำ cross protection ให้มีประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้น (Moreno *et al.*, 1993)

Salibe *et al.*, 2002 ได้รายงานไว้ในประเทศบราซิลพบว่ามีเชื้อ CTV เข้าทำลาย pera sweet orange และส้มสายพันธุ์อื่นๆ ทำให้เกิดอาการ stem pitting อย่างรุนแรง ซึ่งทำความเสียหายให้แก่การผลิตส้มเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงได้มีการควบคุมโรคนี้ด้วยการปลูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงให้กับต้นพืชก่อนนำไปปลูกในสภาพแปลง เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานให้กับพืชก่อน และพบว่าต้นส้มที่ทำการปลูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงมีการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตสูง ขนาดผลใหญ่ และไม่มีอาการ stem pitting เกิดขึ้น

Roistacher *et al.*, 1988 ศึกษาการป้องกันเชื้อ CTV ที่ทำให้เกิดอาการ stem pitting และ seedling yellows ด้วยวิธี cross-protection โดยใช้วิธีการ graft-inoculation ด้วยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงให้กับต้นกล้า Sweet orange, Passiflora และ Mexican lime หลังจากทำการปลูกเชื้อ 6 เดือน ทำการตัดลำต้นและปอกเปลือกที่เจริญออกมาใหม่ จากนั้นนำไปวัดขนาดผลและนับจำนวนรอยบุ๋มที่เกิดขึ้นบนลำต้น โดยคำนวณเป็นพื้นที่ต่อ 100 ตารางเซนติเมตร โดยเปรียบเทียบกับ treatment อื่นๆ พบอาการที่เกิดขึ้นมีความรุนแรงลดลงและเมื่อเวลาผ่านไป 4 ปี ก็ยังสามารถควบคุมได้

Meyer *et al.*, 2005 ศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ CTV ในต้น Red Grapefruit ซึ่งประเทศแอฟริกาใต้ได้ใช้เชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง คือ GFMS 35 มา graft-inoculation บนต้น Grapefruit พันธุ์ Star Ruby พบว่าไม่แสดงอาการใดๆบนพืชทดสอบ เมื่อนำ GFMS 12 เป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงมา graft-inoculation บนต้น Grapefruit พันธุ์ Flame และ Grapefruit พันธุ์ Henderson พบว่าแสดงอาการบนพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงได้มีการใช้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงมา graft-inoculation ลงบนต้น Grapefruit เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง

6.8 การพัฒนาพันธุ์ส้มต้านทานต่อโรคทริสเทซ่าไวรัส โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มพัฒนาส้ม ไม่ว่าจะเป็นส่วนของต้นตอหรือท่อนพันธุ์ให้ต้านทานต่อทริสเทซ่าไวรัส โดยอาศัยการถ่ายยีนของไวรัสให้กับพันธุ์ส้ม (Lee *et al.*, 2008) ประสิทธิภาพและความยั่งยืนของลักษณะความต้านทานเหล่านี้ เป็นสิ่งที่นักวิชาการและผู้ที่เกี่ยวข้องจำเป็นต้องติดตามความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง

7. เทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CTV

การใช้พืชทดสอบในการปลูกเชื้อ CTV มีหลายชนิด เช่น ส้มซ่า ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะกรูด เลมอน และมะนาว เป็นต้น ส่วนใหญ่จะใช้มะนาวเนื่องจากมะนาวมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CTV ได้หลายสายพันธุ์ และแสดงอาการผิดปกติได้อย่างชัดเจน (Ghorbel *et al.*, 2001) การปลูกเชื้อสามารถทำได้โดย การติดตาทาบกิ่ง และการใช้แมลงพาหะ แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง เช่น ต้องใช้ระยะเวลานานกว่าพืชทดสอบจะแสดงอาการและอาการที่แสดงออกอาจจะยังไม่ชัดเจนถ้าเชื้อที่เข้าทำลายเป็นสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง ต้องใช้มะนาวเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดความไม่สะดวกในการปฏิบัติ แต่ปัจจุบันพบว่าในการทดลองยังมีการใช้พืชทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะอาการอยู่อย่างต่อเนื่อง (Fagoaga *et al.*, 2005; Maria *et al.*, 2010; Ayazpour *et al.*, 2011; Fagoaga *et al.*, 2011)

เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และแม่นยำสูงในการตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ถึงระดับนาโนกรัม และสามารถศึกษาได้ในระดับการแสดงออกของ mRNA แต่ข้อจำกัดของการเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายในการทำปฏิกิริยา RT-PCR จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของยีนเป้าหมายเริ่มต้น (Schmittgen *et al.*, 2000) และในการปฏิบัติงานต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ มีขั้นตอนการทำงานที่ซับซ้อน และใช้เวลานานในการตรวจสอบ

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope) ในการตรวจสอบเชื้อ CTV สามารถทำได้โดยการลอยกริดบนหยดตัวอย่าง ด้านส่วนเกินออกด้วยบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นและย้อมสีด้วยสารละลาย uranyl acetate (UA) หรือ phosphotungstic acid (PTA) ซึ่งเรียกรูปแบบนี้ว่า Dip preparation ส่วนวิธีการอิมมูโนอิเล็กตรอนไมโครสโคปี (Immunoelectron microscopy, IEM) เป็นการนำเอาหลักการทางอิมมูโนวิทยามาใช้ร่วมกับเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในตัวอย่างน้ำคั้นพืช ซึ่งวิธีนี้อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นอนุภาคไวรัสได้ชัดเจนกว่าวิธี Dip preparation ความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสที่นิยมให้อยู่ในช่วง 0.01-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รัชนี, 2549) และตรวจวินิจฉัยเชื้อ CTV กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางชีววิทยาด้วยเพื่อเป็นการเพิ่มความชัดเจนและแม่นยำขึ้นในการทำปฏิกิริยา (Maria *et al.*, 2004) แต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณเยอะๆ ได้ เครื่องมือมีจำนวนจำกัด ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการปฏิบัติงาน

วิธีการทางชีววิทยาที่นำมาตรวจสอบเชื้อ CTV มีหลายวิธี เช่น วิธี Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) นั้นอาศัยหลักการการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ และตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรท (substrate) ของเอ็นไซม์นั้น ความเข้มข้นของแอนติเจนที่นิยมใช้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากพร้อมๆกัน นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และวิธี Direct Tissue Blot Immunoassay ใช้ในการทดสอบชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชทำให้สามารถระบุตำแหน่งของแอนติเจนได้จากสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบริเวณนั้นๆบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แต่ข้อจำกัดคือไม่สามารถประเมินแอนติเจนได้โดยตรง ต้องใช้เวลาในการทดสอบนาน 4-5 ชั่วโมง

ต่อมาได้พัฒนาการตรวจวินิจฉัยแบบ Immunochromatographic Assay, lateral flow test หรือ strip test มีพื้นฐานมาจาก latex agglutination test เริ่มคิดค้นและพัฒนาโดย Plotz and Singer (1956) ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีปฏิกิริยาจะเกิดบนแผ่นเมมเบรน เช่น nitrocellulose และ nylon มีคุณสมบัติในการยึดเกาะ โปรตีนได้ดี ซึ่งขนาดรูพรุนของแผ่นเมมเบรนจะแปรผันตามอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารละลาย สำหรับแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ทำให้สารละลายเคลื่อนที่เร็วมาก มีผลทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีไม่สามารถทำปฏิกิริยากันได้ และการคัดเลือกหาชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อเป็นการเพิ่มความไว (sensitivity) และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนแผ่นเมมเบรนได้ดียิ่งขึ้น (Chen and Wu, 2012) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้ใช้งานง่ายมีความรวดเร็ว สะดวก ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจเชื้อไวรัส ตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณเยื่อได้ ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่าง และชุดตรวจสอบสามารถอ่านผลได้ด้วยตนเองโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนมีความไวสูงใช้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 3-5 นาที ผลลัพธ์ที่ได้มีความแปรปรวนต่ำ (Wong and Tse, 2009) (ภาพที่ 3)

Sambade *et al.*, 2003 ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจแยกเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรงโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *p23* และทำการโคลนยีนเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากเชื้อ CTV จำนวน 18 ไอโซเลต เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนพบว่าตำแหน่งที่ 78-80 มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง

Xu *et al.*, 2006 ใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) จัดกลุ่มเชื้อ CTV ที่เข้าทำลาย Sweet Oranges ในประเทศจีน จำนวน 192 ตัวอย่าง โดยใช้เอ็นไซม์ *HinfI* ในการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) พบว่ากลุ่ม III และ I

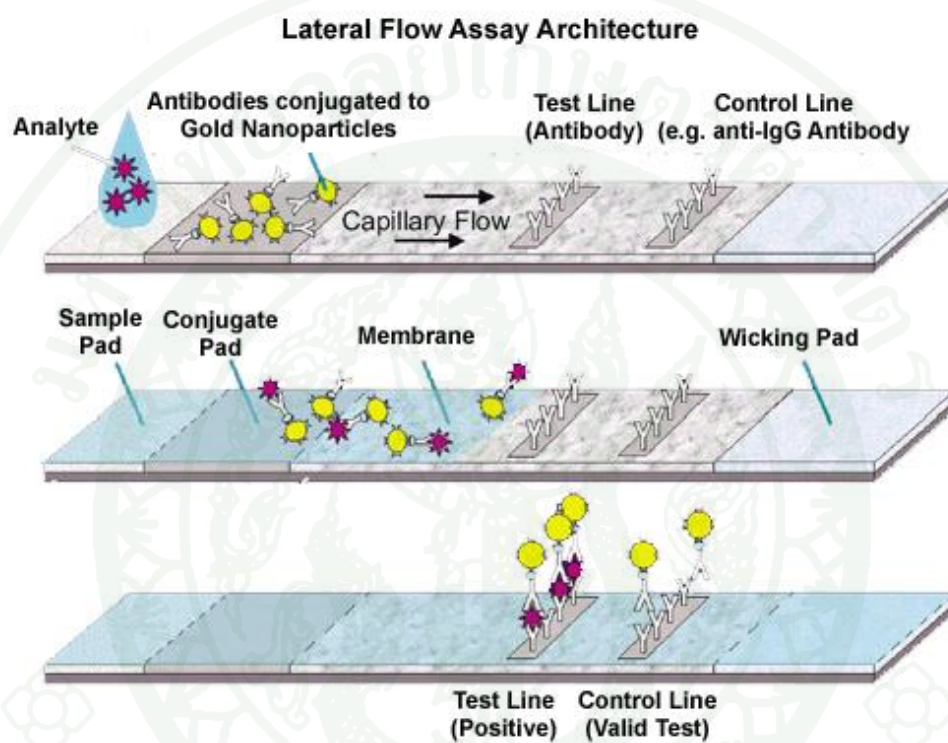
เป็นกลุ่มของเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง แสดงอาการลำต้นบวมบนต้น sweet oranges และพบว่าเชื้อ CTV ในประเทศจีนส่วนใหญ่เป็น mix infection ระหว่างเชื้อสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง

Cambra *et al.*, 2000 ตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี Direct Immunoprinting-ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติบอดีที่พัฒนาจากเทคนิค Recombinant-coat protein และยืนยันผลด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค Immunocapture RT-PCR จากผลการทดลองพบว่าการใช้เทคนิค Direct Immunoprinting ให้ผลสอดคล้องกันและเป็นวิธีที่ง่ายให้การทดลองที่ชัดเจน

Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2009 ตรวจวินิจฉัยเชื้อ CTV ด้วยแอนติบอดีที่พัฒนาจากเทคนิค Recombinant Coat protein โดยใช้วิธี double-antibody sandwich indirect (DASI)-ELISA พบว่าต้นที่มีเชื้อ CTV ให้ค่า OD₄₀₅ nm ระหว่าง 0.250 - 2.00 ส่วนต้นปกติให้ค่า OD 405 ไม่เกิน 0.100 ซึ่งสามารถแยกต้นพืชที่เป็นโรคและต้นพืชปกติได้ และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแอนติบอดีจากหน่วยงาน CCTEA และแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้าของ Agdia กับ BIOREBA ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน

Latanya *et al.*, 2010 ตรวจสอบลักษณะของอาการ stem pitting ของเชื้อ CTV ในเกาะจามเกาซึ่งเคยมีการระบาดอย่างรุนแรงในสวนส้มบนเกาะไอซ์แลนด์และมีการแพร่กระจายเข้ามายังเกาะจามเกาในระยะเวลา 2 ปี ในการทดลองได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นที่เป็นโรคทั้งหมด 55 ตัวอย่าง นำมาตรวจด้วยวิธี ELISA และทำการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ พบว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจด้วยวิธี ELISA พบว่าทำปฏิกิริยากับ polyclonal antibody 74 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงสามารถทำปฏิกิริยาได้ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสังเกตอาการที่เกิดขึ้นบนมะนาวซึ่งเป็นพืชทดสอบแสดงอาการ stem pitting และ vein clearing แสดงว่าการใช้ monoclonal antibody สามารถตรวจแยกสายพันธุ์ของเชื้อ CTV ได้

Su, 2008 พัฒนาชุดตรวจสอบ (strip test) เชื้อ CTV โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมต่อกับอนุภาคทอง และเคลือบลงบนแผ่นเมมเบรน เมื่อจุ่มชุดตรวจสอบลงในตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบของเหลวจากตัวอย่างจะไหลผ่านขึ้นไปทำให้เกิดปฏิกิริยา มีผลที่ให้มองเห็นเส้นเป็นสีชมพูบริเวณ test line และ control line ในตัวอย่างพืชที่มีเชื้อ CTV เข้าทำลาย ส่วนพืชปกติจะเห็นสีชมพูที่เส้น control line เพียงเส้นเดียว ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 2-3 นาที



ภาพที่ 3 แสดงเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีชนิด Double Antibody Sandwich Assay

ที่มา: <http://www.cytodiagnostics.com/lateral-flow-immunoassays.php>

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ เช่น ส้มโอ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเขียว ส้มซ่า ส้มแก้ว ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มเปลือกบาง และมะกรูด จำนวน 418 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดต่างๆ จำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชัยนาท นครปฐม กรุงเทพมหานคร สระแก้ว นครนายก และปราจีนบุรี (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 4) โดยเลือกเก็บตัวอย่างจากส่วนของใบในระยะเฟสลาด จากต้นที่ไม่แสดงอาการและต้นที่แสดงอาการเป็นโรค โดยสังเกตและบันทึกอาการของโรค ได้แก่ อาการลำต้นนูน (stem pitting) อาการเส้นใบใส (vein clearing) อาการใบด่าง (leaf mottling) อาการใบเป็นรูปถ้วย (leaf cupping) และอาการเส้นใบแตก (corky vein) และอาการเหี่ยวเฉา แล้วนำใบดังกล่าวมาตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าโดยเทคนิค PCR ต่อไป

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจแยกตามจังหวัดและชนิดของพันธุ์ส้ม

สถานที่	ชนิดของส้ม	จำนวนตัวอย่าง	สถานที่	ชนิด/พันธุ์	จำนวนตัวอย่าง
1. กาญจนบุรี	ส้มโอทองดี	16	7. สมุทรสงคราม	ส้มโอขาวใหญ่	38
	ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	16		ส้มโอทองดี	1
2. นครปฐม	ส้มโอทองดี	22		ส้มแซ้ง	1
	ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	9		ส้มสายน้ำผึ้ง	3
	มะนาว	12		มะกรูด	1
	ส้มเปลือกบาง	1		มะนาว	1
	ส้มสายน้ำผึ้ง	1		ส้มแก้ว	1
3. ปราจีนบุรี	ส้มโอขาวใหญ่	6	8. สมุทรสาคร	มะนาว	4
	ส้มโอทองดี	17		ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	5
	ส้มโอขาวแดงกวา	2		ส้มโอพันธุ์ไร่เมล็ด	5
	มะนาว	4		ส้มเขียวหวาน	10
4. กรุงเทพมหานคร	ส้มแซ้ง	5	9. นครนายก	ส้มโอทองดี	15
	มะนาว	1		ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	3
	ส้มเขียวหวาน	7		ส้มโอขาวพวง	1
5. ราชบุรี	ส้มโอขาวใหญ่	10	10. สระแก้ว	มะกรูด	1
6. ชัยนาท	ส้มโอขาวแดงกวา	8		ส้มโอทองดี	191



ภาพที่ 4 แสดงพื้นที่ (★) ที่ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสฮิสเตซ่าในประเทศไทย

2. การสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้อเยื่อพืช

สกัดแยกอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้ส่วนของเส้นกลางใบพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ด้วยวิธี TLES buffer ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chowpongpan และคณะ (2002) โดยบดเส้นกลางใบพืชตระกูลส้ม ปริมาณ 0.1 กรัม ในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TLES buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS, 1% NaSO₃) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปแช่ในน้ำแข็ง แล้วเติม phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol อัตรา 24:1 ปริมาตร 1 เท่า เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม 4M LiCl ปริมาตร 1 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่เติม 0.1% DEPC ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ เติม 3M sodium acetate pH 5.4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม 100% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำที่เติม 0.1% DEPC ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR ในขั้นตอนต่อไป

3. ไพโรเมอร์

3.1 ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *p23* เพื่อตรวจแยกเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง (Sambade *et al.*, 2003) มีดังนี้

ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 612 bp ซึ่งเป็นส่วนของยีน *p23* แบบเต็มยีน คือ CTV-p23 FPM85/CTV-p23 RPM86 (Sambade *et al.*, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพโรเมอร์ มีดังนี้

CTV-p23 FPM85: 5'-GGACAAACTTTCGTTTCTGTGAACCTTTC-3'

CTV-p23 RPM86: 5'-GATGAAGTGGTGTTCACGGAGAACTC-3'

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 239 bp ซึ่งเป็นส่วนของยีน CTVp23-mild สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง คือ CTV-p23 PM84/CTV-p23 PM85 (Sambade *et al.*, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ มีดังนี้

CTV-p23 FPM85: 5'-GGACAAACTTTCGTTTCTGTGAACCTTTC-3'

CTV-p23 RPM84: 5'-CACTTACGTTTCAGTCTTCAAC-3'

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400 bp ซึ่งเป็นส่วนของยีน CTVp23-severe สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง คือ CTV-p23 PM82/CTV-p23 PM86 (Sambade *et al.*, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ มีดังนี้

CTV-p23 FPM82: 5'-AAACACGATAAGGCATCGAG-3'

CTV-p23 RPM86: 5'-GATGAAGTGGTGTTCACGGAGAACTC-3'

3.2 ออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาค (CTV-CP gene)

ออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV จากฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustal W>) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ค่า Tm และค่า GC ด้วยโปรแกรม FastPCR version 6.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ของเชื้อ CTV คือ CTV-CP1/CTV-CP2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์มีดังนี้

CTV-CP1: 5'-AAACTCCACCATCCCGAT-3'

CTV-CP2: 5'-GGGTCGTTAATTGACGAC-3'

4. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย

4.1 การเพิ่มปริมาณยีน *p23* ด้วยวิธี multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR)

โดยมีขั้นตอนการทำ RT-PCR ดังนี้

สังเคราะห์ Complementary DNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription (RT) ปฏิกริยาประกอบด้วย

2 pmole ไพรเมอร์ สาย R Mix	10.0	ไมโครลิตร
ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	3.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาเติมสารดังนี้

5X reverse transcriptase buffer	4.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.0	ไมโครลิตร
200 U/ μ l reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที 16 องศาเซลเซียส 10 นาที

การทำปฏิกริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *p23* ให้มากพอที่จะใช้ในการตรวจสอบ ปฏิกริยาประกอบด้วย

น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ	4.8	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	1.0	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
2 pmole ไพรเมอร์ สาย R Mix	1.0	ไมโครลิตร

2 pmole ไพรเมอร์ สาย F Mix	1.0	ไมโครลิตร
2 U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
cDNA (จากขั้นตอน RT)	2.0	ไมโครลิตร
รวม	11.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน	3	นาที	1	รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน	40	วินาที		
ขั้นที่ 3:	56°C	นาน	40	วินาที		
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน	40	วินาที	30	รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน	7	นาที	1	รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน	15	นาที	1	รอบ

ตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้น CTV-CP ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

โดยมีขั้นตอนการทำ RT-PCR ดังนี้

สังเคราะห์ Complementary DNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription (RT) ปฏิบัติโดย

2 pmole ไพรเมอร์ สาย R	10.0	ไมโครลิตร
ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	3.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาเติมสารดังนี้

5X reverse transcriptase buffer	4.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.0	ไมโครลิตร
200 U/ μ l reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที 16 องศาเซลเซียส 10 นาที

การทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น CTV-CP ให้มากพอที่จะใช้ในการตรวจสอบ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ	4.8	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	1.0	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
2 pmole ไพรเมอร์ สาย c	1.0	ไมโครลิตร
2 pmole ไพรเมอร์ สาย h	1.0	ไมโครลิตร
2 U/ μ l Taq DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
cDNA (จากขั้นตอน RT)	2.0	ไมโครลิตร
รวม	11.2	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน	3	นาที	1	รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน	40	วินาที		
ขั้นที่ 3:	52°C	นาน	40	วินาที		
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน	40	วินาที	30	รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน	7	นาที	1	รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน	15	นาที	1	รอบ

ตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

5. การโคลนยีน

นำตัวอย่างที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700, 600, 250 และ 400 คู่เบส จากการเพิ่มปริมาณยีน CTV-CP, CTV-p23, CTVp23-mild และ CTVp23-severe เพื่อโคลนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

5.1 การเตรียม PCR product ให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ

นำ PCR product มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย gel star เป็นเวลา 15 นาที และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ออกแบบไว้ของยีน CTV-CP, CTV-p23, CTVp23-mild และ CTVp23-severe คือ มีขนาดประมาณ 700, 600, 250 และ 400 bp ตามลำดับ แยกเจลแต่ละขนาดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำหนักเจล โดยจะต้องมีน้ำหนักไม่เกิน 400 มิลลิกรัม แยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invisorb® Fragment Clean Up เติม Gel solubilizer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักเจล 150 มิลลิกรัม นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ เติม Binding enhancer ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อสารละลายเจล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ spin column วางบน collection tube ดูดสารละลาย

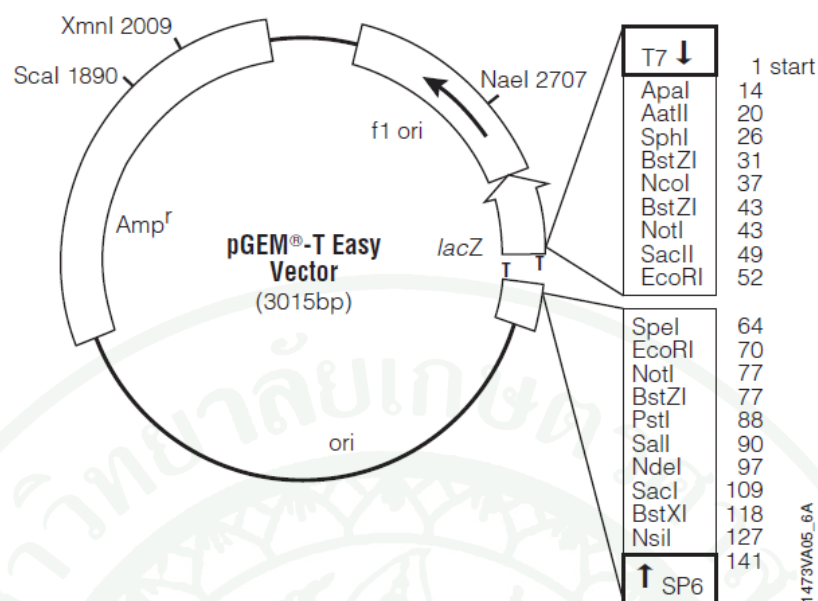
ผสมใส่ในชุด column โดยดูดสารละลายไม่เกิน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งน้ำใส่ในหลอด collection tube ล้าง spin column ด้วย wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้ column แห้ง ย้าย column ใส่หลอดใหม่เพื่อเก็บชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยเติม elution buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณของ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

5.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Inc., Madison, USA)

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาโคลนเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) (ภาพที่ 5) ด้วยเอนไซม์ T₄ DNA Ligase โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T ₄ DNA Ligase, 2X buffer	5.0	ไมโครลิตร
pGEM-T Easy vector	0.5	ไมโครลิตร
PCR product	3.5	ไมโครลิตร
T ₄ DNA Ligase (3 U/μl)	1.0	ไมโครลิตร
รวม	10.0	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน



ภาพที่ 5 แสดงรายละเอียดของ pGEM®-T Easy Vector (Promega)

5.3 การย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ถ่ายฝาก (transform) พลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5 α โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยการเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านปริมาตร 50 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่หลอดทดลองทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นระยะเวลา 5 นาที เติมน้ำอาหาร LB เหลว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเก่าทิ้ง เติมน้ำอาหาร LB เหลวใหม่ที่เติมแอมพิซิลลิน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปแทนเพื่อละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไป spread บนผิวหน้าอาหาร LB agar ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารประกอบ 5-bromo-4-chloro-3 indolyl- β -D-galactosides (X-gal) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ isopropylthio- β -D-galactosides (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5.4 การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดสายผสมโดยวิธี Blue-white colony screening โดยใช้ไม้ม้วนนิ่งมาเชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่มีสีขาวที่คาดว่าจะมีชั้นยีนอยู่มาตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยมีองค์ประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาเหมือนการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายนั้น ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis และเก็บรักษาโคลนที่มีชั้นยีนอยู่ในรูปของ *E. coli* suspension ที่มี 30% glycerol และแช่แข็งเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

5.5 การแยกสกัดพลาสมิดสายผสม

การแยกสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป FastPlasmid™ Mini kit คูณสารละลายเบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร LB เหลว ใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้ง เติม lysis solution buffer (ต้องอยู่ในที่เย็นตลอดเวลา) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไป vortex ประมาณ 1 นาที เพื่อให้ตะกอนเซลล์เบคทีเรียละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นจัดชุด column โดยนำ spin column วางบน collection tube คูณสารละลายผสมใส่ในชุด column โดยคูณสารละลายไม่เกิน 800 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย column ใส่หลอดใหม่เพื่อเก็บพลาสมิด เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของ พลาสมิดสายผสมด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดสายผสมที่ตรวจสอบได้แถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการ ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV ที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast ผ่านทางเครือข่ายอินเทอร์เน็ต <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST> เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด และนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ

7. การจัดจำแนกเชื้อ CTV ในประเทศไทย

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV โดยใช้ส่วนของยีน CTV-CP มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน โดยแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม sequence translation (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CTV-CP ด้วยโปรแกรม sequence translation เลือกใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) แสดงความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนของยีน CTV-CP ของเชื้อ CTV ที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในประเทศไทยและที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) ในรูป Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega Version 5.05

8. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (recombinant-coat protein; rCP) ของเชื้อ CTV

8.1 เตรียม Constructed expression vector

เพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5 α ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CTV-CP gene) ด้วยไพรมอร์คู่ใหม่ ที่ออกแบบโดยการเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ที่ forward primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ CPA: 5' - GGATCC ATG GAC GAC GAA ACA AA-3' และเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ *Hind* III ที่ reverse primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ CPB: 5'- AAGCTT TCA GAA TGC AAC GAA TC-3' ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่ได้จากโคโลนีชุดแรกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำไปย้อม

ด้วย gel star เป็นเวลา 15 นาที และตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CTV-CP gene) และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invisorb® Fragment Clean Up (Invitek, Berlin, Germany) เชื่อมต่อผลผลิตของปฏิกิริยาฟิซอร์ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM®-T Easy ชุดใหม่อีกครั้ง

จากนั้นตัดชิ้น CTV-CP gene ออกมาจากพลาสมิดด้วยวิธีการ double digestion โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Bam* HI และ *Hind* III (FastDigest® enzyme, Fermentas, Burlington, Canada) มีวิธีการดังนี้

กระบวนการ Double digestion

1. pGEM®-T easy vector / CTV-CP gene (0.5 µg/µl)	10.0	ไมโครลิตร
2. 10X buffer	8.0	ไมโครลิตร
3. <i>Bam</i> HI (10 U/µl)	2.0	ไมโครลิตร
4. <i>Hind</i> III(10 U/µl)	4.0	ไมโครลิตร
5. Deionized water (dH ₂ O)	56.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	80.0	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 60 โวลต์เป็นเวลา 70 นาที นำไปย้อมด้วย gel star เป็นเวลา 15 นาที และทำการตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นทำการชะ (eluted) ดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invisorb® Fragment Clean Up

8.2 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pQE-80L expression vector

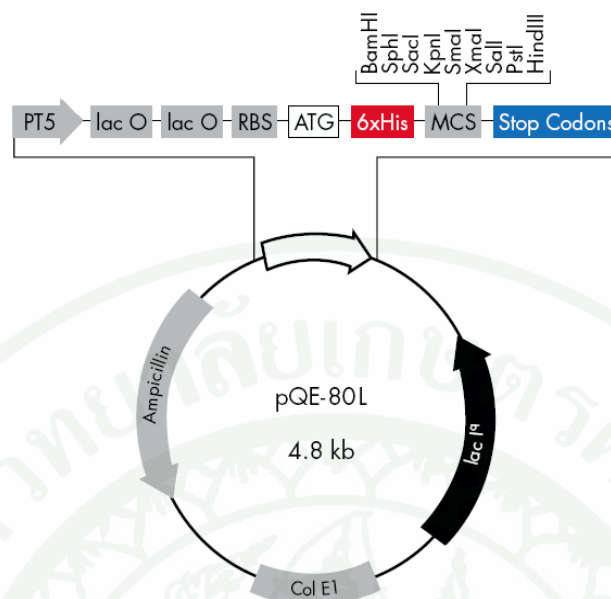
นำโคลนของ pQE-80L ที่ไม่มีชิ้น insert มา streak ลงบนอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีเดี่ยวของ

pQE-80L มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป FastPlasmid™ Mini kit (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) จากนั้นทำการตัดพลาสมิด pQE-80L ให้เป็นเส้นตรงด้วยกระบวนการ Double digestion โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam* HI และ *Hind* III (FastDigest® enzyme) (ภาพที่ 6) มีวิธีการดังนี้

กระบวนการ Double digestion

1. pQE-80L vector (0.5 µg/µl)	17.0	ไมโครลิตร
2. 10X buffer	8.0	ไมโครลิตร
3. <i>Bam</i> HI (10 U/µl)	2.0	ไมโครลิตร
4. <i>Hind</i> III (10 U/µl)	4.0	ไมโครลิตร
5. Deionized water (dH ₂ O)	49.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	80.0	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ หยดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที นำไปย้อมด้วย gel star เป็นเวลา 15 นาที และตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ทั้งสองชนิด จากนั้นทำการชะ (eluted) ดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Invisorb® Fragment Clean Up



ภาพที่ 6 แสดงรายละเอียดของ pQE-80L expression vector Qiagen (Invitrogen, Carlsbad, CA)

8.3 เชื่อมต่อยีนโปรตีนห่อหุ้ม (CTV-CP gene) เข้ากับพลาสมิด pQE-80L expression vector ตามวิธีการของ สรรชัย (2550)

เชื่อมต่อชิ้นส่วนของ CTV-CP gene เข้ากับพลาสมิด pQE-80L expression vector ด้วย เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega) ปฏิบัติการประกอบด้วย

น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	5.0	ไมโครลิตร
2X Rapid Ligation buffer	10.0	ไมโครลิตร
ชิ้น CTV-CP adapter (purified)	3.0	ไมโครลิตร
T ₄ DNA Ligase (3 unit/μl)	1.0	ไมโครลิตร
pQE-80L expression vector	1.0	ไมโครลิตร
ปฏิบัติการรวม	20.0	ไมโครลิตร

บ่มที่ตู้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

จากนั้นนำ ligation ที่ได้ถ่ายฝาก (transform) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวที่คาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธีการส้อม และตรวจหาชิ้นส่วน CTV-CP gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เลือกโคโลนีที่ให้ผลเป็นบวก เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีน CTV-CP

8.4 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

วิเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) และใช้โปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) ใช้ตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆของโปรตีน

8.5 การแสดงออกของโปรตีน CTV-CP gene และการเตรียมโปรตีน CTV-CP ให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Qiagen)

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มี CTV-CP gene แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pQE-80L ในอาหารเหลว 2YT ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เช้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นเติมเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนในอาหาร 2YT ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 ลิตร ในอัตราส่วน 1:20 เช้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่เชื้อเจริญวัดค่า OD₆₀₀ ไม่ควรเกิน 1.5 จากนั้นชักนำการสังเคราะห์โปรตีนโดยการเติมสาร IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลลาร์ เลี้ยงเชื้อต่ออีกประมาณ 5 ชั่วโมง เช้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง และสกัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี native condition โดยการใช้ buffer A, pH 8.0 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) ที่มี lysozyme ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในการละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และ Freeze/Thaw เซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหรือใช้ในโตรเจนเหลว จำนวน 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อนำไปใช้ในการสกัดโปรตีนสายผสมให้บริสุทธิ์ และเก็บตะกอนไว้เติม buffer C, (8 M Urea, 1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl) เป็นแบบ

denature condition ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธีการ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 6% stacking gel และ 12% separating gel (Laemmli, 1970)

เตรียมคอลัมขนาด 1.2 x 10 เซนติเมตร ที่บรรจุ Ni-NTA agarose resin ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ล้างคอลัมด้วย buffer A, pH 8.0 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) ปริมาตร 10 เท่า ของ Ni-NTA agarose resin จากนั้นนำสารละลายโปรตีนสายผสมที่ได้จากกระบวนการ native condition ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมค่อยๆ ดูดสารละลายลงไปเบาๆ อย่าให้ resin ฟุ้ง ปล่อยให้ส่วนใสไหลผ่านคอลัมออกมา (flow through) และล้างด้วย washing buffer, pH 7.6 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1% Tween-20) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นให้ชะล้าง (Elute) ด้วย Elution buffer, pH 3.0 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl) ปริมาตร 16 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมนี้ ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ด้วยหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร แต่ละหลอดจะมี 2 M Tris-HCl solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ให้เป็นกลาง เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นตอนไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 8000 spectrophotometer) และตรวจสอบโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ SDS-PAGE โดยใช้ 6% stacking gel และ 12% separating gel (Laemmli, 1970) ดังนี้

8.6 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เตรียมเจลแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ด้วยอุปกรณ์ Bio-Rad® โดยเตรียมเจลระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่สะอาดโดยใช้กระดาษซับที่ชุบด้วยแอลกอฮอล์ 95% เช็ดทำความสะอาดสะอาดกระจกทั้งสองด้านแล้วปล่อยให้แห้ง ประกบแผ่นกระจกทั้งสองเข้าด้วยกันโดยใช้ spacer หนา 1 มิลลิเมตร คั่นระหว่างแผ่นกระจก ตรวจสอบไม่ให้มีรอยร้าวก่อนนำเข้าเครื่องประกอบเจลแยกขนาดโปรตีนประกอบด้วยเจล 2 ส่วน โดยเจลส่วนล่าง คือ separating gel 12% ประกอบด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อปริมาตร 2.6 มิลลิลิตร 30% acrylamide ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร 10% SDS ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร 10% ammonium persulphate ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร TEMED 0.002 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อน รีบหยอดส่วนผสมที่ได้ลงสู่ช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ของชุดเตรียมเจล โดยให้ระดับเจลมีความสูงประมาณ 2/3 ของแผ่นกระจก รีบหยอดน้ำตามลงไปเพื่อให้ผิวเจลเรียบเสมอกันเมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้ซับน้ำส่วนบนออก แล้วหยอดเจลส่วนบน คือ 6% stacking gel เตรียมโดยผสมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อ ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร 30 % acrylamide ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร 1.0 M Tris-HCl pH 6.8 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

10% SDS ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร 10% ammonium persulphate ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร TEMED 0.002 มิลลิลิตร จากนั้นเสียบหัวทิ้งไว้นาน 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงค่อยๆ ดึงหัวออกเบาๆ จากนั้นประกอบกระจกแล้วนำไปใส่ใน tank เติม 1X running buffer (0.025 M Tris-HCl, 0.25 M glycine และ 0.1% SDS, pH 8.3) จนเต็ม tank

เตรียมตัวอย่างสำหรับ load gel โดยใช้ตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร กับ 2X sample buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือด 5-10 นาที และแช่ตัวอย่างหลังจากการต้มในน้ำแข็งทันที โดยโหลดตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อช่อง ใช้โปรตีนมาตรฐานเป็น protein marker ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ β -galactosidase จาก *E. coli*, bovine serum albumin จาก bovine plasma, ovalbumin จาก chicken egg white, เอนไซม์ lactate dehydrogenase จาก porcine muscle, เอนไซม์ REase Bsp981 จาก *E. coli*, β -lactoglobulin จาก bovine milk และเอนไซม์ lysozyme จาก chicken egg white มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 และ 14.4 kDa ตามลำดับ โหลดปริมาณ 10 ไมโครลิตรต่อช่อง ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้เพิ่มกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี coomassie blue R250 (0.25% coomassie brilliant blue R250, 40% methanol, 7% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาให้เทสีออก และล้างสีบนแผ่นเจลด้วย destaining solution 3 (30% methanol, 10% acetic acid) 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที เขย่าบน shaker หรือจนกระทั่งแผ่นเจลใสและสังเกตเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน จึงหยุดปฏิบัติการด้วยการแช่แผ่นเจลในน้ำ

8.7 การตรวจสอบโปรตีนลูกผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค โดยวิธี Western blotting

ตรวจสอบโปรตีนลูกผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค โดยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการของ (Clark and Adam, 1977) และใช้ mouse anti-His monoclonal antibody จากบริษัท GE Healthcare ในการทำปฏิกิริยา

8.7.1 การทำ Western blotting

เตรียม SDS-polyacrylamide gel จำนวน 2 แผ่น และนำโปรตีนลูกผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่บริสุทธิ์มา load ลงในเจลทั้ง 2 แผ่นโดยขั้นตอนการทำ SDS-PAGE ใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ (8.6) จากนั้นนำเจลแผ่นที่ 1 ไปย้อมด้วยสี Coomassie blue R250 ส่วนเจล

แผ่นที่ 2 จะนำไปเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจล ไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่อง electrotransblotter (Bio-rad, Richmond, CA) เพื่อนำไปตรวจสอบโปรตีนด้วย specific antibody ต่อไป

8.7.2 การเตรียม Gel cassette

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและกระดาษ 3M ให้มีขนาด 6.5 X 10 เซนติเมตร เตรียมขนาดพอเหมาะและไม่ลึกลงเกินไปที่สามารถทำงานได้สะดวก จากนั้นใส่ 1X TBS พอประมาณให้ท่วม gel cassette แฉ่แผ่นฟองน้ำ กระดาษ 3M และแผ่นแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน 1X TBS เรียงชั้นต่างของ gel cassette โดยเริ่มจากการวางแผ่นกระดาษ 3M ที่เปียก 2 แผ่นบนแผ่นฟองน้ำ ตามด้วย เจล, แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน, กระดาษ 3M อีก 2 แผ่น และฟองน้ำ ตามลำดับจากนั้นจึงปิด gel cassette

8.7.3 การเคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลไปยังไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (gel electroblotting)

ย้าย gel cassette ลงใน transblotting tank และเติม 1X TBS (Tris buffer saline) ลงใน tank ให้ท่วม gel cassette โดยหันเจลไปทางด้านขั้วลบ และแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอยู่ทางด้านขั้วบวก ปิด tank และเตรียมเคลื่อนย้ายโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 40 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที เมื่อครบเวลา ปิดเครื่อง และทำเครื่องหมายบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยการตัดมุมด้านใดด้านหนึ่ง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนออกจาก gel cassette (อย่างระมัดระวัง!) ใช้ TBS-T (Tris buffer saline, 0.05% Tween-20) เพื่อล้างเจลที่อาจติดอยู่บนแผ่นเมมเบรน และแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน blocking buffer (TBS-T, 5% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าเบาๆ โดยใช้เครื่องเขย่าล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ด้วย TBS-T วางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงบนกระดาษกรองผึ่งให้แห้ง และเก็บในถุงพลาสติกปิดปากถุงและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจสอบด้วย แอนติบอดี

8.7.4 การทำ Immunoblotting

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนออกมาแช่ใน primary antibody (mouse anti-His monoclonal antibody, GE Healthcare) ในความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่เจือจางใน TBS-T ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน secondary antibody (goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphase) (Sigma, USA) ที่เจือจาง 1:10,000 ใน TBS-T ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30-60 นาที ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนในสารละลาย substrate buffer ที่มี 10X BCIP buffer, 10X NBT solution และ dH_2O ในอัตราส่วน 1:1:8 จะได้ final concentration เท่ากับ 1X ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าจะเห็นปฏิกิริยาชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำกลั่น

9. การผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนลูกผสม (Recombinant coat protein) ของเชื้อ CTV โดย ใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด

9.1. กระต่าย

การฉีดโปรตีนแอนติเจนเข้าสัตว์ทดลองในการวิจัยครั้งนี้ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White rabbit ตามวิธีการของ รัชนี (2549) โดยใช้วิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) หลังจากการเตรียมโปรตีนแอนติเจนให้มีความบริสุทธิ์และทราบความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจนแล้ว จากนั้นฉีดโปรตีนแอนติเจนเข้าสัตว์ทดลองในการฉีดแอนติเจนให้กับสัตว์ทดลองแต่ละครั้งใช้โปรตีนประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตรต่อการฉีด 1 ครั้ง การฉีดแอนติเจนครั้งแรกจะใช้ในปริมาณที่ต่ำก่อน โดยผสมแอนติเจนกับ Complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมในกระบอกฉีดขนาด 5 มิลลิเมตร 2 อัน กับ Tree-way valve ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและหนีคจนไม่ละลายน้ำ ส่วนในการฉีดครั้งต่อไปจะผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วน 1:1 และผสมให้เข้ากันเช่นเดียวกับการเตรียมครั้งแรก หลังจากฉีดครั้งแรกแล้วควรทิ้งระยะห่างออกไปอีก 2-3 สัปดาห์ ก่อนการฉีดครั้งต่อไปเก็บแอนติซีรัมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

การเก็บแอนติซีรัมสำหรับใช้ตรวจสอบไม่ควรเก็บเลือดมากเกินไป หลังการเก็บเลือดให้ตั้งเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัว และใช้พลาสติกเกอร์ไปเปิดหรือคลิปลิ้นกระดากที่ถูกยึดเป็นเส้นตรง กรีดตามขอบด้านในของหลอดแก้วเพื่อไม่ให้เลือดที่แข็งตัวเกาะติดกับหลอดแก้ว จากนั้นเก็บเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ก้อนเลือดหดตัวและบีบส่วนที่เป็นของเหลวหรือซีรัมออกมา แยกส่วนที่เป็นน้ำใสออกจากก้อนเลือดโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งเก็บซีรัมใส่หลอดไมโครทิวป์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการเติม sodium azide (NaN_3) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 % หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9.2. ไข่ไก่

ไข่ไก่ Hi-sex อายุประมาณ 10 เดือน น้ำหนักประมาณ 1.8-2.0 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง ฉีดด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันกับที่ฉีดในกระดากไข่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการฉีด 1 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดที่ใต้ผิวหนังบริเวณคอไก่ ส่วนการฉีดครั้งต่อไปในสัปดาห์ที่ 2-4 จะใช้ incomplete Freund's adjuvant ด้วยอัตราส่วนเดิม ทำการเก็บไข่ก่อนการฉีดเพื่อเป็น preimmune และทำการเก็บไข่ทุกวันหลังจากฉีดครั้งแรกไป 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เตรียมอิมมูโนโกลบูลินจากไข่แดง (yolk immunoglobulin, IgY) ของไข่ไก่ (CHIgY) ตามวิธีการของ สรรชัย และคณะ (2546) โดยแยกไข่แดงออกจากไข่ขาว นำไข่แดงมากลั่นบนกระดากชำระเพื่อให้ไข่ขาวออกจากไข่แดงให้มากที่สุด ทำให้ไข่แดงแตกและวัดปริมาตร เจือจางไข่แดงอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ pH 5.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่มีแอนติบอดี (water soluble fraction, WSF) มากรองด้วยกระดาก Whatman # 2 นำส่วนน้ำใสที่กรองมาตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอัตราส่วน 0.39 กรัมต่อมิลลิลิตร กวนนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นตกตะกอนแอนติบอดีโดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.5X phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 0.2 เท่าของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้นและเติม 0.02% NaN_3 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก

ด้วยวิธี dialysis ในบัฟเฟอร์ 1X PBS ทันทีก่อนหุ้มนาน 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ครั้ง ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในงานต่อไป

10. ตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนลูกผสม (Recombinant - coat protein; rCP) ของเชื้อ CTV โดยวิธี Indirect plate trapped antigen-ELISA (indirect PTA-ELISA)

ตรวจวัดค่าไตเตอร์ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ตามวิธีการของ Clark and Adam (1977) เคลือบหลุม ELISA plate ด้วยโปรตีนลูกผสมใน coating buffer, pH 9.6 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมน้ำ blocking buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมน้ำแอนติบอดีที่เจือจาง 2 เท่า (2-fold dilutions) เริ่มจาก 1:1000 จนถึง 1:4,096,000 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมน้ำ Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase ที่เจือจางใน PBS 1:10,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมน้ำ substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที หรือจนเห็นปฏิกิริยาชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 3M NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Multiskan EX

11. การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assay

11.1 การหาความเจือจางของตัวอย่างพืชและแอนติบอดีที่เหมาะสมด้วยวิธี Indirect plate trapped antigen-ELISA (indirect PTA-ELISA)

บดเส้นกลางใบมะนาวปกติและมะนาวที่มีเชื้อ CTV ใน carbonate coating buffer, pH 9.6 ที่มี 0.2% sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (NaDIECA) อัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจือจางแบบ 2 เท่า (2 fold dilution) เริ่มเจือจาง 1:2 ถึง 1:32,736 เคลือบหลุม ELISA plate ด้วยน้ำคั้นพืชปกติและพืชเป็นโรค ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมน้ำ

blocking buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม primary antibody (RIgG หรือ ChIgY) ที่เจือจางใน blocking buffer เริ่มเจือจาง 1:200 ถึง 409,600 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย บัฟเฟอร์ PBS-T ตามวิธีเดิม จากนั้นเติม secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase หรือ Goat anti-chicken IgG with alkaline phosphatase) ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม สารละลาย *p*-nitrophenyl phosphatase (PNPP) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Multiskan EX

การคำนวณค่า signal-to-noise (S/N ratio) ของแต่ละความเจือจาง เพื่อเลือกค่าความเจือจางของแอนติซีรัมที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาซึ่งให้ค่า OD 405 นาโนเมตร ที่ดีที่สุด โดยค่า S/N ratio (Locarnini *et al.*, 1979) คำนวณได้จาก

$$\text{ค่า S/N ratio} = A_{405} \text{ ของ Positive control} / \text{ค่า } A_{405} \text{ ของ Negative control}$$

11.2 การเปรียบเทียบการใช้ RIgG หรือ ChIgY ในการเคลือบ plate ด้วยวิธี Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS- ELISA)

การเปรียบเทียบการใช้ RIgG หรือ ChIgY ในการเคลือบ plate ด้วยวิธี Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS- ELISA) เป็นการทดสอบแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในเบื้องต้น เพื่อนำข้อมูลไปใช้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป ซึ่งเลือกใช้วิธี TAS-ELISA เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้หลักการ sandwich ในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับหลักการของเทคนิค immunochromatographic assay อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่ายเหมาะสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น โดยเริ่มจากการเจือจาง primary antibody (RIgG หรือ ChIgY) ใน coating buffer, pH 9.6 ให้ได้ความเข้มข้น 1:400 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม blocking buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

บดตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบใน carbonate coating buffer, pH 9.6 ที่มี 0.2% sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (NaDIECA) อัตราส่วน 1:8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T (PBS + 0.05% Tween-20) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเจือจาง secondary antibody (RIgG หรือ ChIgY) ใน blocking buffer โดยให้ได้ความเข้มข้น 1:1,600 เติมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase หรือ Goat anti-chicken IgG with alkaline phosphatase ที่เจือจางใน 1XPBS (ใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที หรือจนเห็นปฏิกิริยาชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 3M NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มข้นของสีที่ได้ด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Multiskan EX

12. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ด้วยวิธี ELISA

ตรวจสอบความจำเพาะของ ChIgY และ RIgG ด้วยวิธี TAS - ELISA ตามวิธีในข้อ 11.2 ทดสอบกับน้ำคั้นพืชปกติ และน้ำคั้นจากพืชเป็นโรคไวรัสชนิดต่างๆ ทั้งหมด 15 ชนิด ได้แก่ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV) *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสเหล่านี้จาก ผศ.ดร. รัชนิ์ องประยูร เป็นเชื้อที่ซื้อมาจากบริษัท Agdia ในลักษณะใบแห้งบดเป็นผง *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaV-2) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชนิดนี้จาก อ.ดร. มณีนรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม จากใบพืชสด *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อนี้จาก อ.ดร. สุจินต์ ภัทรภูวดล จากใบพืชสด *Candidatus Liberibacter* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. สุภาพร กลิ่นคง จากใบพืชสด เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิ่งในมะนาว *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Brome mosaic virus* (BMV) และ *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) บดตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบใน carbonate coating buffer, pH 9.6 ที่มี 0.2% sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (NaDIECA) อัตราส่วน 1:8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจสอบ

13. การศึกษาประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อ CTV

การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA จากส่วนต่างๆ ของมะนาว ได้แก่ ยอด เนื้อ ใบ เส้นใบ เปลือกแก่ เปลือกอ่อน ที่ได้จากการปลูกเชื้อ CTV ด้วยวิธีติดตาบกิ่ง อายุประมาณ 6-12 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ จากนั้นบดตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชใน carbonate coating buffer, pH 9.6 ที่มี 0.2% sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (NaDIECA) ในอัตราส่วน 1:8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค TAS-ELISA และดำเนินการตามวิธีการข้อ 11.2

14. การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein ของเชื้อ CTV กับแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค TAS-ELISA

ตรวจสอบเชื้อ CTV ในตัวอย่างส้มที่เป็นโรคที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่างและตัวอย่างจากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยใช้แอนติบอดีที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein ของเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค TAS-ELISA และดำเนินการตามวิธีการข้อ 11.2 และเปรียบเทียบกับแอนติบอดีของบริษัท BIOREBA ซึ่งผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค TAS-ELISA ตามวิธีการของบริษัท

15. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ CTV

บดเส้นกลางใบมะนาวที่เป็นโรคในไนโตรเจนเหลว เดิม Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2-7.4 อัตราส่วน 1:4 เมื่อบดจนละเอียดแล้วให้ตั้งพักไว้ 30 นาที เพื่อให้เศษพืชตกตะกอน กรองด้วยกระดาษกรอง (electron microscope grids, 100-400 mesh) ที่เคลือบด้วย formvar-carbon ลงบนหยด แอนติบอดีที่เจือจาง 1:1000 ใน PBS ที่ทิ้งไว้ 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองลงบนหยด PBS ประมาณ 2 นาที จากนั้นนำกริดที่ลงบนหยดน้ำคั้นพืช ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างกริดลงบนหยด PBS ประมาณ 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองแต่อย่าให้แห้งสนิท ย้อมสีด้วย 2% Uranyl acetate (UA) นาน 1-2 นาที ซับให้แห้ง แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL-JEM 12230 electron microscope

16. พัฒนาริธีเบิองตันใการใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ใรูปแบบของ Diagnostic kit

16.1 การเตรียมแอนติบอดีสำหรับชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป (Immunochromatographic Strip, ICS)

16.1.1 การเตรียมแอนติบอดีบริสุทธิ์

16.1.1.1 Rabbit anti-CTV polyclonal antibody

ตกตะกอนแอนติบอดีจากซีรัมของกระต่ายด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% โดยปรับจากวิธีการของ (Hampton *et al.*, 1989) โดยใช้แอนติซีรัม 1 มิลลิลิตร เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำส่วนผสมมาตกตะกอนแอนติบอดีด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนแอนติบอดีที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนแอนติบอดีด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ปริมาตร 0.2 เท่าของปริมาตรแอนติบอดีเริ่มต้น กำจัดเกลือแอมโมเนียมออกด้วยวิธี dialysis ในบัฟเฟอร์ 1X PBS ทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ครั้ง ภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เตรียมได้ โดยการวัดค่าการกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และคำนวณค่าความเข้มข้นตามวิธีการของ (Clark and Adam, 1977) ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น RIgG (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{O.D. 280 nm} \times \text{dilution factor}}{1.4}$$

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยใช้ 6% stacking gel และ 12% separating gel

16.1.1.2 ChIg yolk anti-CTV polyclonal antibody

ตามวิธีการของ สรรชัย และคณะ (2549) ตกตะกอนแอนติบอดีด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอัตราส่วน 0.39 กรัมต่อมิลลิลิตร กวนนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นตกตะกอนแอนติบอดีโดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.5X phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 0.2 เท่าของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้นและเติม 0.02% NaN_3 แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส กำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธี dialysis ในบัฟเฟอร์ 1X PBS ทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ครั้ง ภายใน 24 ชั่วโมง และคำนวณค่าความเข้มข้นตามวิธีการของ (Leslie and Clem, 1969)

$$\text{ความเข้มข้น ChIgY (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{O.D. 280 nm} \times \text{dilution factor}}{13.18}$$

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยใช้ 6% stacking gel และ 12% separating gel

16.1.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยาของ RIGG-CTV และ ChIgY-CTV ด้วยวิธี Dot Immunobinding Assay (DIBA)

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 2 X 3 เซนติเมตร แช่ลงใน 1X TBS (Tris buffer saline, pH 7.4) ซับให้หมาดบนกระดาษกรอง หยดตัวอย่างลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม blocking buffer เขย่า 45 นาที ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม anti-CTV PAb ที่เจือจาง 1:2,000 ใน blocking buffer เขย่า 45 นาที ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน secondary antibody goat anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase (GAR-AP) ที่เจือจาง 1:10,000 ใน blocking buffer เขย่า 45 นาที ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการเติม substrate buffer สำหรับวิธีการ DIBA และเก็บในที่มืดนาน 10-30 นาที จนเกิดสีของปฏิกิริยา เมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจนจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น (วรพจน์, 2554)

16.1.3 การเชื่อมต่อนุภาคทองด้วยแอนติบอดี

นำ colloidal gold ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับ pH colloidal gold ให้ได้ pH 7.3-7.9 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ปริมาตร 34 ไมโครลิตร ผสมกับ แอนติบอดีที่เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร กวนส่วนผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 10% bovine serum albumin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กวนต่ออีก 1 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที หรือ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสออกทิ้งเบาๆ ระวังตะกอนฟุ้ง ละลายตะกอน ด้วย gold diluted buffer, pH 7.4 (0.02M Na_2HPO_4 , 1% Bovine Serum Albumin, 99% Fraction V และ 0.1% NaN_3) ให้มีปริมาตร 500-600 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับอนุภาคทอง ให้มีค่า OD 540 อยู่ ในช่วงประมาณ 0.2-0.3 เติม sucrose ในอัตราส่วน 20% เขย่าเบาๆ ให้ส่วนผสมละลายก่อนนำไปใช้ (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

16.1.4 การตรวจสอบ RIgG-CTV conjugated gold particles ด้วยวิธี DIBA

ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนขนาด 2 X 3 เซนติเมตร แช่ลงใน 1X TBS ซับให้หมาดบนกระดาษกรอง หยดตัวอย่างลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติม blocking buffer เขย่า 30 นาที ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ใน RIgG-CTV conjugated gold particles ที่เจือจาง 1:10 ใน 1X TBS เขย่า 2 ชั่วโมง นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและสังเกตปฏิกิริยา จากการเกิดสีชมพูแดงของอนุภาคทองที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (วรพจน์, 2554)

16.2 การเตรียมชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปเพื่อใช้ในการทดลอง

16.2.1 การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP (Rapid 27, Whatman[®]) ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ backing pad ที่เลือกใช้) วางบนกระดาษขาวที่สะอาด ใช้ฟู่กันเบอร์ 0 จุ่ม antibody conjugated gold ป้ายลงบน CRP ตรงกึ่งกลาง แผ่นโดยใช้ antibody conjugated gold ประมาณ 90-120 ไมโครลิตรต่อ 15-18 เซนติเมตร คิดเป็น

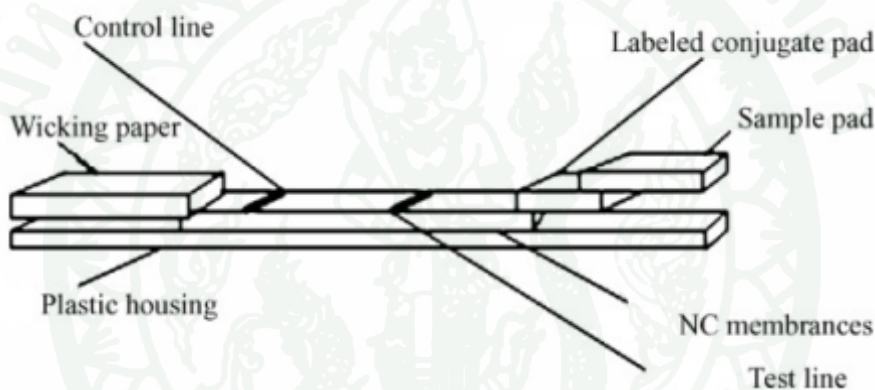
อัตราส่วน 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร นำไปบอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
 ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เก็บในที่แห้ง (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

16.2.2 การเตรียม test line และ control line

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Whatman®) มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร
 ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing card ใช้ดินสอทำเครื่องหมายด้านบนของ
 แผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมขอบของแผ่นไนโตรเซลลูโลส
 เมมเบรน ประมาณ 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร
 ใช้ปากกาหมึกซึม (ปากขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม GAR (goat anti rabbit เข้มข้น 1:3) จำนวน 40
 ไมโครลิตรต่อแผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรงและปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไป
 ทางขวาเบาๆ ไม่ต้องออกแรงกดปากกา ประคองปลายปากกาลากเส้นไปช้าๆ โดยให้เส้นที่เปียกบน
 แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน มีขนาดเท่ากัน หากปากกาแห้งนำกลับมาจุ่ม GAR ใหม่แล้วลากต่อ
 จากเส้นนั้น โดยให้มีความหนาของเส้นเท่ากันไปจนสุดปลายแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนทางขวามือ
 ใช้แอนติบอดีที่ผลิตจากไก่ไข่ (ChIgY-CTV antibody) ในการขีดเส้น test line โดยใช้ปากกาหมึก
 ซึมด้ามใหม่ (ปากขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มกับ ChIgY-CTV antibody (เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ
 มิลลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อแผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับเส้น control line นำไปบอบแห้งที่
 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

16.3 การประกอบชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

นำส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ Sample pad (SAP), CRP, แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และ absorbent pad (AP) มาประกอบลง backing pad โดยแกะพลาสติกด้านบนของ backing pad ออก เพื่อจะสามารถติดชิ้นส่วนลงไปได้ เริ่มจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนก่อนการติดด้วยความระมัดระวังอย่าให้เอียง ติด CRD โดยให้ติดเหลื่อมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเล็กน้อย ติด SAP โดยให้ติดเหลื่อมกับ CRP เล็กน้อย และตัด backing pad ให้มีขนาด 0.45 x 6 เซนติเมตร จากนั้นจึงค่อยติด AP เป็นชิ้นส่วนสุดท้าย เนื่องจาก AP มีความหนาทำให้ยากในการตัดหากกรรไกรหรือเครื่องตัดไม่คม จะทำให้ AP เสียหายได้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

ที่มา: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3094302_1743-422X-8-186-4&req=4

16.4 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแต่ละชนิดของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

ทดสอบบัฟเฟอร์ที่ใช้บดพืช 6 ชนิด ได้แก่ บัฟเฟอร์ที่แนะนำโดยบริษัท 3 ชนิด คือ ADGEN (General Extraction Buffer, pH 7.4), Agdia (General extraction buffer, pH 7.4) และ BIOREBA (General extraction buffer, pH 7.4) และบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆคือ CTV-extraction (Su, 2008), Na_2BO_3 , PBS-T เลือกชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมาใช้ในการบดตัวอย่างพืชทดสอบ คือ มะนาวปกติและมะนาวที่เป็นโรค และทดสอบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทั้ง 4 ชนิด คือ Prima85 (3 ไมครอน), Prima60 (5 ไมครอน), Prima40 (8 ไมครอน) และ AE99 (8 ไมครอน) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับชนิดของบัฟเฟอร์แต่ละชนิดในการทดสอบ โดยใช้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร และสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที เลือกใช้ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ทำให้การทำปฏิกิริยาดีที่สุด

16.5 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเชื้อ CTV ในน้ำคั้นพืชด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

บดตัวอย่างพืชทดสอบคือมะนาวปกติและมะนาวที่เป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ Na_2BO_3 อัตราส่วน 1:8 แล้วหยดลงในชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป ทั้ง 4 ชนิด คือ Prima85 (3 ไมครอน), Prima60 (5 ไมครอน), Prima40 (8 ไมครอน) และ AE99 (8 ไมครอน) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร จับเวลาเมื่อเริ่มจุ่มชุดตรวจสอบลงในน้ำคั้นพืชจนเห็นปฏิกิริยาชัดเจน เลือกใช้ชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ทำให้การทำปฏิกิริยาดีที่สุด

16.6 การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

บดตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรคบัฟเฟอร์ Na_2BO_3 อัตราส่วน 1:2 จากนั้นเจือจางแบบ 2 เท่า (2-fold dilution) ตั้งแต่อัตราส่วน 1:2 จนถึง 1:64 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) แล้วหยดลงในชุดตรวจสอบ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร โดยมีมะนาวปกติเป็น negative control สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที

16.7 การตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อมะนาวเป็นโรคด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป

นำต้นมะนาวที่เป็นโรคมะนาวเป็นโรคมาตัดแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่ ยอด เนื้อใบ เส้นใบ เปลือกอ่อน และเปลือกแก่ จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ได้มาบดในบัฟเฟอร์ Na_2BO_3 ในอัตราส่วน 1:8 แล้วหยดลงในชุดตรวจสอบ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที

16.8 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิค-สตริป

ทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป กับเชื้อไวรัสสาเหตุโรคนิตต่างๆ ทั้งหมด 15 ชนิด ได้แก่ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสเหล่านี้จาก ผศ.ดร. รัชณี สงประยูร เป็นเชื้อที่ซื้อมาจากบริษัท Agdia ในลักษณะใบแห้งบดเป็นผง *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaV-2) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชนิดนี้จาก อ.ดร. มณีรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม จากใบพืชสด *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก อ.ดร. สุจินต์ ภัทรภูวคล จากใบพืชสด *Candidatus Liberibacter* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. สุภาพร กลิ่นคง จากใบพืชสด เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิงในมะนาว *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Brome mosaic virus* (BMV) และ *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) บดในบัฟเฟอร์ Na_2BO_3 อัตราส่วน 1:8 แล้วหยดน้ำคั้นพืชของแต่ละตัวอย่างลงในชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป แต่ละชิ้น ปริมาตร 70 ไมโครลิตร สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที

17. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตรีปกับวิธี TAS-ELISA

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตรีปกับวิธี TAS-ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ CTV ในตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรคที่ระดับค่าการเจือจางตั้งแต่ 1:2 จนถึง 1:65,000 เพื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ CTV จากทั้ง 2 วิธี

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารปฏิบัติการวิจัยศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

ใช้ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2553 ถึงเดือนกรกฎาคม 2555

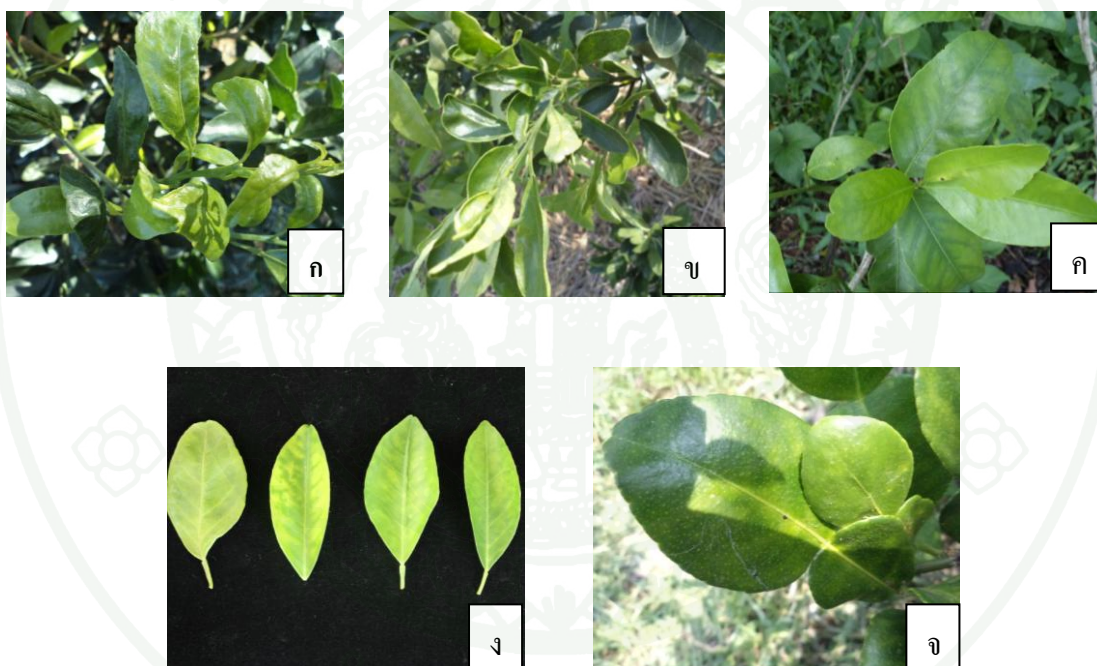
ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชัยนาท นครปฐม กรุงเทพมหานคร สระแก้ว นครนายก และปราจีนบุรี ทั้งหมด 418 ตัวอย่าง ในพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มโอ มะนาว ส้มเปลือกบาง ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มเซ้ง ส้มแก้ว มะกรูด และส้มเขียวหวาน ลักษณะอาการของโรคที่พบสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนต้นมะนาว ได้แก่ อาการเส้นใบสี สามารถพบได้มากในมะนาวโดยเฉพาะใบอ่อนเมื่อส่องกับแสงแดดจะเห็นอาการชัดเจน ใบจะมีลักษณะโปร่งแสงและสีเป็นช่วงๆ ของเส้นใบ และเส้นกลางใบกลายเป็นรอยประที่เส้นใบ ส่วนอาการใบด่างพบได้ทั้งใบแก่และใบอ่อน โดยอาการใบด่างเกิดได้หลายลักษณะ ทั้งอาการใบด่างสีเหลืองสลับเขียวทั่วทั้งใบ ด่างเป็นจุดประเล็กๆ ทั่วทั้งใบ หรือเหลืองเกือบทั้งใบ ส่วนอาการใบเป็นรูปถ้วยสำรวจพบได้ในใบอ่อนมากกว่าใบแก่โดยใบจะมีลักษณะงุ้มเข้าด้านหน้าใบลดรูปลง มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติลักษณะอาการที่ปรากฏสอดคล้องกับของ ลัดดาวัลย์ (2550) และ Hancevic *et al.* (2013) (ภาพที่ 8) และอาการที่พบชัดเจนในส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง ส้มแก้ว ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มเปลือกบาง และมะกรูด เช่น อาการใบรูปถ้วย อาการใบหงิกงอและบิดเบี้ยวจนผิดรูปสำรวจพบได้ในใบอ่อนมากกว่าใบแก่ (ภาพที่ 9) ส่วนลักษณะอาการที่พบในส้มโอพบว่าแสดงอาการไม่ชัดเจนโดยสีและรูปร่างของใบมีลักษณะปกติเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อ CTV แต่พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะอาการใบด่างเป็นจำเขียวคล้ายกับอาการของโรคกรีนนิ่ง



ภาพที่ 8 ลักษณะอาการของเชื้อ CTV ที่พบบนมะนาวที่พบในประเทศไทย เช่น เส้นใบประ โปรง แสง (ก), ใบมีอาการด่างสีเหลือง (ข), ใบรูปกล้วย (ค)



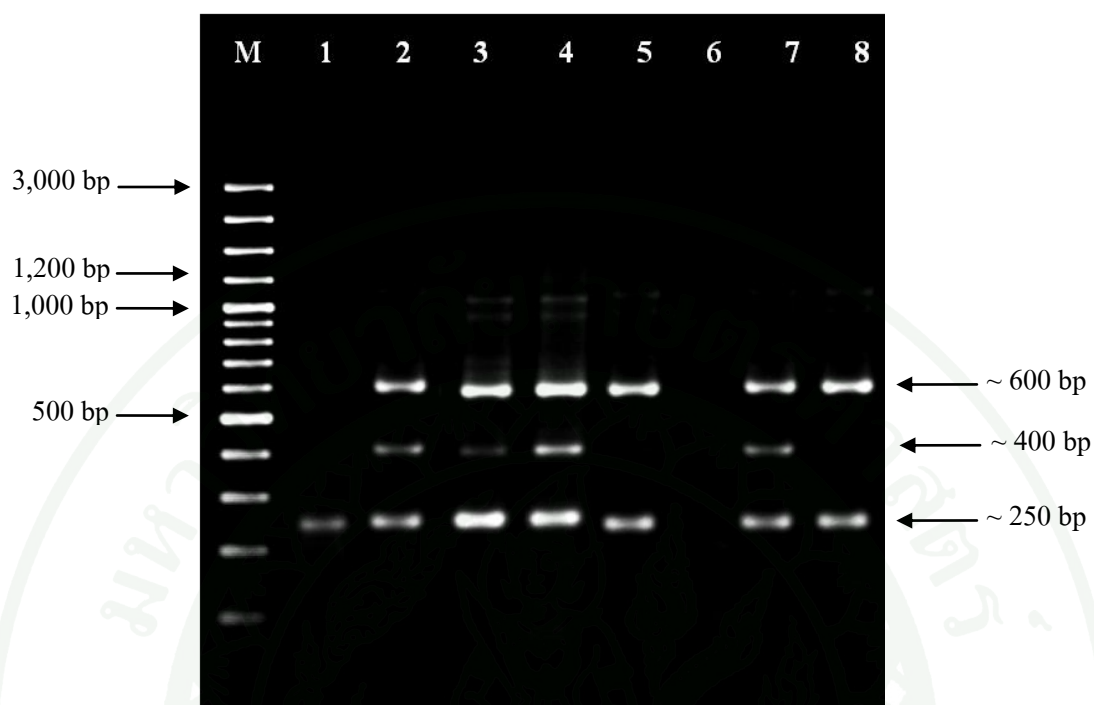
ภาพที่ 9 ลักษณะอาการของเชื้อ CTV ที่เกิดบนพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน แสดงอาการใบ หักงอและบิดเบี้ยวจนผิดรูป (ก), ส้มสายน้ำผึ้ง แสดงอาการใบหักงอและบิดเบี้ยวจนผิดรูป (ข), ส้มแก้ว แสดงอาการใบด่างซีด (ค), ส้มเซ้ง แสดงอาการใบด่างเหลือง (ง), มะกรูด แสดงอาการใบด่างเหลืองเป็นจ้ำ (จ)

2. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย

จากการสังเคราะห์ยีน *p23* ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CTV-p23 FPM82/CTV-p23RPM86 และ CTV-23RPM84/CTV-p23RPM85 สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 600, 400 และ 250 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 10) ในการตรวจสอบเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส จำนวน 30 ตัวอย่าง ส่วนเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 239 คู่เบส จำนวน 34 ตัวอย่าง และจากการสังเคราะห์ยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคจากอาร์เอ็นเอของเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CTV-CP1/CTV-CP2 สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 34 ตัวอย่าง (ภาพที่ 11) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อ CTV จากการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CTV-CP1/CTV-CP2 และการสังเคราะห์ยีน *p23* ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CTV-p23 FPM82/CTV-p23RPM86 และ CTV-23RPM84/CTV-p23RPM85 พบว่าในส้มโอตรวจพบเชื้อ CTV น้อยที่สุด คิดเป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในมะนาว มะกรูด และส้มเขียวหวาน คิดเป็น 36, 50 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในส้มเขียว และส้มแก้ว ตรวจพบเชื้อ CTV มากที่สุด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าส้มแก้วจะมีตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาแค่เพียงตัวอย่างเดียว แต่การตรวจพบเชื้อ CTV ทำให้ทราบว่าส้มแก้วก็เป็นแหล่งของเชื้อ CTV ที่จะระบาดสู่ส้มเศรษฐกิจได้ ฉะนั้นการปฏิบัติทางเขตกรรมต้องมีความระมัดระวังด้วย และพบว่าเชื้อ CTV ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นแบบ mix infection ระหว่างเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain) เนื่องจากตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด ในตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่นำมาตรวจสอบ เช่น มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเขียว และส้มแก้ว พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 239 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดที่ออกแบบไว้สำหรับการตรวจเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง ตามลำดับ แต่ยกเว้นในส้มโอไอโซเลท PMktg 1CN, PMktg 6CN และ PMky 11SNb และมะกรูดไอโซเลท CH 3/6 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 239 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) (ตารางที่ 2)

โดยอาการที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่ไม่รุนแรงเท่ากับที่เกียรยงานในต่างประเทศว่าต้นส้มที่มีเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ที่เข้าทำลายส้มจะทำให้ต้นส้มแสดงอาการรุนแรง เช่น อาการลำต้นบวม อาการต้นโทรมและตายลงอย่างรวดเร็ว เป็นต้น (Niblett *et al.*, 2000) แต่อาการที่พบในประเทศไทย เช่น อาการเส้นใบใส อาการเส้นใบประปรังแสง อาการใบรูปถ้วย อาการใบหงิกและม้วนงอ เป็นต้น เนื่องจากว่ามีเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain)

เข้าทำลายร่วมด้วยในลักษณะ mix infection ทำให้ลักษณะอาการที่แสดงออกไม่รุนแรง เนื่องจากว่ามีกลไกการตอบสนองต่อกระบวนการ post transcription gene silence (PTGS) ต่อเชื้อไวรัสในพืชอาศัยระหว่างเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง โดยเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) จะมีการสร้าง small-interfering (si)-RNAs ขึ้นทำให้สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (mild strain) ได้ โดยจะย่อย genomic และ subgenomic RNAs ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ทำให้เชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (Fagoaga *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2007) ซึ่งกระบวนการนี้อาจเป็นการควบคุมโรคในแบบ cross protection ในสภาพธรรมชาติ



ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอของเชื้อ CTV จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน *p23* ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis

- ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
- ช่องที่ 1 = PMktg 1CN ที่มีเชื้อ CTV
- ช่องที่ 3-4 = เชื้อ CTV เข้าทำลายพืชตระกูลส้มอื่นๆ
- ช่องที่ 5 = CH3/6 NN ที่มีเชื้อ CTV
- ช่องที่ 7 = พืชปกติ
- ช่องที่ 8 = ตัวอย่างมะนาวที่มีเชื้อ CTV
- ช่องที่ 9 = ตัวอย่างมะนาวที่มีเชื้อ CTV เจือจางกับพืชปกติ
(อัตราส่วน พืชปกติ : พืชเป็นโรค, 9:1)



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอของเชื้อ CTV จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ด้วยเทคนิค RT-PCR มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ลูกศรชี้) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis

- ช่องที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
 ช่องที่ 1 = น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ
 ช่องที่ 2 = ตัวอย่างมะนาวปกติ
 ช่องที่ 3 = ตัวอย่างมะนาวที่มีเชื้อ CTV
 ช่องที่ 4-7 = ส้มเขียวหวานที่มีเชื้อ CTV

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ CTV จากตัวอย่างพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

ชนิดของส้ม	จำนวนตัวอย่าง	ผลการเพิ่มปริมาณอินเป้าหมาย				
		CTV-CP	เปอร์เซ็นต์ การเข้าทำลาย	CTV-p23 mild	CTV-p23 severe	Mix infection
ส้มโอ (<i>C. maxima</i>)	365	3	0.8 %	3	-	-
มะนาว (<i>C. aurantifolia</i> Swing.)	22	9	36 %	-	-	9
ส้มเขียวหวาน (<i>C. reticulata</i> Blanco)	22	14	64 %	-	-	14
ส้มเขียว (<i>C. sinensis</i> Osb.)	6	6	100 %	-	-	6
มะกรูด (<i>C. hystrix</i> DC.)	2	1	50 %	1	-	-
ส้มแก้ว (<i>C. nobilis</i> Lour.)	1	1	100 %	-	-	1

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CTV ทั้ง 3 ยีน ได้แก่ ยีน CTV-CP มีขนาด 672 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับ Barzegar *et al.* (2006) ที่ได้รายงานไว้ ส่วนยีน CTVp23-mild มีขนาด 239 คู่เบส และยีน CTVp23-severe มีขนาด 400 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันกับ Sambade *et al.* (2003) ได้ใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันนี้ในการเพิ่มปริมาณยีน *p23* ในการตรวจสอบเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain) ในพืชตระกูลส้ม

4. การจัดจำแนกเชื้อ CTV ในประเทศไทย

4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV โดยเลือกมาทั้งหมด 19 ไอโซเลท จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในประเทศไทยและเปรียบเทียบกับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 3) วิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์และถอดรหัสกรดอะมิโนจากข้อมูลของดีเอ็นเอโดยตรง ด้วยโปรแกรม sequence translation (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV มีความยาว 672 นิวคลีโอไทด์ และถอดรหัสกรดอะมิโนได้ 223 อะมิโน ได้โปรตีนที่มีขนาด 25 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดเท่ากับ Nurhadi *et al.* (2003) ที่ได้รายงานไว้ โดยมีรหัสเริ่มต้นในการแปลรหัสเป็นโปรตีน คือ ATG และรหัสหยุด คือ TGA (ภาพที่ 12) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม EBI ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) และพบว่าเชื้อ CTV ทั้ง 19 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ระดับ 89-100 % และ 94-100 % ตามลำดับ และนำเชื้อ CTV ทั้ง 19 ไอโซเลท ในประเทศไทยมาเปรียบเทียบกับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ระดับ 89-100% และ 94-100 % ตามลำดับ

MDDETKKLKNKNKETKEGDDVVAAESSFGSVNLHIDPTLIAMNDVRQLGTQQNAALNR
DLFLTLKGKYPNLPDKDKDFHIAMMLYRLAVKSSSLQSDDDTTGMTYTREGVEVELPD
KLWTDVVFNBSKGIGNRTNALRVWGRNDALYLAFCRQNRNLSYGGRRPLDAGIPAGYHY
LCADFLTGAGLTDLECAVYIQAKEQLLKKRGADDEVIVTNVRQLGKFNTR*

ภาพที่ 12 ลำดับกรดอะมิโนของ coat protein gene มีขนาด 223 เรซิดิวส์

4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CTV ในรูป phylogenetic tree

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV ทั้ง 19 ไอโซเลต ของประเทศไทยและเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 3) โดยวิธี neighbor-joining แสดงความสัมพันธ์ในรูป phylogenetic tree (ภาพที่ 13) พบว่าเชื้อ CTV ถูกจัดแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) กลุ่ม B เป็นเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) พบว่าเชื้อ CTV ในประเทศไทยเกือบทุกไอโซเลตถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ยกเว้นไอโซเลต CH3/6NN ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม B ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) และจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *p23* พบว่าพืชตระกูลส้มในประเทศไทยที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และ ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ และ 239 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (Sambade *et al.*, 2003) ได้เกือบทุกไอโซเลต แสดงว่าการใช้ยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของเชื้อ CTV ในการจัดกลุ่มสามารถจำแนกเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และ ไม่รุนแรง (mild strain) ได้ เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Hancevic *et al.* (2013) ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของพืชทดสอบในการจำแนกสายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในไอโซเลต T30 และ T385 ตำแหน่งที่ 122 และ 124 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น I และ Y เป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ส่วนในเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ในไอโซเลต SY568, NUagA และ T381A ใน ตำแหน่งที่ 122 และ 124 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น V และ F ซึ่งลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 และ 124 ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีความสำคัญมากในการแยกเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และ ไม่รุนแรง (mild strain) (Jiang *et al.*, 2008 ; Long *et al.*, 2010) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ CTV ไอโซ

เลท CH3/6NN ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับไอโซเลท T30 และ T385 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 และ 124 เป็น V และ F ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกันกับเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 127 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น R ซึ่งมีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนที่เป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain) แสดงว่าเชื้อ CTV ที่พบในประเทศไทยอาจจะเกิดการ mutation ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บางส่วน จึงมีผลทำให้มีลำดับกรดอะมิโนต่างจาก wild type ได้ และพบว่าเชื้อ CTV ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นแบบ mix infection ระหว่างเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain)

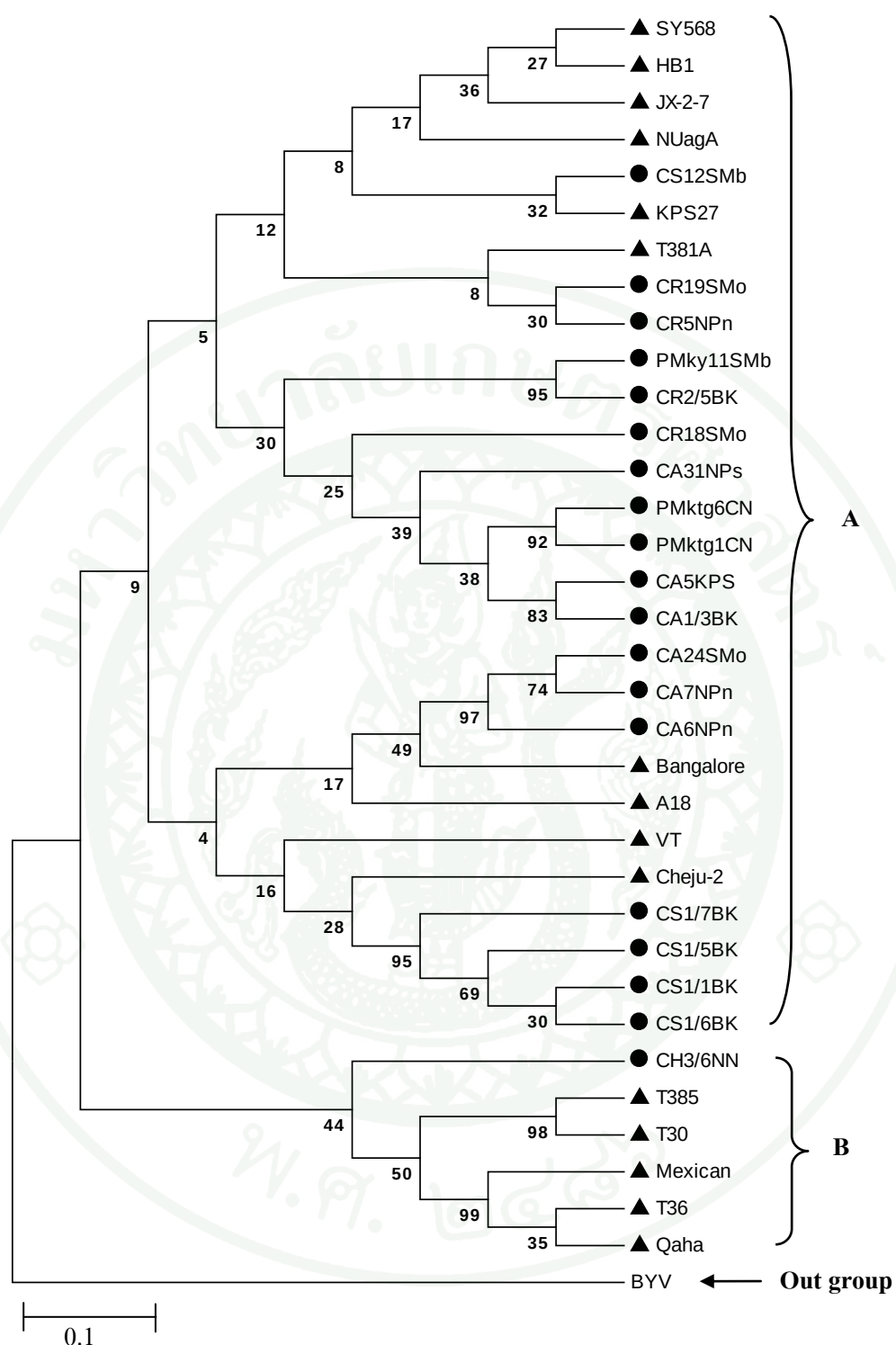
สำหรับเชื้อ CTV ที่ตรวจพบในส้มโอ ไอโซเลท PMktg1CN, PMktg6CN และ PMky11SMb เมื่อตรวจด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR พบว่าตรวจพบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 239 เท่านั้น แต่เมื่อถูกนำไปจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A เป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ CTV ที่เข้าทำลายส้มโออาจจะเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรงแต่เนื่องด้วยส้มโอเป็นพืชที่ต้านทานต่อเชื้อ CTV ทำให้เชื้อ CTV ที่เป็นสายพันธุ์รุนแรงเพิ่มปริมาณได้น้อย (Ayavous *et al.*, 2011) ทำให้ตรวจไม่พบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเชื้อ CTV จำนวน 19 ไอโซเลต ที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในประเทศไทยและข้อมูลเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

Isolate	Pathogenicity	Accession number	Host	Sources
1. T385	Mild	Y18420	<i>C. sinensis</i>	Spain
2. T36	Quick decline	U16304	<i>C. aurantifolia</i>	USA, Florida
3. VT	stem pitting, quick decline	U56902	<i>C. sinensis</i>	Israel
4. T30	Mild	AF260651	<i>C. sinensis</i>	USA, American
5. SY568	Seedling yellowing and stem pitting	AF001623	grapefruit	USA, California
6. T381A	stem pitting	DQ151548	grapefruit	Spain
7. NUagA	Seedling yellowing and stem pitting	AB046398	<i>C. unshiu satsuma mandarin</i>	Japan
8. Bangalore	stem pitting	AF501867	<i>C. aurantifolia</i>	India
9. JX-2-7	stem pitting	AY953980	<i>C. sinensis</i>	Jiangxi, China
10. HB1	stem pitting	EF028326	<i>C. aurantifolia</i>	Hubei, China
11. Cheju-2	stem pitting	AF339088	<i>C. unshiu</i>	Korea
12. KPS27	no determined	AM075622	<i>C. hystrix</i>	Malaysia
13. A18	stem pitting	JQ798289	<i>C. reticulata(mandarin)</i>	Thai
14. Mexican	No determined	AY340974	-	Egypt
15. Qaha	No determined	DQ272579.1	-	Mexico
16. PMktg6CN			<i>C. Maxima</i>	Thai (Chainat)
17. PMky11SMb			<i>C. Maxima</i>	Thai (Samut Songkhram:bangkhonthi)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Isolate	Pathogenicity	Accession number	Host	Sources
18. PMktg1CN			<i>C. Maxima</i>	Thai (Chainat)
19. CS12SMb			<i>C. sinensis</i>	Thai (Samut Songkhram:bangkhonthi)
20. CR18SMo			<i>C. reticulate</i>	Thai (Samut Songkhram:ompawa)
21. CR19SMo			<i>C. reticulate</i>	Thai (Samut Songkhram:ompawa)
22. CA24SMo			<i>C. aurantifolia</i>	Thai (Samut Songkhram:ompawa)
23. CA31NPs			<i>C. aurantifolia</i>	Thai (Nakhon Pathom)
24. CR5NPn			<i>C. reticulate</i>	Thai (Nakhon Pathom)
25. CA6NPn			<i>C. aurantifolia</i>	Thai (Nakhon Pathom)
26. CA7NPn			<i>C. aurantifolia</i>	Thai (Nakhon Pathom)
27. CA5KPS			<i>C. aurantifolia</i>	Thai (Nakhon Pathom)
28. CS1/1BK			<i>C. sinensis</i>	thai (Bangkok)
29. CA1/3BK			<i>C. aurantifolia</i>	thai (Bangkok)
30. CS1/5BK			<i>C. sinensis</i>	thai (Bangkok)
31. CS1/6BK			<i>C. sinensis</i>	thai (Bangkok)
32. CS1/7BK			<i>C. sinensis</i>	thai (Bangkok)
33. CR2/5BK			<i>C. reticulate</i>	thai (Bangkok)
34. CH3/6NN			<i>C. hystrix</i>	thai (nakhonnayok)

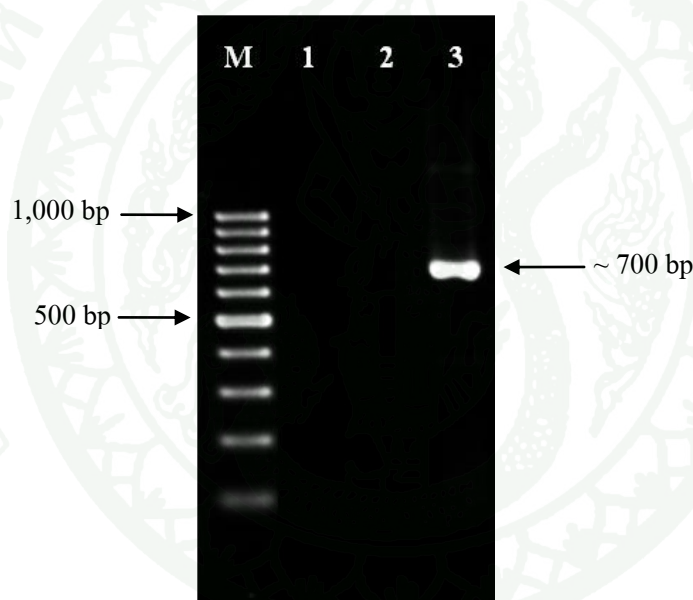


ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV ในประเทศไทย (●) เปรียบเทียบกับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (▲) และเปรียบเทียบเชื้อนอกสกุล (BYV) โดยวิธี neighbor-joining ตัวเลขกำกับเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 1,000 ครั้ง

5. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม (Recombinant – coat protein) ของเชื้อ CTV

5.1 เตรียม Constructed expression vector

นำโคลนของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มี CTV-CP gene ที่เก็บรักษาไว้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CPA/ CPB ซึ่งมีการออกแบบที่ต่อส่วนของ adapter ที่เป็นตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III เพื่อนำชิ้นยีนนี้ไปใช้ในการผลิตโปรตีน จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter มีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จากการสังเคราะห์ยีน CTV-CP adapter ของเชื้อ CTV ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CPA/CPB

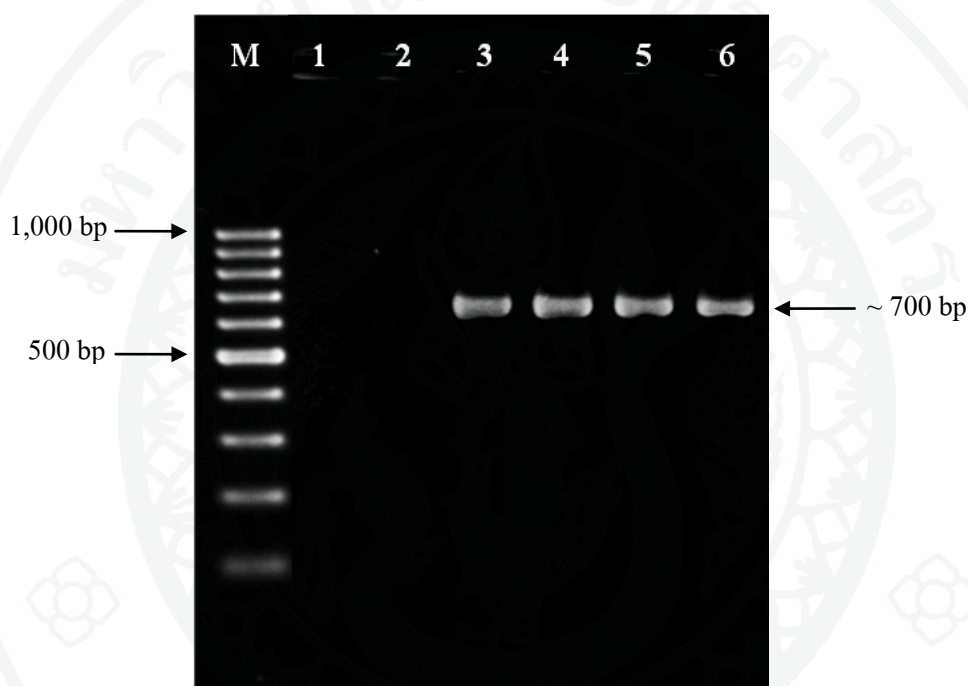
ช่องที่ M = Marker 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ช่องที่ 1 = น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

ช่องที่ 2 = โคลน *E. coli* DH5 α ปกติ

ช่องที่ 3 = โคลน *E. coli* DH5 α ที่มีชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter

จากนั้นสกัดแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จากอะกาโรสเจลแล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy ชุดใหม่อีกครั้ง โดยมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (GGATCC) และ *Hind* III (AAGCTT) ทางด้าน forward และ reverse ตามลำดับ ตรวจสอบโคลนที่ได้รับยีน CTV-CP adapter ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยสุ่มเลือกโคลนนี้สีขาวมาตรวจสอบจำนวน 4 โคลน พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ ทั้ง 4 โคลน และไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวใน *E. coli* ปกติ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แสดงแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ จากการตรวจสอบโคลน *E. coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายยีน CTV-CP adapter ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CPA/ CPB

ช่องที่ M = Marker 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ช่องที่ 1 = น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

ช่องที่ 2 = โคลน *E. coli* DH5 α ปกติ

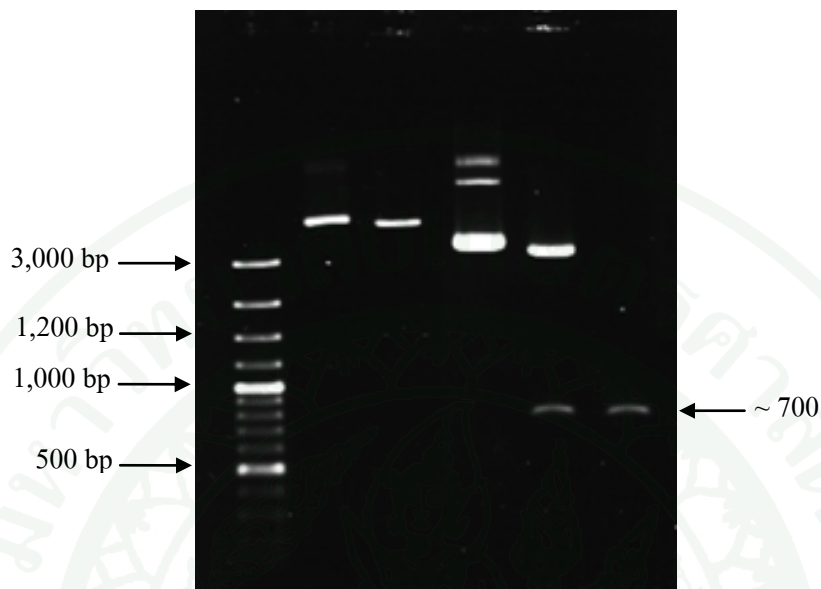
ช่องที่ 3-6 = โคลน *E. coli* DH5 α ที่ชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter

สุ่มเลือกโคลน *E.coli* DH5 α โคลนที่ 1 ที่ได้รับยีน CTV-CP adapter ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CTV-CP adapter มีขนาด 672 นิวคลีโอไทด์ โดยมีตำแหน่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (GGATCC) และ *Hind* III (AAGCTT) ทางด้านปลาย 3' และทางด้านปลาย 5' ตามลำดับ

5.2 เชื่อมต่อจีเอ็นเออินโปรตีนห่อหุ้ม (CTV- CP gene) เข้ากับพลาสมิด pQE-80L expression vector

จากการนำพลาสมิดสายผสม (pGEM[®] -T Easy/CTV-CP adapter) ที่สกัดได้และผ่านการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตัดชิ้นส่วนยีน CTV-CP adapter ออกจากพลาสมิดพาหะ (pGEM[®] -T Easy) ด้วยวิธี Double digestion โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam* HI และ *Hind* III เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าพลาสมิดสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอของพลาสมิด pGEM[®] -T Easy ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอของ CTV-CP adapter ขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิดสายผสม (pGEM[®] -T Easy/CTV-CP adapter) ที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ดังกล่าว (ภาพที่ 16)

จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III ที่ เข้ากับพลาสมิดพาหะ pQE-80L expression vector ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III ด้วยเอ็นไซม์ T4-ligase (Promega) และตรวจสอบ *E.coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายยีน CTV-CP adapter ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากการเชื่อมต่อพลาสมิดสายผสมของ pQE-80L/ CTV-CP adapter และถ่ายฝากให้กับ *E. coli* DH5 α โดยสุ่มเลือกโคโลนีขึ้นมาจำนวน 14 โคโลนี พบว่าทุกโคโลนีให้ผลเป็นบวกโดยพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ และนำไปวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาว 672 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อเทียบกับโคโลนีปกติที่ไม่มียีน CTV-CP adapter ให้ผลเป็นลบ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ ของยีน CTV-CP adapter จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III (double digestion)

- ช่องที่ M = Marker 100 bp DNA ladder plus (Fermentas)
- ช่องที่ 1 = พลาสมิดพาหะ pQE-80L (expression vector)
- ช่องที่ 2 = พลาสมิดพาหะ pQE-80L ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III
- ช่องที่ 3 = พลาสมิดสายผสม (pGEM[®] -T Easy/CTV-CP adapter)
- ช่องที่ 4 = พลาสมิดสายผสมตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Hind* III
- ช่องที่ 5 = ดีเอ็นเอชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter



ภาพที่ 17 การตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ จากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector และคัดเลือกลูกอาหาร LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และให้ผลบวกทุกโคลน คือ โคลนที่ 3-16

- ช่องที่ M = Marker 100 bp DNA ladder (Fermentas)
 ช่องที่ 1 = น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ
 ช่องที่ 2 = โคลน *E. coli* DH5 α ปกติ
 ช่องที่ 3-16 = โคลน *E. coli* DH5 α ที่มีชิ้นส่วนของยีน CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector

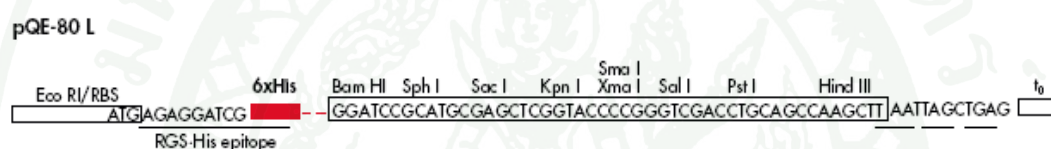
5.3 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของโปรตีนลูกผสม (CTV-CP adapter/ pQE-80L expression vector)

จากการโคลนยีนของ CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector พบว่าชิ้นยีนมีขนาด 672 นิวคลีโอไทด์ มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนจำนวน 223 เรซิดิวส์ โดยมีลำดับการเรียงตัวดังนี้

```
MDDETKKLKNKNKETKEGDDVVAAESSFGSVNLHIDPTLIAMNDVRQLGTQQNAALNR
DLFLTLKGKYPNLPDKDKDFHIAMMLYRLAVKSSSLQSDDDDTTGMTYTREGVEVELPDK
LWTDVVFNSKGIGNRTNALRVWGRTNDALYLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGYHYL
CADFLTGAGLTDLECAVYIQAKEQLLKKRGADDEVIVTNVRQLGKFNTR*
```

เมื่อมารวมกับกรดอะมิโนอีก 12 เรซิดิวส์ จาก pQE-80L expression vector จะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่ได้มีขนาดที่ยาวขึ้นเล็กน้อยโดยกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 12 เรซิดิวส์ ทางด้าน N-terminus ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งได้มาจาก vector ทำให้โปรตีนลูกผสมนี้มีกรดอะมิโนเท่ากับ 235 เรซิดิวส์ และยังมีการเรียงลำดับกรดอะมิโนดังนี้ (ภาพที่ 18)

MRGSHHHHHHGSMDDETKKLKNKNKETKEGDDVVAAESSFGSVNLHIDPTLIAMNDV
RQLGTQQNAALNRDLFLTLKGKYPNLPDKDKDFHIAMMLYRLAVKSSSLQSDDDTTGM
TYTREGVEVELPDKLWTDVVFNSKGIGNRTNALRVWGRTNDALYLAFRCRQNRNLSYGG
RPLDAGIPAGYHYLCADFLTGAGLTDLECAVYIQAKEQLLKKRGADEVIVTNRQLGKF
NTR*



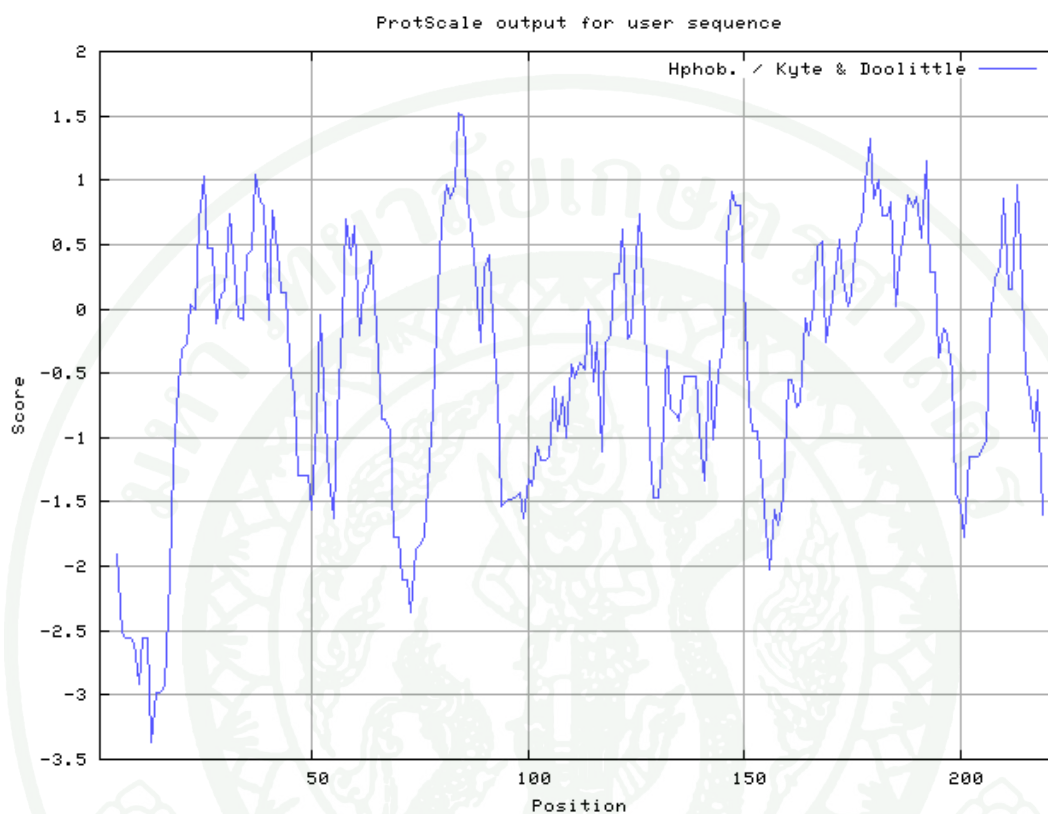
MRGSHHHHHHGS (12 amino acid)

ภาพที่ 18 แสดงกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนลูกผสมที่เกิดจาก pQE80L expression vector จะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่ได้มีขนาดที่ยาวขึ้นเล็กน้อยโดยมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น 12 เรซิดิวส์ ทางด้าน N-terminus ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งได้มาจาก vector

5.4 การวิเคราะห์ Hydropathicity ของโปรตีนลูกผสม (CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector)

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) (ภาพที่ 19) พบว่าโปรตีนลูกผสม (CTV-CP adapter/ pQE-80L expression vector) มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยดูได้จาก amino acid position ที่มากกว่า 0 จะเป็นพวกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และพวกที่มีค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น - จะเป็นพวกที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เมื่อดูจากสาย polypeptide ทั้งเส้นแล้วสามารถที่จะประเมินได้ว่า โปรตีนลูกผสม (CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector) น่าจะละลายน้ำได้ค่อนข้างดี และเมื่อทำการคำนวณ

ค่า average of hydropathicity มีค่าเท่ากับ -0.496 ซึ่งทำการวิเคราะห์จากโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)



ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ CTV-CP เกี่ยวกับคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ProtScale

5.5 การวิเคราะห์โปรตีนลูกผสม CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector ด้วยโปรแกรม ProtParam

- ลำดับกรดอะมิโนมีขนาด 223 เรซิดิวส์
- โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24.9262 kDa
- มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.83
- มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{1093}H_{1746}N_{310}O_{340}S_8$
- มีค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.496 เป็นต้น

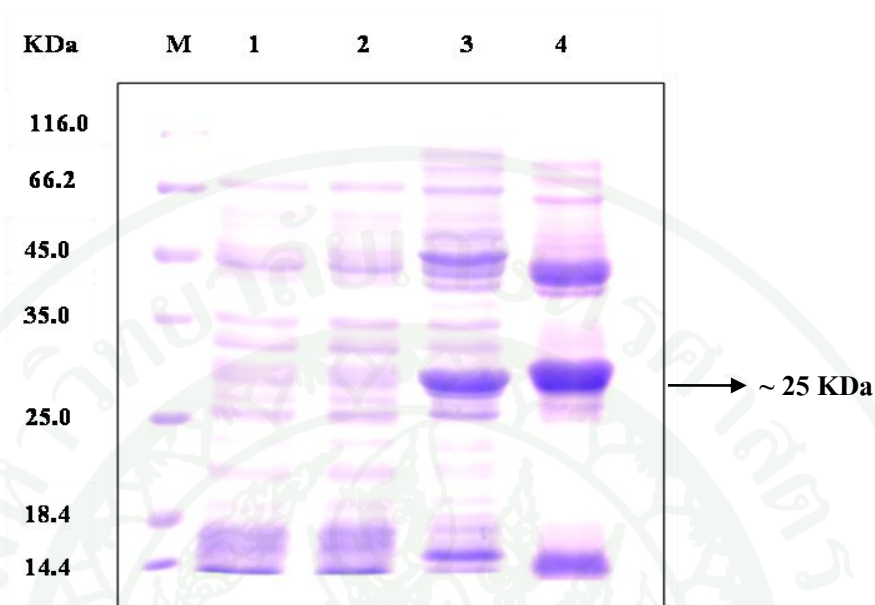
6. การแสดงออกของโปรตีน CTV-CP gene และการเตรียมโปรตีน CTV-CP บริสุทธิ์

จากการเตรียมพลาสมิดสายผสมของ CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector และถ่ายฝากให้กับ *E. coli* DH5 α โดยสุ่มเลือกโคโลนีขึ้นมาจำนวน 14 โคโลนี และตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่าทุกโคโลนีให้ผลเป็นบวกเมื่อเทียบกับโคโลนีปกติที่ไม่มีชิ้นยีน CTV-CP adapter ให้ผลเป็นลบ (ภาพที่ 18) และสุ่มเลือกโคโลนีที่ 1 ที่ให้ผลบวกไปชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP adapter/pQE-80L expression vector ใน *E. coli* DH5 α ด้วย IPTG และตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Native condition และ denature condition ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน และการใช้วิธี denature condition สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากกว่า Native condition (ภาพที่ 20) แต่เลือกสกัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี Native condition โดยการใช้ buffer A, pH 8.0 (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl 0.5 mM EDTA) ที่มี lysozyme ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อละลายโปรตีนออกจาก inclusion body เพราะว่าถ้าเลือกใช้การสกัดแยกโปรตีนด้วยวิธี denature condition ซึ่งโปรตีนที่ได้อยู่ในสภาพที่โปรตีนเสียสภาพได้มากกว่าการสกัดแยกโปรตีนด้วยวิธี native condition

สกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin จะคอตัมน์ด้วย Elution buffer, pH 3.0 (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl) จะโปรตีนออกมาจาก Ni-NTA resin และเก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร สามารถเก็บโปรตีนได้ 11 fraction และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 8000 Spectrophotometer) ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่าโปรตีนแต่ละ fraction มีความเข้มข้น 0.378, 0.214, 0.195, 0.194, 0.246, 0.380, 0.428, 0.444, 0.604, 0.495 และ 0.455 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เลือกมาตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE จำนวน 7 fraction พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์ (ภาพที่ 21)

6.1 การตรวจสอบโปรตีนลูกผสม CTV-CP ด้วยวิธี Western blotting

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting โดยการใช้ mouse anti-His monoclonal antibody ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม CTV-CP พบว่า mouse anti-His monoclonal antibody สามารถทำปฏิกิริยาได้กับโปรตีนลูกผสม CTV-CP ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ในส่วนของ 6XHis tags ที่ได้มาจาก pQE-80L expression vector ได้ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 20 วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP ในเซลล์แบคทีเรีย

E. coli DH5 α ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน

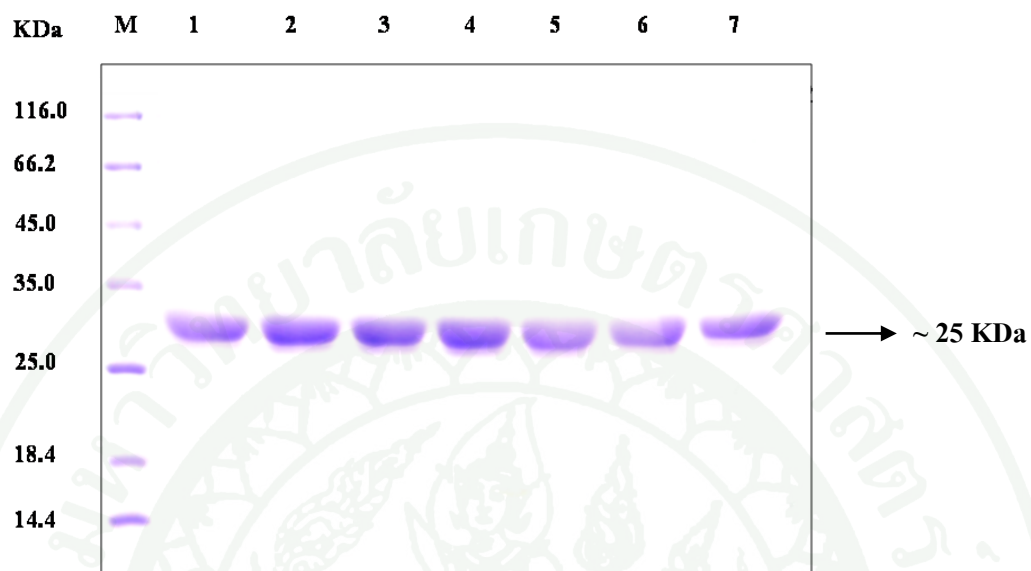
ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

ช่องที่ 1 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ปกติ

ช่องที่ 2 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG

ช่องที่ 3 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่เหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ละลายตะกอนเซลล์ด้วยวิธี native condition

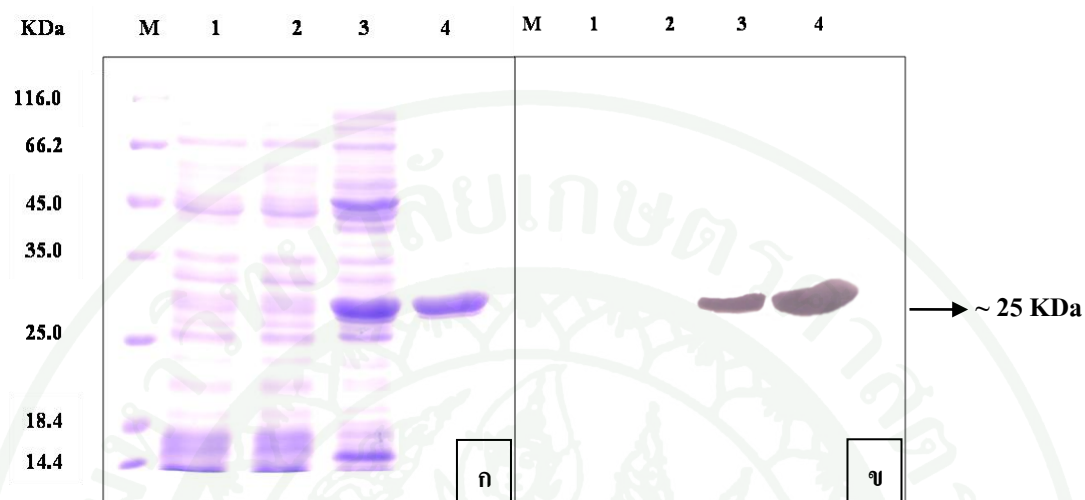
ช่องที่ 4 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่เหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ละลายตะกอนเซลล์ด้วยวิธี denature condition



ภาพที่ 21 การสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA resin ด้วยวิธี affinity column chromatography และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน

ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

ช่องที่ (1-7) = โปรตีนที่สกัดแยกบริสุทธิ์ในแต่ละ fraction โดยใช้ Ni-NTA resin



ภาพที่ 22 การแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP ด้วยวิธี SDS-PAGE (ก) และ Western blotting (ข) โดยใช้ mouse anti-His monoclonal antibody ในการทำปฏิกิริยาพบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน

- ช่องที่ M = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)
- ช่องที่ 1 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ปกติ
- ช่องที่ 2 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG
- ช่องที่ 3 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่เหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG
- ช่องที่ 4 = Lysis cells ของเชื้อ *E. coli* DH5 α + CTV-CP adapter/pQE-80L ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin

7. การผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV โดยใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด

7.1 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV จากกระต่าย

จากการผลิตแอนติซีรัมโดยฉีดโปรตีนลูกผสม CTV-CP ของเชื้อ CTV ในกระต่าย แล้วเก็บแอนติซีรัมทั้ง 8 ครั้ง มาตรวจหาค่าไตเตอร์โดยใช้โปรตีนลูกผสม CTV-CP ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจน พบว่าแอนติซีรัมที่ได้ให้ค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม CTV-CP อยู่ในช่วง 204,800 - 2,048,000 และได้เลือกแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 หรือ 6 ไปใช้ในการทดลอง เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ CTV โดยใช้เทคนิค ELISA ต่อไป เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง (ตารางที่ 4)

7.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV จากไก่ไข่

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี RIgY โดยใช้โปรตีนลูกผสม CTV-CP ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจน พบว่าแอนติบอดี ChIgY ที่ได้ให้ค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม CTV-CP อยู่ในช่วง 25,600 - 2,048,000 และเลือกแอนติบอดี ChIgY ครั้งที่ 6 หรือ 7 ไปใช้ในการทดลอง เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค ELISA ต่อไป เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดี ChIgY ที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีด CTV-CP ให้กับกระต่ายพันธุ์ New Zealand White โดยทำการเก็บแอนติซีรัม จำนวน 8 สัปดาห์ และตรวจสอบค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA

สัปดาห์ที่	แอนติเจน(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	แอดจูแวนต์	ชนิดแอนติซีรัม	ค่าไตเตอร์
1	-	-	NS	-
2	1.0	CFA ²	-	-
3	1.0	IFA ³	-	-
4			AS#1	204,800 ¹
5			AS#2	256,000
6			AS#3	512,000
7			AS#4	1,024,000
8			AS#5	2,048,000
9			AS#6	2,048,000
10			AS#7	1,024,000
11			AS#8	512,000

หมายเหตุ ¹ ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที
หลังจากเติม substrate buffer

² complete Freund's adjuvant

³ incomplete Freund's adjuvant

ตารางที่ 5 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดโปรตีนสายผสม CTV-CP ให้กับไก่ไข่ม้วน
Hisex โดยทำการเก็บแอนติบอดี จำนวน 8 สัปดาห์ และตรวจสอบค่าไตเตอร์ด้วย
เทคนิค indirect PTA-ELISA

สัปดาห์ที่	แอนติเจน(มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	แอดจูแวนต์	ชนิดแอนติซีรั่ม	ค่าไตเตอร์
1			NS	-
2	1.0	CFA ²	-	-
3	1.0	IFA ³	-	-
4			AS#1	25,600 ¹
5			AS#2	256,000
6			AS#3	256,000
7			AS#4	512,000
8			AS#5	1,024,000
9			AS#6	2,048,000
10			AS#7	2,048,000
11			AS#8	1,024,000

หมายเหตุ ¹ ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที
หลังจากเติม substrate buffer

² complete Freund's adjuvant

³ incomplete Freund's adjuvant

8. วิธีการทางซีรั่มวิทยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CTV

8.1 วิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

8.1.1 Indirect plate trapped antigen-ELISA (indirect PTA-ELISA)

ตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้แอนติบอดีของ RIgG และ ChIgY เป็น primary antibody และเปรียบเทียบกับค่าความเจือจางของแอนติซีรั่มในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับน้ำคั้นพืชปกติที่ความเจือจางต่างๆ และพบว่าการใช้แอนติบอดี RIgG ที่ค่าการเจือจาง 1: 3,200 และค่าการเจือจางน้ำคั้นพืชปกติและพืชเป็นโรคที่อัตราส่วน 1:16 ให้ค่า S/N ration สูงที่สุด (ตารางที่ 6) ส่วนการใช้แอนติบอดี ChIgY ที่ค่าการเจือจาง 1:1,600 และค่าการเจือจางน้ำคั้นพืชปกติและพืชเป็นโรคที่อัตราส่วน 1:16 ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติบอดีของ RIgG ที่ค่าการเจือจาง 1: 3,200 และ แอนติบอดี ChIgY ที่ค่าการเจือจาง 1:1,600 และค่าการเจือจางน้ำคั้นพืชปกติและพืชเป็นโรคที่อัตราส่วน 1:16 สำหรับการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA เนื่องจากให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ

8.1.2 Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA)

การพัฒนาวิธี TAS-ELISA โดยเปรียบเทียบผลของการใช้แอนติบอดี 2 ชนิดในการเคลือบ ELISA plate คือ ChIgY หรือ RIgG และทำปฏิกิริยากับพืชเป็นโรค โปรตีนลูกผสม CTV-CP และพืชปกติ ผลปรากฏว่า เมื่อใช้ ChIgY ในการเคลือบ ELISA plate จะให้ค่า OD 405 ที่สูงถึง 3.356 ในพืชที่เป็นโรคและไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ ให้ค่า OD 405 เท่ากับ 0.175 ในขณะที่การใช้ RIgG ในการเคลือบ ELISA plate จะให้ค่า OD 405 เท่ากับ 1.426 ในพืชที่เป็นโรค และไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติให้ค่า OD 405 เท่ากับ 0.236 และพบว่ายังทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติบอดี ChIgY สำหรับเคลือบ ELISA plate และใช้แอนติบอดี RIgG เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบทำปฏิกิริยากับพืชเป็นโรคและพืชปกติ ซึ่งจะให้ค่า S/N ratio มากกว่าการใช้แอนติบอดี RIgG ในการเคลือบ plate (ตารางที่ 8) ซึ่งน่าจะเกิดจาก ChIgY เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะมากกว่า RIgG สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และมีโครงสร้างที่ใหญ่กว่า RIgG ทำให้มีความสามารถในการจับอนุภาคเกิดได้ดี และมีตำแหน่งจดจำบน epitopes มากกว่าในกระต่าย (Michael *et al.*, 2010) และสามารถทำปฏิกิริยาในนานถึง 24 ชั่วโมง หลังจากเติม substrate แล้ว

(Nurhadi *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงได้นำวิธีการนี้ไปพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ CTV ในรูปแบบ Diagnostic kit

9. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA

ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ที่ผลิตได้ 2 ชนิด ได้แก่ ChIgY และ RIgG ด้วยวิธี TAS-ELISA โดยใช้น้ำคั้นจากพืชปกติ และพืชที่เป็นโรคไวรัสที่สามารถเข้าทำลายพืชชนิดอื่นๆ จำนวน 15 ชนิด เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบ จากการตรวจสอบความจำเพาะของ ChIgY และ RIgG ด้วยวิธี TAS-ELISA ผลปรากฏว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นที่นำมาตรวจสอบและสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CTV และไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ (ตารางที่ 9)

10. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการทางซีรั่มวิทยาในการตรวจสอบเชื้อ CTV ในส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืช

จากการตรวจสอบเชื้อ CTV ในน้ำคั้นตัวอย่างมะนาวที่ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการติดตาต่อกิ่ง อายุ 6-12 เดือนหลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่าค่า OD 405 เฉลี่ยของน้ำคั้นพืชจากส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณ ยอด เส้นใบ เนื้อใบ เปลือกอ่อน และเปลือกแก่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งค่า OD 405 จากเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกอ่อน และเปลือกแก่ ให้ค่า OD 405 สูงที่สุด เท่ากับ 3.465 และ 3.593 ตามลำดับ เนื่องจากว่าเชื้อ CTV เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืชและเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกเป็นส่วนที่มีท่ออาหารจำนวนมากที่สุด ทำให้ตรวจพบเชื้อ CTV ในบริเวณนี้มากที่สุด (Moreno *et al.*, 2008) (ตารางที่ 10) แต่พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ CTV ในเนื้อเยื่อบริเวณ ยอด เส้นใบ เนื้อใบ ได้เช่นกัน ถึงแม้ว่าจะให้ค่า OD 405 น้อยกว่าเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกก็ตาม แต่เพื่อความสะดวกในการนำไปปฏิบัติงานจะเลือกเนื้อเยื่อบริเวณไหนก็ได้ที่สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย

11. การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่พัฒนาจาก Recombinant CTV-CP กับแอนติซีรัมที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค TAS-ELISA

ตรวจสอบเชื้อ CTV ในตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่เป็นโรคที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1-17 และตัวอย่างจากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 18-22 ด้วยเทคนิค TAS-ELISA ตามวิธีการข้อ 11.2 และเปรียบเทียบกับแอนติบอดีของบริษัท BIOREBA ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ตรวจสอบด้วยเทคนิค TAS-ELISA ตามวิธีการของบริษัท เมื่อเปรียบเทียบค่า OD 405 ในตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่เป็นโรคพบว่าให้ค่า OD 405 เฉลี่ยของแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค recombinant protein และแอนติบอดีของบริษัท BIOREBA ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11) ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค recombinant protein ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีเชื้อ CTV เข้าทำลายได้ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้า

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเงาของแอนติซีรัม RIgG ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติที่ระดับความเงาต่างๆด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

ค่าความเงา ของแอนติ ซีรัม	น้ำคั้นพืชปกติ				น้ำคั้นพืชเป็นโรค				โปรตีนลูกผสม CTV-CP ความ เข้มข้น 5 ul/ml	Carbonate coating buffer, pH 9.6	S/N ratio
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16			
200	0.889 ^{/1}	0.844	0.748	0.741	3.608	3.605	3.601	3.588	3.889	0.487	4.842
400	0.595	0.486	0.478	0.447	3.55	3.523	3.520	3.525	3.745	0.281	8.011
800	0.4	0.36	0.317	0.315	3.42	3.493	3.448	3.407	3.735	0.212	10.816
1600	0.29	0.250	0.126	0.144	3.201	3.058	3.053	3.031	3.672	0.189	21.048
3,200	0.238	0.204	0.184	0.137	2.617	2.611	2.586	2.541	3.545	0.145	21.717
6,400	0.197	0.171	0.165	0.135	2.321	2.320	2.224	2.21	3.542	0.127	11.946
12,800	0.185	0.165	0.153	0.132	2.221	2.213	2.135	2.105	3.452	0.119	15.946
25,600	0.179	0.160	0.152	0.129	2.109	2.108	1.989	1.975	3.409	0.108	15.310

หมายเหตุ ^{/1} ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate buffer

^{/2} ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า OD 405 นาโนเมตร ของน้ำคั้นมะนาวเป็นโรคต่อมะนาวปกติ คัดที่ระดับความเงาน้ำคั้นพืช 1:16

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเงาของแอนติซีรัม ChIgY ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติที่ระดับความเงาต่างๆ ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

ค่าความเงาของแอนติซีรัม	น้ำคั้นพืชปกติ				น้ำคั้นพืชเป็นโรค				โปรตีนลูกผสม CTV-CP ความเข้มข้น 5 ul/ml	Carbonate coating buffer, pH 9.6	S/N ratio
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16			
200	0.488 ¹	0.301	0.298	0.276	1.989	1.891	1.890	1.768	3.787	0.286	6.406 ²
400	0.311	0.228	0.228	0.218	1.980	1.425	1.386	1.287	3.749	0.206	5.904
800	0.301	0.244	0.217	0.201	1.899	1.119	1.111	1.086	3.654	0.192	5.403
1,600	0.254	0.151	0.126	0.125	1.765	1.109	1.073	1.054	3.644	0.174	8.432
3,200	0.233	0.135	0.134	0.125	1.677	1.103	1.065	1.043	3.589	0.162	8.344
6,400	0.196	0.138	0.125	0.112	1.674	1.099	1.061	1.010	3.576	0.158	8.279
12,800	0.189	0.135	0.123	0.118	1.673	1.087	1.050	0.986	3.345	0.123	8.322
25,600	0.178	0.133	0.121	0.115	1.579	1.042	0.978	0.785	3.256	0.119	6.826

หมายเหตุ ¹ ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate buffer

² ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า OD 405 นาโนเมตร ของน้ำคั้นมะนาวเป็นโรคต่อมะนาวปกติ คัดที่ระดับความเงาน้ำคั้น พืช 1:16

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบการใช้ ChIgY และ RIgG ในการเคลือบ plate ด้วยวิธี TAS-ELISA

วิธี ELISA	Primary antibody	ความเข้มข้น	Secondary antibody	ความเข้มข้น	น้ำคั้นพืชปกติ	น้ำคั้นพืชเป็นโรค	โปรตีนลูกผสม CTV-CP ความเข้มข้น 5 ul/ml	Carbonate coating buffer, pH 9.6	S/N ratio
TAS-ELISA	ChIgY	1:400	RIgG	1:1,600	0.175 ^{/1}	3.356	3.778	0.124	19.177 ^{/2}
TAS-ELISA	RIgG	1:400	ChIgY	1:1,600	0.236	1.426	3.566	0.161	6.043

หมายเหตุ ^{/1} ค่า OD 405 ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า OD 405 มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

^{/2} ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า OD 405 ของน้ำคั้นพืชเป็นโรคต่อน้ำคั้นพืชปกติ

ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV และเชื้อไวรัสชนิดอื่น
เปรียบเทียบกับพืชปกติด้วยวิธี TAS- ELISA

เชื้อไวรัส	พืชอาศัย	ค่า OD 405
<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV) ²	มะนาว	3.377 ¹
<i>sugarcane mosaic virus</i> (SCMV)	ข้าวโพด	0.179
<i>Maize chlorotic mottle virus</i> (MCMV)	ข้าวโพด	0.169
<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	ข้าวโพด	0.156
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	แตงกวา	0.188
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)	พริก	0.115
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	แตงกวา	0.133
<i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV)	เมลอน	0.214
<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	แตงกวา	0.176
<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	มะละกอ	0.268
<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	พริก	0.196
<i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV)	เมลอน	0.109
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	ยาสูบ	0.135
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	แตงกวา	0.185
<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 2</i> (PMWaV-2)	สับปะรด	0.147
<i>Candidatus Liberibacter</i>	มะนาว	0.131
-	มะนาว ^{/3}	0.169
-	ส้มโอ ^{/4}	0.167
-	แตงกวา ^{/4}	0.277
-	แตง Sukine ^{/4}	0.287
-	พริก ^{/4}	0.209
-	ลำโพง ^{/4}	0.173
-	ข้าวโพด ^{/4}	0.126
-	สับปะรด ^{/4}	0.174

- หมายเหตุ ^{/1} ค่า OD 405 ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า OD 405 มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก
- ^{/2} เป็น Positive control จากต้นมะนาวที่ได้จากการปลูกเชื้อ CTV ด้วยวิธีการติดตา
- ^{/3} เป็น Negative control จากต้นมะนาวที่ไม่รับการปลูกเชื้อ CTV ด้วยวิธีการติดตา
- ^{/4} เป็นพืชปกติที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 10 ผลจากการตรวจสอบเชื้อ CTV ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของมะนาวด้วยวิธี TAS-ELISA

ตัวอย่างพืช	ยอด	เส้นใบ	เนื้อใบ	เปลือกอ่อน	เปลือกแก่	F-test
พืชเป็นโรค	2.284 ^{/1} c	2.735 ab	2.321b	3.465 a	3.593 a	*
พืชปกติ	0.229	0.187	0.265	0.154	0.145	ns

- หมายเหตุ ^{/1} ค่า OD 405 ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า OD 405 มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก
- * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ตัวเล็กในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
- ^{ns} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein (rCP) ของเชื้อ CTV กับแอนติซีรัมที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค TAS-ELISA

ตัวอย่างที่	ชนิด/พันธุ์	ค่า OD 405		ผลการ ตรวจสอบ	F-test ^{/3}
		rCP	Bioreba Commercial		
1	มะนาว ^{/1}	*3.299 ^{/2}	3.219 ^{/2}	+	ns
2	ส้มโอ ^{/1}	1.755	1.829	+	ns
3	ส้มโอ	0.134	0.291	-	ns
4	ส้มโอ	0.154	0.283	-	ns
5	มะนาว	*3.299	2.061	+	ns
6	มะนาว	2.189	1.595	+	ns
7	มะนาว	*3.299	*3.299	+	ns
8	มะกรูด	*3.299	2.153	+	ns
9	มะนาว	2.951	2.956	+	ns
10	มะนาว	3.285	3.256	+	ns
11	มะนาว	*3.299	*3.299	+	ns
12	มะนาว	*3.299	*3.299	+	ns
13	ส้มเขียวหวาน	*3.299	*3.299	+	ns
14	ส้มเขียวหวาน	*3.299	*3.299	+	ns
15	ส้มเขียวหวาน	*3.299	3.221	+	ns
16	ส้มเขียวหวาน	*3.299	*3.299	+	ns
17	ส้มเขียวหวาน	1.320	0.756	+	ns
18	มะนาว	*3.299	3.128	+	ns
19	มะนาว	0.129	0.455	-	ns
20	ส้มโชกุน	0.166	0.463	-	ns

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิด/พันธุ์	ค่า OD 405		ผลการ ตรวจสอบ	F-test
		rCP	Bioreba Commercial		
21	มะนาว	*3.299	*3.299	+	ns
22	มะนาวจากใต้หวัน	1.546	1.001	+	ns
	Positive control	*3.299	3.253	+	ns
	Negative control	0.168	0.252	-	ns

หมายเหตุ ^{1/} ตัวอย่างที่ได้จากการปลูกเชื้อ CTV ด้วยวิธีติดต่อกิ่ง

^{2/} ค่า OD 405 ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า OD 405 มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

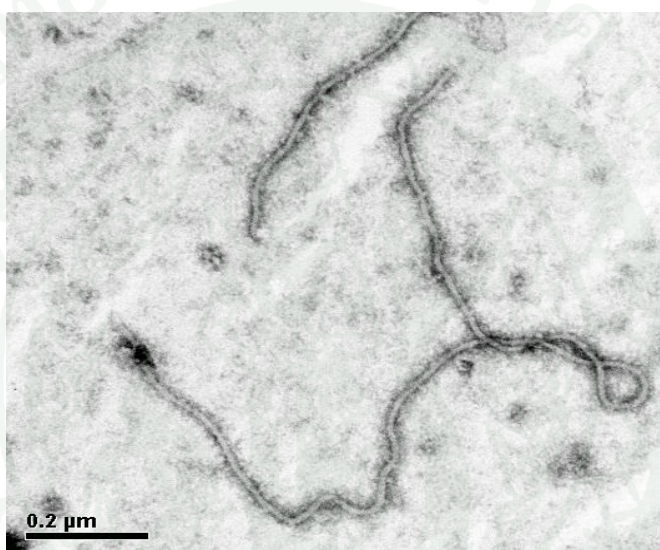
* ค่า OD 405 สูงสุดที่เครื่องวัดได้จากกรมวิชาการเกษตร

^{3/} แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

^{ns} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

12. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ CTV

จากการตรวจหาเชื้อ CTV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านด้วยวิธี Derrick method สามารถตรวจพบอนุภาคของเชื้อ CTV ได้ พบว่ามีลักษณะยาวคล้ายเส้นด้าย เป็นแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 11-13 X 2,000 นาโนเมตร (ภาพที่ 23) และพบว่าลักษณะของเชื้อมีขนาดใกล้เคียงกับของ Ampaiwan (2004) ที่มีรายงานไว้ และแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถจับกับอนุภาคของเชื้อได้อย่างจำเพาะ



ภาพที่ 23 อนุภาคของเชื้อ CTV ที่ได้จากการส่องภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านด้วยวิธี Derrick method ของต้นมะนาวที่ได้รับการปลูกเชื้อ CTV พบไวรัสมีขนาดประมาณ 11-13 x 1,900-2,000 นาโนเมตร (กำลังขยาย 80,000 เท่า, bar = 0.2 ไมโครเมตร)

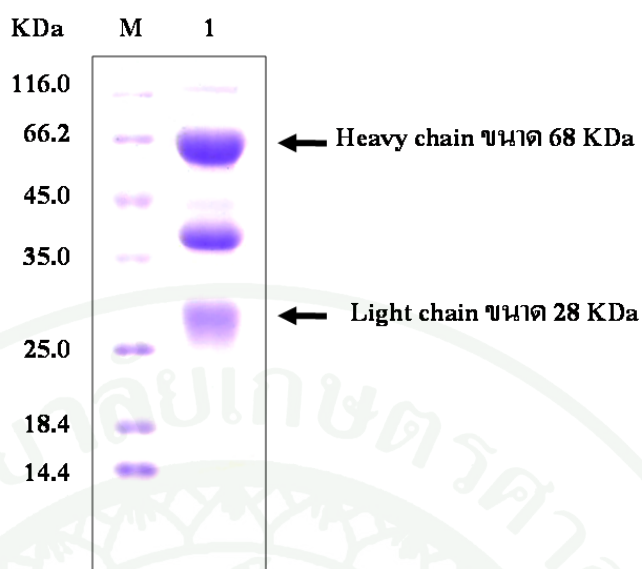
13. การพัฒนาวิธีเบื้องต้นในการใช้แอนติบอดีที่ผลิตได้ในรูปแบบของ Diagnostic kit

13.1 การเตรียมแอนติบอดีสำหรับชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป (Immunochromatographic Strip, ICS)

จากการตกตะกอนแอนติบอดีที่ได้จากไข่ไก่และกระต่ายด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และละลายตะกอนด้วย PBS อัตรา 0.2 เท่า ของปริมาตรแอนติบอดีเริ่มต้น จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแอนติบอดีจาก ChIgY มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 68 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 24) ส่วนแอนติบอดีจาก RIgG มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 50 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 25) เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน แต่ยังพบว่ามี band โปรตีนอื่นๆ ปนอยู่ในแอนติบอดี ซึ่งอาจจะเป็นส่วนของ albumin ที่ปนเปื้อนมาในแอนติบอดี (Michael *et al.*, 2010) แต่สามารถนำไปใช้งานเนื่องจากว่าโปรตีนที่ได้ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์สูง

13.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยาของ RIgG-CTV ด้วยวิธี Dot Immunobinding Assay (DIBA) โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตจาก RIgG และ ChIgY

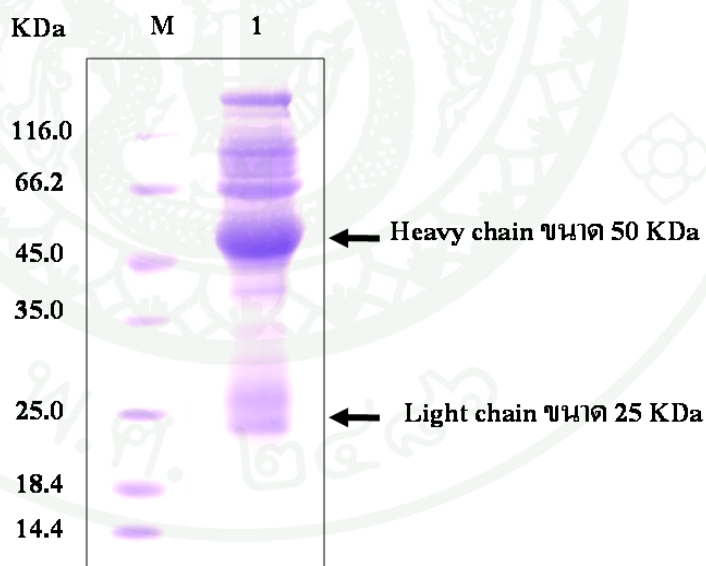
การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี DIBA พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตจาก RIgG และ ChIgY สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CTV ได้โดยเกิดปฏิกิริยาให้สีม่วง ซึ่งให้ผลเป็นบวกที่ชัดเจนกับตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรคและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติและบัฟเฟอร์ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 24 ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ ChIgY ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431 (Fermentas)

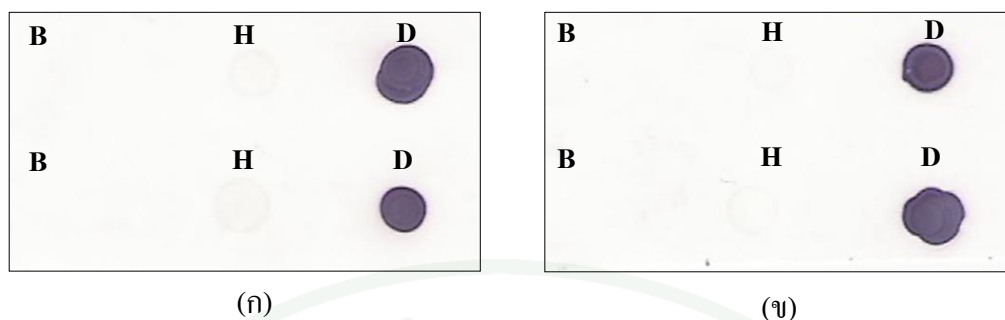
ช่องที่ 1 = แอนติบอดีที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ภาพที่ 25 ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ RIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องที่ M = แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431 (Fermentas)

ช่องที่ 1 = แอนติบอดีที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต



ภาพที่ 26 แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยวิธี dot blotting immunoassay โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตจาก RIgG (ก) และ ChIgY (ข)

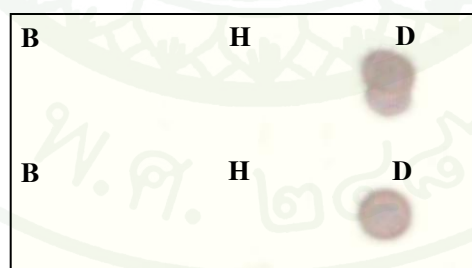
B = PBS buffer

H = มะนาวปกติ

D = มะนาวเป็นโรค

13.3 การตรวจสอบ RIgG-CTV conjugated gold particles ด้วยวิธี DIBA

จากการตรวจสอบ RIgG-CTV conjugated gold particles ด้วยวิธี DIBA พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นมะนาวเป็นโรคได้ โดยจะสังเกตเห็นสีชมพูแดงจับกับตัวอย่างที่เป็นโรค และไม่เกิดปฏิกิริยากับพืชปกติและบัฟเฟอร์ จึงเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีกับอนุภาคทองเชื่อมต่อกันได้จริง (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 การทดสอบการทำปฏิกิริยา RIgG-CTV conjugated gold particles ด้วยวิธี DIBA

B = PBS buffer

H = มะนาวปกติ

D = มะนาวเป็นโรค

13.4 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแต่ละชนิดของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีป

จากการศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนในการבודตัวอย่างพืชที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีป ทั้ง 4 ชนิด คือ Prima85 (3 ไมครอน), Prima60 (5 ไมครอน), Prima40 (8 ไมครอน) และ AE99 (8 ไมครอน) โดยใช้ปริมาตรของบัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร และสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที และชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 6 ชนิด แต่เมื่อจุ่มชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีปลงในบัฟเฟอร์ ADGEN, Agdia, BIOREBA, PBS-T และ CTV- extraction buffer พบปฏิกิริยาแบบ false positive คือ เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line แต่พบว่าชุดตรวจสอบที่ใช้บัฟเฟอร์ Na_2BO_3 ให้ปฏิกิริยาเส้น control line ที่คมชัดสม่ำเสมอ และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเส้น test line กับชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 28) จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ Na_2BO_3 ในการตรวจสอบต่อไป

13.5 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ CTV ในน้ำคั้นพืชด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีป

จากการבודตัวอย่างพืชที่เป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ Na_2BO_3 แล้วหยดลงในชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีปที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด คือ Prima85 (3 ไมครอน), Prima60 (5 ไมครอน), Prima40 (8 ไมครอน) และ AE99 (8 ไมครอน) ต่อเวลาที่ใช้และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ พบว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 (8 ไมครอน) ให้การทำปฏิกิริยาบนเส้น control line และเส้น test line เกิดได้เร็วที่สุดใช้เวลาประมาณ 90 วินาที เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 29) ความไวในการเกิดปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 เปรียบตามกับขนาดของรูพรุนภายในแผ่นไนโตร-เซลลูโลสเมมเบรนสอดคล้องกับการรายงานของ Wong and Tse (2009) ดังนั้นจึงเลือกแผ่นไนโตร-เซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 (8 ไมครอน) ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และ test line ในชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตริป

ชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน	เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาบน control line และ test line (วินาที) ¹
Prima 85 (3 ไมครอน) ²	230
Prima 60 (5 ไมครอน)	190
Prima 40 (8 ไมครอน)	90
AE99 (8 ไมครอน)	120

หมายเหตุ ¹ ค่าเฉลี่ยระยะเวลาตั้งแต่เริ่มจุ่มชุดตรวจสอบลงในบัฟเฟอร์จนเกิดปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยทดสอบทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

² ขนาดรูพรุนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

13.6 การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตริป

การทดสอบความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ CTV ในพืชทดสอบที่เป็นโรค คือ มะนาว และเปรียบเทียบกับมะนาวปกติด้วยชุดตรวจสอบ โดยการบดตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ Na_3BO_3 ในอัตราส่วน 1:2 จากนั้นเจือจางต่อแบบ 2-fold dilution จำนวน 5 ความเจือจางจนถึง 1:64 โดยมีพืชปกติเป็น negative control สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที พบว่าชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้นมาสามารถตรวจน้ำคั้นที่เป็นโรคได้จนถึงที่ระดับความความเจือจางที่ 1:32 ความเข้มของเส้น test line ลดลงเมื่อเจือจางน้ำคั้นพืชที่มากขึ้น (ภาพที่ 30) ซึ่งถือว่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อ PVY ที่สามารถตรวจสอบเชื้อ PVY ได้ที่ระดับค่าความเจือจางที่ 1:5,120 (วรพจน์, 2554) เนื่องจากว่าเชื้อ CTV ที่พบในธรรมชาติมีปริมาณน้อยอยู่แล้วในพืชอาศัย เมื่อนำมาเจือจางในระดับที่สูงขึ้นทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตริปได้ (Bar-Joseph and Lee, 1989) ดังนั้นควรใช้ความเข้มข้นของเชื้อในปริมาณที่สูงขึ้น เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตริปได้

13.7 การใช้บัฟเฟอร์ Na_2BO_3 บดตัวอย่างพืชในการตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืช ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตริป

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืช เช่น ยอด เนื้อใบ เส้นใบ เปลือกอ่อน และ เปลือกแก่ มาบดใน บัฟเฟอร์ Na_2BO_3 พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในทุก ส่วนของเนื้อเยื่อ พืชซึ่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นบนเส้น test line อย่างชัดเจน โดยมีรายงานว่าเชื้อ CTV เป็น เชื้อที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืชและมีการขนส่งสารอาหารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วย แสงจากแหล่งผลิตไปยังส่วนต่างๆ ทำให้เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายได้ทั่วทั้งต้นโดยผ่านทางท่อ อาหารของพืช (Bar-joseph and Lee, 1989; Pappu *et al.*, 1994) (ภาพที่ 31)

13.8 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์- สตริป

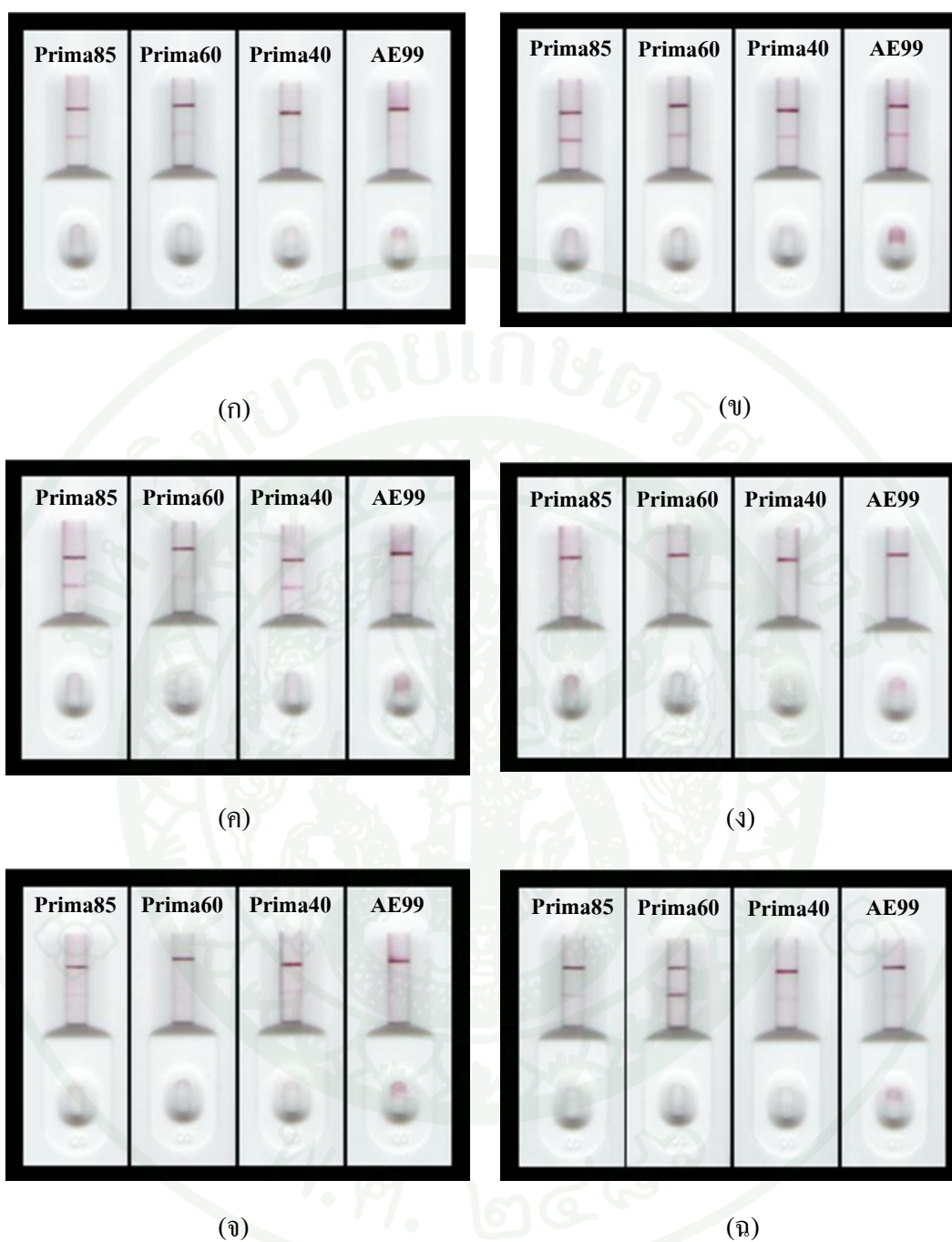
จากการทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตริปกับเชื้อ ไวรัสชนิดอื่นๆที่นำมาทดสอบ จำนวน 15 ชนิด พบว่าชุดทดสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตริปที่ ผลิตขึ้นไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ เนื่องจากการทำปฏิกิริยามีเพียงเส้น control line เท่านั้น ที่ปรากฏอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับมะนาวปกติและมะนาวที่มีเชื้อ CTV ที่ ได้จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีการติดตาต่อกิ่ง แสดงว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตริปที่ นำมาตรวจสอบมีความจำเพาะกับเชื้อ CTV ก่อนข้างสูง (ตารางที่ 13)

14. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์- สตริปกับวิธี TAS-ELISA

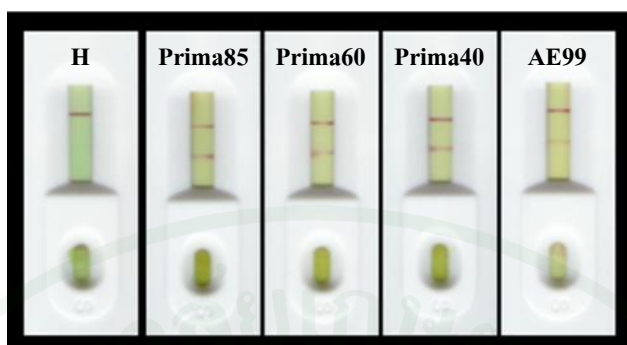
จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโต กราฟิกส์ตริปกับวิธี TAS-ELISA พบว่าการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA ให้ความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยาดีที่สุดสามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึงระดับค่าการเจือจางน้ำคั้นพืชเป็น ไรค์ตั้งแต่ 1:2 จนถึง 1: 16,484 และยังให้ค่า OD 405 สูงกว่า 1.500 สำหรับชุดตรวจสอบอิมมูโนโคร มาโตกราฟิกส์ตริปให้ความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยาปรากฏบนเส้น test line ได้ชัดเจนที่ ระดับความเจือจางน้ำคั้นพืชตั้งแต่ 1:2 จนถึง 1:32 พบว่าการตรวจเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมู- โนโครมาโตกราฟิกส์ตริปมีความไว (sensitivity) น้อยกว่าการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี TAS-ELISA (ตารางที่ 14) แต่วิธีการนี้เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้งานได้ง่ายและขั้นตอนไม่ยุ่งยากเหมือนวิธี TAS-

ELISA ซึ่งสามารถตรวจสอบและเห็นผลการทำปฏิกิริยาภายใน 5 นาที และสามารถปรับระดับการเจือจางของน้ำคั้นพืชให้เหมาะสมก็สามารถนำไปตรวจสอบเชื้อ CTV ในพืชตระกูลส้มได้ ดังนั้นชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปนี้จึงเหมาะสำหรับการคัดกรองตัวอย่างก่อนการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป

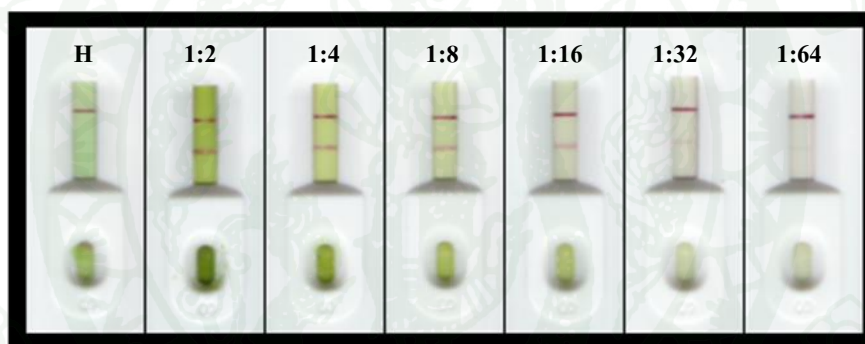




ภาพที่ 28 การศึกษาชนิดของบัพเฟอร์ที่เหมาะสมกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแต่ละชนิดของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป ADGEN (ก), Agdia (ข), BIOREBA (ค), Na_2BO_3 (ง), PBS-T (จ) และ CTV-extraction (Su, 2008) (ฉ)



ภาพที่ 29 การทดสอบตัวอย่างน้ำคั้นพืชกับชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีป



ภาพที่ 30 การทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิกส์ตรีป



ภาพที่ 31 การตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืชด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-
สตริป ได้แก่ ยอด (ก), เนื้อใบ (ข), เส้นใบ (ค), เปลือกกิ่ง (ง), และเปลือกลำต้น (จ)

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

ตัวอย่างที่	เชื้อสาเหตุ	ผลการทดสอบ
1	<i>sugarcane mosaic virus</i> (SCMV)	-
2	<i>Maize chlorotic mottle virus</i> (MCMV)	-
3	<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	-
4	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	-
5	<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)	-
6	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	-
7	<i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV)	-
8	<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	-
9	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	-
10	<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	-
11	<i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV)	-
12	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	-
13	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	-
14	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 2</i> (PMWaV-2)	-
15	<i>Candidatus Liberibacter</i>	-
16	Positive control ^{/1}	+ ^{/3}
17	Negative control ^{/2}	- ^{/4}

หมายเหตุ ^{/1} Positive control เป็นมะนาวที่มีเชื้อ CTV ที่ได้จากการปลูกเชื้อด้วยวิธีการติดตาต่อกิ่ง

^{/2} Negative control เป็นมะนาวปกติ

^{/3} + คือ เห็นเส้น control line และ test line ชัดเจน

^{/4} - คือ เห็นเส้น control line เพียงเส้นเดียว

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปในการตรวจหาเชื้อ CTV เทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี TAS-ELISA

ค่าการเจือจางพืชเป็นโรค	ค่า OD 405 nm	วิธีการตรวจสอบ	
		TAS-ELISA	อิมมูโนสตริป
1:2	3.501	+	+++ ^{/2}
1:4	3.453	+	+++
1:8	3.354	+	+++
1:16	3.298	+	+++
1:32	3.235	+	++
1:64	3.233	+	+
1:128	3.198	+	-/+
1:256	2.928	+	-
1:512	2.579	+	-
1:1024	2.453	+	-
1:2048	2.340	+	-
1:4096	1.989	+	-
1:8192	1.976	+	-
1:16,484	1.790	+	-
negative control ^{/1}	0.178	-	-
Coating buffer	0.134	-	-

หมายเหตุ ^{/1} negative control คือมะนาวปกติ ซึ่งได้ค่า OD 405 = 0.178

^{/2} การตรวจสอบที่ให้ผลบวกในวิธีอิมมูโนสตริปแบ่งเป็น 4 ระดับได้แก่

- (-) ไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line
- (+/-) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ไม่ชัดเจน
- (+) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจน
- (++) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจนดี
- (+++) การเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ชัดเจนดีมาก

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ CTV

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ CTV ในพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ เช่น ส้มโอ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง ส้มแก้ว ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มเปลือกบาง และมะกรูด จำนวน 418 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดต่างๆ จำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชัยนาท นครปฐม กรุงเทพมหานคร สระแก้ว นครนายก และปราจีนบุรี พบลักษณะอาการที่สำคัญบนพืชตระกูลส้ม เช่น มะนาวมีลักษณะอาการเส้นใบสี ใบด่างเหลือง ใบรูปถ้วย ส่วนอาการที่พบบนส้มเขียวหวาน ส้มเซ้ง ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มแก้ว ส้มเปลือกบาง และมะกรูด เช่น อาการใบรูปถ้วย อาการใบหงิกงอและบิดเบี้ยวจนผิดรูปร่าง อาการใบด่างขีด ส่วนอาการที่พบในส้มโอแสดงอาการไม่ชัดเจน แต่พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะอาการใบด่างเป็นจำเขียว คล้ายกับอาการของโรคกรีนนิง

จากการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR ในการสังเคราะห์ยีน *p23* และยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) พบว่าในส้มโอตรวจพบเชื้อ CTV น้อยที่สุด คิดเป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในมะนาว มะกรูด และส้มเขียวหวาน คิดเป็น 36, 50 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในส้มเซ้ง และส้มแก้ว ตรวจพบเชื้อ CTV มากที่สุด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อ CTV ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นแบบ mix infection ระหว่างเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และไม่รุนแรง (mild strain) ทำให้ลักษณะอาการที่แสดงออกไม่รุนแรง ซึ่งอาจจะเป็นผลจากกระบวนการ cross protection ในสภาพธรรมชาติจากกลไก post transcription gene silence (PTGS) ในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ CTV ในรูป phylogenetic tree

การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ CTV ในรูป phylogenetic tree พบว่าเชื้อ CTV ที่ตรวจพบในพืชตระกูลส้มเกือบทุกไอโซเลตในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม A ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อ CTV สาย

พันธุ์รุนแรง ยกเว้น ไอโซเลต CH3/6NN เป็นตัวอย่างจากใบมะกรูดที่เก็บมาจากจังหวัดนครนายก จัดอยู่ในกลุ่ม B ซึ่งเป็นเชื้อ CTV สายพันธุ์ไม่รุนแรง

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

3.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ในกระต่ายพันธุ์ White New Zealand จำนวน 1 ตัว และเก็บแอนติซีรัมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม สัปดาห์ที่ 1-8 และให้ค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ให้ค่าไตเตอร์เท่ากับ 2,048,000 เมื่อนำมาตกตะกอน RIgG ให้บริสุทธิ์ โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าได้ปริมาณความเข้มข้นของ RIgG เท่ากับ 18.8 มิลลิกรัมต่อแอนติซีรัม 1.0 มิลลิลิตร

3.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ในไก่ไข่พันธุ์ Hisex เก็บไข่ทุกวันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อนำไข่แดงมาแยกส่วนของไข่ขาวออกและตกตะกอน ChIgY ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายตะกอนด้วย PBS และนำไปคำนวณความเข้มข้นของ ChIgY พบว่ามีปริมาณเฉลี่ย 20.53 มิลลิกรัม/ไข่ 1 ฟอง และตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ChIgY สัปดาห์ที่ 1-8 และให้ค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 และ 7 ให้ค่าไตเตอร์เท่ากับ 2,048,000

4. วิธีการทางซีรัมวิทยาสำหรับตรวจสอบเชื้อ CTV

4.1 การพัฒนาวิธี indirect PTA-ELISA พบว่าการใช้แอนติบอดี RIgG เป็น primary antibody ให้ค่าการทำปฏิกิริยาในการตรวจสอบเชื้อ CTV ในน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ระดับการเจือจางของแอนติบอดี 1:25,600 ได้ดีกว่าแอนติบอดี ChIgY

4.2 การพัฒนาวิธี TAS-ELISA เพื่อศึกษา coating antibody ที่เหมาะสม พบว่าการใช้แอนติบอดี ChIgY ที่อัตราส่วน 1:400 สำหรับเคลือบ plate และใช้แอนติบอดี RIgG เป็น secondary antibody จะให้ค่า S/N ratio สูงกว่าการใช้แอนติบอดี RIgG ในการเคลือบ plate ถึง 3 เท่า และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ และได้นำรูปแบบของปฏิกิริยานี้ไปใช้ในการผลิตอิมมูโนสตริป

4.3 การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CTV และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เชื้อ CGMMV, PRSV, WSMoV, ZYMV, WMV,

SqMV, TMV, PMWaV-2, ChiVMV, CMV, MDMV,SCMV, BMV, MCMV และ *Candidatus Liberibacter*

5. การศึกษาประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อ CTV

การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA จากส่วนต่างๆของมะนาว ได้แก่ ยอด เนื้อใบ เส้นใบ เปลือกแก่ เปลือกอ่อน พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ CTV ได้ทุกส่วนของต้นมะนาว ที่นำมาตรวจสอบ แต่การใช้น้ำคั้นจากเนื้อเยื่อบริเวณ เส้นใบ เปลือกกิ่ง เปลือกลำต้น ให้ค่า OD 405 ที่สูง และให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ค่า OD 405 เท่ากับ 3.289, 3.465 และ 3.593 ตามลำดับ

การเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein ของเชื้อ CTV กับแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้า (commercial) ด้วยเทคนิค Triple Antibody Sandwich ELISA ตรวจสอบเชื้อ CTV ในตัวอย่างส้มที่เป็นโรคที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่างและตัวอย่างจากกรมวิชาการเกษตร 5 ตัวอย่าง โดยใช้แอนติบอดีที่พัฒนาจาก Recombinant-coat protein ของเชื้อ CTV และเปรียบเทียบกับแอนติบอดีจากบริษัท BIOREBA ด้วยเทคนิค TAS-ELISA พบว่าให้ค่า OD 405 เฉลี่ยของแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค recombinant protein และแอนติบอดีของบริษัท BIOREBA ให้ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค recombinant protein สามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีเชื้อ CTV เข้าทำลายได้ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอนติบอดีที่ผลิตเป็นทางการค้า

6. การพัฒนาวิธีเบื้องต้นในการใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้ในรูปแบบของ Diagnostic kit

การเตรียมชุดตรวจสอบใช้แอนติบอดี RIgG ในการ conjugate gold พ่นลงบนแผ่น conjugate release pad (CRP) นิดฟนเส้น control line และ test line ด้วยแอนติบอดี ChIgY ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ goat anti rabbit เข้มข้น 1:3 ตามลำดับ บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนชนิด Prima40 และชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสำหรับชุดตรวจสอบ อิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป คือ Na_2BO_3 ให้ปฏิกิริยาปรากฏบนเส้น control line ที่คมชัด สม่ำเสมอ และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเส้น test line สามารถนำไปตรวจสอบเชื้อ CTV ในต้นมะนาวที่เป็นโรคได้ทุกส่วน เช่น ยอด เนื้อใบ เส้นใบ เปลือกอ่อน และเปลือกแก่ และให้ความไวในการทำปฏิกิริยาที่ระดับค่าการเจือจางของน้ำคั้นมะนาวที่เป็นโรคอัตราส่วน 1:2 ถึง 1:32 และชุดตรวจสอบ

อิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปมีความจำเพาะกับเชื้อ CTV สูงโดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆที่นำมาทดสอบ

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีค-สตริปกับวิธี TAS-ELISA

การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปมีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี TAS-ELISA แต่วิธีการนี้เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้งานได้ง่ายและขั้นตอนไม่ยุ่งยากเหมือนวิธี TAS-ELISA ซึ่งสามารถตรวจสอบและเห็นผลการทำปฏิกิริยาภายใน 5 นาที ดังนั้นชุดตรวจสอบนี้จึงเหมาะสำหรับการคัดกรองตัวอย่างก่อนการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการสังเกตลักษณะอาการของพืชตระกูลส้มที่ถูกเชื้อ CTV เข้าทำลายที่พบในแปลงเกษตรกร อาการที่พบส่วนใหญ่ยังไม่รุนแรงมากซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ CTV ในพืชตระกูลส้มมีลักษณะเป็น mix infection ระหว่างสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้อาการที่พบไม่รุนแรง จากสมมุติฐานดังกล่าวน่าจะได้ทำการศึกษาอย่างละเอียดต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจนำมาซึ่งการได้เชื้อ CTV สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงและสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงได้ต่อไป และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ CTV พบว่าเชื้อ CTV ในประเทศไทยมีความแปรปรวนน้อยอาจเป็นเพราะมีการปลูกแบบกึ่งตอนเป็นหลัก ทำให้ไวรัสส่วนใหญ่ยังคงลักษณะเดิม หากไวรัสมีการแพร่ระบาดโดยแมลงโอกาสจะเกิดความหลากหลายของเชื้อ CTV น่าจะมากกว่านี้
2. การตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี TAS-ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการตรวจสอบนานเนื่องจากมีหลายขั้นตอน แต่มีประโยชน์สำหรับการตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยในพืชอาศัยโดยเฉพาะเชื้อ CTV ที่อาศัยอยู่ในเฉพาะท่ออาหาร ซึ่งการใช้วิธีนี้ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อในระดับการเจาะ-จางน้ำคั้นพืชเป็นโรคตั้งแต่อัตราส่วน 1:2 ถึง 1:16,384 ได้ และให้ค่า OD 405 สูงกว่า 1.500
3. การเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดี ChIgY จาก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับขีดเส้น test line สามารถช่วยเพิ่มความไวในการทำปฏิกิริยาของชุดตรวจสอบได้
4. การเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืชเป็นโรคสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CTV ด้วยวิธี ELISA และชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีสตริป ควรบดตัวอย่างให้ละเอียดดีที่สุด เนื่องจากเชื้อ CTV เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารและมีปริมาณน้อยถ้าเตรียมตัวอย่างไม่ดีอาจทำให้ไม่สามารถตรวจเจอเชื้อด้วยวิธีนี้ได้ เนื้อเยื่อที่สามารถนำมาตรวจด้วยวิธีนี้ได้ เช่น เส้นใบหรือเปลือก วิธีที่ง่ายคือ การบดด้วยไนโตรเจนเหลวหรือวิธีการทุบบริเวณเส้นใบหรือเปลือกให้ละเอียดที่สุด ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อใบของพืชตระกูลส้มเป็นส่วนที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่เป็นจำนวนมากมีผลทำให้โปรตีนเกาะ plate ได้ไม่ดี ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการเตรียมตัวอย่างจากเนื้อเยื่อใบ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นิรนาม. 2554. สารพัดคุณประโยชน์จากส้ม. แหล่งที่มา: <http://www.oknation.net/blog/monchai83/2011/03/15/entry-1>, 15 มีนาคม 2554.

เปรม ฌ สงขลา, กรกัญญา อักษรเนียม และ วรณภา เสนาดี. 2555. โอกาสทองและความท้าทายของพืชสวนไทยในปี 2555. *เคหการเกษตร*. 36: 76-89.

รวี เสธฐักดี. 2540. ส่วนต่างๆของส้มและการจำแนกประเภทของส้ม, น. 1-39. ใน *การอบรมสัมมนาหลักสูตร “วิทยาการส้ม: ทางเลือกปัจจุบันสู่อนาคต” รุ่นที่ 2. สำนักวิจัยและฝึกอบรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.*

รัชนี องประยูร. 2549. *บทปฏิบัติการเรียนรู้วิทยาทางด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 น.*

รัตนา สดุดี, มงคล แซ่หลิม และ สุภาพ เกียรติทับทิว. 2543. รายงานวิจัย เรื่องการควบคุมโรคทริสเทซ่าในส้มจูโดยการปลูกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ลัดดาวัลย์ สมเพาะ. 2550. *ระบาดวิทยาและการวินิจฉัยโรคทริสเทซ่าและกรีนนิ่งของมะนาวในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.*

วรพจน์ เลือสว. 2554. การผลิตอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริปเพื่อตรวจหาเชื้อ Potato virus Y (PVY). *ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.*

ศิริวรรณ คุณากร. 2525. *โรคทริสเทซ่าของมะนาวและวิธีการผลิตพันธุ์มะนาวให้ปราศจากโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.*

สรรพชัย จันทะจร, ธนายุทธ์ จิรัฐพงศ์, รัชนี องประยูร และ สุรัตน์วดี จิระจินดา. 2546. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในไก่ไข่โดยใช้สารสกัดจากกะเพราแดง ใน โครงการรางวัลนวัตกรรมระดับประเทศ ครั้งที่ 3, 17-19 ตุลาคม 2546, กรุงเทพฯ.

_____. 2550. การสกัดและวิเคราะห์สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากกะเพราแดง (*Ocimum sanctum* Linn.) โดยในอินเทอร์เน็ตลิวคิน 2 เป็นดัชนีในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2552. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. เพชรรุ่งการพิมพ์, นนทบุรี. 139-145.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. การผลิตชุดตรวจสอบไวรัสเพื่อใช้เอง GLIFT kit. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 50 หน้า

อำไพวรรณ ภราดรวันน์. 2545. สัม, น. 201-235. ใน สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนโดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 26. กรุงเทพฯ

Agranovsky, A.A., E.V. Koonin, V.P. Boyko, E. Maiss, R. Frotschl, N.A. Lunina and J.G. Atabekov. 1994. Beet yellows closterovirus: Complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. **Virology** 198: 311-324.

Ampaiwan Paradornuwat. 2003. **Diversity of Citrus Tristeza Closterovirus Isolates from Thailand**. Thesis Doctor of Philosophy Kasetsart University, Bangkok.

Ayazpour K., K.G. Vadamalai and H. Jaafar. 2011. Pomelo, a resistance variety to *Citrus tristeza virus* in peninsular Malaysia. **IPCBE**. 7: 96-99.

Bar-Joseph M., R. Marcus and R.F. Lee. 1989. The continuous challenge of *citrus tristeza virus* control. **Annu. Rev. Phytopathol.** 27: 291-316.

- Barzegar, A., H.H. Sohi and H. Rahimian. 2006. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates in northern Iran. **J Gen Plant Pathol.** 72: 46-51.
- Broadbent, P., K.B. Bevington and B.G. Coote. 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection, pp. 64–70. In R.H. Bransky, R.F. Lee and L.W. Timmer, eds. **Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. Riverside, CA. International Organization of Citrus Virologists.
- Cambra, M., M.T. Gorris, M.Marroquín, M.P. Román, A. Olmos, M.C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López and L. Navarro. 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian community of Spain. **Virus Res.** 71:85-95.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen Virol.** 34: 475-483.
- Chen, C. and J. Wu. 2012. A Fast and Sensitive Quantitative Lateral Flow Immunoassay for Cry1Ab Based on a Novel Signal Amplification Conjugate. **Sensors** 12: 11684-11696.
- Chowpongpan, S., N. Warin, A. Bhunchoth, R. Rodaree, K. Romyanon, S. Attathom, W. Kositratana, S. Wasee and T. Burns. 2002. Screening of transgenic Thai varieties of papaya for resistance to *Papaya ringspot virus*. **BIOTEC Research Project.** 80p.
- Costa, A.S. and G.W. Müller. 1980. Tristeza control by cross protection: a US–Brazil cooperative success. **Plant Dis.** 64: 538–541.
- Dolja, V.V., A.V. Karasev and E.V. Koonin. 1994. Molecular biology and evolution of Closteroviruses: Sophisticated build-up of large RNA genomes. **Annual Review of Phytopathology** 32: 261-285.

- _____. J.F. Kreuze and J.P. Valkonen. 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. **Virus Res.** 117: 38–51.
- Fagoaga, C., C. López, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña. 2005. Viral-like symptoms induced by the ectopic expresión of the p23 of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the patogenicity of the virus strain. **Mol. Plant–Microbe Interact.** 18: 435–445.
- _____. C. López, A.H. Hermoso de Mendoza, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña. 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Mol. Biol.** 66: 153–165.
- _____. P. B. Giovanni, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Pen'a. 2011. Ectopic expression of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* differentially modifies viral accumulation and tropism in two transgenic woody hosts. **Molecular Plant Pathology** 10(1111): 1364–3703.
- Ferbres, V.J., L. Ashoulin, M. Mawassi, A. Frank, M. Bar-Joseph, K. L. Manjunath, R. F. Lee and C. L. Niblett. 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. **Phytopathology** 86: 1331–1335.
- Frison, E.A., and M.M. Taher. 1991. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm. **FAO/IBPGR. Rome.** 50.
- Garnsey, S.M., T.R. Gottwald and R.K. Yokomi. 1996. Control strategies for *citrus tristeza virus*, In A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, eds. **Plant Viral Disease Control: Principles and Practices.** APS Press. St. Paul, MN.

- Ghorbel, R., C. López, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. **Mol. Plant Pathol.** 2: 27–36.
- Gonsalves, D. and S.M. Garnsey. 1989. Cross protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. **Plant Dis.** 73:592-597.
- Gottwald, T.R., S.M. Garnsey, M. Cambra, P. Moreno, M. Irey and J. Borbón. 1996. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of *citrus tristeza virus*, pp. 120-129. In da J.V. Graça, P. Moreno and R.K. Yokomi, eds. **Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. Riverside, CA. IOCV.
- Gowda, S., T. Satyanarayana, C.L. Davis, J. Navas-Castillo, M.R. Albiach-Martí, M. Mawassi, N. Valkov, M. Bar-Joseph, P. Moreno and W.O. Dawson. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. **Virology** 274: 246–254.
- Hampton, R., E. Ball and S. De Boer (eds). 1989. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens : A laboratory manual. **APS Press, St. Paul.** 389 pp.
- Hancevic, K., S. Cerni, G. Nolasco, T. Radic, K. Djelouah and D. Skoric. 2013. Biological characterization of *Citrus tristeza virus* monophyletic isolates with respect to p25 gene. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 81: 45-53.
- Hermoso de Mendoza, A., J.F. and Pina, J.A. 1984. Transmission of *citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain, pp. 23-27. In Garnsey, S.M., L.W. Timmer and J.A. Dodds, eds. **Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. Riverside, CA. IOCV.

- Hilf, M.E., A.V. Karasev, H.R. Pappu, D.J. Gumpf, C.L. Niblett and S. M. Garnsey. 1995. Characterization of *citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. **Virology** 208: 576-582.
- Iracheta-Cárdenas, M.M., P. Metheney, M.L. Polek, K.L. Manjunath, R.F. Lee and M.A. Rocha-Peña. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. **Plant Dis.** 93: 11-16.
- Jiang, B., N. Hong, G.P. Wang, J. Hu, J.K. Zhang, C.X. Wang, Y. Liu and X.D. Fan. 2008. Characterization of *Citrus tristeza virus* strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. **Virus Genes** 37: 185-192.
- Karasev, A.V., O.V. Nikolaeva, E.V. Koonin, D.J. Gumpf and S.M. Garnsey. 1994. Screening of the *closterovirus* genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. **J. Gen. Virol.** 75: 1415-1422.
- _____. V.P. Boyko, S. Gowda, O.V. Nikolaeva, M.E. Hilf, E.V. Koonin, C.L. Niblett, K. Cline, D.J. Gumpf and R.F. Lee. 1995. Complete sequence of the *citrus tristeza virus* RNA genome. **Virology** 20: 511-520.
- Latanya, C.F., F.T. Paula and A.M. Wayne. 2010. Detection and characterization of *Citrus tristeza virus* stem pitting isolates in Jamaica. **Eur J Plant Pathol.** 127: 1-6.
- Lee, R.F. 2001. *Citrus tisteza virus*. In O.C. Maloy and T.D. Murray. **Encyclopedia of plant Pathology Volume 1**. John Wiley and Son, Inc. New York, USA. 598: 244-246.
- _____. V.J. Febres and G.A. Moore. 2008. Transgenic resistance to Tristeza virus in grapefruit. **Plant Cell Reports.** 27: 93-104.

Leslie, G.A. and A.W. Clem. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function.

J. Exper. Med. 130: 1337-1352.

Locarnini, A.S., A.G. Coulepis, A.M. Stratton, J. Kaldor and I.D. Gust. 1979. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A-specific immunoglobulin M. **Journal of Clinical Microbiology** 9: 459-465.

Long, Y., Z. Chang-yong, Z. Yan and L. Zhong-an. 2010. Genetic Evolution Analysis on Wild Isolates of *Citrus tristeza virus* Originated in China Based on Coat Protein Genes Sequences. **Agricultural Sciences in China** 9(11): 1623-1629.

Lo'pez, C.J., M.A. Ayllon, J. Navas-Castillo, J. Guerri, P. Moreno and R. Flores. 1998. Molecular variability of the 5 and 3-terminal regions of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathology**. 88: 685-691.

_____. Navas-Castillo, S. Gowda, P. Moreno and R. Flores. 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. **Virology** 269: 462-470.

Lu, R., A. Folimonov, M. Shintaku, W.X. Li, B.W. Falk, W.O. Dawson and S.W. Ding. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 101: 15 742-15 747.

Maria, R., A.B., J.W. Grosser, S. Gowda, M. Mawassi, T. Satyanarayana, S. M. Garnsey and W. O. Dawson. 2004. *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. **Molecular Breeding** 14: 117-128.

- _____. B., C. Robertson, S. Gowda, S. Tatineni, B. Belliure, S.M. Garnsey, S.Y. Folimonova, P. Moreno and W.O. Dawson. 2010. The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Molecular Plant Pathology* 11(1): 55–67.
- Meyer, J.B., S.P. van Vuuren, M. Luttig, B.Q. Manicom and J.V. da Graca. 2005. Strain Prevalence of *Citrus tristeza virus* Cross-Protecting Isolates Altered by Red Grapefruit Navas-Castillo, J., M. R. Albiach-Marti, S. Gowda, M. E. Hilf, S. M. Garnsey and W. O. Dawson. 1997. Kinetics of accumulation of *citrus tristeza virus* RNAs. **Virology** 228: 92-97.
- Michael, A., S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran and S. Ramalingam. 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. **Indian Journal of Science and Technology** 3(4): 468-474.
- Moreno, P., J. Guerri and N. Munoz. 1989. Identification of Spanish strain of *Citrus Tristeza virus* by analysis of double-Stranded RNA. **Phytopathology** 80: 477-482.
- _____. Guerri, J.F. Ballester-Olmos, R. Albiach and M.E. Martinez. 1993. Separation and interference of strains from a *citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. **Plant Pathology** 42: 35-41.
- _____. S. Ambrós, M.R. Albiach-Martí, J. Guerri and L. Peña. 2008. Plant diseases that changed the world-*Citrus tristeza virus*: apathogen that changed the course of the citrus industry. **Mol. Plant Pathol.** 9: 251–268.
- Müller, G.W. and A.S. Cost. 1972. Reduction in the yield of Galego lime avoided by pre-immunization with mild strains of the tristeza virus, pp. 171-175. *In* W.C. Price, eds. **Proc. 5th Conf. Int. Org. Citrus Virol.** Univ. Florida Press, Gainesville.

- Navarro, L. 1993. Citrus sanitation, quarantine and certification programs, pp. 383-391. *In* P. Moreno, J.V. da Graça and L.W. Timmer, eds. **Proc.12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.** Riverside, CA. IOCV.
- Navas-Castillo, J., M.R. Albiach-Martí, S. Gowda, M.E. Hilf, S.M. Garnsey and W.O. Dawson. 1997. Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. **Virology** 228: 92-97.
- Niblett, C.L., H. Genc, B. Cevik, S. Halbert, L. Brown, G. Nolasco, B. Bonacalza, K.L. Manjunath, V.J. Febres, H.R. Pappu and R.F. Lee. 2000. Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. **Virus Research** 71: 97-106.
- Nurhadi, K. Sijam and I. Sulaiman. 2003. Production of Polyclonal Antibody to the Coat protein of *Citrus tristeza virus* in Chicken Egg. **Indonesia Journal of Agricultural Science** 4(1): 18-26.
- Pappu, H.R., A.V. Karasev, E.J. Anderson, S.S. Pappu, M.E. Hilf, V.J. Febres, R.M. G. Eckloff, M. McCaffery, V. Boyko, S. Gowda, V.V. Dolja, E.V. Koonin, D.J. Gumpf, K.C. Cline, S.M. Garnsey, W.O. Dawson, R.F. Lee and C.L. Niblett. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. **Virology** 199: 35-46.
- Plotz, C.M. and J.M. Singer. 1956. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am J Med.** 21(6): 888-92.
- Price, W.C. 1966. Flexuous rods in phloem cells of lime plants infected with *citrus tristeza virus*. **Virology** 29: 285-294.

Roistacher, C.N. and J.A. Dodds. 1993. Failure of 100 mild *Citrus tristeza virus* isolates from California to cross protect against a challenge by severe sweet orange stem pitting isolates, pp. 100–107. In P. Moreno, J. da Graça and L.W. Timmer, eds. **Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. Riverside, CA. IOCV.

_____. J.A. Dodds and J.A. Bash. 1988. Cross protection against citrus tristeza seedling yellows and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants, pp. 91–100. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey and L. Navarro, eds. **Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. Riverside, CA. IOCV.

Roy, A., P. Ramachandran and R.H. Balansky. 2003. Grouping and coparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and retriCTION analysis patterns. **Virus Research** 148: 707-722.

Salibe, A. A., A.A. Souza, M.L.P.N. Targon, G.W. Muller, H.D. Coletta Filho and M.A. Machado. 2002. Selection of a Mild Sub-isolate of *Citrus tristeza virus* for Preimmunization of Pera Sweet Orange, pp. 40-45. In **Proc. 15th Conf. IOCV. Univ. Fla. Press**. Gainesville, FL.

Sambade A., C. Lo'pez, L. Rubio, R. Flores, J. Guerri, and P. Moreno. 2003. Polymorphism of a specific region in gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. **Arch Virol**. 148: 2325-2340.

- _____. S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri, and P. Moreno. 2007. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants coinoculated with mild and severe variants. **Arch. Virol.** 152: 1115–1126.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Satyanayanana, T., S. Gowda, M. Mawassi, M.R. Albiach-Martí, M.A. Ayllón, C. Robertson, S.M. Garnsey and W.O. Dawson. 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. **Virology** 278: 253-265.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, M.A. Ayllón, M.R. Albiach-Martí, R. Rabindram and W.O. Dawson. 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. **J. Virol.** 76: 473-483.
- Schmittgen, T.D., B.A. Zakrajsek, A.G. Mills, V. Gorn, M.J. Singer and M.W. Reed. 2000. Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. **Analytical Biochemistry** 285: 194-204.
- Sekiya, M.E., S.D. Lawrence, M. McCaffery and K. Cline. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. **J. Gen. Virol.** 72: 1013-1020.
- Stewart, K.A. 2006. **Strain differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates from South Africa by PCR and microarray**. M.Sc. Thesis, University of Florida.

- Su, H.J. and M.C. Tsai. 1991. The etiological and transmission of fruit virus and virus-like diseases in Taiwan. *In Integrated Control of Plant Virus Diseases*. FFTC Supplement 1: 83-97.
- Su, H.J. 2008. Production and Cultivation of Virus-free Citrus Saplings for Citrus Rehabilitation in Taiwan. **APCoAB**. India.
- Tatineni, S., C. Robertson, S.M. Garnsey, M. Bar-Joseph, S. Gowda and W.O. Dawson. 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus. **Virology** 376: 297–307.
- Wong, C. and H.Y. Tse. 2009. **Lateral Flow Immunoassay**. Humana Press, New York.
- Xu, X.F., C.Y. Zhou, Z. Song and F.Y. Yang. 2006. Preliminary studies on CPG/*Hinf* I RFLP group of *Citrus tristeza virus* infection sweet oranges in China. *Agricultural Sciences in China* 5(1) : 39-44.
- Xueyuan, Z., Z. Changyong, T. Kezhi, J. Yuanhui, Y. Fangyun, H. sen, L. Taisheng, L. Kehong, L. Ying and C. Quanyou. 2002. Preliminary Evaluation of the Tolerance of 18 Pummelo Cultivars to Stem-Pitting Tristeza, pp. 172-174. *In Proceedings 15th Conference of the International Organization of Citrus Tristeza Virus*. IOCV.
- Yokomi, R.K. and S.M. Garnsey. 1987. Transmission of *citrus tristeza virus* by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. **Phytophylactica** 19: 169–172.
- _____. 2009. *Citrus tristeza virus*. **Agricultural Research Service (USDA-ARS) Parlier**, CA 93648, USA. 19-33.
- Yoshida, T. 1996. Graft compatibility of Citrus with plants in the Aurantioideae and their susceptibility to *Citrus tristeza virus*. **Plant Disease** 80: 414-417.



ภาคผนวก

การเตรียมสารสำหรับการทดสอบ ELISA

1. Carbonate coating buffer (CB), pH 9.6

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

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

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

2. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.00	กรัม
------	------	------

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

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

KCl	0.20	กรัม
-----	------	------

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

3. Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	97.00	มิลลิลิตร
----------------	-------	-----------

Sodium azide	0.20	กรัม
--------------	------	------

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100.00	มิลลิลิตร
---	--------	-----------

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

Buffer สำหรับ Western blotting**1X Tris buffer saline (TBS)**

Tris base	6.05	กรัม
NaCl	8.76	กรัม
NaN ₃	0.10	กรัม

เติม dH₂O จนครบ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH เท่ากับ 7.4

TBS-T solution

TBS ที่เติม 0.05% Tween-20

1X Transfer buffer solution

Tris base	3.03	กรัม
Glycine	11.26	กรัม

เติม dH₂O จนครบ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH เท่ากับ 8.3

Blocking solution

5% skim milk ใน TBS solution

Reaction mixed substrate for Western blotting (ZYMED)

น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร
NBT (ZYMED)	1	มิลลิลิตร

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE**1. Separating buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)**

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

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

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

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3. 12% Separating gel

30% Polyacrylamide	4.00	มิลลิลิตร
--------------------	------	-----------

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
------------------------	------	-----------

น้ำกลั่น	3.30	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

10% SDS-PAGE	0.10	มิลลิลิตร
--------------	------	-----------

10% ammonium persulfate	0.10	มิลลิลิตร
-------------------------	------	-----------

TEMED	0.004	มิลลิลิตร
-------	-------	-----------

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

4. 6% stacking gel

30 % Polyacrylamide	0.83	มิลลิลิตร
---------------------	------	-----------

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.65	มิลลิลิตร
------------------------	------	-----------

น้ำกลั่น	3.4	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
---------	------	-----------

10% ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
-------------------------	------	-----------

TEMED	0.005	มิลลิลิตร
-------	-------	-----------

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 4 มิลลิลิตร

5. Loading buffer 2 เท่า

2-mercaptoethanol	0.20	มิลลิลิตร
-------------------	------	-----------

Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

2% SDS	2.00	มิลลิลิตร
--------	------	-----------

Bromophenol blue	0.25	มิลลิกรัม
------------------	------	-----------

ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด

6. Running buffer 10 เท่า pH 8.3

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

7. Staining solution

0.2% Commisssie brilliant blue-R250	2	กรัม
45% Methanol	450	มิลลิลิตร
10% acetic acid	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร		

8. Destaining solution

25% methanol	250	มิลลิลิตร
7% acetic acid	70	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร		

การเตรียมสารสำหรับทดสอบชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟีคสตริป

1. Extraction buffer

Polyvinylpyrrolidone (PVP)	20.0	กรัม
Ovalbumin	2.0	กรัม
Sodium sulfa (anhydrous)	1.30	กรัม
Sodium azide	0.20	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate	0.2	กรัม
Disodium hydrogen orthophosphate (anhydrous)	1.15	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Tween-20	0.50	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยการเติม dH₂O จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 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	มิลลิลิตร
PBST	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

3. Extraction buffer (BIOREBA)

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

4. Phosphate buffer saline (PBST)

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
Tween-20	0.50	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร		

5. Extraction buffer (Na_2BO_3)

Sodium sulfite (anhydrous)	4	กรัม
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	10	กรัม
SDS	3	กรัม
Triton X-100	10	มิลลิลิตร
Na_2BO_3	38.10	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

6. CTV extraction buffer

Tris-base	1.18	กรัม
Tris-HCl	6.35	กรัม
Na-DIECA (Sodium N,N-diethyldithiocarbamate trihydrate)	100	กรัม
Tween-20	0.20	มิลลิลิตร
NaCl	0.4	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวยุพา โพธิ์แก้ว
เกิดวันที่	20 สิงหาคม 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดสุรินทร์
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์ พ.ศ. 2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม พ.ศ. 2556 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้ช่วยงานวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554