



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในพืชตระกูลแตง

Development of *Papaya ringspot virus* Detection kit in Cucurbits

นามผู้วิจัย นางสาวสุกัญญา หนูชู

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศรีเมฆ ชวโงพงาง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วันเพ็ญ ศรีทองชัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์อนงค์นุช สาสนรักกิจ, วท.ค.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างจูดวงแหวนมะละกอในพืชตระกูลแตง

Development of *Papaya ringspot virus* Detection kit in Cucurbits

โดย

นางสาวสุกัญญา หนูชู

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุกัญญา หนูชู 2558: การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในพืช
ตระกูลแตง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, Ph.D. 114 หน้า

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ *Papaya ringspot virus* Type P (PRSV-P) เป็นเชื้อไวรัส
สาเหตุโรคที่สำคัญในพืชตระกูลแตง การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างจุดวง
แหวนมะละกอ (PAb-PRSV) โดยการผลิต Recombinant PRSV coat protein ในระบบเซลล์
แบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นแอนติเจน สำหรับฉีดกระตุ้นให้กระต่ายสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดี เก็บ
แอนติซีรัมแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV ใน
พืชตระกูลแตง พบไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ เมื่อนำมาตรวจสอบกับแอนติบอดีทางการค้า
ให้ผลการตรวจสอบที่สอดคล้องกัน การพัฒนาการเทคนิคทางซีรัมวิทยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ PRSV
ในพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect ELISA),
Dot-blot immunobinding assay (DIBA), Tissue blot immunoassay (TBIA) และ Lateral Flow
Immunochromatography Assays (LFIA) พบว่าเทคนิค Indirect ELISA มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดใ
การตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นที่ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
และน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่เจือจางเท่ากับ 1:1,280 ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม
กับพืชปกติ สามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV ได้ทุกบริเวณของพืชที่เป็นโรค จากการตรวจสอบ
ตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเกษตรกร 560 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ PRSV 265 ตัวอย่าง (47.32%) และ
ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ PRSV มากที่สุดคือ แตงโม (19.24) เมื่อนำ PAb-PRSV มาพัฒนาชุด
ตรวจสอบด้วยเทคนิค LFIA โดยใช้ PAb-PRSV เชื่อมต่อกับอนุภาคทอง เป็นตัวจับแอนติเจนที่
บริเวณ conjugated pad และใช้ MAb-Potyvirus (1G8 สวทช.) มาเป็น Test line สามารถตรวจสอบ
Recombinant PRSV coat protein ที่มีความเจือจางในระดับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และชุด
ตรวจสอบยังไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชที่เป็นโรคได้ แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นควรมานำมา
พัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตง ซึ่งควรพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA kit หรือ
DIBA kit

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Sukanya Noochoo 2015: Development of *Papaya ringspot virus* Detection kit in Cucurbits. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Mr. Srimek Chowpongpan, Ph.D. 114 pages.

The *Papaya ringspot virus* Type P (PRSV-P) caused a major disease in cucurbits. The Polyclonal antibody anti PRSV production used the recombinant PRSV coat protein that was produced in the bacterial cell system, It was injected into a rabbit to produce PRSV coat protein specific polyclonal antibodies. Antiserum was collected and purified. The extracted IgG used for PRSV-specific detection in cucurbits, Absence of cross reactivity was not observed in healthy plant. On the other hand, Similar results were obtained from using this IgG and commercial antibody. So we developed PRSV detection by Serological techniques; Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA), Dot-blot immunobinding assay (DIBA), Tissue blot immunoassay (TBIA) and Lateral Flow Immunochromatography Assays (LFIA). The result showed indirect ELISA was highest efficiency to detect of purified Recombinant PRSV coat protein at 5 ng/ μ l, and the dilution of PRSV infected plant sap at 1:1,280, Also PAb-PRSV did not react with healthy plant sap, PRSV were detected in many parts of this plant that infected with PRSV. Five hundred and sixty plant samples that were collected from farmer's field were tested for the presence of PRSV. The result showed that 265 (47.32%) samples were positive. And watermelon samples showed the highest incidence for PRSV (19.24%). This PAb-PRSV was used at LFIA development for PRSV detection, PAb-PRSV was conjugated with colloidal gold particles for antigen capture at the conjugate release pad. And MAb-Potyvirus was immobilized on test line. The efficiency of LFIA was assessed by testing with purified Recombinant PRSV coat protein (the sensitivity was about 100 μ g/ml) nevertheless this kit couldn't detect PRSV infected plant. So this PAb-PRSV should develop as ELISA kit or DIBA kit for PRSV detection in cucurbits.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพพง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการวางแผนการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. อนงค์นุช สาสนรักกิจ ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และดร. ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร วิทยาเขตบางเขน และกรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้ออำนวยความสะดวก และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ อีกทั้งเครื่องมือในการทำงานวิจัย และขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุก ท่านที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และเป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่คุณพ่อ คุณแม่ อาจารย์ทุกท่าน และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญอย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จด้วยดี ทั้งยังเป็นผู้ที่สนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา

ศุภัญญา หนูชู
มกราคม 2558

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	91
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	106
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	114

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนต่าง ๆ ของต้นตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV ซึ่งเก็บตัวอย่างมาทดสอบด้วยเทคนิค TIBA	36
2	โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บเลือด และค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตในกระต่าย White New Zealand	58
3	การแยกภูมิโนโกลบูลินบริสุทธิ์จาก PAb-PRSV ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ด้วยชุดสกัด protein A column chromatography	60
4	ผลการตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Indirect ELISA	63
5	ความสามารถในการป้องกันการเกิด non-specific reaction ของ Blocking solution 2 ชนิด ได้แก่ SK และ BSA เพื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค Indirect ELISA	64
6	ค่าความเจือจางสูงสุด (Dilution end point) ของแอนติเจนที่สามารถตรวจพบเชื้อ PRSV ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA	66
7	เปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้าสำหรับการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตง	71
8	ผลการทดสอบความจำเพาะของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ต่อตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยวิธี Indirect ELISA	75
9	ลักษณะอาการของพืชอาศัยที่นำมาตรวจเชื้อ PRSV โดยใช้ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA	76
10	ปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Colloidal gold โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} นาโนเมตร	78
11	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเปรียบเทียบ Colloidal gold ที่เตรียมได้กับ Colloidal gold ทางการค้า	83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ผลการตรวจสอบของชุด LFIA ที่ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรเป็นเส้น Control line และใช้ Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบ	84
13	ผลการทดสอบความจำเพาะของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ต่อตัวอย่างพืชทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA	89
14	เปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจสอบ ELISA, DIBA และ LFIA	96

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 อนุภาคเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) ซึ่งจัดอยู่ใน Genus Potyvirus	9
2 โครงสร้างจีโนมของ Potyvirus (single stranded, positive-sense RNA) แสดงส่วนต่างๆ ของยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ ของ Potyvirus จาก N-terminus ไปสู่ C-terminus	13
3 องค์ประกอบต่างๆ ที่ประกอบเป็น Lateral Flow Immunochromatography Assays (LFIA) ซึ่งประกอบด้วย Backing pad, Sample pad, Conjugate pad, Reaction membrane และ Absorption pad	24
4 การประกอบชุดตรวจสอบ LFIA ประกอบด้วย plastic backing polyester ขนาด 30 x 60 เซนติเมตร, Sample pad, Conjugated pad, Reaction membrane เมมเบรน ที่มี Test line และ Control line, Absorption pad หรือ wicking pad	44
5 เปรียบเทียบลักษณะอาการของสควอชปกติ และสควอชที่ปลูกเชื้อ PRSV	45
6 เปรียบเทียบลักษณะอาการของฟักทองปกติ และฟักทองที่ปลูกเชื้อ PRSV	46
7 เปรียบเทียบลักษณะอาการของตำลึงปกติ และตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV	46
8 ลักษณะอาการของตัวอย่างแตงโมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	47
9 ลักษณะอาการของตัวอย่างฟักทองที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	48
10 ลักษณะอาการของตัวอย่างตำลึงที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	48
11 ลักษณะอาการของตัวอย่างมะระจีนที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	49
12 ลักษณะอาการของตัวอย่างฟักเขียวที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ลักษณะอาการของตัวอย่างแดงขาวที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	50
14	ลักษณะอาการของตัวอย่างบวบเหลี่ยมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	51
15	ลักษณะอาการของตัวอย่างใบบวบหอมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	51
16	ลักษณะอาการของตัวอย่างใบบวบงูที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	52
17	ลักษณะอาการของตัวอย่างใบกระทกรกที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	52
18	ลักษณะอาการของตัวอย่างใบกระทกรกที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV	53
19	ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Recombinant PRSV coat protein ที่มีการผลิตในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ M15 ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE	54
20	ผลการวิเคราะห์ขนาด และปริมาณ Recombinant PRSV coat protein หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยวิธี SDS-PAGE	56
21	ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ PRSV เมื่อใช้โปรตีน Recombinant PRV coat protein บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA	59
22	การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย protein A column chromatography ด้วยวิธี SDS-PAGE	61
23	ผลการตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 5 นาที หลังจากเติมสับสเตรท	62

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	การเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของ IgG จาก PAb-PRSV และ MAb-PRSV ที่ค่าความเจือจางต่าง ๆ ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA	65
25	ผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยด้วยเทคนิค DIBA การตรวจสอบที่เวลา 5 นาที หลังจากเติมสับสเตรท	66
26	ผลการตรวจสอบค่าถึงด้วยเทคนิค TIBA และ Indirect ELISA อ่านผลที่เวลา 15 นาทีหลังเติมสับสเตรท	68
27	จำแนกจำนวนตัวอย่างตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA	73
28	ร้อยละการเป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอจำแนกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่างตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA	73
29	สัดส่วนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ PRSV ต่อตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ PRSV จำแนกตามชนิดตัวอย่างตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA	74
30	แสดงค่า O.D ₅₂₀ และการเปลี่ยนแปลงสีของ Colloidal gold ที่ปริมาณความเข้มข้น IgG ของ PAb-PRSV ที่ระดับต่างๆ ที่ 10 นาทีหลังเติม 10 % NaCl	78
31	เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น A ₄₀₀₋₇₀₀ นาโนเมตร ของ Colloidal gold และ Colloidal gold conjugated IgG	79
32	การเปรียบเทียบขนาดของ Colloidal gold ก่อนและหลัง การเชื่อมด้วย IgG ของ PAb-PRSV ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ กำลังขยาย 120,000 เท่า	80
33	ความเข้มสีที่เกิดบริเวณ Control line จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง GAR ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร	81
34	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนชุด LFIA เมื่อใช้ Sample buffer ชนิดต่าง ๆ	86
35	แสดงผลการตรวจสอบของชุดตรวจสอบ LFIA เมื่อทดสอบที่ระยะเวลา 5 นาที	87

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A ₄₀₅	=	Absorbance at 405 nanometre
A ₅₂₀	=	Absorbance at 520 nanometre
A ₅₉₅	=	Absorbance at 595 nanometre
BS	=	Bovine serum albumin
As	=	Antiserum
CB	=	Carbonate coating buffer
CFA	=	Complete Freund's adjuvant
DIBA	=	Dot-blot immunobinding assay
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
GAR	=	Goat anti rabbit
GAR	=	Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase
IPTG	=	isopropyl-beta-D-thylogalactopyranoside
IFA	=	Incomplete Freund's adjuvant
Indirect ELISA	=	Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	=	Gamma-immunoglobulin
kDa	=	Kilodalton
LFIA	=	Lateral Flow Immunochromatography Assays
M	=	Protein molecular weight markers
MAb	=	Monoclonal antibody
Ns	=	Normal serum
NC	=	Nitrocellulose membrane
Ni-NTA	=	Nickel-nitriloacetic acid agarose
O.D. ₄₀₅	=	Optical density at 405 nanometer wavelength
O.D. ₅₂₀	=	Optical density at 520 nanometer wavelength
PA	=	Polyclonal antibody
PRSV-P	=	<i>Papaya ringspot virus</i> Type P
PRSV-W	=	<i>Papaya ringspot virus</i> Type W

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PBS	=	Phosphate buffer saline
PBST	=	Phosphate buffer saline with 0.05% Tween-20
PNPP	=	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
SC	=	Subcutaneous injection
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SK	=	Skim milk
S/N ratio	=	Signal-to-noise-ratio
TIBA	=	Tissue immunoblotting assay
TBS	=	Tris-buffer saline
TBS	=	Tris-buffer saline with 0.05% Tween-20
TVMV	=	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
v/v	=	volume per volume
w/	=	weight per volume

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ในพืชตระกูลแตง

Development of *Papaya ringspot virus* Detection kit in Cucurbits

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการผลิตสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกหลายชนิด อย่างไรก็ตามการส่งสินค้าออกสู่ตลาดต่างประเทศ สินค้าที่ส่งออกต้องได้รับการตรวจสอบเพื่อรับรองว่าปลอดเชื้อและไม่มีสารพิษตกค้าง หรือถ้ามีการปนเปื้อนต้องไม่เกินมาตรฐานที่ประเทศผู้ค้ากำหนด หนึ่งในสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศหลายร้อยล้านบาทต่อปี คือ พืชตระกูลแตงซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* เช่น แตงโม แตงกวา แตงร้าน ฟักทอง ฟักเขียว บวบเหลี่ยม บวบหอม แคนตาลูป น้ำเต้า สควอช และมะระ เป็นต้น พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ทางภาคกลาง และภาคตะวันตก รองลงมา ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ซึ่งทำรายได้หลักให้แก่ประเทศในรูปแบบการส่งออกเมล็ดพันธุ์ ผลสด และอาหารแปรรูป เป็นต้น จากข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตรในปี 2555 พบว่า ประเทศไทยมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ผัก 18,380.9 ตัน โดยมีมูลค่า 3,904.49 ล้านบาท ในพืชตระกูลแตงแตงโมมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์มากกว่าพืชอื่นๆ โดยคิดเป็นปริมาณเมล็ดพันธุ์แตงโม 139.14 ตัน มูลค่า 381.58 ล้านบาท รองลงมา คือ แตงกวา และแคนตาลูป (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, 2556) และมีแนวโน้มเพิ่มปริมาณสูงขึ้นทุก ๆ ปี ปัญหาหลักในการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง คือ การเข้าทำลายของศัตรูพืช ได้แก่ แมลง ไส้เดือนฝอย เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และโรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ เพิ่มต้นทุนทางการผลิต ส่งผลกระทบต่อทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิตทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด

สำหรับประเทศไทยตรวจพบโรคไวรัสพืชตระกูลแตงหลากหลายชนิด โดยเฉพาะ *Papaya ringspot virus* Type W (PRSV-W) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชตระกูลแตงเป็นอันดับที่สองรองจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) (เครือพันธุ์ และคณะ, 2535) ความเสียหายของพืชตระกูลแตงที่ถูกเชื้อ PRSV เข้าทำลายส่งผลกระทบต่อผลผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ถ้าหากพืชเกิดการติดเชื้อ PRSV เชื้อจะสามารถแพร่กระจายไปสู่พืชอาศัยข้างเคียงโดยวิธีการสัมผัสและแมลงพาหะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว ยกแก่การควบคุม ด้วยเหตุนี้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยี ซึ่งได้รับความนิยมและมีการวิจัยอย่างต่อเนื่อง นำไปสู่การพัฒนา

เทคโนโลยีที่ใช้สำหรับตรวจสอบที่เรียกว่า Lateral Flow Immunochromatography Assay (LFIA) ที่สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็ว สำหรับในประเทศไทยมีการพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสในพืช ได้แก่ สุรภี และคณะ, (2547) และ กิตติศักดิ์ และคณะ, (2549) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้ และไวรัสของมันฝรั่งด้วยเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ทำให้การตรวจสอบไวรัสมีความสะดวกมากขึ้น และอ่านผลได้ในเวลารวดเร็วเพียง 5 นาที วิชชุตา และคณะ, (2554) ได้นำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใช้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสใบหงิกของข้าว ด้วยวิธี Lateral Flow Immunochromatography Assay (LFIA) ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้งานง่าย สะดวก และอ่านผลได้รวดเร็ว โดยสามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกจากใบข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อไวรัสใบหงิกได้ในเวลาประมาณ 5-10 นาที จะเห็นได้ว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจสอบโรคในชิ้นส่วนพืชได้อย่างรวดเร็ว จึงมีส่วนช่วยในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างทันสถานการณ์ อีกทั้งการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคเป็นเรื่องที่ทำได้ยากลำบาก เนื่องจากเชื้อมีอนุภาคขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงต้องนำตัวอย่างพืชไปตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการที่มีความยุ่งยาก ซับซ้อน อีกทั้งผู้ตรวจวินิจฉัยต้องมีความรู้ความสามารถเฉพาะทาง จากข้อจำกัดดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น LFIA จึงเป็นเทคโนโลยีที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ในการพัฒนาสำหรับตรวจสอบชิ้นส่วนของพืชก่อนการปลูกหรือขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งสามารถใช้ในการเฝ้าระวัง เพื่อตรวจสอบและวางแผนการควบคุมโรคไม่ให้เกิดการระบาดเมื่อมีการปลูกพืชไปแล้ว ทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดโรค นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ปฏิบัติได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องอาศัยทักษะและความชำนาญเฉพาะด้าน ทำให้การตรวจสอบโรคเป็นไปได้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น ส่งผลดีต่อการผลิตโดยภาพรวมของประเทศ ดังนั้นจึงเกิดงานวิจัยชุดตรวจสอบ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ในพืชตระกูลแตงขึ้น เพื่อเป็นการพัฒนาให้สามารถตรวจสอบไวรัส PRSV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ โดยเทคนิค LFIA เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบชิ้นส่วนของพืชก่อนการปลูกหรือขยายพันธุ์ ให้สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในพืชตระกูลแตงได้อย่างทันทั่วถึง อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อทั้งเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ด่านกักกันพืช นำไปใช้ตรวจไวรัสในชิ้นส่วนพืชนอกห้องปฏิบัติการได้ด้วยตนเอง

วัตถุประสงค์

1. ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบด่างจูดวงแหวนมะละกอ โดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบด่างจูดวงแหวนมะละกอที่ได้จากการโคลนยีนและผลิตเซลล์แบคทีเรีย (*E.coli*) มาใช้ในการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง
2. นำแอนติบอดีที่ผลิตได้ มาใช้พัฒนาเป็นการตรวจสอบโรคใบด่างจูดวงแหวนมะละกอในพืชตระกูลแตง

การตรวจเอกสาร

1. พืชตระกูลแตง

พืชตระกูลแตงเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญของโลก มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นของโลก และกระจายพันธุ์ทั่วไปในเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้น สำหรับประเทศไทยมีการปลูกพืชตระกูลแตงกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ส่งออก พื้นที่ปลูกพืชตระกูลแตงในประเทศไทย มีประมาณ 440,000 ไร่ หรือ 15% ของพื้นที่ปลูกผักทั้งหมด (กรมวิชาการเกษตร, 2556) ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เพื่อการบริโภคภายในประเทศและมีการส่งออกในรูปผักสด และผักแปรรูปชนิดต่าง ๆ ตลอดจนเมล็ดพันธุ์ พืชตระกูลแตงที่มีการปลูกเพื่อส่งออกเมล็ดพันธุ์เป็นหลัก ได้แก่ แตงโม แตงกวา แคนตาลูป ฟักทอง และมะระ โดยมีพื้นที่เพาะปลูกอยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ แตงโมมีพื้นที่ปลูกมากเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมา ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง แตงร้าน บวบ ฟักเขียว มะระจีน และแคนตาลูป

พืชตระกูลแตงจัดอยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* ส่วนใหญ่เป็นพืชฤดูเดียว ลำต้นเป็นเถาเลื้อย มีใบรูปทรง 5 เหลี่ยม และมีขนาดปานกลาง ลำต้นสามารถม้วนงอ และมีมือเกาะ ใบเป็นใบเดี่ยวแบบฝ่ามือ มีการเรียงตัวแบบสลับ ไม่มีใบเลี้ยง ดอกเป็นแบบสมมาตรตามรัศมี (actinomorphic) ตามลักษณะทางชีววิทยาแยกเป็น 5 ตระกูลย่อย (subfamily) ได้แก่ Fevilleae, Melothriacae, Cucurbitaceae, Sicyoideae และ Cyclanthereae แตงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ แตงโม *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mats. & Nakai แตงกวา *Cucumis Sativus* Linn. แคนตาลูป *Cucumis melo* L. บวบหอม *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. บวบเหลี่ยม *Luffa acutangula* (L.) Roxb. น้ำเต้า *Lagenaria siceraria* Standl. ฟักทอง *Cucurbita pepo* L. และสตวอช *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.

2. โรคไวรัสที่สำคัญในพืชตระกูลแตง

จากการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกพืชตระกูลแตงในประเทศไทยได้มีการตรวจพบไวรัสที่สำคัญในพืชตระกูลแตงแพร่ระบาดทุกพื้นที่เพาะปลูกของประเทศ อาการที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ อาการใบด่าง ใบจุดเหลือง ใบหยิกย่น และบิดเบี้ยวผิดปกติ ต้นแคระแกร็น ผลด่างขรุขระบิดเบี้ยว และผลผลิตลดลง ไวรัสที่พบว่าเป็นสาเหตุของอาการดังกล่าว ได้แก่ ไวรัสใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*,

CMV) ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (*Papaya ringspot virus* Type P และ Type W, PRSV-P และ PRSV-W) ไวรัสใบด่างเหลืองซูกินี (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) ไวรัสใบด่างแดงโมสายพันธุ์ 2 (*Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2) โรคใบด่างเขียว *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (Thonmo and Thummabenjapone, 2008)

โรคใบด่างแดงเกิดจากเชื้อไวรัส CMV อยู่ในกลุ่ม Cucumovirus มีอนุภาคเป็นทรงกลม ประกอบด้วย single-stranded RNA พืชอาศัยของเชื้อในพืชตระกูลแตง ได้แก่ พักเจียว พักทอง บวบเหลี่ยม แตงร้าน แตงไทย แตงโม แตงกวา แคนตาลูป บวบหอม มะระจีน และน้ำเต้า ลักษณะอาการของโรค คือ ใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบม้วนงอ ต่อมาใบเริ่มเรียวเล็กกว่าปกติอาจมีลักษณะเรียวยาวเหลือแต่เส้นใบ ต้นแคระแกร็น เชื้อถ่ายทอดโรคโดยวิธีการสัมผัส และมีเพี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ ในลักษณะ non-persistent (Brunt *et al.*, 1996)

โรคไวรัสใบด่างแดงโมสายพันธุ์ 2 เกิดจากเชื้อ WMV-2 เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม Tobamovirus มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด ประกอบด้วย single-stranded RNA พืชอาศัยของเชื้อในพืชตระกูลแตง ได้แก่ พักเจียว แตงโม แคนตาลูป แตงกวา พักทอง และสควอช ลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไป คือ ใบด่างสีเหลืองหรือเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม พืชที่เป็นโรครุนแรงใบจะขรุขระ เป็นคลื่น ลดขนาด เสียรูปทรง เชื้อถ่ายทอดโรคโดยวิธีสัมผัส โดยผ่านทางน้ำคั้นของพืช มีเพี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ ในลักษณะ non-persistent และเชื้อไม่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (Yu *et al.*, 1989)

โรคใบด่างเขียวของพืชตระกูลแตงเกิดจากเชื้อไวรัส CGMMV เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม Potyvirus มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ประกอบด้วย single-stranded RNA โดยเชื้อเข้าทำลายทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช พืชอาศัยของเชื้อในพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา แตงโม แคนตาลูป บวบ และมะระ ลักษณะอาการของโรค คือ ใบด่าง โป่งนูน บิดเบี้ยว บางครั้งพบใบด่างเหลืองสว่างกระจายทั่วไป เชื้อสามารถถ่ายทอดโรคโดยการสัมผัสผ่านทางน้ำคั้นของพืช เมล็ดพันธุ์ และเศษซากพืช (Komuro *et al.*, 1968)

โรคใบด่างเหลืองซูกินีเกิดจากเชื้อไวรัส ZYMV เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม Potyvirus มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด ประกอบด้วย single-stranded RNA พืชอาศัยของเชื้อ ได้แก่ แตงโม แตงกวา น้ำเต้า พักทอง บวบเหลี่ยม บวบหอม และซูกินี ลักษณะอาการของโรคบนพืชอาศัยมีลักษณะอาการคล้ายกับพืชที่เป็นโรค WMV-2 และ PRSV-W อาการของโรคที่เกิดขึ้นที่ใบ คือ ใบด่าง

ผิวใบขรุขระ ผลมีรูปร่างบิดเบี้ยวผิดปกติ เชื้อไวรัสถ่ายทอดโรคโดยการสัมผัสผ่านทางน้ำคั้นของพืช มีเพื่อย่อนเป็นแมลงพาหะในลักษณะ non-persistent (Blua *et al.*, 1989)

3. โรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

โรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอเป็นโรคที่มีความสำคัญในพืชตระกูลแตงในหลายประเทศทั่วโลก (Lecoq *et al.*, 2001) รวมถึงประเทศไทย ซึ่งเชื้อสาเหตุของโรค คือ เชื้อ *Papaya ringspot virus* Type P และ Type W (PRSV-P และ PRSV-W) ซึ่งจัดจำแนกตามพืชอาศัยของเชื้อ PRSV-W เดิมเรียกชื่อ *Watermelon mosaic virus-1* (WMV-1) (Yeh *et al.*, 1984) ในประเทศไทยพบว่า PRSV เป็นไวรัสที่สร้างความเสียหายในพืชตระกูลแตงเป็นอันดับสองรองจาก CMV

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในพืชอาศัยวงศ์ *Cucurbitaceae* ดังต่อไปนี้ พักทอง (ถวิล, 2518; วิไล และคณะ, 2525; สุรภิ และนวลจันทร์, 2526) แตงไทย (วิไล และคณะ, 2525; สุรภิ และนวลจันทร์, 2526) และแตงโม (วิไล และคณะ, 2525) ในงานวิจัยยุคถัดมามีการระบุว่า พืชอาศัยของ PRSV-P ได้แก่ พักเขียว แตง บวบต่างๆ รวมทั้งแตงกวา แตงป่า และตำลึง (วิชัย และคณะ, 2533)

3.1 เชื้อสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

PRSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus แบ่งออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *Papaya ringspot virus* Type P (PRSV-P) และ Type W (PRSV-W) ซึ่ง PRSV-W เดิมเรียก WMV-1 เป็นเชื้อที่ก่อโรคเฉพาะพืชวงศ์แตงเท่านั้น ในประเทศไทย จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งเส้นเท่ากับ 11.4 กิโลเบส ของ PRSV-W พบว่านิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับ PRSV ที่พบในแหล่งอื่น 83-95 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะมิโนเหมือนกันในระดับ 91-97 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่าง PRSV-P และ PRSV-W ที่บ่งชี้ถึงการก่อโรคที่แตกต่างกัน (Attasart, 2003) การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ พบว่าในสภาพน้ำคั้น เชื้อหมดความสามารถในการทำให้เกิดโรคแก่พืชทดสอบเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Longevity in vitro, LIV) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ความคงทนต่อความร้อน (Thermal inactivation point, TIP) 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ความคงทนเมื่อเจือจาง (Dilution end point, DEP) 1:1,000 (Purcifull *et al.*, 1984)

3.2 การถ่ายทอดโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

เชื้อ PRSV ถ่ายทอดโรคได้ดีโดยวิธีการผ่านทางบาดแผล (mechanical transmission) และถ่ายทอดโดยแมลงพาหะ (insect transmission) พวกเพลี้ยอ่อนหลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) (Karl and Schmelzer, 1971) ในลักษณะ non-persistent ใช้เวลาสั้นๆ เพียง 10-30 วินาที ขบวนการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะต้องการ helper component คือ โปรตีน AI ซึ่งสร้างขึ้นในเซลล์พืชโดยอาศัยรหัสจากอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส เชื้อไม่ถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ด

3.3 พืชอาศัยและลักษณะอาการไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

พืชอาศัยหลักของเชื้อ PRSV คือ พืชที่อยู่ในวงศ์ *Caricaceae* วงศ์ *Chenopodiaceae* และวงศ์ *Cucurbitaceae* ลักษณะอาการของโรคแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพืชอาศัย เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของ

3.3.1 วงศ์ *Caricaceae* ได้แก่ มะละกอ อาการของโรคพบได้ทุกส่วนของต้น อาการโดยทั่วไป คือ ใบด่างสีเขียวแก่สลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น หรือบิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่าง เหลือแต่เส้นกลางใบ บนผลมีอาการคล้ายกับบนต้น และก้านใบคือ เป็นจุดสีเขียวขี้ม้า อาการจุดวงแหวนสีเขียว (ringspot) จุดวงแหวนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อผลสุก ผิวของผลขรุขระ เนื้อภายในมีลักษณะแข็งและเมื่อเริ่มสุกจะเน่า ปริมาณน้ำตาลในผลลดลง ต้นเป็นโรคจะมีปล้องสั้น

3.3.2 วงศ์ *Chenopodiaceae* ได้แก่ goosefoot (*Chenopodium amaranticolor*) และ quinoa (*Chenopodium quinoa*) จะเกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) สีน้ำตาลอ่อน

3.3.3 วงศ์ *Cucurbitaceae* หลายชนิด ได้แก่ แตงกวา แตงโม แคนตาลูป น้ำเต้า ฟักทอง สควอช และซูกินี อาการแพร่กระจายตามส่วนต่างๆ ของพืช (systemic infection) ลักษณะอาการจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืชอาศัย

แดง โม อาการค้างสีเขียวเข้มสลับเหลืองที่ใบ มีตุ่มนูนบนเนื้อใบที่เป็นสีเขียว เมื่อเชื้อมีพัฒนาการที่รุนแรงขึ้น อาการที่ผลจะเป็นวงซ้อนกัน กระจายทั่วผล เมื่อผลสุกปริมาณน้ำตาลในผลลดลง

มะระจีน อาการจุดเขียวอ่อนกระจายบนพื้นใบสีเขียวเข้ม หรือทั้งใบแสดงอาการเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ใบแก่แสดงอาการเหลืองสลับเขียว ต้นที่เป็นโรครุนแรง ลำต้นนี้มากกว่าปกติและมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล ผลบิดเบี้ยวไม่สมบูรณ์ และเรียวยาวทางปลาย

ฟักทอง ใบยอดของฟักทองเกิดอาการค้าง ลักษณะใบใส (vein clearing) ใบหดย่นเล็กน้อย ต่อมาพืชแสดงอาการค้างชัดเจนขึ้น มีลักษณะสีเขียวเข้มระหว่างเส้นใบ บริเวณเส้นใบมีสีเขียวอ่อน หรือแถบสีเขียวเข้มขนานไปตามเส้นใบ (vein banding) บางครั้งพบอาการตุ่มนูนสีเขียวเข้มใบลดรูปบิดเบี้ยว

สควอช แสดงอาการใบค้างเหลืองสลับสีเขียว เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น อาการรุนแรงใบจะเรียวย่นเล็กเหลือแต่เส้นใบ ผลมีขนาดเล็กบิดเบี้ยวผิดปกติ

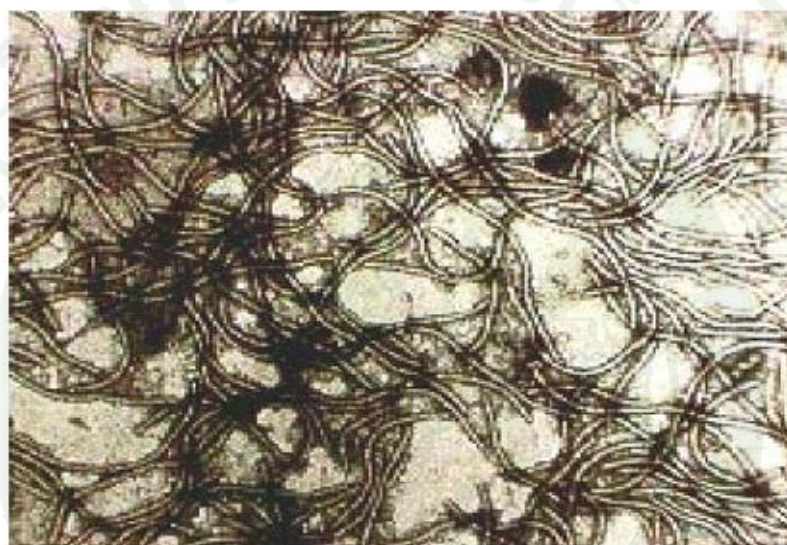
ฟักเขียว เกิดอาการเส้นใบใสบนใบจริงคู่แรก เมื่ออาการรุนแรงพืชแสดงอาการใบค้างสีเขียวอ่อน หรือสีเขียวปนเหลืองสลับสีเขียวเข้ม ใบหดย่น เป็นคลื่น ม้วนงอ เนื้อใบโป่งพอง ใบจริงที่เจริญต่อมาขนาดเล็ก เสียรูปทรง และพืชที่แสดงอาการรุนแรงในส่วนยอดชะงักการเจริญเติบโต ต้นแคระแกร็น ไม่ให้ผลผลิต

แตงกวา เกิดอาการใบค้างบนใบยอด พืชมักแสดงอาการไม่รุนแรง ใบเสีयरูปทรงเล็กน้อย ส่วนในแคนตาลูป ใบค้างสีเขียวอ่อนปนเหลือง เมื่ออาการรุนแรงขึ้นใบจะหดย่น เป็นคลื่นบิดเบี้ยวเสีयरูปทรง อาการที่ผลเป็นผลค้างเป็นจุดวงแหวนบริเวณผิว

3.4 โครงสร้างยีนของไวรัสใบค้างจุดวงแหวนมะละกอ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไวรัส PRSV (ภาพที่ 1) เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ใน Genus Potyvirus มีอนุภาคแบบท่อนยาวคด ความยาวประมาณ 760-800 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12 นาโนเมตร ประกอบด้วย single-stranded RNA 5.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอนุภาค

และโปรตีนห่อหุ้ม 94.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอนุภาค บริเวณปลาย 5' ของสายอาร์เอ็นเอมีโปรตีน genome linked protein (VPg) เชื่อมติดด้วยพันธะ covalent และส่วนปลายด้าน 3' จะเป็น poly A โปรตีนห่อหุ้ม (coat protein) จากการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ตรวจพบโปรตีน 2 ชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค คือ cylindrical (pinwheel) inclusion body (CI) และ amorphous inclusion body (AI) น้ำหนักโมเลกุล 6.9×10^3 - 7×10^3 และ 5.1×10^3 คาลตัน ตามลำดับ ตรวจพบอนุภาคไวรัสในส่วนของท่ออาหารในไซโตพลาสซึม (Purcifull *et al.*, 1984)



ภาพที่ 1 อนุภาคเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) ซึ่งจัดอยู่ใน Genus Potyvirus

ที่มา: (นุชนาถ และคณะ, 2546)

ลักษณะโครงสร้างยีน PRSV (ภาพที่ 2) มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอแบบเส้นบวก (single stranded positive sense) มีขนาดความยาว 10,000 นิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งปลาย 3' จะมี poly A มี open reading frame (ORF) ขนาดยาว 1 ชุด ซึ่งมีลักษณะเป็น (polyprotein) ขนาดใหญ่หนึ่งสาย และถูกแบ่งย่อยเป็น โพลีเปปไทด์ (polypeptide) ขนาดเล็กอย่างน้อย 8 ชนิดโดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) เรียงลำดับจากตำแหน่ง N-terminus ถึง C-terminus ของจีโนม ดังนี้ First protein (P1) Helper component protein (HC-Pro) Third protein (P3) Cylindrical inclusion protein (CI) Small nuclear inclusion protein (NIa) ซึ่งรวมถึงโปรตีน Vpg ที่ตำแหน่ง N-terminus large nuclear

inclusion protein (NIb) และ Coat protein (CP) ส่วนของ VPg และ CP เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้จากอนุภาคของไวรัส ส่วน HC-Pro, CI, NIa และ NIb เป็นโปรตีนที่แยกได้จากพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย P1 และ P3 เป็นโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานในพืชที่เป็นโรค (Dougherty and Carrington, 1988) และพบโปรตีนขนาด 6 กิโลดาลตัน ที่จุดตัด (cleavage site) บริเวณ C-terminus ของ CI ซึ่งพบใน polyprotein ของไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ทุกชนิด สำหรับ NIb แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาด 59 กิโลดาลตัน ที่ทำหน้าที่เป็น RNA dependent RNA polymerase เพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสขั้นตอนการจำลองตัว (replication) (Yeh *et al.*, 1992)

3.4.1 P1 protein เป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่างไวรัสกับพืชอาศัย Potyvirus ซึ่ง Potyvirus ที่ต่างชนิดกันจะมีลำดับอะมิโนของ P1 protein แตกต่างกัน และทางด้าน 3' ของ P1 protein เป็นส่วนอนุรักษ (His456, Asp465, Gly-Ser-Ser499-Gly, Phe519-Val - Val-Arg-Gly523) ซึ่งพบได้ใน Potyvirus ทุกชนิด และยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase เนื่องจากพบว่าทางด้านปลาย 3' มีคุณสมบัติเป็น trypsin-like serine proteinase ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน P1 และ HC-Pro (Verchot *et al.*, 1991) นอกจากนี้ ยังอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไวรัสพืช ในเซลล์พืชจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell movement protein) และการแสดงอาการของโรค (symptoms expression)

3.4.2 Helper component protein (HC-Pro) เป็นโปรตีนที่ Potyvirus สร้างขึ้น โดย HC-Pro ของ PRSV เป็น multifunction protein มีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HC-Pro ในโพทิวไรสนิคมต่าง ๆ ประมาณ 45.1-51.8 เปอร์เซ็นต์ HC-Pro ทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคไวรัสด้วยเพลี้ยอ่อน เนื่องจากมีส่วนอนุรักษ PTK และ FRNK ที่อยู่บริเวณส่วนกลางของโปรตีน HC-Pro และ KITS ที่อยู่บริเวณด้านปลาย N-terminus ของ HC-Pro และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสในพืชแบบ long-distance movement และแบบ cell-to-cell นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase สำหรับ autolytic cleavage ที่ตำแหน่ง HC-Pro กับ P3 เนื่องจากมีคุณสมบัติของ papain-like cystein proteinase (Carrington *et al.*, 1989) ไปกดหรือปิดระบบป้องกันโรคของพืชในยีน RdRp ของพืชที่เกี่ยวข้องกับ RNA silencing ทำงานเสริมกับยีน CP

3.4.3 P3 protein เป็นโปรตีนที่อยู่ระหว่าง HC-Pro กับ 6K1 มีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ Potyvirus ชนิดอื่นๆ 25.7-33.0 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษา พบว่าโปรตีน P3 มีความสัมพันธ์กับ

CI ในยาสูบที่ถูก *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) เข้าทำลาย โดยคาดว่าน่าจะทำหน้าที่เป็น RNA helicases (Rodriguez-Cerezo and Shaw, 1991) และเกี่ยวข้องกับการแสดงอาการของโรค (symptomatology) และการทวิจำนวนของจีโนมไวรัส

3.4.4 6 KDa protein (6K1) เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อย่างแน่ชัด แต่จากการศึกษา พบว่าโปรตีนนี้อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อภายในเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย (Riechmann *et al.*, 1992)

3.4.5 Cylindrical inclusion protein (CI) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอ โดยโปรตีน CI มีกิจกรรมของ helicase ในการทำให้สายอาร์เอ็นเอเกิดการคลายเกลียว เพื่อให้เป็นสายต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอคู่ผสม โดยทั่วไปจะพบโปรตีน CI อยู่ทั่วไประหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ผนังเซลล์ (cell wall) และอยู่รอบ plasmodesmata นอกจากนี้ยังพบใน endoplasmic reticulum หรืออยู่เป็นเส้นสายเกาะกันอยู่ในไซโตพลาสซึม เรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า pinwheel นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว โปรตีน CI ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาค Potyvirus จากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์ข้างเคียง โดยผ่านทาง plasmodesmata (Shukla *et al.*, 1994)

3.4.6 6 KDa protein (6K2) เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อย่างแน่ชัดแต่จากการศึกษา พบว่าโปรตีนชนิดนี้ อาจจะมีบทบาทเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของไวรัส เนื่องจากพบโปรตีนชนิดนี้ใน RNA1 ของ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งแปรรหัสเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณ (Shukla *et al.*, 1994) และสันนิษฐานว่าโปรตีน 6K2 นี้จะมีบทบาทในการเคลื่อนย้าย NIa ภายในเซลล์เนื่องจากพบว่า โปรตีนนี้ยับยั้งการเคลื่อนย้าย NIa ไปสู่นิวเคลียส (Restrepo-Hartwig and Carrington, 1992)

3.4.7 Small nuclear inclusion protein (NIa) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48 กิโลดาลตัน พบในเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย โปรตีน NIa ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase ในการตัดสายโพลีโปรตีน ทางด้านปลาย C-terminus เข้ามา 2 ใน 3 ส่วน (Dougherty and Carrington, 1988) NIa proteinase มีโครงสร้างที่สัมพันธ์กับ trypsinlike serine proteinase (Bazan and Fletterick, 1988) จากการศึกษาทางอิมมูโนวิทยา และการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TVMV และ TEV ทำให้ทราบว่า ครึ่งหนึ่งทางด้านปลาย N-terminus ของ NIa คือ ส่วนของ viral genome-linked protein (VPg)

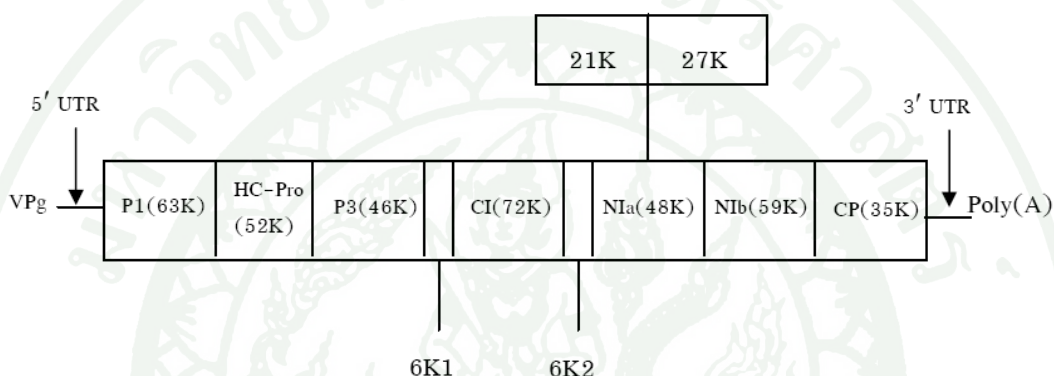
และทางด้านปลาย C-terminus จะเป็นส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ proteinase โดยส่วนของโปรตีน VPg จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกสายใหม่ของไวรัส (Shahabuddin *et al.*, 1988)

3.4.8 Large nuclear inclusion protein (Nib) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 59 กิโลดาลตัน โปรตีน Nib ของ Potyvirus ต่างชนิดกันจะมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ของ Potyvirus โปรตีน Nib ของ *Potato virus Y* (PVY), *Plum pox virus* (PPV), TEV และ TYMV มีส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า GDD (glycine-aspartic-aspartic) ซึ่งพบใน RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสในกลุ่ม comovirus และ picornavirus และพบในเอนไซม์เรพลิเคสของ *Cowpea mosaic virus* และ poliovirus โปรตีน Nib ของ Potyvirus คาดว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ RNA dependent RNA polymerase หรือเรพลิเคส เนื่องจากมีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในส่วน of โปรตีน Nib ของเชื้อ PRSV สายพันธุ์ HA กับ HA 5-1 และ W พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบส 98.7-99.0 เปอร์เซ็นต์ และพบ conserved motif YCDAADGS, GNNSGQPSTVVDNT(S) LMV และ NGDDL-X34-K ซึ่งมีบทบาทใน RNA polymerase ของ Potyvirus (Yeh *et al.*, 1992)

3.4.9 Coat protein (CP) เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใน Genus Potyvirus มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30-45 กิโลดาลตัน (Dougherty and Carrington, 1988) ประกอบด้วยโปรตีนชนิดเดียวซึ่งมีจำนวนประมาณ 2,000 หน่วยย่อย (subunit) ต่ออนุภาคไวรัส (Holling and Brunt, 1981) CP มีความสำคัญในการแยกชนิดและ strain ของไวรัสในกลุ่มนี้ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PRSV มีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ Potyvirus ชนิดอื่นๆ 53.2-56.6 เปอร์เซ็นต์ ทางด้านปลาย N-terminus มีส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า DAG ซึ่งส่วนนี้มีความสัมพันธ์กับเปลือกอ่อนในการถ่ายทอดโรค ในขณะที่ 2 ใน 3 ส่วนของโปรตีนทางด้าน C-terminus มีความคล้ายคลึงกันมาก (Shukla and Ward, 1988; Ward and Shukla, 1991)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Coat protein ของกลุ่ม Potyvirus ทั้ง 20 ชนิดรวม 42 strains พบว่า N-terminus ของ Coat protein มีความแตกต่างกันมากทั้งขนาดและลำดับของกรดอะมิโน ในขณะที่ 2 ใน 3 ส่วนโปรตีนทางด้าน C-terminal เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีในสัตว์ทดลอง (immunodominant) และยังมีอิทธิพลที่จำเพาะต่อไวรัสนั้นด้วย (virus specific epitope) (Shukla *et al.*, 1988) จากความสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง

แอนติบอดีที่ดีจึงมีการนำส่วนของ Coat protein ของเชื้อ PRSV มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง (Chatchen *et al.*, 2006) ทั้งในหนู และกระต่าย Screenivasula and Sai (2010) ได้นำส่วนของ Coat protein ของเชื้อ PRSV ที่ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอด้วยเทคนิค immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT PCR) Assay เปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA ซึ่งสามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 2 โครงสร้างจีโนมของ Potyvirus (single stranded, positive-sense RNA) แสดงส่วนต่างๆ ของยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ ของ Potyvirus จาก N-terminus ไปสู่ C-terminus

ที่มา: Yeh *et al.* (1992)

VPg	=	viral genome-linked protein
P1	=	P1 protein
HC-Pro	=	helper component protein
P3	=	P3 protein
6K1	=	6 kDa protein 1
CI	=	cylindrical inclusion protein
6K2	=	6 kDa protein 2
NIa-VPg	=	nuclear inclusion protein “a including the VPg”
NIa-Pro	=	nuclear inclusion protein “a” proteinase

NIB	=	nuclear inclusion protein “b”
CP	=	coat protein
5' UTR	=	5' non-coding region
3' UTR	=	3' non-coding region
Poly (A)	=	Poly A tail

4. การผลิตโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย

เป็นระบบการผลิตโปรตีนที่นิยมกันมากในยุคปัจจุบัน เนื่องจากเป็นระบบที่สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ โดยอาศัยหลักการทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) และหลักการควบคุมการแสดงออกของยีน (expression system)

หลักการในการผลิตโปรตีนทำได้โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้ คือ หากไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเป็น RNA ในการโคลนนิ่งเพื่อผลิตโปรตีนด้วยเทคนิครีคอมบิเนนทดีเอ็นเอ จะต้องสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายคู่ขึ้นจาก genomic RNA จากนั้นจึงเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่จะถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ต้องเข้ากับพลาสมิดสำหรับการแสดงออก (expression plasmid) ซึ่งถูกออกแบบขึ้นเพื่อใช้ผลิตโปรตีนด้วยเทคนิครีคอมบิเนนทดีเอ็นเอ โดยพลาสมิดจะทำหน้าที่พาดีเอ็นเอสำหรับผลิตโปรตีนที่ต้องการผลิตเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเซลล์เจ้าบ้าน คือ เซลล์ของแบคทีเรีย (*E. coli*) นอกจากนั้นบน expression plasmid ยังมีปัจจัยสำหรับการแสดงออกของยีนอยู่ด้วย ได้แก่ ส่วนของ promoter และส่วนของ terminator มีจุดเริ่มต้นการจำลองตัว (origin of replication) มีตัวติดตาม (marker) สำหรับการคัดเลือกการได้รับพลาสมิดของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ampicillin resistant gene (amp^R) และที่สำคัญ คือ ส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ต้องการผลิตโปรตีน เช่น lac operon นอกจากนั้น พลาสมิดยังมีส่วนโปรตีน tag ติดอยู่ด้วย เพื่อประโยชน์ในการคัดแยก (isolation) และการทำโปรตีนที่ต้องการให้บริสุทธิ์ (purification) โดยโปรตีน tag ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Glutathione S-transferase (GST) และ 6 x histidine (His_6) สำหรับตัวติดตาม His_6 จะทำให้โปรตีนที่ผลิตจากยีนที่โคลนไว้มีฮิสติดีนเพิ่มขึ้นทางด้าน N-terminus อีก 6 เรสิดิวซ์ ทำให้สามารถแยกสกัดโปรตีนที่แสดงออกจากการถอดรหัสของยีนที่ทำการโคลนเอาไว้โดยเทคนิค affinity chromatography ได้คือ His_6 จะทำหน้าที่ไปจับกับ Nickel-nitriloacetic acid resin และโปรตีนจะถูกชะออกจาก resin โดยการปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง

5. การศึกษาทางด้านซีรัมวิทยา

Hampton (1990) กล่าวว่าซีรัมวิทยาเป็นการศึกษาถึงการนำเอาซีรัมมาใช้ประโยชน์ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมกับการตรวจสอบในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ด้วยการนำแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะเชื้อไวรัสที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน รัชณี (2545) กล่าวว่า ปฏิบัติทางซีรัมวิทยาเป็นการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อไวรัส ซึ่งเรียกว่า แอนติเจน ซึ่งบริเวณเล็กๆ ที่อยู่บนแอนติเจน และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้อย่างจำเพาะเจาะจง เรียกว่า อีพิโทป (epitope) ส่วนบริเวณที่อยู่บนแอนติบอดี เรียกว่า พาราโทป (paratope) ถ้าเป็น โปรตีนอีพิโทป จะมีขนาดประมาณ 4-6 เรสิดิวส์เท่านั้น โดยลักษณะการเกาะกันนี้เป็นแบบ lock and key คือ โครงสร้างของ อีพิโทป จะเข้ากันได้พอดีกับ โครงสร้างบนแอนติบอดีที่มีลักษณะเป็นร่อง (grove)

เทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ PRSV-P และ PRSV-W มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ซึ่งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้เทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาในการจำแนกความแตกต่างได้ (Jensen, 1949) ในปัจจุบันแอนติบอดีที่ใช้สำหรับการตรวจสอบเชื้อ PRSV-W ที่ใช้งานอยู่มีทั้ง โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody, PAb) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAAb) จากการศึกษาของ Baker *et al.* (1991) ได้มีการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV-W โดยการเก็บตัวอย่างพืชทองที่เป็นโรค PRSV-W มาปลูกเชื้อบนน้ำเต้า และทำการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์ มาตรวจหาไวรัสโดยวิธีการ SDS-PAGE จากนั้นแยกไวรัสที่บริสุทธิ์ออกจากเจล ตรวจวัดค่าความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ A_{280} นำโปรตีนที่ปรับค่าความเข้มข้นได้เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิต PAb จากกระต่าย และ MAAb จากหนู นำแอนติบอดีที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อ PRSV-P และ PRSV-W โดยวิธีการ SDS-immunodiffusion test และวิธี Indirect ELISA ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตจาก PAb และ MAAb สามารถใช้ตรวจเชื้อ PRSV-P และ PRSV-W และไม่เกิดปฏิกิริยากับพืชปกติ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อ PRSV-P และ PRSV-W มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ไม่สามารถใช้เทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้

Agarwall *et al.* (2009) ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ Coat protein ของเชื้อ PRSV ได้ขนาด fusion protein ขนาด 72 กิโลดาลตัน นีคกระตุ้นในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดี นำแอนติบอดีมาตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค

in direct antigen-coated enzyme-linked immunosorbent assay. โดยใช้ตัวอย่างพืชที่เชื้อจาก 1:4,000 ได้สำเร็จ Sreenivasulu *et al.* (2010) พัฒนาเทคนิค Recombinant coat Protein ของเชื้อ PRSV โดยนำส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RT-PCR เพื่อให้ได้ double strand DNA ที่เสถียรสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตัดต่อ cDNA โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM-T ตรวจสอบวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วโคลนเข้าสู่ expression plasmid pRSET-A ชักนำให้เพิ่มปริมาณ และสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5 α ตรวจสอบขนาดและปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 40 กิโลดาลตัน ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin ตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธีการ Western blot โดยใช้แอนติบอดีของ PRSV นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย จากนั้นจึงนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิค Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) เปรียบเทียบประสิทธิภาพ และความไวของการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA, Dot blot immunobinding assay, Plate trapped ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตจาก Recombinant coat protein แล้วนำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ PRSV โดยเทคนิค IC-RT-PCR มีประสิทธิภาพสูงกว่าการตรวจสอบด้วยวิธีการตรวจสอบอื่นๆ ที่นำมาใช้เปรียบเทียบ

5.1 การตรวจสอบ โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสด้วยวิธีการทางชีววิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคพืชมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปลูกพืช และการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ โดยสามารถช่วยให้พืชปลอดภัยจากการที่เชื้อโรคเข้าทำลายทั้งทางตรง และทางอ้อม สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส การสังเกตลักษณะอาการบนส่วนต่างๆ ของพืช ทั้ง ใบ ลำต้น ดอก ผล และเมล็ด การทดลองปลูกเชือบนพืชทดสอบ (indexing plant) การทดลองถ่ายทอดเชื้อจากตัวอย่างพืชโดยการใส่แมลงพาหะ และการใช้วิธีการขยายพันธุ์พืช เป็นวิธีการตรวจสอบที่ต้องใช้ระยะเวลา นาน นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ คือ การตรวจดูเชื้อสาเหตุโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การตรวจสอบโดยวิธีการทางอนุชีววิทยา และอีกหนึ่งวิธีการที่สำคัญ คือ วิธีการทางชีววิทยา ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และไม่สิ้นเปลืองเวลาในการตรวจสอบ โดยวิธีการทางด้านชีววิทยามีหลายวิธีการด้วยกัน ได้แก่

5.1.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการที่มีการเคลื่อนแอนติเจนลงบน ELISA plate แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สามารถทำได้ทั้งสองแบบ Direct และ Indirect methods ผลของปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบได้โดยการเติม

สับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ลงไป ซึ่งสีของปฏิกิริยาจะแปรผันตามปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่าง วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีความไวสูงมากสามารถตรวจสอบหาปริมาณไวรัสได้ต่ำถึงระดับ 1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะกับการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากในคราวเดียว รวมทั้งใช้วัดปริมาณของไวรัสในตัวอย่าง (Quantitative assay) ได้ (Clark and Adam, 1977)

Direct method วิธีการนี้ แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนจะถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ก่อน เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในหลุมแล้ว สามารถตรวจสอบผลของปฏิกิริยาได้โดยการเติมสับสเตรท

Indirect method วิธีการนี้จะทำปฏิกิริยากับ unlabeled antigen-specific antibody ก่อน แล้วจึงตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยใช้ enzyme-labeled secondary antibody และสับสเตรท

5.1.2 Immune precipitation polymerase chain reaction (IP-PCR) เป็นเทคนิคการตรวจที่นำแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจจับกับแอนติเจนก่อนจะตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

5.1.3 Immunoblotting methods เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเช่นเดียวกับ ELISA แต่ใช้แผ่นเมมเบรนเป็นตัวยึดเกาะแอนติเจนเอาไว้ ซึ่งเมมเบรนที่นิยมใช้ ได้แก่ ไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) และไนลอน (nylon)

Dot immunobinding assay (DIBA) การหยดแอนติเจนลงบนแผ่นเมมเบรนโดยตรง จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจสอบ (primary antibody) หลังจากล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกไปแล้ว สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติเจนต่อแอนติบอดีที่เกิดขึ้นด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (enzyme-conjugated secondary antibody) การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาทำได้โดยการเติมสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งผลของปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสีบริเวณที่หยดแอนติเจนไว้ ซึ่งโดยปกติแล้วความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่อยู่บนเมมเบรน (Makkouk *et al.*, 1993)

Tissue immunoblotting assay (TIBA) คือ การใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืชกดลงบนแผ่นเมมเบรนแล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเช่นเดียวกับวิธีการทำ DIBA (Hsu and Lawson, 1991)

Western blotting เป็นเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน โดยการให้โปรตีน เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า เพื่อแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีน ตามขนาดโมเลกุล ต่อมาทำการ เคลื่อนย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วตรวจสอบโปรตีนดังกล่าวด้วยแอนติบอดี ซึ่ง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบโปรตีนว่าเป็นโปรตีนที่เราสนใจหรือไม่ ตรวจสอบ คุณสมบัติโปรตีนว่าเป็นโปรตีนอะไร มีปริมาณ และน้ำหนักโมเลกุลเท่าไรและความบริสุทธิ์ของ โปรตีนมากน้อยเพียงใด (Purcifull *et al.*, 2001)

5.1.4 Immunoelectron microscopy (IEM) เป็นวิธีการที่ใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน ซึ่งสามารถตรวจอนุภาคไวรัสได้ที่กำลังขยายสูงๆ ร่วมกับการใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสในการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจอยู่ในรูปของสารละลาย (suspension) หรือ อยู่ในรูปของ thin section ของเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย นอกจากนี้ยังอาจใช้แอนติบอดีที่ติดฉลาก กับอนุภาคทอง (Colloidal gold) หรือเฟอริทิน (Ferrithin) ในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจน ทำให้ สามารถตรวจสอบไวรัสได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งมีหลายแนวทางด้วยกัน คือ

Derrick method โดยการเคลือบกริด (grid) ด้วยแอนติบอดีแล้วจึงหยดตัวอย่าง ไวรัสลงไป ซึ่งแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนกริดก่อนแล้วจะเลือกจับกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงกับ แอนติบอดีชนิดนั้นๆ

Decorate method โดยการหยดไวรัสลงบนกริดก่อน แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับ แอนติบอดี ถ้าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน เมื่อแอนติเจนถูกปกคลุมด้วย แอนติบอดีจำนวนมากพอ จะสามารถมองเห็นเป็นบริเวณที่บ่งแสงที่ครอบคลุมแอนติเจนอยู่ (Milne, 1991)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคที่ถูกต้องถือเป็นกระบวนการที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการ ป้องกัน กำจัด และควบคุมการแพร่ระบาดของโรค วิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และ แม่นยำส่งผลให้การป้องกันโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบัน เทคโนโลยีที่เรียกว่า Diagnostic technology ได้เข้ามามีบทบาทต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบต่าง จุดวงแหวนมะละกอ เช่น เทคนิค RT-PCR โดยการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก และเทคนิค ELISA โดยการใช้ร่วมกับ PAb หรือ MAbs ที่จำเพาะต่อเชื้อ PRSV ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าว มีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อไวรัสได้ถึงระดับนาโนกรัม อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีมีข้อจำกัด คือ

ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบอย่างน้อย 2-3 ชั่วโมง และกระบวนการตรวจสอบต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางมาทำการวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์ต้องทำภายในห้องปฏิบัติการ เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง แม้ว่าปัจจุบันชุดตรวจสอบ (Detection kit หรือ Strip test) ที่ได้นำวิธีการทางด้านอิมมูโนวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสพีชจะให้ผลการอ่านค่าเร็ว มีประสิทธิภาพ ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีทักษะเฉพาะทาง สะดวก สามารถพกพาไปตรวจในภาคสนาม แต่ชุดตรวจสอบดังกล่าวยังจำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ทำให้ชุดตรวจสอบดังกล่าวยังไม่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย

6. การพัฒนาชุดตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนโครมาโทกราฟี

LFIA เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพ และความเสถียร ระดับความน่าเชื่อถือเทียบเท่ากับเทคนิค ELISA ที่สำคัญคือ สะดวกสามารถพกพาไปตรวจนอกห้องปฏิบัติการได้ ผู้ใช้งานสามารถใช้ได้ง่ายไม่จำเป็นต้องได้รับการฝึกอบรม การพัฒนาชุดตรวจสอบ ได้มีการพัฒนาขึ้นทั้งในการตรวจสอบโรคทางการแพทย์ พีช สัตว์ พีชตัดแปลงพันธุกรรม สารพิษ สารเสพติด สำหรับการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคพีชที่เกิดจากเชื้อไวรัส เริ่มมีการพัฒนาในปี ค.ศ. 1992 และได้มีการพัฒนาเรื่อยมา (Tsua *et al.*, 1992) จนถึงปัจจุบัน โดยมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบให้สามารถตรวจสอบโรคได้รวดเร็วยิ่งขึ้น อย่างเช่นหลักการทางด้าน DNA probe ร่วมกับ LFIA หรือที่เรียกว่า Nucleic acid lateral flow assay (NFLA) (Mao *et al.*, 2009)

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสโดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ได้ถูกพัฒนาขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิค คือ latex agglutination tests, sandwich assay และ โครมาโทกราฟี โดย Yallow and Berson (1959) เพื่อใช้ตรวจหา anti-insulin antibodies ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือด จากแนวคิดที่ว่าแอนติบอดี 2 ชนิดมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกัน บนแอนติเจน ดังนั้นหากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งมาติดกับ solid support แล้ว เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่ติดกับ solid support แอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีนี้ จะถูกตรวจ โดยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากกับอนุภาค bead ที่มีขนาดต่างกันเช่น latex bead, erythrocytes, Colloidal dyes หรือ metal solution ทำให้สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาได้ง่ายจากสี bead ที่เกิดขึ้น (Garland *et al.*, 1986, Borque *et al.*, 1995) ทั้งนี้วัตถุประสงค์ของการพัฒนาเทคนิคดังกล่าว เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ง่ายต่อการนำไปใช้ ให้ผลการ

ตรวจสอบในระยะเวลาที่รวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ด้วยตนเอง และไม่จำกัดอยู่ในกลุ่มผู้ใช้กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง (Ronald and Stimson, 1998)

ซึ่งเทคนิค LFIA เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการพัฒนาในการตรวจสอบโรคพืชเป็นอย่างมาก ในประเทศไทยมีการนำเทคนิค LFIA มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบโรคพืช เช่น โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย โดยด้านการตรวจสอบโรคไวรัสในพืช Tsua *et al.* (1992) ได้ศึกษาการตรวจไวรัส CMV และ TMV ด้วยวิธีการตรวจสอบแบบ Lateral flow test โดยใช้ Latex bead สีชมพูเป็นตัวติดฉลาก ปรากฏว่า Latex bead ให้ผลของปฏิกิริยาที่ไม่คงตัว และมีราคาแพงเกินไป

ด้านชุดตรวจสอบโรคพืชมีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Lateral flow test โดยใช้อนุภาคของทองเป็นตัวติดฉลาก สุทธิ และคณะ (2547) จึงได้นำเทคนิคนี้มาปรับใช้กับการตรวจสอบเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ โดยใช้ Latex bead ขนาดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการใช้อนุภาคของทองในการแสดงปฏิกิริยาของการตรวจสอบ ที่ชื่อว่า Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) โดยอาศัยหลักการทางชีววิทยา คือ การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และการไหลของสารละลายในเมมเบรน ตามหลักการเคลื่อนที่ของสารแบบ โครมาโทกราฟี ซึ่งเทคนิคดังกล่าว คือ เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ซึ่งอนุภาคทองมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ อนุภาคทองมีการคงรูปดี เมื่อมีการเชื่อมต่อกับ IgG ให้สีปฏิกิริยาสีแดงเข้มชัดเจนกว่า Latex bead เมื่อปรากฏผลบนแผ่นเมมเบรน

หลักการของเทคนิค LFIA คือ การนำแอนติบอดีมาติดฉลากกับอนุภาค bead ที่มีสี เมื่อให้แอนติบอดีที่ติดฉลากทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะแล้ว จะเกิดเป็น antigen-antibody complex โดย complex ดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปบน solid support ด้วยแรง capillary flow จนมาถึงตำแหน่งบน solid support ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีอีกชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจน บริเวณนี้ เรียกว่า Test line ซึ่ง complex ข้างต้นจะถูกจับอยู่ที่ Test line เกิดให้เห็นเป็นแถบสี การเกิดแถบสีจะแปรผันตามปริมาณแอนติเจนที่พบในตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก complex หรือแอนติบอดีที่เหลือจากการจับกันตรงตำแหน่ง Test line จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (secondary antibody, 2° Ab) เรียกบริเวณนี้ว่า Control line ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีตัวแรก และแอนติบอดีที่ Control line นี้ จะทำให้เกิดแถบสีอีกแถบหนึ่ง (Garland *et al.*, 1986)

หลักการของปฏิกิริยาในเทคนิค LFIA แบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบ Double antibody sandwich assay (DAS) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้กับการตรวจแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่และมี antigenic sites หลายชนิด สำหรับหลักการของวิธีการนี้เหมือนกับหลักการดังกล่าวข้างต้น และแบบ competitive inhibition วิธีนี้นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดเล็ก และมี antigenic sites เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้น หลักการของวิธีนี้คล้ายกับแบบ DAS แต่ที่แตกต่าง คือ ตำแหน่งของ Test line จะถูกเคลือบด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นถ้าในตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่มากพอ แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนจนหมด และไม่เหลือพอที่จะจับกับแอนติเจนที่ Test line เพราะฉะนั้นตำแหน่ง Test line จะไม่เกิดแถบสีให้เห็น ทั้งนี้ผลที่อ่านได้จะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่าง

จากผลการตรวจสอบที่นอกจากสามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่า ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว สะดวกต่อการพกพา และการใช้นอกจากจะสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตนเองแล้ว ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค LFIA ให้สามารถตรวจสอบเชื้อได้มากกว่าหนึ่งเชื้อ โดยใช้แอนติบอดีติดฉลากกับเม็ดสีที่แตกต่างกัน ได้สำเร็จ ทำให้วิธีการตรวจสอบโดยใช้หลักการ โครมาโทกราฟี ได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบในงานทางด้านการแพทย์ สัตว์ พืช อุตสาหกรรมอาหาร และสภาพแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น (Weeman and Schuurs, 1971; Stimson and Sinclair, 1974) แม้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น IC-PCR และเทคนิคอื่น ๆ ได้แก่ immunosensor เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบให้สูง (Ronald and Stimson, 1998) แต่จากข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ และการอ่านผลที่มีราคาแพง ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ และอ่านผลจึงทำให้ค่าบริการสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างสูงตามไปด้วย ดังนั้นในปัจจุบันเทคนิค LFIA จึงได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยอย่างแพร่หลาย แม้ความไวในการตรวจสอบบางตัวอย่างจะน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน แต่ก็สามารถนำวิธีการนี้มาใช้คัดกรองตัวอย่างจำนวนมากในเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังเช่น Smits *et al.* (2001) ใช้เทคนิค LFIA ตรวจสอบ Immunoglobulin M (IgM) จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Leptospira* sp. เปรียบเทียบกับเทคนิค ELISA แล้วพบว่าเทคนิค LFIA สามารถตรวจสอบตัวอย่าง IgM จากผู้ป่วยได้ใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แม้จะมีความไว และความจำเพาะ (specificity) เพียง 85.8 เปอร์เซ็นต์

6.1 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจสอบ

โครงสร้างของชุดตรวจสอบที่ใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟี ที่เรียกว่า อิมมูโนโครมาโทกราฟีคสตริป หรืออิมมูโนสตริป มีส่วนประกอบสำคัญ (ภาพที่ 3) ได้แก่ Backing pad, Sample pad, Conjugate pad, Reaction membrane และ Absorption pad (Kumar, 2011)

Backing pad ทำหน้าที่ค้ำจุน (support) องค์ประกอบต่าง ๆ ของชุดตรวจสอบ ได้แก่ Sample pad, Conjugate pad, Nitrocellulose และ Absorption pad ให้เป็นโครงสร้างของชุดตรวจสอบที่สมบูรณ์ Backing pad ที่ใช้ส่วนใหญ่ทำมาจากโพลีเอสเตอร์ (polyester) หนาประมาณ 0.25-1 มิลลิเมตร

Sample pad เป็นส่วนที่ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างโดยตรง และเกี่ยวข้องกับควบคุมอัตราการไหลของตัวอย่างไปยังส่วนของ Conjugate pad โดยทั่วไป Sample pad ที่ใช้จะมีอยู่ 2 แบบ คือ woven meshes และ cellulose filters (Buddhirakkul *et al.*, 2004) ซึ่ง woven meshes หรือบางครั้งเรียกว่า screens มีคุณสมบัติที่ดีซึ่งทำให้ตัวอย่างมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบน SAP มีความแข็งแรงเมื่อเปียกน้ำ ไม่ฉีกขาด แต่มี sample volume หรือความสามารถในการรับตัวอย่างได้ต่ำ คือ ประมาณ 1-2 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร และราคาแพงเมื่อเทียบกับวัสดุชนิดอื่น ส่วน cellulose filter มีคุณสมบัติตรงข้าม คือ มีความหนาไม่แข็งแรง แต่ราคาไม่แพง สามารถรองรับตัวอย่างได้มาก คือ มากกว่า 25 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งคุณสมบัตินี้เหมาะกับตัวอย่างบางชนิดที่ต้องการให้สามารถรองรับตัวอย่างปริมาตรสูงได้ เช่น การตรวจตัวอย่างในปัสสาวะผู้ป่วย เป็นต้น

Conjugate pad มีหน้าที่สำคัญนอกจากจะเป็นส่วนที่เก็บรักษา detector (antibody conjugate) แล้วยังทำหน้าที่เสมือนตัวส่ง detector ไปยัง Test line และ Control line เพราะฉะนั้นการเลือก Conjugate pad ชนิดใดมาใช้ในงานทดลองจึงถือเป็นส่วนสำคัญ ทั้งนี้ในปัจจุบันชนิดของ Conjugate pad ที่นำมาใช้ ได้แก่ ชนิดที่เป็น cellulose glass และ plastic (เช่น polyester และ polypropylene เป็นต้น) Nitrocellulose ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่การเคลื่อนที่ของสารละลายตัวอย่างจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งในบางครั้งอาจเร็วมากจนทำให้แอนติบอดี และแอนติเจนไม่สามารถทำปฏิกิริยากันได้ อาจมีผลต่อความไวของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ปัจจัยทางโครงสร้างดังกล่าวแล้ว ความหนาของแผ่น Nitrocellulose ก็ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับอัตราเร็วในการไหลของสารละลายที่ต้องคำนึงถึงด้วยเช่นกัน

Reaction membrane ชนิดของเมมเบรนที่นำมาใช้มีหลายชนิด เช่น Hydrophobic Nitrocellulose หรือ Cellulose acetate membrane ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด และขนาดของแอนติเจนต้องมีคุณสมบัติในการให้แอนติเจนสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปได้ในอัตราเร็วที่เหมาะสม มีความสามารถในการตรึงแอนติบอดีที่นำมาใช้เป็นเส้น Test line และ Control line ให้คงอยู่อย่างมีเสถียรภาพที่ดี

Absorption pad มีหน้าที่ช่วยเพิ่มแรงดึงของแรง capillary เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ ดังนั้นข้อดีของการใช้ Absorption pad คือช่วยเพิ่มปริมาตรและระยะเวลาของสารละลายที่เคลื่อนที่ผ่าน Test line และ Control line มากขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีมากยิ่งขึ้น (Hochleitner, 2002)

อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาของอิมมูโนโครมาโทกราฟีจะเกิดไม่ได้ถ้าขาดส่วนของ Detector ที่ประกอบด้วย 2 องค์ประกอบที่สำคัญ คือ แอนติบอดี และ bead สีต่าง ๆ แอนติบอดีที่ใช้ในปฏิกิริยาสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ 1) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจน และใช้เคลือบส่วนของ Test line 2) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจน และใช้ติดฉลากกับ bead โดยจะเคลือบอยู่ในส่วนของ Conjugate pad และ 3) แอนติบอดีซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่ถูกติดฉลาก ซึ่งเคลือบอยู่ที่ส่วนของ Control line ทั้งนี้การเลือกใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน 2 ชนิด มีข้อจำกัดอยู่ที่การมีตำแหน่งจับกับ antigenic site บนผิวของแอนติเจนที่ต่างกันด้วย ซึ่งอาจใช้แอนติบอดีชนิดที่เป็น PAb หรือ MAbs อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิด ร่วมกันก็ได้ ดังเช่น Buddhirakkul *et al.* (2004)

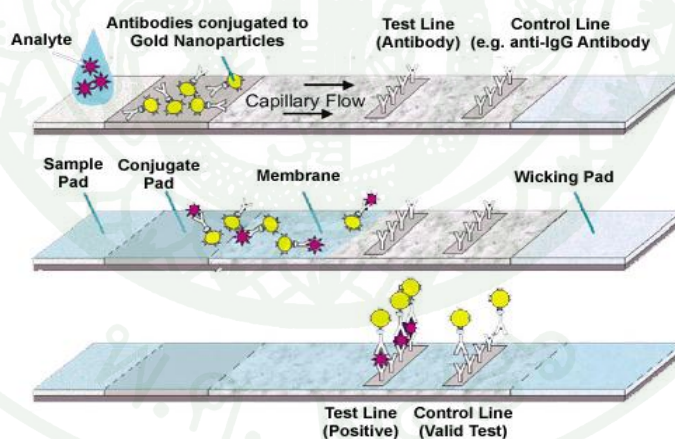
นอกจากปัจจัยสำคัญข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว ปัจจัยที่สำคัญซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ (marker) การทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี คือ เม็ดสีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Latex bead, Erythrocytes, Colloidal dyes หรือ Metal solution (Garland *et al.*, 1986, Borque *et al.*, 1995) และเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการประยุกต์ใช้ไลโปโซมมากักเก็บสี (dye) เพื่อใช้เป็น marker แทนเม็ดสีที่มีจำหน่ายในรูปทางการค้า เนื่องจากเม็ดสีดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งจะส่งผลให้ราคาต้นทุนในการผลิตชุดตรวจสอบสูงตามไปด้วย

Colloidal gold ในระดับนาโนเมตร ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ ซึ่งอนุภาคนาโนของทองคำจะมีพื้นที่ผิวสูงมาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้วัสดุที่มีขนาดระดับนาโนจะมีจำนวนอะตอมที่อยู่บริเวณผิวหน้าสูงมาก ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาบนผิวหน้าวัสดุได้ง่ายขึ้น มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่ดี มีความเสถียรสูง มีสีแดงเข้มซึ่งเมื่ออ่านผลการเกิดปฏิกิริยาบนบริเวณ Reaction membrane จะเห็นผลการเกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน

Buddhirakkul *et al.* (2004) ได้มีรายงานการใช้แอนติบอดีชนิด MAbs ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี คือ HB3 มาใช้ติดฉลากกับ beads และ HB4 ซึ่งถูกนำมาเคลือบ Test line แล้วประสบความสำเร็จสามารถนำมาใช้ตรวจแอนติซีรั่มจากผู้ป่วยได้

Xiang *et al.* (2012) พัฒนาชุดตรวจแบบ double antibody sandwich-lateral flow immunoassay เพื่อใช้ตรวจสอบ hepatitis C virus โดยใช้ recombinant จากโปรตีนส่วนที่แตกต่างกันของเชื้อ HCV ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ชุดตรวจมีความไว และจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ HCV เหมาะสำหรับการนำไปใช้ตรวจโรคนอกห้องปฏิบัติการ

Drygin *et al.* (2011) พัฒนาชุดตรวจสอบ PVX ในมันฝรั่งโดยใช้ PAb เชื่อมต่อกับอนุภาคทองขนาด 15 ± 5 นาโนเมตร ตรวจจับไวรัส PVX ตรงบริเวณ conjugated และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นเส้น Test line โดยใช้ Cellulose nitrate membrane ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจ PVX ในแปลงได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 8 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 15 นาที



ภาพที่ 3 องค์ประกอบต่างๆ ที่ประกอบเป็น Lateral Flow Immunoassay Assays (LFIA) ซึ่งประกอบด้วย Backing pad, Sample pad, Conjugate pad, Reaction membrane และ Absorption pad

ที่มา: Cytodiagnosics Inc, 2013

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชทดสอบที่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ
2. ตู้ Laminar Flow Cabinet
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
4. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
5. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
6. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
7. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
8. เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ 37 องศาเซลเซียส
9. เครื่องไมโครเวฟ
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
11. เครื่อง Electrophoresis
12. เครื่องวิเคราะห์ภาพ Gel Doc
13. เครื่อง Vortex
14. เครื่องเขย่า
15. เครื่อง Air jet และ Biojet
16. เครื่องอ่านผล ELISA
17. ไมโครปิเปต
18. เครื่อง Ultrasonicator
19. เครื่อง Protein Electrophoresis
20. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
21. เครื่อง Spectrophotometer
22. เครื่อง pH meter
23. อาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT ที่เติม สารปฏิชีวนะชนิดเหลวและแข็ง
24. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการสกัดพลาสมิด
25. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE
26. กระจ่าย และสารเคมีในการผลิตแอนติบอดี

27. ไมโครเพลท และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA
28. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA
29. สารละลาย Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการผลิตชุดตรวจสอบ
30. วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติการทางชีววิทยา
31. โรงเรือนและพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ
- 31.1 สควอช (*Cucurbita maxima* Duchesne พันธุ์ลูกผสม)
- 31.2 พักทอง (*Cucurbita moschata* Duchesne พันธุ์ลูกผสม)
- 31.3 คำลิ่ง (*Coccinia grandis* (L.) Voig)

วิธีการ

1. สํารวจ เก็บตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตง และการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

สํารวจ และเก็บตัวอย่างมะละกอ คำลิ่ง พักทอง แคนตาลูป แตงโม และวัชพืชจากแปลงปลูกมะละกอ และพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ ซึ่งพืชดังกล่าวแสดงลักษณะอาการใบด่างสีเขียวแก่สลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น (puckering) ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (distortion) และอาการจุดวงแหวนบนผล (ringspot) ตรวจสอบตัวอย่างพืชที่เก็บมาด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จากนั้นจึงคัดเลือกตัวอย่างที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV มาปลูกถ่ายเชื้อเข้าสู่พืชทดสอบ ได้แก่ สควอช พักทอง และคำลิ่ง โดยบดตัวอย่างใบพักทองที่เป็นโรค น้ำหนักประมาณ 2 กรัม กับ 0.1M PBS pH 7.4 ที่เติม 0.2% Na₂SO₃ ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนัก : ปริมาตร) ในโถงที่แช่เย็น จากนั้นโรยผง celite ผสมลงไปใต้น้ำคั้นพืชที่ได้ แล้วนำน้ำคั้นพืชดังกล่าวไปทาบบนใบของพืชทดสอบทั้งสามชนิด คือ สควอช พักทอง และ คำลิ่ง โดยพืชทดสอบนี้อยู่ในช่วงการเจริญเติบโตที่มีเพียงใบเลี้ยงเท่านั้น ควบคุมกับการถ่ายเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชทดสอบ โดยการใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20G ฉีดน้ำคั้นพืชเข้าสู่เส้นกลางใบ และบริเวณลำต้นของพืชทดสอบ จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จึงล้าง

ใบพืชที่ผ่านการถ่ายเชื้อด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้สะอาด แล้วนำคั้นของพืชทดสอบไปเลี้ยงในโรงเรือน เพื่อรอให้พืชแสดงอาการของโรค

2. การผลิต Recombinant PRSV coat protein ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

การผลิต Recombinant PRSV coat protein ในระบบเซลล์แบคทีเรียมีวิธีการดังต่อไปนี้ ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม pQE 30 ที่มียีน PRSV coat protein ขนาด 864 คู่เบส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) โดยนำพลาสมิดลูกผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ competent cell เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยการเคาะหลอดเบา ๆ นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดจุ่มลงในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำหลอดไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมอาหาร SOB medium ลงไปในหลอดปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำหลอดไปเขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียมาเกลี่ยบนอาหาร 2xYT agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีของเชื้อมาใส่หลอดไมโครทิวป์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT broth ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเหลวออก เติมสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม Solution III (3 M Potassium acetate, 0.2 M Glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ และเติม Isopropanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนพลาสมิด ล้างตะกอนด้วย absolute

ethanol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ ตากตะกอนพลาสติกให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดพลาสติกลูกผสมที่แยกได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

การเพิ่มปริมาณ Recombinant PRSV coat protein ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2xYT broth ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นชักนำให้เซลล์แบคทีเรียมีการสังเคราะห์ Recombinant PRSV coat protein โดยการเติมสาร IPTG (Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และเก็บเซลล์โดยเริ่มที่เวลา 0 ชั่วโมง แล้วจึงนำเชื้อไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ทำการเก็บเชื้อทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 6 และข้ามคืน จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้ของแต่ละช่วงเวลาไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นดูดผสมกับ 2x loading buffer อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำแข็งอีก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาหยอดลงในแต่ละช่องของเจลหยอดตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ช่องเจลละ 10 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของโปรตีนโดยการนำชุด SDS-PAGE ต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที แยกเจลออกมาด้วย Staining (0.25% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย Destain (25% methanol + 7% acetic acid) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดโปรตีน Recombinant PRSV coat protein ด้วยแถบโปรตีนมาตรฐาน (Fermentus, Finland)

3. การแยกสกัดให้บริสุทธิ์ การวิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein

ทำการเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาที่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 สามารถผลิต Recombinant PRSV coat protein ได้ในปริมาณมากที่สุด ตามระยะเวลาที่ได้ทดสอบมาแล้วข้างต้น จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนเซลล์ที่มาละลายด้วย Buffer B (8 M urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl pH 8.0) โดยใช้ Lysozyme เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกด้วย ultrasonicator ครั้งละ 30 วินาที 10 ครั้ง บนน้ำแข็ง หรือจนกว่า cell suspension จะใส แล้วจึงนำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) มาทำให้บริสุทธิ์ภายใต้สภาพ Denaturing condition โดยวิธี Nickel-nitriloacetic acid agarose (Ni-NTA) (Qiagen, USA) โดยการบรรจุ Ni-NTA ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นนำ supernatant ไปผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที แล้วปล่อยให้ supernatant ไหลผ่านคอลัมน์ (เรียกว่า flow through) เก็บสารละลายไว้ตรวจหาโปรตีน หลังจากผ่านสารละลายโปรตีนในคอลัมน์แล้วล้างโปรตีนอื่น ๆ ออกจากคอลัมน์ด้วย Buffer C (Wash I) (8 M Urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl, pH 6.3) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ไว้ จากนั้นทำการ elute โปรตีนที่เกาะอยู่กับ Ni-NTA ด้วย Buffer D (Wash II) (8 M urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl pH 5.9) ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ ทำการเก็บ fraction ที่ได้ ในหลอดไมโครทิวป์ จำนวน 20 หลอด แต่ละ fraction ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการชะ (elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย Buffer E (8 M Urea, 50 mM Tris และ 0.3 M NaCl, pH 4.5) ทำการเก็บ fraction ที่ได้ ในหลอดไมโครทิวป์ จำนวน 20 fraction แต่ละ fraction ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Sambrook and David, 2001) จากนั้นจึงนำสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ในแต่ละช่วงไปทำการตรวจหาโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.1 การวิเคราะห์ขนาดของ Recombinant PRSV coat protein ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ทำการศึกษาขนาดของ Recombinant PRSV coat protein โดยนำตัวอย่างสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ flow through, wash I, wash II และ elution แต่ละ fraction ผสมกับ 2x loading buffer อัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เก็บ fraction ที่มี Recombinant PRSV coat protein ขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน เพื่อนำไปทำโคอะไลซิส และนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

3.2 การหาปริมาณโปรตีน Recombinant PRSV coat protein ด้วยวิธี Bradford protein assay

หลังจากการสังเคราะห์ Recombinant PRSV coat protein ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 แล้วนำโปรตีนที่ได้มาทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA ก่อนที่จะนำโปรตีนที่ได้ไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง ต้องทำการไตอะไลซิสโปรตีนในสารละลาย 1xPBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เปลี่ยนสารละลาย 1xPBS, pH 7.4 จำนวน 4 ครั้ง ทุก ๆ 4 ชั่วโมง) ในเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโปรตีนที่ผ่านการทำไตอะไลซิสมาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีการ Bradford protein assay ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เตรียมโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ละลายกับสารละลาย 1xPBS ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทำปฏิกิริยาจะใช้โปรตีนมาตรฐาน และ Recombinant PRSV coat protein ปริมาตร 20 ไมโครลิตรกับ Bradford reagent (Biorad, USA) 980 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{595} นาโนเมตร และใช้ 1xPBS เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) จากค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากปฏิกิริยาของโปรตีนมาตรฐานทุกความเข้มข้น แล้วจึงเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ของโปรตีน Recombinant PRSV coat protein กับ Standard curve ที่สร้างขึ้นเพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีน Recombinant PRSV coat protein ที่ได้

4. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง และการตรวจสอบค่าไตเตอร์ (Titer) ของแอนติซีรัมด้วยวิธี Indirect ELISA

4.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

กระต่ายที่ใช้เป็นสัตว์ทดลอง เป็นกระต่ายเพศเมียพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 2 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัม โดยเจาะเลือดกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (Normal serum, Ns) จากนั้นนำ Recombinant PRSV coat protein ที่ทำการสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ M 15 ปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (Subcutaneous injection, SC) ในครั้งแรก และฉีดแอนติเจนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผสมกับ Incomplete

Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วน และปริมาณเท่าเดิมอีกครั้งในครั้งที่ 2, 3, 4 เริ่มเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหูครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 5 และทำการเจาะเลือดทุก ๆ สัปดาห์ ปริมาณเลือดที่เจาะแต่ละครั้งประมาณ 15-20 มิลลิลิตร จนครบ 10 ครั้ง เมื่อทำการเจาะเลือดจากกระต่ายแล้วนำเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรีดรอบก้อนเลือดด้วยเข็มฉีดยา แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยแรงเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนซีรัมและเติม 2% NaN₃ ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.02% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค Indirect ELISA

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อ Recombinant PRSV coat protein เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของ O.D.₄₀₅ ของซีรัมปกติ, Normal serum) ด้วยวิธีการ Indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark and Adam (1977) โดยการเคลือบหลุม micro plate ด้วย Recombinant PRSV coat protein ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใน Carbonate coating buffer, pH 9.6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างออกด้วย PBST (PBS ที่ผสม 0.05% tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม Blocking solution (2% Skim milk ที่ละลายใน PBST) (Sigma, USA) ที่ละลายใน PBST) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นเป็นเวลา 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติมแอนติซีรัมที่เจือจางด้วย Blocking solution แบบ 2 เท่า (2 fold-dilutions) โดยเริ่มต้นเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100 ถึง 1:1,638,400 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นเป็นเวลา 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR-conjugated) (Sigma, USA) เจือจาง 1:10,000 ใน Blocking solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นเป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเติมสารละลายสับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 10% Diethanolamine หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นและมีคเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH หลุมละ 100

ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{405} นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของซีรัมปกติที่ให้ค่าเป็นบวก

5. การแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Blocking solution ทดสอบค่าไตเตอร์ของ IgG และ ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตง ด้วยวิธีการ Indirect ELISA, DIBA และ TIBA

5.1 การแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน

การแยกสกัด IgG ด้วยชุดสกัด Protein A (GE, Sweden) โดยการ โหลด binding buffer ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของแอนติซีรัม บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำคอลัมน์ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นำแอนติซีรัมไปผ่านคอลัมน์ โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ล้างคอลัมน์ อีกสองครั้งด้วย Binding buffer จากนั้นจึงชะ IgG บริสุทธิ์ด้วย Elution buffer ปรับสภาพของ IgG ด้วย 0.05 เท่าของปริมาตร IgG ด้วย Netutralizing buffer เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์แต่ละ fraction ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นปรับความเข้มข้นของ IgG โดยใช้ค่า Extinction coefficient ของ IgG เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลาง คำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จาก สูตร $O.D._{280}/1.4 = X$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977)

5.2 การหาค่าความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค DIBA และ Indirect ELISA

ทำการเจือจาง Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 5-1,280 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ฝั่งให้แห้ง นำแผ่น NCM แฉลง ใน Blocking buffer (2% skim milk ที่ละลายใน TBS) ที่เติม 0.4% Triton X-100 เป็นเวลา เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม PAb-PRSV เจือจางใน Blocking buffer ในอัตรา 1:1,000 เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นไปแช่ในสารละลาย GAR-conjugated ที่เจือจางใน Blocking buffer อัตราส่วน 1:10,000 โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าตลอดเวลและล้างด้วย TBST (0.05% tween 20, tris-buffer saline) จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

จากนั้นเติมสารละลาย Napthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2-toluidinediazonium chloride hemizene chloride) เป็นสับสเตรท บ่มในที่มืดจนกว่าจะเกิดสีชมพูของปฏิกิริยาหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น

5.3 การศึกษาชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Blocking solution

เปรียบเทียบความเหมาะสมของ Blocking solution ได้แก่ BSA และ SK ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non specific reaction) โดยวิธีการ Indirect ELISA ในการทดลองใช้ BSA และ SK ที่ระดับความเข้มข้นคือ 1% BSA, 2% BSA, 3% BSA, 4% BSA และ 1% SK, 2% SK, 3% SK และ 4% SK ตามลำดับ โดยการบดตัวอย่างไบสควอชที่เป็นโรคใน Carbonate coating buffer, pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:10 ทำปฏิกิริยากับ IgG ที่เจือจาง 1:1,000 ใน Blocking solution และ GAR-conjugated เจือจาง 1:10,000 ใน Blocking solution โดยมีแผนการทดลองดังนี้

- ทริทเมนต์ที่ 1 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 2 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 2% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 3 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 4 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 4% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 5 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% SK
- ทริทเมนต์ที่ 6 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 2% SK
- ทริทเมนต์ที่ 7 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% SK
- ทริทเมนต์ที่ 8 ไบสควอชเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 4% SK
- ทริทเมนต์ที่ 9 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 10 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 2% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 11 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% BSA
- ทริทเมนต์ที่ 12 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 4% BSA

ทริทเมนต์ที่ 13 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% SK
 ทริทเมนต์ที่ 14 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 2% SK
 ทริทเมนต์ที่ 15 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% SK
 ทริทเมนต์ที่ 16 ไบสควอชปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 4% SK

ทำ 4 ชั่วโมงต่อทริทเมนต์ โดยทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 5 กำหนดค่าเฉลี่ยที่ A_{405} นาโนเมตร มากกว่า 2 เท่า ของไบสควอชปกติที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เจือจางใน Blocking solution แต่ละทริทเมนต์ เป็นผลการทดลองที่สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกชนิดของ Blocking solution ที่สามารถให้ผลการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจงที่ดี

5.4 การตรวจสอบไตเตอร์ของ IgG เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแอนติบอดีทางการค้า

หาค่าไตเตอร์ของ IgG ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein ต่อเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง IgG แบบ 2 fold dilution ตั้งแต่ 1:100 จนถึงระดับความเข้มข้นที่ 1:1,638,400 เปรียบเทียบกับแอนติบอดีทางการค้า MAb-PRSV (Agdia) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยใช้ตัวอย่างสควอชที่เป็นโรคในอัตราส่วน 1:10 ด้วยวิธี Indirect ELISA เคลือบหลุม ELISA plate ด้วยตัวอย่างสควอชที่เป็นโรค PRSV อัตราส่วน 1:10 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน เติม IgG ของ PAb-PRSV และ MAb-PRSV หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 4 และตามวิธีการของบริษัทสำหรับ MAb-PRSV อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น A_{405} นาโนเมตร โดยกำหนดค่าสิ้นสุดไตเตอร์ คือ ค่าต่ำสุดของค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 2 เท่าของค่าที่อ่านได้จากพืชปกติ (Negative control) ทำปฏิกิริยากับ IgG และ MAb-PRSV

5.5 ค่าการเจือจางของน้ำคั้นพืชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ทดลองหาค่าการเจือจางน้ำคั้นสควอช พักทอง และตำลึงที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA โดยมีวิธีการทดลองดังต่อไปนี้ คือ เคลือบหลุม ELISA plate ด้วยน้ำคั้นพืชที่เจือจางแบบ 2 เท่า (2 fold-dilutions) จาก 1:10 ถึง 1:20,480 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้น เทและล้างเอาสารส่วนเกินออกด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ต่อจากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับวิธี Indirect ELISA ข้อ 5

5.6 การตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค DIBA

ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA โดยมีวิธีการดังนี้ บดใบมะละกอ พืชตระกูลแตง และวัชพืช มาบดด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:10 ใช้น้ำคั้นปริมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 5.2 เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของ PAb-PRSV ที่สามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างพืชเป็นโรค สามารถเกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน

5.7 การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยด้วย TIBA

ทำปฏิกิริยาด้วยวิธีการ TIBA ที่ดัดแปลงจาก Martin *et al.* (2002) เพื่อตรวจสอบการเพิ่มปริมาณ และการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ในพืชที่เป็นโรค มีวิธีการดังนี้ ใช้ตัวอย่างตำลิ่งที่ปลูกเชื้อ PRSV อายุ 2 เดือน ตัดส่วน ดอก ก้านดอก ใบอ่อน ก้านใบ มือเกาะ ลำต้นบริเวณข้อตาที่ 1-5 ลำต้น ราก และลำต้นบริเวณข้อตามาทดสอบ (ตารางที่ 1) กดชิ้นส่วนพืชลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยกดค้างไว้นาน 5-10 วินาที เพื่อให้สารละลายในชิ้นส่วนพืชไหลออกมาที่แผ่นเมมเบรน ปล่อยให้เมมเบรนแห้ง ต่อจากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับวิธี DIBA ในข้อ 5.2

ตารางที่ 1 แสดงส่วนต่าง ๆ ของต้นตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV ซึ่งเก็บตัวอย่างมาทดสอบด้วยเทคนิค TIBA

ลำดับที่	ส่วนของพืช	ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง
1	ดอก	ดอกแรกที่บ้านเต็มที่นับจากปลายยอด
2	ก้านดอก	ก้านของดอกแรกที่บ้านเต็มที่นับจากปลายยอด
3	ใบอ่อน	ใบที่ 3 นับจากปลายยอด
4	ก้านใบ	ก้านของใบที่ 3 นับจากปลายยอด
5	มือเกาะ	มือเกาะบริเวณก้านของใบที่ 3 นับจากปลายยอด
6	ลำต้นบริเวณข้อตา 1	ข้อที่ 1 จากโคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
7	ลำต้นบริเวณข้อตา 2	ข้อที่ 2 จากโคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
8	ลำต้นบริเวณข้อตา 3	ข้อที่ 3 จากโคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
9	ลำต้นบริเวณข้อตา 4	ข้อที่ 4 จากโคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
10	ลำต้นบริเวณข้อตา 5	ข้อที่ 5 จากโคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
11	ลำต้นบริเวณ	โคนต้นที่โผล่เหนือระดับดิน
12	ราก	รากใหญ่ที่อยู่ใต้ผิวดิน

5.8 การตรวจสอบความสามารถในการถ่ายโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอผ่านทางเมล็ด

เก็บตัวอย่างเมล็ดตำลึงจากผลตำลึงที่ตรวจพบเชื้อ PRSV เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA และ DIBA เพราะเมล็ดตำลึงในโรงเรือนปลูกพืชทดลองที่มีมดขีด ป้องกันการเข้าทำลายของแมลง เมื่อตำลึงอายุครบ 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบตำลึง 2-3 ใบต่อต้นมาตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้าต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ และพืชตระกูลแตงที่สำรวจและเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร

6.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PAb-PRSV ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้า

เปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของ PAb-PRSV ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้า คือ MAb-PRSV, MAb-Potyvirus และ MAb-WSMoV (Agdia, USA), ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอ แคนตาลูป แตงโม พักทอง และตำลึง โดยเจือจางน้ำคั้นพืชเป็น โรคในอัตราส่วน 1:10 และเจือจางแอนติบอดี 1:200 ตามวิธีการของบริษัท ทำตามขั้นตอนในข้อที่ 5 และใช้ Goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAM-conjugated) สำหรับ MAb ที่ความเข้มข้นเดียวกับ GAR-conjugated อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น A_{405} นาโนเมตร โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 2 เท่าของค่าที่อ่านได้จากพืชปกติเป็นบวก

6.2 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ และพืชตระกูลแตง

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ พืชตระกูลแตง และวัชพืชด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยเลือกแอนติซีรัมที่มีค่าไตเตอร์สูงสุดมาแยกสกัด IgG และใช้ค่าความเจือจางที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ IgG ต่อเชื้อ PRSV มาทำการทดสอบกับชิ้นส่วนของดอก ใบ ผล และราก ของมะละกอ ตำลึง แตงโม แคนตาลูป พักทอง มะระขี้นก พักเปียว แตงกวา บวบเหลี่ยม บวบหอม บวบงู กระทกรก และขี้กาขาว ซึ่งเก็บจากแปลงปลูกมะละกอและพืชตระกูลแตง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ในการเก็บตัวอย่างพืชมาจากแปลงเกษตรกร พื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม สกลนคร หนองคาย มุกดาหาร ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ลพบุรี สระบุรี กรุงเทพมหานคร นครปฐม สุโขทัย เชียงราย และพัทลุง โดยการเก็บตัวอย่างพืชจะเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการของโรคไวรัส โดยใบมีลักษณะอาการใบด่างสีเขียวแก่สลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น บิดเบี้ยวผิดรูปร่าง มีอาการจุดวงแหวนบนผล จากนั้นนำตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคมาบดด้วย Carbonate coating buffer, pH 9.6 ในอัตราส่วน 1:10 เปรียบเทียบ กับพืชปกติ มาทำการทดลองด้วยวิธีการ Indirect ELISA ตามการทดลองข้อ 5 จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{405} นาโนเมตร อ่านผลการตรวจสอบด้วยเครื่อง ELISA microplate reader (Thermo, Finland) กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติที่ให้ผลการทดลองเป็นบวก หรือตรวจสอบได้ว่าพืชตัวอย่างนั้นเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ PRSV

7. การผลิตชุดตรวจสอบ (LFIA) และการตรวจสอบประสิทธิภาพในพีซตระกูลแดง

7.1 การเตรียมสารละลาย Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

เตรียม Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตรปริมาตร 100 มิลลิลิตร จาก 0.01% gold (III) chloride trihydrate (Sigma, USA) ในน้ำกลั่นที่กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน ต้มจนสารละลายเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กวนด้วย magnetic bar ตลอดเวลา จากนั้นเติม 300 ไมโครลิตร ของ 0.1% trisodium citrate (Sigma, USA) ต้มจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม ประมาณ 15 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 0.1M K_2CO_3 เก็บสารแขวนลอยอนุภาคทอง (gold solution) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400-700 นาโนเมตร (Xu *et al.*, 2006)

7.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง IgG ของ PAb-PRSV กับ Colloidal gold

นำสารละลาย Colloidal gold ที่เตรียมได้จากข้อ 7.1 มาเชื่อมต่อกับ IgG โดยปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำ titration เพื่อหาความเหมาะสมของปฏิกิริยาระหว่าง Colloidal gold conjugated IgG โดยการผสม IgG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0-75 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร กับสารละลาย Colloidal gold (ปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วย 0.1 M K_2CO_3) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีเติม 10% NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มอีก 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคทอง อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง IgG ของ PAb-PRSV กับ Colloidal gold คือ สารละลาย Colloidal gold ไม่ตกตะกอน และไม่เปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ 10% NaCl (Kumar *et al.*, 2011) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 520-580 นาโนเมตร (Paek *et al.*, 2000) คัดเลือกอัตราส่วนของ Colloidal gold และ IgG ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ

7.3 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG)

การทำ Tritation เพื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง IgG ของ PAb-PRSV กับ Colloidal gold เลือกระดับความเข้มข้น IgG ที่ระดับ 30, 45, 60 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมนลงใน

Colloidal gold ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติม IgG ที่ละลายจากนั้นกวนเบาๆ ด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที เติม 10% BSA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% กวนเบาๆ กวนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำไปตกตะกอน Colloidal gold conjugated IgG โดยหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่มีส่วนใส ละลายตะกอนด้วย Passive gold diluents pH 7.4 (0.1M TBS pH 7.5 + 0.5% Tween 20 + 1% BSA + 0.02% sodium azide) ให้มีปริมาณ 500 ไมโครลิตร หรือ O.D.⁵³⁰ ให้มีค่าเท่ากับ 3 เติม 20% sucrose และ 10% trehalose ผสมให้เข้ากัน และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยืดอกอายุการเก็บรักษา

7.4 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคทอง (Colloidal gold)

เปรียบเทียบขนาดของ Colloidal gold ก่อน และหลังการเชื่อมด้วย IgG โดยการนำหยดอนุภาคทองลงบนแผ่นกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอรัมวาม และคาร์บอนซับให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตรวจดูที่กำลังขยาย 120,000 เท่า ที่ 100 KV วัดขนาดอนุภาคทอง ดูการกระจาย และหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดอนุภาคทองก่อน และหลังเชื่อมต่อกับ IgG

7.5 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

ศึกษาปฏิกริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ AE98 (5.0 ไมครอน), AE99 (8.0 ไมครอน) และ AE100 (10 ไมครอน) ทำเครื่องหมายที่ 1 และ 1.5 เซนติเมตรจากปลายด้านหนึ่งของแผ่นเมมเบรน กำหนดเป็น Test line และ Control line ตามลำดับ นิดพัน GAR ลงบนตำแหน่ง Control line ตามลำดับ โดยใช้ Biojet (Biodot, USA) ปล่อยให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการประกอบชุดตรวจสอบบนแผ่นพลาสติก (Plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร ตามลำดับดังนี้ คือ วางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงในช่องสำหรับวางแผ่นเมมเบรน ลงในช่องล่างที่ถัดจากช่องที่วางเมมเบรน แล้วจึงวางแผ่นใยแก้วที่รองซับตัวอย่างน้ำคั้น (Sample pad) ลงซ้อนเกยแผ่นประมาณ 1 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (Absorption pad) เพื่อดูดซับของเหลวไว้ด้านบนของแผ่นพลาสติก ตัดให้มีขนาด 0.5 x 6 เซนติเมตร (ภาพที่ 4) จุ่มชุดตรวจลงในบัฟเฟอร์ เปรียบเทียบความเข้มสี ความไวในการเคลื่อนที่ และที่เกิดขึ้นบน Control line

7.6 การคัดเลือกชนิด และความเข้มข้นของแอนติบอดีสำหรับใช้เป็น Control line และ Test line

ชนิด และความเข้มข้นของแอนติบอดีสำหรับใช้เป็นเส้น Test line ทำเครื่องหมายที่ 1 และ 1.5 เซนติเมตรจากปลายด้านหนึ่งของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน กำหนดเป็น Control line และ Test line ตามลำดับ จี๊ดเส้น Goat anti rabbit (GAR) (Sigma, USA) ลงบนตำแหน่ง Control line และ IgG ของ PAb-PRSV และ MAb-Potyvirus ในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ตรงตำแหน่ง Test line บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ปล่อยให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีแผนการทดลองดังต่อไปนี้

ทริทเมนต์ที่ 1 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 2 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 3 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 4 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 5 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 6 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 7 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 8 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 9 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 10 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 11 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 12 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 13 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 14 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 15 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 16 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 17 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทริทเมนต์ที่ 18 ตำแหน่ง Control line ใช้ GAR เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Test line ใช้ MAb-Potyvirus เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คัดเลือกชนิด อัตราส่วน และความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำให้เกิดปฏิกิริยาบริเวณ Control line และ Test line ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ

7.7 การหาอัตราส่วนปริมาณ Colloidal gold conjugated IgG ที่พ่นลงบนแผ่น Conjugate pad

ทดสอบหาชนิด และความเข้มข้นของแอนติบอดีสำหรับใช้เป็น Control line และ Test line จากนั้นหาอัตราส่วน Colloidal gold conjugated IgG ที่เหมาะสมโดยพ่น Colloidal gold conjugated IgG วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{530} นาโนเมตรให้มีค่าเท่ากับ 3 ในอัตราส่วน 1, 3, 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร พ่นลงบนแผ่น Conjugate pad ปล่อยให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการประกอบชุดตรวจสอบ ตัดให้มีขนาด 0.5 x 6 เซนติเมตร หยด Sample buffer ปริมาณ 75 ไมโครลิตร ตรงบริเวณ Sample pad อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาภายในเวลา 10 นาที

เปรียบเทียบความเข้มข้นเส้น Control line ที่เหมาะสม เลือกอัตราส่วนของ Colloidal gold conjugated IgG ที่ให้ผลการตรวจสอบบริเวณ Control line ที่คมชัดไปใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ

7.8 การเปรียบเทียบ Colloidal gold ที่เตรียมได้กับ Colloidal gold ทางการค้า

เมื่อได้ผลการตรวจสอบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ชนิดและความเข้มข้นของแอนติบอดีสำหรับใช้เป็น Test line อัตราส่วนปริมาณ Colloidal gold conjugated IgG ที่พ่นลงบนแผ่น Conjugate pad เปรียบเทียบ Colloidal gold ที่เตรียมได้กับ Colloidal gold ทางการค้าของยี่ห้อ DCN ยี่ห้อ KESTREL BIO SCIENC และยี่ห้อแปซิฟิกประเทศไทย โดยเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของ IgG ของ PAb-PRSV ที่ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื่อมต่อ Colloidal gold conjugated IgG เช่นเดียวกับข้อ 7.3 เปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น Control line ที่ภายในเวลา 10 นาที เลือกชนิดของ Colloidal gold ที่ให้สี Control line ที่เข้มชัดเจน

8. การพัฒนาชุดตรวจสอบ LFIA และหาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างพืช

8.1 การหาค่าความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่สามารถตรวจสอบชุดตรวจสอบ LFIA

พ่น MAb-Potyvirus) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ GAR อัตราส่วน 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ด้วย Biojet (Biodot, USA) ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ชนิด AE99 ที่ตำแหน่ง Test line และ Control line ตามลำดับพ่น Conjugate pad ด้วย Colloidal gold conjugated IgG ของ PAb-PRSV ที่ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 3 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ปล่อยให้แห้ง ประกอบชุดตรวจสอบ ตัดชุดตรวจสอบให้มีขนาด 0.5x6 เซนติเมตร ทดสอบหาค่าการความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนภายในเวลา 10 นาที

8.2 หาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างพืชเพื่อใช้ทดสอบชุดตรวจสอบ LFIA

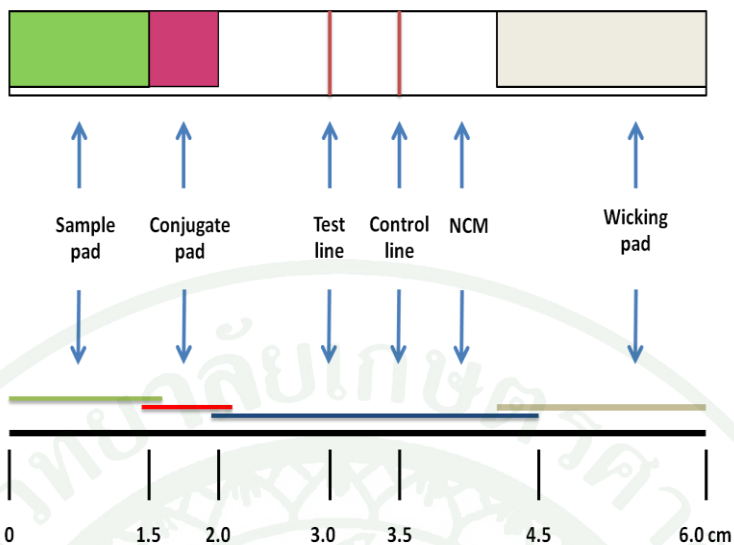
ทดสอบหาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างพืชทดสอบคือ ใบสควอชปกติ และใบสควอชที่ติดเชื้อ PRSV ในบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 10 ชนิดคือ ก. DOA extraction buffer 2 pH 8.5, ข. DOA extraction buffer 2 pH 9.0, ค. DOA extraction buffer 2 pH 9.5 (สำนักวิจัย และพัฒนาการอารักขาพืช) ง. PBS pH 7.4, จ. 1x PBS+0.05% Tween 20+0.01% SDS pH 7.4, ฉ. 10 mM Phosphate buffer pH 7.4, ช. 10 mM phosphate buffer pH 7.4 + 0.05% Tween 20, ซ. Carbonate coating buffer pH 9.6, ฅ. Agdia extraction buffer pH 7.4 และ ฉ. BIOREBA general extraction buffer pH 7.4 เลือกชนิดของบัฟเฟอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และผลการตรวจสอบบริเวณ Control line ที่ชัดเจนไปใช้ในการในการבודตัวอย่างพืช

8.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ LFIA

โดยבודตัวอย่างมะละกอ ตำลึง แดงโม แคนตาลูป ฟักทอง มะระจีนก พักเขียว แดงกวา บวบเหลี่ยม บวบหอม บวบงู กระทกรก และขี้กขาว ที่เป็นโรคด้วย DOA extraction buffer pH 9.0 เจือจางน้ำคั้นพืชที่เป็น โรคในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ หยดน้ำคั้นพืชปริมาตร 75 ไมโครลิตร บริเวณ Sample pad ของชุดตรวจสอบ อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาภายในเวลา 10 นาที

9. เปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างพืช ตัวอย่างมะละกอ ตำลึง แดงโม แคนตาลูป ฟักทอง มะระจีนก พักเขียว แดงกวา บวบเหลี่ยม บวบหอม บวบงู กระทกรก และขี้กขาว ด้วยเทคนิค Indirect ELISA , DIBA และ LFIA เจือจางน้ำคั้นพืชในอัตราส่วน 1:100 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ดูประสิทธิภาพ และความถูกต้องแม่นยำของเทคนิคทั้ง 3 เทคนิค เพื่อเลือกเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสุดไปใช้ในการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ PRSV ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ



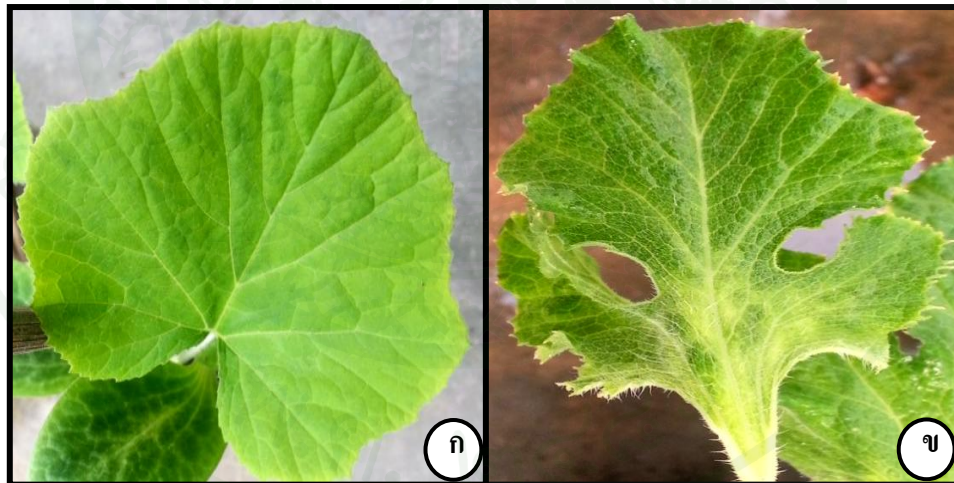
ภาพที่ 4 การประกอบชุดตรวจสอบ LFIA ประกอบด้วย Plastic backing polyester ขนาด 30 x 60 เซนติเมตร, Sample pad, Conjugated pad, Reaction membrane เมมเบรน ที่มี Test line และ Control line, Absorption pad หรือ Wicking pad

ผลและวิจารณ์

1. ดำรวจ เก็บตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตง และการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

นำตัวอย่างมะละกอ ตำลึง พักทอง และแตงโม ซึ่งเก็บจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ที่แสดงลักษณะอาการ ใบด่างเขียวสลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบ เป็นคลื่น บิดเบี้ยวผิดรูปร่าง มาปลูกถ่ายเชื้อลงบนพืชทดสอบ ได้แก่ สควอช พักทอง และตำลึงด้วยวิธีกล พบว่าหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 1 เดือน ต้นสควอช (ภาพที่ 5) ต้นพักทอง (ภาพที่ 6) และตำลึง (ภาพที่ 7) ที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV จะแสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนอย่างชัดเจน

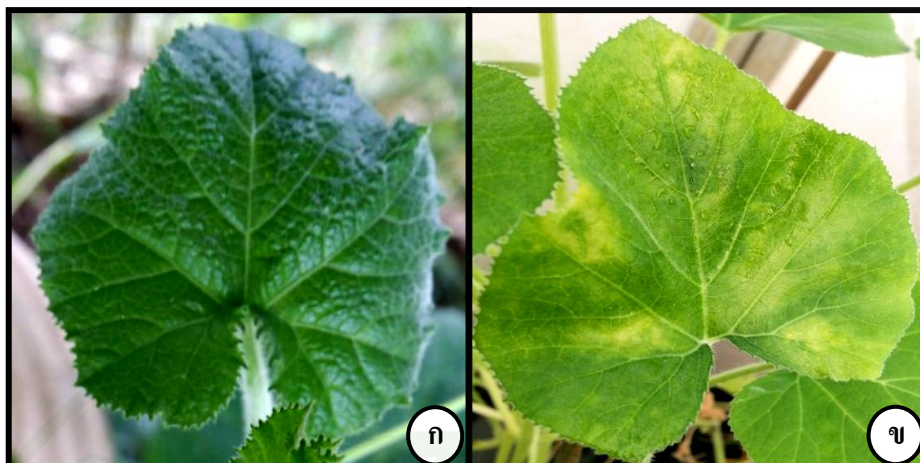
สำหรับบริเวณต้นและก้านใบเมื่ออายุประมาณ 2 เดือนหลังจากการปลูกเชื้อ เริ่มสังเกตเห็นพืชแสดงอาการจุดน้ำน้ำกระจายทั่วบริเวณลำต้นและก้านใบ บริเวณลำต้นเกิดอาการด่างเขียว ลำต้นแคระแกร็น การเจริญเติบโตหยุดชะงัก



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะอาการของสควอชปกติ และสควอชที่ปลูกเชื้อ PRSV

ก) สควอชปกติ

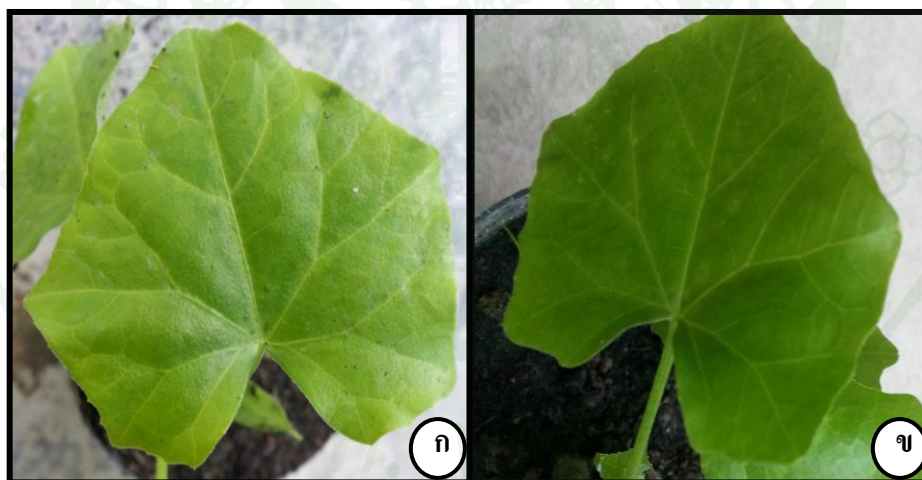
ข) สควอชที่ปลูกเชื้อ PRSV แสดงลักษณะอาการใบด่างเหลืองสลับเขียว ใบลดรูป บิดเบี้ยว



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะอาการของผักทองปกติ และผักทองที่ปลูกเชื้อ PRSV

ก) ผักทองปกติ

ข) ผักทองที่ปลูกเชื้อ PRSV จะแสดงอาการใบด่างเหลืองสลับเขียวกระจายทั่วบริเวณผิวใบ



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบลักษณะอาการของตำลึงปกติ และตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV

ก) ตำลึงปกติ

ข) ตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV ไม่แสดงลักษณะอาการของโรค

จากการเก็บตัวอย่างมะละกอและพีชตระกูลแตง พบลักษณะอาการใบมะละกอใบด่างเหลืองสลับเขียว ใบโป่งนูนลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม ในต้นที่มีลักษณะอาการรุนแรงใบจะบิดเบี้ยว

ลดรูป เหลือแต่เส้นกลางใบ บริเวณผลแสดงลักษณะอาการเป็นวงซ้อน ๆ แต่ลักษณะอาการของโรค ใบด่างจุดวงแหวนมะละในพืชตระกูลแตงจะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดและอายุของพืชอาศัยที่เชื้อเข้าทำลาย

แตงโม บนผลเกิดอาการจุดวงแหวนซ้อน ๆ กันกระจายทั่วบริเวณผล ส่วนลักษณะอาการ บริเวณใบเกิดอาการใบด่างเหลือง บิดเบี้ยว เสียรูปทรง บริเวณขอบใบเกิดรอยไหม้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ลักษณะอาการของตัวอย่างแตงโมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

ก) ลักษณะอาการบริเวณใบแตงโม

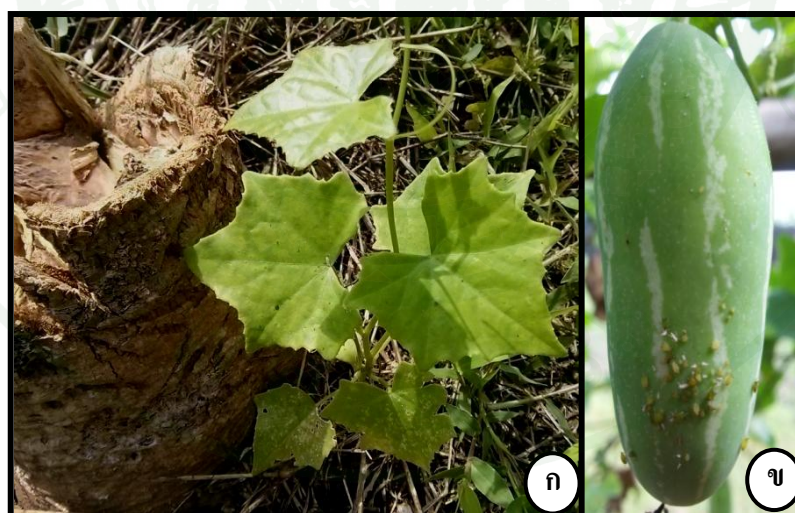
ข) ลักษณะอาการบริเวณผลแตงโม

ฟักทอง ลักษณะอาการต่างเหลืองกระจายทั่วบริเวณใบ ใบหย่น โป่งนูนเป็นตุ่มสีเขียวเข้ม ในใบอ่อนเกิดอาการด่าง เส้นใบใส (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะอาการของตัวอย่างพืชทองที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

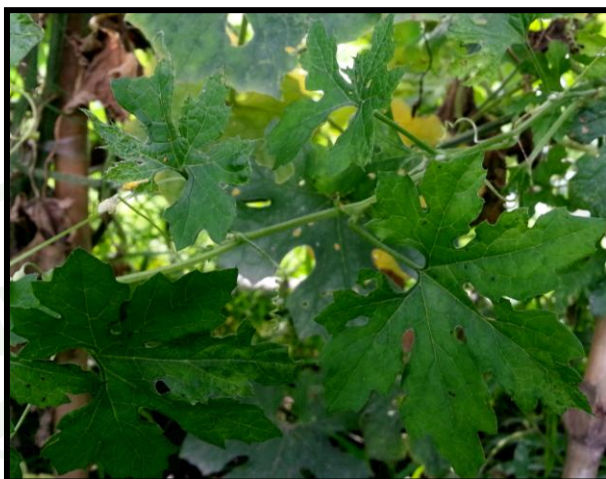
ตำลึงไม่แสดงลักษณะอาการของโรคทั้งบริเวณใบและผล ลักษณะใบไม่แตกต่างจากใบพืชปกติ มีเพียงลักษณะร่องรอยของการเข้าทำลายของแมลงบริเวณใต้ใบ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะอาการของตัวอย่างตำลึงที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

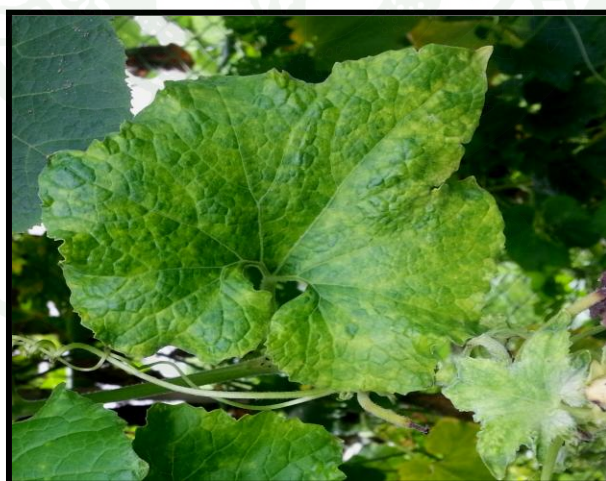
- ก) ลักษณะอาการบริเวณใบตำลึง
- ข) ลักษณะอาการบริเวณผลตำลึง

มะระจั่นก ใบเสีรูปทรง เกิดอาการใบด่างเหลืองสลับเขียวเข้ม ใบยอดหงิกงอน (ภาพที่ 11)



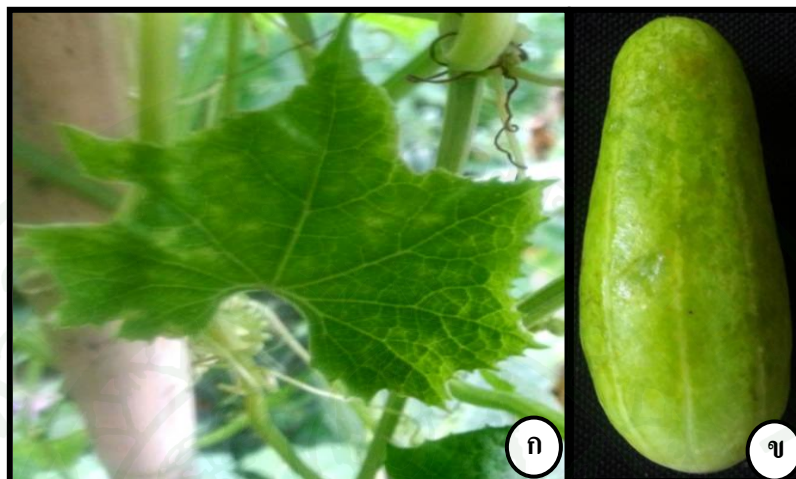
ภาพที่ 11 ลักษณะอาการของตัวอย่างมะระจั่นกที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

ฟักเขียว ใบแสดงลักษณะอาการด่างเหลืองอย่างชัดเจน บิดเบี้ยวเสีรูปทรง (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ลักษณะอาการของตัวอย่างฟักเขียวที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

แตงกวา เกิดอาการใบด่างเหลือง ใบเสียรูปทรง เส้นใบใส บริเวณผลเป็นวงสีเขียว มักพบการแสดงอาการของโรคไม่ค่อยชัดเจน (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ลักษณะอาการของตัวอย่างแตงกวาที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

ก) ลักษณะอาการบริเวณใบแตงกวา

ข) ลักษณะอาการบริเวณผลแตงกวา

บวบเหลี่ยม ใบยอดแสดงอาการด่างเหลืองอย่างชัดเจน ขนาดเล็ก หักย่น เนื้อใบโป่งอ มีตุ่มสีเขียวเข้มกระจายทั่วใบ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ลักษณะอาการของตัวอย่างบวบเหลี่ยมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

บวบหอม ใบค่างเหลืองสลับเขียวเข้ม ใบบิดเบี้ยวเสี้ยวรูปทรง เนื้อใบโป่งนูนมีสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ลักษณะอาการของตัวอย่างใบบวบหอมที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

บวบงู ใบแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน ลักษณะอาการต่างเขี้ยว (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ลักษณะอาการของตัวอย่างใบบวบงูที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

กระทกรก อาการใบอย่างต่างเหลืองกระจายทั่วบริเวณ บริเวณใบเหลือพื้นที่สีเขียวเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ลักษณะอาการของตัวอย่างใบกระทกรกที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

งี่กาขาว ใบมีลักษณะอาการต่างเหลืองสลับเขียวเข้ม กระจายทั่วบริเวณใบ (ภาพที่ 18)



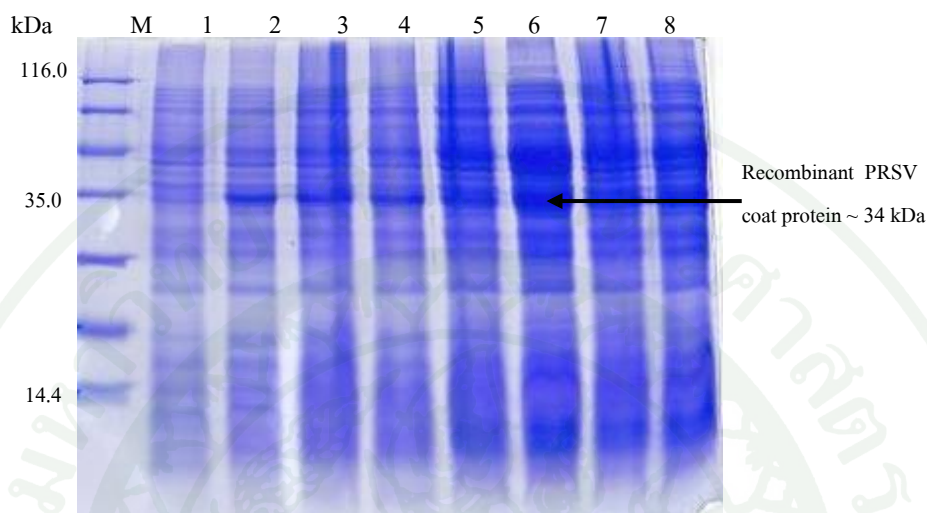
ภาพที่ 18 ลักษณะอาการของตัวอย่างใบงี่กาขาวที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ PRSV

ซึ่งพบลักษณะอาการของโรคแสดงออกรุนแรงบริเวณใบยอด หากมีการแพร่กระจายของเชื้อใบบริเวณลำต้น ลำต้นจะแคระแกร็น เกิดเป็นจุดน้ำสีเขียวนี้อจะแข็งกว่าบริเวณส่วนอื่น

2. การผลิต Recombinant PRSV coat protein ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรีย (CP_M15 transformante) ซึ่งได้รับพลาสมิดลูกผสม pQE30 ที่มียีน PRSV coat protein ของเชื้อ PRSV เชื่อมต่ออยู่แล้วชักนำให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนลูกผสมออกมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อหาระยะเวลาที่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ผลิต Recombinant PRSV coat protein ออกมามากที่สุด ตรวจสอบวิเคราะห์ขนาด และปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ที่ชั่วโมง 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และข้ามคืนด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 19) ผลจากการตรวจวิเคราะห์หาขนาดและปริมาณของโปรตีนพบว่าเซลล์แบคทีเรียมีการผลิต Recombinant PRSV coat protein สูงสุดภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมง หลังการชักนำด้วย IPTG ซึ่งหลังจากชั่วโมงที่ 5 จนกระทั่งข้ามคืนการผลิต Recombinant PRSV coat protein จะลดต่ำลง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 เพื่อให้มีการผลิต Recombinant PRSV coat protein สำหรับไปแยกสกัดโปรตีนบริสุทธิ์ ควรทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมในชนิดและปริมาณอาหารเหลว

2xYT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพเขย่า ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที และชักนำให้มีการผลิตโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลาเป็นเวลา 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 19 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Recombinant PRSV coat protein ที่มีการผลิตในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE
 M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Finland)
 ช่องเจลที่ 1 โปรตีนที่แยกได้ก่อนชักนำด้วย IPTG เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์
 ช่องเจลที่ 2-7 การผลิต Recombinant PRSV coat protein ชั่วโมงที่ 1-6
 ช่องเจลที่ 8 การผลิต Recombinant PRSV coat protein นานข้ามคืน

3. การแยกสกัดให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein

เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดการผลิต Recombinant PRSV coat protein บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาพเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเซลล์มาย่อยด้วย Lysozyme เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultrasonicator และแยกสกัดโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย

Ni-NTA ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ระหว่างการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ออกเป็นส่วนๆ แบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ด้วยกัน ได้แก่

ก. ส่วน flow through คือส่วนของน้ำไหลหลังจากการย่อยเซลล์และตกตะกอนเซลล์ แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ และไหลออกจากคอลัมน์เป็นครั้งแรก

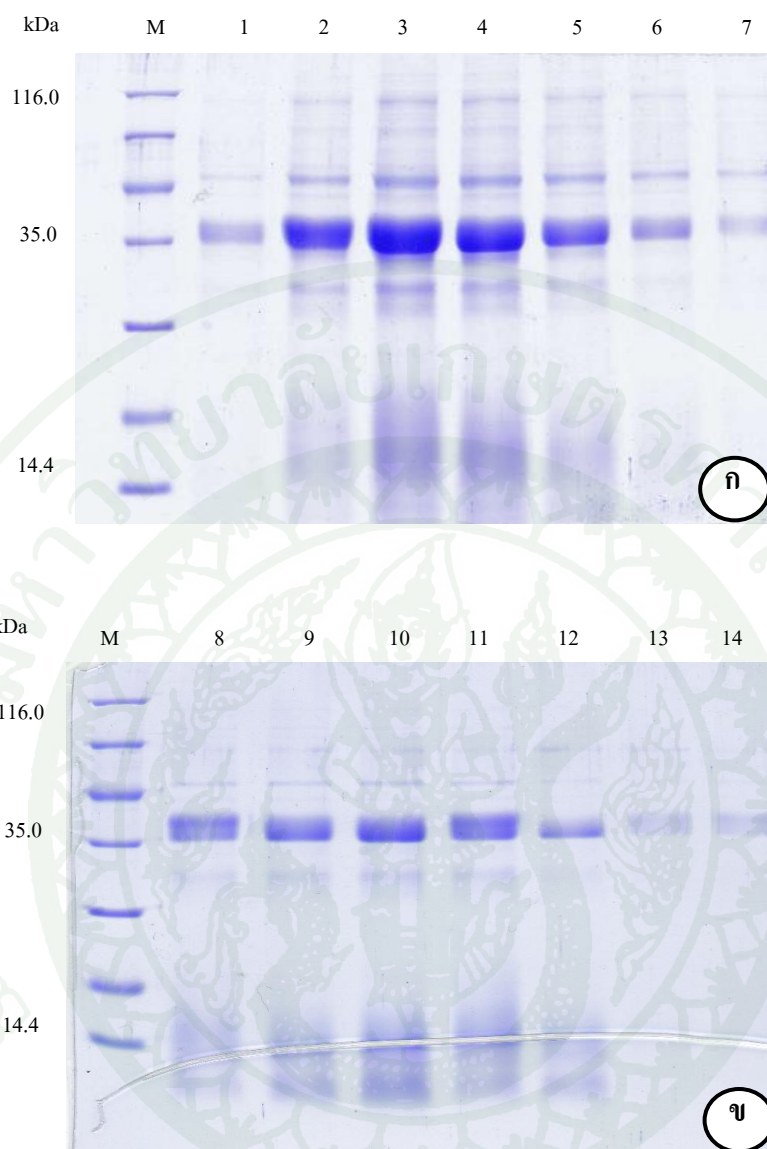
ข. ส่วน wash คือส่วนน้ำที่เก็บมาจากคอลัมน์ หลังจากการล้างด้วย Buffer C pH 6.3

ค. ส่วน D คือ ส่วนน้ำที่เก็บมาจากคอลัมน์หลังจากการล้างด้วย Buffer D pH 5.9 แบ่งเก็บเป็น fraction จำนวน 20 fraction

ง. ส่วน E คือส่วนน้ำที่เก็บมาจากคอลัมน์หลังจากการชะ ด้วย Buffer E pH 4.5 แบ่งเก็บเป็น fraction จำนวน 20 fraction

แต่ละขั้นตอน (ก-ง) นำส่วนน้ำไปวิเคราะห์หาขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีน PRSV coat protein ขนาด 33 กิโลดาลตัน และส่วนของ 6x histidine อีกประมาณ 1 กิโลดาลตัน ซึ่งจะพบว่า PRSV coat protein ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เริ่มมีความบริสุทธิ์ส่วนท้าย ๆ ของ Buffer D ใน fraction ที่ D17-D20 หลังจาก elute ด้วย Buffer E จะเห็นแถบโปรตีนเป้าหมายแถบเดียว ไม่มีโปรตีนอื่นเจือปนมา (ภาพที่ 20) จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี ไดอะไลซิส และตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford protein assay

หลังจากการแยกสกัด Recombinant PRSV coat protein แล้วทำการไดอะไลซิส โปรตีนในสารละลาย 1xPBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเกลือหรือ urea ออกโดยการให้ไหลผ่าน dialysis tube (molecular weight cut of 10 kDa) (Sigma, USA) ทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ ตรวจวัดปริมาณ และความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford นำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein จากสมการ $y = 0.005x$ ค่า $R^2 = 0.857$ ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Recombinant PRSV coat protein ได้ 0.14 คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนได้เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 5.60 มิลลิกรัมจากปริมาตรของ Recombinant PRSV coat protein ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำโปรตีนที่บริสุทธิ์มาปรับความเข้มข้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 20 ผลการวิเคราะห์ห้ขนาด และปริมาณ Recombinant PRSV coat protein หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยวิธี SDS-PAGE

ก) M โปรตีนมาตรฐาน โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Finland)

ช่องเจลที่ 1-7 โปรตีนที่แยก fraction ที่ 1-7 หลังการชะด้วย Buffer E pH 4.5

ข) M โปรตีนมาตรฐาน โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Finland)

ช่องเจลที่ 8-14 โปรตีนที่แยก fraction ที่ 8-14 หลังการชะด้วย Buffer E pH 4.5

4. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง และการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม ด้วยวิธี Indirect ELISA

4.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิต PAb ต่อเชื้อ PRSV โดยใช้ Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นี๊ดเข้าสู่กระต่ายบริเวณใต้ผิวหนังจำนวน 4 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ผสมแอนติเจน กับ Complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 (1 มิลลิลิตร : 1 มิลลิลิตร) ครั้งถัดไปผสมแอนติเจน กับ Incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วนเช่นเดิม เจาะเลือดกระต่ายทุก ๆ สัปดาห์รวม 10 ครั้ง เก็บแอนติซีรัมได้ปริมาณ 79 มิลลิลิตร โดยมีการเติม 0.02 % NaN₃ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ แบคทีเรีย และคุณภาพของแอนติบอดี (ตารางที่ 2)

4.2 การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค Indirect ELISA

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บมาทั้งหมด 10 ครั้งด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยใช้ Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตรเป็นแอนติเจน พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมมีค่าอยู่ในช่วง 1 : 3,200 - 1 : 409,600 โดย แอนติซีรัมครั้งที่ 1, 2, 3 มีค่าไตเตอร์ต่ำสุดคือ 1 : 3,200 และค่าไตเตอร์ค่อยเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อนี๊ด แอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในครั้งที่ 4 พบว่าแอนติซีรัมที่มีค่าไตเตอร์สูงกว่าก่อน ๆ อาจ เนื่องจากการฉีดกระตุ้นครั้งก่อน สัตว์ทดลองยังไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีมากนัก พบว่า แอนติซีรัมครั้งที่ 8 มีค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 1 : 409,600 (ภาพที่ 21) จึงคัดเลือกแอนติซีรัมครั้งที่ 8 ไป สกัด IgG เพื่อใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ใน มะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA, TIBA และ LFIA

ตารางที่ 2 โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บเลือด และค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตใน
กระต่าย White New Zealand

สัปดาห์ ที่	แอนติเจน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	แอดจู แวนต์	ปริมาตรที่ฉีด (มิลลิลิตร)	ชนิดซีรัม	ปริมาณซีรัม (มิลลิลิตร)	ค่าไตเตอร์ ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA
1	-	-	-	NS	2	-
2	1.0	CFA ¹	1.0	-	-	-
3	1.0	IFA ²	1.0	-	-	-
4	1.0	IFA ²	1.0	-	-	-
5	-	-	-	AS ₁	6	3,200
6	-	-	-	AS ₂	6	3,200
7	-	-	-	AS ₃	12	3,200
8	-	-	-	AS ₄	2	12,800
9	-	-	-	AS ₅	12	25,600
10	1.0	IFA ²	1.0	-	-	-
11	-	-	-	AS ₆	5	102,400
12	-	-	-	AS ₇	10	204,800
13	-	-	-	AS ₈	10	409,600
14	-	-	-	AS ₉	10	25,600
15	-	-	-	AS ₁₀	10	204,800

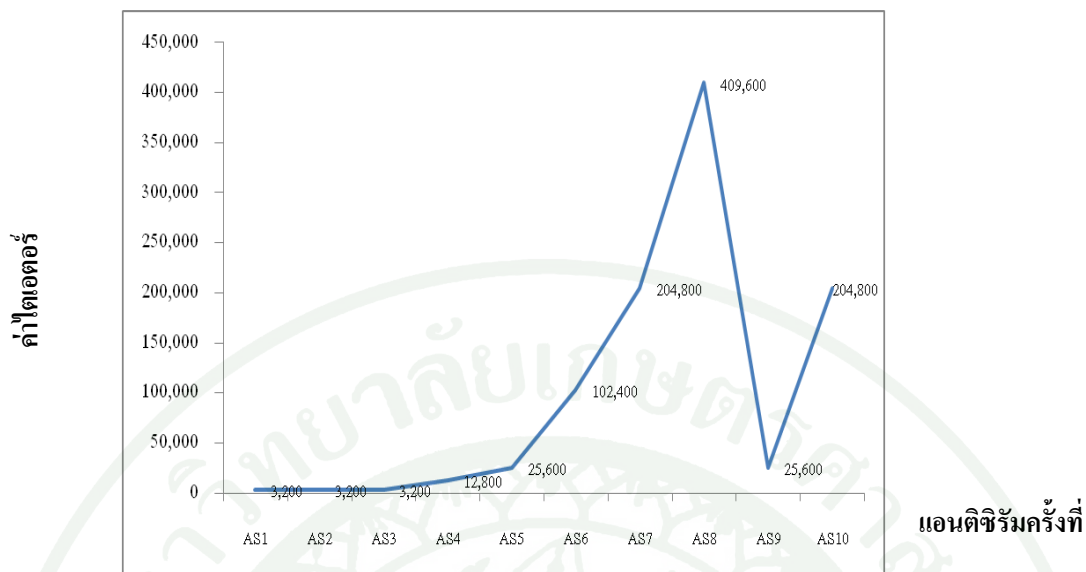
หมายเหตุ ¹ Complete Freund's adjuvant

² Incomplete Freund's adjuvant

Carbonate coating buffer pH 9.6 ที่แอนติซีรัมเจือจาง 1:200 วัดค่า O.D.₄₀₅ ได้ 0.098

Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า O.D.₄₀₅ ได้ 0.102

ค่า O.D.₄₀₅ เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ จากการอ่านผลที่เวลา 30 นาที หลังจากเติมสับสเตรท



ภาพที่ 21 ค่าไคเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ PRSV เมื่อใช้โปรตีน Recombinant PRV coat protein บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

5. การแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Blocking solution ทดสอบค่าไคเตอร์ของ IgG และความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตง ด้วยวิธีการ Indirect ELISA, DIBA และ TIBA

5.1 การแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน

การแยกสกัด IgG จากการสกัดแอนติซีรัมปริมาตร 2 มิลลิตรด้วยชุด protein A column chromatography ขนาด 1 มิลลิตร ทำการเก็บ IgG ที่ชะด้วย Elution buffer ทั้งหมด 10 fraction (ตารางที่ 3) เมื่อนำ fraction ต่าง ๆ ของ IgG ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่ามีความบริสุทธิ์ มีขนาดของ Heavy chain และ Light chain เท่ากับ 55 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่ง fraction ที่มี IgG เข้มข้นมากที่สุดคือ fraction E1 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{280} นาโนเมตร ค่า $O.D_{280}$ เท่ากับ 10.10 คำนวณความเข้มข้นของ IgG ได้เท่ากับ 7.179 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (ภาพที่ 22) พบมีโปรตีนบางส่วนที่ไม่จับกับ protein A หลุดออกมาในขั้นตอนการล้างคอลัมน์ ซึ่งสามารถนำโปรตีนกลับไปผ่านคอลัมน์อีกครั้งหนึ่งโดยการบ่มทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจับของ protein A ได้ดียิ่งขึ้น แต่ไม่ควรทิ้งไว้นานเกินไป เพราะอุณหภูมิสูงอาจจะทำให้ IgG เสียสภาพ

ตารางที่ 3 การแยกอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จาก PAb-PRSV ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ด้วยชุดสกัด protein A column chromatography

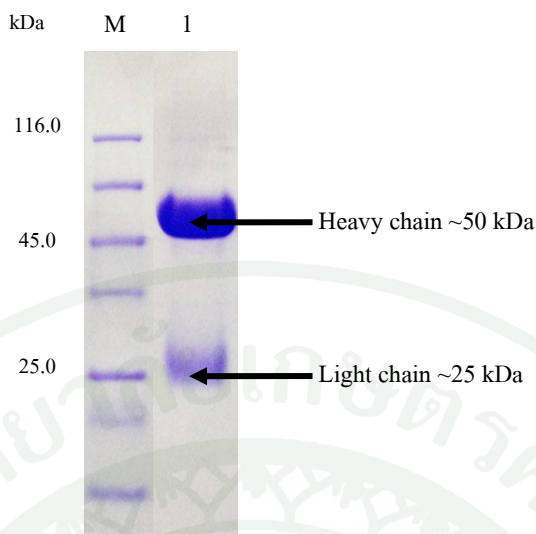
Fraction ¹	ค่าการดูดกลืนแสงที่	ความเข้มข้นของ IgG ² (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
	A ₂₈₀ นาโนเมตร	
W1	2.496	1.783
W2	0.410	0.293
W3	0.372	0.266
W4	0.198	0.141
W5	0.010	0.007
E1	10.050	7.179
E2	4.180	2.986
E3	3.670	2.621
E4	2.230	1.593
E5	1.870	1.336
E6	1.790	1.279
E7	0.579	0.414
E8	0.189	0.135
E9	0.000	0.070
E10	0.000	0.021

หมายเหตุ ¹ fraction ต่าง ๆ ที่เก็บจากการล้างคอลัมน์

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

W fraction ที่เก็บจากการล้างคอลัมน์ด้วย Washing buffer

E fraction ที่เก็บจากการล้างคอลัมน์ด้วย Elution buffer



ภาพที่ 22 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ IgG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย protein A column chromatography ด้วยวิธี SDS-PAGE

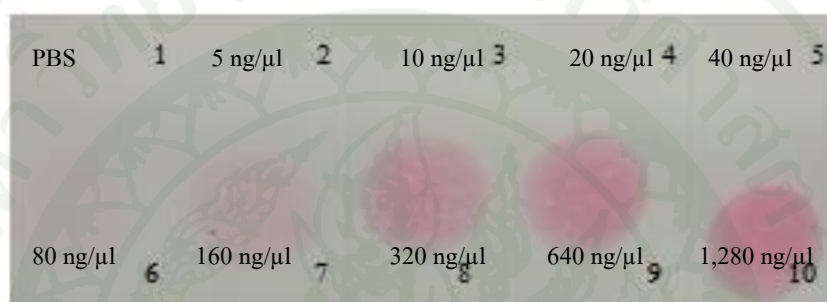
M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, Finland)

ช่องเจลที่ 1 IgG บริสุทธิ์ เจือจาง 1:10

5.2 การหาค่าความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค DIBA และ Indirect ELISA

การตรวจหาความสามารถในการตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้น 5-1,280 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยเทคนิค DIBA และ Indirect ELISA ความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่สามารถมองเห็นสีชมพูได้ด้วยตาเปล่าคือ ระดับความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein ที่ 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 23) ซึ่งระดับความเข้มข้นของปฏิกิริยาสีชมพูที่เกิดจาก Naphthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2 toluidinediazonium chloride hemizene chloride) จะชัดเจนมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein เดียวกัน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA ความเข้มข้นต่ำสุดของ Recombinant PRSV coat protein ที่ยังคงให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก คือ ระดับความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่า $O.D._{405}$ มีค่าเท่ากับ 0.71 (ตารางที่ 4) ซึ่งสีของปฏิกิริยายังไม่ชัดเจนเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แสดงว่า PAb-PRSV ที่ผลิตจากการใช้ Recombinant PRSV coat protein มีความสามารถในการ

การตรวจหา Recombinant PRSV coat protein ที่มีความเข้มข้นในระดับนาโนกรัม ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้เจือจางแอนติเจน แม้ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้แม้จะมีปริมาณน้อยก็สามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจน ซึ่งหากมีการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ DIBA kit หรือ ELISA kit เป็นการลดต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ เทคนิค DIBA ใช้ตัวอย่างในปริมาณที่น้อยกว่าเทคนิค Indirect ELISA โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ PRSV ในตัวอย่างนั้น



ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 5 นาที หลังจากเติมสับสเตรท

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ระดับความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A ₄₀₅ นาโนเมตร
CB	0.096
5	0.710
10	1.972
20	2.343
40	2.554
80	2.989
160	2.981
320	3.270
640	3.230
1,280	3.870

หมายเหตุ CB สารละลาย Carbonate coating buffer pH 9.6

กำหนดค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของ CB จัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

5.3 การศึกษาชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Blocking solution

จากการตรวจสอบชนิดและความเข้มข้นของ Blocking solution ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างพืชที่เป็นโรคซึ่งสามารถป้องกันการเกิด non specific reaction ได้ดี คือ Blocking solution ที่ใช้ SK ที่ระดับความเข้มข้น 2% และ 4% ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจนในระดับที่ใกล้เคียงกัน และสามารถป้องกันการเกิด non specific reaction ได้ดีกว่า BSA ที่ระดับความเข้มข้นทุกความเข้มข้น ซึ่งสังเกตได้จากค่า O.D.₄₀₅ ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าต่ำกว่า และไม่แตกต่างจากพืชปกติ (ตารางที่ 5) จึงคัดเลือก Blocking solution ที่เติม 2% ของ SK ไปใช้สำหรับการทดลอง

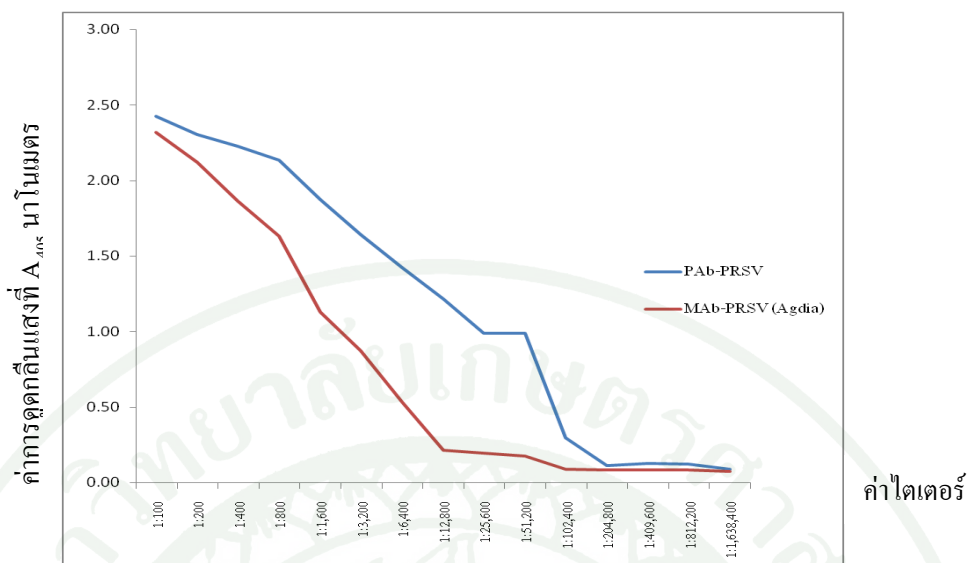
ตารางที่ 5 ความสามารถในการป้องกันการเกิด non-specific reaction ของ Blocking solution 2 ชนิด ได้แก่ SK และ BSA เพื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ทรีทเมนต์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A ₄₀₅ นาโนเมตร			ค่า S/N ratio เฉลี่ย
	โบสควอชิตติเชื้อ PRSV	โบสควอชปกติ	บัพเฟอร์	
1% SK	1.538	0.215	0.083	7.153 ¹
2% SK	1.538	0.192	0.095	8.010
3% SK	1.538	0.199	0.080	7.728
4% SK	1.544	0.174	0.198	8.873
1% BSA	1.629	0.359	0.076	4.537
2% BSA	1.639	0.278	0.077	5.895
3% BSA	1.643	0.311	0.106	5.283
4% BSA	1.655	0.317	0.094	5.220

หมายเหตุ ¹ ค่า S/N ratio เท่ากับค่า O.D.₄₀₅ ของตัวอย่างพืชเป็นโรคต่อ O.D.₄₀₅ ของพืชปกติ

5.4 การตรวจสอบไตเตอร์ของ IgG และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแอนติบอดีทางการค้า

นำ IgG ที่สกัดได้ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจหาค่าไตเตอร์ของ IgG ต่อความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างสควอชที่เป็นโรค เปรียบเทียบหาค่าความเจือจางต่ำสุดของ IgG ของ PAb-PRSV กับแอนติบอดีทางการค้า MAb-PRSV ตรวจวัดค่า O.D.₄₀₅ กำหนดค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติจึงให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก เมื่อนำ IgG ที่สกัดจาก PAb-PRSV มาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับ MAb-PRSV พบว่า PAb-PRSV ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein ให้ผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ที่ถูกต้อง แม่นยำเทียบเท่ากับ MAb-PRSV แต่ให้ค่าไตเตอร์ที่สูงกว่า MAb-PRSV คือ PAb-PRSV มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1 : 51,200 ผลการเกิดสีเหลืองชัดเจนของ *p*-nitrophenyl phosphate ในช่วงค่าไตเตอร์ 1 : 100 - 1 : 51,200 ค่า O.D.₄₀₅ เท่ากับ 2.424-0.988 ส่วน MAb-PRSV ที่มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1 : 25,600 ค่าค่า O.D.₄₀₅ เท่ากับ 0.193 (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของ IgG จาก PAb-PRSV และ MAb-PRSV ที่ค่าความเจือจางต่าง ๆ ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

5.5 ค่าการเจือจางของน้ำคั้นพืชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Indirect ELISA

การตรวจหาค่าความเจือจางของน้ำคั้นพืชเป็นโรคน้ำคั้นพืช โดยใช้น้ำคั้นพืชของ สควอช และตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV ที่อายุ 2 เดือนมาใช้ทดสอบ พบว่าค่า O.D.₄₀₅ ของพืชเป็นโรคน้ำคั้นพืชเป็นโรคเจือจางกับ Carbonate coating buffer, pH 9.6 ที่อัตราส่วน 1:10 ซึ่งเข้มข้นสูงสุด ไม่ได้ให้ผลการตรวจสอบที่ดีที่สุด พบว่าพืชเมื่อเจือจางน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่เจือจางในอัตราส่วน 1:160 ให้ผลการตรวจสอบที่มีค่า O.D.₄₀₅ สูงที่สุด ในขณะที่สควอช และตำลึงค่าความเจือจางน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่เจือจางในอัตราส่วน 1:80 และ 1:40 ซึ่งค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชของ สควอช และตำลึง ที่สามารถให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA คือ 1:10,240, 1:2,260 และ 1:5,120 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ค่าความเจือจางสูงสุด (Dilution end point) ของแอนติเจนที่สามารถตรวจพบเชื้อ PRSV
ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ค่าความเจือจางของแอนติเจน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A ₄₀₅ นาโนเมตร		
	ฟักทอง	สควอช	ตำลึง
CB	0.077	0.072	0.073
H	0.116	0.094	0.086
D	2.427	1.905	2.134
1:10	2.236 ¹	1.712 ²	2.287 ³
1:20	2.233	1.830	2.134
1:40	2.236	1.980	2.387
1:80	2.244	1.990	1.958
1:160	2.677	1.246	1.874
1:320	2.258	1.046	1.723
1:640	2.228	0.605	1.564
1:1,280	2.211	0.558	1.268
1:2,560	2.189	0.437	0.608
1:5,120	2.159	0.184	0.187
1:10,240	1.408	0.189	0.124
1:20,480	0.149	0.101	0.134

หมายเหตุ CB สารละลาย Carbonate coating buffer pH 9.6

ตัวอย่าง H คือ Negative control

ตัวอย่าง D คือ Positive control

¹ ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำของตัวอย่างฟักทอง

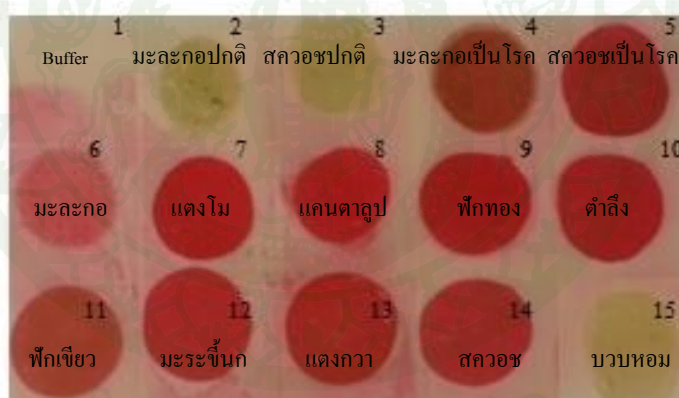
² ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำของตัวอย่างสควอช

³ ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำของตัวอย่างตำลึง

กำหนดค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

5.6 การตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค DIBA

การตรวจสอบตัวอย่างมะละกอ และพืชตระกูลแตงที่เก็บจากแปลงเกษตรกรด้วยเทคนิค DIBA พบว่าเทคนิค DIBA สามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยจำนวน 9 ชนิด คือ มะละกอ แตงโม แคนตาลูป ฟักทอง ตำลึง ฟักเขียว มะระจีนก แดงกวา สควอช ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนปฏิกิริยาเกิดสีชมพูอย่างชัดเจนของ Naphthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2 toluidincediazonium chloride hemizene chloride) ที่ใช้เป็นสับสเตรท ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ซึ่งผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ถูกต้องแม่นยำเทียบเท่ากับเทคนิค Indirect ELISA (ภาพที่ 25) แต่ลักษณะการแสดงผลของปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน คือ เทคนิค Indirect ELISA ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนเป็นค่าของตัวเลขที่สามารถระบุผลการตรวจสอบที่ให้ผลเป็นบวกหรือลบ แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือในการอ่านผล เทคนิค DIBA เป็นเทคนิคที่อ่านผลด้วยสายตาเหมาะสำหรับการตรวจสอบในภาคสนาม แต่ถ้าผลของปฏิกิริยาไม่ชัดเจน อาจเกิดข้อผิดพลาดในการให้ผลการตรวจสอบได้

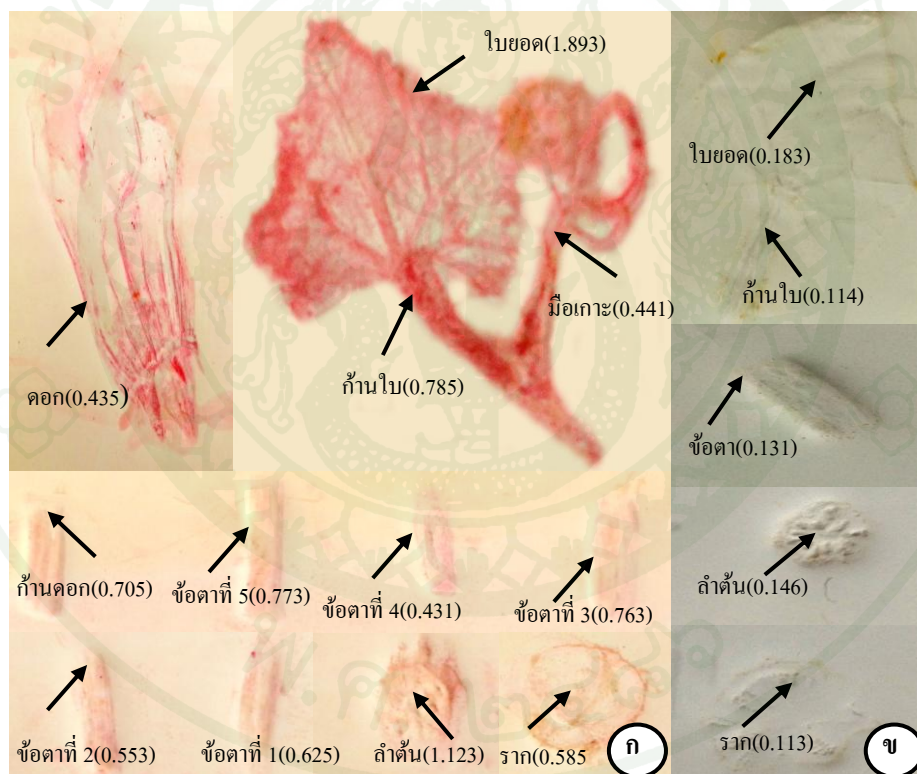


ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยด้วยเทคนิค DIBA การตรวจสอบที่เวลา 5 นาที หลังจากเติมสับสเตรท

5.7 การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค TIBA

การตรวจสอบติดตามการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตงโดยศึกษาในตัวอย่างตำลึงอายุ 2 เดือนหลังการปลูกเชื้อ PRSV ใช้ตัวอย่างตำลึง ตัดส่วน ใบ ดอก ก้านดอก ลำต้น ราก และมือเกาะ มาทดสอบด้วยเทคนิค TIBA พบการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ทุกส่วนของ

ตำลึงที่นำมาตรวจสอบ (ภาพที่ 26) ซึ่งสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนว่าตำลึงที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV ไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อนำมาตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค TIBA ตรวจพบเชื้อ PRSV ในต้นดังกล่าว โดยบริเวณที่ตรวจพบเชื้อ PRSV มากที่สุด คือ บริเวณใบ และก้านใบของตำลึง ซึ่งให้ผลปฏิกิริยาเกิดสีชมพูชัดเจนกว่าบริเวณชิ้นส่วนอื่นของตำลึง ซึ่งอาจเกิดจากการถ่ายทอดโรคของเชื้อ PRSV โดยแมลงพาหะ บริเวณที่ได้รับเชื้อเป็นลำดับแรกคือบริเวณเนื้อใบ จากนั้นเชื้อค่อย ๆ แพร่กระจายไปตามท่อน้ำท่ออาหาร การตรวจสอบเห็นได้ว่าเชื้อ PRSV สามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณต้นตอของต้นตำลึง ทำให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตบนพืชอาศัยและแพร่กระจายเชื้อไปยังฤดูปลูกต่อไปได้ จึงเป็นสาเหตุให้เชื้อ PRSV สามารถระบาดไปได้อย่างรวดเร็ว อยากแก่การป้องกันกำจัด



ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบตำลึงด้วยเทคนิค TIBA และ Indirect ELISA อ่านผลที่เวลา 15 นาที หลังเติมสับสตรท
 ก) ตำลึงที่ปลูกเชื้อ PRSV (ค่า O.D. ₄₀₅)
 ข) ตำลึงปกติ (ค่า O.D. ₄₀₅)

5.8 การตรวจสอบความสามารถในการถ่ายโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอผ่านทางเมล็ด

จากการนำเมล็ดตำลึงจากต้นที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ เมื่อต้นกล้าอายุครบ 1 เดือน จำนวน 195 ต้น โดยการเด็ดตัวอย่างใบ 2-3 ใบต่อต้นมาตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA ใช้ PAb-PRSV เจือจาง 1:1,000 เมื่อเวลา 30 นาทีหลังการเติมสับสเตรท ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีการเกิดปฏิกิริยาของ *p*-nitrophenyl phosphate แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า เชื้อ PRSV ไม่มีความสามารถในการถ่ายโรคผ่านทางเมล็ดของตำลึง Bayot *et al.* (1990) รายงานตรวจพบเชื้อ PRSV ในต้นกล้ามะละกอที่ปลูกจากเมล็ดต้นที่เป็นโรค คิดเป็น 0.15 % และ Alma *et al.* (2012) พบการถ่ายโรคเชื้อ PRSV ผ่านทางเมล็ดต้น Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) คิดเป็น 48% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปตรวจสอบในฐานข้อมูลใน Gen Bank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PRSV-W ถึง 92-95 % นิวคลีโอไทด์ และ 94 – 99 % กรดอะมิโน จากผลการวิจัยนั้นชี้ให้เห็นว่าเชื้อ PRSV มีความสามารถในการถ่ายโรคถึงแม้ว่าจะตรวจพบในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชอาศัยหลักคือ มะละกอ ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ PRSV สามารถแพร่ระบาดไปทั่วโลกได้อย่างรวดเร็ว เพราะฉะนั้น การตรวจสอบความสามารถในการถ่ายโรคผ่านทางเมล็ดของต้นตำลึงควรมีการศึกษาในตัวอย่างที่มีจำนวนมากกกว่านี้ และขยายช่วงเวลาในการตรวจสอบตัวอย่างเป็นระยะ ๆ เพราะในช่วงเวลาสั้น ๆ เชื้อ PRSV อาจยังเพิ่มปริมาณได้ไม่มากนัก จึงอาจส่งผลให้ยังไม่สามารถตรวจพบเชื้อ PRSV ในต้นตำลึง

6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้าต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ และพืชตระกูลแตงที่สำรวจ และเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร

6.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PAb-PRSV ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้า

เปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของ PAb-PRSV ที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้า MAb-PRSV, MAb-Potyvirus, MAb-WSMoV โดยตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอ แคนตาลูป แตงโม ฟักทอง และตำลึง พบว่า PAb ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein สามารถตรวจสอบพืชตระกูลแตงที่เป็นโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่

เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติที่นำมาใช้ในการทดสอบ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบเช่นเดียวกับแอนติบอดีทางการค้าทั้ง 3 ชนิดที่นำมาใช้เปรียบเทียบ ซึ่งตรวจพบเชื้อ PRSV และ WSMoV ในตัวอย่างแตงโม และแคนตาลูปที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ (ตารางที่ 7) ซึ่งให้เห็นว่าในพืชตระกูลแตงอาจมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด จึงต้องใช้เทคนิคทางด้านซีรัมวิทยาช่วยจำแนกเชื้อสาเหตุในพืชอาศัยเช่นเดียวกับ Oliveira, (2000) ที่ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ ZYMV และ PRSV จากพืชอาศัยที่มีลักษณะอาการที่ใกล้เคียงกัน และจากการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่า PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอ และพืชตระกูลแตงเทียบเท่ากับแอนติบอดีทางการค้า

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้าสำหรับการตรวจสอบเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตง

ชนิดตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A ₄₀₅ นาโนเมตร			
	PAb-PRSV	MAB-PRSV (Agdia)	MAB-Potyvirus (IG8 สวทช.)	MAB-WSMoV (Agdia)
CB	0.083 ¹	0.087 ²	0.083 ³	0.097 ⁴
H	0.121	0.113	0.132	0.128
D	2.257	2.583	2.213	2.107
แคนตาลูป-1	0.135	0.101	0.132	0.112
แคนตาลูป-2	0.178	0.123	0.127	0.783
แตงโม-1	1.721	1.753	1.772	0.217
แตงโม-2	1.725	1.853	1.721	1.627
ฟักทอง-1	1.385	1.557	1.531	0.127
ฟักทอง-2	0.125	0.112	0.183	0.124
ตำลึง-1	1.987	2.135	2.027	0.114
ตำลึง-2	1.758	1.975	1.653	0.122

หมายเหตุ CB สารละลาย Carbonate coating buffer pH 9.6

ตัวอย่าง H คือ Negative control ของบริษัท (Agdia, USA)

ตัวอย่าง D คือ Positive control ของบริษัท (Agdia, USA)

¹ ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ เมื่อใช้ PAb-PRSV

² ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ เมื่อใช้ MAb-PRSV

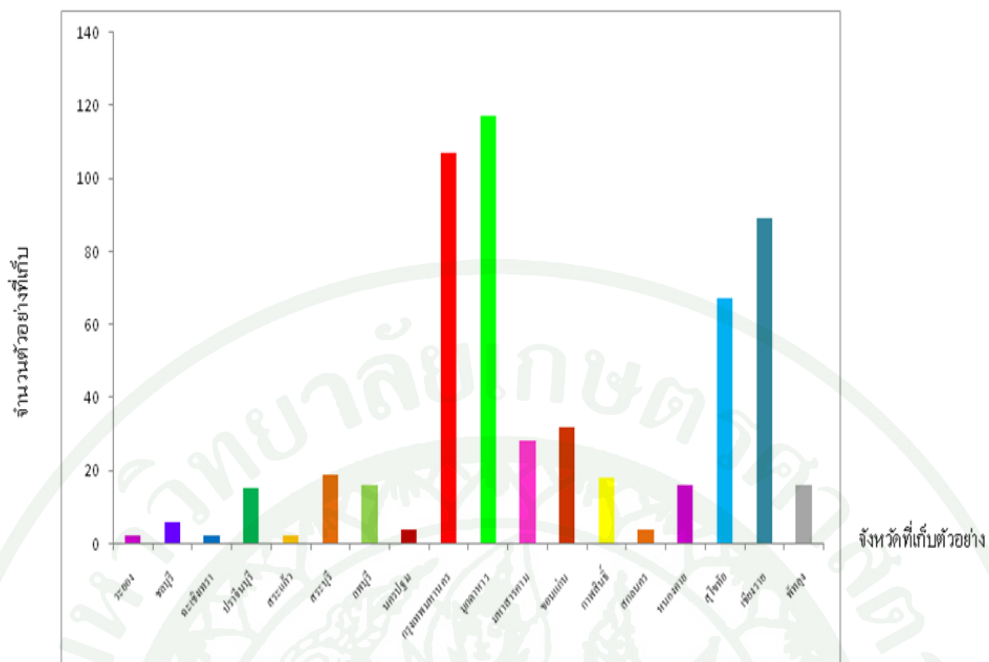
³ ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ เมื่อใช้ MAb-Potyvirus

⁴ ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ เมื่อใช้ MAb-WSMoV

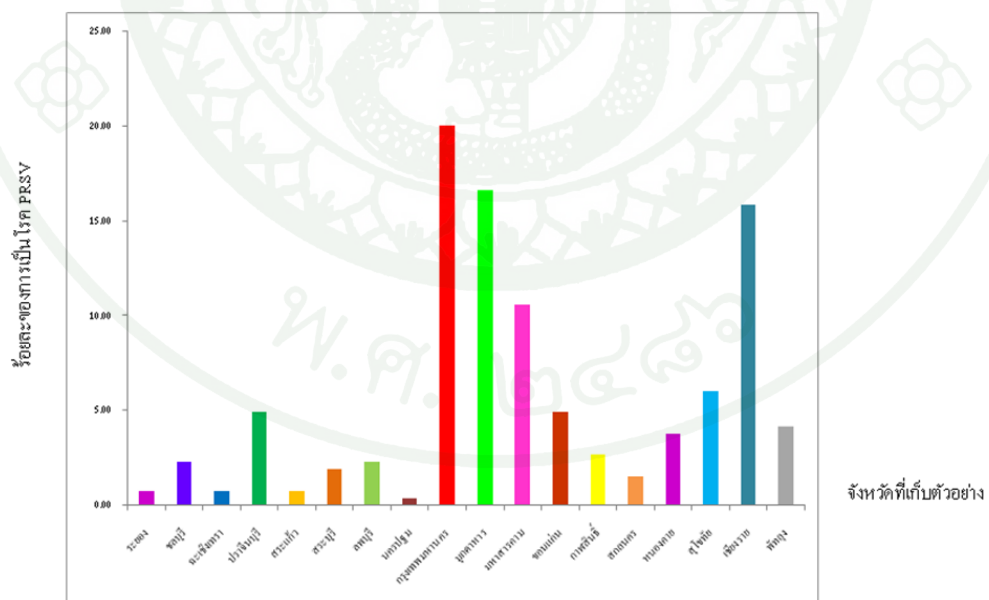
กำหนดค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

6.2 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตง

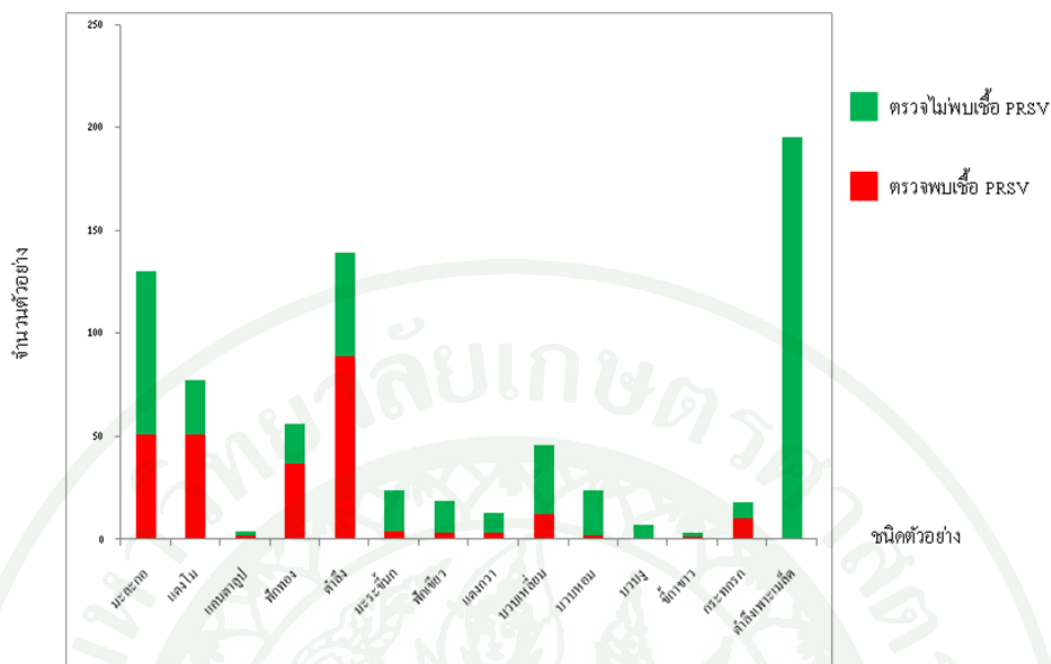
การตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอ พืชตระกูลแตงและวัชพืช 14 ชนิดพืชอาศัย จำนวน 560 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกมะละกอและพืชตระกูลแตงในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ จำนวน 18 จังหวัด จังหวัดมุกดาหาร มีจำนวนตัวอย่างมากเป็นอันดับ 1 ตามมาด้วยจังหวัดกรุงเทพมหานคร และ จังหวัดเชียงราย (ภาพที่ 27) โดยนำส่วนของ ราก ใบ ดอก และผล ของพืชอาศัยแต่ละชนิด มาตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA และ DIBA ผลการตรวจสอบพบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างทั้งหมด 265 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 47.32 จังหวัดกรุงเทพมหานครเป็นจังหวัดที่ตรวจพบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างมากที่สุด รองลงมาคือ จังหวัดมุกดาหาร และจังหวัดเชียงรายตามลำดับ (ภาพที่ 28) ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเชื้อ PRSV แพร่ระบาดไปทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ PRSV คือ ตัวอย่างแตงโม จำนวน 51 ตัวอย่าง จากตัวอย่างแตงโมทั้งหมด 77 ตัวอย่าง (ภาพที่ 29) โดยมีอัตราส่วนของพืชเป็นโรคต่อพืชปกติเท่ากับ 1.96 คิดเป็นร้อยละการเป็นโรค 66.23 รองลงมาคือ พักทอง ตำลึง กระถกรก แคนตาลูป มะละกอขี้กาขาว แตงกวา พักเขี้ยว มะระจีนก บวบหอม (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าแตงโมเป็นพืชอาศัยที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อ PRSV มากกว่าพืชตระกูลแตงชนิดอื่นๆ พืชตระกูลแตงเป็นพืชอาศัยที่ตรวจพบเชื้อ PRSV มากกว่าในมะละกอ และตรวจไม่พบเชื้อ PRSV ในบวบงู และบวบหอม ผลการตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ในผลการตรวจสอบสอดคล้องทั้งเทคนิค Indirect ELISA และ DIBA แสดงให้เห็นว่า PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ และ พืชตระกูลแตง สามารถนำไปใช้ตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA และ DIBA และจากการสำรวจตัวอย่างจากพืชแสดงให้เห็นได้ว่า ลักษณะอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวน มะละกอมีลักษณะอาการที่แตกต่างตามชนิดพืชอาศัย (ตารางที่ 9)



ภาพที่ 27 จำนวนจำนวนตัวอย่างตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA



ภาพที่ 28 ร้อยละการเป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอจำแนกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA



ภาพที่ 29 สัดส่วนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ PRSV ต่อตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ PRSV จำแนกตามชนิดตัวอย่างตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความจำเพาะของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ต่อตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตงด้วยวิธี Indirect ELISA

ตัวอย่างพืชอาศัย	จำนวน	ตรวจพบเชื้อ	ตรวจไม่พบเชื้อ	ร้อยละของการเป็นโรค	S/N ratio
		PRSV	PRSV		
มะละกอ	130	51	79	39.21	0.64 ^{1/}
แตงโม	77	51	26	66.23	1.96
แคนตาลูป	4	2	2	50.00	1.00
ฟักทอง	56	37	19	66.07	1.94
ตำลึง	139	89	50	64.08	1.78
มะระจีน	24	4	20	14.29	0.17
ฟักเขียว	19	3	16	15.79	0.19
แตงกวา	13	3	10	23.08	0.30
บวบเหลี่ยม	46	12	34	26.08	0.35
บวบหอม	24	2	22	8.33	0.09
บวบงู	7	0	7	0.00	0.00
ซูกากาว	3	1	2	33.33	0.50
กระทกรก	18	10	8	55.56	1.25
รวม	560	265	295	47.32	0.89
ตำลึงเพาะเมล็ด	195	0	195	0	0

หมายเหตุ ^{1/} ค่า S/N ratio เท่ากับค่า O.D.₄₀₅ ของตัวอย่างพืชเป็นโรคต่อค่า O.D.₄₀₅ ของพืชปกติ

ตารางที่ 9 ลักษณะอาการของพืชอาศัยที่นำมาตรวจเชื้อ PRSV โดยใช้ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA

ลำดับ	ชื่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ลักษณะอาการบนพืชอาศัย
1	มะละกอ	<i>Carica papaya</i> L.	papaya	ใบด่างเหลืองสลับเขียว เสียรูปทรง อาการรุนแรง เหลืองแต่เส้นกลางใบ เกิดจุดวงแหวนบริเวณผล
2	แตงโม	<i>Citrullus vulgaris</i> L.	watermelon	ใบด่างเหลืองสลับเขียว เสียรูปทรง ผลเกิดอาการ ด่างจุดวงแหวน
3	แคนตาลูป	<i>Cucumis melo</i> L.	cantaloupe	เกิดจุดวงแหวนบริเวณผล
4	แตงกวา	<i>Cucumis sativus</i> L.	cucumber	ใบด่างเหลือง พืชมักไม่แสดงอาการรุนแรง ผลด่างเป็นจุดวงแหวนบริเวณพื้นผิว
5	คำลิ่ง	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	Ivy Gourd	พืชไม่แสดงอาการของโรค ใบอาจมีขนาดเล็กลดรูป
6	ฟักทอง	<i>Cucurbita moschata</i> (Duch) Pior	pumpkin	ใบด่างเหลืองทั่วผิวใบ หรือเหลืองสลับเขียว เนื้อใบใส ใบย่นเล็ก เสียรูปทรง ต่อมาแสดงอาการด่างชัดเจนขึ้น
7	สควอช	<i>Cucurbita pepo</i> L.	squash	ใบด่างเขียวอ่อนสลับกับเขียวเข้ม ใบม้วนงอเสียรูปทรง ต้นแคระแกร็น ผลบิดเบี้ยวเสียรูปทรง
8	มะระ	<i>Momordica charantia</i> L.	bitter gourd	เนื้อใบด่างสีเขียวเข้ม ใบโป่งนูน แคระแกร็น ขนาดเล็กลดรูป
9	ฟักเขียว	<i>Benincasa hispida</i> Cogn.	wax gourd	ใบด่างสีเหลืองสลับเขียว เป็นคลื่น ม้วนงอ เนื้อใบโป่งพอง
10	บวบเหลี่ยม	<i>Luffa acutangula</i>	angled foofah	ใบด่างเหลืองสลับสีเขียวเข้ม เนื้อใบโป่งพอง เสียรูปทรง
11	บวบหอม	<i>Luffa cylindrica</i>	Sponge gourd	ใบด่างเหลือง สลับเขียวเข้ม เนื้อใบโป่งนูน
12	บวบงู	<i>Trichosanthes cucumerina</i> Linn.	Snake gourd	ใบด่างเขียว อาการไม่ชัดเจน
13	ขี้กاخาว	<i>Trichosanthes cordata</i> Roxb.	-	ใบด่างเหลืองกระจายทั่วผิวใบ
14	กระทกรก	<i>Passiflora foetida</i>	Fetid passionflower	ใบด่างเหลือง หงิก ลดรูป

7. การผลิตชุดตรวจ PRSV (LFIA) และการตรวจสอบประสิทธิภาพในพีชตระกูลแตง

7.1 การเตรียมสารละลาย Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร

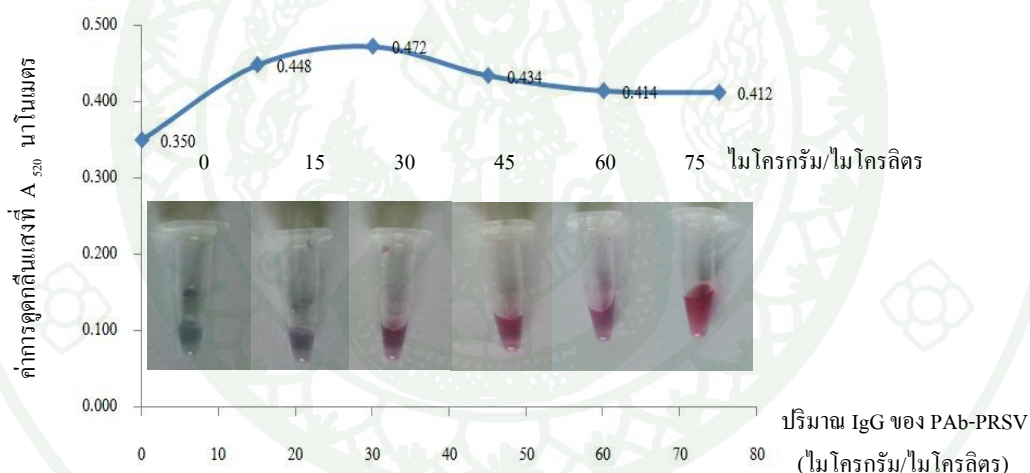
การเตรียม Colloidal gold ที่มีความเหมาะสมกับการนำไปเชื่อมต่อกับ IgG คือ Colloidal gold ที่มีขนาด 20-40 นาโนเมตร ซึ่ง Colloidal gold ที่เตรียมได้มีลักษณะของสีม่วงแดง เมื่อนำ Colloidal gold วัดค่า O.D.₅₂₀ มีค่าเท่ากับ 0.386

7.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง IgG ของ PAb-PRSV กับ Colloidal gold

จากการทำ Titration เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม Colloidal gold และ IgG ของ PAb-PRSV พบว่า Colloidal gold เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินที่ความเข้มข้นของ IgG ของ PAb-PRSV เท่ากับ 0 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งวัดค่า O.D.₅₂₀ เท่ากับ 0.448 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของ Colloidal gold ที่ความเข้มข้นของ IgG ที่ 30, 45, 60 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสีแปรผันตามปริมาณของ IgG โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงไม่เพิ่มขึ้นแม้จะเพิ่มปริมาณ IgG ของ PAb-PRSV ให้มากขึ้นก็ตาม (ตารางที่ 10) ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณ Colloidal gold และ IgG ของ PAb-PRSV ไปใช้สร้างกราฟระหว่างปริมาณของ IgG ของ PAb-PRSV กับค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณ IgG ของ PAb-PRSV ที่เหมาะสมคือค่าความเหมาะสมของ IgG ของ PAb-PRSV กับ Colloidal gold ที่ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 30)

ตารางที่ 10 ปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ Colloidal gold โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} นาโนเมตร

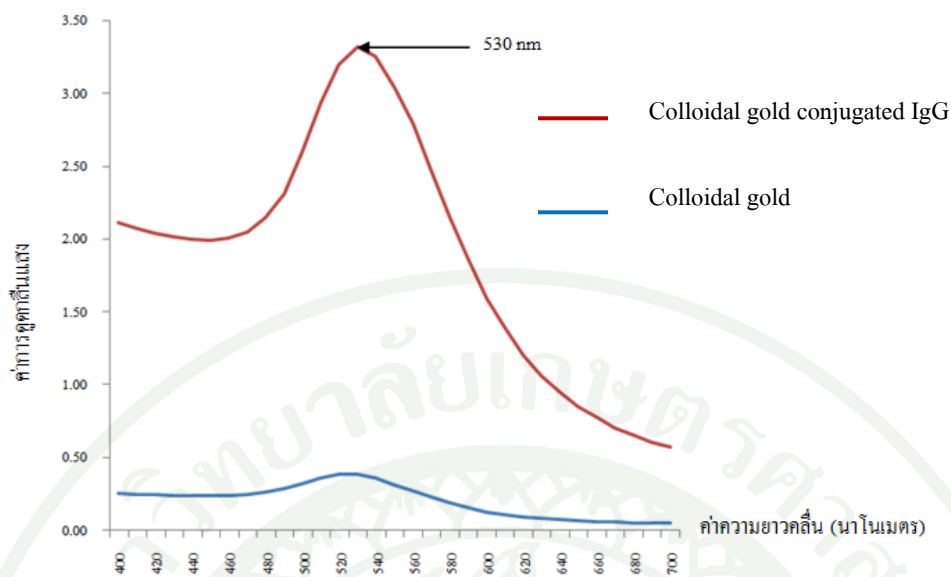
IgG ของ PAb-PRSV (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	Colloidal gold (ไมโครลิตร)	10% NaCl (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} นาโนเมตร
0	500	100	0.350
15	500	100	0.448
30	500	100	0.472
45	500	100	0.434
60	500	100	0.414
75	500	100	0.412



ภาพที่ 30 แสดงค่า $O.D_{520}$ และการเปลี่ยนแปลงสีของ Colloidal gold ที่ปริมาณความเข้มข้น IgG ของ PAb-PRSV ที่ระดับต่างๆ ที่ 10 นาทีหลังเติม 10 % NaCl

7.3 การเชื่อมต่อ IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal gold conjugated IgG)

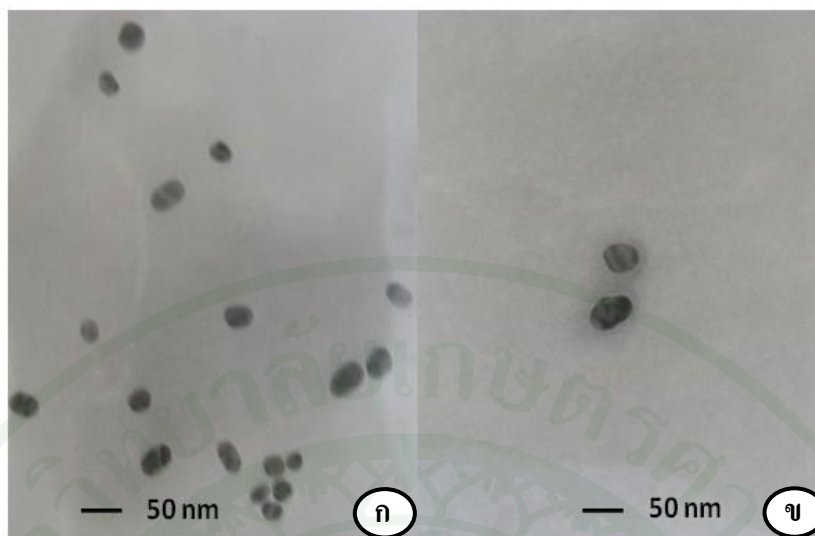
หลังจากเชื่อมต่อ Colloidal gold กับ IgG ของ PAb-PRSV ตกตะกอน Colloidal gold conjugated IgG ด้วยสารละลาย passive gold diluents pH 7.4 และเติม 20 % sucrose และ 10 % trehalose ผสมให้เข้ากัน ตรวจวัดค่า $O.D_{520}$ ให้มีค่าเท่ากับ 3 (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น $A_{400-700}$ นาโนเมตร ของ Colloidal gold และ Colloidal gold conjugated IgG

7.4 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคทอง (Colloidal gold)

การศึกษาขนาดของ Colloidal gold ก่อนและหลังติดฉลากด้วย IgG ของ PAb-PRSV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 120,000 เท่า พบว่า Colloidal gold conjugated IgG มีขนาดโดยเฉลี่ยใหญ่กว่า Colloidal gold ก่อนการเชื่อมด้วย IgG ของ PAb-PRSV โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 28.5 ± 9.75 และ 45 ± 5 นาโนเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การเปรียบเทียบขนาดของ Colloidal gold ก่อนและหลัง การเชื่อมด้วย IgG ของ PAb-PRSV ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 120,000 เท่า

ก) Colloidal gold ก่อนเชื่อมต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 28.5 ± 9.75 นาโนเมตร

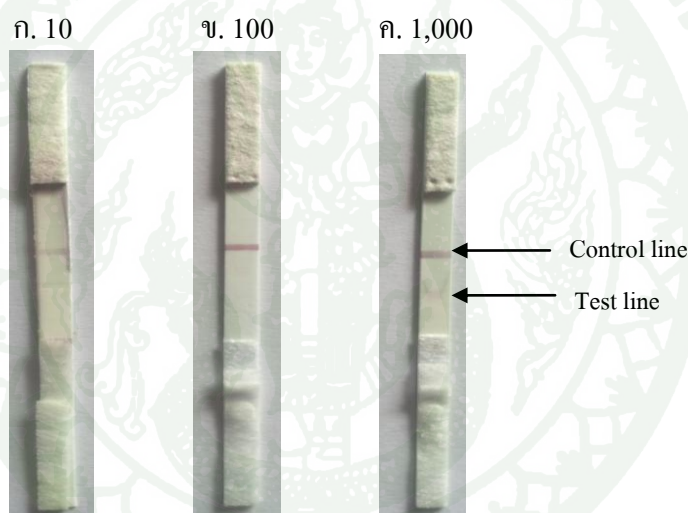
ข) Colloidal gold conjugated IgG ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 45 ± 5 นาโนเมตร ตามลำดับ

7.5 การศึกษาชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ต่อเวลาที่ใช้และความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ พบว่า ปฏิกริยาบนเส้น Control line เกิดได้เร็วที่สุดบนชุดตรวจสอบที่ใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 100 (80 วินาที) ซึ่งแตกต่างจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 98 และ AE 99 แต่พบว่าที่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนทั้ง 3 ชนิด ความไวในการเกิดปฏิกริยาบนบริเวณ Control line แปรผกผันกับขนาดของช่องว่างเฉลี่ยภายในแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน สอดคล้องกับการรายงานของ Hechleitner and Kraus (2002) โดย AE98 (5 ไมครอน) ใช้เวลาในการเกิดปฏิกริยานานที่สุด คือ 168 วินาที รองลงมาคือ AE99 (8 ไมครอน) และ AE100 (10 ไมครอน) ซึ่งใช้เวลาในการเกิดปฏิกริยา 110 และ 80 วินาทีตามลำดับ พบว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 99 ให้การสอบบริเวณ Control line ที่คมชัดกว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบ จึงคัดเลือกแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE 99 ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

7.6 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีสำหรับใช้เป็น Control line

การหาความเข้มข้นของ GAR ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนบน Control line โดยใช้ GAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ ความชัดเจนของสีปฏิกิริยาบริเวณ Control line แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของ GAR ที่พ่นลงบน Control line ในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เมื่อพิจารณาสีของ Control line เมื่อใช้ GAR ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการเกิดปฏิกิริยาภายใน 10 นาที ความชัดเจนของสีปฏิกิริยาบริเวณ Control line ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 33) จึงเลือก GAR ที่เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรเพื่อลดต้นทุนในการผลิตชุดตรวจสอบ



ภาพที่ 33 ความเข้มสีที่เกิดบริเวณ Control line จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง GAR ความเข้มข้นต่างๆ ที่อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร
 ก) 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
 ข) 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
 ค) 1,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

7.7 การหาอัตราส่วนปริมาณ Colloidal gold conjugated IgG ที่เหมาะสมในการพันลงบนแผ่น Conjugate pad

เมื่อฉีดพ่น Colloidal gold conjugated IgG ลงบนแผ่น Conjugate pad ในอัตราส่วน 1, 3, 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร พบว่าความเข้มของสีบนเส้น Control line แปรผันตามความปริมาณของ Colloidal gold conjugated IgG ที่ใช้พ่นลง แต่เนื่องจากอัตราส่วน 3 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้สีของเส้น Control line ที่คมชัด และเพียงพอสำหรับการบ่งชี้ปฏิกิริยา ไม่เกิดการไหลย้อนกลับของ Colloidal gold conjugated IgG เมื่อตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาภายใน 10 นาที จึงเลือกใช้อัตราส่วนดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป

7.8 การเปรียบเทียบคุณภาพ Colloidal gold ที่เตรียม กับ Colloidal gold ทางการค้า

การเปรียบเทียบคุณภาพ Colloidal gold ที่เตรียมได้กับ Colloidal gold ทางการค้าผล โดยการเปรียบเทียบสีและความชัดเจนของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบริเวณ Control line จากการเปรียบเทียบชนิดของ Colloidal gold ทางการค้าจากบริษัทต่างๆ พบว่า ระดับความชัดเจนของเส้น Control line เมื่อใช้ Colloidal gold ยี่ห้อของบริษัทแปซิฟิกประเทศไทย มีความคมชัดมากที่สุด รองลงมาคือ Colloidal gold ยี่ห้อ DCN ยี่ห้อ KESTREL BIO SCIENC ประเทศไทย และ Colloidal gold ที่เตรียมได้เอง (ตารางที่ 11) อาจเนื่องจาก Colloidal gold บริษัทแปซิฟิกประเทศไทยเป็น Colloidal gold ที่ผลิตขึ้นภายในประเทศไทย ระยะเวลาในการขนส่งน้อยกว่า Colloidal gold ที่ผลิตขึ้นจากต่างประเทศ จึงส่งผลให้ Colloidal gold ยังคงคุณภาพที่ดีขณะนำมาใช้พัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค LFIA จึงคัดเลือก Colloidal gold ของบริษัทแปซิฟิกประเทศไทย ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเปรียบเทียบ Colloidal gold ที่เตรียมได้กับ Colloidal gold ทางการค้า

ชนิดของ Colloidal gold	ระดับความเข้มของ Control line
	บนชุดตรวจสอบ
ยี่ห้อ DCN	4
ยี่ห้อ KESTREL BIO SCIENC ประเทศไทย	4
ยี่ห้อ แปซิฟิกประเทศไทย	5
Colloidal gold ที่เตรียมได้เอง	3

หมายเหตุ ระดับ 5 สีของ control ชัดเจนดีมาก
 ระดับ 4 สีของ control ชัดเจนดี
 ระดับ 3 สีของ control ชัดเจนปานกลาง

8. การพัฒนาชุดตรวจสอบ LFIA และหาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างพืช

8.1 การหาค่าความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่สามารถตรวจสอบชุด LFIA

ค่าความเจือจางของ Recombinant PRSV coat protein ที่สามารถใช้ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ Colloidal gold conjugated IgG ของ PAb-PRSV และใช้ MAb-Potyvirus มาเป็น Test line สามารถตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่มีความเจือจางในระดับ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนภายในระยะเวลา 3 นาทีหลังจากหยดแอนติเจนลงไป (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบของชุด LFIA ที่ใช้ GAR เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตรเป็นเส้น Control line และใช้ Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบ

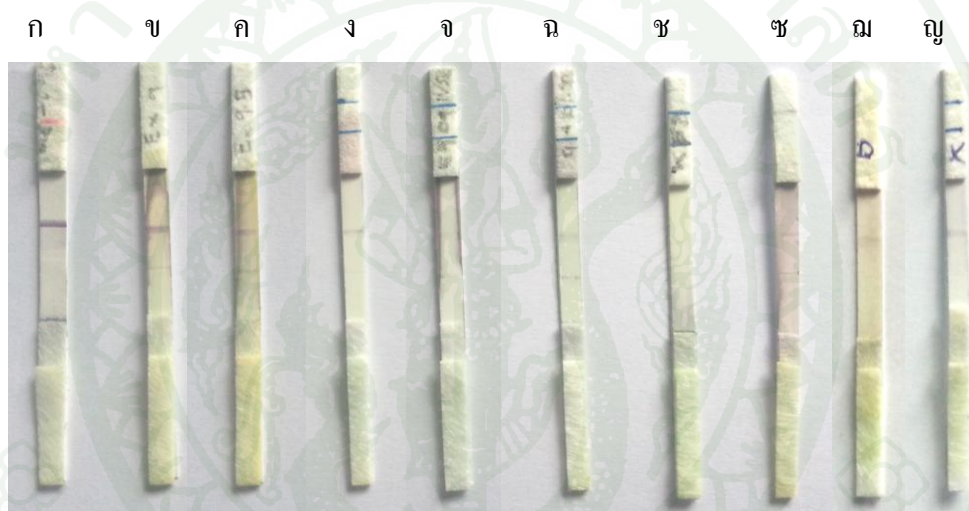
ระดับความเข้มข้น ของ IgG ที่เชื่อมต่อ กับ Colloidal gold (ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร)	อัตราส่วน ปริมาณ (ไมโครลิตร/ เซนติเมตร)	ระดับความเข้มข้นของเส้น Test line (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)			
		MAb- Potyvirus	ผลการ ทดสอบ	IgG ของ PAb-PRSV	ผลการ ทดสอบ
15	1	10	-	10	-
	1	100	-	100	-
	1	1,000	-	1,000	-
	3	10	-	10	-
	3	100	-	100	-
	3	1,000	-	1,000	-
	5	10	-	10	-
	5	100	-	100	-
30	1	10	-	10	-
	1	100	-	100	-
	1	1,000	-	1,000	-
	3	10	-	10	-
	3	100	-	100	-
	3	1,000	-	1,000	-
	5	10	-	10	-
	5	100	-	100	-
	5	1,000	-	1,000	-
45	1	10	-	10	-
	1	100	-	100	-
	1	1,000	-	1,000	-
	3	10	-	10	-
	3	100	+	100	-
	3	1,000	-	1,000	-
	5	10	-	10	-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ระดับความเข้มข้น ของ IgG ที่เชื่อมต่อกับ Colloidal gold (ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร)	อัตราส่วน ปริมาณ (ไมโครลิตร/ เซนติเมตร)	ระดับความเข้มข้นของเส้น Test line (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)			
		MAb- Potyvirus	ผลการ ทดสอบ	IgG ของ PAb -PRSV	ผลการ ทดสอบ
	5	100	-	100	-
	5	1,000	-	1,000	-
60	1	10	-	10	-
	1	100	-	100	-
	1	1,000	-	1,000	-
	3	10	-	10	-
	3	100	-	100	-
	3	1,000	-	1,000	-
	5	10	-	10	-
	5	100	-	100	-
	5	1,000	-	1,000	-
75	1	10	-	10	-
	1	100	-	100	-
	1	1,000	-	1,000	-
	3	10	-	10	-
	3	100	-	100	-
	3	1,000	-	1,000	-
	5	10	-	10	-
	5	100	-	100	-
	5	1,000	-	1,000	-

8.2 หาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการבודตัวอย่างพืช เพื่อใช้ทดสอบชุดตรวจสอบ LFIA

จากการเปรียบเทียบชนิดของ Sample buffer ทั้ง 10 ชนิด พบว่า บัฟเฟอร์ 4 ชนิดคือ DOA extraction buffer pH 8.0, DOA extraction buffer2 pH 9.0, DOA extraction buffer 2 pH 9.5, extraction buffer DIBA pH 8.4 ซึ่งบัฟเฟอร์ทั้ง 4 ชนิดไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ พบว่า DOA extraction buffer 2 pH 9.5 เป็นที่เหมาะสมในการนำไปใช้בודตัวอย่างพืช เนื่องจากให้ผลการตรวจสอบบริเวณ Control line ชัดเจนกว่าบัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ (ภาพที่ 34)

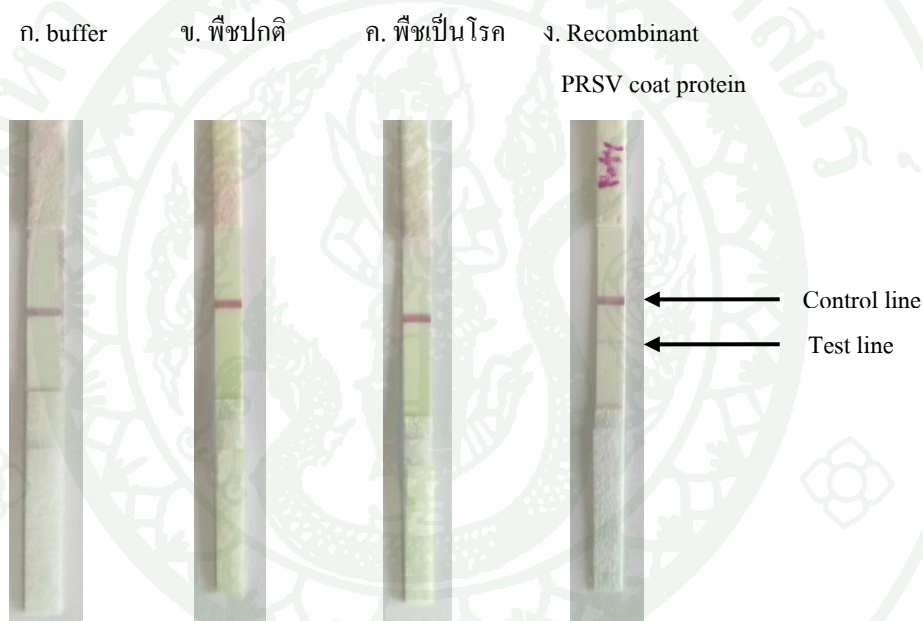


ภาพที่ 34 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนชุด LFIA เมื่อใช้ Sample buffer ชนิดต่าง ๆ

- ก) DOA extraction buffer 2 pH 8.5
- ข) DOA extraction buffer 2 pH 9.0
- ค) DOA extraction buffer 2 pH 9.5,
- ง) PBS pH 7.4,
- จ) 1x PBS+0.05% Tween 20+ 0.01% SDS pH 7.4
- ฉ) 10 mM phosphate buffer pH 7.4
- ช) 10 mM phosphate buffer pH 7.4 + 0.05% Tween 20
- ฌ) Carbonate coating buffer pH 9.6,
- ฉ) Agdia extraction buffer pH 7. 4,
- ญ) Extraction buffer DIBA pH 8.4

8.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ LFIA

ผลการตรวจสอบเปรียบเทียบกับวิธี Indirect ELISA และ DIBA พบว่า ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมาไม่สามารถตรวจหาเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยได้ สามารถตรวจสอบ Recombinant coat protein บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 35) ดังนั้นชุดตรวจสอบนี้จึงไม่สามารถนำมาใช้สำหรับการคัดกรองตัวอย่างพืชตระกูลแตงก่อนการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป เพราะฉะนั้นการพัฒนาชุดตรวจสอบในการตรวจหาเชื้อ PRSV ในพืชตระกูลแตงควรจะพัฒนาในรูปแบบของ ชุดตรวจ ELISA kit หรือ DIBA kit



ภาพที่ 35 แสดงผลการตรวจสอบของชุดตรวจสอบ LFIA เมื่อทดสอบที่ระยะเวลา 5 นาที

ก) DOA extraction buffer 2 pH 8.5

ข) พืชปกติ

ค) พืชเป็นโรค

ง) Recombinant PRSV coat protein เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

9. เปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA

ตรวจสอบเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตงและวัชพืช ด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA ผลการตรวจสอบพบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างมะละกอ แตงโม แคนตาลูป ฟักทอง ตำลึง ฟักเขียว มะระจีนก แตงกวา สควอช ซึ่งไม่พบเชื้อ PRSV ในบวบงูและบวบหอมซึ่งผลการตรวจสอบที่สอดคล้องกันทั้ง 3 เทคนิค ผลการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ แต่สำหรับวัชพืชอีก 2 ชนิดคือ จีกาขาว และ กระทกรก เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบค่า O.D.₄₀₅ มีค่ามากกว่า 2 เท่าของพืชปกติไม่มากนัก เช่นเดียวกับผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ซึ่งเกิดสีชมพูไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชที่เป็นโรค ซึ่งในตัวอย่างจีกาขาวอาจมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสใน Genus Potyvirus ชนิดอื่นๆ ที่มีส่วนของ coat protein ที่มีส่วนคล้ายกับ coat protein ของเชื้อ PRSV และตรวจไม่พบเชื้อ PRSV ในพืชอาศัยเมื่อตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ LFIA (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความจำเพาะของ PAb-PRSV ที่ผลิตได้จาก Recombinant PRSV coat protein ต่อตัวอย่างพืชทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA

ชนิดตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ A ₄₀₅ นาโนเมตร	วิธีการตรวจสอบ		
		Indirect ELISA ¹	DIBA ²	LFIA ³
ใบมะละกอปกติ	0.103	-	-	-
ใบสควอชปกติ	0.096	-	-	-
ใบมะละกอเป็นโรค	2.854	+	+	-
ใบสควอชเป็นโรค	2.954	+	+	-
มะละกอ	2.79	+	+	-
แตงโม	2.319	+	+	-
แคนตาลูป	2.100	+	+	-
ฟักทอง	2.984	+	+	-
ตำลึง	2.732	+	+	-
ฟักเขียว	2.778	+	+	-
มะระขี้นก	2.764	+	+	-
แตงกวา	1.775	+	+	-
สควอช	2.727	+	+	-
บวบหอม	0.207	+	+	-
บวบงู	0.221	-	-	-
ขี้กาขาว	1.057	+	-/+	-
กระทกรก	0.779	+	-/+	-

หมายเหตุ ¹ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA ค่า O.D.₄₀₅ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า O.D.₄₀₅ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

² ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ผลการเกิดปฏิกิริยาให้สีชมพูเมื่อเทียบกับพืชปกติให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

ตารางที่ 13 (ต่อ)

³ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคและ LFIA ผลการเกิดปฏิกิริยาเกิดเส้นสีแดงบริเวณ Control line และ Test line ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก



สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สํารวจ เก็บตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตง และการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

การเก็บตัวอย่างมะละกอและพืชตระกูลแตงจากแปลงเกษตรกรมาปลูกเชื้อบนพืชอาศัย สควอช ฟักทอง และตำลึง ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากการปลูกเชื้อ PRSV แสดงลักษณะอาการที่ชัดเจนภายในระยะเวลา 1 เดือน พบลักษณะอาการที่เกิดขึ้นในสควอชจะรุนแรงกว่าใน ฟักทอง ส่วนในตัวอย่างตำลึงจะไม่แสดงอาการของโรคแต่ตรวจพบการติดเชื้อ PRSV จากการ สํารวจตัวอย่างจะพบเห็นการเข้าทำลายของเพลี้ยอ่อนซึ่งแมลงพาหะที่ถ่ายเชื้อ PRSV บริเวณต้น ตำลึงเป็นจำนวนมาก แต่เมื่อต้นตำลึงไม่แสดงอาการของโรคทำให้เกษตรกรไม่ทำลายต้นตำลึงซึ่ง เป็นแหล่งสะสมโรคที่สำคัญ ส่งผลเชื้อ PRSV อาศัยอยู่ในต้นตำลึงและแพร่กระจายเชื้อ PRSV สาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในต้นมะละกอ และพืชตระกูลแตง ไปยังฤดูปลูกถัดไป เพื่อ เป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ PRSV จึงควรมีการกำจัดวัชพืชเช่นตำลึงออกจากแปลงปลูก มะละกอและพืชตระกูลแตงชนิดอื่น ๆ

2. การผลิต Recombinant PRSV coat protein ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ผลิต Recombinant PRSV coat protein มากที่สุดเมื่อชักนำด้วย IPTG เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง ในอาหารเหลว 2xYT การตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนเป้าหมายในปริมาณที่ ต่ำ จึงควรศึกษาหาชนิดอาหาร ความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสม เพื่อช่วยกระตุ้นการผลิตโปรตีน เป้าหมายให้มากยิ่งขึ้น

3. การทำบริสุทธิ์ วิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความเข้มข้นของ Recombinant PRSV coat protein

พบว่า Recombinant PRSV coat protein เริ่มมีความบริสุทธิ์ในช่วงส่วนท้าย ๆ ของส่วน Buffer D จำนวน 4 fraction หลังจาก elute ด้วย Buffer E จะเห็นแถบโปรตีนเป้าหมายแถบเดียว ขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford protein assay คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ปริมาณโปรตีน

ทั้งหมด 5.6 มิลลิกรัม พบมีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น ๆ มาเล็กน้อย จึงควรหาวิธีการทำบริสุทธิ์โปรตีนให้ได้โปรตีนเป้าหมายที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด เช่น การเติม Tween 20 หรือ triton X 100 ในขั้นตอนการล้างคอลัมน์ เพื่อล้างโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่จับกับ Ni-NTA ให้หลุดออกมาในขั้นตอนการล้าง เป็นการลดการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น ๆ เพราะ Recombinant PRSV coat protein ที่มีความบริสุทธิ์ถือเป็นแอนติเจนที่ดีในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีที่มีคุณภาพ มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV

4. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลองและการตรวจสอบค่าไตเตอร์ ของแอนติซีรัม ด้วยวิธี Indirect ELISA

การผลิต PAb-PRSV โดยใช้ Recombinant PRSV coat protein เป็นแอนติเจน เจาะเลือด กระต่ายจำนวน 10 ครั้ง ได้แอนติซีรัมทั้งหมด 79 มิลลิลิตร ตรวจสอบค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบแอนติซีรัมครั้งที่ 8 ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 1:409,600 ควรมีสัตว์ทดลองอย่างน้อย 2 ชนิด ศึกษาว่าสัตว์ทดลองชนิดใดมีการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ PRSV ได้ดีกว่า หรือใช้สัตว์ทดลองชนิดเดียวกันแต่นัดกระตุ้นตรงบริเวณที่แตกต่างกัน เพื่อหาบริเวณที่สามารถฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ สัตว์ทดลองมีการผลิตแอนติบอดีที่ดี

5. การแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Blocking solution ทดสอบค่าไตเตอร์ของ IgG และ ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตง ด้วยวิธีการ Indirect ELISA, DIBA, และ TIBA

แยกสกัด IgG จากแอนติซีรัมครั้งที่ 8 จำนวน 2 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นของ IgG ได้ เท่ากับ 7.179 มิลลิกรัมต่อ เนื่องการสกัด IgG ด้วยชุดสกัด Protein A มีความจำเพาะเจาะจงต่อการ เลือกรับเฉพาะ IgG ที่อยู่ในแอนติซีรัม ทำให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของ IgG สูงกว่าการตกตะกอน IgG ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวซึ่งอาจมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่มีขนาดโปรตีนที่ใกล้เคียงกับ IgG ปนเปื้อนมาด้วย เมื่อนำแอนติบอดีมาตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอ พักทอง แตงโม ตำลึง แคนตาลูป บวบเหลี่ยม พักเปียว มะระจีนก สควอช ตามลำดับ และตรวจไม่ พบเชื้อ PRSV ในบวบงู และบวบหอม เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และ DIBA ให้ผลการ ตรวจสอบที่ชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ สามารถตรวจเชื้อ PRSV ได้ที่ค่าความเจือจางน้ำ คั้นพักทองเป็นโรคสูงสุด 1:10,240 พบการแพร่กระจายของเชื้อบริเวณส่วน ดอก ก้านดอก ใบยอด

ก้านใบ ลำต้นบริเวณข้อตา 1-5 ลำต้นส่วนเหนือพื้นดิน และราก เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TIBA ตรวจไม่พบเชื้อ PRSV จากเมล็ดต้นตำลึงที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ แสดงว่าเชื้อ PRSV ไม่สามารถถ่ายโรคผ่านทางเมล็ดในพืชตระกูลแตง

6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตจาก Recombinant PRSV coat protein กับแอนติบอดีทางการค้าต่อเชื้อ PRSV ในมะละกอและพืชตระกูลแตงที่สำรวจ

PAb ที่ผลิตขึ้นจากการใช้ Recombinant PRSV coat protein เป็นแอนติเจน แอนติบอดีที่ได้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ PRSV เทียบเท่ากับแอนติบอดีทางการค้า จากการสำรวจตัวอย่างในแปลงเกษตรกรทั้งหมด 560 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ PRSV ในตัวอย่างจำนวน 265 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 47.32 พบตัวอย่างแตงโมมีการแพร่กระจายของเชื้อ PRSV ทั้งในตัวอย่างใบและผล มากกว่าพืชอาศัยชนิดอื่น อัตราส่วนค่า S/N ratio เท่ากับ 1.96 คิดเป็นร้อยละ 19.24 ของตัวอย่างพืชที่ตรวจพบเชื้อ PRSV ทั้งหมด และยังคงตรวจพบตัวอย่างแตงโมมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ลักษณะของอาการที่เกิดจากการการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส พบว่า อาการที่เกิดขึ้นโดยมากลักษณะอาการที่เกิดบริเวณผลเกิดจากเข้าทำลายของแมลงพาหะที่ถ่ายทอดเชื้อไวรัส การป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสควรมุ่งเน้นการป้องกันการเข้าทำลายของแมลงพาหะที่เป็นตัวการสำคัญในการถ่ายทอดโรค

7. การผลิตชุดตรวจ PRSV (LFIA) และการตรวจสอบประสิทธิภาพในพืชตระกูลแตง

Colloidal gold ที่เตรียมได้มีลักษณะของสีม่วงแดง เมื่อนำ Colloidal gold วัดค่า O.D.₅₂₀ เท่ากับ 0.386 เมื่อหาอัตราส่วนของ Colloidal gold และ ปริมาณ IgG ของ PAb-PRSV ได้อัตราส่วนของความเข้มข้น IgG ของ PAb-PRSV ที่ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรค่า O.D.₅₂₀ เท่ากับ 0.434 เมื่อเชื่อมต่อ Gold conjugated IgG วัดค่า O.D.₅₃₀ เท่ากับ 3 ตรวจวิเคราะห์ขนาดของ Colloidal gold ก่อนและหลังติดฉลากด้วย IgG ของ PAb-PRSV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 28.5±9.75 และ 45±5 นาโนเมตร ในโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 99 เป็นเมมเบรนที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาพัฒนาชุดตรวจสอบ เพราะมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม ลักษณะเส้นของการเกิดปฏิกิริยาคมชัด

ชนิดและความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาบริเวณคือ GAR ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณเส้น Test line คือ MAb-Potyvirus ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Colloidal gold conjugated IgG ใช้ IgG ของ PAb-PRSV เชื่อมต่อกับ Colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร ของยี่ห้อ แปะซิฟิคประเทศไทย ปริมาณที่พ่นลงบนแผ่น Conjugate pad ที่เหมาะสมคือ 3 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ปล่อยให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการประกอบชุดตรวจสอบบนแผ่น Plastic backing polyester ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตรวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนลงในช่องสำหรับวางแผ่นเมมเบรน ลงในช่องล่างที่ถัดจากช่องที่วาง เมมเบรน แล้วจึงวางแผ่นใยแก้วที่รองซับตัวอย่าง Sample pad ลงซ้อนแยกแผ่นประมาณ 1 มิลลิเมตร และวางแผ่น Absorbion pad เพื่อดูดซับของเหลวไว้ด้านบนของแผ่นพลาสติก ตัดให้มีขนาด 0.5x6 เซนติเมตร

8. การผลิตชุดตรวจ PRSV (LFIA) และหาชนิดของ Sample buffer ที่เหมาะสมในการบดตัวอย่างพืชเพื่อใช้ทดสอบชุดตรวจ PRSV ในพืชตระกูลแตง

เมื่อทดสอบชุดตรวจสอบโดยใช้ Recombinant PRSV coat protein บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนทดสอบ ชุดตรวจสอบสามารถตรวจสอบ Recombinant PRSV coat protein ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 3 นาทีหลังจากหยดแอนติเจนลงบนบริเวณ Sample pad

เมื่อนำชุดตรวจสอบมาตรวจสอบเชื้อ PRSV โดยใช้ DOA extraction buffer 2 pH 8.5 มาบดตัวอย่างพืชซึ่งเป็นชนิดบัพเฟอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ อัตราการไหลของน้ำคั้นพืชจาก Sample pad จนถึงสูงสุดปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 3 นาที DOA extraction buffer 2 pH 8.5 จึงเป็นบัพเฟอร์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการบดตัวอย่าง

9. เปรียบเทียบผลการตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA, DIBA และ LFIA

ชุดตรวจสอบ LFIA ที่ได้พัฒนาขึ้นมา ยังไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ PRSV เหมือนเช่นเทคนิค Indirect ELISA, DIBA อาจเกิดจากข้อจำกัดของเวลาที่ต้องมีความไวในการตรวจจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี หรือความจำเพาะเจาะจงของอิมูโนโอบีโตนยังไม่เหมาะสม จะต้องใช้แอนติบอดีที่มีความสามารถในการตรวจจับเชื้อ PRSV โดยใช้ PAb ผลผลิตจากกระต่ายคู่กับ PAb ที่

ผลิตจากไก่ หรือหาลู่เหมาะสมระหว่าง PAb และ MAb ที่สามารถจับตรงตำแหน่งอีพิโทปที่แตกต่างกับ หรืออาจจะใช้ไวรัสบริสุทธิ์มาใช้ผลิต PAb ตำแหน่งของอีพิโทปที่มากและมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้ Recombinant PRSV coat protein เป็นแอนติเจน นอกจากนี้ปัจจัยของแอนติบอดีที่มีผลต่อการพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค LFIA ชนิดและขนาดของอนุภาคของ Colloidal gold แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ขนาดช่องว่างบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนจะขึ้นอยู่กับลักษณะและขนาดของอนุภาคของแอนติเจน ชนิดของ Extraction buffer ที่เหมาะสมสำหรับการבודตัวอย่างพืชแต่ละชนิด

ชุดตรวจสอบที่ควรมีพัฒนาขึ้นควรพัฒนาในรูปแบบ ELISA kit หรือ DIBA kit โดยการพัฒนา Recombinant PRSV coat protein เป็นโปรตีนมาตรฐานในการตรวจสอบ ซึ่งชุด ELISA kit หรือ DIBA kit ซึ่งอาศัยช่วงเวลาในการตรวจสอบ 3-4 ชั่วโมง แต่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ผู้ใช้ต้องได้รับการฝึกฝนให้เกิดทักษะความชำนาญกว่าการตรวจสอบด้วยชุด LFIA แต่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่า LFIA (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจสอบ ELISA, DIBA และ LFIA

ELISA kit	DIBA kit	LFIA
1. ใช้เวลาในการตรวจสอบ 4-5 ชั่วโมง	1. ใช้เวลาในการตรวจสอบ 3-4 ชั่วโมง	1. ใช้เวลาในการตรวจสอบ เพียง 3-5 นาที
2. วิธีการตรวจสอบประกอบด้วย 2.1 การบดตัวอย่างด้วย Extraction buffer	2. วิธีการตรวจสอบประกอบด้วย 2.1 การบดตัวอย่างด้วย Extraction buffer	2. วิธีการตรวจสอบ สะดวกง่าย เพียง 2 ขั้นตอนง่าย ๆ 2.1 การบดตัวอย่างด้วย Extraction buffer ในถุงพลาสติก
2.2 หยอดตัวอย่างใน micro plate ELISA บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	2.2 หยดตัวอย่างบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แช่ใน Blocking solution นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	2.2 นำชุด LFIA มุมในถุงบดตัวอย่าง
2.3 การเติม Blocking solution บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	2.3 แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน IgG นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	3. สามารถตรวจสอบได้ 1 ตัวอย่าง ต่อ ชุด ต้นทุนในการตรวจสอบต่อหน่วยค่อนข้างสูง
2.4 การเติม IgG บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	2.4 แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน GAR-conjugate บ่มนาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง	4. อ่านผลการตรวจสอบด้วยระดับสายตา
2.5 การเติม GAR-conjugate บ่มนาน 1 ชั่วโมง	2.5 การเติม substrate อ่านผล 5-15 นาที	5. ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องอาศัยทักษะวิธีการตรวจสอบง่าย
2.6 การเติม substrate อ่านผล 15-30 นาที	3. ต้นทุนในการตรวจสอบขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง เหมาะกับการตรวจสอบตัวอย่างครั้งละมาก	6. เหมาะกับการนำไปตรวจคัดกรองตัวอย่างในภาคสนาม
3. ต้นทุนในการตรวจสอบขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง เหมาะกับการตรวจสอบตัวอย่างครั้งละมาก	4. อ่านผลการตรวจสอบด้วยระดับสายตา	
4. อ่านผลการตรวจสอบชัดเจนค่าที่ได้แสดงผลเป็นตัวเลข	5. ผู้ใช้ต้องมีฝึกทักษะในการปฏิบัติ	
5. ผู้ใช้ต้องมีฝึกทักษะในการปฏิบัติ	6. เหมาะกับการนำไปตรวจคัดกรองตัวอย่างในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม	
6. เหมาะกับการนำไปตรวจคัดกรองตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ		

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2556. **พืชผักเศรษฐกิจของไทย**. แหล่งที่มา:

http://www.doa.go.th/th/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=99&Itemid=81, 20 ตุลาคม 2556.

กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร, สุรภี กิริติยะอังกูร และ เขียวภา ต้นติวานิช. 2549. GLIFT Kit เพื่อทำการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง. **ว. วิชาการเกษตร 24 (2): 168-177.**

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร. 2556. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้าปี 2551-2555**. แหล่งที่มา:

<http://www.oae.go.th/download/FactorOfProduct/ValueExportSeed47-52.html>, 10 มีนาคม 2556.

เครือข่ายพันธุ์ กิตติปกรณ์. 2535. การแพร่กระจายไวรัสพืชตระกูลแตงในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2535 กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองวิจัยโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

ถวิล ศรีสมชัย. 2518. การศึกษาโรคใบด่างวงแหวนมะละกอ. รายงานประจำปี สำนักงานการเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ท่าพระ ขอนแก่น. ขอนแก่น.

นุชนาด วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, อัญญา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย โฆสิตรัตน์ และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ, น. 539-546. ใน รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 41. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัชณี องประยูร. 2545. **บทปฏิบัติการทางเขตร่วมวิทยาทางด้านโรคพืช**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

วิษชุดา รัตนากาญจน์, รัศมี ลูติเกียรติพงษ์ และ วันพร เข็มมุกด์. 2554. การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสใบหงิกของข้าวด้วย immunochromatographic assay, น. 291-300. ใน การประชุมวิชาการข้าว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ,

วิชัย ไชยรัตน์, นิพนธ์ ทวีชัย, อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ และ ชีระ สุตะบุตร. 2533. คำถึงพืชอาศัยตามธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ, น. 383-391. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิไล ปราสาทศรี, อาทิตย์ ฟุ้งเกียรติไพบุลย์ และ เกษม ชมพูนุชประภา. 2525. การศึกษาเบื้องต้นใบด่างมะละกอในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานการเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ขอนแก่น.

สุรภี กิรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา. 2526. โรคใบจุดวงแหวนมะละกอในประเทศไทย. สาขาวิชาวิทยา, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และ กิตติศักดิ์ กิรติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้. ว. โรคพืช 18 (1-2): 1-14.

Agarwal, S., M. K. Reddy and R. K. Jain. 2009. Production of polyclonal antibodies using recombinant coat protein of *Papaya ringspot virus* and their use in immunodiagnosis. **Plant Biochem. Biot.** 18: 109-111.

Alma G. L., V.A. Maria and E. T. Ioannis. 2012. High incidence of seed transmission of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus*, two viruses newly identified in *Robinia pseudoacacia*. **J Plant Pathol.** 134: 227-230.

Attasart, P. 2003. **Genome characterization and construction of Papaya ringspot virus type W (PRSV-W) infectious transcript.** Ph.D. Thesis, Mahidol University.

- Baker, C. A., H. Lecoq and D. E. Purcifull. 1991. Serology and biological variability among papaya ringspot virus type-W isolates in Florida. **Phytopathology** 81: 722-728.
- Bayot, R. G., V. N. Villegas, P. M. Magdalita, M. D. Jovellana, T. M., Espino, and S. B. Exconde. (1990). Seed transmissibility of *Papaya ringspot virus*. **Philippine Journal of Crop Science**. 15: 107-111.
- Bazan, J. E. and R. J. Fletterick. 1988. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 85: 7872-7876.
- Borque, L., Olivan, V. and F. Iguaz. 1995. Development and validation of an automated particle-enhanced nephelometric immunoassay method for the measurement of human plasma C1Q. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 9: 302-307.
- Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson. 1996. **Viruses of plants: Description and list from the VIDE database**. Wallingford, Oxon: CAB International.
- Buddhirakkul, N., K. Balachandra, P. Pumthong, S. Chaelermtaranukul and P. Sawanpanyalert. 2004. Development of a simple strip test for the detection of Hepatitis B surface antigen. **Thai J. Health Res** 18 (1): 40-47.
- Blua, M. J. & Perring, T. M. 1989. Effect of zucchini yellow mosaic virus on development and yield of cantaloupe (*Cucumis melo*). **Plant Dis.** 73: 317-320.
- Carrington, J.C., S.M. Cary, T.D. Parks and W.G. Dougherty. 1989. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. **EMBO J.** 8: 365-370.

- Chatchen, S., M. Juricek, P. Rueda and S. Kertbundit. 2006. Papaya Ringspot Virus Coat Protein Gene for Antigen Presentation in *Escherchia coli*. **Biochem. Mol. Biol.** 39:16-21.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol** 34: 475-483.
- Cytodiagnosics Inc. 20013. **Lateral Flow Immunoassays**. Available Source <http://www.cytodiagnosics.com/lateral-flow-immunoassays.php>, November 10, 2013.
- Dougherty, W. G. and J. C. Carrington. 1998. Expression and function of potyviral gene product. **Ann. Rev. Phytopathol** 26: 123-143.
- Drygin, Y. F., A. N. Blintsov, V. G. Grigorenko, I. P. Andreeva, A. P. Osipov, Y. A. Varitzev, A. I. Uskov, D. V. Kravchenko and J. G. Atabekov. 2011. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection. **Appl. Microbiol. Biot.** 93 (1): 179-189.
- Fristch, E. F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Garland, D. L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophyline with the Abbott TDX and high pressure liquid chromatography methods. **Clin. Chem.** 32: 1104.
- Hampton, R., E. Ball and S. D. Boer. 1990. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens**. APS Press, Minnesota, U.S.A.

- Hochleitner, K. and H. Kraus. 2002. Rapid assay formats, components and materials. pp. 10-45.
In Awiruttakarn C., ed. **Introductory workshop on rapid diagnostic tests.**
Biogenomed co.ltd., Bangkok.
- Holling, M. and A. A. Brunt. 1981. Potyviruses, pp. 732-807. In **E. Kourstak (ed.).**
Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/
North-Holland Biomediated Press, Amsterdam.
- Hsu, H.T. and R.H. Lawson. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt
virus in *Impatiens*. *Plant Disease* 75: 292–295.
- Jensen, D. D. 1949. Papaya virus disease with special reference to papaya ringspot.
Phytopathol. 39: 191-211.
- Karl, E. and K. Schmelzer. 1971. Investigations on the transmission of watermelon mosaic
viruses by aphids. **Arch. Pflschut. Z.** 7: 3-11.
- Kumar, R. and R. P. Sinha. 2011. Colloidal gold based dipstick strip for detection of genetically
modified crops and produce. **Int. J. of Pharma and Bio Sci.** 2: 110-121.
- Komuro, Y., H. Tochiara, R. Fukatsu, Y. Nagai and S. Yoneyama. 1968. Cucumber
green mottle mosaic virus on watermelon in Chiba and Ibaraki Prefectures (in Japanese).
Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 34: 377.
- Lecoq, H., M. Pitrat, and M. Clement. 1981. **Agronomie** 1:827
- Lecoq, H., G. Dafalla and C. Desbbiez. 2001. Biological and molecular
characterization of *Moroccan watermelon mosaic virus* and a potyvirus isolate
from eastern Sudan. **Plant Dis.** 85: 547-552.

- Lee, J. A., S. K. Choi, J. Y. Yoon, J. S. Hong, K. H. Ryu, S. Y. Lee and J. K. Choi. 2007. Variation in pathogenicity of lily isolates of *Cucumber mosaic virus*. **Plant Pathol. J.** 23: 251-259.
- Mao, X., Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, I. Zeng and G. Lui. 2009. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. **Anal. Chem** 81: 1660-1668.
- Martin, S., D. Alioto., R. G. Milne, J. Guerri and P. Moreno. 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field tree by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. **Plant Pathol.** 51: 134-141.
- Milne, R.G. 1991. Immunoelectron microscopy for virus identification. **Electron microscopy of plant pathogens** 87–120. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Oliveira, V.B., J.A.A. Lima, C.C. Vale, W.O. Paiva. (2000). Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira.** 25(4): 628-636.
- Paek, S.H., S.H. Lee, J.H. Cho and Y.S. Kim. 2000. Development of rapid one step immunochromatographic assay. **Method.** 22: 53-60
- Posthuma-Trunpie, G. A., J. Korf and A. V. Amerongen. 2009. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal. Bioanal. Chem.** 393: 569-582.
- Purcifull, D. E., E. Hiebert, M. Petersen, S. Webb. (2001). Virus detection – Serology. **Encyclopedia of Plant Pathology** Vol. 2: 1100–1109.

- Purcifull, D. E., J. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves. 1984. Papaya ringspot virus. **CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.** 292: 8.
- Restrepo-Hartwig, W. A. and J. C. Carrington. 1992. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. **J. Virol.** 66: 5662-5666
- Riechmann, J. L. , S. Lain and J. A. Garcia. 1992. Inhibition and prospects of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.** 73: 1-16.
- Rodriguez-Cerezo, E. and J. G. Shaw. 1991. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus infected cells. **J. Virol.** 185: 572-579.
- Ronald, A. and W. H. Stimson. 1998. The evolution of immunoassay technology. **Parasitology.** 117: 13-27.
- Sambrook J. and W.R. David. 2001. **Molecular cloning: A laboratory manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Screenivasula, M. and D. V. R. Sai Gopal. 2010. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR and comparison of its sensitivity with other immunoassays for the detection of *Papaya ringspot virus* isolates from india. **Plant Pathol. J.** 26: 25-31.
- Shahabuddin, M., J. G. Shaw and R. E. Rhoads. 1988. Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. **Virol.** 163: 635-637.
- Shukla, D. D. and C. W. Ward. 1988. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Avd Virus Res.** 36: 273-314.

- Shukla, D. D., C. W. Ward and A. A. Brunt. 1994. **The potyviridae**. CAB international, Ilingford.
- Smits, H. L., C. K. Eapen, S. Sugathan, M. Kuriakose, M. H. Gasem, C. Yersin, D. Sasaki, B. Pujianto, M. Vestering, T. H. Abdoel and C. G. George. 2001. Lateral-Flow Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 8 (1):166-171.
- Stimson, W. and J. M. Sinclair. 1974. An immunoassay for a pregnancy associated amacroglobulin using antibody enzyme conjugates. **FEBS Letters**. 47: 190-192.
- Thonmo, Y. and P. Thummabenjapone. 2008. Virus Diseases in Cucurbit Seed Production Fields in Northeast Thailand . **KKU Agricultural Sciences Seminar**.
- Tsua, S., M. K. Iwaki, K. Hanada, Y. Kouda, M. Hikata and K. Tomaru. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA). **Plant Disease**. 76: 466-469.
- Van Weeman, B.K. and A.H.W.M. Schuurs. 1971. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. **FEBS Letters**. 15: 232-235.
- Verchot, J., E. V. Koonin and J.C. Carrington. 1991. The 35 KDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein function as a third virus-encoded proteinase. **Virology**. 185: 527-535.
- Voller, A.A., A. Bartlett, D.E. Bidwell, M.F. Clark, A.N. Adams, 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **J. Gen Virol**. 33: 165-167.
- Ward, C. W. and D. D. Shukla. 1991. Taxonomy of potyviruses; current problems and some solution. **Intervirolgy**. 32: 269–296.

- Weeman, B. K. V. and A. H. W. M. Schuurs. 1971. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. **FEBS Letters**. 15: 232-235.
- Xiang, T., Z. Jiang, Z. Jain, C. lo, H. Tsou, G. Ren, J. Zhang, A. Huang and G. Q. Lai. 2012. A novel double antibody sandwich-lateral flow immunoassay for the rapid and simple detection of hepatitis C virus. **Inter. J. of Mol. Medicine**. 30: 1041-1047
- Xu, C. L., H. T. Wang, C. F. Peng, Z. Y. Jin and L. Q. Liu. 2006. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. **Biomed Chromatogr**. 20: 1390–1394.
- Yallow, R. S. and S. A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Natur**. 184: 1648-1649.
- Yeh, S. D., D. Gonsalves and R. Provvidenti, 1984. Comparative studies on host range and serology of papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. **Phytopathology**. 74:1081-1085.
- Yeh, S. D., F. J. Jan, C. H. Chiang, T. J. Doong, M. C. Chen, P. H. Chung and H. J. Bau. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. **J. Gen. Virol**. 73: 2531-2541.
- Yu, M. H, M.J. Frenkel, N.M. Mckern, D.D. Shukla, P.M. Strike, and C.M Ward. 1989. Coat protein of potyviruses 6 . Amino acid sequences suggest watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N are strains of the same potyvirus. **Arch. Virol**. 105:55.



ภาคผนวก

สารเคมีในการสกัดพลาสมิด

Solution I

50 mM glucose
25 mM Tris-HCl, pH 8.0
10 mM EDTA, pH 8.0

Solution II

0.2 N NaOH
1% SDS

Solution III

3 M Potassium acetate
0.2 M Glacial acetic acid

สารเคมีในการทำริบูทธีโปรตีน

Buffer B

NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม
Tris base	1.2	กรัม
Urea	480.5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

Buffer C

NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม
Tris base	1.2	กรัม
Urea	480.5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.3 ด้วย HCL และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

Buffer D

NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม
Tris base	1.2	กรัม
Urea	480.5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.9 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

Buffer E

NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม
Tris base	1.2	กรัม
Urea	480.5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

อาหาร 2xYT

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	16	กรัม
NaCl	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และนำไป autoclave ที่ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล SDS-PAGE

2x sample buffer

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

10x Tris-glycine electrophoresis buffer, pH 8.3

Tris-base	30	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

Staining solution

Coomassie-blue R-250	0.25	กรัม
Methanol	45	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร
กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman #1) เก็บในขวดทึบแสง		

Destain solution

Methanol	250	มิลลิลิตร
Acetic acid	70	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร		

Separating gel

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

6% Stacking gel

น้ำกลั่น	3.4	มิลลิลิตร
30% Acrylamide solution	0.83	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	0.65	มิลลิลิตร
10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร		

การเตรียมบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในเทคนิคทาง Indirect ELISA, DIBA และ TIBA

Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.4

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

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Tris buffer saline (TBS), pH 7.4

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

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

TBST

TBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

Carbonate coating buffer; pH 9.6

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

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

Blocking solution สำหรับ Indirect ELISA

PBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	2	กรัม

Blocking buffer สำหรับ DIBA และ TIBA

TBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	2	กรัม

Washing buffer (PBST)

PBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

Substrate buffer, pH 9.8

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

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

การเตรียมบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในเทคนิค LFIA**DOA Extraction buffer 2**

Na ₂ BO ₃	38.1	กรัม
Triton X 100	10	มิลลิลิตร

PVP	10	กรัม
SDS	3	กรัม
NaSO ₃	4	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 8.5, 9.0 และ 9.5 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

General extract buffer (Agdia)

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

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

Extraction buffer (BIOREBA)

Tris-(hydroxymethyl)aminomethane	2.40	กรัม
NaCl	8.00	กรัม
PVP (MW 24000)	20.0	กรัม
Tween 20	0.50	กรัม
KCl	0.20	กรัม
NaN ₃	0.20	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุกัญญา หนูชู
เกิดวันที่	23 พฤศจิกายน 2529
สถานที่เกิด	อำเภอศรีนครินทร์ จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรกลวิธาน) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน
ตำแหน่งปัจจุบัน	นักวิชาการเกษตร
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานทางวิชาการ	รางวัลอันดับ 3 การนำเสนอผลงานเรื่อง การผลิตแอนติบอดีเพื่อ ตรวจสอบไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอในตำลึง ในการเสนอการ ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 บทความตีพิมพ์เผยแพร่ในวิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ ปี ที่ 49 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2558 เรื่อง Production of Polyclonal Antibodies for Detection of <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) in ivy gourd (<i>Coccinia grandis</i> (L.))