ภาคผนวก

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับการทำ ELISA

(Enzyme-linked immunosorbent assay) (โสภณ, 2536)

---

1. Carbonate Coating Buffer pH 9.6

ละลาย Na_2CO_3 1.59 กรัม และ $NaHCO_3$ 2.93 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสม NaN_3 0.2 กรัม จะได้ 0.05 M Sodium carbonate buffer pH 9.6

2. Phosphate Buffer Saline Tween (PBS-T) pH 7.4

ผสม NaCl 8.0 กรัม KH_2PO_4 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 2.9 กรัม, KCl 0.2 กรัม และ NaN_3 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้ PBS จากนั้นเติม Tween 20 ปริมาณ 0.5 มล. คนให้เข้ากันจะได้ PBS-T

3. Conjugate Buffer

ผสม Polyvinyl pyrrolidone 40 T (PVP) และ ovalbumin (egg albumin) ลงใน PBS-T ให้ได้ความเข้มข้นอย่างละ 0.2%

4. Substrate Buffer pH 9.8

ละลาย Diethanolamine ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10% (v/v) ปรับ pH ด้วยกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น จนได้ pH 9.8 จากนั้นเติม NaN_3 ให้ได้ความเข้มข้น 0.02%

Buffer ที่เตรียมเสร็จแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

วิธีการทดสอบการตรวจหาแอนติเจน โดยวิธี DAC-indirect ELISA (โสภณ, 2536)

---

1. บดชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการตรวจสอบใน carbonate coating buffer อัตราตามที่กำหนดในวิธีการทดลอง โดยใช้ใกร่งบด ถ่ายน้ำคั้นลงไว้ในหลอดทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในตู้เย็น เศษพืชจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

2. เตรียมตัวอย่างใบพืชปกติเพื่อใช้เป็น negative control และเตรียมตัวอย่างที่ทราบแล้วว่ามีเชื้อ PBNV เพื่อเป็น positive control ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างตรวจสอบ

3. ใช้ไมโครไปเปตดูดเอาน้ำคั้นตัวอย่างละ 100 ul ใส่ลงในแต่ละหลุมของจานทดสอบ (microtitre plate) โดยมี negative และ positive control อย่างน้อย plate ละ 2 หลุม

4. บ่มจานทดสอบในกล่องชื้น (กล่องพลาสติกใส่กระดาษชื้น) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง หรืออาจใส่ตู้เย็นค้างไว้ 1 คืน

5. เทน้ำคั้นที่บ่มไว้ทิ้ง จากนั้นล้างหลุมให้สะอาดด้วย PBS-T 3 ครั้ง โดยแช่ไว้ 3-5 นาทีต่อครั้ง (รวม 10-15 นาที)

6. บดใบถั่วลิสงใน conjugate buffer อัตรา 1:50 (w/v) กรองเอาเฉพาะน้ำคั้นมาผสมกับ anti-PBNV ในอัตรา 1:2,000 (v/v) ตั้งทิ้งไว้ 20-40 นาที จากนั้นนำไปหยอดในหลุมที่ผ่านการล้างแล้วหลุมละ 100 ul (เท่ากับปริมาณที่หยอดน้ำคั้น)

7. บ่มไว้ในกล่องชื้นนาน 1 ชั่วโมง ที่ 37°C

8. ล้างเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 5

9. เตรียม anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate อัตรา 1:40,000 (v/v) ใน conjugate buffer นำไปหยอดในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ul

10. บ่มไว้ในกล่องชื้นนาน 1 ชั่วโมง ที่ 37°C

11. ล้างเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 5

12. เตรียม 0.5% p-nitrophenylphosphate ใน substrate buffer เท่าที่ต้องการใช้ นำมาหยอดลงในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ul จากนั้นนำไปบ่มไว้ในกล่องชื้นในที่มืดที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 45-60 นาที นำออกมาตรวจปฏิกิริยา

13. เมื่อมีสีเหลืองปรากฏขึ้นบนหลุม positive control จนเห็นชัดด้วยตาเปล่า แล้วให้หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M KOH อัตรา 25/100 ul จากนั้นนำจาน ELISA ไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 nm (ใช้แว่นกรองเบอร์ 405) ค่า A_{405} ที่สูงกว่าค่า A_{405} ของน้ำคั้นใบพืชปกติ 2 เท่าขึ้นไป ถือว่าให้ปฏิกิริยาบวก