GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง

GLIFT Kit for Detecting of Potato Virus Y in Potato

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร [1] สุรภี กีรติยะอังกูร [2] เยาวภา ตันติวานิช [2]

Kittisak Kiratiya-angul [1] Surapee Kiratiya-angul [2] Yaowapa Tantiwanich [2]

ABSTRACT

Gold labeling IgG flow test (GLIFT) was developed to be the tool for detecting potato virus Y (PVY) in potato. The excellent property of PVY-GLIFT kit are accuracy, easy, convenient and rapid detecting for diagnostic and screening of potato virus free seed production in 5 minutes which is faster than ELISA test that has taken 4-5 hours. It was developed by the combination of the two technologies namely serology and lateral flow technique. The concentration of 1 mg per ml of protein in IgG from PVY which was immunized in rabbit was conjugated with colloidal gold. The gold particles are stable, easy to conjugate with IgG and very clear in reaction of red colour at test line and control line. The optimum amount of gold labeling IgG of PVY in the reaction is about 2 μl/cm which shows the better reaction than using 1.0 and 1.5 μl/cm. The appropriate amount of IgG of PVY for preparing test line is 1.5 μl/cm. Goat anti-rabbit gave the strong red colour on control line the same as goat anti-mouse. The GLIFT kit is a commercial cheap tool which is convenient to carry out for detecting PVY in the potato field more than NCM-ELISA technique.

Key words: GLIFT kit, PVY, potato

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold labeling IgG flow test (GLIFT) มาปรับใช้เพื่อตรวจเชื้อ Potato virus

[1/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900
Senior Expert Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900
Plant Disease Research Group, Crop Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวกและอ่านผลได้รวดเร็วภายใน 5 นาที เร็วกว่าวิธี ELISA ที่ใช้เวลามากกว่า 4-5 ชม. GLIFT kit ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยการเลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVY ที่มีความเข้มข้นในปริมาณ 1 mg/ml ให้สีของปฏิกิริยาที่ test line แดงเข้มชัดเจน เมื่อใช้ gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl/cm มีความเหมาะสมดีกว่าปริมาณ 1.0 และ 1.5 μl/cm สำหรับการใช้ IgG ของ PVY ในปริมาณ 1.5 μl /cm ทำ test line ให้ผลของปฏิกิริยาดี สามารถใช้ goat-anti rabbit IgG ทำ control line แทน goat anti mouse IgG เมื่อประกอบ GLIFT เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป บรรจุลงในตลับพลาสติกพร้อมใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ PVY ในมันฝรั่งนอกห้องปฏิบัติการได้อย่างสะดวกรวดเร็วกว่าวิธี NCM-ELISA

คำหลัก: ไวรัส มันฝรั่ง GLIFT kit

คำนำ

มันฝรั่งเป็นพืชที่มีโรคไวรัสหลายชนิดเข้าทำลายได้ เช่น Potato leafroll virus, Potato virus Y, Potato virus A, Potato virus X, Potato virus M, Potato vitus S, Potato virus T, Andean potato mottle virus, Cucumber mosaic virus,Tobacco mosaic virus, Potato mop-top virus, Tobacco rattle virus เป็นต้น (Hooker, 1981) สำหรับประเทศไทยเชื้อไวรัสที่มีการระบาดและถูกตรวจพบมากที่สุด คือ Potato virus Y (PVY) (กิตติ ศักดิ์, 2536) เชื้อ PVY มีอนุภาคเป็นท่อนยาวคดขนาด 750 nm (Figure 1) มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนและ ssRNA จัดอยู่ใน Order Potyviridae, Genus *Potyvirus* เชื้อ PVYมีหลาย strain ได้แก่ PVYo ทำให้ต้นมันฝรั่งมีอาการใบด่างและต้นแคระแกร็นชนิดไม่รุนแรง (Figure 2) และ PVYn ทำให้ต้นมันฝรั่งมีอาการใบด่างค่อนข้างรุนแรงบางครั้งมีอาการใบไหม้เป็นสีน้ำตาลตามบริวณเส้นใบ มีผลกระทบกับผลผลิตของมันฝรั่งในหลายประเทศ โรคใบด่างนี้แพร่ระบาดได้มาก เพราะมีแมลงพวกเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ เช่น *Aphis gossypii* Glove (Figure 3) ในประเทศนิวซีแลนด์ผลผลิตลดลงตั้งแต่ 10-80% (Fletcher, 2000) กิตติศักดิ์ (2536) ได้รายงานความเสียหายที่เกิดจากเชื้อไวรัส PVY และ PVX ประมาณ 10-20% จากการปลูกเชื้อในแปลงปลูกในโรงกันแมลง การนำหัวพันธุ์ที่ติดเชื้อ PVY ในอัตราที่สูงมาปลูกเป็นฤดูที่สองทำความเสียหายให้กับผลผลิตมันฝรั่ง 40-60% จึงเกิดความเสียหายในอัตราสูง 10-80% ขึ้นกับช่วงเวลาที่ต้นมันฝรั่งได้รับเชื้อ ถ้าเชื้อไวรัสติดไปกับหัวพันธุ์ ย่อมทำความเสียหายให้มากกว่าการได้รับเชื้อในช่วงหลังของการลงหัวแล้ว โดยทั่วๆไป ในแปลงปลูกมันฝรั่งที่ใช้หัวพันธุ์ปลอดโรค ความเสียหายจากการติดเชื้อในแปลงในฤดูแรกจะอยู่ในอัตราต่ำ ดังนั้นจึงควรใช้หัวพันธุ์ปลอดเชื้อ PVY ในการปลูก สำหรับการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศ กรมวิชาการเกษตรได้

วางข้อกำหนดยอมให้มีการติดเชื้อ PVY เข้ามาได้ไม่เกิน 4% ตามมาตรฐานของ FAO

ปัจจุบันประเทศไทยสั่งหัวพันธุ์มันฝรั่งเข้ามาปลูกมากกว่าปีละ 8,000-15,000 ตัน โดยเฉพาะปี พ.ศ. 2547 มีปริมาณการนำเข้า 16,810 ตัน คิดเป็นมูลค่า 419.12 ล้านบาท (นิรนาม, 2547) โดยนำเข้าจากหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย สก๊อตแลนด์ สหรัฐอเมริกา ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราของประเทศออกไปจำนวนมาก กรมวิชาการเกษตรจึงสร้างเทคโนโลยีการผลิตหัวพันธุ์ใช้เองภายในประเทศ เพื่อทดแทนการนำเข้าในบางส่วน และในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งคุณภาพและปลอดโรคนั้น สิ่งที่สำคัญคือการตรวจสอบ เพื่อคัดเลือกหัวพันธุ์ที่ปลอดโรคไวรัสก่อนการขยายพันธุ์ ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ผ่านมาโครงการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรคไวรัสของกรมวิชาการเกษตรได้ใช้ชุดตรวจสอบ NCM-ELISA (Nitrocellulose membrane - enzyme linked immunosorbent assay) ที่ผลิตขึ้นใช้เองในประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 จนถึงปัจจุบัน ซึ่งวิธีการตรวจสอบแบบ NCM-ELISA มี 5 ขั้นตอน ใช้เวลาประมาณ 5 ชั่วโมง ผู้ตรวจต้องมีทักษะและประสบการณ์พอควร ซึ่งเป็นข้อยุ่งยากสำหรับผู้ตรวจบางคน ทำให้การใช้ NCM-ELISA kit อยู่ในวงจำกัด (กิตติศักดิ์และคณะ, 2532; กิตติศักดิ์และนวลจันทร์, 2532; กิตติศักดิ์และคณะ, 2535; Hsu, 1984; Towbin, 1984; Banttarri *et al.*,1985; Oberfelder, 1989; Tsuda *et al.*,1992; Tsuda, 1993)

กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จึงมีแนวคิดที่จะนำเทคนิค GLIFT มาสร้างชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสในมันฝรั่งที่รวดเร็วเช่นเดียวกับชุดตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ในกล้วยไม้ (สุรภี, 2547) ที่สามารถตรวจและอ่านผลได้ใน 5 นาที การผลิตชุด GLIFT เพื่อตรวจสอบไวรัสชนิดใด ต้องใช้แอนติซีรัมของเชื้อไวรัสที่เฉพาะเจาะจงกับไวรัสชนิดนั้นๆเมื่อต้องการตรวจสอบไวรัสบนมันฝรั่ง เชื้อ PVY จึงต้องใช้แอนติซีรัมของเชื้อ PVY โดยนำมาทดสอบคุณสมบัติ และคุณภาพของแอนติซีรัมแล้วจึงนำมาผลิต ซึ่งอาจต้องมีการปรับเปลี่ยนวัสดุบางอย่าง ความเข้มข้นของสารบางชนิด เมื่อนำไปใช้กับไวรัสชนิดอื่นที่มีขนาดและชนิดรูปร่างของอนุภาคของไวรัสที่ต่างกัน เช่นไวรัสชนิดกลมบางชนิดยังไม่สามารถปรับเทคนิคนี้ไปใช้ได้ และอาจจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางองค์ประกอบของน้ำคั้นว่ามีปริมาณไวรัสที่เพียงพอ ที่จะไม่เป็นอุปสรรค์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเซรุ่มกับ IgG ดังนั้นการผลิต GLIFT เพื่อตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิดต้องทำการศึกษาและทดสอบเฉพาะชนิดไป โดยทำการทดลองใช้วัสดุ ตรวจสอบความเข้มข้นของ IgG ของ PVY และสารละลายที่เหมาะในการเตรียมตัวอย่างจากมันฝรั่ง แล้วเลือกอัตราที่เหมาะสมในแต่ละส่วนมาประกอบกันผลิตเป็น GLIFT kit เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ PVY ในมันฝรั่ง ให้สามารถผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ขึ้นใช้เองในประเทศไทย

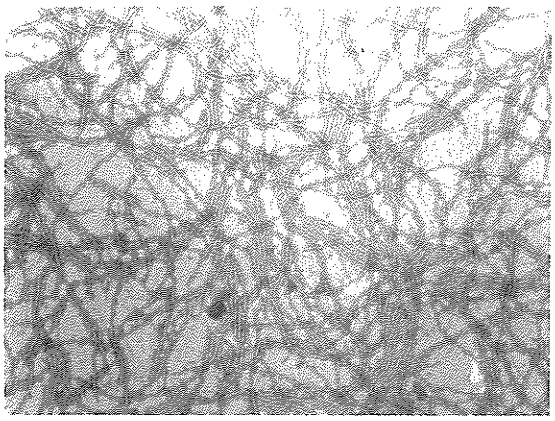

Figure 1. Flexuous rod particle of Potato virus Y is about 750 nm long and transmited by aphids.

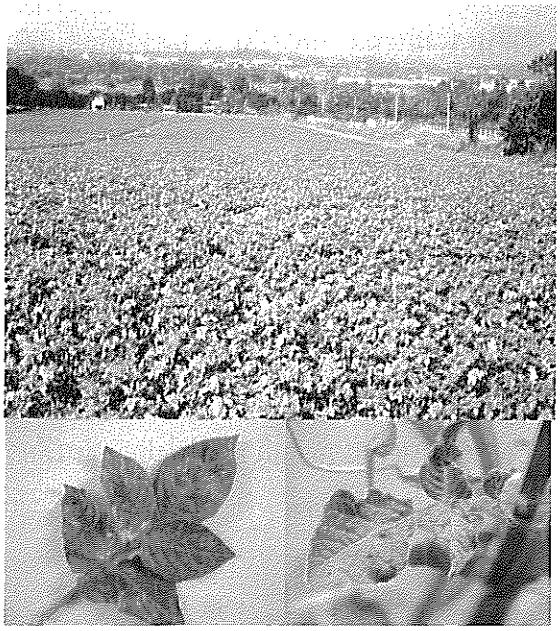

Figure 2. Mosaic symptom on potato leaves cause by potato virus Y

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองแบ่งการดำเนินงานออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด IgG ของ PVY (สุรภีและคณะ, 2547)

การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG ของ PVY โดยนำแอนติซีรัมมาผสมให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:9 แล้วเติม ammonium sulphate ที่อิ่มตัวลงไปในปริมาณที่เท่ากับสารละลายแอนติซีรัมที่เจือจางนี้ แล้วบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm (รอบ/นาที) นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนด้วย centrifuge แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยครึ่งเท่าของ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 4 ชม. 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280 nm เพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มก./มล. (Hampton *et al.*, 1990)

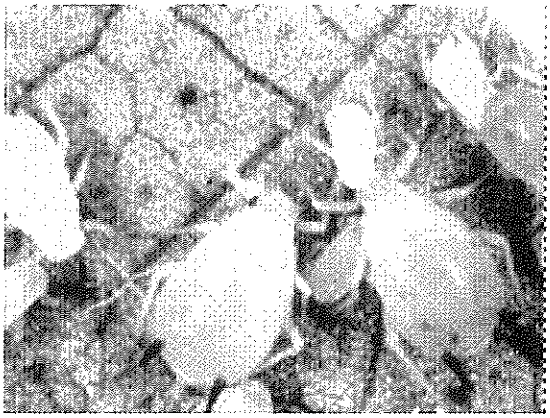

Figure 3. *Aphis gossipii*, Glove is one of the vectors of PVY

ขั้นตอนที่ 2 การ conjugate IgG ของ PVY กับ Colloidal gold (Anon., 2002)

Colloidal Gold Labeling IgG เป็นการนำเอา IgG ของไวรัสไป conjugate กับอนุภาคของทอง (colloidal gold)

2.1 การเตรียม Colloidal Gold

เตรียมจากสารประกอบ HAuCl4 เพื่อให้ได้อนุภาคของทองที่บริสุทธิ์ ที่มีขนาดของอนุภาคที่ต้องการ คือประมาณ 40 nm ใช้ reducer และ Sodium citrate ทำปฏิกิริยาดังสมการ

Gold tetrachloric acid + reducer = gold colloid

$$HAuCl_4 + e = Au^0$$

นำสารละลาย 1% ของ gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม Sodium citrate ทำให้เย็นลง จึงนำไปวัด OD ให้ได้ขนาด colloidal gold ประมาณ 40 nm (Hampton *et al.*,1990) แล้วนำสารละลายของ colloidal gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของ PVY

2.2 การเตรียม Gold labeling IgG

การต่อเชื่อม IgG ของ PVY เข้ากับ colloidal gold เป็น colloidal gold conjugated IgG หรือ Gold labeling IgG โดยผสม 1 มล. IgG ของ PVY ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 1 มก./มล. กับ colloidal gold แล้วเติม 10 % Bovine serum albumin (BSA) แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน gold labeling IgG แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ passive gold diluent

2.3 การเตรียม Conjugate release pad (CRP)

ทำการขีดเส้นด้วยพู่กันหรือพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ PVY ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.0, 1.5 และ 2.0 μl/ซม. แล้วนำไปอบแห้งใน ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 36°ซ นาน 2 ชม. ก่อนนำไปประกอบบนแผ่นกาวพลาสติก แล้วตัดเป็น dipstick บรรจุลงตลับเป็นชุดตรวจสอบ

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียม Test line (Anon., 2002)

ทำการขีด IgG ด้วยปากกาหมึกซึม (ขณะทดลองในห้องทดลอง) หรือพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดันและปริมาณลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ PVY ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 1 มก./มล. ที่ต่างกัน 3 อัตราได้แก่ 1.0, 1.5 และ 2.0 μl/ซม. ขีดให้เป็นเส้นตรง เรียกว่า test line โดยวาง test line ให้อยู่สูงจากขอบล่างของ แผ่น NCM 1.5 ซม. ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอยู่ในตำแหน่งที่มองเห็นได้ชัดเจนคู่กับ control line ที่จะอยู่ห่างจาก test line ขึ้นไป 0.5 ซม. ก่อนนำไปอบต้องทำ control line บนแผ่น NCM นี้ให้เสร็จก่อน แล้วจึงนำไปอบเช่นเดียวกับแผ่น CRP

ขั้นตอนที่ 4 เปรียบเทียบการใช้ Goat-anti rabbit (GAR) กับ Goat-anti mouse (GAM) เป็น control line

ทำเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) ของการตรวจสอบ ด้วยการขีดเป็นเส้นตรงด้วยปากกาหมึกซึมหรือ spray GAM ในอัตรา 1.0 μl/ซม. ลงบน NCM ในตำแหน่งห่างจาก Test line ขึ้นไปด้านบนของแผ่น NCM 0.5 ซม. ทำในช่วงเวลาเดียวกับการพ่น test line แล้วนำไป

อบแห้ง เช่นเดียวกับ conjugate release pad (CRP) เพื่อเป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี นำ GAR มาปฏิบัติเช่นเดียวกับ GAM เพื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของปฏิกิริยาระหว่างการใช้ GAM และ GAR เพื่อทดลองลดต้นทุนในการเตรียม control line สำหรับการใช้ GAR ไม่ต้องใช้ gold labeling IgG ของ mouse IgG เพิ่มเข้ามา เพราะสามารถใช้ gold labeling IgG ของ PVY ที่อยู่บน CRP ได้เลย แล้วตรวจดูความชัดเจนของปฏิกิริยาของ control line ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกัน

ขั้นตอนที่ 5 การประกอบ GLIFT เป็นตลับชุดตรวจสอบ

มีขั้นตอนเช่นเดียวกับการประกอบชุดตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ในกล้วยไม้ (สุรภีและคณะ, 2547) โดยแผ่น NCM มี test line เป็น IgG ของเชื้อ PVY และ control line เป็น GAR ส่วนแผ่น conjugate release pad ใส่เป็น gold conjugate IgG ของ PVY โดยไม่ต้องใช้ gold conjugate IgG ของ GAM เหมือนในชุดตรวจกล้วยไม้

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

6.1 นำตัวอย่างมันฝรั่งเป็นโรคไวรัสจากเชื้อ PVY มาบดละเอียดใน sample pad buffer-Na_2BO_3 แล้วดูดน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT 3 หยด แล้วตรวจผลของการเกิดปฏิกิริยา

6.2 ทดลองใช้ extraction buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช ด้วยวิธี NCM-ELISA แล้วหยอดเช่นเดียวกับ 6.1

ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด IgG ของ PVY

การสกัด IgG และปรับความเข้มข้นของ IgG พบว่า IgG ที่สกัดได้ เมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ PVY ที่ OD 280 nm เท่ากับ 9.7 ซึ่งเป็นค่าที่สูงมากกว่าความเข้มข้นมาตรฐานที่ต้องการใช้ คือ 1.4 (ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 mg/ml) ที่ 9.7 มีปริมาณโปรตีนสูงเกินเกินมาตรฐาน จึงปรับให้ IgG มีค่ามาตรฐานของความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 mg/ml โดยปรับจนมีค่า 1.4 ที่ OD 280 nm ก็เพียงพอต่อการใช้ในทางเซรุ่มวิทยา

ขั้นตอนที่ 2 การ conjugate IgG กับ colloidal gold หรือ colloidal gold labeling IgG

ภายหลังจากการกวน $HAuCl_4$ กับ Sodium citrate จะได้สารละลายของ colloidal gold นำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส PVY ผลจากการทดลองใช้ gold labeling IgG ของ PVY ในปริมาณ 1.0, 1.5 และ 2.0 µl/ซม. พบว่าทุกอัตราให้ปฏิกิริยาของสีแดงที่เส้น test line มีความชัดเจนใกล้เคียงกัน จากการดูสีของ

ปฏิกิริยาที่เป็นสีแดงเข้มคล้ายลูกเชอรี่ การอ่านผลของปฏิกิริยาใช้ความชัดเจนของสีแดงที่ปรากฏต่อสายตา คือแดงอ่อน แดง แดงเข้ม แสดงว่าปริมาณทั้ง 3 อัตราเพียงพอสำหรับ test line แต่อัตรา 1.0 ,1.5 µl/ซม. ไม่เพียงพอสำหรับ control line เพราะเกิดเป็นสีแดงอ่อนๆ เนื่องจาก gold labeling IgG ต้องไหลผ่าน test line ก่อน control line ดังนั้นอัตราที่ใช้ จึงเหลือปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่ไปทำให้ control line มีสีเข้มเท่ากับ 2.0 µl/ซม. ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณที่มากพอคือ 2.0 µl/ซม. จึงทำให้เกิดความชัดเจนทั้ง test line และ control line

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียม Test line

พบว่าการใช้ IgG ของ PVY ขีดด้วยปากกาหมึกซึมหรือ spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้น 1.5 µl/ซม. ให้ปฏิกิริยาของสี test line คมชัดดีกว่าที่ 1.0 µl/ซม. เป็นสีแดงเข้มของเชอรี่ดูด้วยสายตา และชัดเจนเพียงพอ ไม่จำเป็นต้องใช้ 2.0 µl/ซม. เป็นเพราะมีปริมาณของ IgG ของ PVY ที่เส้น test line มีมากทำให้สามารถจับเชื้อ PVY ที่ติดมากับ gold labeling IgG ของ PVY ได้ดีจึงเกิดสีแดงเข้มที่ test line

ขั้นตอนที่ 4 เปรียบเทียบกับการใช้ Goat-anti rabbit (GAR) กับ Goat-anti mouse (GAM) เป็น control line

ผลการทดลองสามารถใช้ GAR ขีดเส้น control line แทนการใช้ GAM ได้ผลดี gold labeling IgG ของ PVY ที่มีเหลือเกินพอจากการจับเชื้อไวรัสไปทำปฏิกิริยากับ GAR ได้เลย และยังคงให้ปฏิกิริยาเส้นสีแดงที่ชัดเจน เมื่อเลือกใช้ gold labeling IgG ของ PVYที่ conjugate release pad มากขึ้นเป็น 2.0 µl/ซม. ทำให้ปริมาณมากพอที่จะเหลือไปทำปฏิกิริยากับ GAR ที่ control line ได้สมบูรณ์มากขึ้นจนมีสีแดงของอนุภาคทองเข้มข้นชัดเจนซึ่งเป็นการประหยัดไม่ต้องเพิ่มการใช้ gold labeling IgG ของ mouse

ขั้นตอนที่ 5 การประกอบ GLIFT เป็น Dipstick และตลับใช้ตรวจสอบ

การประกอบวัสดุส่วนประกอบของ GLIFT (Figue 4) โดยเลือกวัสดุ สารเคมีและอัตราส่วนของสารละลายที่ใช้ให้เหมาะกับชนิดของเชื้อ PVY โดยทดลอง spray อย่างละ 1 แผ่น ในแต่ละความเข้มข้นและทดสอบจนได้ผลดีแล้วในแต่ละส่วนของ gold labeling IgG ของ PVY, IgG ของ PVY และ GAR เมื่อนำมาประกอบทุกส่วนแล้วใช้เครื่องตัดกระดาษให้ได้ขนาดของ dipstick ที่สม่ำเสมอเรียบร้อย และบรรจุลงในตลับพลาสติก หลังจากทดลองตรวจสอบด้วยตัวอย่างเป็นโรคของมันฝรั่ง เชื้อ PVY น้ำคั้นของพืชไหลไปได้อย่างสมบูรณ์ สามารถอ่านผลของปฏิกิริยาของ test line ได้ใน 3 นาที และการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ภายในเวลา 5 นาที (Figure 5) ชุด GLIFT ตรวจสอบเชื้อ PVY (Figure 6) ที่ประกอบสำเร็จนี้จึงใช้ตรวจสอบเชื้อ PVY ได้รวดเร็วมากกว่าชุดตรวจสอบ NCM-ELISA kit ไม่น้อยกว่า 5 ชม.

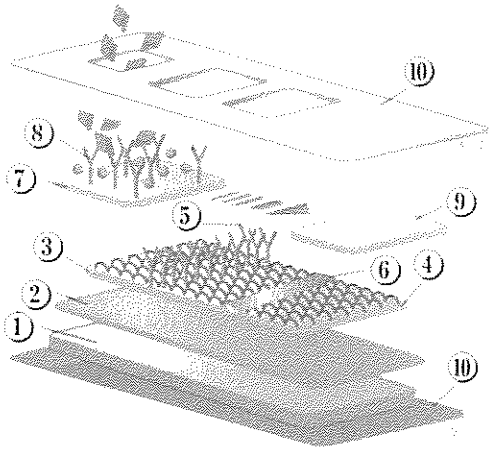

Figure 4. Composition of GLIFT

1. Plastic backing
2. Sticky tape
3. Nitrocellulose mennbrane
4. Blocking agent
5. Test line
6. Control line
7. Conjugate release pad
8. Gold labelling IgG
9. Wick
10. Plastic housing

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลาย บัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

การทดลองเปรียบเทียบใช้ sample pad buffer-Na_2BO_3 และ extraction buffer ของ NCM-ELISA พบว่า sample pad buffer-Na_2BO_3 ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชได้ดีกว่า extraction buffer ของ NCM-ELISA เพราะทำให้น้ำคั้นของใบมันฝรั่งละลายได้ดีไม่เหนียวข้นเป็นผลทำให้ gold labeling IgG ของ PVY ละลายออกได้ข้างดีและเร็วกว่า ทำให้ gold conjugated IgG ไหลไปได้หมด บัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดนี้สามารถช่วยลดการออกซิไดซ์ของน้ำคั้นพืชได้ดีเท่าๆกันสีของน้ำคั้นยังคงมีสีเขียวตามปกติ

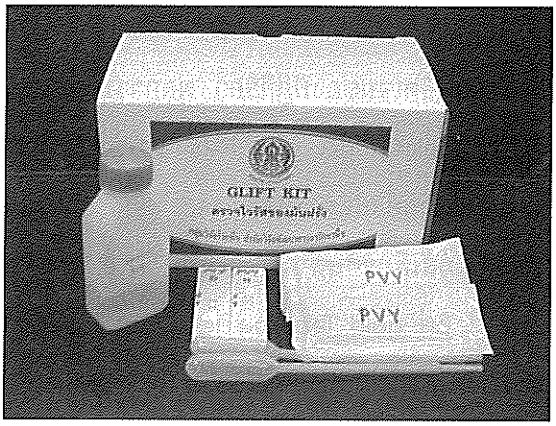

Figure 5. Sample No1 is healthy, has only C line not T line. Samples No.2, 3 and 4 are PVY, have two line of C and T lines. C = control line, T = test line shows reaction of disease sample

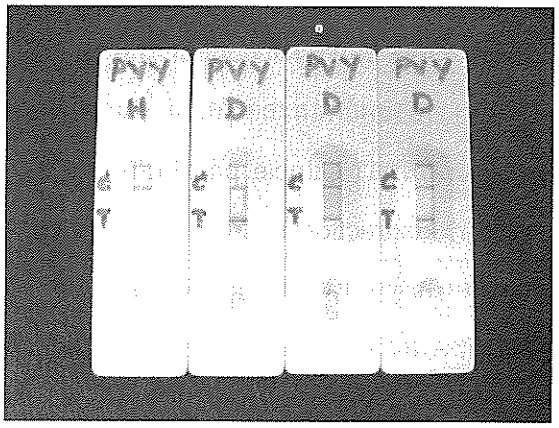

Figure 6. PVY GLIFT kit product compose with GLIFT kit, buffer, plastic bag and pasture pipet

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองปรับใช้ชุดสำเร็จรูป GLIFT เพื่อตรวจสอบเชื้อ PVY ในมันฝรั่งสามารถทำได้สำเร็จเช่นเดียว กับการพัฒนาการผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ในกล้วยไม้ จะมีความแตกต่างกันบ้างในปริมาณของสารที่ใช้เพื่อความชัดเจนของปฏิกิริยา ผลการทดลองใช้ gold labeling IgG ของ PVY พบว่าทุกอัตราให้ปฏิกิริยาของสีแดงที่เส้น test line ที่ดีและชัดเจนใกล้เคียงกันส่วน control line ไม่ค่อยชัดเจน แต่ gold labeling IgG ของ PVY ในปริมาณ 2.0 μl/ซม. ทำให้ทั้ง test line และ control line มีสีเข้มชัดเจนดีเท่ากัน ซึ่งดีกว่าการใช้ที่ปริมาณ 1.0 และ 1.5 μl/ซม. ในการใช้ GAR ขีดเส้น control line ซึ่งเป็นการประหยัดดีกว่าการใช้ GAM ทำ control line และการใช้ IgG ของ PVY spray เป็น test line ในปริมาณความเข้มข้นที่ 1.5 μl/ซม. ให้ปฏิกิริยาสีที่ test line คมชัดดีกว่าอีกสองความเข้มข้น สามารถเลือกใช้ GAR ในการทำ control line และเป็นผลดีในการประหยัดและลดงานลง ในการเตรียมตัวอย่างพืชพบว่า sample pad buffer-Na_2BO_3 ใช้ได้ดีกว่า extraction buffer ของ NCM-ELISA การผลิตเป็นชุดสำเร็จ GLIFT kit เชิงพาณิชย์มีความสะดวกในการจัดอุปกรณ์ประกอบ เพราะมีเพียง 4 อย่าง คือ ตลับ PVY GLIFT ขวดบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ หลอดดูดสารละลาย และถุงพลาสติกบดตัวอย่างพืช ซึ่งมีอุปกรณ์น้อยกว่า NCM-ELISA kit ใช้ง่ายสะดวกรวดเร็ว อ่านผลได้ภายใน 5 นาที ราคาไม่แพง เป็นประโยชน์ต่อการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรคเพื่อทดแทนการนำเข้า และเพื่อบริการวิชาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PVY ของมันฝรั่งที่รวดเร็ว

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณนิลวรรณ เพชระบูรณิน ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยด้วยการอนุญาตให้ใช้เครื่องพ่นแอนติซีรัม และ colloidal gold conjugate ในการทดสอบการผลิตแบบเชิงพาณิชย์

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532. การผลิต ELISA KIT เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่ง. หน้า 1-8. *ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. หน้า 103-109. *ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2535. การตรวจหาเชื้อ PVX ด้วยวิธี NCM-ELISA. หน้า 17-22. *ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2536. เชื้อ PVY สาเหตุโรคใบด่างของมันฝรั่งและแนวทางแก้ไขปัญหา. หน้า 107-122. *ใน : รายงานโรคพืชและจุลชีววิทยา ประจำปี 2536.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นิรนาม. 2547. *รายงานผลการสำรวจมันฝรั่ง ปีเพาะปลูก เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 421.* สำนักเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 79 หน้า.

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้. *วารสารโรคพืช* (1-2) : 1-14.

Anon. 2002. *Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests.* BGM Company. Bangkok, Thailand. 180 p.

Banttarri, E.E., and P.H. Goodwin 1985. Detection of potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrane (Dot-ELISA). *Plant Disease* 69:202-205.

Fletcher, J. 2000. *Management of Potato Viruses.* In New Zealand Institute for Crop & Food Research Ltd. E-mail : fletcherj@crop.cri.nz

Hampton, H., E. Ball and S. De Boer 1990. Serological Methods for Detection *and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens.* The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 389 p.

Hooker,W.J. 1981. *Compendium of Potato Diseases.* The International Potato Center, Lima, Peru. 125 p.

Hsu,Y.H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. *Ann. Biochem.* 142 : 221226.

Oberfelder, R. 1989. Immunoblotting : comparison of detection methods. *Focus* 11:1-5.

Towbin, H., and J. Gordon. 1984. Immnoblotting and dot Immunobinding current status and outlook. *J. Immunological Methods* 72 : 313-340.

Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, I. Fujisawa and K. Tomaru, 1993. Simultaneous diagnosis for plant Infected with multiple viruses employing rapid immunofilter paper assay (RIPA) with two step method; multi RIPA. *Ann. Phytopathology Soc. Japan* 59 : 200-203.

Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, Y. Konda, M. Hikata and K. Tomaru, 1992. A Novel detection and Identification technique for plant virus : rapid immunofilter paper assay (RIPA). *Plant Disease* 76:466-469.