วิทยานิพนธ์

การผลิตแอนติบอดีและการตรวจสอบเชื้อ *CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS* ในแตงกวา

ANTIBODY PRODUCTION AND THE DETECTION OF *CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS* IN CUCUMBER

นายสุพจน์ ภูมิสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร — **สาขา**

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา — **ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตแอนติบอดีและการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวา

Antibody Production and the Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Cucumber

นามผู้วิจัย นายสุพจน์ ภูมิสุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชวลิต ฮงประยูร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตแอนติบอดีและการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวา

Antibody Production and the Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Cucumber

โดย

นายสุพจน์ ภูมิสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

สุพจน์ ภูมิสุข 2551: การผลิตแอนติบอดีและการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D. 80 หน้า

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) เป็นไวรัสที่มีความสำคัญ จัดเป็นศัตรูพืชกักกันที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับการปลูกพืชเศรษฐกิจต่างๆ ในวงศ์แตงในหลายพื้นที่ งานวิจัยนี้ ใช้ไวรัส CGMMV ที่แยกได้จากน้ำเต้าเป็นโรค (CGMMV-Bg) เป็นแหล่งของเชื้อปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าน้ำเต้า เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ ซึ่งได้ไวรัสบริสุทธิ์ 25.4 มิลลิกรัม ต่อใบพืช 100 กรัม และใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในไก่ (ChIgY) และกระต่าย (RIgG) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV (MIgG) การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV จำนวน 5 โคลน เลือกโคลน MCG-2 มาเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง จากนั้นจึงแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลินโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ affinity chromatography เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี พบว่า RIgG และ MIgG มีความจำเพาะต่อเชื้อ CGMMV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ การพัฒนาวิธีการทางซีรัมวิทยาเพื่อใช้ในการตรวจสอบ CGMMV ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot immunobinding assay (DIBA) และ tissue blot immunoassay (TBIA) พบว่า วิธี double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV โดยมีความไวในการตรวจสอบไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำวิธี DAS-ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในส่วนต่างๆ ของต้นแตงกวา พบเชื้อไวรัสในระดับความเข้มข้นที่สูงในส่วนต่างๆ ที่นำมาตรวจสอบ หลังจากการปลูกเชื้อ 45 วัน แต่ในผลอ่อนจะมีค่า $O.D._{405}$ น้อยกว่าส่วนอื่นๆ ถึง 4 เท่า การศึกษาการติดเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาที่เก็บจากผลที่ติดเชื้อ พบว่า มี 27 จาก 30 เมล็ด ที่ตรวจพบเชื้อ อย่างไรก็ตาม ในจำนวนนี้มีเพียง 21 จาก 27 เมล็ด ที่สามารถทำให้ต้นกล้าแตงกวาแสดงอาการของโรค หลังจากการปลูกเชื้อ 14 วัน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Suphot Phoomsuk 2008: Antibody Production and the Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Cucumber. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Ratchanee Hongprayoon, Ph.D. 80 pages.

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) is an important quarantine pest and a threat for the production areas of various economic crops in the cucurbitaceous. In this research, CGMMV isolated from diseased bottle gourd (CGMMV-Bg) was used as virus source and inoculated onto the bottle gourd seedling to propagate the virus for purification, which 25.4 mg purified virus per 100 g leaves was obtained. Purified CGMMV preparation was used as antigen for the production of polyclonal antibodies in chicken (ChIgY) and rabbit (RIgG) as well as monoclonal antibodies (MIgG). Five monoclonal antibodies were obtained from fusion, clone MCG-2 was selected for upscale production. The immunoglobulin was purified by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography. From the specific test by used ELISA, the result showed that RIgG and MIgG were specifically to CGMMV but did not react with healthy plant sap and other viruses tested. Serological techniques for the detection of CGMMV were developed; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot immunobinding assay (DIBA) and tissue blot immunoassay (TBIA), the result showed double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA) was highest efficiency to detect of purified virus which the sensitivity at 5 ng/ml could be observed. Application of DAS-ELISA to detect CGMMV in cucumber tissues showed high concentration of CGMMV in every parts of the 45-days post inoculation but the $O.D._{405}$ was 4 times less in immature-fruit than other tissues. The investigation of CGMMV infection in seed collected from infected fruit was also carried out and the result showed that 27 out of 30 seeds were infected. However, only 21 out of 27 infected seed, with the $O.D._{405}$ value from 0.417-1.618, induced disease symptom on cucumber seedlings 14-days post inoculation.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนี ฮงประยูร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวลิต ฮงประยูร กรรมการวิชาเอก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสสวรรณ เจียมสมบัติ กรรมการวิชารอง ที่ได้กรุณากรุณามอบความรู้ อบรมบ่มสอนทั้งคุณธรรม จริยธรรม แนะนำให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดมาจนกระทั่งจบการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คนึงนิตย์ เหรียญวรากร ประธานการสอบ และอาจารย์ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส ที่กรุณาให้คำแนะนำ และร่วมตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้มอบความรัก กำลังใจ และทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา และขอกราบขอบพระคุณต่อพ่อแม่ครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการซีรัมวิทยา ตลอดทั้งท่านผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในงานวิจัยทุกท่านโดยมิได้กล่าวนาม ที่ได้กรุณาช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายขอมอบคุณงามความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้แด่ สัตว์ทดลองทั้งหลายที่ได้เสียสละเลือด เนื้อ และชีวิต แก่งานวิจัยนี้

สุพจน์ ภูมิสุข

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	25
สรุปและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	70
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนต่างๆ ของต้นแตงกวาที่เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบเชื้อ CGMMV	23
2	โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บไข่ และค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ที่ผลิตในไก่ไข่พันธุ์ Hisex	30
3	โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บเลือด และค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ที่ผลิตจากกระต่ายพันธุ์ White New Zealand	32
4	ผลของการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CGMMV บริสุทธิ์กับเซลล์มัยอีโลมา และตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของไฮบริโดมา ด้วยวิธี TAS-ELISA โดยใช้ไวรัสบริสุทธิ์ แตงกวาเป็นโรค และแตงกวาปกติ เป็นแอนติเจน	34
5	ผลการตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไฮบริโดมาจากการทำ limiting dilution ครั้งที่ 3 ด้วยวิธี TAS-ELISA	34
6	ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ChIgY สำหรับวิธี indirect PTA-ELISA	36
7	ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RIgG ในการทำปฏิกิริยา กับแอนติเจนในวิธี indirect PTA-ELISA	38
8	ผลการเปรียบเทียบการใช้ ChIgY และ RIgG เคลือบ ELISA plate ในวิธี DAS-ELISA และใช้ RIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody	38
9	ผลการเปรียบเทียบความความเข้มข้นของ RIgG ในการเคลือบ ELISA plate ในวิธี DAS-ELISA และใช้ RIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody	39
10	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ RIgG-AP เพื่อใช้เป็น secondary antibody ในการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA	39
11	ผลการเปรียบเทียบการใช้ RIgG และ MIgG เคลือบ ELISA plate ในวิธี DAS-ELISA และใช้ MIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody	40
12	ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ MIgG-AP เพื่อใช้เป็น secondary antibody ในการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA	41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV กับน้ำคั้นพืชเป็นโรคจากเชื้อ CGMMV และไวรัสอื่นเปรียบเทียบกับพืชปกติ ด้วยวิธี ELISA	43
14	ประสิทธิภาพของวิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นจากใบและเมล็ดแตงกวาปกติ	44
15	ผลจากการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของแตงกวาด้วยวิธี DAS-ELISA	47
16	การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวา ด้วยวิธีแช่เมล็ดและบดเมล็ด เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA	50
17	ผลจากการเตรียมตัวอย่างด้วยการปั่นเหวี่ยง และไม่ปั่นเหวี่ยงน้ำคั้นเมล็ดเพื่อตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA	50
18	ผลการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาจากผลที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลในแตงกวาทดสอบ โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นเมล็ดและวิธี DAS-ELISA	52
19	ผลจากการตรวจเชื้อไวรัส CGMMV ในเมล็ดแตงกวาด้วยวิธี DIBA เปรียบเทียบกับวิธี DAS-ELISA	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการแผลเฉพาะแห่งบน *Chenopodium amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อด้วยวิธีกลเป็นเวลา 10 วัน โดยทาใบด้วยน้ำคั้นจากใบน้ำเต้าที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV (ขวา) เปรียบเทียบกับใบปกติ (ซ้าย)	26
2	ลักษณะอาการของเชื้อ CGMMV บนน้ำเต้า	26
3	ลักษณะอาการของเชื้อ CGMMV บนแตงกวา	27
4	ลักษณะอาการใบด่างและลดรูปบนแตงโม หลังปลูกเชื้อ CGMMV เป็นเวลา 14 วัน	27
5	ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนของเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี SDS-PAGE	29
6	ไวรัส CGMMV ที่เตรียมให้บริสุทธิ์จากใบน้ำเต้าเป็นโรค ด้วยวิธี sucrose-gradient centrifugation และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	29
7	ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนของ IgY ที่ผลิตได้จากไข่ไก่ ด้วยวิธี SDS-PAGE	31
8	ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนของ RIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE	31
9	ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนของ MIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE	35
10	ผลการตรวจเชื้อ CGMMV ในเนื้อเยื่อของแตงกวา ด้วยวิธี TBIA	48
11	ผลการตรวจเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา ด้วยวิธี DIBA	55
12	ลักษณะอาการของผล และเนื้อภายในผลแตงกวาที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

8-Ag	= 8-Azaguanine
BCIP	= 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BMV	= *Brome mosaic virus*
CaCV	= *Capsicum chlorosis virus*
CMF Hanks	= Calcium and magnesium free Hanks balanced salt solution
CB	= Carbonate coating buffer
CFA	= Complete Freund's adjuvant
CGMMV	= *Cucumber green mottle mosaic virus*
CGMMV-Bg	= CGMMV-Bottle gourd isolate
CGMMV-C	= CGMMV-Cucumber strain
CGMMV-KOM	= CGMMV-Korean oriental melon isolate
CGMMV-KW	= CGMMV-Korean watermelon isolate
CGMMV-W	= CGMMV-Watermelon strain
CGMMV-Y	= CGMMV-Yodo strain
ChIgY	= Chicken yolk immunoglobulin
CM	= Complete medium
CMV	= *Cucumber mosaic virus*
CV3	= *Cucumber virus* 3
CV4	= *Cucumber virus* 4
CVMV	= *Chili veinal mottle virus*
CymMV	= *Cymbidium mosaic virus*
DAS-ELISA	= Double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay
DEPC-water	= Diethylpyrocarbonate–treated water
DIBA	= Dot immunobinding assay
DIECA	= Diethylthiocarbamic acid sodium salt
DMRT	= Duncan's Multiple Range Test
$E^{0.1\%}_{260\,nm}$	= Extinction coefficient

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

FrMMV	= *Frangipani mosaic virus*
GACh	= Goat anti-chicken IgY conjugated with Alkaline phosphatase
GAM	= Goat anti-mouse IgG conjugated with Alkaline phosphatase
GAR	= Goat anti-rabbit IgG conjugated with Alkaline phosphatase
HAT medium	= Hypoxanthine thymidine aminopterin medium
IC-RT-PCR	= Immunocapture reverse transcriptase polymerase chain reaction
IFA	= Incomplete Freund's adjuvant
IgG	= gamma-Immunoglobulin
IgY	= Yolk immunoglobulin
Indirect PTA-ELISA	= Indirect plate trapped antigen-enzyme-linked immunosorbent assay
IP	= Intraperitoneal injection
KGMMV	= *Kyuri green mottle mosaic virus*
MCMV	= *Maize chlorotic mottle virus*
MdMV	= *Maize dwarf mosaic virus*
MIgG	= MCG-2 mouse gamma-immunoglobulin
MIgG-AP	= MIgG conjugated with Alkaline phosphatase
MW	= Molecular weight
MYSV	= *Melon yellow spot virus*
NBT	= Nitro blue tetrazolium salt
Ns	= Normal serum
$O.D._{405}$	= Optical density at 405 nanometer wavelength
PRSV	= *Papaya ringspot virus*
PBS	= Phosphate buffer saline
PBST	= Phosphate buffer saline with 0.05% Tween-20
PC	= Phytosanitary certificate
PEG	= Polyethylene glycol
PNPP	= *p*-Nitrophenyl phosphate

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PVY	= *Potato virus* Y
RIgG	= Rabbit gamma-immunoglobulin
RIgG-AP	= RIgG conjugated with Alkaline phosphatase
RMV	= *Ribgrass mosaic virus*
RT-PCR	= Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
$s^{\circ}_{20,w}$	= Sedimentation coefficient
SC	= Subcutaneous injection
SCMV	= *Sugarcane mosaic virus*
SDS-PAGE	= Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SDT-RT-PCR	= Simple-direct-tube RT-PCR
SK	= Skimmed milk
S/N ratio	= Signal-to-noise-ratio
TAS-ELISA	= Triple antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay
TBIA	= Tissue blot immunoassay
TBS	= Tris-buffer saline
TBST	= Tris-buffer saline with 0.05% Tween-20
TMGMV	= *Tobacco mild green mosaic virus*
TMV	= *Tobacco mosaic virus*
ToMV	= *Tomato mosaic virus*
WMV-2	= *Watermelon mosaic virus*-2
WSF	= Water soluble fraction
WSMV	= *Watermelon silver mottle virus*

การผลิตแอนติบอดีและการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวา

Antibody Production and the Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Cucumber

คำนำ

แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีรสชาติดี รับประทานได้ทั้งในรูปผลสดและนำมาประกอบอาหารได้หลากหลาย นอกจากจะปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศแล้ว ในปัจจุบันประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ซึ่งมีแนวโน้มที่จะขยายตัวเพิ่มขึ้น โดยในปี 2549 มีมูลค่าของการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาประมาณ 171.11 ล้านบาท จึงทำให้ประเทศไทยต้องมีการปรับตัวในเรื่องการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากแตงกวาให้ได้คุณภาพทัดเทียมและเป็นที่ยอมรับของต่างประเทศ การเตรียมพร้อมของการส่งออกสินค้าเกษตรประการหนึ่ง คือ การตรวจสอบว่าสินค้าปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตพืชนั้นๆ เพื่อป้องกันมิให้ถูกกีดกันทางการค้าด้วยคุณภาพของสินค้าในการส่งออก ส่วนในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบไม่ให้มีการนำเชื้อเข้ามาในประเทศ โดยเฉพาะศัตรูพืชกักกัน

*Cucumber green mottle mosaic v*irus (CGMMV) สาเหตุโรคพืชที่จัดอยู่ในจีนัส *Tobamovirus* เป็นไวรัสมีพืชอาศัยเป็นพืชในวงศ์แตงหลายชนิด มีรายงานถึงการระบาดในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ เกาหลี ญี่ปุ่น อินเดีย และมาเลเซีย เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ มีรายงานว่าสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดแตงกวาได้ถึง 8% และถ่ายทอดผ่านเมล็ดแตงโมได้ 5% (Komuro *et al.,* 1971; Nagai *et al.,* 1974) การเข้าทำลายของเชื้อ CGMMV ในพืชตระกูลแตงก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตในหลายประเทศ เช่น ในประเทศเกาหลี พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ส่งผลให้เนื้อภายในผลเสื่อมสภาพ เรียกอาการดังกล่าวว่า “blood flesh” และในประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า “conjak” (Komuro *et al.,* 1968; Lee *et al.,* 1990) อาการดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในปี 1995 (Lee, 1996; Park *et al.,* 2001) ส่วนในประเทศกรีกเกิดการแพร่ระบาดของ CGMMV watermelon strain ครั้งแรกในปี 1995 ก่อให้เกิดความเสียหายที่รุนแรงในการปลูกแตงโมที่ใช้ต้นตอ

(root-stock) เป็นโรค โดยอาการของโรคจะแสดงในผลที่โตเต็มที่โดยที่ผิวนอกของผลมีความปกติ แต่เนื้อในผลมีลักษณะไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Varveri *et al.,* 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ CGMMV ที่มีการปนเปื้อนอยู่ในดินสามารถเข้าทำลายพืชปลูกได้เช่นกัน (Inoue *et al.,* 1967; Nagai *et al.,* 1974) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงการแพร่ระบาดของเชื้อดังกล่าว แต่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้เชื้อ CGMMV เป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจสอบวินิจฉัยโรคได้รวดเร็ว มีความแม่นยำและเป็นที่ยอมรับก็จะเป็นประโยชน์ต่อธุรกิจเมล็ดพันธุ์ และกระบวนการกักกันพืชของประเทศไทย

ในปัจจุบัน การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชนิยมใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยา เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความเหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีคุณภาพสูง ร่วมกับการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CGMMV โดยใช้กระต่ายและไก่เป็นสัตว์ทดลองให้ได้แอนติบอดีที่มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในแตงกวา

วัตถุประสงค์

1. ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)

2. พัฒนาวิธีการสำหรับตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา เพื่อใช้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส CGMMV ในแตงกวา

การตรวจเอกสาร

Cucumber green mottle mosaic virus

*Cucumber green mottle mosaic v*irus (CGMMV) มีชื่อเรียกเดิมหลายชื่อ ได้แก่ *Tobacco mosaic virus watermelon* strain-W, *Cucumber virus*-3 (Ainsworth, 1935), *Cucumber virus*-4 (Ainsworth, 1935; Hollings *et al.,* 1975) และ *Bottle gourd Indian mosaic virus*, *Cucumis virus* 2 (Smith, 1957) มีรายงานการพบเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นครั้งแรกในประเทศสหราชอาณาจักร เมื่อปี 1935 ทำให้ผลแตงกวามีลักษณะผิดปกติ (Ainsworth, 1935) หลังจากนั้นพบการระบาดไปยังส่วนต่างๆ ของโลก ได้แก่ ประเทศในแถบทวีปยุโรป ประเทศอินเดีย และญี่ปุ่น (Hollings *et al*., 1975; Francki, 1988)

องค์ประกอบของอนุภาคไวรัส

อนุภาคของเชื้อ CGMMV มีรูปร่างเป็นท่อนตรงและมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) มีความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร กว้างประมาณ 15 นาโนเมตร ประกอบด้วย กรดนิวคลิอิค 5% และโปรตีน 95% จีโนมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยวสายบวก (plus single-stranded RNA) ขนาด 6,500 นิวคลีโอไทด์ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17.2 กิโลดาลตัน อนุภาคของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์มีค่า sedimentation coefficient ($s°_{20,w}$) ที่ 195 S มีค่า isoelectric point ที่ pH 4.98 และสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.38 และที่ $A_{\max (260)}/A_{\min (249)}$ เท่ากับ 1.05 (Hollings *et al*., 1975)

คุณสมบัติในน้ำคั้นของอนุภาคไวรัส

Smith (1957) รายงานว่า เชื้อ CGMMV มีความคงทนสูง แม้ในสภาพแวดล้อมที่ไวรัสโดยทั่วไปอาจไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ เชื้อชนิดนี้มีความคงทนต่อความร้อน (thermal inactivation point) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้นานเป็นเวลา 10 นาที และพบว่าในบางสายพันธุ์ เช่น Watermelon และ Yodo strains สามารถทนต่อความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิที่สูงถึง 90-100 องศาเซลเซียส (Kitani *et al.,*1970; Nagai *et al.,* 1974) Indian strain C ทนต่อความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิ 86-88 องศาเซลเซียส (Vasudeva *et al.,* 1949) อนุภาคไวรัสในน้ำคั้นพืชซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) มีความคงทนอยู่ได้นานถึง 240 วัน และคงทนอยู่ได้หลายปีหากเก็บที่

0 องศาเซลเซียส นอกจากนี้น้ำคั้นจากพืชเป็นโรคมีค่าการเจือจางสูงสุดที่ยังก่อให้เกิดโรค (dilution end point) อยู่ระหว่าง 10^{-6} ถึง 10^{-7} (Nagai *et al.,* 1974)

พืชอาศัย ลักษณะอาการ และสายพันธุ์ของเชื้อ CGMMV

พืชอาศัยของเชื้อ CGMMV

พืชอาศัยของเชื้อ CGMMV ส่วนใหญ่เป็นพืชในวงศ์ *Cucurbitaceae* โดยจะแสดงอาการใบด่างทั่วทั้งต้น (Hollings *et al*., 1975; Francki,1986) ได้แก่ แตงโม (*Cirtullus vulgaris*) แตงกวา (*Cucumis sativus*) แตงเมลอน (*Cucumis melo*) และน้ำเต้า (*Lagenaria siceraria*) นอกจากนี้ Boubourakas *et al.* (2004) รายงานว่าเชื้อ CGMMV บางสายพันธุ์ยังสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดอาการแผลเฉพาะแห่งกับพืชในวงศ์ *Amaranthaceae* เช่น บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) วงศ์ *Chenopodiceae* ได้แก่ *Chenopodium amaranticolor* และ *C. murale* พืชในวงศ์ *Mavalceae* เช่น กระเจี๊ยวเขียว (*Hibiscus esculentus*) และพืชในวงศ์ *Solanaceae* ได้แก่ ลำโพง (*Datura stramonium*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และยาสูบใบกลาง (*Nicotiana benthamiana*) เป็นต้น

ลักษณะอาการ และสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส CGMMV

เชื้อ CGMMV เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติของใบพืชในวงศ์แตงได้หลายลักษณะ เช่น อาการใบด่าง (mottling) โป่งนูน (blistering) และบิดเบี้ยว (distortion) ในบางครั้งจะพบอาการด่างสีเหลืองสว่างกระจายทั่วทั้งใบ (blight yellow leaf mottling) รวมทั้งอาการลำต้นแคระแกร็น ในบางครั้งอาจทำให้ผลผลิตลดลงถึง 15% (Fletcher *et al*., 1969) หรือทำให้ผลผลิตมีลักษณะไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Smith, 1957)

ส่วนที่ผลมักพบอาการที่สำคัญ เช่น อาการแผลขีดสีเหลือง (yellow-coloured streak) โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงๆ (Smith, 1957) แต่ถ้าหากว่าเชื้อเข้าทำลายในระยะติดผล จะทำให้เนื้อภายในผลเกิดการเน่าเละ (decomposition) และสีซีดลง (discoloration) (Komuro *et al*., 1971)

เนื่องจากเชื้อไวรัส CGMMV มีการระบาดไปยังภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก จึงทำให้มีรายงานถึงสายพันธุ์ และไอโซเลทของเชื้อ ดังนี้

- Ainsworth (1935) รายงานการพบเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ *Cucumber virus* 3 (CV3) ในประเทศสหราชอาณาจักร ซึ่งไม่ทำให้แตงกวาแสดงอาการที่ผล แต่จะแสดงอาการแผลเฉพาะแห่งเล็กน้อยบน *C. amaranticolor* และไม่สามารถเข้าทำลาย *D. stramonium* หรือ *Petunia hybrida*

- *Cucumber virus* 4 (CV4) พบในประเทศสหราชอาณาจักรเช่นเดียวกัน (Ainsworth, 1935) ก่อให้เกิดอาการกับผลแตงกวา และทำให้เกิดแผลเฉพาะแห่งใน *C. amaranticolor* แต่ไม่เกิดใน *D. stramonium* CV 3 และ CV 4 มีความเหมือนกันมากทั้งทางคุณสมบัติทางเคมีและซีรัมวิทยา (Nozu *et al*., 1971)

ในประเทศญี่ปุ่นพบสายพันธุ์ของเชื้อ CGMMV 3 สายพันธุ์ ได้แก่

- Cucumber strain (CGMMV-C) เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการบิดเบี้ยว (distortion) ในผลแตงกวา และชักนำให้เกิดแผลเฉพาะแห่งใน *D. stramonium* แต่ไม่พบอาการดังกล่าวใน *C. amaranticolor* (Inoue *et al*., 1967)

- Yodo strain (CGMMV-Y) ทำให้เกิดอาการแผลเฉพาะแห่งทั้งใน *C. amaranticolor* และ *D. stramonium* (Kitani *et al*., 1970)

- Watermelon strain (CGMMV-W) ทำให้แตงโมแสดงอาการแผลเฉพาะแห่งใน *C. amaranticolor* แต่ไม่เกิดอาการใน *D. stramonium* (Komuro *et al.,* 1968)

นอกจากนี้ Tan *et al.* (2000); Ugaki *et al*. (1991) ยังพบเชื้อในกลุ่ม *Tobamovirus* ที่แยกเชื้อได้จาก muskmelon ที่แสดงอาการใบด่าง และอาการแผลแห้งตาย (necrotic lesion) ที่ผล ให้ชื่อว่า CGMMV-SH และพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CGMMV-W

Vasudeva *et al*. (1949) สามารถแยกเชื้อ CGMMV Indian strain ได้จากน้ำเต้าที่ปลูกในประเทศอินเดีย และก่อให้เกิดแผลเฉพาะแห่งบนใบของ *C. amaranticolor* แต่ไม่แสดงอาการใน *D. stramonium*

ในประเทศเกาหลีมีรายงานครั้งแรกถึงการเข้าทำลายของเชื้อ CGMMV ที่เป็นสาเหตุของอาการ “blood flesh” ในแตงโม (Lee, 1996) จากนั้นมีรายงานอีกครั้งถึงโรคไวรัสของพืชตระกูลแตง โดย Park *et al*. (2001) สำหรับไอโซเลทของเชื้อ CGMMV ที่มีรายงานในประเทศเกาหลี เช่น CGMMV-Korean watermelon isolate (CGMMV-KW) และ CGMMV-Korean oriental melon isolate (CGMMV-KOM) ที่ก่อให้เกิดอาการแผลเฉพาะแห่งทั้งใน *C. amaranticolor* และเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทเป็นสาเหตุของอาการด่างในแตงโม แตงเมลอน และแตงกวา (Kim *et al*., 2003)

การถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส CGMMV

เชื้อ CGMMV สามารถแพร่ระบาดได้ดีด้วยวิธีกล เช่น เกิดจากการสัมผัสระหว่างใบพืช การจับต้องในระหว่างการเพาะปลูก โดยเฉพาะการปลูกแตงกวาและแตงโม โดยการใช้ต้นตอที่เป็นโรค แต่ไม่มีรายงานว่ามีการระบาดโดยเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ (Hollings *et al*., 1975)

Hollings *et al*. (1975) รายงานว่าเชื้อ CGMMV สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดแตงกวาได้ โดยหลังจากเก็บเมล็ดประมาณ 1 เดือน ยังมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดประมาณ 8% และจะลดลงเหลือ 1% หลังจากเก็บเมล็ดแตงกวาไว้ประมาณ 5 เดือน และพบว่ามีการถ่ายทอด 5% ในเมล็ดแตงโม (Komuro *et al.,* 1971; Nagai *et al.,* 1974) Francki (1988) พบว่า การปนเปื้อนของเชื้อมากับเมล็ดนั้นเกิดขึ้นส่วนใหญ่โดยติดมาทางผิวของเมล็ด และสามารถกำจัดได้โดยใช้ความร้อนแห้งในการอบเมล็ดที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ส่วนในละอองเกสรก็พบว่ามีเชื้อไวรัสปนเปื้อนมาได้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ CGMMV ที่ปนเปื้อนในดินสามารถเข้าทำลายทางราก (Inoue *et al.,* 1967; Nagai *et al.,* 1974) แต่สามารถกำจัดเชื้อที่มีการปนเปื้อนในดินโดยใช้เมธิลโบรไมด์ (methyl bromide) อบฆ่าเชื้อในดิน (Inoue *et al.,* 1967)

ความสัมพันธ์ของเชื้อ CGMMV กับไวรัสในจีนัส *Tobamovirus*

Tan *et al.* (2000) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส CGMMV กับ *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV) พบว่า KGMMV-Y มีจีโนมขนาด 6,519 นิวคลีโอไทด์ ส่วน CGMMV-SH มีจีโนมขนาด 6423 นิวคลีโอไทด์ โดยไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีการจัดเรียงตัวของยีนเหมือนกัน และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ ในจีนัส *Tobamovirus* เชื้อ CGMMV มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนที่ดีเมื่อนำมาผลิตแอนติซีรัม และมีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อต่อไปนี้ ได้แก่ *Frangipani mosaic virus* (FrMMV)*, Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV)*, Ribgrass mosaic virus* (RMV)*, Tobacco mosaic virus* (TMV)*, Tomato mosaic virus* (ToMV) *และ Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (Francki, 1988)

การตรวจรับรองการปลอดเชื้อ CGMMV ในเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง

สถานการณ์ในการนำเข้า-ส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงของประเทศไทย

ธุรกิจเมล็ดพันธุ์นับว่าเป็นธุรกิจที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ในปัจจุบันประเทศไทยมีบริษัทที่ดำเนินธุรกิจการนำเข้าส่งออกเมล็ดพันธุ์ประมาณ 70 บริษัท และประมาณครึ่งหนึ่งเป็นบริษัทที่มีธุรกิจในการส่งออก โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ผักจัดว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีมูลค่าสูงและมีศักยภาพ โดยจะเห็นว่าในช่วง 6 ปีที่ผ่านมามีการขยายตัวสูงขึ้นถึง 4 เท่าตัว (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2547) สำหรับเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงก็จัดเป็นเมล็ดพันธุ์เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ในปี 2549 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์แคนตาลูป แตงกวา และแตงโมประมาณ 1.86, 171.11 และ 196.94 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2549) ส่วนการนำเข้ามีมูลค่าประมาณ 1.03, 9.19 และ 8.42 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2549)

การตรวจสอบโรคเพื่อการรับรองการปลอดศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

แนวโน้มของการปรับตัวของอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ในตลาดเมล็ดพันธุ์โลกในปัจจุบันมีการแข่งขันระหว่างประเทศผู้ส่งออกที่รุนแรงมากขึ้น สำหรับขั้นตอนในการรับรองเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกไปยังประเทศผู้ค้า ต้องมีการรับรองเรื่องการปลอดจากโรคและแมลงตามที่ประเทศ

นั้นๆ กำหนด ซึ่งบางประเทศต้องมีการรับรองในระดับแปลงผลิต บางประเทศต้องมีการรับรองเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออก ปัจจุบันหน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองในประเทศไทยคือ กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในทางกลับกันรัฐบาลก็เข้มงวดกับบริษัทที่นำเมล็ดพันธุ์เข้ามาจำหน่ายในประเทศมากขึ้น เพื่อเป็นการป้องกันมิให้เชื้อจากต่างประเทศเข้ามาปนเปื้อนในประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

ในกรณีการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงโม (watermelon seed) ไปยังประเทศเกาหลีใต้จะต้องมีข้อความที่ระบุไว้ชัดเจนในใบรับรองปลอดศัตรูพืช (phytosanitary certificate, PC) ว่า “เมล็ดพันธุ์เก็บเกี่ยวมาจากต้นพืชที่มีการตรวจสอบในระหว่างการเพาะปลูกและพบว่าปลอดจากเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)” (กรมวิชาการเกษตร, 2549) และการส่งเมล็ดพันธุ์เมลอน (melon seed) ไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา จะต้องมีข้อความที่ระบุไว้ชัดเจนในใบรับรองปลอดศัตรูพืชว่า “เมล็ดพันธุ์ได้ผ่านการทดสอบแล้วพบว่าปลอดจากเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (Syn. *Cucumber aucuba mosaic virus*)” (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

เทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CGMMV

เทคนิคทางซีรัมวิทยา

Yoon *et al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาของเชื้อไวรัส ZGMMV, KGMMV, CGMMV และ TMV ด้วยวิธี double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติซีรัมต่อเชื้อในแต่ละชนิด พบว่า เชื้อไวรัส ZGMMV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อ KGMMV แต่ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อ CGMMV และ TMV

Varveri *et al.* (2002) ศึกษาความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อไวรัส CGMMV Greek isolate ด้วยวิธี DAS-ELISA และ $F(ab')_2$-ELISA เปรียบเทียบกับวิธีการ immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) โดยการเจือจางเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ตั้งแต่ 1 ถึง 10^6 พิโคกรัม/มิลลิลิตร พบว่า วิธี DAS-ELISA สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ในระดับ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และวิธี $F(ab')_2$-ELISA สามารถตรวจสอบได้ในระดับ 100 พิโคกรัม/มิลลิลิตร

Ali *et al*. (2004) ใช้วิธี dot immunobinding assay ในการตรวจสอบพืชจำพวกแตงที่แสดงอาการด่าง แผลจุดเหลือง และบิดเบี้ยว ที่มีการปลูกช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาว ในประเทศปากีสถาน พบว่ามีการเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัส CGMMV คิดเป็น 46.9 % ของจำนวนตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 128 ตัวอย่าง

Boubourakas *et al.* (2004) เก็บรวบรวมวัชพืช 12 ชนิด จากแปลงปลูกแตงโมที่ได้รับผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อ CGMMV จำนวน 294 ตัวอย่าง ตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA และยืนยันผลอีกครั้งด้วยวิธี IC-RT-PCR ผลจากการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า มีวัชพืชจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อ ได้แก่ *Amaranthus balistoides, A. retroflexus, Chenopodium album, Heliotropium europaeum, Portulaca oleracea* และ *Solanum nigrum* เมื่อตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี IC-RT-PCR และนำตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV ไปบดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่เติม 0.01 M Na_2SO_4 และ 0.2% DIECA จากนั้นปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนในเลี้ยงแตงกวาและเมลอน พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคและแสดงอาการโรคได้

Boubourakas *et al.* (2004) ใช้วิธี DAS-ELISA ตรวจหาเชื้อในเมล็ดน้ำเต้า (bottle gourd) ที่เก็บจากต้นที่ถูกเชื้อ CGMMV เข้าทำลาย พบว่า มีการถ่ายทอดของเชื้อผ่านไปยังเมล็ดในส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด จำนวน 102 เมล็ดจากทั้งหมด 386 เมล็ด คิดเป็น 27% ซึ่งเมล็ดเหล่านี้จะใช้สำหรับเป็นเมล็ดพันธุ์ในการผลิตต้นตอ (root stock)

เทคนิคและวิธีการอื่นๆ

Martin *et al*. (2004) ศึกษาการจัดเรียงของอนุภาคไวรัสในแตงโมที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย 2 ชนิด คือ *Watermelon mosaic virus*-2 (WMV-2) และเชื้อ CGMMV เตรียมตัวอย่างในการศึกษาโดยใช้ใบจากต้นพืชอายุ 14 วันหลังจากปลูกเชื้อบนพื้นที่ใบขนาด 2 ตารางมิลลิเมตร ด้วยเทคนิค ultrathin sectioning จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า การจัดเรียงของอนุภาคไวรัสในแตงโมที่ถูกเชื้อ WMV-2 และเชื้อ CGMMV เข้าทำลาย มีอัตราส่วนในการจัดเรียงอนุภาคเป็น 1:9 โดยอนุภาคของเชื้อ WMV-2 เพียง 1 อนุภาคถูกล้อมด้วยอนุภาคของเชื้อ CGMMV จำนวน 9 อนุภาค นอกจากนี้ยังพบว่าพืชที่มีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่าง *Potyvirus*/*Tobamovirus* ชนิดอื่นๆ เช่น BlCMV/SHMV และ SMV/SHMV ใน black valentine bean ก็มีอัตราส่วนเป็น 1:9 เช่นเดียวกัน

Varveri *et al.* (2002) ใช้วิธีการ three-step IC-RT-PCR ในการตรวจเชื้อ CGMMV โดยในการทดลองแรกเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อในดินลึก 10-30 เซนติเมตร บริเวณรอบๆ พื้นที่เพาะปลูกแตงโมที่ถูกเชื้อ CGMMV ไอโซเลท GR7 เข้าทำลาย โดยละลายดินใน PBS-T ในอัตราส่วน 1:10 (กรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาตรวจสอบด้วยวิธี IC-RT-PCR และใช้สำหรับการปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนใบพืช ส่วนการทดลองในตอนที่สอง ปลูกต้นกล้าแตงกวาลงในดินที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ CGMMV เพื่อศึกษาอาการของโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อ และตรวจสอบด้วยวิธี IC-RT-PCR จากผลการทดลองในตอนที่หนึ่ง พบว่า วิธี IC-RT-PCR สามารถตรวจพบเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในดินที่เก็บไว้นานถึง 10 เดือน และแตงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยวิธีกลโดยใช้สารละลายดิน จำนวน 6 จาก 10 ต้น และจากผลการทดลองตอนที่สอง พบว่า เมื่อใช้วิธี IC-RT-PCR ตรวจหาเชื้อ CGMMV ในต้นกล้าแตงกวาที่ปลูกในดินที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อในต้นกล้าดังกล่าวจำนวน 5 จาก 10 ต้น

Suehiro *et al.* (2005) ใช้เทคนิค simple-direct-tube RT-PCR (SDT-RT-PCR) ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV โดยนำใบพืชเป็นโรคมาบดใน PBS-T ในอัตรา 1:1 (w/v) เจือจางน้ำคั้นที่ได้อีกครั้งในอัตรา 1:10 เติมน้ำคั้นใบพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน PCR tube (0.5 ml, polypripylene) ทิ้งไว้นาน 15 นาที แล้วล้างด้วย PBS-T 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษพืช แล้วเติม DEPC-water (diethylpyrocarbonate–treated water) ที่เติม RNase inhibitor (15 unit) บ่มที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (denature) เสร็จแล้วจุ่มลงในน้ำแข็ง 1 นาที จะได้ viral RNA สำหรับใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR หลังจากตรวจสอบผลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า SDT-RT-PCR สามารถตรวจสอบและให้ผลเป็นบวกเมื่อเจือจางน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค 10 เท่า แต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นที่มีการเจือจาง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบวิธีการนี้กับ IC-RT-PCR พบว่า วิธีการ SDT-RT-PCR มีค่าความไวต่ำกว่า อย่างก็ตามวิธีการ SDT-RT-PCR ก็ยังถือว่าเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งของไวรัส CGMMV และพันธุ์แตงกวาที่ใช้ในการศึกษา

แหล่งของไวรัส CGMMV เชื้อในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์ใบน้ำเต้าที่มีเชื้อ CGMMV จาก ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ซึ่งได้นำมาแยกเชื้อให้ได้ไวรัสสายพันธุ์เดี่ยว โดยบดใบน้ำเต้าใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 อัตราส่วน 1:10 ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลโดยทาน้ำคั้นลงบนใบของ *C. amaranticolor* เมื่อพืชแสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) ตัดแผลดังกล่าวไปบดในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อแผล และปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนใบเลี้ยงแตงกวา แตงโม และน้ำเต้าอายุ 7 วันหลังจากเมล็ดงอก แผลละ 1 ต้น เมื่อพืชแสดงอาการของโรคเก็บตัวอย่างใบพืชไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อและเรียกชื่อไวรัสที่แยกได้ และนำมาใช้ในการศึกษาต่อไปว่า CGMMV ไอโซเลท Bg (CGMMV-Bg)

พันธุ์พืชที่ในการศึกษา ได้แก่ แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) บริษัทเจียไต๋ Lot.No. 5408 940710 แตงโมพันธุ์ “แตงโมดำ” บริษัทเจียไต๋ Lot.No. 84138 811202 และน้ำเต้าผลยาวพันธุ์พื้นเมือง จากกิ่งอำเภอเขวาสินรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ เป็นพืชทดสอบ

2. การเตรียมเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* บริสุทธิ์

เก็บใบน้ำเต้าที่แสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ CGMMV-Bg เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Gooding *et al.* (1967) โดยบดใบพืชแช่แข็งในเครื่องบด (blender) เติม 0.05 M phosphate buffer, pH 7.6 ที่มี 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol อัตรา 4 มิลลิลิตร ต่อใบพืช 1 กรัม กรองด้วยผ้าขาวบาง 2-4 ชั้น เก็บน้ำคั้นที่กรองได้มาเติม n-buthanol อัตรา 9.3 มิลลิลิตร ต่อปริมาตรของน้ำคั้นพืช 100 มิลลิลิตร กวนสารผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเศษซากพืชด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนน้ำใส เติม polyethylene glycol (PEG, MW 6000) อัตรา 4 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร กวนจนละลาย นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งละลายตะกอนไวรัสด้วย 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อปริมาตรของน้ำคั้นพืชตั้งต้น 100 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน PEG ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาเติม NaCl และ PEG อัตราส่วน 0.4 กรัม ต่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนไวรัสด้วย 0.01 phosphate buffer, pH 7.6 อัตรา 2 มิลลิลิตร ต่อปริมาตรของน้ำคั้นพืชตั้งต้น100 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน PEG ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสซึ่งเป็นไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ (partially purified virus) ที่ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

จากนั้นเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธี sucrose gradients centrifugation เตรียมสาร ละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40, 30, 20 และ 10% ใน 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 ดูดสารละลายน้ำตาลซูโครส ปริมาตร 3.3, 2.6, 2.6 และ 3.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นชนิดใส (ultraclear centrifuge tube) เป็นชั้นๆ ตามลำดับ จากก้นหลอด เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเติม CGMMV ค่อนข้างบริสุทธิ์ ที่เตรียมได้ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ที่ผิวหน้าของสารละลายน้ำตาลซูโครส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 30,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที ใน SW.41 Ti rotor เก็บแถบสีขาวของไวรัสและเติม 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไวรัสที่ 40,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 90 นาที ละลายตะกอนไวรัสด้วย 0.01 M phosphate buffer, pH 7.6 เติม NaN_3 0.02% เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส คำนวณความเข้มข้นของไวรัส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 นาโนเมตร และคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของไวรัสบริสุทธิ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{O.D.}_{260}}{\text{extinction coefficient}}$$

ใช้ค่า extinction coefficient ($E^{0.1\%}_{260\ nm}$) ของเชื้อไวรัส CGMMV เท่ากับ 3.18 (Wetter *et al*., 1984) และคำนวณหาความบริสุทธิ์ของไวรัสบริสุทธิ์จากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ $O.D._{260}/O.D._{280}$ ซึ่งเท่ากับ 1.38 (Hollings *et al*., 1975)

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) โดยใช้ 12% separating gel และ 6% stacking gel นำตัวอย่างสารละลายไวรัสที่สกัดได้ผสมกับ 2x loading buffer (0.1% bromophenol blue, 4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol และ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายที่เตรียม

ได้ลงหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 40 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย staining solution (0.2% coomassie brilliant blue R-250 ที่ละลายใน 50% methanol และ 7% acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25% methanol และ 7% acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส CGMMV กับตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ พืชเป็นโรค พืชปกติ และแถบโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight markers Cat.No. SMO431, LabAid, USA)

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอนุภาคไวรัสที่เตรียมได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ดัดแปลงจากวิธีการของ Boubourakas *et al.* (2004) หยดสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ลงบนกริดที่เคลือบด้วยฟอร์มวา (formvar) และคาร์บอน (carbon) นาน 5 นาที ย้อมด้วย negative stain ที่ประกอบด้วย 2% uranyl acetate จากนั้นตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL 1200 EX (Jeol Ltd., Tokyo, Japan)

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV

3.1 โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากไก่ไข่

ใช้ไก่ไข่พันธุ์ Hisex อายุ 40 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 1.8-2.0 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง เก็บไข่ก่อนการฉีดแอนติเจนครั้งแรกเพื่อใช้เป็น negative control จากนั้นฉีดเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจนจำนวน 4 ครั้ง โดยในครั้งที่ 1 ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) บริเวณคอไก่ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ฉีดครั้งต่อมาอีก 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant (IFA) ด้วยอัตราส่วนเดิม และเก็บไข่ทุกวันหลังจากฉีดครั้งแรกไป 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์

เตรียมอิมมูโนโกลบูลินจากไข่แดง (yolk immunoglobulin, IgY) ของไข่ไก่ (ChIgY) ตามวิธีการของ สรรชัย และคณะ (2546) โดยแยกไข่แดงออกจากไข่ขาว ทำให้ไข่แดงแตกและวัดปริมาตร เจือจางไข่แดงด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ (pH 5.0) ในอัตราส่วน 1:10 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อกำจัดไขมันที่ 16,000x g เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วน

น้ำใสซึ่งมีแอนติบอดี (water soluble fraction, WSF) มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ Whatman # 2 นำส่วนน้ำใสที่กรองแล้วมาตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)]_2SO_4$ ในอัตราส่วน 0.39 กรัม/มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแอนติบอดีที่ 16,000x g เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และละลายตะกอนด้วย PBS อัตรา 0.2 เท่า ของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้น และเติม NaN_3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 % เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ก่อนนำ ChIgY ไปใช้งาน นำไป dialyze ใน PBS ข้ามคืน โดยเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ ChIgY ด้วยวิธี SDS-PAGE ใช้ 12% separating gel และ 6% stacking gel ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 40 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที ตามลำดับ คำนวณความเข้มข้นของ ChIgY ที่เตรียมได้จากไข่แดง ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และใช้ค่า extinction coefficient ของ IgY เท่ากับ 1.318 (Leslie *et al*., 1969) และคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของอิมมูโนโกลบูลิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{O.D.}_{280}}{\text{extinction coefficient}}$$

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ ChIgY ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยเจือจาง ChIgY ความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 6.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แบบ 3 เท่า (3-fold dilution) และใช้เชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม เป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบลงบน ELISA plate

ตรวจสอบความไวของ ChIgY ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยเจือจางเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นของไวรัสตั้งต้น 10,000 จนถึง 0.325 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเคลือบ ELISA plate และใช้ ChIgY ความเข้มข้น 7.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากไข่ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบ

3.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่าย

ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ โดยใช้กระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 3 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัม เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดในสัปดาห์แรก

เพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum, Ns) ก่อนการฉีดเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เข้าทางใต้ผิวหนังโดยผสมกับ CFA ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสัปดาห์แรก และฉีดแอนติเจนที่ผสมกับ IFA ในอัตราส่วน และปริมาตรเท่าเดิมอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 เริ่มเจาะเลือดในสัปดาห์ที่ 4 ทุกๆ สัปดาห์จนครบ 8 ครั้ง นำเลือดมาตั้งไว้ที่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกรีดรอบก้อนเลือด นำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนซีรัมและเติม 0.02% Na_3N เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

เตรียม แกมมา-อิมมูโนโกลบูลิน (γ-immunoglobulin, IgG) จากแอนติซีรัมกระต่าย (RIgG) โดยนำซีรัมไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของซีรัมไปตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ให้มีความข้นสุดท้ายเป็น 50% (v/v) หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแรงเหวี่ยง 10,000x g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS และนำไป dialyze ใน PBS นานข้ามคืน จากนั้นเตรียม RIgG ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้ rec Protein A-Sepharose (ZYMED, USA)

คำนวณความเข้มข้นของ RIgG โดยใช้ค่า extinction coefficient ของ IgG ที่ได้จากกระต่ายเท่ากับ 1.4 (Clark and Adams, 1977) และคำนวณโดยใช้สูตรเดียวกับ ข้อ 3.1

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาของ RIgG ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA และ DAS-ELISA โดยเจือจางเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ในน้ำคั้นใบแตงกวาและเมล็ดไม่เป็นโรคให้มีความเข้มข้นของไวรัสตั้งแต่ 0.72 ถึง 5,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจนในการทำปฏิกิริยา

3.3 การติดฉลากแอนติบอดีเพื่อใช้ในวิธี DAS-ELISA

จากนั้นติดฉลาก RIgG ด้วย alkaline phosphatase (RIgG-AP) โดยนำเอา RIgG ผสมรวมกับ alkaline phosphatase (Fermentas, USA) อัตราส่วน 1:2 (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร และนำไป dialyze ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8 ข้ามคืน เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (เติมครั้งละ 5 ไมโครลิตร

โดยในแต่ละครั้งผสมกันเบาๆ นานครั้งละ 3 นาที) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 1M ethanolamine ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป dialysis ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8 ข้ามคืน เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (Campbell,1991)

4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา

4.1 การฉีดกระตุ้นหนูเม้าส์ให้ผลิตแอนติบอดีต่อไวรัส CGMMV

ใช้หนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c อายุ 3 เดือน เป็นสัตว์ทดลอง ฉีดเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์เพื่อเป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนู 4 ครั้ง โดยในสัปดาห์ที่ 1 ฉีดเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ 100 ไมโครกรัม ที่ผสมกับ CFA อัตราส่วน 1:1 เข้าหน้าท้องหนู (intraperitoneal injection, IP) และฉีดแอนติเจนที่ผสม IFA อัตราส่วนเดิม สัปดาห์ละครั้งจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเก็บเลือดจากเส้นเลือดที่หางหนูในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากการฉีดครั้งแรก ตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธี indirect PTA-ELISA เลือกหนูที่มีค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมสูงสุดมาฉีดกระตุ้นด้วยไวรัสบริสุทธิ์ 200 ไมโครกรัม 3 วัน ก่อนทำการเชื่อมเซลล์

4.2 การเตรียมเซลล์มัยอีโลมา

นำเซลล์มัยอีโลมาสายพันธุ์ P3-X63-Ag8.653 มาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก complete medium (CM) ที่เติม 10% 8-azaguanine (8-Ag) นานประมาณ 1 สัปดาห์ โดยจะเปลี่ยนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง เลี้ยงเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ภายใต้สภาวะควบคุมที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิภายในตู้ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 80% เพิ่มปริมาณเซลล์มัยอีโลมาที่ผ่านการคัดเลือกใน CM โดยจะเปลี่ยนอาหาร 3 ครั้ง ภายในระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เลี้ยงเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ภายใต้สภาวะเดิมให้เซลล์อยู่ในระยะ exponential phase และมีปริมาณมากพอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 400x g (1,500 รอบ/นาที) นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย calcium and magnesium free Hanks balanced salt solution (CMF Hanks) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI) ละลายตะกอนเซลล์ใน RPMI ที่อุ่น (37 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการเชื่อมเซลล์ในข้อ 4.4

4.3 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (Feeder cells)

นำต่อมธัยมัสจากหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c อายุไม่เกิน 1 เดือน ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ มาบดผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh ใน CMF Hanks ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 400x g นาน 10 นาที และล้างเซลล์ด้วย CMF Hanks จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย RPMI ละลายตะกอนเซลล์ในอาหาร HAT และเติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ (cell culture plate) ขนาด 96 หลุม เก็บภายใต้สภาวะเดียวกับข้อ 4.2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อนนำมาใช้งาน

4.4 การเชื่อมเซลล์ (Cell fusion)

เตรียมเซลล์ม้ามจากหนูเม้าส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นในข้อ 4.1 ในสภาพปลอดเชื้อนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh ล้างเซลล์ด้วย CMF Hanks จำนวน 2 ครั้ง และ RPMI 1 ครั้ง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 400x g นาน 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ใน RPMI ที่อุ่น (37 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมรวมกับเซลล์มัยอีโลมาที่เตรียมได้ในข้อ 4.2 ในอัตราส่วน 1:2 ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 400x g นาน 10 นาที เชื่อมรวมเซลล์โดยใช้ PEG (MW 1,400) โดยหยด PEG ทีละหยด ปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ภายในเวลา 1 นาที จากนั้นล้าง PEG ออกโดยค่อยๆ หยด RPMI ที่อุ่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ภายใน 5 นาที และเติม RPMI ที่อุ่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 400x g นาน 5 นาที ละลายตะกอนด้วยอาหาร HT ปริมาตร 15 มิลลิลิตร หยดสารแขวนลอยเซลล์ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ที่มีเซลล์พี่เลี้ยง ที่ก้นหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ข้อ 4.3) คัดเลือกเซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) โดยเลี้ยงในอาหารคัดเลือก HAT medium เก็บภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 4.2 เปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ลูกผสมเป็นระยะๆ รอให้เซลล์มีการเจริญและเพิ่มจำนวน จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีส้ม ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาตรวจการสร้างแอนติบอดีและตรวจสอบความจำเพาะ โดยวิธี TAS-ELISA (ข้อที่ 5.1.3) เพื่อคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส CGMMV แยกไฮบริโดมาให้เป็นโคลนเดี่ยว (monoclone) ด้วยวิธี limiting dilution (Köhler and Milstein, 1975; David, 1993)

4.5 การตรวจการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยวิธี Triple antibody sandwich-ELISA (TAS-ELISA)

เคลือบหลุม ELISA ด้วย RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติม blocking solution 5% SK หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เจือจางใน PBS หรือน้ำคั้นพืชที่บดใน PBSD อัตราส่วน 1:40 โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม เติม GAM ที่เจือจางใน 1% SK อัตราส่วน 1:5,000 โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างด้วย washing buffer (PBST) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง บ่มนานครั้งละ 5 นาที เติม substrate buffer บ่มเป็นเวลา 30-60 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Clark and Adams, 1977)

4.6 การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV เพื่อใช้ในการทดลอง

หลังจากการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมในอาหาร HAT พบเซลล์ลูกผสมโคลนเซลล์ 2F11 ซึ่งมีการเจริญเติบโตดี นำมาทำ limiting dilution จนครบ 3 รอบ คัดเลือกโคลน 2F11/D4/G10/G1 (รหัสโคลน MCG-2) มีค่า $O.D._{405}$ สูง (1.504) และผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CGMMV มาเพิ่มปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ (*in vitro*) โดยเลี้ยงในอาหาร HT เพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 เท่า ทุก 2-3 วัน หรือเมื่อเซลล์เจริญและอาหารเปลี่ยนเป็นสีส้ม จนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มใช้เวลาประมาณ 14 วัน ตั้งแต่วันเริ่มเลี้ยงเซลล์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ และนำไปแยกแอนติบอดีบริสุทธิ์ (MIgG) ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้ rec Protein A-Sepharose ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ MIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE และเตรียม MIgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase (MIgG-AP) ตามวิธีการของในข้อ 3.2

4.7 การตรวจสอบชนิดอิมมูโนโกลบูลินของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotyping)

ตรวจสอบชนิดของอิมมูโนโกลบูลินของโมโนโคลนอลของแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี TAS-ELISA โดยใช้ชุด Mouse MonoAb-ID Kit (AP) (Cat.no. 90-6650, Zymed, USA) เคลือบหลุม ELISA ด้วย RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติม blocking solution (5% skimmed milk ใน PBS, 5% SK) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ (ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่เจือจางใน PBS จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี MIgG ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทำปฏิกิริยากับ Rabbit Anti-Mouse Ig-class ต่างๆ จำนวน 1 หยด/หลุม และเติม

goat anti-mouse IgG conjugate (GAM) (Product No. B 8895, SIGMA, USA) ที่เจือจางใน 1.0% blocking solution อัตราส่วน 1:5,000 โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างด้วย washing buffer (PBST) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

5. วิธีการทางซีรัมวิทยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

5.1.1 Indirect plate trapped antigen-ELISA (indirect PTA-ELISA) บดตัวอย่างพืชใน carbonate coating buffer (CB) pH 9.6 ที่มี 0.2% sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (DIECA) หรือ CBD อัตราส่วน 1:40 และใช้น้ำคั้นพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับเคลือบ ELISA plate เป็นเวลา 60 นาที เติม 5% blocking solution (PBST ที่ผสม 5% SK) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที เติม primary antibody ที่เจือจางใน 1% SK ได้แก่ ChIgY (ความเข้มข้น 14.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) หรือ RIgG (ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที และเติม goat anti-chicken IgY conjugate (GACh) หรือ goat anti-rabbit IgG conjugate (GAR) (Pro. No. A 3687, SIGMA, USA) ที่เจือจางใน 1% SK อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างด้วย washing buffer (PBST) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม substrate buffer ที่มี p-nitrophenyl phosphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

5.1.2 Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) เคลือบ ELISA plate ด้วย RIgG ที่เจือจางใน CB ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 90 นาที เติม 5%SK ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที เติมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เจือจางใน PBS หรือน้ำคั้นพืชที่บดใน PBS ที่มี 0.2% DIECA (PBSD) อัตราส่วน 1:40 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที และเติมแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ที่ติดฉลาก ได้แก่ RIgG-AP หรือ MIgG-AP ที่เจือจางใน 1% SK อัตราส่วน 1:500

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 60 นาที โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม substrate buffer ที่มี p-nitrophenyl phosphate บ่มเป็นเวลา 30-60 นาที ในที่มืด หยุดปฏิกิริยาและนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

5.2 วิธี Dot Immunobinding Assay (DIBA)

บดเมล็ดแตงกวาใน PBSD อัตราส่วน 1:40 ใช้น้ำคั้นเมล็ด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ผึ่งให้แห้ง นำแผ่นเมมเบรนแช่ลงใน 5% SK เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นเติม RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่เจือจางใน 1% SK จากนั้นเติม GAR ที่เจือจางใน 1% SK อัตราส่วน 1:10,000 ตามลำดับ โดยในแต่ละขั้นตอนจะนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (ROCKER II MODEL 260350, Boekel Scientific) และล้างด้วย TBST จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรท nitro blue tetrazolium (NBT) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP/NBT) (ZYMED, USA) บ่มในที่มืดจนกว่าจะเกิดสี และหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น

5.3 วิธี Tissue Blot Immunoassay (TBIA)

ใช้ชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ลำต้นที่ส่วนยอด ลำต้นที่กิ่งแขนง ลำต้นที่โคนต้น ลำต้นเหนือระดับดิน 60 เซนติเมตร ราก และผลอายุ 21 วัน กดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน โดยกดค้างไว้นาน 5-10 วินาที ผึ่งให้แห้ง ต่อจากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับวิธี DIBA

6. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี ELISA

ตรวจสอบความจำเพาะของ ChIgY และ RIgG ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยเจือจาง ChIgY ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเจือจาง RIgG ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody และตรวจสอบความจำเพาะของ MIgG ด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ RIgG ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody และใช้ MIgG-AP อัตราส่วนเจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody ทดสอบกับน้ำคั้นพืชปกติ และน้ำคั้นจากพืชเป็นโรคไวรัสชนิดต่างๆ ทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ เชื้อไวรัสที่สามารถเข้าทำลายแตงได้

จำนวน 6 ชนิด คือ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Melon yellow spot virus* (MYSV) *Papaya ring spot virus* (PRSV) และ *Watermelon silver mottle virus* (WSMV) และเชื้อไวรัสอื่นๆ จำนวน 8 ชนิด คือ *Brome mosaic virus* (BMV), *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Potato virus Y* (PVY), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) แล *Tobacco mosaic virus* (TMV) ที่บดใน PBSD อัตราส่วน 1:40 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจสอบ

7. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการทางซีรัมวิทยาในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

7.1 การศึกษาความไว (Sensitivity) ของวิธีการในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV โดยวิธี indirect PTA-ELISA และ DAS-ELISA โดยเจือจางเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นของไวรัสตั้งแต่ 10,000 จนถึง 0.625 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับเป็นแอนติเจนในการทำปฏิกิริยา

7.2 การศึกษาประสิทธิภาพของในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างพืช

7.2.1 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในต้นแตงกวา

- การตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ 6 ส่วน ของแตงกวาที่ปลูกเชื้อ CGMMV อายุ 45 วัน หลังจากปลูกเชื้อ ได้แก่ หนวด ใบอ่อน ใบแก่ ดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย และผลอ่อน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างส่วนละ 13 ซ้ำ (ตารางที่ 1) จากนั้นบดตัวอย่างเนื้อเยื่อใน PBSD ในอัตราส่วน 1:40 ใช้น้ำคั้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค DAS-ELISA และดำเนินการตามวิธีการข้อ 5.1.2

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆ ของต้นแตงกวาที่เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบเชื้อ CGMMV

ส่วนของพืช	ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง
1. หนวด	บริเวณข้อที่ 3 นับจากปลายยอด
2. ใบอ่อน	ใบที่ 3 นับจากปลายยอด
3. ใบแก่	ใบที่ 25 นับจากปลายยอด
4. ดอกเพศผู้	ดอกแรกที่บานเต็มที่นับจากปลายยอด
5. ดอกเพศเมีย	ดอกแรกที่บานเต็มที่นับจากปลายยอด
6. ผลอ่อน	ผลแรกนับจากปลายยอดหลังจากดอกร่วงไม่เกิน 1 สัปดาห์

- การตรวจสอบด้วยวิธี TBIA เตรียมเนื้อเยื่อจากแตงกวาเป็นโรคอายุ 2 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ ใช้ตัวอย่างพืช 6 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้นบริเวณโคนต้น ลำต้นสูงจากระดับดิน 60 เซนติเมตร ลำต้นที่ยอด ลำต้นบริเวณกิ่งแขนง หนวด ดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย ผลอายุ 21 วัน หลังดอกบาน และผลอ่อน ผ่าชิ้นส่วนพืชตามแนวยาวและแนวขวาง จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนในข้อ 5.3

7.2.2 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา

- การเตรียมเมล็ดแตงกวา เตรียมเมล็ดที่จะนำมาตรวจสอบเชื้อ CGMMV โดยปลูกแตงกวาในถุงพลาสติกสีดำขนาด 12x20 นิ้ว จำนวน 4 ต้นต่อถุง ทั้งหมด 25 ถุง ปลูกเชื้อ CGMMV-Bg ลงบนใบเลี้ยงแตงกวาอายุ 7 วันหลังจากเมล็ดงอก รวบรวมผลจากจากต้นที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี indirect PTA-ELISA แยกเมล็ดออกจากผลอายุ 2 เดือน นำไปแช่ในน้ำกลั่นนานข้ามคืน ล้างให้สะอาดและผึ่งเมล็ดให้แห้ง นำตัวอย่างใส่ถุงปิดให้สนิท เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจสอบต่อไป

- การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวา เตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวาเพื่อใช้สำหรับการตรวจหาเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี ELISA โดยแช่เมล็ดแตงกวาใน CBD หรือ PBSD ในอัตราส่วน 1:40 (กรัม/มิลลิลิตร) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองแรกเปรียบเทียบวิธีในการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ การแช่เมล็ดแตงกวานานเป็นระยะเวลา 15, 30, 60 นาที และการบดเมล็ด โดยใช้น้ำแช่เมล็ด และน้ำคั้นเมล็ด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม เป็นแอนติเจน

สำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี DAS-ELISA ส่วนการทดลองที่สองเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นเมล็ด โดยนำน้ำคั้นไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนซากพืชที่มาจากการบดเมล็ดที่ 10,000x g เป็นเวลา 3 นาที และไม่นำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้น้ำคั้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม เป็นแอนติเจน จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

- การตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA ตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาจากผลเป็นโรคจำนวน 30 เมล็ด ด้วยวิธี DAS-ELISA ที่ใช้ RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody และใช้ MIgG-AP อัตราเจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody ตรวจเชื้อในเมล็ดแตงกวาแต่ละเมล็ด และน้ำคั้นส่วนที่เหลือนำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลลงบนใบเลี้ยงแตงกวาอายุ 7 วันหลังเมล็ดงอก จำนวน 1 ต้นต่อน้ำคั้นเมล็ดแต่ละเมล็ด ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อต้น เพื่อตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อที่อยู่ในเมล็ด สังเกตอาการของโรค และตรวจสอบเชื้ออีกครั้งด้วยวิธี DAS-ELISA หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

- การตรวจสอบด้วยวิธี DIBA ใช้น้ำคั้นจากการบดเมล็ดแตงกวาใน PBSD อัตราส่วน 1:40 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จากนั้นตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี DIBA ตามข้อ 5.2

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารปฏิบัติการวิจัยศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ใช้ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2548 ถึงเดือนมิถุนายน 2550

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

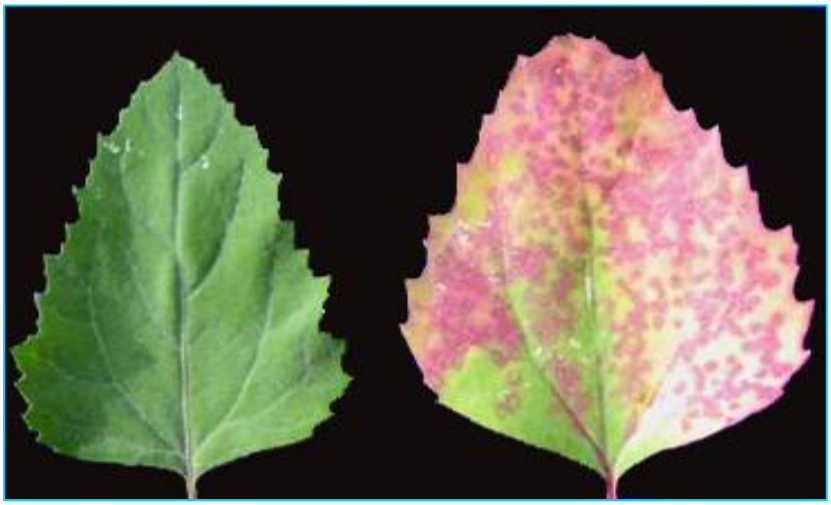
การปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากใบน้ำเต้าที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV โดยวิธีกลลงบนใบของ *C. amaranticolor* พบว่า พืชแสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 1) ซึ่งคล้ายกับเชื้อ CGMMV-GGR, CGMMV-M, CGMMV-NA, CGMMV-WGR (Boubourakas *et al*., 2004) CGMMV Watermelon strain (CGMMV-W) (Komuro *et al.*, 1968) และ CGMMV Indian strain ที่แยกได้จากน้ำเต้าเป็นโรค (Vasudeva *et al.*, 1949) ที่พบว่า สามารถก่อให้เกิดอาการแผลเฉพาะแห่งใน *C. amaranticolor* จากนั้นเมื่อตัดแผลเฉพาะแห่งแต่ละจุดไปบดใน 0.1 M phosphate buffer และปลูกเชื้อโดยวิธีกลลงบนใบเลี้ยงของน้ำเต้า แตงกวา และแตงโม พืชแสดงอาการ ดังนี้

- น้ำเต้า แสดงอาการใบด่างไม่ชัดเจน หลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 2ก) และแสดงอาการใบโป่งนูน และด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนเห็นได้อย่างชัดเจน หลังปลูกเชื้อ เป็นเวลา 2 เดือน (ภาพที่ 2ข)

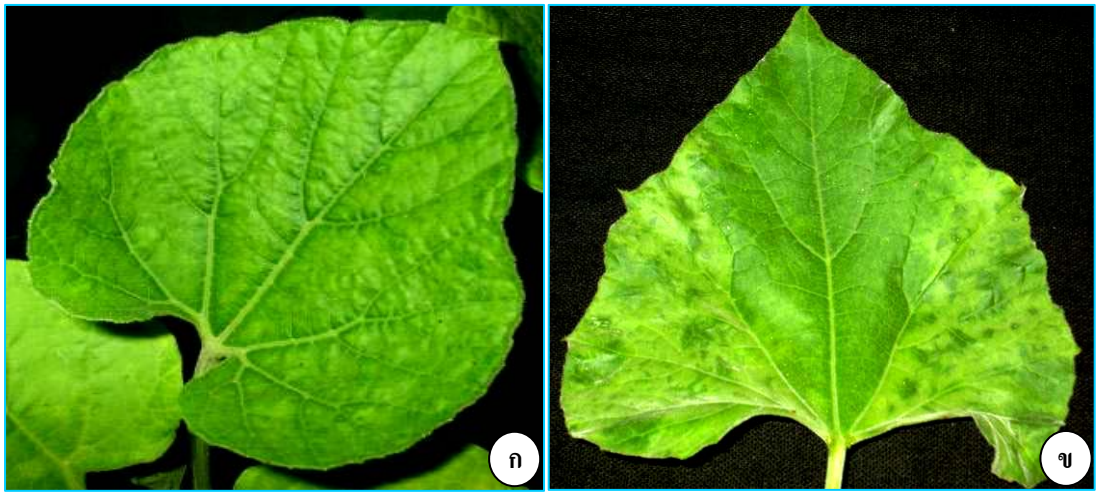
- แตงกวา แสดงอาการใบด่างทั่วทั้งต้น (ภาพที่ 3ก) และพบว่า บริเวณใบอ่อน มีลักษณะงองุ้ม ผิดรูปทรง หลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 3ข)

- แตงโม แสดงอาการใบด่างเขียวทั่วทั้งต้น ใบอ่อนมีลักษณะผิดรูปทรง และใบลดรูป เห็นได้อย่างชัดเจน หลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 4)

เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ CGMMV ในน้ำเต้า และแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ พบว่า ได้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์เฉลี่ยเท่ากับ 25.4 มิลลิกรัม ต่อใบพืชสด 100 กรัม ซึ่งได้ปริมาณใกล้เคียงกับ Varveri *et al*. (2002) ที่แยกเชื้อ CGMMV จากใบแตงกวา คือเท่ากับ 23 มิลลิกรัม ต่อใบพืชสด 100 กรัม เชื้อ CGMMV บริสุทธิ์มีสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.38 เท่ากับที่ Hollings *et al*. (1975) และ Wetter *et al*. (1984) รายงาน การตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ มีขนาดประมาณ 17.4 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5) ใกล้เคียงกับรายงาน



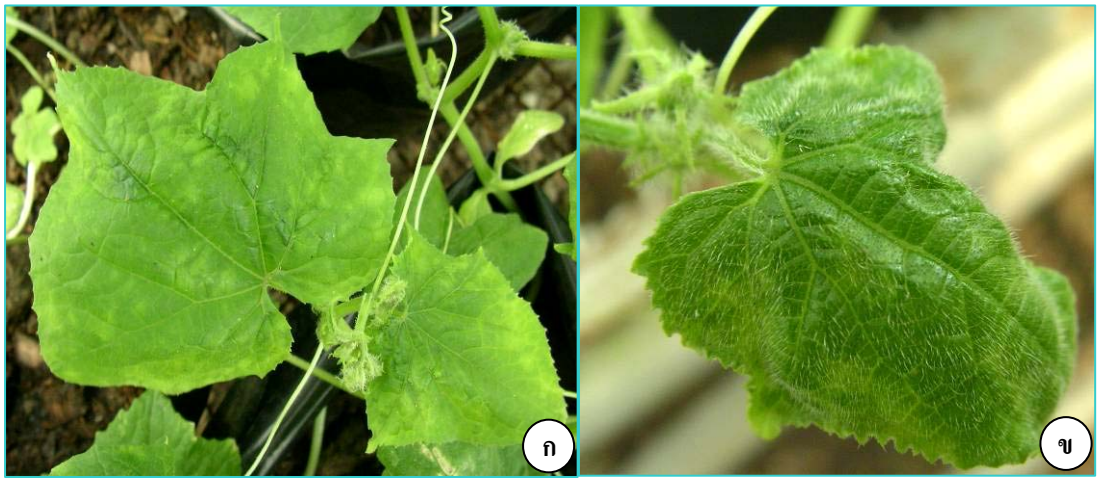
ภาพที่ 1 ลักษณะอาการแผลเฉพาะแห่งบน *C. amaranticolor* หลังปลูกเชื้อด้วยวิธีกลโดยใช้น้ำคั้นจากใบน้ำเต้าที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV เป็นเวลา 10 วัน (ขวา) เปรียบเทียบกับใบปกติ (ซ้าย)



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของเชื้อ CGMMV บนน้ำเต้า

(ก) แสดงอาการด่างไม่รุนแรง หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

(ข) แสดงอาการด่างเขียวอย่างชัดเจน หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของเชื้อ CGMMV บนแตงกวา

(ก) อาการด่าง บนแตงกวา หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

(ข) อาการใบด่างเขียว และงองุ้มที่ใบอ่อนของแตงกวา หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

ภาพที่ 4 ลักษณะอาการใบด่าง และลดรูปบนแตงโม หลังปลูกเชื้อ CGMMV เป็นเวลา 14 วัน

ของ Hollings *et al*. (1975) และ Antignus *et al*. (2001) คือ ขนาด 17.2 และ 17 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสมีความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร (ภาพที่ 6)

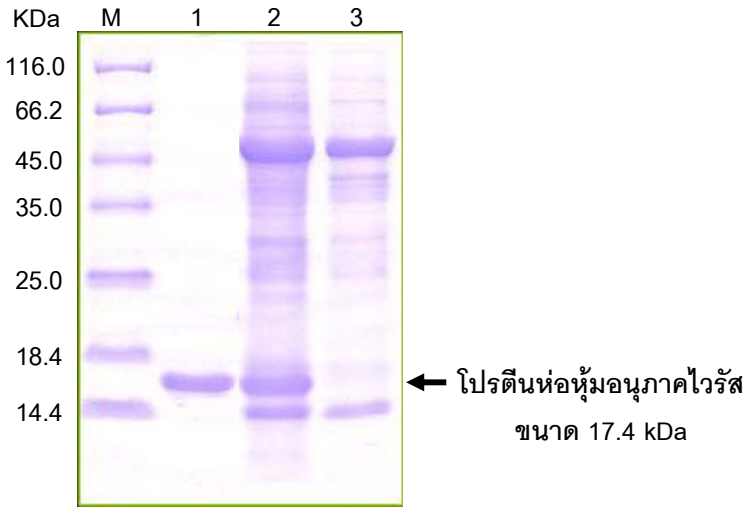
2. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV

2.1 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV จากไก่ไข่

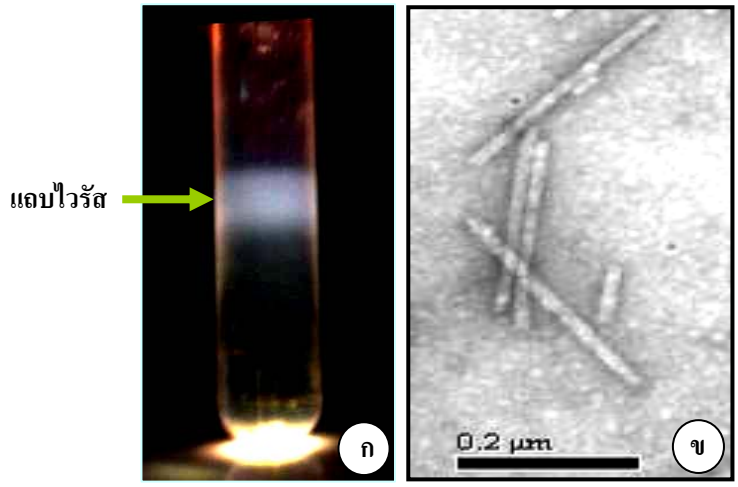
การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ในไก่ไข่ โดยเตรียมสารละลายแอนติบอดีจากไข่แดง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนไขมัน จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายตะกอนด้วย PBS อัตรา 0.2 เท่าของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้น ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 72 มิลลิลิตร และมีความเข้มข้นของ ChIgY เฉลี่ยเท่ากับ 6.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (25 มิลลิกรัม/ฟอง) เมื่อนำ ChIgY ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 63 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 7) การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ ChIgY ความเข้มข้น 6.96 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจน พบว่า มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 128,000-1,024,000 (ตารางที่ 2)

2.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV จากกระต่าย

เตรียมแอนติซีรัมจากเลือดกระต่ายทั้งหมด 8 ครั้ง จากนั้นนำไปเตรียม IgG บริสุทธิ์จากซีรัมกระต่าย (RIgG) โดยนำแอนติซีรัมไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ละลายตะกอนด้วย PBS อัตรา 0.25 เท่า ของปริมาตรซีรัมเริ่มต้น จากนั้นจึงนำไปแยก IgG บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity column chromatography ได้ RIgG บริสุทธิ์ ได้ทั้งหมด เท่ากับ 15.5 มิลลิกรัมต่อปริมาณแอนติซีรัมที่ใช้เตรียม 10 มิลลิลิตร เมื่อนำ RIgG บริสุทธิ์ ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 50 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ส่วนการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม กระต่าย ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นแอนติเจน พบว่า แอนติซีรัมจากกระต่ายมีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 51,000-1,638,400 โดยแอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าไตเตอร์สูงสุด (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนของเชื้อ CGMMV ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE
ช่อง M แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431
ช่อง 1 เชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ (ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ช่อง 3 น้ำคั้นใบแตงกวาเป็นโรค (เจือจาง 40 เท่า)
ช่อง 3 น้ำคั้นใบแตงกวาปกติ (เจือจาง 40 เท่า)



ภาพที่ 6 ไวรัส CGMMV ที่เตรียมให้บริสุทธิ์จากใบน้ำเต้าเป็นโรค ด้วยวิธี sucrose-gradient centrifugation และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
(ก) แถบสารละลายไวรัส CGMMV โดยวิธี sucrose-gradient centrifugation
(ข) อนุภาคของเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ ความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บไข่ และค่าไตเตอร์ของ แอนติบอดีที่ผลิตในไก่ไข่พันธุ์ Hisex

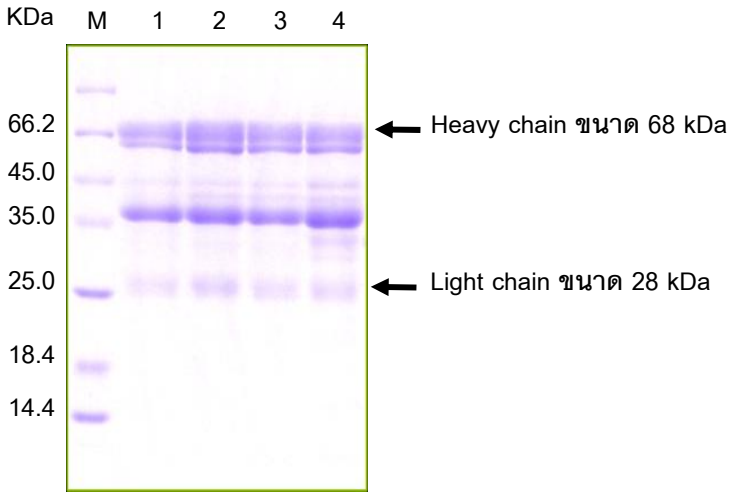
สัปดาห์ที่	แอนติเจน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชนิดแอดจูแวนด์	ปริมาตรที่ฉีด (มิลลิลิตร)	ปริมาตร ChIgY (มิลลิลิตร) [/1]	ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA[/2]
1	2.0	CFA[/3]	0.5	-	-
2	2.0	IFA[/4]	0.5	-	-
3	2.0	IFA	0.5	9.0	256,000
4	-	-	-	9.0	204,800
5	-	-	-	9.0	512,000
6	-	-	-	9.0	1,024,000
7	-	-	-	9.0	512,000
8	-	-	-	9.0	256,000
9	-	-	-	9.0	256,000
10	-	-	-	9.0	128,000

[/1] ปริมาตรของ ChIgY ที่ได้หลังจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และละลายตะกอนด้วย PBS อัตรา 0.2 เท่าของปริมาตรไข่แดงเริ่มต้น เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

[/2] ตรวจสอบโดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

[/3]complete Freund's adjuvant

[/3] incomplete Freund's adjuvant



ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ IgY ที่ผลิตได้จากไข่ไก่ ด้วยวิธี SDS-PAGE

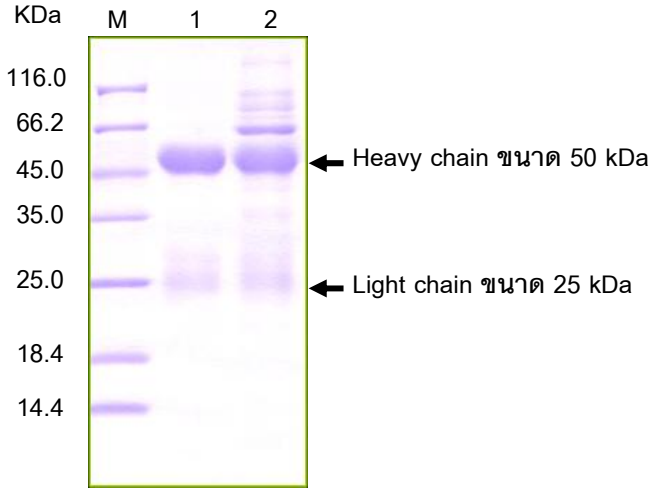
ช่อง M แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431

ช่องที่ 1 แอนติบอดีจากไข่ หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ช่องที่ 2แอนติบอดีจากไข่ หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ช่องที่ 3แอนติบอดีจากไข่ หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ช่องที่ 4แอนติบอดีจากไข่ หลังการฉีดกระตุ้นครั้งแรก เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 8 ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ RIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่อง M แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431

ช่อง 1 RIgG บริสุทธิ์ ที่เตรียมด้วยวิธี affinity column chromatography

ช่อง 2 ซีรัมที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity column chromatography

ตารางที่ 3 โปรแกรมการฉีดแอนติเจน การเก็บเลือด และค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตในกระต่ายพันธุ์ White New Zealand

สัปดาห์ที่	แอนติเจน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	แอดจูแวนด์	ปริมาตรที่ฉีด (มิลลิลิตร)	ชนิดซีรัม	ปริมาตรซีรัม (มิลลิลิตร)	ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA[/1]
1	-	-	-	Ns	4.0	-
2	1.0	CFA[/2]	1.0	-	-	-
3	1.0	IFA[/3]	1.0	-	-	-
4	-	-	-	As-1	15.5	51,200
5	-	-	-	As-2	15.0	51,200
6	-	-	-	As-3	15.0	102,400
7	-	-	-	As-4	16.0	204,800
8	-	-	-	As-5	15.0	204,800
9	-	-	-	As-6	15.0	1,638,400
10	-	-	-	As-7	12.0	6,553,600
11	-	-	-	As-8	14.0	1,638,400

[/1] ตรวจสอบโดยเจือจางแอนติซีรัมแบบ 2 เท่า และทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

[/2] complete Freund's adjuvant

[/3] incomplete Freund's adjuvant

3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา

หลังจากฉีดเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มของหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว จนครบ 4 ครั้ง และทดสอบแอนติซีรัมในสัปดาห์ที่ 5 ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่า มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 4,016,000, 1,004,000 และ 16,000 ตามลำดับ จึงนำหนูเม้าส์ตัวที่ 1 ซึ่งมีค่าไตเตอร์สูงสุดมาใช้ในการเชื่อมเซลล์ โดยฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดิมก่อนการเชื่อมเซลล์ 3 วัน

ในการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูเม้าส์หลังการกระตุ้นด้วยแอนติเจนกับเซลล์มัยอีโลมาได้เซลล์ไฮบริโดมา จำนวน 352 หลุม จากทั้งหมด 376 หลุม คิดเป็น 93.62% และมีจำนวนหลุมที่ให้ผลเป็นบวกกับเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ และน้ำคั้นจากแตงกวาเป็นโรค แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ จำนวน 5 หลุม ได้แก่ 2F11, 3F2, 1F8, 2F8 และ 3H12 (ตารางที่ 4) ทั้งนี้พบว่า 2F11 มีการเจริญเติบโตดี และมีค่า $O.D._{405}$ สูงสุด จึงคัดเลือกเซลล์ลูกผสมจากหลุมดังกล่าวไปทำ limiting dilution ต่อไป

เมื่อนำเซลล์ลูกผสมหลุม 2F11 ไปทำ limiting dilution จนครบ 3 รอบ และตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ลูกผสมด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่า มีจำนวน 5 โคลนที่ทำปฏิกิริยาได้ดีกับเชื้อ CGMMV แต่พบว่า โคลน 2F11/D4/G10/G1 (MCG-2) ให้ค่า S/N ratio สูงที่สุดเท่ากับ 11.02 (ตารางที่ 5) จึงเลือกโคลนดังกล่าวไปตรวจสอบไอโซไทป์ของแอนติบอดี ด้วยชุดทดสอบ Mouse Mono Ab Kit พบว่า โคลน MCG-2 สร้างอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG3 และสร้าง light chain ชนิด kappa (κ) เมื่อนำโคลนดังกล่าวมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร และแยก IgG บริสุทธิ์ (MIgG) ด้วยวิธี affinity column chromatography ได้ MIgG ทั้งหมดเท่ากับ 6.58 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร การตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า MIgG มีขนาดของ heavy chain และ light chain เท่ากับ 50 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 9) จากการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ MIgG ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่า มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 12,800

ตารางที่ 4 ผลของการเชื่อมเซลล์ม้ามของหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย CGMMV บริสุทธิ์ กับเซลล์มัยอีโลมา และตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของไฮบริโดมา ด้วยวิธี TAS-ELISA โดยใช้ไวรัสบริสุทธิ์ แตงกวาเป็นโรค และแตงกวาปกติ เป็นแอนติเจน

หลุมจากถาดเชื่อมเซลล์	ตัวอย่างที่ตรวจสอบ		
	CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แตงกวาเป็นโรค	แตงกวาปกติ
2F11	0.475 /1	1.405	0.224
3F2	0.363	0.984	0.185
1F8	0.181	0.575	0.127
2F8	0.364	0.676	0.130
3H12	0.209	0.673	0.282

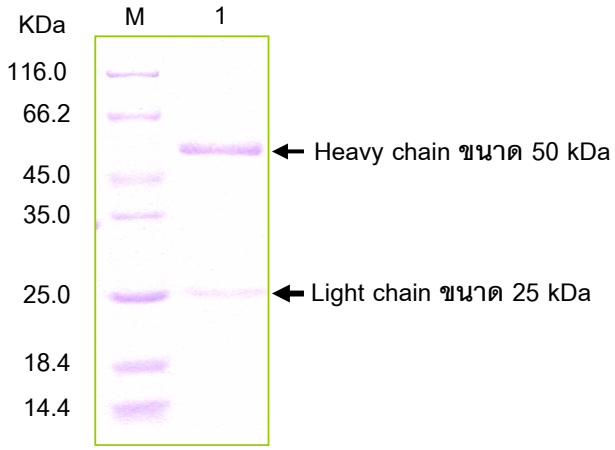
/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา จากการทำ limiting dilution ครั้งที่ 3 ด้วยวิธี TAS-ELISA

โคลนจากการทำ limiting dilution ครั้งที่3	รหัสโคลน	ตัวอย่างที่ตรวจสอบ			
		CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	แตงกวาเป็นโรค	แตงกวาปกติ	S/N ratio
2F11/F2/H5/C5	MCG-1	1.576 /1	1.472	0.187	7.87 /2
2F11/D4/G10/G1	MCG-2	1.504	1.445	0.129	11.20
2F11/G1/B3/C4	MCG-3	1.502	1.397	0.142	9.84
2F11/H1/G4/F3	MCG-4	1.489	1.434	0.175	8.19
2F11/C5/D6/G11	MCG-5	1.473	1.400	0.141	9.93

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

/2 ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ



ภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนของ MIgG ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่อง M แถบโปรตีนมาตรฐาน SM0431

ช่อง 1 MIgG บริสุทธิ์ ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา MCG-2

การทดลองนี้ได้ทำการเชื่อมรวมเซลล์มัยอีโลมากับเซลล์ม้ามหลายครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะได้จำนวนหลุมของเซลล์ลูกผสมจำนวนมาก (50-95%) ที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือก HAT แต่เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA กลับพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา จึงได้ทดลองเปลี่ยนรูปแบบของการตรวจสอบมาเป็นวิธี TAS-ELISA พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ และแตงกวาเป็นโรค แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ TMV และพืชปกติ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับ epitope ชนิดเดียว และเคยมีรายงานการใช้ไวรัสเคลือบ plate ที่เป็นพลาสติกโดยตรงอาจมีผลทำให้เกิดความเสียหายกับอนุภาคไวรัสบางส่วน (Altschuh *et al.*, 1985) ซึ่งถ้าหากตำแหน่งดังกล่าวบนอนุภาคไวรัสเป็นตำแหน่งสำคัญที่จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีอาจส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Cerovská *et al.* (1998) ที่พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PVY^{NTN} จากโคลน 4C1 ไม่สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ PVY^{NTN} ด้วยวิธี PTA-ELISA แต่สามารถตรวจสอบได้เมื่อใช้วิธี sandwich ELISA

4. วิธีการทางซีรัมวิทยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

4.1.1 วิธี Indirect PTA-ELISA จากการตรวจสอบความเข้มข้นของ ChIgY และ RIgG ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบว่า ปริมาณของ ChIgY ที่ทำให้ค่า S/N ratio สูงสุด คือ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 28.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมา ได้แก่ ความเข้มข้น 14.0 และ 7.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6) แต่พบว่าที่ความเข้มข้น 28.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TMV ได้เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากว่าเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในจีนัสเดียวกัน และเคยมีรายงานว่า เชื้อ CGMMV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อ TMV (Francki, 1988) จึงเลือกใช้ ChIgY ความเข้มข้น 14.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA เนื่องจากจะไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TMV

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ChIgY สำหรับวิธี indirect PTA-ELISA

ChIgY (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ใบแตงกวาเป็นโรคจาก CGMMV	ใบแตงกวาปกติ	ใบยาสูบเป็นโรคจาก TMV	ใบยาสูบปกติ	S/N ratio
28.0	1.731 /1	0.988	0.170	0.280	0.138	5.81 /2
14.0	1.496	0.700	0.129	0.183	0.117	5.43
7.0	1.080	0.387	0.097	0.121	0.101	3.99

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

/2 ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

ส่วนความเข้มข้นของ RIgG ที่ทำให้ค่า S/N ratio สูงสุด คือ ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ TMV รองลงมา ได้แก่ ความเข้มข้น 0.5 0.25 และ 0.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้ RIgG ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA

4.1.2 วิธี DAS-ELISA การทดลองครั้งนี้ทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ใช้เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบ (secondary antibody) 2 ชนิด ได้แก่ RIgG-AP และ MIgG-AP

การพัฒนาวิธี DAS-ELISA รูปแบบที่ 1 โดยเปรียบเทียบผลของการใช้แอนติบอดี 2 ชนิดในการเคลือบ ELISA plate คือ ChIgY หรือ RIgG และใช้ RIgG-AP เป็น secondary antibody ทำปฏิกิริยากับไวรัสบริสุทธิ์ และพืชปกติ ผลปรากฏว่า เมื่อใช้ RIgG ในการเคลือบ ELISA plate จะให้ค่า $O.D._{405}$ ที่สูงกว่า (1.808) และไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ (0.196) ในขณะที่การใช้ ChIgY ในการเคลือบ ELISA plate จะให้ผลเป็นลบกับ CGMMV บริสุทธิ์ (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกใช้ RIgG ความเข้มข้นของ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเคลือบ ELISA plate (ตารางที่ 9) จากการทดสอบอัตราเจือจาง RIgG-AP ที่ใช้เป็น secondary antibody โดยเจือจางที่อัตราส่วน 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 และทำปฏิกิริยากับพืชเป็นโรคและพืชปกติ พบว่า ค่าเจือจางของ RIgG-AP ที่อัตราส่วน 1:500 ให้ค่า S/N ratio สูงสุด ดังนั้น วิธี DAS-ELISA รูปแบบที่ 1 จะใช้ RIgG ความเข้มข้นของ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเคลือบ ELISA plate และใช้ RIgG-AP เจือจางในอัตราส่วน 1:500 เป็น secondary antibody (ตารางที่ 10)

การพัฒนาวิธี DAS-ELISA รูปแบบที่ 2 โดยเปรียบเทียบผลของการใช้ RIgG และ MIgG ในการเคลือบ ELISA plate และใช้ MIgG-AP เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบ ทำปฏิกิริยากับพืชเป็นโรค และพืชปกติ ผลปรากฏว่าการใช้ RIgG ในการเคลือบ ELISA plate จะให้ค่า S/N ratio มากกว่าการใช้ MIgG ในการเคลือบ ELISA plate ถึง 6 เท่า (ตารางที่ 11) ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ epitope มากกว่า 1 ชนิด บนอนุภาคไวรัส ทำให้ความสามารถในการจับอนุภาคเกิดได้ดีกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จับ epitope เพียง

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RIgG ในการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในวิธี indirect PTA-ELISA

RIgG (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ใบแตงกวาเป็นโรคจาก CGMMV	ใบแตงกวาปกติ	ใบยาสูบเป็นโรคจาก TMV	ใบยาสูบปกติ	S/N ratio
1.00	1.100 [/1]	1.144	0.083	0.145	0.077	13.78 [/2]
0.50	1.051	1.057	0.079	0.151	0.084	13.38
0.25	0.838	0.817	0.072	0.124	0.115	11.35
0.13	0.656	0.612	0.072	0.106	0.105	8.50

[/1] ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

[/2] ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบการใช้ ChIgY และ RIgG เคลือบ ELISA plate ด้วยวิธี DAS-ELISA และใช้ RIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody

แอนติบอดี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio
		CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แตงกวาปกติ	
ChIgY	14.0	0.157 [/1]	0.182	0.86 [/2]
RIgG	1.0	1.808	0.196	9.22

[/1] ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

[/2] ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของไวรัสบริสุทธิ์ต่อแตงกวาปกติ

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบความความเข้มข้นของ RIgG ในการเคลือบ ELISA plate ในวิธี DAS-ELISA และใช้ RIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody

RIgG (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ			S/N ratio
	CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แตงกวาเป็นโรค	แตงกวาปกติ	
2.0	3.128 /1	3.115	0.125	24.92 /2
1.0	2.937	2.567	0.095	27.02
0.5	1.772	1.227	0.089	13.79

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

/2 ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ RIgG-AP เพื่อใช้เป็น secondary antibody ในการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

อัตราเจือจางของ RIgG-AP	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio
	แตงกวาเป็นโรค	แตงกวาปกติ	
1:200	3.251 /1	0.110	29.55 /2
1:500	2.872	0.095	30.23
1:1,000	2.044	0.085	24.04
1:2,000	1.265	0.081	15.61

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

/2 ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบการใช้ RIgG และ MIgG เคลือบ ELISA plate ในวิธี DAS-ELISA และใช้ MIgG-AP เจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody

แอนติบอดี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio
		CGMMV บริสุทธิ์ (5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แตงกวาปกติ	
RIgG	1.0	2.609 /1	0.119	21.92 /2
MIgG	1.0	0.290	0.082	3.56

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

/2 ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

1 ชนิดเท่านั้น (ธารารัตน์ และคณะ, 2537) และจากการเปรียบเทียบอัตราเจือจางของ MIgG-AP ที่อัตรา 1:500, 1:1,000, 1:2,000 และ 1:3,000 เพื่อใช้เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบ พบว่า การเจือจาง MIgG-AP ที่อัตรา 1:500 จะให้ค่า S/N ratio สูงที่สุด (ตารางที่ 12) ดังนั้น วิธี DAS-ELISA รูปแบบที่ 2 จะใช้ RIgG ความเข้มข้นของ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเคลือบ ELISA plate และใช้ MIgG-AP อัตราเจือจาง 1:500 เป็น แอนติบอดีในการตรวจสอบ และใช้ในการทดลองต่อไป

จากการทดลองนี้ พบว่า ในภาพรวมการใช้ RIgG เคลือบ ELISA plate ให้ผลของปฏิกิริยาดีกว่า ChIgY และ MIgG และสามารถตรวจสอบเชื้อ CGMMV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อจำกัดของวิธี sandwich ELISA คือ ขนาด และตำแหน่งของ epitope ที่อยู่บนแอนติเจน แอนติเจนจะต้องมีตำแหน่ง epitope ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ต่างกันอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง และแอนติบอดีที่ใช้เคลือบ ELISA plate โดยแอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบต้องจับ และเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ตำแหน่ง epitope ได้ต่างกัน ไม่บดบังกันซึ่งจะช่วยให้แอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ ดังนั้น การเลือกใช้แอนติบอดีที่จะใช้เป็นแอนติบอดีในการตรวจสอบจึงกลายเป็นข้อจำกัดที่สำคัญประการหนึ่งของการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA (Crowther, 2001)

5. การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี ELISA

ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ChIgY, RIgG และ MIgG ด้วยวิธี ELISA โดยใช้น้ำคั้นจากพืชปกติ และพืชเป็นโรคไวรัสที่สามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตง จำนวน 6 ชนิด และไวรัสชนิดอื่นๆ จำนวน 8 ชนิด เป็นแอนติเจนในการตรวจสอบจากการตรวจสอบความจำเพาะของ ChIgY และ RIgG ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ผลปรากฏว่า ChIgY เกิดปฏิกิริยาข้ามได้เล็กน้อยกับไวรัสที่สามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตง ได้ 1 ชนิด คือ WSMV และเชื้อไวรัสอื่นๆ 2 ชนิด ได้แก่ MCMV และ CyMV ส่วน RIgG สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ และเชื้อไวรัสทั้ง 14 ชนิดที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 12 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ MIgG-AP เพื่อใช้เป็น secondary antibody ในการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

อัตราเจือจางของ MIgG-AP	ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ		S/N ratio
	แตงกวาเป็นโรค	แตงกวาปกติ	
1:500	2.651 [/1]	0.153	17.38 [/2]
1:1,000	0.830	0.075	11.13
1:2,000	0.507	0.079	6.46
1:3,000	0.262	0.078	3.38

[/1] ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

[/2] ค่า S/N ratio เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า $O.D._{405}$ ของแตงกวาเป็นโรคต่อแตงกวาปกติ

ส่วนการตรวจสอบความความจำเพาะของ MIgG ด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ และเชื้อไวรัสทั้ง 14 ชนิดที่นำมาทดสอบเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 13)

6. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการทางซีรัมวิทยาในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

6.1 การศึกษาความไวของวิธีการในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV

จากการตรวจสอบความไวของวิธี ELISA ที่พัฒนาได้ คือ indirect PTA-ELISA และ DAS-ELISA โดยเจือจาง CGMMV บริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นของไวรัส ตั้งแต่ 0.625-10,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร พบว่า วิธี DAS-ELISA มีความไวในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ได้ดีกว่าวิธี indirect PTA-ELISA โดยวิธี DAS-ELISA ที่ใช้ MIgG-AP เป็น secondary antibody มีความไวสูงสุด รองลงมาได้แก่ วิธี DAS-ELISA ที่ใช้ RIgG-AP เป็น secondary antibody และวิธี indirect PTA-ELISA ที่ใช้ RIgG และ ChIgY ตามลำดับ โดยสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ถึงแม้วิธี indirect PTA-ELISA ที่ใช้ ChIgY หรือ RIgG เป็น primary antibody ในงานวิจัยนี้จะมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ได้ต่ำกว่าวิธี DAS-ELISA แต่ก็ยังพบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างแตงกวาได้ดี เมื่อใช้ RIgG ในการทำปฏิกิริยา โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสทั้ง 14 ชนิด ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ

ตารางที่ 13 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV กับน้ำคั้นพืชเป็นโรคจากเชื้อ CGMMV และไวรัสอื่นเปรียบเทียบกับพืชปกติ ด้วยวิธี ELISA

แอนติบอดี	เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง						เชื้อไวรัสอื่นๆ							
	CGMMV	CMV	CACV	MYSV	PRSV	WSMV	BMV	CVMV	MCMV	CymMV	MDMV	PVY	SCMV	TMV
ChIgY [/1]	+++	-	-	-	-	++	-	-	+	+++	-	-	-	-
RIgG [/2]	+++ [/4]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIgG [/3]	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[/1] ตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้ ChIgY ความเข้มข้น 14.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody

[/2] ตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA โดยใช้ RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody

[/3] ตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody และใช้ MIgG-AP อัตราส่วนเจือจาง 1:500 เป็น secondary antibody

[/4] การตรวจสอบที่ให้ผลบวก แบ่งออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่

(+) ค่า O.D. $_{405}$ ต่ำกว่า 0.5

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

(+++) ค่า O.D. $_{405}$ ตั้งแต่ 1.0-1.5

(++++) ค่า O.D. $_{405}$ ตั้งแต่ 1.5 ขึ้นไป

ตารางที่ 14 ความไวของวิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นจากใบและเมล็ดแตงกวาปกติ

วิธี ELISA	Primary antibody		Secondary antibody		CGMMV บริสุทธิ์ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)								Negative control [4]
	ชนิด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ชนิด	อัตราส่วนเจือจาง	10,000	1,000	100	10	5	2.5	1.25	0.625	
indirect PTA-ELISA	RIgG	1.0	GAR [1]	1:10,000	2.700 [3]	1.014	0.177	0.117	0.251	0.080	0.077	0.077	0.076
	ChIgY	14.0	GACh [2]	1:7,500	1.797	0.250	0.160	0.132	0.244	0.261	0.160	0.785	0.118
DAS-ELISA	RIgG	1.0	RIgG-AP	1:500	2.779	1.080	0.256	0.212	0.152	0.161	0.156	0.187	0.088
	RIgG	1.0	MIgG-AP	1:500	2.840	2.817	1.243	0.293	0.196	0.134	0.112	0.102	0.095

[1] Goat anti-chicken IgY conjugated with alkaline phosphatase

[2] Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase

[3] ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของ Negative control จัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

[4] ผลของปฏิกิริยาระหว่างซีรัมปกติกับบัฟเฟอร์ (CBD หรือ PBSD)

งานวิจัยนี้พบว่า เมื่อปลูกเชื้อ CGMMV ลงบนใบเลี้ยงแตงกวาปกติ แตงกวาจะแสดงอาการใบด่างทั่วทั้งต้นหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 10-14 วัน สอดคล้องกับ รัชนี และคณะ (2549) ซึ่งรายงานว่า อาการหลังปลูกเชื้อ 14 วัน เป็นตัวแทนที่ดีสำหรับการประเมินระดับการเกิดโรค สำหรับคัดเลือกสายพันธุ์แตงกวาพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ CGMMV นอกจากนี้ Moreno *et al*. (2004) พบว่า หลังปลูกเชื้อเพียง 14 วัน ก็สามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ได้ในส่วนต่างๆ ของแตงกวาด้วยวิธี immonolocalization ดังนั้นหากเลือกใช้แอนติบอดีที่เหมาะสมแล้ววิธีการนี้ก็ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อในตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของต้นแตงกวาได้เช่นกัน เนื่องจากวิธี ELISA จะช่วยในการตรวจสอบเบื้องต้นในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนมากได้สะดวก และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าวิธี PCR โดยมีรายงานการนำวิธี PTA-ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV เช่น การพัฒนาวิธีการมาตรฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์แตงกวาต้านเชื้อ CGMMV (รัชนี และคณะ, 2549) การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในต้นแตงโมเพื่อคัดเลือกต้นแตงโมที่ต้านทานต่อเชื้อ CGMMV หลังจากได้รับการถ่ายยีนให้ต้านทานต่อเชื้อ CGMMV (Park *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้พบว่า ในการตรวจสอบด้วยวิธี indirect PTA-ELISA พบปริมาณของเชื้อ CGMMV ในเมล็ดเป็นโรคมีน้อยกว่าในใบแตงกวาเป็นโรคถึง 4 เท่า (ตารางผนวกที่ 1)

สำหรับวิธี DAS-ELISA ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 วิธี คือ วิธี DAS-ELISA ที่ใช้ RIgG-AP และวิธี DAS-ELISA ที่ใช้ MIgG-AP เป็น secondary antibody สามารถนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในระดับโรงเรือนปลูกพืชทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความไวที่ใกล้เคียงกัน แต่พบว่า วิธี DAS-ELISA ที่ใช้ MIgG-AP เป็น secondary antibody สามารถตรวจสอบเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ในน้ำคั้นเมล็ดได้ที่ระดับความเข้มข้นของไวรัสที่ต่ำกว่า วิธี DAS-ELISA ที่ใช้ RIgG-AP เป็น secondary antibody ประมาณ 3 เท่า และมีความไวสูงกว่า วิธี DAS-ELISA ที่พัฒนาขึ้นโดย Varveri *et al*. (2002) ซึ่งรายงานไว้ที่ระดับ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี RT-PCR ซึ่งมีความไวถึง 0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Varveri *et al*., 2002) ถึงแม้ว่าวิธี ELISA จะมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ที่ต่ำกว่าวิธี PCR แต่การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ก็มีข้อดีหลายประการ คือ เป็นวิธีการที่ตรวจสอบได้ง่ายกว่า (Martin,1996 ; Lee, 2004) สามารถวัดผลได้ด้วยเครื่อง microplate reader และประเมินผลในรูปของค่า O.D. $_{405}$ ทำให้สะดวกและง่ายต่อการวิเคราะห์ผล เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ โดยตรวจสอบได้มากถึง 600-800 ตัวอย่าง/คน/วัน (Martin,1996) นอกจากนี้สารเคมีที่ใช้มีราคาไม่แพง และไม่เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่เป็นอันตราย (Crowther , 2001) จากการรายงานของ Lee (2004) พบว่า การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดน้ำเต้าด้วยวิธี RT-PCR และวิธี ELISA

ให้ผลการตรวจสอบที่ใกล้เคียงกัน โดยการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พบเมล็ดน้ำเต้าติดเชื้อ CGMMV 24 เมล็ด จาก 24 เมล็ด (100%) และการตรวจสอบด้วย ELISA พบเมล็ดติดเชื้อ CGMMV จำนวน 23 เมล็ด จาก 24 เมล็ด (95.80%) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการนำวิธี DAS-ELISA ไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงบางชนิด Boubourakas *et al*. (2001) ตรวจสอบเมล็ดน้ำเต้าพบการติดเชื้อในเมล็ด (infected seed) 27% และ Shim *et al*. (2006) ตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงโมด้วยวิธี DAS-ELISA เช่นกัน พบการถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ด (seed transmission) ถึง 24%

6.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการทางซีรัมวิทยาในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างพืช

6.2.1 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในต้นแตงกวา ด้วยวิธี DAS-ELISA

จากการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นตัวอย่างแตงกวา อายุ 45 วัน หลังปลูกเชื้อ จำนวน 6 ตำแหน่งๆ ละ 13 ตัวอย่าง ด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า ค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยของน้ำคั้นจากเนื้อเยื่อบริเวณ หนวด ใบอ่อน และใบแก่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่าใกล้เคียงกับการใช้น้ำคั้นจากดอกตัวผู้ และดอกตัวเมีย โดยมีค่าเท่ากับ 2.512, 2.409, 2.526, 2.324 และ 2.149 ตามลำดับ ส่วนน้ำคั้นจากผลอ่อน พบว่ามีค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยเท่ากับ 1.130 ซึ่งต่ำกว่าส่วนอื่นๆ ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 15)

การตรวจเชื้อ CGMMV ในแตงกวาด้วยเทคนิค TBIA พบว่า วิธี TBIA ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน และสามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ในแตงกวาได้ทุกส่วนที่นำมาตรวจสอบ (ภาพที่ 10) โดยมีรายงานว่า หลังจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายพืช เชื้อจะมีการเคลื่อนย้ายไปยังท่อลำเลียงอาหาร และเคลื่อนที่ควบคู่ไปกับการขนส่งสารอาหารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจากแหล่งผลิตไปยังส่วนต่างๆ ของพืช ทำให้เชื้อไวรัสสามารถเคลื่อนที่กระจายไปได้ทั่วทั้งต้น (Haywood *et al*., 2002; Lucas *et al*., 1999; Moreno *et al*., 2004) นอกจากนี้ Moreno *et al*. (2004) รายงานว่า เชื้อ CGMMV สามารถเคลื่อนที่แพร่กระจายทั่วทั้งต้นได้ทั้งในท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหาร โดยพบการสะสมเชื้อปริมาณมากที่บริเวณเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารโดยเฉพาะที่ใบอ่อน ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงทำให้ตรวจพบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างแตงกวาทุกส่วนที่นำมาตรวจสอบ

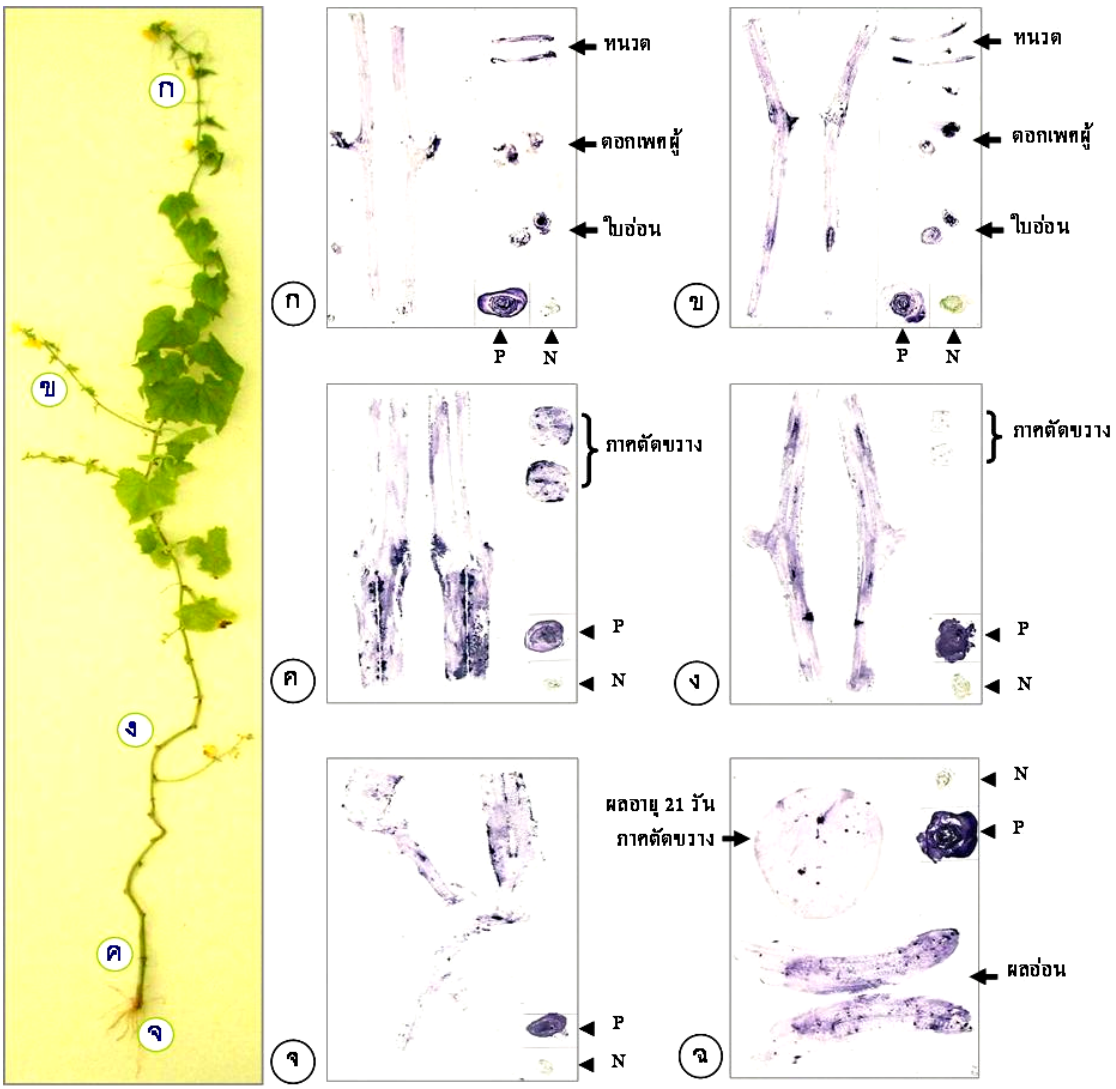
ตารางที่ 15 ผลจากการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของแตงกวาด้วยวิธี DAS-ELISA

ตัวอย่างพืช	หนวด	ใบอ่อน	ใบแก่	ดอกเพศผู้	ดอกเพศเมีย	ผลอ่อน	F-test
แตงกวาปกติ	0.104 [/1]	0.095	0.105	0.111	0.104	0.104	ns
แตงกวาเป็นโรค	2.512 a	2.409 ab	2.526 a	2.324 b	2.149 c	1.130 d	*

[/1] ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 13 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

[*] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ตัวเล็กในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

[ns] ไม่แตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 10 ผลการตรวจเชื้อ CGMMV ในเนื้อเยื่อของแตงกวา ด้วยวิธี TBIA

(ก) เนื้อเยื่อบริเวณยอด

(ข) เนื้อเยื่อบริเวณยอดของกิ่งแขนง

(ค) ลำต้นที่โคนต้น

(ง) ลำต้นสูงจากระดับดินปลูก 60 เซนติเมตร

(จ) เนื้อเยื่อบริเวณราก หลังดอกบาน

(ฉ) ผลอ่อน และผลอายุ 21 วัน

(P) positive control (ใบแตงกวาเป็นโรค)

(N) negative control (ใบแตงกวาปกติ)

จากการทดลองจะเห็นว่า ค่า $O.D._{405}$ ของตัวอย่างน้ำคั้นที่มาจากผลแตงกวาอ่อนให้ค่าต่ำสุด ทั้งนี้เนื่องจากผลแตงกวามีการเจริญเติบโตที่เร็วมาก จากการรายงานของ ทิวา และคณะ (2537) พบว่า ผลแตงกวามีการขยายขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางในอัตรา 1.41 เท่า ความยาวในอัตรา 1.36 เท่า และมวลเป็น 2.75 เท่า ต่อวัน และในผลแตงกวายังประกอบด้วยน้ำถึง 95.4% ดังนั้นจึงมีโอกาสที่เนื้อเยื่อจากผลจะมีสัดส่วนที่ยังไม่ติดเชื้อสูงกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ที่มีอัตราการเจริญช้ากว่าผล เช่น หนวด ใบอ่อน ใบแก่ ดอกตัวผู้ และดอกตัวเมีย ทำให้ให้ค่า $O.D._{405}$ ของการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในผลมีค่าต่ำ ในขณะที่ส่วนอื่นๆ ยังคงมีค่าที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี ELISA และวิธี TBIA ในทุกชิ้นส่วนของต้นแตงกวาเป็นโรคที่นำมาตรวจสอบ

6.2.2 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา

- การเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV จากการศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวา โดยการแช่เมล็ดใน CBD หรือ PBSD และการบดเมล็ด พบว่าการแช่เมล็ดใน PBSD เป็นเวลา 15, 30, และ 60 นาที ให้ค่า $O.D._{405}$ ต่ำ (0.228-0.287) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่า มีความแตกต่างจากตัวอย่างที่ได้จากการบดเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า $O.D._{405}$ ที่ได้จากวิธีบดเมล็ดมีค่าสูงสุด รองลงมา ได้แก่ น้ำแช่เมล็ดที่ระยะเวลา 60, 30 และ 15 นาที โดยมีค่าเท่ากับ 1.446, 0.287, 0.254 และ 0.228 ตามลำดับ ซึ่งค่า $O.D._{405}$ จากทั้ง 4 วิธี ยังคงให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก เมื่อเทียบกับเมล็ดจากผลปกติ (ตารางที่ 16) ส่วนการเปรียบเทียบผลของการเตรียมตัวอย่างด้วยการบดเมล็ด และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเทียบกับไม่ปั่นเหวี่ยง พบว่า ค่า $O.D._{405}$ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 17) ดังนั้นในการเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวาสำหรับการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี DAS-ELISA จึงควรใช้วิธีบดเมล็ดในบัฟเฟอร์ โดยไม่ต้องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

- การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา จากการตรวจสอบการติดเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาจากผลเป็นโรค ด้วยวิธี DAS-ELISA พบเมล็ดแตงกวาที่ติดเชื้อ CGMMV จำนวน 27 เมล็ด จากทั้งหมด 30 เมล็ด เมื่อนำตัวอย่างน้ำคั้นเมล็ดจากแต่ละเมล็ดทั้ง 30 ตัวอย่าง ไปปลูกเชื้อลงบนใบเลี้ยงแตงกวาปกติ ตัวอย่างละ 1 ต้น ตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี DAS-ELISA หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน พบว่า แตงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อจากน้ำคั้นเมล็ดที่ตรวจไม่พบเชื้อ CGMMV

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดแตงกวา ด้วยวิธีแช่เมล็ด และบดเมล็ด เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

ตัวอย่าง	วิธีแช่เมล็ด			วิธีบดเมล็ด	F-test
	15 นาที	30 นาที	60 นาที		
เมล็ดจากผลปกติ	0.074 /1	0.073	0.072	0.076	ns
เมล็ดจากผลเป็นโรค	0.228 b	0.254 b	0.287 b	1.446 a	*

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 14 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ตัวเล็กในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 17 ผลจากการเตรียมตัวอย่างด้วยการปั่นเหวี่ยง และไม่ปั่นเหวี่ยงน้ำคั้นเมล็ด เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

ตัวอย่างพืช	ไม่ปั่นเหวี่ยง	ปั่นเหวี่ยง	F-test
เมล็ดจากผลปกติ	0.114 /1	0.110	ns
เมล็ดจากผลเป็นโรค	1.844	1.485	ns

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเฉลี่ยมาจาก 10 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติ ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

(ตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4) ไม่แสดงอาการของโรคและให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี DAS-ELISA ซึ่งตรงกับผลการตรวจสอบในเบื้องต้น ส่วนต้นแตงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อจากน้ำคั้นเมล็ดที่ตรวจพบ CGMMV ทั้ง 27 ตัวอย่าง พบว่า มี 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 5, 14, 18, 19, 28 และ 29 ที่ไม่ทำให้แตงกวาทดสอบแสดงอาการของโรค และให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี DAS-ELISA และมี 21 ตัวอย่าง ที่ทำให้ต้นแตงกวาทดสอบแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 6-13, 15-17, 20-27 และ 30 (ตารางที่ 18) โดยมีลักษณะอาการหลายแบบ เช่น อาการเส้นใบใส (vein clearing) ใบด่างไม่ชัดเจน (mild mottle) ใบด่างเขียว (green mottle) ใบด่างชัดเจน (mosaic) เนื้อใบหดย่นตามแนวเส้นใบ (wrinkle) อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนและแผ่นใบมีลักษณะโป่งขึ้นเล็กน้อย ในจำนวนนี้พบเพียงตัวอย่างที่ 1 ซึ่งไม่ทำให้แตงกวาทดสอบแสดงอาการ

จากงานทดลองนี้จะเห็นได้ว่า เมล็ดจำนวน 30 เมล็ด จากผลแตงกวาที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV ทั้งหมด 15 ผล มีการติดเชื้อมากถึง 86% เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA และเมื่อตรวจสอบด้วยการปลูกเชื้อบนต้นแตงกวา พบว่า เชื้อ CGMMV จากน้ำคั้นเมล็ดยังคงความสามารถในการก่อโรคได้เท่ากับ 70% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด แสดงว่าเชื้อ CGMMV ที่ติดไปกับเมล็ดมีทั้งเชื้อที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรค (non-infectious virus) และสามารถก่อให้เกิดโรคได้ (infectious virus) ในพืชทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lee (2004) ที่พบว่า เมื่อตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดน้ำเต้าด้วยวิธี HDLPTA (high density latext particle agglutination test), RT-PCR และ ELISA พบเมล็ดน้ำเต้ามีการติดเชื้อเท่ากับ 100, 100 และ 95.8% ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจสอบโดยการใช้พืชทดสอบ (bioassay) กลับพบว่ามีเมล็ดเพียง 50% ที่สามารถทำให้พืชทดสอบแสดงอาการของโรคได้

วิธี DAS-ELISA ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยค่า $O.D._{405}$ ของเมล็ดปกติ (healthy seed) เฉลี่ยเท่ากับ 0.086 เมล็ดจากผลเป็นโรคที่ตรวจไม่พบเชื้อ CGMMV มีค่า $O.D._{405}$ อยู่ในช่วง 0.085-0.091 ส่วนในเมล็ดที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV มีค่า $O.D._{405}$ อยู่ในช่วง 0.417-1.618 เมื่อแบ่งช่วงของค่า $O.D._{405}$ ออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (ค่า $O.D._{405}$ ต่ำกว่า 0.5) ระดับปานกลาง (ค่า $O.D._{405}$ ตั้งแต่ 0.5-1.0) และระดับสูง (ค่า $O.D._{405}$ ตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป) พบว่า ตัวอย่างเมล็ดที่ตรวจพบเชื้อและสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชทดสอบ ที่มีค่า $O.D._{405}$ ระดับต่ำ 9.52%, ระดับปานกลาง 80.95% และระดับสูง 9.52% เมล็ดที่มีการติดเชื้อส่วนใหญ่จะมีค่า $O.D._{405}$ อยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งค่า $O.D._{405}$ อยู่ในช่วง

ตารางที่ 18 ผลการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาจากผลที่ติดเชื้อ และการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลในแตงกวาทดสอบ โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นเมล็ดและวิธี DAS-ELISA

ตัวอย่างที่	การตรวจเชื้อในเมล็ด		การตรวจเชื้อในแตงกวาทดสอบ หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน	
	$O.D._{405}$	ผลการตรวจสอบ	$O.D._{405}$	ผลการตรวจสอบ
1	1.618 /1	+	2.271 /1	+
2	0.088	-	0.166	-
3	0.091	-	0.180	-
4	0.085	-	0.136	-
5	0.937	+	0.166	-
6	0.892	+	2.702	+
7	0.899	+	2.442	+
8	0.607	+	2.605	+
9	0.699	+	2.821	+
10	0.938	+	2.828	+
11	1.169	+	2.811	+
12	0.851	+	2.762	+
13	0.417	+	2.781	+
14	0.688	+	0.157	-
15	0.645	+	2.712	+
16	0.857	+	2.658	+
17	0.841	+	2.317	+
18	0.944	+	0.212	-
19	0.693	+	0.174	-
20	0.764	+	2.762	+
ควบคุม	0.086 /2	-	0.163 /3	-

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก (+)

/2 เป็นค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยของตัวอย่างเมล็ดแตงกวาปกติ จำนวน 4 เมล็ดๆ ละ 2 ซ้ำ

/3 เป็นค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยของตัวอย่างใบแตงกวาปกติ จำนวน 4 เมล็ดๆ ละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	การตรวจเชื้อในเมล็ด		การตรวจเชื้อในแตงกวาทดสอบหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน	
	$O.D._{405}$	ผลการตรวจสอบ	$O.D._{405}$	ผลการตรวจสอบ
21	0.657 /1	+	2.549 /1	+
22	0.930	+	2.473	+
23	0.536	+	2.621	+
24	0.440	+	2.274	+
25	0.705	+	2.612	+
26	0.547	+	2.600	+
27	0.532	+	2.606	+
28	0.794	+	0.180	-
29	0.762	+	0.152	-
30	0.602	+	2.455	+
เมล็ดปกติ	0.086 /2	-	0.163 /3	-

/1 ค่า $O.D._{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า $O.D._{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก (+)

/2 เป็นค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยของตัวอย่างเมล็ดแตงกวาปกติ จำนวน 4 เมล็ดๆ ละ 2 ซ้ำ

/3 เป็นค่า $O.D._{405}$ เฉลี่ยของตัวอย่างใบแตงกวาปกติ จำนวน 4 เมล็ดๆ ละ 2 ซ้ำ

0.532-0.938 ส่วนตัวอย่างเมล็ดที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV แต่ไม่ทำให้พืชแสดงอาการ พบว่า มีค่า $O.D._{405}$ ในระดับปานกลางทุกตัวอย่าง คือ ในช่วง 0.693-0.944

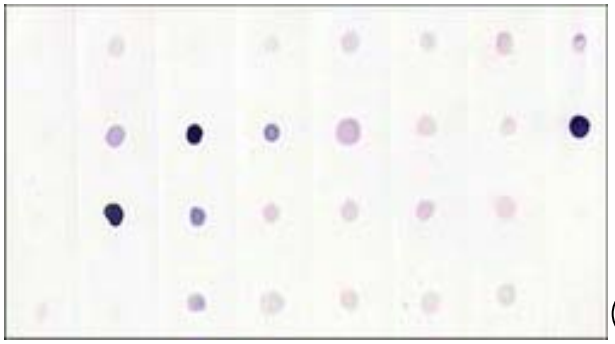
การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน พบว่า พืชทดสอบที่แสดงอาการทั้ง 21 ตัวอย่าง มีค่า $O.D._{405}$ อยู่ในระดับสูง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.271-2.828 นอกจากนี้การทดลองนี้ยังพบว่า เมล็ดแตงกวาจากผลเป็นโรคซึ่งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อนำมาทดสอบการก่อโรคในพืชทดสอบยังคงความสามารถในการก่อโรค และทำให้แตงกวาทดสอบแสดงอาการของโรคได้อย่างรุนแรง

การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาด้วยวิธี DIBA พบว่า ให้ผลการตรวจสอบที่ใกล้เคียงกับวิธี DAS-ELISA โดยให้ผลเป็นบวกที่ชัดเจนกับตัวอย่างเมล็ดที่ให้ผลบวกโดยวิธี DAS-ELISA จำนวน 22 ตัวอย่าง จาก 23 ตัวอย่าง (ภาพที่ 11 และตารางที่ 19) แต่การประเมินผลการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ด้วย microplate reader จะให้ค่า O.D. $_{405}$ ที่ช่วยทำให้การอ่านผลมีความถูกต้องแม่นยำกว่า การตรวจสอบด้วยสายตาในวิธี DIBA

สำหรับการเลือกใช้วิธีในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้ทดลอง หากต้องการตรวจสอบโปรตีนของเชื้อสามารถใช้วิธี ELISA, DIBA หรือ TBIA แต่ทั้ง 3 วิธีก็ให้ผลที่ต่างกัน โดยวิธี ELISA ให้ผลของการตรวจสอบในรูปแบบค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง ELISA reader ทำให้การตรวจสอบผลมีความแม่นยำกว่า วิธี DIBA และ TBIA การตรวจสอบในระดับ RNA สามารถใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบสูงกว่าวิธีอื่นๆ แต่วิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงกว่าด้วย และถ้าหากต้องการศึกษาความสามารถในการก่อโรคจะใช้พืชทดสอบวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่มักใช้เวลานานในการตรวจสอบผล และอาจต้องตรวจสอบยืนยันผลด้วยวิธีการอื่นด้วย เช่น ELISA หรือ PCR เป็นต้น โดยทั่วไปมักใช้หลายวิธีร่วมกันจากรายงายของ Lee (2004) ใช้วิธีในการตรวจสอบเพื่อประเมินการติดเชื้อ CGMMV ในเมล็ดน้ำเต้า 4 วิธีการ ได้แก่ วิธี HDLPTA, RT-PCR, ELISA และการใช้พืชทดสอบ (bioassay) ซึ่งแต่ละวิธีการก็ให้ผลและนัยยะที่ต่างกัน และจากรายงานของ Boubourakas *et al*. (2001) ที่ใช้วิธี ELISA ในการศึกษาและตรวจสอบการติดเชื้อ CGMMV ของวัชพืชบริเวณแปลงปลูกแตงโมที่มีการระบาดของเชื้อจากนั้นจึงใช้พืชทดสอบ และวิธี IC-RT-PCR ในตรวจสอบซ้ำและยืนยันผล เป็นต้น

H1	D1	D5	D9	D13	D17	D21	D25
H2	D2	D6	D10	D14	D18	D22	P
H3	D3	D7	D11	D15	D19	D23	N
H4	D4	D8	D12	D16	D20	D24	B

ก



ข

ภาพที่ 11 ผลการตรวจเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา ด้วยวิธี DIBA

(ก) แผนผังการทดลอง กำหนดให้

H คือ เมล็ดจากผลปกติ

D คือ เมล็ดจากผลเป็นโรค

P คือ ไวรัส CGMMV บริสุทธิ์

N คือ ใบแตงกวาปกติ

B คือ บัฟเฟอร์ (PBSD)

(ข) ผลการทดลอง จุดสีม่วงน้ำเงินแสดงผลการตรวจสอบที่ให้ผลเป็นบวก

ตารางที่ 19 ผลจากการตรวจเชื้อไวรัส CGMMV ในเมล็ดแตงกวาด้วยวิธี DIBA เปรียบเทียบกับวิธี DAS-ELISA

.เมล็ดจาก	ตัวอย่างที่	วิธี DAS-ELISA		วิธี DIBA
		O.D. $_{405}$	ผลการตรวจ	(ผลการตรวจ)
ผลปกติ	1	0.084 [/1]	- [/2]	-
	2	0.081	-	-
	3	0.087	-	-
	4	0.085	-	-
ผลเป็นโรค	1	1.171	+	+
	2	1.719	+	+
	3	2.614	+	+
	4	0.095	-	-
	5	0.092	-	-
	6	2.578	+	+
	7	2.117	+	+
	8	1.318	+	+
	9	0.651	+	+/-
	10	1.289	+	+
	11	1.561	+	+
	12	1.687	+	+
	13	1.500	+	+
	14	1.845	+	+
	15	1.611	+	+
	16	1.364	+	+
	17	1.319	+	+
ตัวอย่างควบคุม	พืชปกติ	0.074	-	-
	พืชเป็นโรค	2.382	+	+

[/1] ค่า O.D.$_{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า O.D.$_{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

ตารางที่ 19 (ต่อ)

.เมล็ดจาก	ตัวอย่างที่	วิธี DAS-ELISA		วิธี DIBA
		O.D. $_{405}$	ผลการตรวจ	(ผลการตรวจ)
ผลเป็นโรค	18	1.392 [/1]	+ [/2]	+
	19	1.660	+	+
	20	1.546	+	+
	21	1.616	+	+
	22	1.496	+	+
	23	1.507	+	+
	24	1.423	+	+
	25	1.738	+	+
ตัวอย่างควบคุม	พืชปกติ	0.074	-	-
	พืชเป็นโรค	2.382	+	+

[/1] ค่า O.D.$_{405}$ ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ และตัวอย่างที่มีค่า O.D.$_{405}$ มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติจัดให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

ภาพที่ 12 ลักษณะอาการของผล และเนื้อภายในผลแตงกวาที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV
(ก) ผลปกติ
(ข) ผลแตงกวาจากต้นที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การปลูกเชื้อ CGMMV ลงบนใบเลี้ยงของน้ำเต้า แตงกวา และแตงโม อายุ 7 วัน หลังเมล็ดงอก พบอาการด่างเขียวในพืชทั้ง 3 ชนิด หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน และพบอาการใบอ่อนของแตงกวาและแตงโมมีลักษณะงองุ้มผิดรูปทรง หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 21 วัน

2. การเตรียมไวรัส CGMMV บริสุทธิ์จากใบน้ำเต้าเป็นโรคได้ไวรัสบริสุทธิ์ทั้งหมดเท่ากับ 25.4 มิลลิกรัม ต่อใบพืช 100 กรัม มีค่าสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.38 จากการศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสมีขนาดประมาณ 17.4 kDa

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ในไก่ไข่พันธุ์ Hisex จำนวน 3 ตัว และเก็บไข่ทุกวันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้ไข่ไก่ทั้งหมด 120 ฟอง เมื่อนำไข่แดงมาแยกไขมันและตกตะกอน IgY ของไก่ (ChIgY) ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายตะกอนด้วย PBS และนำไปคำนวณความเข้มข้นของ IgY พบว่ามีปริมาณเฉลี่ย 25 มิลลิกรัม/ไข่ 1 ฟอง และมีค่าไตเตอร์ของ IgY ที่ได้จากสัปดาห์ 1-8 เท่ากับ 128,000 -1,024,000 ตามลำดับ โดยมีค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งแรก

4. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ในกระต่ายพันธุ์ White New Zealand จำนวน 1 ตัว และเก็บแอนติซีรัมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมสัปดาห์ที่ 1-8 ได้ค่าเท่ากับ 51,000-1,638,400 ตามลำดับ โดยมีค่าไตเตอร์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งแรก เมื่อนำมาแยก IgG บริสุทธิ์ โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ วิธี affinity column chromatography พบว่า ได้ปริมาณ IgG ของกระต่าย (RIgG) เท่ากับ 1.55 มิลลิกรัมต่อแอนติซีรัม 1.0 มิลลิลิตร

5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV โดยเชื่อมเซลล์มัยอีโลมากับเซลล์ม้ามของหนูเม้าส์พันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ หลังจากการเชื่อมเซลล์ได้เซลล์ไฮบริโดมา คิดเป็น 93.62% ของจำนวนหลุมทั้งหมด ตรวจพบหลุมที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อ CGMMV จำนวน 5 หลุม ได้แก่ หลุม 2F11, 3F2, 1F8, 2F8 และ 3H12 เลือก 2F11 ที่มีการเจริญที่ดี และมีค่า $O.D._{405}$ สูงสุดมาทำ limiting dilution จำนวน 3 รอบ ได้ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ทั้งหมด 5 โคลน ได้แก่ 2F11/F2/H5/C5, 2F11/D4/G10/G1, 2F11/G1/B3/C4, 2F11/H1/G4/F3 และ 2F11/C5/D6/G11 ให้รหัสโคลนเป็น MCG-1, MCG-2,

MCG-3, MCG-4 และ MCG-5 ตามลำดับ เลือกโคลน 2F11/D4/G10/G1 (รหัส MCG-2) ที่ให้ค่า S/N ratio สูง มาเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยโคลนดังกล่าวสร้างอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG3 และสร้าง light chain ชนิด kappa (κ)

6. การเพิ่มปริมาณ IgG จากโคลน MCG-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และแยก IgG บริสุทธิ์ได้ IgG ของหนูเม้าส์ (MIgG) ทั้งหมด 6.58 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 200 มิลลิลิตร การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ MIgG ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่า มีค่าเท่ากับ 12,800

7. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ด้วยเทคนิค ELISA แบ่งเป็น 2 วิธีการ ได้แก่ indirect PTA-ELISA และ DAS-ELISA โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา เช่น ชนิด และความเข้มข้นของ primary และ secondary antibody และระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยา เป็นต้น

7.1 การพัฒนาวิธี indirect PTA-ELISA พบว่าควรใช้ ChIgY ความเข้มข้น 14.0 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร เป็น primary antibody ซึ่งจะมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ที่ระดับ 1,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody จะมีความไวในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ที่ระดับ100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

7.2 การพัฒนาวิธี DAS-ELISA โดยได้ตรวจสอบความเข้มข้นของ primary antibody พบว่า การใช้ RIgG (1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เคลือบ ELISA plate จะให้ค่า S/N ratio มากกว่าการใช้ ChIgY และ MIgG ถึง 10 และ 6 เท่า ตามลำดับ ส่วน secondary antibody ควรใช้ RIgG-AP (1:500) ซึ่งเมื่อนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ จะมีความไวในการตรวจสอบ ที่ระดับ 10.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่ถ้าใช้ MIgG-AP (1:500) เป็น secondary antibody มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ ที่ระดับ 5.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

8. การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างแตงกวา ด้วยวิธี DIBA และวิธี TBIA พบว่า วิธี DIBA ควรหยดน้ำคั้นพืช ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี TBIA หลังจากที่ตัดชิ้นส่วนพืชแล้ว ควรกดชิ้นเนื้อเยื่อพืชลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนทันที และกดทิ้งไว้ประมาณ 5-10 วินาที เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชที่มี

ยางมาก เมื่อปล่อยให้รอยแผลสัมผัสอากาศเป็นเวลานาน แผลจะเกิดสีม่วงดำ ซึ่งอาจทำให้แปลผลผิดพลาดได้ จากนั้นจึงผึ่งเมมเบรนให้แห้ง และใช้ RIgG ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น primary antibody ในการทำปฏิกิริยา

9. การตรวจสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ด้วยวิธี ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CGMMV และไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ และไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เชื้อ CMV, CACV, MYSV, PRSV, BMV, CVMV, MCMV, MDMV, PVY, SCMV และ TMV

10. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการทางซีรัมวิทยาในการการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในตัวอย่างแตงกวา

10.1 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของต้นแตงกวาอายุ 2 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ ด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ในแตงกวาได้ทุกส่วนที่นำมาตรวจสอบ แต่การใช้น้ำคั้นจากเนื้อเยื่อบริเวณ หนวด ใบอ่อน ใบแก่ ให้ค่า $O.D._{405}$ ที่สูง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีค่าใกล้เคียงกับการใช้เนื้อเยื่อจาก ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมีย โดยมีค่าเท่ากับ 2.512, 2.409, 2.526, 2.324 และ 2.149 ตามลำดับ ส่วนน้ำคั้นจากผลอ่อน มีค่า $O.D._{405}$ ต่ำสุด เท่ากับ 1.130 และจากการตรวจเชื้อ CGMMV ในต้นแตงกวาด้วยเทคนิค TBIA พบว่า วิธี TBIA ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน และสามารถตรวจพบเชื้อ CGMMV ในแตงกวาได้ทุกส่วนที่นำมาตรวจสอบ เช่นเดียวกับวิธี DAS-ELISA

10.2 การตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวา ควรบดเมล็ดใน PBSD อัตรา 1:40 โดยไม่ต้องนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนซากพืช และใช้น้ำคั้นเมล็ด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เคลือบ ELISA plate สำหรับตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA และใช้นำคั้นปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน สำหรับตรวจสอบด้วยวิธี DIBA

เมื่อตรวจสอบเมล็ดแตงกวาจากผลที่ตรวจพบเชื้อ CGMMV จำนวน 30 เมล็ด ด้วยวิธี DAS-ELISA พบเมล็ดมีการติดเชื้อ 86% โดยเมล็ดมีการติดเชื้ออยู่ในระดับสูง (ค่า $O.D._{405}$ ตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป) กลาง (ค่า $O.D._{405}$ ตั้งแต่ 0.5-1.0) และต่ำ (ค่า $O.D._{405}$ ต่ำกว่า 0.5) คิดเป็น 9.52%, 80.95% และ9.52% ตามลำดับ เมื่อนำเมล็ดที่ให้ผลโดยวิธี DAS-ELISA ไปปลูกเชื้อบนแตงกวาทดสอบ

พบว่า น้ำคั้นเมล็ดยังคงความสามารถในการก่อโรคเท่ากับ 77.78% ของจำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อทั้งหมด โดยหลังจากปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน แตงกวาจะแสดงอาการให้เห็นได้ชัดเจนและสามารถตรวจยืนยันผลด้วยวิธี DAS-ELISA ซึ่งมีค่า $O.D._{405}$ ในระดับสูง ส่วนการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในเมล็ดแตงกวาด้วยวิธี DIBA พบว่า ให้ผลการตรวจสอบใกล้เคียงกับวิธี DAS-ELISA โดยคิดเป็น 95.65% จากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี DAS-ELISA

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2549. **การรับรองการปลอดศัตรูพืชกับพืชบางชนิดที่ส่งออก**. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/pl_data/03_REGULATION/CleanTab001. pdf, 7 มีนาคม 2549.

_____. 2550. **เจตนารมย์ของพระราชบัญญัติกักพืช**. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/pl_data/03_REGULATION/Clean/CleangovUse.html, 18 กุมภาพันธ์ 2550.

ทิวา บุพผาประเสริฐ และ สุนทรี ยิ่งชัชวาล. 2537. ลักษณะการเจริญเติบโตของผลแตงกวาพันธุ์พวง *ใน* **การประชุมสรุปผลการวิจัยผักและถั่ว ครั้งที่ 2**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน, กรุงเทพฯ.

ธารารัตน์ ธารากุล และ สิริฤกษ์ ทรงวิลัย. 2537. บทที่ 19 โมโนโคลนอลแอนติบอดี. น. 365-376. *ใน* สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, บรรณาธิการ. **อิมมูโนวิทยา**. เค. พี. พริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ.

รัชนี ศิริยาน, เพชรรัตน์ ธรรมเบญพล, กมล เลิศรัตน์ และ พิศาล ศิริธร. 2549. วิธีมาตรฐานในการคัดเลือกพันธุ์แตงกวาต้านทางต่อเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus*. **ว. วิทย์. กษ**. 37(พิเศษ): 211-214.

สรรชัย จันทะจร, ธนายุทธ์ จิรัฐพงศ์, รัชนี ฮงประยูร และ สุรัตน์วดี จิวะจินดา. 2546. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในไก่ไข่โดยใช้สารสกัดจากกะเพราแดง *ใน* **โครงการรางวัลนวัตกรรมระดับประเทศ ครั้งที่ 3, 17-19 ตุลาคม 2546**, กรุงเทพฯ.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2549. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2549**. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/ard/pdf/ExpSeedType49.pdf, 7 มีนาคม 2549.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2549. **ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2549**. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/ard/pdf/ImpSeedType49.pdf, 7 มีนาคม 2549.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2547. **เอกสารประกอบการประชุม seed cluster ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ: สถานภาพการผลิต/การค้าและความต้องการทางเทคโนโลยีของธุรกิจเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทย กรณีศึกษาเมล็ดพันธุ์พืชไร่และเมล็ดพันธุ์ผัก**. นครราชสีมา.

Ainsworth, G.C. 1935. Mosaic disease of cucumber. **Annals. Appl. Biol**. 22: 55-67.

Ali, A., T. Natsuaki and S. Okuda. 2004. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. **Phytopathology** 152: 677-682.

Altschuh, D., M.Z. Al., J.P. Braind and R.MHV. Van. 1985. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus VI attempts localize viral epitope with monoclonal antibody. **Mol. Immun.** 22: 329-337.

Antignus, Y., Y. Wang, M. Pearlsman, O. Lachman, N. Lavi and A. Gal-On. 2001. Biological and characterization of a new cucurbit-infecting tobamovirus. **Phytopathology** 91: 565-571.

Boubourakas, N., E. Hatziloukas, Y. Antignus and N. I. Kasis. 2004. Etiology of leaf chlorosis and deterioration of fruit interior of watermelon plant. **J. Phytopathol.** 152: 580-588.

Campbell, A.M. 1991. **Monoclonal Antibody and Immumosensor Technology**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Cerovská, N. 1998. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y^{NTN} strain and their use for strain differentiation. **Plant Pathol.** 47: 505-509.

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen Virol.** 34: 475-483.

Crowther, J.R. 2001. **The ELISA guidebook**. Humana Press, New Jersey.

David A.J. and J.K. Wilder. 1993. Making monoclonal antibody, pp. 57-74. *In* A.J. David, ed. **Methods in cell biology**. Academic Press, New York.

Francki, R.I., J. Hu and P. Palukaitis. 1986. Taxonomy of cucurbit-infecting tobamoviruses as determined by serological and molecular hybridization analyses. **Intervirology** 26: 156-163.

Francki, R.I.B. 1988. ***Cucumber green mottle mosaic Tobamovirus***. Available Source: http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr265.htm, May 2, 2005.

Gooding, G.V. and T.T. Hebert. 1667. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. **Phytopathology** 57: 1285.

Hollings, M., Y. Komuro and H. Tochihara. 1975. *Cucumber green mottle mosaic virus*. Available Source: http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=154, April, 28, 2008.

Haywood, V., F. kragler, and W.J. Lucas. 2002. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. **Plant Cell** 14: 303-325.

Inoue, T., N. Inoue, M. Asatani and K. Mitsuhata. 1967. Studies on cucumber green mottle mosaic virus in Japan (in Japanese). **Nogaku Kenkyu** 51: 175-186.

Kim, S.M., J.M. Lee, K.O. Yim, M.H. Oh, J.W. Park and K.H. Kim. 2003. Nucleotide sequences of two Korean isolate of *Cucumber green mottle mosaic virus*. **Mol. Cells**. 16: 407-412.

Kitani, K., A. Kiso and Y. Shigematsu. 1970. Studies on a new virus disease of cucumber (*Cucumis sativus* L. var. F1 Kurume-Otiai-H type) discovered in Yodo. **Proc. Assoc. Plant Prot. Shikoku** 5: 59-66.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256: 495-497.

Komuro, Y., H. Tochihara, 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.

Komuro, Y., A. Tochichara, R. Fukatsu, Y. Nagai and S. Yoneyama. 1971. Cucumber green mottle mosaic virus (Watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit known as “Konnyaku”. **Ann. Phytopathol. Soc. Jap**. 37: 34–42.

Laemmil, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bateriophage T4. **Nature (London)** 227: 680-687.

Leslie, G.A. and A.W. Clem. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. **J. Exper. Med.** 130: 1337-1352.

Lee, K.Y., B.C. Lee and H.C. Park. 1990. Occurrence of *Cucumber green mottle mosaic virus* disease of watermelon in Korea. **Korean J. Plant Pathol.** 6: 250-255.

Lee, K.Y. 1996. Current occurrence and control of CGMMV 'Konjak' disease. **Plant Dis. Agric.** 2: 38-39.

Lee, J-M. 2004. Advance in seed treatment for horticultural crops. **Chronica Horticulturae** 44: 11-20.

Lucas, W.J. and S. Wolf. 1999. Connections between virus movement of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants. **Mol. Plant Microbe. Interact**. 5: 192-197.

Martin, E.M., J.D. Cho, J.S. Kim, S.C. Geoke, K.S. Kim and R.C. Gergerich. 2004. Novel cytopathological structures induced by mixed infection of unrelated plant viruses. **Phytopathology** 94:111-119.

Martin, R.M. 1996. Plant virus detection: to use nucleic acid-base, immunological or other methods. **AgBiotech New and Information** 8: 35-39.

Moreno, I.M., J.R. Thompsont and F. Garcia-Arenal. 2004. Analysis of systemic cocalization of cucumber plant by *Cucumber green mottle mosaic virus*. **J. Gen. Virol.** 58: 749-759.

Nagai Y, T. Tok and R. Fukatsu. 1974. Studies on the virus disease and fruit deterioration of watermelon of cucumber green mottle mosaic virus–watermelon strain. I. Occurrence, epidemiology and control of the virus disease of watermelon. **Bull Chiba Ken Agri. Exp. Stat.** 15: 1–53.

Nozu, Y., H. Tochihara, Y. Komuro and Y. Okada. 1971. Chemical and immunological characterization of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) protein. **Virology** 45: 577-585.

Park, J.-W., J.U. Cheon and H.S. Choi. 2001. Occurrence and control of seeed-borne plant viruses in Korea, pp. 194-218. *In* **Crop Protection Research**. Rural Development Administration, Suwon.

Park, S.M., J.S. Lee, S. Jegal, B.Y. Jeon, M. Jung, Y.S. Park, S.L. Han, Y.S. Shin, K.H. Ryu, S.G. Yang and C.H. Harn. 2005. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*). **Plant cell Rep.** 24: 350-356.

Shim, C.K., J.H. Lee, S.M. Hong, K.S. Han and H.K. Kim. 2006. Construction of antibody for detection and diagnosis of cucumber green mottle mosaic virus from watermelon plant. **Korean Soc. Plant Path.** 22: 21-27.

Smith. 1957. **A textbook of plant virus diseases**, 2nd. Churchill.

Suehiro, N., K. Matsuda, S. Okuda and T. Natsuaki. 2005. A simple method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. **J. Virol. Meth.** 125 (2005): 67-73.

Tan, S.H., M. Nishiguchi, M. Murata, and F. Motoyoshi. 2000. The genome structure of kyuri green mottle mosaic tobamovirus and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. **Arch. Virol**. 145:1067–1079.

Ugaki, M., M. Tomiyama, T. Kakutani, S. Hidaka, T. Kiguchi, R. Nagata, T. Sato, F. Motoyoshi and M. Nishiguchi. 1991. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. **J. Gen. Virol.** 72: 1487-1495.

Varveri C, N. Vassilakos and F. Bem. 2002. Characterization and detection of cucumber green mottle mosaic virus in Greece. **Phytoparasitica** 30(5): 493–501.

Vasudeva, R.S., S.P.Raychaudhuri and J. Singh. 1949. A new strain of Cucumis virus 2. **Indian Phytopathol**. 2:180-185.

Wetter, C., M. Conti, R. Altschuh, R. Tabillion and van MHV Regenmortel. 1984. Pepper mildmottle mosaic virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. **Phytopathology** 74: 405–410.

Yoon, Y.J., B.E. Min, J.K. Choi and K.H. Ryu. 2001. Genome structure and production of biologically active in vitro transcripts of cucurbit-infecting Zucchini green mottle mosaic virus. **Phytopathology** 92: 156-163.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์มัยอีโลมาและเซลล์ม้าม

100x HT (Hypoxanthine และ Thymidine) stock solution

Hypoxanthine (M.W. 136.1 :SIGMA) (6-Hydroxypurine)	136.1	มิลลิกรัม
Thymidine (M.W. 242.2, SIGMA)	37.8	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายสารที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยแผ่นกรอง (millipore) ขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง (microtube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

100x Aminopterin (A) stock solution

Aminopterin (M.W. 440.4 : sigma) (4-Amino folic acid; 4-Aminopteroyl glutamic acid)	1.76	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ หยดสารละลาย 1.0 M NaOH ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ให้ Aminopterine ละลายปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วยสารละลาย 1.0 M HCl เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ให้ถูกแสง

100x Glutamine (G) stock solution

Glutamine	2.92	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Glutamine ให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

100x Penicillin stock solution

ละลาย Penicillin (1,000,000 U) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ Penicillin สุดท้ายเท่ากับ 100U/มิลลิลิตร

100x Streptomycin stock solution

ละลาย Streptomycin 7.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ Streptomycin สุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

100x 2-Mercaptonethanol stock solution

2-Mercaptonethanol	70	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ละลาย RPMI 1640 (GIBCO) 1 ซอง (20 กรัม) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติม Na_2HPO_4 2 กรัม เติม 100x Penicillin stock solution และ 100x Streptomycin stock solution จากนั้นกรองอาหารด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งใส่ขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารสำหรับการเก็บเซลล์ในสภาพแช่แข็ง (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	7	มิลลิลิตร
Fetal calf serum	2	มิลลิลิตร
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	1	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรเตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ Complete medium (CM)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640	89	มิลลิลิตร
100x Glutamine stock stock solution	1	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (GIBCO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ CM	99	มิลลิลิตร
100x HT stock solution	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT

อาหารเลี้ยงเซลล์ HT	99	มิลลิลิตร
100x Aminopterine stock solution	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบทางซีรัมวิทยา

Carbonate coating buffer (CB), pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม

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

Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.00	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.90	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
KCl	0.20	กรัม

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

Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	97.00	มิลลิลิตร
Sodium azide (NaN_3)	0.20	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	100.00	มิลลิลิตร

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

Extraction buffer (CBD หรือ PBSD)

CB หรือ PBS	100.00	มิลลิลิตร
DIECA	20.0	มิลลิกรัม

Tris-buffer saline(TBS), pH 7.4

Trisma-base	6.05	กรัม
NaCl	8.76	กรัม
NaN_3	0.10	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หากต้องการเตรียม TBST ให้เติม 0.05% Tween-20

สารเคมีที่ใช้ในวิธี SDS-PAGE

30% Acrylamide solution

Acrylamide	30.00	กรัม
Bis-acrylamide	0.80	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

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

ละลาย Tris-base 45.50 กรัม ในน้ำ ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 250 มิลลิลิตร

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

ละลาย Tris-base 30.30 กรัม ในน้ำ ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2x Loading buffer

2-Mercaptonethanol	0.20	มิลลิลิตร
Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
2% SDS	2.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.25	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Running buffer 10 เท่า, pH 8.3

Tris-base	30.00	กรัม
Glycine	144.00	กรัม
10%SDS	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Staining solution

Coomassie brilliant blue-R 250	25%
Methanol	45.0%
Acetic acid	10.0%

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Destaining solution

Methanol	25.0%
Acetic acid	7.0%

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.5% Separating gel (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

30% Acrylamide solution	4.75	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.15	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.60	มิลลิลิตร

5% Stacking gel (ปริมาตร 4 มิลลิลิตร)

30% Acrylamide solution	0.60	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.00	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.33	มิลลิลิตร

Transfer buffer, pH 8.3

25 mM Tris-base

150 mM Glycine

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.02% SDS

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมแอนติบอดีบริสุทธิ์

10 mM Phosphate buffer saline, pH 7.4

KH_2PO_4	0.26	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	2.17	กรัม
NaCl	8.71	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.0 M Tris-HCl, pH 8.0

ละลาย Trisma-base 2.42 กรัม ในน้ำ จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl แล้วปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Citrate buffer, pH 4.5

Stock solution A: 0.1 M Citric acid (21.01 กรัมในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Stock solution B: 0.1 M Sodium citrate (29.41 กรัมของ $C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$ ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

ผสมสาร Stock solution A ปริมาตร 28 มิลลิลิตร เข้ากับสาร Stock solution B ปริมาตร 22 มิลลิลิตร แล้วใช้สารทั้ง 2 ในการปรับ pH

สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมแอนติบอดีกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

Sodium phosphate buffer, pH 6.8

Stock solution A: 0.1 M $Na_2HPO_4.2H_2O$

Stock solution B: 0.1M $Na_2HPO_4.12H_2O$

ผสมสาร Stock solution A และ Stock solution B อัตราส่วน 1:2 แล้วปรับ pH ด้วย Stock solution A หรือ Stock solution B

1% Glutaraldehyde

ผสม 50% Glutaraldehyde stock ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร กับน้ำปริมาตร 0.98 มิลลิลิตร

1.0 M Ethanolamine

ผสม Ethanolamine 0.06 มิลลิลิตร กับน้ำปริมาตร 0.94 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสุพจน์ ภูมิสุข
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 ตุลาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดสุรินทร์
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) (เกียรตินิยมอันดับ 1) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์เทคโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- พ.ศ. 2545-2548 ได้รับทุนการศึกษาจาก Mizuho Corporate Bank, Ltd. - พ.ศ. 2548-2550 ได้รับทุนการศึกษา และทุนวิจัยจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม