



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor สำหรับตรวจสอบ
เชื้อ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

Development of Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor Technique for the
Detection of *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

นามผู้วิจัย นางสาววริรัตน์ สมประทุม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวดล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิชัย โหมสินรัตน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี ธงประยูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor สำหรับตรวจสอบ
เชื้อ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

Development of Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor Technique for the Detection of
Chilli veinal mottle virus (ChiVMV)

โดย

นางสาววาริรัตน์ สมประทุม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2554

วาริรัตน์ สมประทุม 2554: การพัฒนาเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวศล, Ph.D. 111 หน้า

Chilli veinal mottle virus (ChiVMV) สาเหตุโรคเส้นใบด่างประของพริก ทำความเสียหายให้ผลผลิตพริกกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ การตรวจเชื้อไวรัสชนิดนี้นิยมใช้เทคนิค Plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) แต่เนื่องจากพบว่าวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ให้ปฏิกิริยาบวกกับเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกันคือเชื้อ *Pepper veinal mottle virus* (PVMV) จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจอื่นที่ให้ผลตรวจที่แม่นยำ งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค surface plasmon resonance (SPR) biosensor เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA

ผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง โดยนำโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ตรึงบนแผ่นกระจกเคลือบด้วยอนุภาคทองคำที่ปรับสภาพพื้นผิวด้วยสาร 11-Mercaptoundecanoic acid (11MUA) สำหรับเป็นอิมมูโนเซ็นเซอร์ในการตรวจเชื้อนี้ด้วยเทคนิค SPR biosensor เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับ SPR biosensor พบว่าเทคนิค SPR biosensor สามารถตรวจเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ได้ที่ระดับต่ำสุด 3.9 ไมโครกรัม และตรวจเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพริกได้ที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 ในขณะที่เทคนิค PTA-ELISA ตรวจเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ได้ที่ 1,000 ไมโครกรัม และเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพริกที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 ตามลำดับ การตรวจเชื้อของเทคนิค SPR biosensor ให้ความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA โดยพิจารณาค่า Kinetic association constant (K_a) ของปฏิกิริยาการเข้าจับกันระหว่างเชื้อไวรัสกับแอนติบอดี ซึ่งพบว่าเทคนิค SPR biosensor และ PTA-ELISA มีค่า K_a เท่ากับ 10^4 - 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ และ 10^2 - 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าเทคนิค SPR biosensor จะให้ผลการตรวจเชื้อไวรัสได้ในขณะเกิดปฏิกิริยาและสามารถนำแผ่น SPR immunosensor กลับมาใช้ตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง แต่เทคนิค SPR biosensor มีค่าใช้จ่ายในการตรวจเชื้อไวรัสประมาณ 95 บาทต่อตัวอย่าง ซึ่งสูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 2 เท่า

Wareerat Sompratoom 2011: Development of Surface Plasmon Resonance (SPR)

Biosensor Technique for the Detection of *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV).

Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Miss Sujin Patarapuwadol, Ph.D. 111 pages

ChiVMV is causing agent of Chili veinal mottle disease and it caused reduction in crop yields up to 50% in pepper. Plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) is commonly used for viral detection. However, PTA-ELISA technique has a limitation on ChiVMV detection due to a cross reaction of polyclonal antibody with closely related virus, *Pepper veinal mottle virus* (PVMV). Thus, the development of an alternative method for specific detection of ChiVMV is highly desirable. This thesis was aimed to develop surface plasmon resonance (SPR) biosensor technique for the detection of ChiVMV.

Rabbit-polyclonal antibody (PAb) against ChiVMV-KPS9 was produced and used through-out the experiments. The SPR disc surface was modified with 11- mercaptoundecanoic acid (11-MUA) for immobilizing ChiVMV-PAb and use as an immunosensor for ChiVMV-KPS9 detection. In comparison with PTA-ELISA, SPR biosensor was able to detect ChiVMV-KPS9 as low as 3.9 µg and 1:4,000 dilution of disease-chili sap samples with clear cut decision whereas PTA-ELISA was able to detect at the level of 1,000 µg and 1:4,000 dilution, respectively. By observing the Kinetic association constant (K_a) value of antigen-antibody reaction, SPR biosensor was found to be highly specific compare to PTA –ELISA. The K_a values of the ChiVMV-PAb binding observed from SPR biosensor and PTA-ELISA were 10^4 - $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ and 10^2 - $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, respectively. The result demonstrated that SPR biosensor technique can be used for ChiVMV-KPS9 detection. Furthermore, SPR biosensor give a real time result and could be reused the SPR immunosensor disc for ChiVMV-KPS9 detection at least four times. However, the cost of SPR biosensor detection is approximately 95 baht/samples which two times higher than that of PTA-ELISA.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.สุจินต์ ภัทรภูวคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้โอกาสทางการศึกษา สละเวลาและกำลังกายสำหรับคำแนะนำในการทำงานวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รศ.ดร.วิชัย โฆสิตรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.สุพัฒน์ อรรถธรรม ประธานการสอบ และ ดร.ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สังกัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและการพลังงานและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนห้องปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการศึกษาวิจัยและภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนโรงเรียนปลูกพืชทดลอง

ขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ข้าพเจ้า ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและ Anti-NSs Tospovirus serogroup4 ผศ.ดร.รัชนิ สงประยูร ที่ให้ความอนุเคราะห์ Anti-ChiVMV และคุณนุชนาด วารินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย ดร.สุทธิเดช ปรีชารัมย์ ที่ให้คำปรึกษาเรื่องการประมวลผลการทดสอบแอนติบอดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อประเสริฐ คุณแม่ณงลักษณ์ และครอบครัว ที่ได้มอบความรัก กำลังใจ ตลอดจนการสนับสนุนทางการศึกษามาโดยตลอด จนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จเช่นวันนี้

วาริรัตน์ สมประทุม

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	84
สรุป	84
ข้อเสนอแนะ	86
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	87
ภาคผนวก	100
ภาคผนวก ก การเตรียมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง	101
ภาคผนวก ข ภาพผลการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ด้วยเทคนิค SPR biosensor	107
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	111

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค SPR biosensor กับ PTA-ELISA ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช	10
2 สายพันธุ์ของเชื้อ ChiVMV ในภูมิภาคเอเชียที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank	29
3 ผลการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อ 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยวิธี PTA-ELISA	44
4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส 7 ชนิด ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	52
5 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส 7 ชนิด ด้วยเทคนิค SPR biosensor	53
6 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	56
7 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	57
8 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor	58
9 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	62
10 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	64
11 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA	65
12 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor	66
13 เปรียบเทียบค่า K_d ของการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor	67
14 ผลการทดสอบค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ในแต่ละขั้นตอนที่เดิมสารบนผิวแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	เปรียบเทียบการทดสอบสารที่ใช้ลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor	72
16	เปรียบเทียบค่า K_a และ K_d ของการทดสอบสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor	73
17	ผลการทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	75
18	ผลการทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์	76
19	เปรียบเทียบค่า K_a และ K_d ของการทดสอบ regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9	77
20	เปรียบเทียบคุณสมบัติในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor	83

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยเทคนิค PTA- ELISA (ดัดแปลงจาก John, 2001)	9
2	ลำดับการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลสารชีวภาพที่ต้องการทดสอบบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ (ดัดแปลงจาก Autolab application note, n.d.)	13
3	การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ SPR ในแต่ละขั้นตอนที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Julian, 2001)	14
4	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_d กับค่า K_a ภายหลังการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Lidstrom, n.d.)	18
5	ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำเพื่อตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Jaruput, 2005)	21
6	ขั้นตอนในการเตรียมแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor	36
7	ขั้นตอนการทดสอบเชื้อด้วยเทคนิค SPR biosensor	38
8	ลักษณะอาการของพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ ChiVMV-KPS9	44
9	ผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วย เทคนิค Agarose gel eletrophoresis	46
10	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับเชื้อ ChiVMV จากประเทศจีน ไทย ได้หวัน เวียดนาม อินเดียและอินโดนีเซียที่มีรายงานใน GeneBank	47
11	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9	48
12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	49
13	ค่าสหสัมพันธ์ของผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 7 ชนิดด้วยเทคนิค SPR biosensor และ PTA-ELISA	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ค่าสหสัมพันธ์ของผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor และ PTA-ELISA	59
15	ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของการเกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ	70
16	เปรียบเทียบการทดสอบ regenerate buffer	78
17	ผลการทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ	80
18	ผลการทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ	80
19	ทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วในการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9	81
ภาพผนวกที่		
1	ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb กับเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ 7 ชนิด ด้วยเทคนิค SPR biosensor	108
2	ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor	109
3	ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor	110

การพัฒนาเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor สำหรับตรวจสอบ เชื้อ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

Development of Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor Technique for the Detection of *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

คำนำ

Chilli veinal mottle virus (ChiVMV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบด่างประของพริก ที่ทำให้ผลผลิตพริกในแปลงปลูกเสียหาย 56.96 เปอร์เซ็นต์ (เครือพันธุ์และคณะ, 2536) ลักษณะอาการที่สำคัญของโรคนี้ได้แก่ ใบด่างเขียวระหว่างเส้นใบ จุดด่างเขียวและใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง (Siriwong *et al.*, 1995) เชื้อ ChiVMV จัดอยู่ในจีนัสโพทิวไวรัส (Genus *Potyvirus*, Family *Potyviridae*) อนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นท่อนคด สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยอ่อนและการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล แนวทางที่สำคัญสำหรับการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ การป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทาน (สุพัฒน์, 2552) การพัฒนาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสได้อย่างถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญและจำเป็นต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานโรค

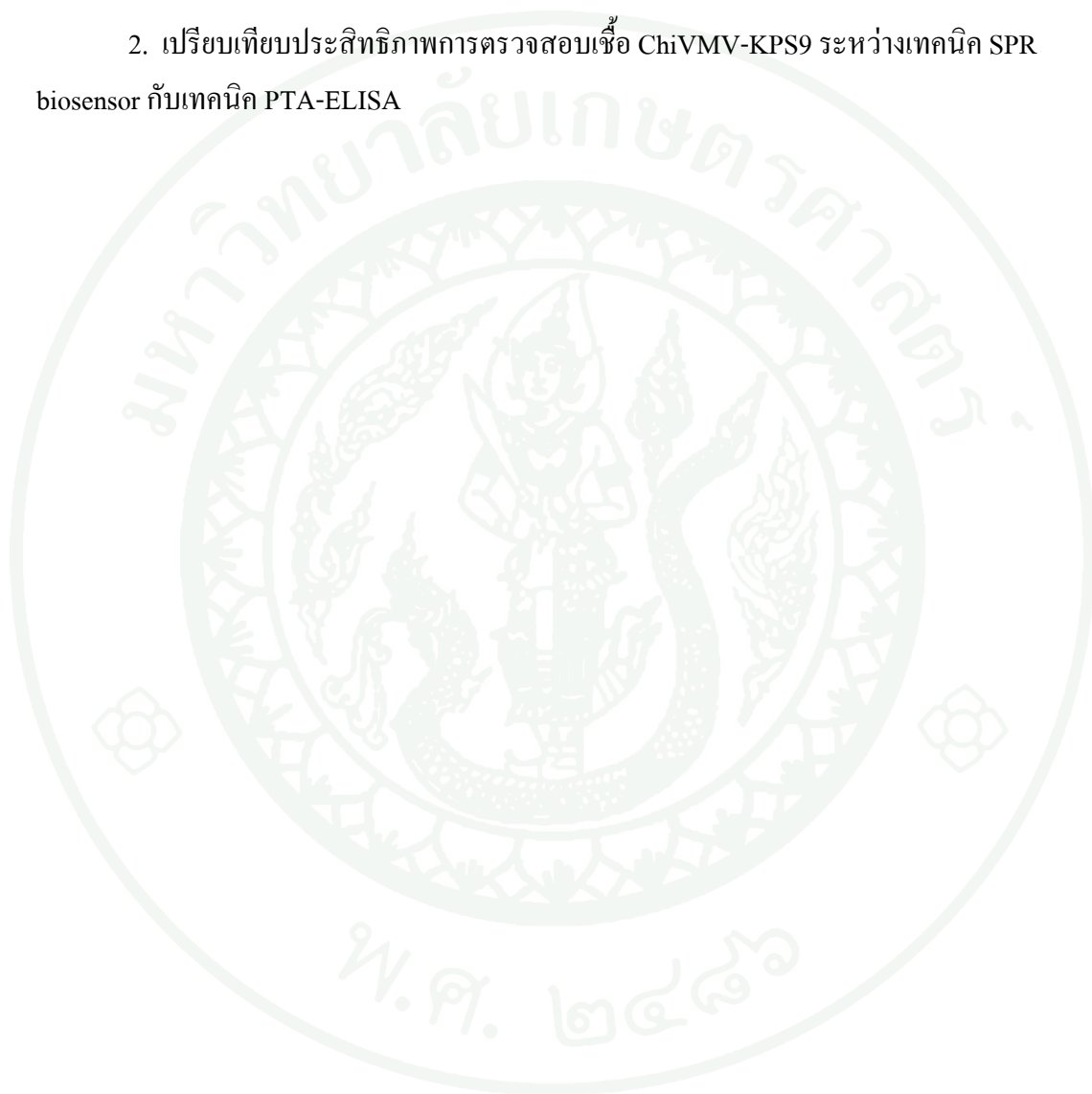
เทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชมีหลายเทคนิค เช่น Plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสในครั้งเดียวกันได้หลายตัวอย่างและสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ที่ระดับต่ำสุดที่ 10 นาโนกรัม (Renate, 1981) แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดหลายประการเช่น แอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบจำเป็นต้องมีการติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ เพื่อรายงานผลการตรวจสอบภายหลังการเติมสับสเตรท ผลที่ได้ของการทดลองจึงไม่ใช่ผลของการเข้าจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจน ส่วนการเข้าจับของแอนติบอดีใน ELISA microtiter plate เป็นลักษณะสุ่ม ส่งผลให้การทดลองในแต่ละครั้งให้ผลไม่สม่ำเสมอและต้องใช้เวลาในการตรวจสอบเชื้ออย่างน้อย 5-6 ชั่วโมง (รัชนี, 2549) นอกจากนี้พบว่า การตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ด้วยเทคนิคนี้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pepper veinal mottle virus* (PVMV) ซึ่งเชื้อไวรัสชนิดนี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับเชื้อ ChiVMV มากที่สุด (Tsai *et al.*, 2008) จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องใช้เทคนิคอื่นมาประกอบเพื่อยืนยันผลการตรวจเชื้อที่แน่นอนและชัดเจน จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคที่มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ

สำหรับการตรวจเชื้อไวรัส ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค Surface plasmon resonance (SPR) biosensor ในการตรวจเชื้อไวรัสหลายชนิดเช่น *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) และ *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) (Alvin *et al.*, 2002), *Tobacco mosaic virus* (Boltovets *et al.*, 2002), *Lettuce mosaic virus* (Thierry *et al.*, 2007), *Tomato bushy stunt virus* (Rajendran and Nagy, 2008) และ *Apple stem pitting virus* (ASPV) (Zsofia *et al.*, 2010) เป็นต้น เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อดีอยู่หลายประการเช่น สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่จำเป็นต้องมีการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์เพื่อรายงานผลการตรวจสอบ (Fahriye *et al.*, 2008) สามารถรายงานผลได้ในขณะเกิดปฏิกิริยา (real time detection) (Katsamba *et al.*, 2002) นอกจากนี้เทคนิค SPR biosensor มีความแตกต่างจากเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาอื่นๆ เนื่องจากการรายงานผลของปฏิกิริยาเป็นผลมาจากการเข้าจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจริงขณะทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถคำนวณเป็นค่าคงที่ในการเข้าจับกัน (kinetic affinity constant; K_d) ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีได้ (Glaser and Hausdorf, 1996, และ Moonil *et al.*, 2007) จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้จากเทคนิคนี้มีความแม่นยำ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิค SPR biosensor สำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค SPR biosensor สำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA



การตรวจเอกสาร

1. เชื้อ *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV)

1.1 เชื้อ ChiVMV สาเหตุโรคเส้นใบด่างประของพริก

โรคเส้นใบด่างประของพริกมีการตั้งชื่อเชื้อสาเหตุด้วยกันหลายชื่อ เช่น *Chilli mottle virus* (Plant virus online, 1996), *Chilli vein-banding mottle virus* (Chiemsombat *et al.*, 1998) *Indian pepper mottle virus*, *Pepper vein banding mosaic virus* และ *Pepper vein banding virus* (Descriptions of plant viruses, n.d.) เป็นต้น ปัจจุบันคณะกรรมการระดับนานาชาติด้วยอนุกรมวิธานของไวรัส (The International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) กำหนดให้ใช้ชื่อเชื้อสาเหตุโรคเส้นใบด่างประของพริกว่า *Chilli veinal mottle virus* มีชื่อย่อว่า ChiVMV อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่ยังใช้ชื่อย่อต่างกันเช่น ChVMV (Gibbs and Ohshima, 2010) และ CVMV (Krishna *et al.*, n.d.) เป็นต้น

เชื้อ ChiVMV จัดอยู่ในจีนัสโพทิวไวรัส (Family Potyviridae, Genus Potyvirus) มีอนุภาคเป็นท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดความยาว 765 นาโนเมตร และมีความกว้าง 13 นาโนเมตร ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) มีขนาด 9,711 นิวคลีโอไทด์ และมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเท่ากับ 33 กิโลดาลตัน ในเซลล์พืชที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ตรวจพบโปรตีนที่เป็น inclusion bodies แบบ pinwheel และแบบ laminated aggregates อยู่ในไซโตพลาสซึม (Anindya *et al.*, 2004 และ Siriwong *et al.*, 1995)

1.2 การเข้าทำลายและความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ ChiVMV

เชื้อ ChiVMV สามารถเข้าทำลายพริกได้หลายชนิดเช่นพริกชี้หนูผลใหญ่ พริกหวาน (*Capsicum annuum*) และพริกชี้หนูผลเล็ก (*C. frutescens*) ซึ่งมีรายงานว่าพบครั้งแรกที่ประเทศมาเลเซียในปี พ.ศ.2490 โดยการแยกเชื้อจากต้นพริกที่แสดงอาการของโรค (Burnet, 1962) ต่อมาใช้วิธีการตรวจสอบและจำแนกเชื้อด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา (Ong *et al.*, 1979) สำหรับประเทศไทยนั้นมียารายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปี พ.ศ. 2532 โดยแยกเชื้อได้จากพริกพันธุ์มันแดงที่แสดงอาการเส้นใบด่างประ นอกจากนี้เชื้อ ChiVMV นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของการปลูกพริกในหลายประเทศ เช่น ปากีสถาน ไทย มาเลเซีย และประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียง

เถียงได้ ซึ่งพบว่าเมื่อเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายพริกจะทำให้ผลผลิตพริกลดลง 30-50 เปอร์เซ็นต์ (เครือพันธุ์และคณะ, 2536; Hameed *et al.*, 1995 และ Ong *et al.*, 1980) ในปี 2004 ทาง AVRDC รายงานผลความเสียหายที่เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสชนิดนี้พบว่าทำให้ผลผลิตพริกในสภาพแปลงปลูกจาก 16 ประเทศในทวีปเอเชียลดลงเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ Hussain *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อ ChiVMV มีการแพร่กระจายในแปลงปลูกพริกของปากีสถานประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์

1.3 การถ่ายทอดโรคและพืชอาศัยของเชื้อ ChiVMV

เชื้อ ChiVMV สามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกล โดยการปลูกเชื้อด้วยการทาน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ การทาบกิ่งและการถ่ายทอดด้วยเพลี้ยอ่อน ได้แก่ *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *A. siraeicola*, *Hysteroneura setariae*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis* และ *Toxoptera citricidus* (Fujisawa *et al.*, 1986; Green, 1997 และ Prakash *et al.*, 2002) ความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับเพลี้ยอ่อนเป็นแบบ non-persistent เชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (Nono, 2001) พืชอาศัยของเชื้อ ChiVMV ในธรรมชาติมีหลายชนิด อยู่ในหลายวงศ์เช่น Paranthaceae, Boraginaceae, Compositaceae และ Solanaceae (Moi, 1992) มีพืชอีก 52 ชนิดที่ทดสอบพบว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสชนิดนี้ (Siriwong *et al.*, 1995)

1.4 การจำแนกและการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV

การจำแนกเชื้อ ChiVMV ที่เข้าทำลายพริกไม่สามารถใช้ลักษณะอาการที่ปรากฏบนพริกเพียงอย่างเดียวในการจำแนกเชื้อได้ จึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ เช่น เทคนิค Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นต่างๆ ของไวรัสและนำข้อมูลมาใช้สำหรับการจัดจำแนก โดยจะเลือกใช้ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของเชื้อ เช่น ยีน CP ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากในการจัดจำแนกเชื้อไวรัสในจินัสโพที่ไวรัส โดยการจัดจำแนกเชื้อโพที่ไวรัสด้วยยีนดังกล่าวถ้ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 76.0-77.0 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปแสดงว่าไวรัสชนิดนั้นเป็นไวรัสชนิดเดียวกัน (Adam *et al.*, 2005) โดยมีรายงานการเลือกใช้ยีน CP เพื่อจำแนกเชื้อ ChiVMV ดังนี้

พิสสุวรรณ และคณะ (2540) จำแนกชนิดของโพที่ไวรัสที่แยกได้จากพริกที่แสดงอาการเส้นใบด่างประที่พบในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยโคลนยีน CP และส่วน

ปลายสายด้าน 3' ขนาด 1,309 นิวคลีโอไทด์ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของการเรียงลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีนนี้กับข้อมูลยีนของโพที่ไวรัสชนิดอื่นอีก 23 ชนิด พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเส้นใบด่างประของพริกมีแบบแผนเช่นเดียวกับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของโพที่ไวรัสชนิดอื่น แต่มีเปอร์เซ็นต์เหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคสูงสุดเพียง 75.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่แปลรหัสมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 29.7 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโรคเส้นใบด่างประของพริกมีสาเหตุจากเชื้อโพที่ไวรัสชนิดใหม่ต่างจากโพที่ไวรัสชนิดอื่นที่เคยมีรายงาน

Tsai *et al.* (2008) จัดกลุ่มของเชื้อ ChiVMV จำนวน 24 ไอโซเลท ที่แยกจาก ประเทศจีน ใต้หวัน ไทย อินเดีย และอินโดนีเซีย และจัดกลุ่มร่วมกับเชื้อ *Pepper veinal banding virus* (PVBV), *Chilli vein-banding mottle virus* (CVbMV) และ CVbMV Chiangmai isolate (CVbMV-CM) โดยเลือกใช้ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน CP และ 3'UTR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสดังกล่าวพบว่ามีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ ChiVMV กับเชื้อ PVMV ที่ระดับ 89.5 เปอร์เซ็นต์

จากการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงให้เห็นว่าเชื้อ ChiVMV มีความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อ PVMV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสในจีนัส (genus) เดียวกัน นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ด้วยเทคนิคทางเซรัมวิทยาพบว่าแอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ดังรายงานของ Benoit *et al.* (2005) ที่จำแนกชนิดของเชื้อ ChiVMV และ PVMV ด้วยเทคนิค Double antibody sandwich (DAS)-ELISA ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีพบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Moury *et al.* (2005) ที่ตรวจเชื้อ ChiVMV และ PVMV ในแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ด้วยเทคนิค DAS-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี สังเกตเห็นว่าการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV และ PVMV เกิดปฏิกิริยาข้าม

นอกจากการจัดจำแนกเชื้อ ChiVMV ด้วยการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน CP ยังพบว่าการเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย 3' เพื่อจัดจำแนกเชื้อไวรัสในจีนัสโพที่ไวรัสได้ Ha *et al.* (2008) ได้จัดจำแนกเชื้อ ChiVMV ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนปลาย 3' พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวสามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ ChiVMV ได้จำนวน 7 ไอโซเลท (ChiVMV-VN/C1-7) จากเชื้อโพที่ไวรัสทั้งหมด 52 ไอโซเลท

นอกจากนี้ นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' ของเชื้อจากประเทศต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อ ChiVMV จากประเทศไทยพบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 99.0 เปอร์เซ็นต์

1.5 แนวทางการควบคุมและป้องกันกำจัดโรคเส้นใบด่างประของพริก

การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสสามารถทำได้โดยควบคุมแมลงพาหะและกำจัดพืชอาศัย เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส เนื่องจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนั้นไม่มีสารเคมีกำจัด วิธีการควบคุมโรคไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง ประหยัดและใช้ได้สะดวกที่สุดคือการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรค แต่การที่จะได้มาซึ่งพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่มีปัญหาต่อผลผลิตเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่มากนัก (สุพัฒน์, 2552) มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อเชื้อ ChiVMV และการควบคุมโรคเส้นใบด่างประของพริกดังนี้

เกรือพันธุ์ และคณะ (2536) ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสของพริกและการคัดเลือกพริกให้ต้านทานต่อไวรัสบางชนิด โดยสำรวจโรคไวรัสของพริกใน 13 จังหวัด ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2532 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2534 และตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคด้วยวิธี ELISA พบว่าเชื้อ ChiVMV จากจังหวัดเชียงใหม่มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อ ChiVMV จากประเทศไต้หวันและมาเลเซีย ต่อมาคัดเลือกพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อเชื้อ ChiVMV ในสภาพโรงเรือนกันแมลงพบว่ามีพริกจำนวน 4 สายพันธุ์ ที่มีความต้านทานสูง (เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 0 เปอร์เซ็นต์) ต่อเชื้อ ChiVMV ได้แก่ พันธุ์พริกขี้หนูไร้สุรตัน พันธุ์พริกขี้หนูอบล 2 พันธุ์พริกไต้หวัน 83-168 และพันธุ์พริกตูม (Toom)

พิสสุวรรณ และคณะ (2542) ได้พัฒนาพริกคัดแปลงพันธุ์กรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ CVbMV ตรวจสอบและคัดเลือกพริกบางช่วงจำลองพันธุ์รุ่นแรก (R_0) และรุ่นลูก (R_1 และ R_2) ที่มีทรานส์ยีนจากการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเส้นใบด่างประ (CVbMV-CP) พบว่าพริก R_1 จำนวน 497 ต้นจาก 1992 ต้น มีความต้านทานต่อไวรัสโดยไม่แสดงอาการของโรค ส่วนในรุ่น R_2 พบว่าผลพริก 5 สายพันธุ์ คือ R1 #161-1/5-3, #161-1/13-3, #161-1/13-4, #161-1/13-5 และ #161-1/14-3 ให้เมล็ดและต้นพริกที่มีความต้านทานโรคทั้งหมด (100 เปอร์เซ็นต์)

สุจินต์และคณะ (2551) ใช้เทคนิค indirect ELISA ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์พริกที่มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV และ ChiVMV พบว่าจากการประเมินความต้านทานพริก 320 สายพันธุ์ในสภาพโรงเรือนกันแมลง มีพริกที่ต้านทานสูง (เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

เท่ากับศูนย์) ต่อเชื้อ CMV-KPS10 จำนวน 4 สายพันธุ์ ส่วนพริกที่ด้านทานสูงต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 มีจำนวน 30 สายพันธุ์

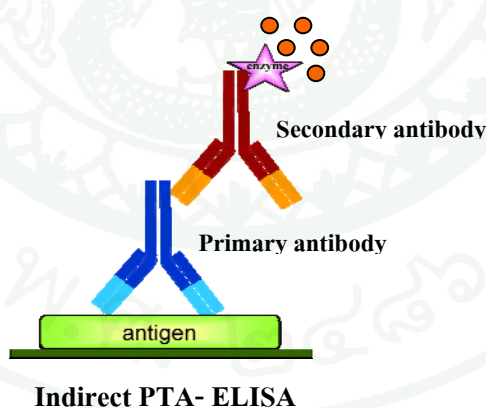
การทดสอบความต้านทานของพริกต่อเชื้อ ChiVMV ที่ AVRDC โดยทดสอบกับกล้าพริกที่ปลูกในถาดหลุม 24 หลุม เมื่อต้นกล้าพริกมีใบจริง 3 ใบ จึงปลูกเชื้อ ChiVMV ไอโซเลท P-1037 ลงบนใบพริกด้วยการทาน้ำคั้น ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส 14 วัน เก็บใบพริกมาตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามีพริก 20 สายพันธุ์ที่ด้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้แก่ CO1664, CO0265, VC16a, VC58a, VC160, VC211, VC236, VC237, VC240, VC241, VC255, PBC122, PBC148A, PBC370, PBC371, PBC521, PBC522, PBC523, PBC524 และ PBC693 (AVRDC, 1999)

2. ข้อจำกัดของเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

เทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชมีหลายเทคนิค เช่น dot blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ polymerase chain reaction (PCR) (Webster *et al.*, 2004) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ถึงระดับนาโนกรัม อย่างไรก็ตามทั้ง 3 วิธีมีข้อจำกัดคือ เทคนิค dot blot และเทคนิค ELISA ไม่สามารถกำหนดทิศทางการเข้าจับของแอนติบอดีกับ solid phase อาทิ membrane และ ELISA microtiter plate ตามลำดับ อาจทำให้แอนติบอดีอยู่ในสภาพที่ไม่พร้อมทำปฏิกิริยา ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อผลการตรวจเชื้อไวรัสแต่ละครั้งที่จะได้ผลการทดลองที่ไม่สม่ำเสมอ (Torrance *et al.*, 2006) ใช้เวลาในการตรวจเชื้อไวรัสอย่างน้อย 5-6 ชั่วโมง และจำเป็นต้องมีการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์เพื่อการรายงานผลการตรวจสอบ (สุภาวิณี, 2550) (ตารางที่ 1) ส่วนเทคนิค PCR มีข้อจำกัดในเรื่องการปฏิบัติงานที่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจนาน (Bright and Perry, 2007) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจสอบ (detection kits; GLIFT kit) โดยนำเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยามาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (immunochromatography) ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วรู้ผลภายใน 5-10 นาที มีความสะดวกในการตรวจสอบ แต่ชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชดังกล่าวจำเป็นต้องมีการติดฉลาก IgG ที่ใช้ตรวจสอบด้วยอนุภาคทองคำ (colloidal gold) เพื่อรายงานผลการตรวจสอบและไม่สามารถบ่งบอกปริมาณเชื้อที่แน่นอนได้ (สุรภิ และคณะ, 2550)

3. การตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค Plate trapped antigen-Enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA)

การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค ELISA พัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Clark and Adam (1977) ต่อมาจึงมีการพัฒนาเทคนิคนี้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเทคนิค ELISA เนื่องจากสามารถตรวจสอบแอนติเจนได้ครั้งละหลายตัวอย่าง เป็นวิธีการที่ง่าย จึงทำให้มีการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวหลายรูปแบบ เช่น เทคนิค PTA-ELISA ที่มีการรายงานครั้งแรกโดย Mowat and Dawson (1987) การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคนี้เริ่มจากเติมแอนติเจน (น้ำคั้นพืชที่มีเชื้อไวรัส หรือตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจ) ให้เข้าจับกับ ELISA microtitre plate ต่อมาจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน (primary antibody) และเติมแอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวแรก ขั้นสุดท้ายคือการเติมซับสเตรทลงใน ELISA microtitre plate (ภาพที่ 1) ภายหลังการเติมซับสเตรทจึงนำ ELISA microtitre plate มาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยการแปลผลนั้นจะพิจารณาจากค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) เทคนิค PTA-ELISA มีรายงานว่ามีการนำมาใช้ในการตรวจเชื้อ ChiVMV โดยสุจินต์และคณะ (2551) ที่ประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการประเมินความต้านทานพริกต่อเชื้อ ChiVMV เพื่อคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานโรคในสภาพโรงเรือน



ภาพที่ 1 ลักษณะการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยเทคนิค PTA-ELISA (ดัดแปลงจาก John, 2001)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค SPR biosensor กับ PTA-ELISA ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

คุณสมบัติ \ เทคนิค	SPR	ELISA
ความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) (พิโคกรัม)	0.1 (Boltovets <i>et al.</i> , 2004)	10,000 (Renate, 1981)
ระยะเวลา	2 ชั่วโมง (Autolab application note, n.d.)	5-6 ชั่วโมง (สุภาวิณี, 2550)
การติดฉลาก (labeling)	ไม่มี (Moonil <i>et al.</i> , 2007)	เอนไซม์ (รัชนี, 2549)
ค่าคงที่ในการเข้าจับกันของสาร (K_d) ($M^{-1}S^{-1}$)	10^5 - 10^7 (Autolab application note, n.d.)	1.52×10^5 (Hardy <i>et al.</i> , 1997)
ค่าคงที่ในการแยกออกจากกันของสาร (K_d) (S^{-1})	10^{-5} - 10^{-1} (Autolab application note, n.d.)	3.8×10^{-5} (Hardy <i>et al.</i> , 1997)

4. เทคนิค Surface plasmon resonance (SPR) biosensor

Biosensor Technique เป็นเทคนิคที่นำสารชีวภาพมาเป็นตัวตรวจจับ (bioreceptor) โดยสารชีวภาพนั้นสามารถเข้าจับสิ่งตรวจ (tester) ได้อย่างจำเพาะ โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดการเข้าจับกันของสารด้วยเทคนิคนี้มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย 2 ส่วนดังนี้ ส่วนแรกเป็นส่วนที่ทำให้เกิดสัญญาณและตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้นขณะเกิดการเข้าจับกันของสาร ซึ่งประกอบด้วยสารชีวภาพที่ตรึงอยู่กับ transducer ส่วนนี้อาจเรียกว่า detector และส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่ขยายสัญญาณและอ่านสัญญาณของสารชีวภาพที่เกิดการเข้าจับกัน สารชีวภาพที่นำมาใช้ใน biosensor มีหลายชนิดเช่น แอนติบอดี เอนไซม์ เนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ เป็นต้น ส่วนสัญญาณชี้แนะ (Indicated Signal) ที่เกิดขึ้นหลังจากการเข้าจับกันของสารชีวภาพกับสิ่งตรวจสามารถตรวจวัดได้หลายรูปแบบเช่น พลังงานแสง การเปลี่ยนแปลงอิเล็กทรอนิกส์ และพลังงานความร้อน เป็นต้น สัญญาณที่เกิดขึ้นนั้นเป็นตัวกำหนดระบบการตรวจสอบการเข้าจับกันของสารและตัวชักนำสัญญาณ (transducer) เช่น ถ้าสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนแปลงของแสง ระบบที่ใช้ตรวจวัดเรียกว่า Optical และมีตัวชักนำสัญญาณเรียกว่า Optoelectronics เป็นต้น มีการนำเทคนิค biosensor มา

ประยุกต์ในการตรวจสอบโรคในทางการแพทย์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1962 โดย Leland ได้ประยุกต์ใช้ biosensor ในการตรวจวัดปริมาณกลูโคสในเลือดมนุษย์ เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเบาหวาน (นันทยา, 2553) ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อใช้ประโยชน์ที่กว้างมากขึ้นในศาสตร์แขนงต่าง ๆ รวมถึงงานทางด้านการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืช (Boltovets *et al*, 2004)

Surface Plasmon Resonance (SPR) เป็นปรากฏการณ์เชิงแสงซึ่งเกิดขึ้นเมื่อแสงตกกระทบบนผิวของโลหะเช่น อนุภาคทองคำ ซึ่งไวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงแสง (Jarupat, 2005) เมื่อเกิดการเข้าจับกันของสารบนพื้นผิวสโลว์ด์แก้วในแต่ละชั้นตอนมากขึ้นจะส่งผลให้ค่าการเปลี่ยนแปลงมุมสะท้อนกลับของแสงลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 2) โดยการรายงานผลการเกิดปฏิกิริยาเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ซึ่งค่าดังกล่าวขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการสะท้อนกลับของแสง (reflection index) เมื่อเกิดการเข้าจับกันของสารบนพื้นผิวสโลว์ด์ที่เคลือบอนุภาคทองคำมากขึ้นตามลำดับ จะส่งผลให้ค่าดัชนีสะท้อนกลับของแสงลดลง ซึ่งสามารถวัดเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ได้ ณ ช่วงเวลานั้น โดยค่ามุม SPR ที่เปลี่ยนแปลงมีหน่วย milli degree (m°) (Stenberg *et al*, 1991) จึงมีการนำหลักการ SPR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการเข้าจับกันของสารชีวภาพกับสิ่งตรวจด้วยเทคนิค biosensor รวมเป็นเทคนิค SPR biosensor โดยการตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องมีการติดฉลากโมเลกุลที่ใช้เป็นตัวรายงานผล (บุญส่ง, ม.ป.ป.) ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค ELISA ที่ต้องติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์เพื่อการรายงานผล โดยเทคนิค SPR biosensor มีขั้นตอนในการทำงานหลายขั้นตอน ที่วัดค่าการเปลี่ยนแปลงของมุม SPR ซึ่งเกิดขึ้นจากการเข้าจับกันของสารบนพื้นผิวสโลว์ด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำและสารต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Base line เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากตรึงแอนติบอดีลงบนผิวอนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว (11-mercaptopundecanoic acid; 11 MUA)

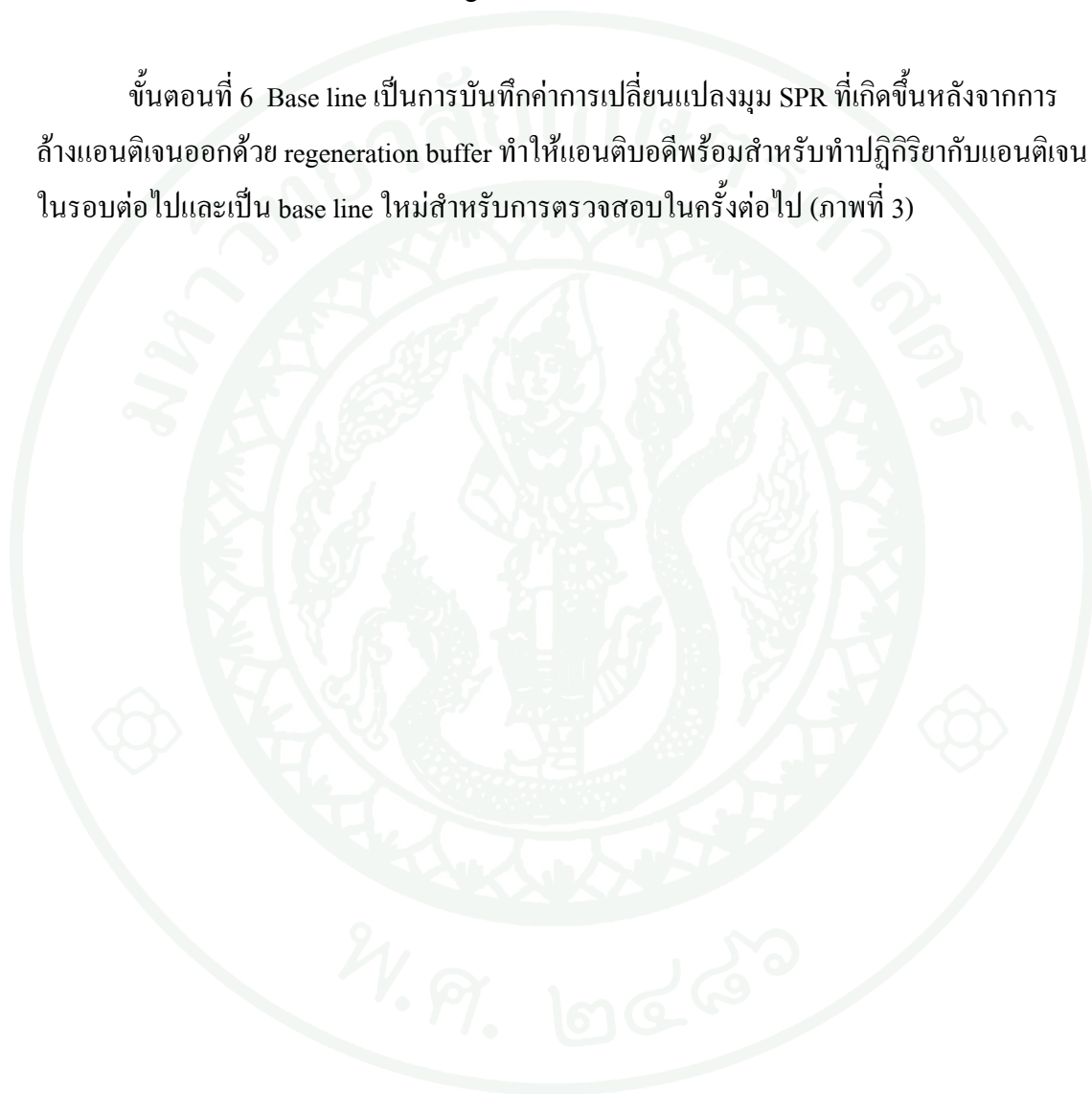
ขั้นตอนที่ 2 Association เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากแอนติบอดีเริ่มทำปฏิกิริยาเข้าจับแอนติเจน

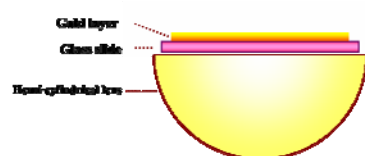
ขั้นตอนที่ 3 Equilibrium เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากแอนติบอดีทำปฏิกิริยาเข้าจับกับแอนติเจนจนถึงจุดสมดุล

ขั้นตอนที่ 4 Dissociation เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากล้างแอนติเจนออกจากการเข้าจับกับแอนติบอดี

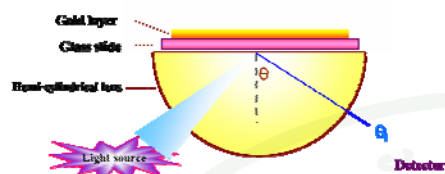
ขั้นตอนที่ 5 Regeneration เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากล้างแอนติเจนออกจากแอนติบอดีด้วย regenerate buffer

ขั้นตอนที่ 6 Base line เป็นการบันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นหลังจากการล้างแอนติเจนออกด้วย regeneration buffer ทำให้แอนติบอดีพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในรอบต่อไปและเป็น base line ใหม่สำหรับการตรวจสอบในครั้งต่อไป (ภาพที่ 3)

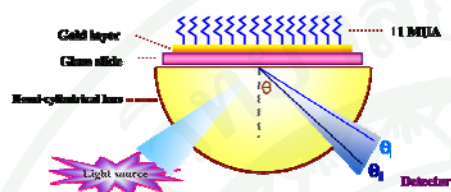




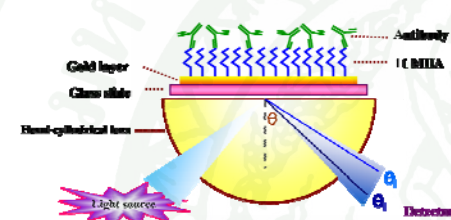
ประกอบแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาค
ทองคำบน hemi-cylindrical lens



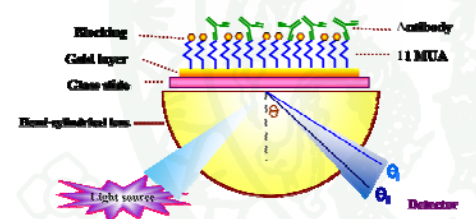
กระตุ้นแผ่นสไลด์แก้วด้วย running buffer



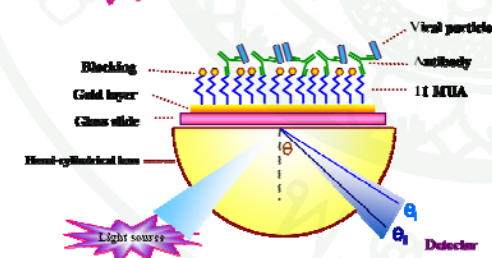
สารปรับสภาพพร้อมทำปฏิกิริยา



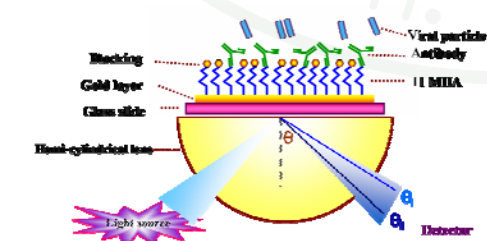
ตรึงแอนติบอดีลงบนแผ่นสไลด์แก้ว



ยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ

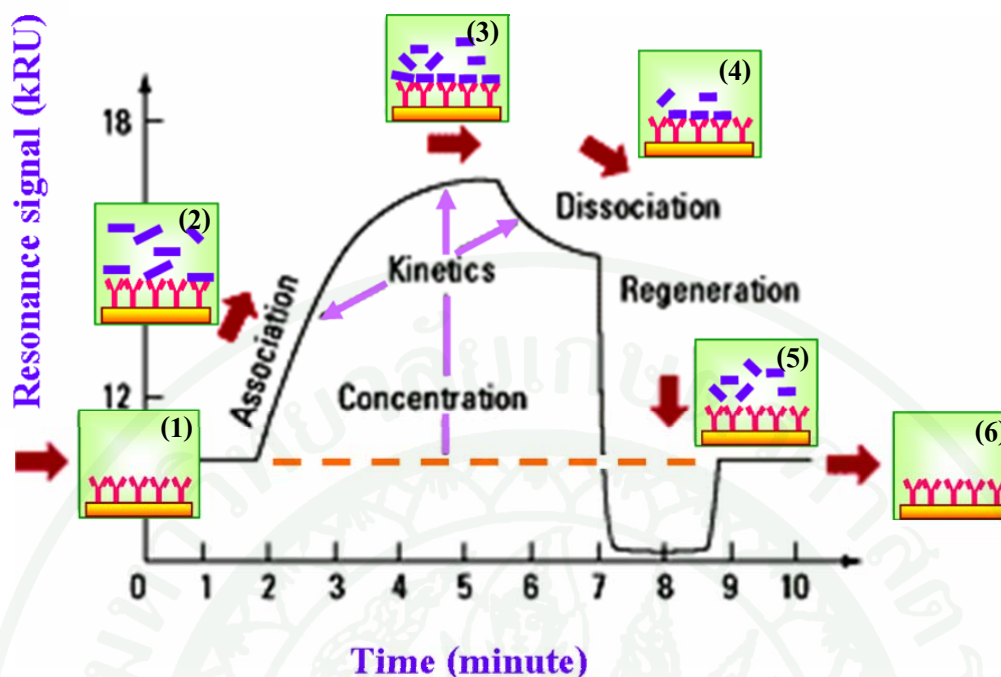


แอนติบอดีเข้าจับกับแอนติเจน



ล้างแอนติเจนออกด้วย regenerate buffer

ภาพที่ 2 ลำดับการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลสารชีวภาพที่ต้องการทดสอบบนแผ่นสไลด์
แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ (ดัดแปลงจาก Autolab application note, n.d.)



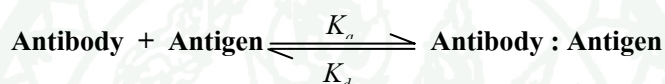
ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ SPR ในแต่ละขั้นตอนที่เกิดปฏิกิริยาระหว่าง แอนติบอดีกับแอนติเจนด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Julian, 2001)

5. การตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพิษด้วยเทคนิค SPR biosensor

การตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพิษด้วยเทคนิค SPR biosensor ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยอาศัยความจำเพาะของสารชีวโมเลกุลที่ใช้เป็นตัวตรวจจับ เช่น แอนติบอดี (Fahriye *et al.*, 2008) ผลการตรวจสอบสามารถรายงานผลในขณะเกิดปฏิกิริยาได้ (real time detection) (Katsamba *et al.*, 2002) ถึงแม้ว่าเทคนิค SPR biosensor มีการใช้แอนติบอดีในการตรวจเชื้อไวรัส แต่เทคนิคนี้มีความแตกต่างจากเทคนิคเซรุ่มวิทยาอื่นๆ เนื่องจากการรายงานผลของปฏิกิริยาเป็นการรายงานผลที่เกิดจากการเข้าจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เกิดขึ้นจริงขณะเกิดปฏิกิริยา (Altschug *et al.*, 1992 และ Rebert and Fait, 1997)

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเทคนิค SPR biosensor สามารถคำนวณค่าคงที่ในการเข้าจับกัน (kinetic association constant; K_d) ระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำได้ ซึ่งค่า K_d นั้นเป็นค่าที่บ่งบอกถึง

ความจำเพาะเจาะจงของการเกิดปฏิกิริยา เมื่อการประมวลผลค่า K_a แล้วพบว่ามีความสูงแสดงว่าการเกิดปฏิกิริยาของสารคู่หนึ่งมีความจำเพาะเจาะจงมาก หรืออาจกล่าวได้ว่าค่า K_a แปรผันตรงกับ ความจำเพาะเจาะจงของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งการตรวจวัดค่า K_a ได้ทำให้เกิดความแม่นยำในการ ตรวจสอบของเทคนิค SPR biosensor ได้อีกด้วยโดยค่าดังกล่าวมีหน่วยเป็นความเข้มข้นของสารที่ เกิดปฏิกิริยา ณ ช่วงเวลานั้น ($M^{-1}S^{-1}$) (Lidstrom, n.d.) ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี กับแอนติเจนเป็นแบบ 1 ต่อ 1 ดังสมการด้านล่าง ซึ่งค่า K_a ของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี กับแอนติเจนในกรณีที่แอนติบอดีมีส่วนของพาราโทป 2 ตำแหน่ง (homologous) มีค่า K_a ประมาณ 10^8 - $10^9 M^{-1}S^{-1}$ (Elma *et al.*, 1995) ดังนั้นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาบนผิวสโลด์แก้วที่เคลือบอนุภาค ทองคำและสาร 11MUA จึงมีค่า K_a ประมาณ 10^4 - $10^5 M^{-1}S^{-1}$ เนื่องจากมีส่วนของพาราโทปที่พร้อม ทำปฏิกิริยาเพียงตำแหน่งเดียว



นอกจากนี้เทคนิค SPR biosensor ยังตรวจวัดค่าคงที่ในการแยกออกจากกันระหว่าง แอนติบอดีกับแอนติเจนได้ (kinetic dissociation constant; K_d) ได้อีกด้วย ซึ่งค่า K_d เป็นค่าที่แสดง ให้เห็นถึงลักษณะการเข้าจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนว่ามีการเข้าจับกันลักษณะใด หากค่า K_d มีค่าสูงแสดงว่าการเข้าจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนเป็นแบบหลวมๆ จึงสามารถแยกออก จากกันได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการประมวลผลของค่านี้จะแปรผกผันกับค่า K_a (ภาพที่ 4) (Lidstrom, n.d.) โดยค่า K_d จะสามารถคำนวณได้ภายหลังการเติมสารล้าง (regenerate buffer) เพื่อทำลายพันธะ ระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน มีหน่วยเป็นการเกิดปฏิกิริยาการแยกออกจากกันต่อวินาที (S^{-1}) จึง มีการทดสอบ regenerate buffer ที่เหมาะสมสำหรับล้างแอนติเจนออก ซึ่งจะทำให้สามารถนำ แอนติบอดีกลับมาทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ซ้ำในปฏิกิริยารอบใหม่ (Man *et al.*, 1999 และ Xai *et al.*, 2003)

นอกจากนี้เทคนิค SPR biosensor ไม่จำเป็นต้องมีการขยายสัญญาณของการทำปฏิกิริยาที่ เกิดขึ้นด้วยการติดฉลากโมเลกุลสารที่ใช้ตรวจสอบ เช่น การติดฉลากด้วยเอนไซม์ เพื่อการรายงาน ผลการเกิดปฏิกิริยา (Glaser and Hausdorf, 1996 และ Moonil *et al.*, 2007) เนื่องจากการรายงานผล การเกิดปฏิกิริยาพิจารณาจากการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนโดยตรง จึงช่วย ลดความผิดพลาดจากการประมวลผลการทดลองที่ได้ ทำให้เทคนิคนี้มีความเหมาะสมกับงานที่ ต้องการความแม่นยำและความรวดเร็วในการตรวจสอบ แนวโน้มการประยุกต์ใช้เทคนิค SPR biosensor เพื่อการศึกษาและการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ นับจากปี ค.ศ.1993

เป็นต้นมา (Olivier *et al.*, 2006) ดังรายงานผลการวิจัยที่อาศัยเทคนิค Biosensor เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

Alvin *et al.* (2002) พัฒนาเทคนิค Quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors ที่ใช้หลักการทำปฏิกิริยาของ biosensor สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) และ *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORPV) เป็นเชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ จึงมีการพัฒนาเทคนิค QCM เพื่อให้การตรวจสอบเชื้อดังกล่าวอย่างทันทั่วที่ก่อนเกิดการแพร่ระบาดในแปลง โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวเป็นตัวตรวจจับพบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ CymMV และ ORSV ได้ที่ระดับต่ำสุด 1 นาโนกรัม เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบกับเทคนิค ELISA พบว่าทั้ง 2 เทคนิคให้ผลการตรวจสอบเชื้อไม่แตกต่างกันแต่เทคนิค QCM มีคุณสมบัติที่ดีกว่าเทคนิค ELISA คือ ใช้เวลาตรวจสอบน้อยกว่า ประมวลผลได้รวดเร็วและใช้ปริมาณตัวอย่างที่จะตรวจสอบน้อยกว่า

Boltovets *et al.* (2002a) ทดสอบสารที่ใช้ปรับสภาพผิวแผ่นทองก่อนการตรึงแอนติบอดี โดยเปรียบเทียบสารระหว่าง potassium thiocyanate (KNCS) กับ KNCS ที่ผสมกับโปรตีน A ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เมื่อใช้เชื้อ TMV ที่บริสุทธิ์เป็นสิ่งตรวจพบว่าการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับเชื้อ TMV บนผิวแผ่นทองที่ปรับสภาพด้วย KNCS และ KNCS ที่ผสมโปรตีน A วัดเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ได้ที่ระดับ 500 และ 1300 RU (Resonance Unit) ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่าการใช้สาร KNCS ร่วมกับโปรตีน A ทำปฏิกิริยาบนแผ่นทองลดความเสียหายของแอนติบอดีที่ตรึงบนผิวแผ่นทอง ส่งผลให้แอนติบอดีมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเข้าทำปฏิกิริยากับเชื้อ TMV

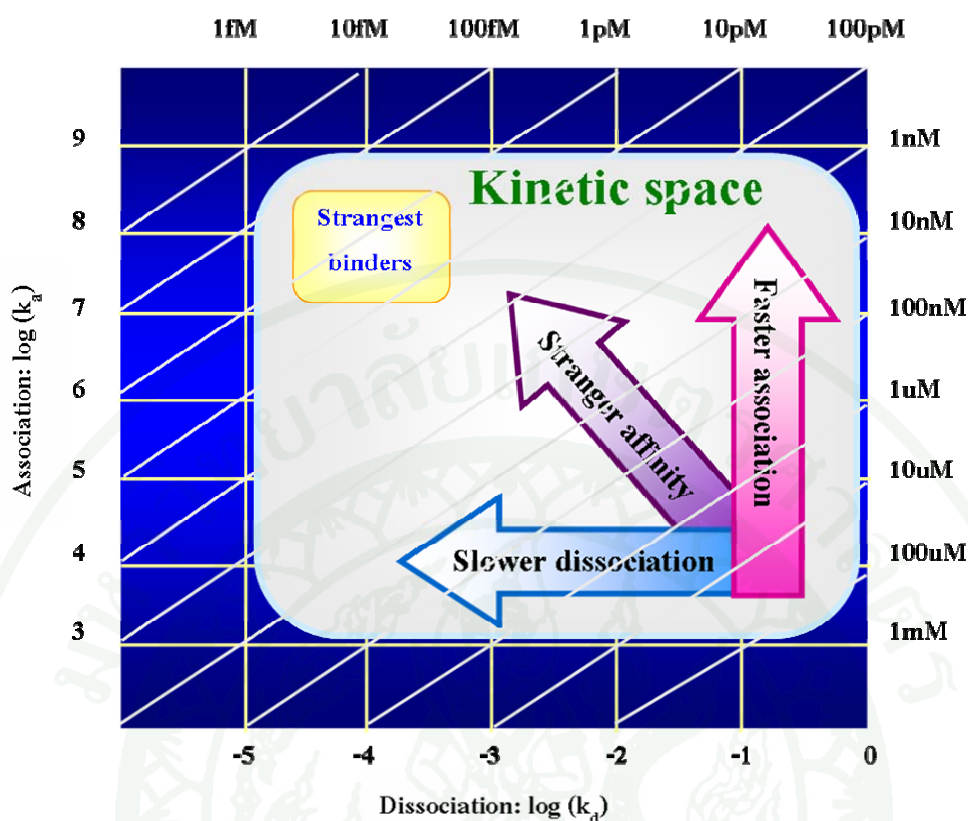
Boltovets *et al.* (2004b) ตรวจสอบเชื้อ TMV ด้วยเทคนิค SPR biosensor โดยปรับสภาพผิวแผ่นทองด้วยสาร KNCS ร่วมกับโปรตีน A พบว่าความเข้มข้นของเชื้อ TMV ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 2-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) สำหรับการตรวจสอบอยู่ที่ระดับ 0.019 นาโนกรัมต่อตารางมิลลิเมตร นอกจากนี้พบว่าไม่สามารถตรวจสอบโมเลกุลของสารที่เกิดปฏิกิริยาบนผิวแผ่นทองที่มีขนาดเกิน 1.5 ไมโครเมตร เนื่องจากตัวแปลงสัญญาณไม่สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของมุมสะท้อนกลับขณะเกิดปฏิกิริยาได้

Thierry *et al.* (2007) ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจำนวน 19 โคลน ต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Lettuce mosaic virus* (LMV) จำนวน 15 ไอโซเลต

ด้วยเทคนิค SPR competition พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจำนวน 19 โคลน มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ LMV

Rajendran and Nagy (2008) ทดสอบการจำลองตัวของอาร์เอ็นเอของเชื้อ *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) จากเอ็นไซม์ replicase ด้วยเทคนิค SPR biosensor พบว่าสามารถศึกษาจลจกรมการจำลองตัวของเอ็นไซม์ได้ในลักษณะพลวัต (dynamic) นอกจากนี้สามารถนำเทคนิค SPR biosensor มาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ replicase และสามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาการจำลองตัวของอนุภาคไวรัสในพืช เพื่อค้นหาแนวทางในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสต่อไป

Zsofia et al. (2010) ตรวจสอบเชื้อ *Apple stem pitting virus* (ASPV) ด้วยเทคนิค enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA) ที่ใช้หลักการตรวจสอบของ Biosensor โดยการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายสั้นหรือที่เรียกว่า aptamer ที่มีความจำเพาะกับส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ASPV โดยที่ aptamer เชื่อมเข้ากับเอ็นไซม์เพื่อขยายสัญญาณการตรวจสอบจากการทดลองพบว่าเทคนิค ELONA สามารถทำปฏิกิริยาตรวจสอบเชื้อ ASPV ที่สกัดจากพืชที่มีเชื้อเข้าทำลายได้ดีกว่าเทคนิค ELISA



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_a กับค่า K_d ภายหลังจากทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Lidstrom, n.d.)

เครื่อง SPR biosensor ที่มีจำหน่ายเป็นการค้ามีด้วยกันหลายบริษัท เช่น บริษัทออโตแลป (Autolab) ที่จำหน่ายเครื่อง SPR biosensor รุ่น Springle ยี่ห้อ Eco Chemie ซึ่งเครื่องในรุ่นนี้สามารถรายงานผลขณะเกิดปฏิกิริยา (real time detection) ใช้ช่วงความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร ในการรายงานผลการเข้าจับกันของสารบนพื้นผิวอนุภาคทองคำ ประมวลผลค่า K_a ในช่วง 10^3 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ และค่า K_d ในช่วง 10^{-5} - 10^{-1} s^{-1} สามารถตรวจสอบสารได้ในช่วงความเข้มข้น 10^{-11} - 10^{-3} M น้ำหนักโมเลกุลสารต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้เท่ากับ 180 ดาลตัน ใช้ระยะเวลาในการทดสอบต่อ 1 ตัวอย่างประมาณ 2 ชั่วโมง (Jan, 2010)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเทคนิค SPR biosensor

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเทคนิค SPR biosensor ได้แก่

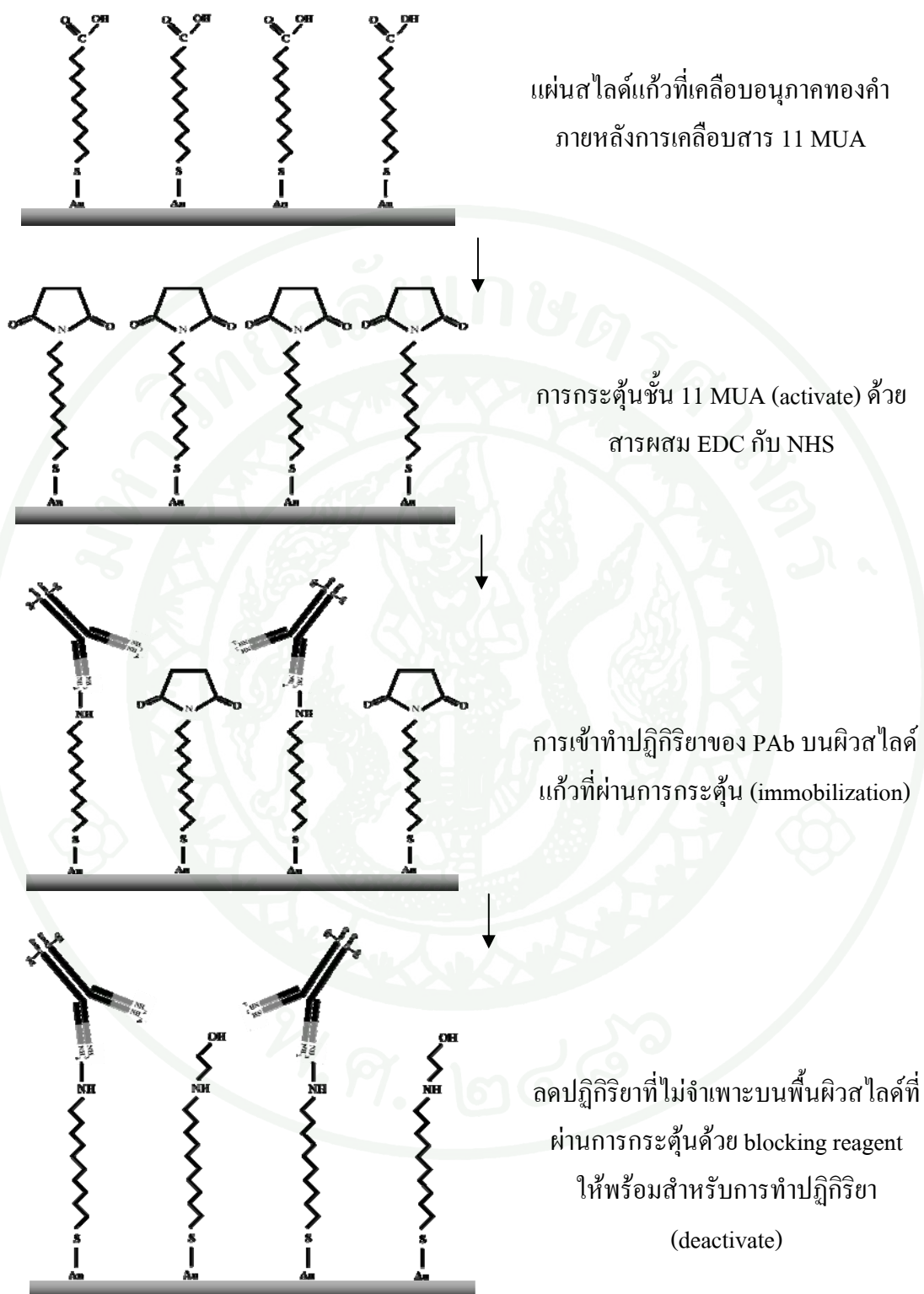
6.1 สารที่ใช้ในการปรับสภาพผิวแผ่นทอง

การเข้าทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีบนผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำเป็นลักษณะการเข้าจับแบบสุ่ม (random orientation) ทำให้การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีแต่ละครั้งให้ผลการทดลองไม่สม่ำเสมอ (Jyoung *et al.*, 2006) ดังนั้นการปรับสภาพพื้นผิวสไลด์ก่อนการตรึงแอนติบอดีสามารถกำหนดทิศทางการเข้าจับของแอนติบอดีและเพิ่มความเสถียรให้กับแอนติบอดีให้มีโครงสร้างพร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยา (Dijksma *et al.*, 2002) ซึ่งสารที่นิยมใช้มีหลายชนิด ได้แก่ 11-mercaptoundecyl hexa (ethylene oxide) (Vitalii *et al.*, 1997) สาร KNCS ร่วมกับโปรตีน A (Boltovets *et al.*, 2002) และ Wu *et al.* (2010) ได้ประยุกต์ใช้กราฟีน (graphene) เคลือบด้านบนอนุภาคทองคำที่เคลือบสไลด์ นอกจากนี้ Chen *et al.* (2010) ศึกษาคุณภาพพื้นผิวของกระจกสไลด์ที่เกิดการทำปฏิกิริยาพบว่าชนิดของโลหะที่เคลือบบริเวณพื้นผิวสไลด์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา โดยเฉพาะพื้นผิวที่มีความขรุขระจะมีผลต่อความไวในการทำปฏิกิริยาลดลงอย่างชัดเจน สารที่มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับใช้เคลือบสไลด์เพื่อทำปฏิกิริยา SPR ได้แก่ อนุภาคทองคำขนาดประมาณ 1.31-1.40 นาโนเมตร สามารถเพิ่มความไวในการทำปฏิกิริยา SPR ได้ถึง 48.6-58.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอนุภาคทองคำขนาด 2.02 นาโนเมตร ต่อมา Liying *et al.* (2010) ทดสอบการเพิ่มความไวในการทำปฏิกิริยาด้วยการพัฒนาสารเคลือบพื้นผิวสไลด์แก้วให้มีคุณสมบัติในการยึดจับกับสารชีวโมเลกุลได้ดียิ่งขึ้นและมีคุณสมบัติการสะท้อนกลับของแสงที่ดีเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจสอบ จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการเคลือบสไลด์แก้วด้วย ZnO-Au สามารถตรวจสอบ IgG ของกระต่ายได้ที่ระดับต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเคลือบสไลด์แก้วด้วยทองคำที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบาง นอกจากนี้พบว่า ZnO-Au มีความไวในการตรวจสอบ IgG สูงกว่าการเคลือบสไลด์ด้วยทองคำถึง 16 เท่า

สารปรับสภาพพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ 11 MUA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไธออล (thiol) สารดังกล่าวเกิดการสร้างพันธะโควาเลนต์กับแอนติบอดีระหว่างหมู่ carboxylic acid ของ 11 MUA กับหมู่ amine ของแอนติบอดี ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง (Jarupat, 2005) จากการทดสอบสารในกลุ่มไธออลจำนวน 4 ชนิด ของ Jean *et al.* (2006)

เพื่อปรับสภาพของแผ่นทองพบบว่าสาร 11 MUA ที่ถูกกระตุ้นด้วย NHS สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบ Interleukin (IL-6) ได้ที่ความเข้มข้น 268 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร ดังนั้นก่อนการตรึงสารชีวโมเลกุลเช่น แอนติบอดี บนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำและสารปรับสภาพพื้นผิวด้วย 11 MUA ควรมีการเติมสารเพื่อกระตุ้นการทำปฏิกิริยาในการเข้าจับกันระหว่างแอนติบอดีกับชั้น 11 MUA (self assembled monolayer; SAM) เช่นสารผสมระหว่าง 3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ *N*-hydroxyl-succinimide (NHS) โดย EDC เป็นสารเคมีที่มีหน้าที่เป็นตัวประสาน (crosslinker) ระหว่างหมู่ carboxylic acid กับ polymer อื่นทำให้เกิดการสร้างพันธะขึ้น ส่วน NHS เป็นสารอินทรีย์หรือสารชีวเคมีที่มีหน้าที่กระตุ้น (activate) สารในกลุ่ม carboxylic acid ให้สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่มีหมู่ amine ได้ (Rakhee *et al.*, 2008) การกระตุ้นพื้นผิวด้วย EDC และ NSH ก่อนการตรึงแอนติบอดี ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของมุมภายหลังการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น 150 องศา เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นทองที่ไม่ผ่านการกระตุ้นผิวแผ่นทอง (Autolab application note, n.d.)

สาร 11 MUA ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยสารผสมระหว่าง EDC กับ NHS เมื่อนำ PAb มาตรึงบนพื้นผิวดังกล่าวส่วนของหมู่ amine ของชั้น SAM ที่ปรับสภาพแล้วและหมู่ amine ของบริเวณที่ยึดจับแอนติเจน (antigen binding site) หรือพาราโทป (paratope) จะเกิดการสร้างพันธะโควาเลนต์ขึ้น 1 ตำแหน่ง ในบริเวณดังกล่าว ดังนั้นจึงเหลือส่วนของพาราโทปอีก 1 ตำแหน่ง (Heterologous) (ภาพที่ 5) เพื่อทำปฏิกิริยากับส่วนอีพิโทป (epitope) ของแอนติเจน จากปกติที่แอนติบอดีสามารถเข้าจับกับแอนติเจนได้ 2 ตำแหน่ง (Homologous) (Jarupat, 2005) ในขณะที่การยึดจับของแอนติบอดีในเทคนิค ELISA ไม่สามารถกำหนดลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีได้ จึงทำให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนไม่แน่นอนในแต่ละครั้งที่ทำปฏิกิริยาขึ้น ซึ่งลักษณะของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นใน ELISA microtitre plate มี 3 ลักษณะ ได้แก่ ยึดจับกับแอนติเจนได้ 2 ตำแหน่ง 1 ตำแหน่ง และไม่เกิดการเข้าจับกับแอนติเจน เมื่อส่วนของพาราโทปสร้างพันธะกับพื้นผิวของ ELISA microtitre plate โดยตรง เหตุการณ์นี้อาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่เติมสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะไม่สมบูรณ์หรือมีพื้นที่ว่างให้แอนติบอดีเข้าจับกับพื้นผิวของ plate ได้ (John, 2001)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวสโลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำเพื่อตรวจสอบเชื้อ
ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor (ดัดแปลงจาก Jaruput, 2005)

6.2 แอนติบอดี

แอนติบอดีเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างจำเพาะเจาะจงจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน (เชื้อสาเหตุโรคพืช) ซึ่งโดยส่วนมากเทคนิคทางเซรุ่มวิทยานิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เนื่องจากอนุภาคไวรัสมีขนาดเล็ก (นาโนเมตร) จึงไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือการสังเกตอาการ โดยตรงที่ปรากฏบนพืช (Peter *et al.*, 2008) จึงมีการพัฒนาเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสอยู่หลายเทคนิค รวมถึงเทคนิค SPR biosensor ที่นำแอนติบอดีมาเป็นตัวตรวจจับเชื้อไวรัส (Lee *et al.*, 2007) แอนติบอดีที่ใช้มีด้วยกันหลายชนิด อาทิ โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody; PAb) โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAAb) และแอนติบอดีสายผสม (recombinant antibody; RAb) เป็นต้น (Barry *et al.*, 2009) ก่อนการนำแอนติบอดีมาใช้เป็นตัวตรวจจับจำเป็นต้องนำแอนติบอดีมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้ ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ค่าการเจือจางสูงสุดที่แอนติบอดีสามารถตรวจสอบเชื้อได้ (titer) และความไวในการทำปฏิกิริยา (sensitivity) เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา (Leonard *et al.*, 2003)

การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชหลายชนิดด้วยเทคนิค Biosensor โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจจับ ได้แก่ เชื้อ *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (Marie *et al.*, 1992), *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Thierry *et al.*, 2007) และ *Oyster mushroom spherical virus* (OMSV) (Sang *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้ส่วนของ single chain variable fragment (scFv) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชด้วย อาทิ เชื้อ *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (Torrance *et al.*, 2006)

6.3 รูปแบบแอนติเจน

เทคนิค SPR biosensor สามารถตรวจได้ทั้งสารเคมีและสารที่มีมาจากธรรมชาติได้หลากหลายชนิด (Torreri *et al.*, 2005) โดยมีรายงานว่ามีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช ซึ่งรูปแบบของเชื้อไวรัสที่นำมาตรวจมีหลายชนิด เช่น การตรวจอนุภาคเชื้อไวรัสโดยตรงพบว่ามีรายงานดังนี้ เชื้อ *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) และ *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) (Alvin *et al.*, 2002), *Tobacco mosaic virus* (Boltovets *et al.*, 2002), *Lettuce mosaic virus* (Thierry *et al.*, 2007) และ *Apple stem pitting virus* (ASPV) (Zsofia *et al.*,

2010) เป็นต้น นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้ในการตรวจโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้น เช่น การตรวจสอบแอนติบอดี replicase ของเชื้อ *Tomato bushy stunt virus* (Rajendran and Nagy, 2008)

6.4 ชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ

การทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบสารชีวโมเลกุลเช่น เซลล์หรืออนุภาคเชื้อไวรัส บน พื้นผิวสโกลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำและผ่านการกระตุ้นด้วยสารต่างๆ ก่อนการทำปฏิกิริยากับ สิ่งตรวจควรเติมสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (blocking reagent) ที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวสโกลด์แก้ว ที่เคลือบสารปรับสภาพแต่ไม่มีการเข้าทำปฏิกิริยาของแอนติบอดี เพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาที่ จำเพาะเจาะจงต่อสิ่งตรวจเท่านั้น ซึ่งการทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่เหมาะสมสำหรับการ ทำปฏิกิริยาในแต่ละครั้งจึงมีความสำคัญ (Autolab application note, n.d.) ในกรณีที่ตรวจสอบ เชื้อในน้ำคั้นพืชมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบสาร blocking reagent เนื่องจากโปรตีนของออร์แกเนลล์ต่างๆ ในน้ำคั้นพืชเช่น คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ไมโครทิวบูล (microtubule) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และไรโบโซม (ribosome) เป็นต้น ซึ่งมีขนาด 200-400, 25, 400 และ 25 นาโนเมตร ตามลำดับ ([http://en.wikipedia.org/wiki/Plant cell](http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_cell)) จากขนาดของโปรตีนดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับ ในช่วงที่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิค SPR biosensor ได้ เนื่องจากของเทคนิคนี้สามารถ ตรวจสอบโมเลกุลที่มีขนาดไม่เกิน 400 นาโนเมตร (Autolab application note, n.d.) โดยที่โปรตีน ของออร์แกเนลล์ดังกล่าวจะเข้าจับกับพื้นผิวสโกลด์แก้วที่เคลือบสารปรับสภาพ (11MUA) ซึ่งเป็น บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเจาะจง แต่จะไม่มีการเข้าจับกับแอนติบอดี ตัวอย่างสารที่ใช้ลด ปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ เช่น BSA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Son *et al.*, 2007), BSA 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร (Su *et al.*, 2008), casein 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Kristina *et al.*, 2008), ethanolamine-HCl 1 โมลาร์ pH 8.5 (Satoshi *et al.*, 1998), glycine 10 มิลลิโมลาร์ (Rosa and Kubota, 2007) และ Poly-L-Lysine polyethylene glycol 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Shankar *et al.*, n.d.) เป็นต้น

6.5 สาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา

ภายหลังการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค SPR biosensor สิ้นสุดใน 1 รอบ ถ้า ต้องการทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิมบนผิวสโกลด์แก้ว จำเป็นต้องมีการเติมสาร regenerate buffer เพื่อทำลายพันธะโควาเลนต์ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีออกจากกัน (Anton, n.d.) ตัวอย่างสาร regenerate buffer ที่มีการใช้ในการล้างสิ่งตรวจออก เช่น glycine 50 มิลลิโมลาร์ pH 2.0 (Bram *et al.*, 2003), glycine pH 2.2 และ carbonate coating buffer pH 9.6 (Boltovets *et al.*, 2004), citric

buffer 0.3 มิลลิโมลาร์ pH 2.7 (Xia *et al.*, 2004), HCl 100 มิลลิโมลาร์ (Marjorie, 2006), glycine pH 2.0 (Peter *et al.*, 2007) และ NaOH 20 มิลลิโมลาร์ (Vanneste *et al.*, 2008) เป็นต้น ภายหลังจากเติมสาร regenerate buffer ทำให้แอนติบอดีหรือตัวตรวจจับสามารถกลับมาทำปฏิกิริยาซ้ำได้ โดยไม่ต้องมีการเติมแอนติบอดีใหม่ ซึ่ง regenerate buffer ที่ใช้ควรมีคุณสมบัติในการทำลายพันธะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี แต่ไม่ทำลายคุณสมบัติของแอนติบอดี เพื่อให้แอนติบอดีมีคุณสมบัติที่ดีสำหรับการทำปฏิกิริยาครั้งใหม่



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อ ChiVMV

แยกเชื้อ ChiVMV จากพริกชี้หนู (*Capsicum annuum*) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของเครือพันธุ์และคณะ (2536) และ Siriwongse *et al.* (1995) โดยเก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการใบด่างประจากแหล่งปลูกพริกในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค plate trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) จากนั้นแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี single local lesion isolation ในยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum*) สายพันธุ์ White Burley เมื่อใบยาสูบแสดงอาการแผลจุดเฉพาะที่ จึงตัดบริเวณแผลจุดที่แสดงอาการบนสไลด์ที่มี phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร (w/v) จากนั้นนำไปปลูกเชื้อ โดยทาน้ำคั้นพืชที่ผสมผงคาร์บอนดำลงบนใบลำโพง (*Datura metel*) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส ตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ในต้นลำโพงที่แสดงอาการด้วยเทคนิค PTA-ELISA จากนั้นเตรียมน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ ChiVMV จากลำโพงและปลูกเชื้อลงบนใบพริกชี้หนูปกติเพื่อตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการ

2. การตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ที่แยกได้จากพริกด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ตรวจเชื้อ ChiVMV จากใบพืชด้วยเทคนิค PTA-ELISA ตามวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Clark and Adams (1977) โดยเก็บใบยอด ใบที่ 3 และใบที่ 5 ที่อยู่ถัดจากใบยอด รวมเป็น 1 ตัวอย่างต่อ 1 ต้น บดใบพืชในสารละลาย carbonate coating buffer pH 9.6 ที่ผสม sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (sodium DIECA) 0.02 เปอร์เซ็นต์ ก่อนใช้ในอัตราส่วนใบพืชต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร (w/v) ใส่ น้ำคั้นพืชปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในหลุมของ ELISA microtitre plate (Costar 3590, Cambridge, MA, USA) ตัวอย่างละ 2 หลุม (โดยมีตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเส้นใบด่างประของพริก (positive control) และต้นพืชปกติ (negative control) เป็นตัวอย่างควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม blocking solution (powder non fat milk ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน PBS pH 7.4) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม antiserum ต่อเชื้อ ChiVMV (anti-ChiVMV, ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.รัชณี สงประยูร) ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:2,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated (Sigma, St.Louis, USA) ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน

1:10,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียม substrate solution (*p* - nitrophenyl phosphate) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ELISA substrate buffer (Diethanolamine 9.7 เปอร์เซ็นต์, Sodium azide 0.002 เปอร์เซ็นต์ และ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 เปอร์เซ็นต์) เติมนิพาลในหลุม ELISA microtitre plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 45 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiscan EX, Labsystem, Finland) ทั้งนี้ทุกขั้นตอนก่อนการเติมสารชนิดใหม่ลงในหลุมของ ELISA microtitre plate ต้องเทสารเดิมออกและล้างด้วย PBST (phosphate buffer saline ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 ที่ผสม Tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 3 ครั้ง ล้างครั้งแรก 400 ไมโครลิตรต่อหลุม ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 ล้างครั้งละ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ที่อุณหภูมิห้องครั้งละ 5 นาที

3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP

3.1 การสกัด RNA จากลำโพงที่ปลูกเชื้อ ChiVMV-KPS9

สกัด RNA จากใบลำโพงที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA ซึ่งดัดแปลงวิธีการสกัด RNA จากวิธีการของ Monthatip *et al.* (2009) บดใบพืชในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ตักตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube เติมนิพาล buffer (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, LiCl 100 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซ็นต์) 650 ไมโครลิตร ที่ผสม Na_2SO_3 2 เปอร์เซ็นต์ และเติมนิพาล PCI (มีอัตราส่วน phenol : chloroform: isoamyl เท่ากับ 25:24:1) 650 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 2 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ 450 ไมโครลิตร ตกตะกอน RNA ด้วย LiCl 4 โมลาร์ 450 ไมโครลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสออก ละลายตะกอนด้วย RNase free water 100 ไมโครลิตรต่อหลอด ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอน RNA ด้วย 2.5 เท่าของ absolute Ethanol และ 0.1 เท่าของ CH_3COONa 2.5 โมลาร์ pH 6.0 นำมาแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอน RNA ด้วย RNase free water ตรวจสอบ RNA ที่สกัดได้ด้วย Agarose gel electrophoresis

3.2 การสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene; CP gene) ของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน CP ด้วยวิธี reverse transcription (RT) ด้วยชุดสำเร็จรูป Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit # K1622 (Fermentas, Burlington, Canada) นำ total RNA ที่สกัดได้ 2.5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ Oligo (dT₁₈) 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase (RNase free water) 8.5 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอดพีซีอาร์บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในเครื่อง thermal cycler เป็นเวลา 5 นาที และเติม reaction buffer (5 เท่า) 4 ไมโครลิตร เติม Libo Lock™ Ribonuclease inhibitor ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และ dNTPs 10 มิลลิโมลาร์ 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Revert Aid™ M-MuLV Reverse transcriptase ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก cDNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA 1 ไมโครลิตร เป็นแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer (10 เท่า) 2 ไมโครลิตร MgCl₂ 25 มิลลิโมลาร์ 1.6 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ CVb CP1 (5'-GAA CCA TGG CGG GAG AGA GTG TTG AT-3') 1.25 พิโคโมลาร์ 0.4 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ CVb RP2 (5'-CAC GGA TCC CCT TAT GGT GGG AAC CCA-3') 0.5 พิโคโมลาร์ 1 ไมโครลิตร dNTPs 10 มิลลิโมลาร์ 1 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร และน้ำ 12.8 ไมโครลิตร กำหนดอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 35 รอบและปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE (tris base 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์ และ EDTA 0.02 โมลาร์) ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide solution ตรวจสอบผลภายใต้แสง ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง UV-transilluminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany) และบันทึกภาพ

3.3 การโคลนชิ้นส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9

เชื่อมต่อดีเอ็นเอ ChiVMV-KPS9-CP ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เข้าสู่พลาสมิด

พาหะ pGEM^R-T Easy (Promega, Madison, USA) ด้วยเอ็นไซม์ DNA ligase โดยใช้ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร เติม Rapid ligation buffer (2 เท่า) 5 ไมโครลิตร พลาสมิดพาหะ 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นย้ายพลาสมิดสายผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) ด้วยวิธี heat shock transformation ตามวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) โดยย้ายพลาสมิดสายผสม 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (competent cell) 100 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที บ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB 800 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 5,000 g ดูดอาหารส่วนบนออกปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาหาร LB 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเซลล์ที่ได้มา spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม แอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 40 ไมโครลิตร และเติม isopropyl-6-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 15 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน เลือกโคโลนีสีขาวจากการตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Blue-white screening

คัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค Bio-PCR ตามวิธีในข้อ 3.2 และเลือกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเฉพาะเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (QIAGEN, CA, USA) ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย บัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 4-6 ครั้ง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่ใน QIA prep column นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสใน QIA prep column ล้าง filter ของ QIA prep column ด้วยบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสออกและนำ QIA prep column มาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที นำ QIA prep column วางบน microcentrifuge หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างพลาสมิดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ EB 20 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ ChiVMV-KPS9

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 เป็น sequencing primer จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของไพรเมอร์ออก จัดเรียงแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม VecScreen ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับเชื้อ ChiVMV ในภูมิภาคเอเชียจำนวน 25 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) ที่มีรายงานบนฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) และจัดทำ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ของเชื้อ ChiVMV ในภูมิภาคเอเชียที่มีรายงานบนฐานข้อมูลของ GenBank

สายพันธุ์เชื้อ (strain)	ประเทศ	Genbank Accession number
BCV1	อินเดีย	DQ854962
BeCV1	อินเดีย	DQ854963
CCV3	อินเดีย	DQ854964
China1	จีน	DQ854950
China2	จีน	DQ854951
ChiVMV-VN/c1	เวียดนาม	DQ925440
ChiVMV-VN/c5	เวียดนาม	DQ925441
BP	ไทย	DQ854954
Cikabayan2	อินโดนีเซีย	DQ854960
CM1	ไทย	DQ854953
DCV3	อินเดีย	DQ854965
K37	ไทย	DQ854956
Pataruman	อินโดนีเซีย	DQ854961

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ (strain)	ประเทศ	Genbank Accession number
PJ	ไทย	DQ854955
P1037	ไต้หวัน	DQ854942
P3380	ไต้หวัน	DQ854943
P3389	ไต้หวัน	DQ854944
P3215	ไต้หวัน	DQ854945
P3525	ไต้หวัน	DQ854948
P3384	ไต้หวัน	DQ854946
P3488	ไต้หวัน	DQ854947
P714	ไต้หวัน	DQ854949
SKh5	ไทย	DQ854959
SRt8	ไทย	DQ854958
UB32	ไทย	DQ854957

4. การเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์

4.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9

เตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Brunt and Kenten (1972) โดยนำใบลำโพงที่ผ่านการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดและเติม borate buffer pH 7.8 (H_3BO_3 0.11 โมลาร์, NaOH 0.053 โมลาร์, HCl 0.048 โมลาร์ และ KCl 0.40 โมลาร์) ที่ผสม 2-mercaptoethanol 2 เปอร์เซ็นต์ และ chloroform อัตราส่วน พืช : chloroform : borate buffer pH 7.8 เท่ากับ 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร : 2 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2-4 ชั้น เก็บเฉพาะน้ำคั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเศษพืช แยกส่วนใสเติม polyethylene glycol (PEG; MW 6000) อัตราส่วน 50 กรัมต่อส่วนใส 1,000 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยแรง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย borate buffer pH 7.8 ในอัตราส่วน 1:10 ของน้ำคั้นพืชตั้งต้น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนน้ำใสมาเติม PEG 5 เปอร์เซ็นต์ และ NaCl 4 เปอร์เซ็นต์ นำไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วย borate buffer pH 7.8 ในอัตราส่วน 1:10 ของส่วนใส ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีสารแขวนลอยของอนุภาคไวรัสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ (partial purified virus) และเติม NaN_3 0.2 เปอร์เซ็นต์ กำจัดสารโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ ด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุง pleated dialysis tubing ที่มีค่า Molecular weight cut off 7000 (Snake Skin, Fisher Scientific, Rockford, USA) กวนใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการทดลองต่อไป

4.2 ตรวจสอบขนาดโปรตีนของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การตรวจสอบขนาดโปรตีนของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้ stacking gel 6 เปอร์เซ็นต์ และ separating gel 12 เปอร์เซ็นต์ นำอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ ผสมกับ sample buffer (bromophenol blue 0.1 เปอร์เซ็นต์, SDS 4 เปอร์เซ็นต์, 2-mercaptoethanol 5 เปอร์เซ็นต์, glycerol 10 เปอร์เซ็นต์ และ Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างที่เตรียมลงบนเจลช่องละ 15 ไมโครลิตร ใช้ความต่างศักย์คงที่ 40 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และเปลี่ยนเป็นความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย staining solution (commissie brilliant blue R-250 0.2 เปอร์เซ็นต์ methanol 50 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 7 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างเจลด้วย destaining solution (methanol 25 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 7 เปอร์เซ็นต์) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากนั้นเปรียบเทียบขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ChiVMV-KPS9 ที่ปรากฏกับแถบน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Ladder (Fermentas, Maryland, USA)) คำนวณน้ำหนักโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยการวัดระยะห่างของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละแถบจากด้านบน separating gel นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเทียบกับขนาดน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาน้ำหนักโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 และตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนจากพืช

4.3 การตรวจสอบขนาดโปรตีนของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค Western blotting

การตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blotting ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Harry *et al.* (1979) โดยเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลสู่ nitrocellulose membrane เป็นเวลา 100 นาที 40 โวลต์ แช่แผ่นเมมเบรนใน non fat milk powder 7 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำละลายใน TBST (Tris base saline 0.01 โมลาร์ และ Tween 20 0.05 เปอร์เซ็นต์) เวลาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่แผ่นเมมเบรนใน primary antibody (anti-ChiVMV) ที่เจือจางใน TBST อัตราส่วน 1:1,000 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นเมมเบรนใน goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated (Sigma, St.Louis, USA) ที่เจือจางใน TBST อัตราส่วน 1:10,000 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายสับสเตอร์ฟ (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate *p*-toluidine salt (BCIP) และ nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) อัตราส่วน 1:1) ที่อุณหภูมิห้องและมีค เมื่อปรากฏสีของแถบโปรตีนที่ทดสอบชัดเจนให้หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ เปรียบเทียบตำแหน่งของแถบสีที่ปรากฏกับแผ่นเจลโปรตีนที่ผ่านการย้อมสี commassie brilliant blue R-250 จากเทคนิค SDS-PAGE

4.4 ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ เจือจางด้วย PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 หยดบนกริด (grid) ที่ผ่านการเคลือบด้วยสาร Formvar เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย uranyl acetate เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่านิ่งมาเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรอง รอให้แห้ง จากนั้นตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (Model JEM-123080KV, JEOL, Japan)

5. การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในกระต่าย

5.1 การเก็บเซรุ่มปกติ (normal serum; Ns) ก่อนการฉีดเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์

กระต่ายที่ใช้ผลิตแอนติบอดีเป็นพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน น้ำหนัก 2.5 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว เป็นสัตว์ทดลอง เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็น

เซรุ่มปกติ (normal serum; Ns) ก่อนการฉีดเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์นำเลือดที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัว ใช้เข็มฉีดยาปลายแหลมกรีดขอบวงด้านในของภาชนะ เพื่อไม่ให้ก้อนเลือดที่แข็งตัวเกาะติดกับภาชนะ จากนั้นจึงเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แยกส่วนที่เป็นเซรุ่มออกจากก้อนเลือดโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนในขวดแก้ว 5 มิลลิลิตรต่อขวด และเติม NaN_3 0.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส (รัชนี, 2549)

5.2 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายและการเก็บแอนติบอดีต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9

ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ Complete Freund's adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) ของกระต่าย ซึ่งนับเป็นสัปดาห์แรกและเริ่มเจาะเลือดเพื่อเก็บแอนติบอดีต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไปจนครบ 8 ครั้ง โดยวิธีการเก็บเลือดเพื่อแยกเก็บแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ปฏิบัติเช่นการเก็บ Ns ตามวิธีการในข้อ 5.1 จากนั้นกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกระต่ายซ้ำอีกครั้ง โดยผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายเช่นเดิมและเริ่มเจาะเลือดในสัปดาห์ถัดไป (รัชนี, 2549)

6. การตรวจสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

6.1 ทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในเบื้องต้นกับน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 และน้ำคั้นลำโพงปกติเป็นตัวควบคุม (negative control) ด้วยเทคนิค PTA-ELISA ตามวิธีการในข้อ 2 โดยมีลำดับการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ดังภาพที่ 6

ทำการ cross absorb โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในน้ำคั้นใบลำโพงปกติ โดยนำ PAb เจือจางในน้ำคั้นใบลำโพงปกติ (บดใบลำโพงปกติใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 นำน้ำคั้นดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000

g จากนั้นนำส่วนใสด้านบนมาทำ cross absorb) อัตราส่วน 1:10 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ PAb ปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ด้วยเทคนิค PTA-ELISA และเทคนิค SPR biosensor ต่อไป

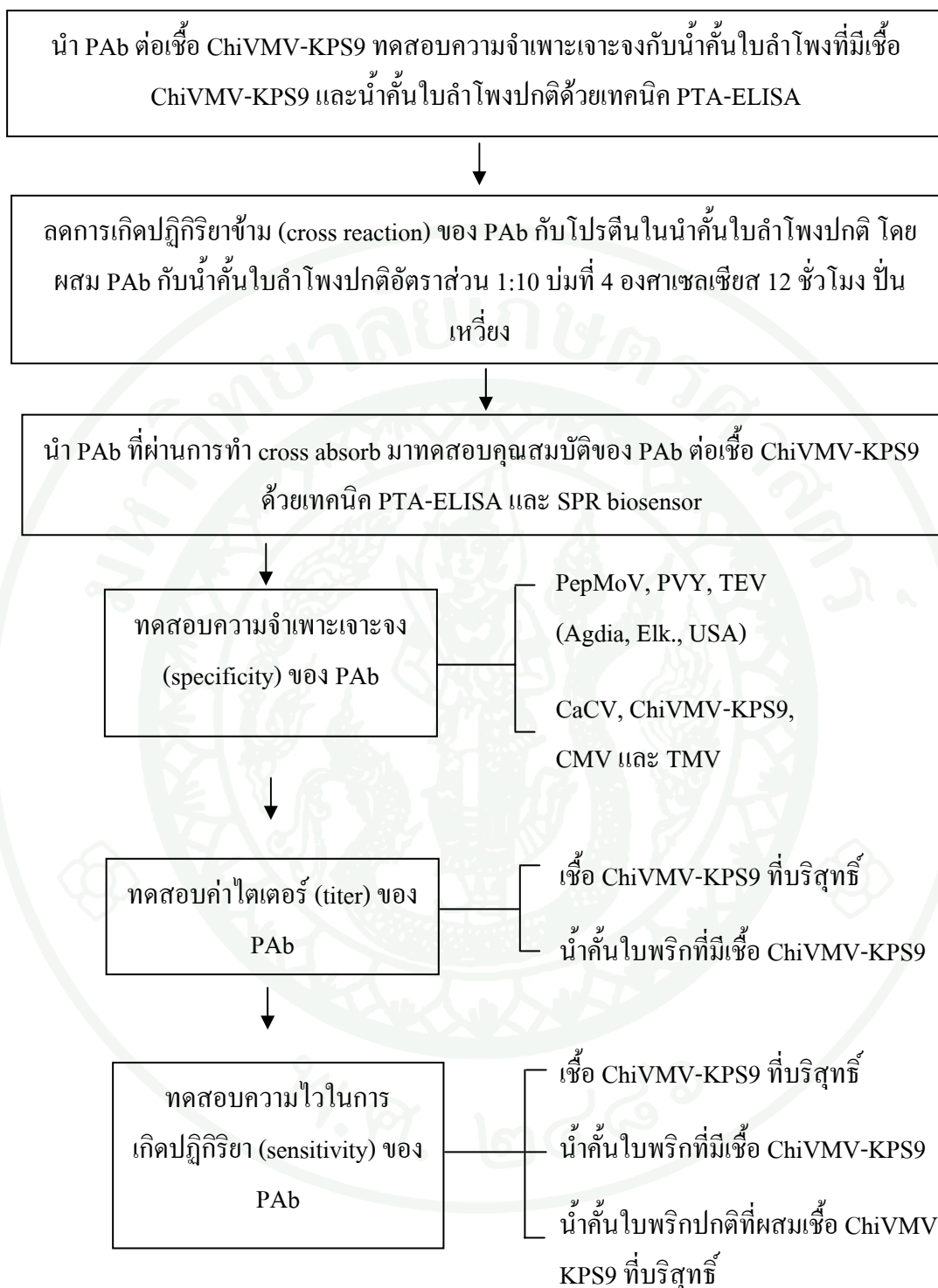
ทดสอบความจำเพาะของ PAb ด้วยเทคนิค PTA-ELISA ตามวิธีการในข้อ 2 โดยใช้เชื้อไวรัส 7 ชนิด ดังนี้ จีโนส Potyvirus ได้แก่ *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV) (Agdia, Elk., USA) จีโนส Cucumovirus ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV) จีโนส Tobamovirus ได้แก่ *Tobacco mosaic virus* (TMV) และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสจีโนส Tospovirus serogroup 4 ได้แก่ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) จาก ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ เชื้อไวรัสทั้งหมดเจือจางใน PBS pH 7.4 โดยมีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร น้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ซึ่งบดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) มี PBS pH 7.4 และน้ำคั้นใบลำโพงปกติที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) เติมตัวอย่างลงใน ELISA microtitre plate 50 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยเลือกใช้ PAb ใน PBS pH 7.4 ที่ค่าการเจือจาง 1:1,000 ในการทำปฏิกิริยา

6.2 ทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ PAb ด้วยวิธี PTA-ELISA ตามวิธีการในข้อ 2 โดยใช้เชื้อไวรัส ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก ใช้ PBS pH 7.4 และน้ำคั้นลำโพงปกติที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุม เจือจาง PAb แบบ 2 เท่า (two fold dilution) ใน PBS pH 7.4 เริ่มจากความเข้มข้น 1:1,000 จนถึง 1:512,000 เพื่อหาค่าการเจือจางสูงสุดของ PAb ที่ยังคงให้ผลบวก (end point titer) โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างใดมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมากกว่า 2 เท่าของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ของตัวอย่างควบคุมถือว่าตัวอย่างนั้นตรวจพบเชื้อ (มณีรัตน์, 2547)

6.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยวิธี PTA-ELISA

รูปแบบแอนติเจนสำหรับการทดสอบได้แก่ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ เจือจางแบบ 2 เท่า เป็นลำดับชั้นใน PBS pH 7.4 เริ่มจากความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม จนถึง 0.007 ไมโครกรัม น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 1:100 1:500 1:1,000, 1:2,000 และ 1:4,000 และน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ เจือจางแบบ 2 เท่า เป็นลำดับชั้น ใน PBS pH 7.4 เริ่มจากความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม จนถึง 1.953 ไมโครกรัม โดยมี PBS pH 7.4 และน้ำคั้นใบพริกปกติเป็นตัวอย่างควบคุม (negative control) ใช้ PAb ที่ค่าการเจือจางในระดับที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 6.2 ด้วยวิธี PTA-ELISA



ภาพที่ 6 ขั้นตอนในการเตรียมแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

7. ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

7.1 การเตรียมสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำสำหรับทำปฏิกิริยา

สไลด์แก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.54 เซนติเมตร ความหนา 0.085 เซนติเมตร ที่ผ่านการเคลือบพื้นผิวด้วยอนุภาคทองคำหนึ่งด้านเป็นชั้นหนา 50 นาโนเมตร (Autolab Springle, Utrecht, The Netherlands) นำสไลด์แก้วดังกล่าวมาเตรียมสำหรับการทำปฏิกิริยา โดยแช่สไลด์แก้วในสารละลาย piranha ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 10 โมลาร์ อัตราส่วน 1:6) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้ด้านที่เคลือบอนุภาคทองคำอยู่ด้านบนเสมอตลอดการเตรียมแผ่นสไลด์แก้ว ล้างสไลด์แก้วด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์แก้ววางในสารละลาย 11-Mercaptoundecanoic acid (11MUA) (Sigma-Aldrich, Capricorn, Singapore) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างสไลด์แก้วด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ผึ่งสไลด์แก้วให้แห้ง (ภาพที่ 7ก)

7.2 ขั้นตอนการตรวจสอบสัญญาณของปฏิกิริยา (Autolab Springle, Utrecht, The Netherlands)

ปรับค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ให้อยู่ในช่วง -2,000 ถึง 2,000 มิลลิดีกรี ซึ่งสังเกตจากกราฟที่ปรากฏที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ โดยค่าที่เหมาะสมและแนะนำให้ใช้มีค่าประมาณ -1,500 มิลลิดีกรี (ตามคู่มือของเครื่อง Autolab Springle) ต่อมาจึงปรับสภาพผิวแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำให้เสถียรด้วย PBS pH 7.4 ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยามีดังนี้ ขั้นที่ 1) กระตุ้นผิวสไลด์แก้ว (activate surface) ที่เคลือบอนุภาคทองคำและใช้ 11 MUA ให้พร้อมสำหรับการทำปฏิกิริยาด้วยสารผสมระหว่าง EDC และ NHS (Fluka, P.O., USA) อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 15 นาที ขั้นที่ 2) ตรึง PAb (immobilization) ตามระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบบนผิวสไลด์แก้วที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อที่ 1 เป็นเวลา 20 นาที ขั้นที่ 3) ลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะบนผิวสไลด์แก้ว (deactivate surface) ด้วย blocking reagent เป็นเวลา 15 นาที ขั้นที่ 4) ทำปฏิกิริยา (interaction plot) กับแอนติเจน เช่น เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ น้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 น้ำคั้นพืชปกติ และ PBS pH 7.4 เป็นต้น เป็นเวลา 10 นาที และขั้นที่ 5) เติม regenerate buffer เพื่อดึงแอนติเจนออกจากแอนติบอดีเป็นเวลา 10 นาที



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการทดสอบเชื้อด้วยเทคนิค SPR biosensor ก) อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการล้างและเคลือบแผ่นสไลด์แก้วด้วย 11 MUA ข) เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ ค) การวางแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำบนปริซึมและ ง) โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (Data acquisition version 5.1; Autolab Springle, Utrecht, The Netherlands) และ โปรแกรมการประมวลผลการทำปฏิกิริยา (Kinetic Evaluation version 5.1; (Autolab Springle, Utrecht, The Netherlands)

7.3 ตรวจสอบค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ขณะทำปฏิกิริยากับสารชนิดต่างๆ บนพื้นผิวสไลด์แก้ว

ลำดับการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR บนพื้นผิวสไลด์แก้วที่ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ มีลำดับดังนี้ ลำดับที่ 1) แผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำโดยปราศจากการเคลือบสาร 11 MUA ลำดับที่ 2) แผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำและผ่านการเคลือบสาร 11 MUA ลำดับที่ 3) กระตุ้นพื้นผิวสไลด์แก้วดังกล่าว (activate surface) ให้พร้อมสำหรับการทำปฏิกิริยากับ EDC และ NHS ลำดับที่ 4) ตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบสาร (immobilize surface) ด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000 ลำดับที่ 5) ลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะบนพื้นผิวสไลด์แก้ว (deactivate surface) ด้วย ethanolamine 1 โมลาร์ (Sigma-Aldrich, Capricorn, Singapore) และลำดับที่ 6) ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา (interaction plot) กับสาร 2 ชนิด คือ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ PBS pH 7.4

วิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำและสารต่างๆ ในแต่ละขั้นตอนตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete random design; CRD) ทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ในแต่ละขั้นตอนด้วยโปรแกรม R (Ross and Robert, 2009)

7.4 ทดสอบความสม่ำเสมอ (uniformity) ของการเกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบสารต่างๆ

ทดสอบความสม่ำเสมอของการเกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบสารต่างๆ ตามลำดับ จำนวน 5 ตำแหน่ง บนแผ่นสไลด์แก้วแผ่นเดียวกันด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000 ใช้ ethanolamine 1 โมลาร์ เป็น blocking reagent ทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ PBS pH 7.4 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ในแต่ละขั้นตอนด้วยโปรแกรม R (Ross and Robert, 2009)

8. ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

8.1 ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ

ทดสอบสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ 4 ชนิด ดังนี้ ชนิดที่ 1) โปรตีน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่ 2) โปรตีน casein ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่ 3) ethanolamine ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ชนิดที่ 4) โปรตีน powder non fat milk ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ และชนิดที่ 5) สาร polyethylene glycol (PEG; MW 6,000) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

เลือกใช้ PAb ที่ผ่านการ cross absorb แล้วนำมาเจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000 ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 เปรียบเทียบกับน้ำคั้นลำโพงปกติ โดยน้ำคั้นพืชทั้ง 2 ชนิด บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ทำปฏิกิริยา ซึ่งน้ำคั้นที่ใช้ในการทดสอบ ในปฏิกิริยาในทุกการทดลองต้องผ่านการเตรียมด้วยวิธีการข้างต้น

8.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ในการเกิดปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับเชื้อไวรัส 7 ชนิด ดังนี้ จีโนส Potyvirus ได้แก่ *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV) (Agdia, Elk., USA) จีโนส Cucumovirus ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV) จีโนส Tobamovirus ได้แก่ *Tobacco mosaic virus* (TMV) และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสจีโนส Tospovirus serogroup 4 ได้แก่ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) จาก ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ เชื้อไวรัสทั้งหมดเจือจางใน PBS pH 7.4 โดยมีน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) นอกจากนี้มี PBS pH 7.4 และน้ำคั้นใบลำโพงปกติที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) เลือกใช้ PAb ที่ผ่านการ cross absorb แล้วนำมาเจือจางใน PBS pH 7.4 ที่ค่าการเจือจาง 1:1,000 แล้วตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เปรียบเทียบกัน

8.3 ทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9

เจือจาง PAb ที่ผ่านการ cross absorb ใน PBS pH 7.4 แบบ 2 เท่า เป็นลำดับขั้น (two fold serial dilution) เริ่มจาก 1:1,000 ถึง 512,000 ใช้ blocking reagent ที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 8.1 เป็นสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะและทดสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่

ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และมี PBS pH 7.4 เป็นตัวอย่างควบคุม (negative control)

8.4 ทดสอบความไว (sensitivity) ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9

การทดสอบแอนติเจนรูปแบบต่างๆ ได้แก่ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ เจือจาง ใน PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม และ 8 ไมโครกรัม น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:2,000 และ 1:4,000 และน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม และ 500 ไมโครกรัม โดยมี PBS pH 7.4 และน้ำคั้นใบพริกปกติเป็นตัวอย่างควบคุม ใช้ PAb ที่ผ่านการ cross absorb แล้วนำมาเจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

8.5 ทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา

สาร regenerate buffer ที่นำมาทดสอบมี 4 ชนิด ดังนี้ ชนิดที่ 1) carbonate coating buffer pH 9.6 ชนิดที่ 2) glycine ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 2.2 และ pH 3.5 ชนิดที่ 3) NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 10, 15, 20, 25 และ 40 มิลลิโมลาร์ และชนิดที่ 4) PBST pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โดยเลือกใช้ blocking reagent และ PAb ที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 8.1 และ 8.3 ส่วนแอนติเจนที่ทดสอบมี 2 ชนิด ได้แก่ น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 และเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

8.6 ทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ

ทดสอบจำนวนซ้ำที่สามารถตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้บนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ 1 ตำแหน่ง โดยเติม blocking reagent, PAb และ regenerate buffer ที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 8.1, 8.3 และ 8.5 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับสาร 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 ภายหลังการทำปฏิกิริยาของสารแต่ละชนิด

จึงเติมสาร regenerate buffer จากนั้นเติมสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเดิมเพื่อทำปฏิกิริยารอบใหม่ แต่ไม่ต้องเติม PAb ในการทำปฏิกิริยารอบใหม่ ทำปฏิกิริยาซ้ำเช่นนี้ต่อไปและสังเกตลักษณะการเกิดปฏิกิริยาจากข้อมูลที่ปรากฏ วางแผนการทดลองแบบ CRD เพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละครั้งและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม R (Ross and Robert, 2009)

8.7 ทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

นำแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ผ่านการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค SPR biosensor มาแล้ว นำกลับมาล้างด้วยสารละลาย Piranha (H_2O_2 : H_2SO_4 ความเข้มข้น 10 โมลาร์ อัตราส่วน 1:6) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเตรียมสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำเช่นวิธีการในข้อ 8.1 จากนั้นนำสไลด์แก้วดังกล่าวมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำแผ่นที่ยังไม่เคยใช้งาน โดยเลือกใช้ blocking reagent, PAb และ regenerate buffer ที่เหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 8.1, 8.3 และ 8.5 ตามลำดับ สารที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยามีดังนี้ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 มีตัวอย่างควบคุม (negative control) คือ PBS pH 7.4 และน้ำคั้นใบพริกปกติที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม R (Ross and Robert, 2009)

9. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA

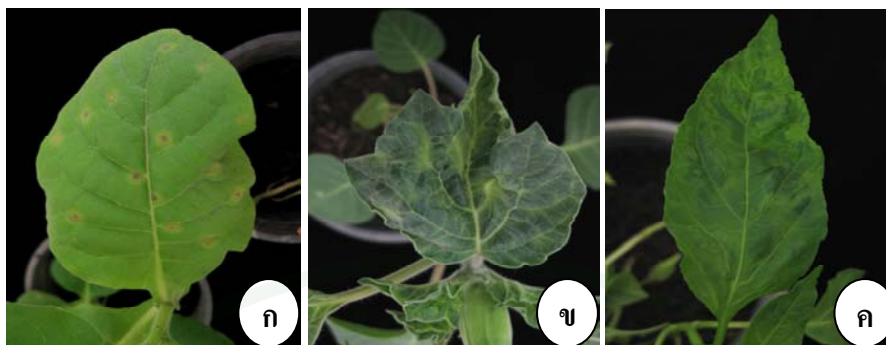
เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของทั้ง 2 เทคนิค โดยพิจารณาจากความจำเพาะเจาะจง (specificity) ค่าการเจือจางสูงสุดของแอนติบอดีที่สามารถตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ (titre) ความไว (sensitivity) ค่า K_d ค่า K_d ค่าใช้จ่าย ระยะเวลาในการทดสอบ ปริมาตรสารที่ใช้ตรวจสอบและจำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยาซ้ำเมื่อใช้แอนติบอดีเดิม

ผลและวิจารณ์

1. แยกเชื้อ ChiVMV จากพริกให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวและตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ในพืชอาศัย

ผลการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV ในตัวอย่างพริกทั้ง 10 ตัวอย่าง ที่มีอาการต่างประจกแหล่งปลูกพริกในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ด้วยเทคนิค PTA-ELISA ตรวจพบเชื้อ ChiVMV จำนวน 2 ตัวอย่าง จากนั้นจึงแยกเชื้อ ChiVMV ด้วยยาสูบใบใหญ่ (*N. tabacum*) สายพันธุ์ White Burley เกิดแผลจุดเฉพาะแห่งก่อนข้างกลมขนาด 0.3-0.5 เซนติเมตร ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน (ภาพที่ 8ก) นำแผลจุดแต่ละจุดปลูกเชื้อบนใบลำโพง พบว่าลำโพงแสดงอาการต่างระหว่างเส้นใบ ใบเล็กเล็กเสียวรูปหลังการปลูกเชื้อได้ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 8ข) ซึ่งลักษณะอาการที่ปรากฏสอดคล้องกับรายงานของเครือพันธุ์และคณะ (2536) และ Siriwong *et al.* (1995) จากนั้นเตรียมนำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV และปลูกเชื้อลงบนใบพริกพันธุ์ CA500 พบอาการต่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มระหว่างเส้นใบ เส้นใบย่น ใบเสียวรูป ภายหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 8ค) จึงตั้งชื่อสายพันธุ์ของเชื้อ ChiVMV ว่า KPS9 (ChiVMV-KPS9)

ภายหลังการแยกเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์นำเชื้อตรวจสอบการเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยเช่น พริก CA500 ลำโพงและยาสูบใบใหญ่สายพันธุ์ White Burley ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณในพริก CA500 ได้สูงสุดหลังการปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ ส่วนในลำโพงเชื้อไวรัสเพิ่มปริมาณได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการปลูกเชื้อ นอกจากนี้เชื้อ ChiVMV-KPS9 ชักนำให้พืชแสดงอาการต่างทั่วทั้งต้น (systemic symptom) ส่วนยาสูบใบใหญ่สายพันธุ์ White Burley แสดงอาการแบบแผลจุดเฉพาะที่ (local lesion) ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน และตรวจพบเชื้อเพียง 1 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อเท่านั้น (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 8 ลักษณะอาการของพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ ChiVMV-KPS9 ก) ลักษณะอาการของยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum*) สายพันธุ์ White Burley ข) ลักษณะอาการของตำโพง (*Datura metel*) และ ค) ลักษณะอาการของพริก (*Capsicum annuum*) สายพันธุ์ CA500

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในพืชทดสอบหลังการปลูกเชื้อ 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยวิธี PTA-ELISA

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (วัน)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในพืชอาศัย ¹		
	พริก CA500 ² (<i>C. annuum</i>)	ตำโพง ² (<i>D. metel</i>)	ยาสูบ White Burley ² (<i>N. tabacum</i>)
7	0.560 (+)	1.248 (+)	0.343 (+)
14	0.721 (+)	1.492 (+)	0.111 (-)
21	0.453 (+)	1.536 (+)	0.143 (-)
28	0.738 (+)	1.464 (+)	0.121 (-)
ตัวอย่างพืชปกติ	0.153	0.186	0.107

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้ คำนวณจาก 10 ซ้ำ (ต้น) ภายหลังเติมขั้วสเตรท 45 นาที่ เมื่อใช้แอนติบอดีต่อ ChiVMV ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:2,000

^{2/} น้ำคั้นพืชชนิดต่างๆ บดใน carbonate coating buffer pH 9.6 อัตราส่วน 1:10 (กรัม:มิลลิลิตร)

(-) คือ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

(+) คือ เกิดปฏิกิริยาได้ เมื่อมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมากกว่า 2 เท่าของตัวอย่างพืชปกติ (negative control)

2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีน CP ของเชื้อ ChiVMV-KPS9 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

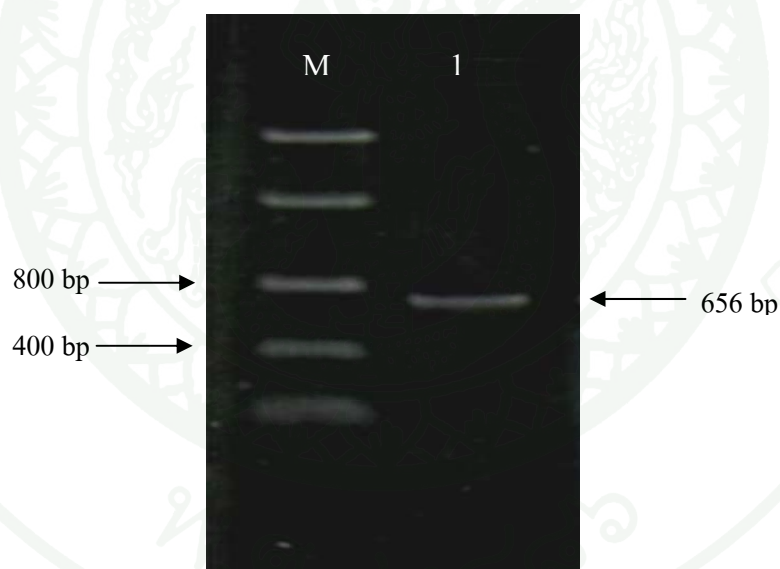
จำแนกเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยใช้ข้อมูลส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP เนื่องจากยีนดังกล่าวเป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อในจีนัสโพทิวไรสแต่ละชนิดหรือเรียกว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของโพทิวไรส (Chen *et al.*, 2001 และ Moury *et al.*, 2005) ซึ่งยีน CP ของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ศึกษามีความยาว 656 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP กับเชื้อ ChiVMV สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานในทวีปเอเชีย (ตารางที่ 2) รวม 25 สายพันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีน CP ของเชื้อ ChiVMV สายพันธุ์ K37, SKh5, CM1, SRt8 และ BP จากประเทศไทย ChiVMV-VN/C1 และ ChiVMV-VN/C5 จากประเทศเวียดนาม Cikabayan2 และ Pataruman จากประเทศอินโดนีเซีย ที่ระดับ 91.0-96.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและนำมาสร้างแผนภาพเดนโดแกรมพบว่าเชื้อ ChiVMV-KPS9 และเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่มที่ 2 (ภาพที่ 10) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของเชื้อ ChiVMV ส่งข้อมูลเก็บบนฐานข้อมูลใน Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) ได้รับ accession number คือ EU636198

3. การเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9

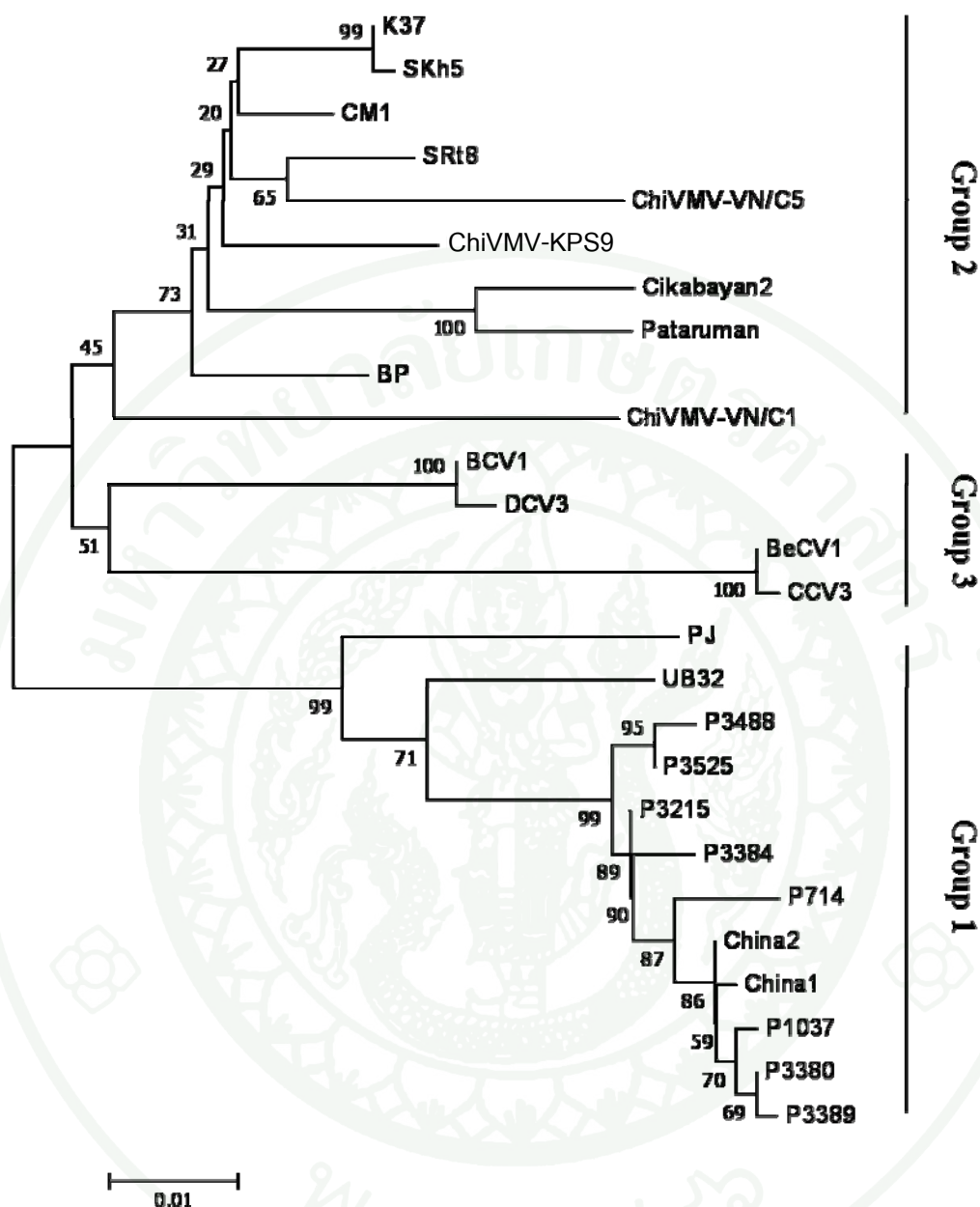
3.1 ตรวจสอบขนาดโปรตีนของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ภายหลังการเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Brunt and Kenten (1972) โดยแยกขนาดของโปรตีนด้วย 12 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่เตรียมได้มี 2 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 28.0 และ 32.8 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11ก) จากการเปรียบเทียบกับขนาดของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Wang *et al.* (2005) ที่กล่าวว่าโปรตีนขนาด 32.8 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ

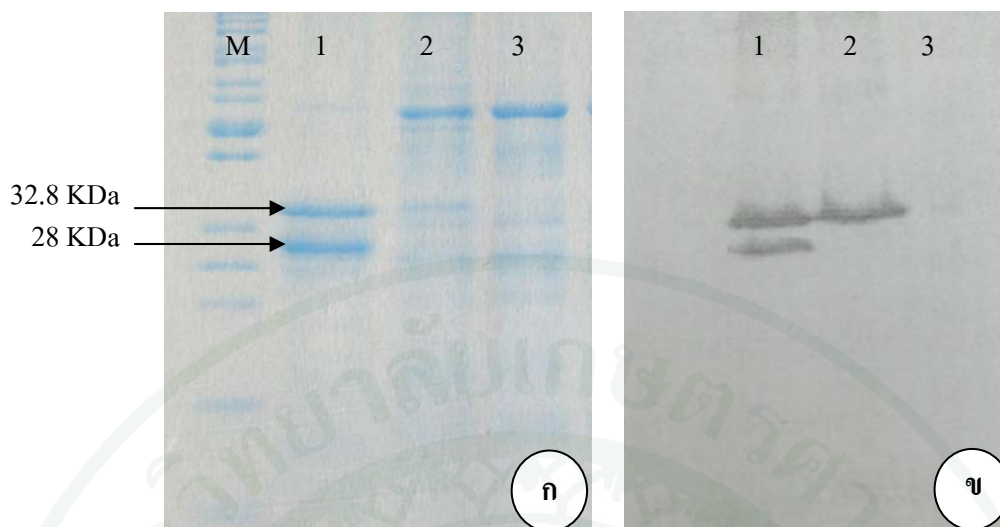
ChiVMV-KPS9 ที่สมบูรณ์ (full length) ส่วนโปรตีนขนาด 28.0 กิโลดาลตัน สันนิษฐานว่าเป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่เสื่อมสภาพ เนื่องจากการเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ในภาพเจลปรากฏแถบโปรตีนอื่นที่มีขนาดต่างๆ กระจายอยู่ในช่อง (lane) เดียวกัน พิสูจน์ความบริสุทธิ์ของแถบโปรตีนดังกล่าวด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้ PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV ที่อัตราส่วน 1:1,000 ปรากฏแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในตัวอย่างเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 11ข) ปรากฏแถบโปรตีน 2 ขนาดที่ตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนที่แยกขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE (28.0 และ 32.8 กิโลดาลตัน) แสดงว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ส่วนโปรตีนอื่นที่ปรากฏในภาพเจล SDS-PAGE เป็นแถบโปรตีนของพืชที่ปนเปื้อนจากการเตรียมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้บริสุทธิ์ ส่วนน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวอาจเนื่องจากการไม่มีการเสื่อมสภาพของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในขณะที่เตรียมน้ำคั้นใบลำโพง



ภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis 0.8 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR จากไพรเมอร์ CVb CP1 และ CVb RP2
M คือ Middle range DNA marker (Fermentas, Ontario, Canada)
1 คือ ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับเชื้อ ChiVMV จากประเทศจีน ไทย ไต้หวัน เวียดนาม อินเดียและอินโดนีเซียที่มีรายงานใน GeneBank โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 ด้วยวิธี Neighbor Joining ตัวเลขเหนือเส้นแสดงค่า Bootstrap จากการคำนวณ 1,000 ครั้ง



ภาพที่ 11 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับโปรตีนมาตรฐานเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค ก) SDS-PAGE และ ข) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยใช้ PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค Western Blotting

M คือ Protein Molecular Weight Ladder (Fermentas, Maryland, USA)

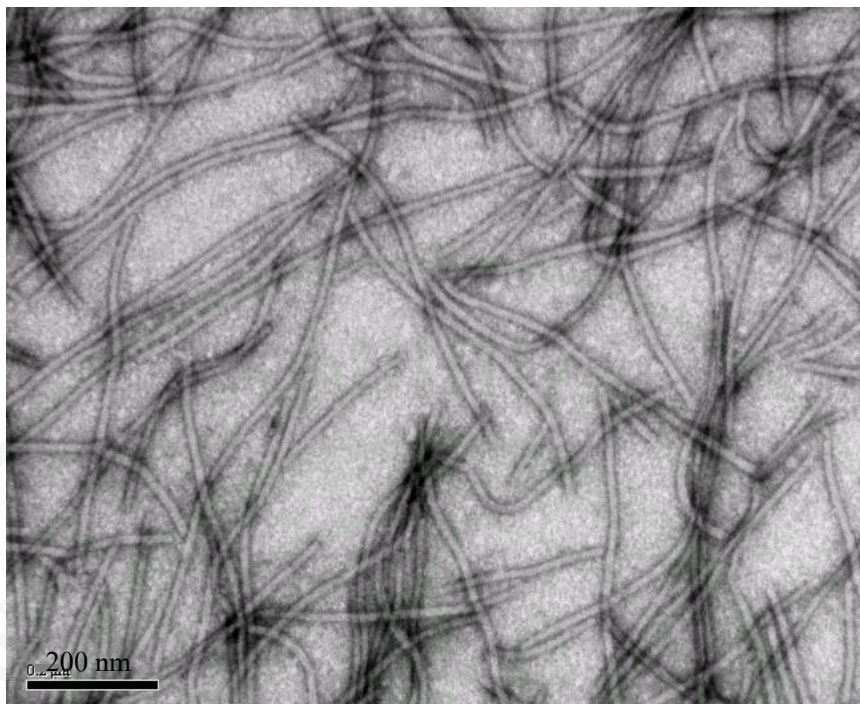
1 คือ โปรตีนของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 1.5 มิลลิกรัม

2 คือ โปรตีนในน้ำคั้นใบลำไยที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 อัตราส่วน 1:5

3 คือ โปรตีนในน้ำคั้นใบลำไยต้นปกติอัตราส่วน 1:5

3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ภายหลังจากนำเชื้อที่บริสุทธิ์ตรวจสอบสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 80,000 เท่า พบว่าอนุภาคของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดความยาว 765 นาโนเมตร ความกว้างประมาณ 12-15 นาโนเมตร (ภาพที่ 12) สอดคล้องกับการรายงานของ Prakash *et al.* (2002)



ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคเชื้อ ChiVMV-KPS9 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4. เปรียบเทียบการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor

4.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในเบื้องต้นกับน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 มีน้ำคั้นใบลำโพงปกติเป็นตัวอย่างควบคุม (negative control) และใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่า PAb ที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ให้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ($O.D._{405nm}$) เท่ากับ 2.631 และน้ำคั้นใบลำโพงปกติให้ค่า $O.D.$ เท่ากับ 0.401 ภายหลังการเติมซบสเตรท 45 นาที ซึ่งค่า $O.D.$ ที่วัดได้ในน้ำคั้นใบลำโพงปกติมีค่าอยู่ในระดับค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีการนำ PAb ดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา cross absorb เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในน้ำคั้นใบลำโพงปกติ จากนั้นจึงนำ PAb ที่ผ่านการทำ cross absorb มาทดสอบความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ

ไวรัส 7 ชนิด คือ PepMoV, PVY และ TEV (Agdia, Elk., USA) CaCV, CMV, TMV เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และนำคั่นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ใช้ PAb ที่ผ่านการ cross absorb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่า PAb ดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสทั้ง 6 แต่พบว่า PAb ที่ผ่านการทำ cross absorb ให้ค่า O.D. ลดลงจากเดิมซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของมณีรัตน์ (2547) ที่ทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CMV 30RS แต่ละโคลนพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางโคลนที่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั่นพืชปกติ จึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวมาทำ cross absorb กับน้ำคั่นพืชปกติ ซึ่งปรากฏว่าการทดสอบค่าไคเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำ cross absorb มีค่า O.D. ลดลง นอกจากนี้ PAb ดังกล่าวที่นำมาทดสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีค่า O.D. เท่ากับ 1.513 มีค่า K_d และ K_a เท่ากับ $1.1961 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.4353 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ ส่วนน้ำคั่นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 มีค่า O.D. เท่ากับ 2.450 มีค่า K_d และ K_a เท่ากับ $1.917 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.8203 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาค่า K_d พบว่า PAb ที่ผ่านการ cross absorb มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ ChiVMV-KPS9

ดังนั้นจึงเลือกใช้ PAb ที่ผ่านการทำ cross absorb เรียบร้อยแล้วในการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของ PAb ด้วยเทคนิค PTA-ELISA และการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor โดยใช้เชื้อไวรัส 7 ชนิด และใช้ PAb ในการทำปฏิกิริยาเช่นการทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่า PAb ที่ผ่านการ cross absorb มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั่นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 มีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เท่ากับ 315.02 RU ซึ่งมีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR สูงกว่าการทดสอบน้ำคั่นใบลำโพงปกติประมาณ 2 เท่า (152.30 RU) งานวิจัยครั้งนี้จึงกำหนดค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่ให้ผลเป็นบวก เมื่อตัวอย่างที่ทดสอบมีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (negative control) 2 เท่า นอกจากนี้แล้วการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ดังกล่าวพบค่า K_d และค่า K_a มีค่าเท่ากับ $3.018 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.1039 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ แต่ค่า K_d ของเชื้อไวรัสอื่นๆ ทั้ง 6 ชนิดให้ค่าที่ติดลบมีค่าอยู่ในช่วง -1.781×10^4 ถึง $-2.971 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และค่า K_a ของเชื้อไวรัสทั้ง 6 ชนิด ให้ค่าที่ติดลบเช่นกันมีค่าอยู่ในช่วง -1.1264×10^{-4} ถึง $-3.3934 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงว่า PAb ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 และไม่

เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสทั้ง 6 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า K_a ของทั้งสองเทคนิคพบว่าเทคนิค SPR biosensor ให้ค่า K_a สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 25 เท่า ส่วนการคำนวณค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับ PTA-ELISA ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 7 ชนิด พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ของทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันที่ระดับ 0.821 แสดงว่าผลการทดลองของทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันในทิศทางเดียวกัน



ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส 7 ชนิด ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ชนิดของเชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบ	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ⁴	ค่า K_d (M ⁻¹ S ⁻¹)	ค่า K_d (S ⁻¹)
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV-KPS9) ¹	1.513	1.196x10 ⁴	6.435 x10 ⁻³
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV-KPS9) ²	2.450	1.917 x10 ⁴	6.820 x10 ⁻³
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) ²	0.151	0.483 x10 ²	0.982 x10 ⁻⁴
<i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV) ³	0.215	0.671 x10 ²	1.366 x10 ⁻⁴
<i>Potato virus Y</i> (PVY) ³	0.225	0.649 x10 ²	1.320 x10 ⁻⁴
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV) ³	0.178	0.569 x10 ²	1.158 x10 ⁻⁴
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) ²	0.137	0.438 x10 ²	0.891 x10 ⁻⁴
<i>Capsicum chlorosis virus</i> (CaCV) ²	0.107	0.342 x10 ²	0.696 x10 ⁻⁴
PBS pH 7.4	0.096	0.307 x10 ²	0.625 x10 ⁻⁴
น้ำคั้นใบลำโพงปกติ ²	0.245	0.783 x10 ²	1.594 x10 ⁻⁴

^{1/} เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

^{2/} ตัวอย่างน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 และน้ำคั้นใบลำโพงปกติที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10

^{3/} ตัวอย่างเชื้อ Potyvirus (Agdia, Elk. , USA) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

^{4/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1.000

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส 7 ชนิด ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ชนิดของเชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบ	ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม		
	SPR (RU) ⁵	ค่า K_a (M ⁻¹ S ⁻¹)	ค่า K_d (S ⁻¹)
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV-KPS9) ¹	281.25	3.018×10^5	6.1039×10^{-4}
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV-KPS9) ²	315.02	9.010×10^5	6.9361×10^{-4}
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) ²	110.50	$(-2.114) \times 10^4$	$(-3.110) \times 10^{-4}$
<i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV) ³	35.00	$(-2.150) \times 10^4$	$(-1.282) \times 10^{-4}$
<i>Potato virus Y</i> (PVY) ³	38.25	$(-2.520) \times 10^4$	$(-1.126) \times 10^{-4}$
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV) ³	153.13	$(-1.781) \times 10^4$	$(-1.978) \times 10^{-4}$
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) ²	35.82	$(-2.210) \times 10^4$	$(-3.393) \times 10^{-4}$
<i>Capsicum chlorosis virus</i> (CaCV) ²	33.09	$(-2.971) \times 10^4$	$(-3.003) \times 10^{-4}$
PBS pH 7.4 ⁴	2.500	$(-1.580) \times 10^2$	$(-0.496) \times 10^{-4}$
น้ำคั้นใบลำโพงปกติ ^{2,4}	152.30	$(-2.080) \times 10^4$	$(-1.991) \times 10^{-4}$

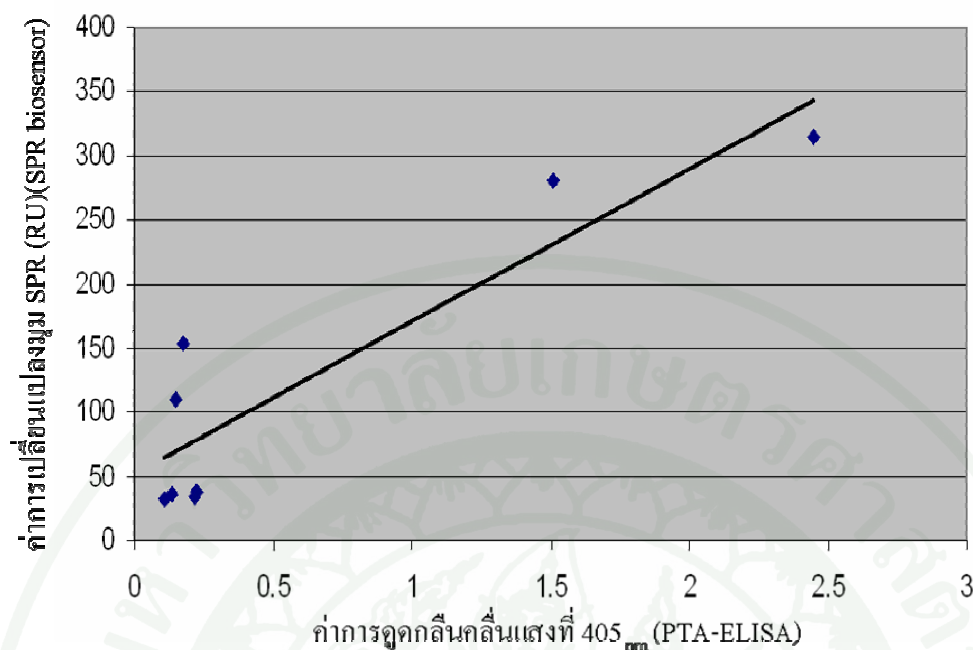
^{1/} เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

^{2/} ตัวอย่างน้ำคั้นพืชที่มีและไม่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10

^{3/} ตัวอย่างเชื้อ Potyvirus (Agdia, Elk., USA) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

^{4/} ตัวอย่างควบคุม (negative control) ในกรณี PBS pH 7.4 เป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์และน้ำคั้นใบลำโพงปกติเป็นตัวอย่างควบคุมสำหรับน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อไวรัส

^{5/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่าง PAb กับแอนติเจนคำนวณจากการทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ ใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:1,000



ภาพที่ 13 ค่าสหสัมพันธ์ของผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb ต่อเชื้อไวรัสทั้ง 7 ชนิด ด้วยเทคนิค SPR biosensor และ PTA-ELISA (Pearson correlation coefficient $r = 0.821$, $p < 0.01$)

4.2 ทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

ทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ผ่านการ cross absorb โดยใช้เชื้อ ChiVMV-KPS9 2 รูปแบบ ด้วยเทคนิค PTA-ELISA เมื่อนำ PAb ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อพบว่าเมื่อใช้เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร PAb มีค่าไคเตอร์ 64,000 โดยมีค่า K_d และ K_a เท่ากับ $9.3542 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $4.7613 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ ส่วนน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 พบว่ามีค่าไคเตอร์ 128,000 มีค่า K_d และ K_a เท่ากับ $1.1191 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $5.6889 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ประกอบการตัดสินใจว่าควรเลือกแอนติบอดีที่ความเข้มข้นใดจึงจะเหมาะสมต่อการทำปฏิกริยานั้น (John, 2001) พบว่าค่า S/N ratio ของ PAb ที่ตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์และน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 มีค่า S/N ratio ของ PAb อยู่ในระดับสูงที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 และมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการเจือจางของ PAb ที่ระดับ 1:1,000 และ 1:2,000 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 ที่

ระดับ 1:4,000 มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ทั้งเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์และน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (ตารางที่ 6-7)

เมื่อทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor โดยใช้เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่ามีค่าไคเตอร์มากกว่า 512,000 ให้ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เท่ากับ 304.33 RU มีค่า K_d และ K_a ดังนี้ $3.0339 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ และ $6.1677 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่า S/N ratio ในการทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ครั้งนี้พบว่าค่า S/N ratio ของ PAb อยู่ในระดับที่สูงที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 และมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการเจือจางของ PAb ที่อัตรา 1:1,000 และ 1:2,000 ดังนั้น PAb ที่ค่าการเจือจางดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิคนี้และเมื่อพิจารณาค่า K_d และ K_a ของ PAb ที่ระดับการเจือจางนี้มีค่าเท่ากับ $3.9558 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ และ $6.4187 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบค่าไคเตอร์ของ PAb ที่ผ่านการ cross absorb ที่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยเทคนิคทั้งสองพบว่าเทคนิค SPR biosensor มีค่าไคเตอร์ของ PAb ดังกล่าวสูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA แต่ทั้ง 2 เทคนิคมีค่า S/N ratio เท่ากันที่ค่าการเจือจางของ PAb เท่ากับ 1:4,000 จากผลการทดสอบ PAb ที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 สำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor พบว่ามีค่า K_d ประมาณ $3.955 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Attana Application Example (n.d.) ที่ทดสอบคุณสมบัติของ PAb ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย PAb มีลักษณะการทำปฏิกิริยาเป็นแบบ 1:1 พบว่า PAb ทั้ง 5 ความเข้มข้นมีค่า K_d เท่ากับ $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ แต่การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของ PAb ที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 ที่ตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่ามีค่า K_d ประมาณ $1.292 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ เมื่อเปรียบเทียบค่า K_d ของทั้ง 2 เทคนิคพบว่าเทคนิค SPR biosensor มีค่า K_d สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 20 เท่า ส่วนการคำนวณค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับ PTA-ELISA ในการทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ที่ผลิตได้พบว่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันที่ระดับ 0.938 แสดงว่าผลการทดลองของทั้งสองเทคนิคมีความสัมพันธ์กันในทิศทางเดียวกัน

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ค่าการเจือจางแอนติบอดี	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹			ค่า S/N ratio ²	ค่า K_d ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
	เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์	PBS pH 7.4				
1:1,000	2.4423	0.1217		20.0700a	1.312×10^4	6.623×10^{-3}
1:2,000	2.0833	0.1097		18.9900a	1.302×10^4	6.625×10^{-3}
1:4,000	1.7360	0.0943		18.4009a	1.292×10^4	6.422×10^{-3}
1:8,000	1.1313	0.0960		11.7800b	1.101×10^4	6.622×10^{-3}
1:16,000	0.6837	0.0937		7.3000c	1.040×10^4	6.310×10^{-3}
1:32,000	0.3853	0.0933		4.1300d	1.034×10^4	5.261×10^{-3}
1:64,000	0.2460	0.0937		2.6300d	9.354×10^3	4.761×10^{-3}
1:128,000	0.1657	0.0913		1.8100d	6.599×10^3	3.336×10^{-3}
1:256,000	0.1297	0.0933		1.3900d	2.657×10^3	1.952×10^{-3}
1:512,000	0.1143	0.0957		1.1900d	1.276×10^3	1.297×10^{-3}

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังจากเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ต่อ ChiVMV-KPS9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

^{2/} ค่า signal-to-noise ratio เทียบกับค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ต่อค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ของ PBS pH 7.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ค่าการเจือจางแอนติบอดี	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹		ค่า S/N ratio ²	ค่า K_d (M ⁻¹ S ⁻¹)	ค่า K_d (S ⁻¹)
	น้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	น้ำคั้นลำโพงปกติ			
1:1,000	1.089	0.120	9.100a	4.552 x10 ³	6.808 x10 ⁻³
1:2,000	0.956	0.107	8.910a	3.861 x10 ³	6.474 x10 ⁻³
1:4,000	0.922	0.095	9.670a	3.637 x10 ³	6.332 x10 ⁻³
1:8,000	0.732	0.093	7.870b	3.1486 x10 ³	6.094 x10 ⁻³
1:16,000	0.592	0.092	6.410b	2.097 x10 ³	6.068 x10 ⁻³
1:32,000	0.366	0.090	4.050c	1.876 x10 ³	6.018 x10 ⁻³
1:64,000	0.267	0.090	2.960c	1.148 x10 ³	5.842 x10 ⁻³
1:128,000	0.195	0.089	2.180cd	1.119 x10 ³	5.689 x10 ⁻³
1:256,000	0.140	0.090	1.550d	1.177 x10 ³	5.417 x10 ⁻³
1:512,000	0.114	0.089	1.280d	0.836 x10 ²	5.298 x10 ⁻³

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ต่อ ChiVMV-KPS9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

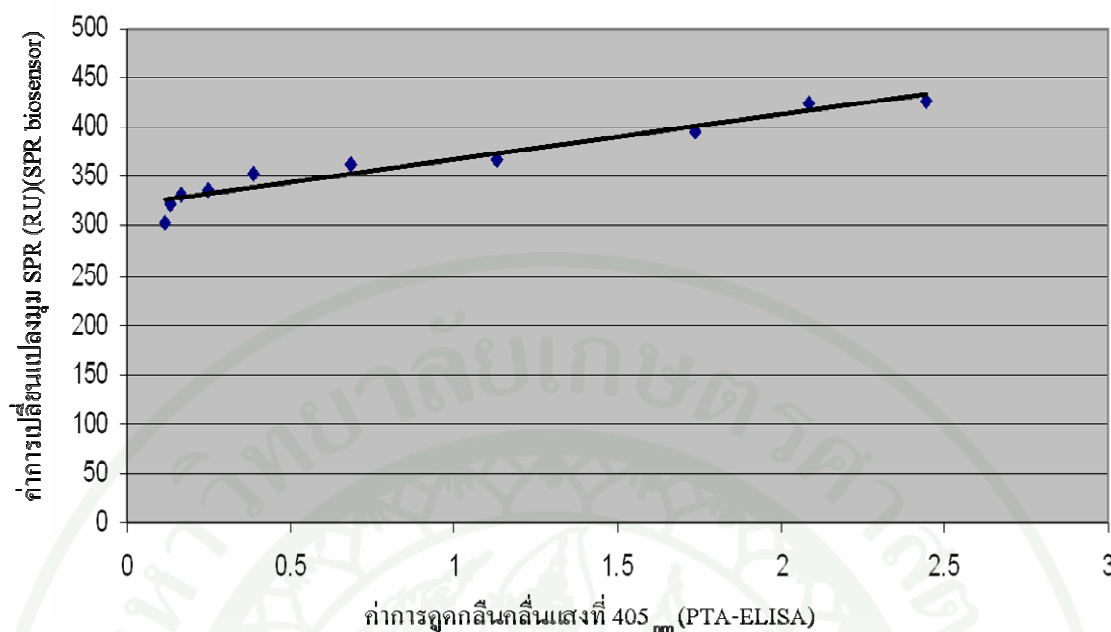
^{2/} ค่า signal-to-noise ratio เทียบกับค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ของน้ำคั้นลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (ที่บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:10) ต่อค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ของ PBS pH 7.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ค่าการเจือจางแอนติบอดี	ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU) ¹			ค่า S/N ratio ²	K_a (M ⁻¹ S ⁻¹)	K_d (S ⁻¹)
	เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์	PBS pH 7.4				
1:1,000	427.67	2.4		136.529a	4.001 x 10 ⁵	6.807 x 10 ⁻⁴
1:2,000	425	2.4		135.417a	3.958 x 10 ⁵	6.605 x 10 ⁻⁴
1:4,000	395	2.2		134.091a	3.955 x 10 ⁵	6.418 x 10 ⁻⁴
1:8,000	367.67	2.3		116.378b	3.911 x 10 ⁵	6.400 x 10 ⁻⁴
1:16,000	361.67	2.1		124.605b	3.700 x 10 ⁵	6.201 x 10 ⁻⁴
1:32,000	353	2.2		115.000b	3.646 x 10 ⁵	6.209 x 10 ⁻⁴
1:64,000	337.67	2		118.835b	3.600 x 10 ⁵	6.208 x 10 ⁻⁴
1:128,000	331.67	1.8		128.706b	3.271 x 10 ⁵	6.223 x 10 ⁻⁴
1:256,000	322.33	2		111.165c	3.079 x 10 ⁵	6.187 x 10 ⁻⁴
1:512,000	304.33	2		102.165c	3.034 x 10 ⁵	6.167 x 10 ⁻⁴

^{1/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PAb ที่ค่าการเจือจางต่างๆ กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 คำนวณจากการทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ

^{2/} ค่า signal-to-noise ratio เท่ากับค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU) เมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ต่อค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU) ที่ทำปฏิกิริยากับ PBS pH 7.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$



ภาพที่ 14 ค่าสหสัมพันธ์ของผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค SPR biosensor และ PTA-ELISA (Pearson correlation coefficient $r = 0.938$, $p < 0.01$)

4.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของการทำปฏิกิริยาของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

ทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000 กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบว่า PAb ดังกล่าวสามารถตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 3.906 ไมโครกรัม มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $1.153 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $5.1523 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Olivier *et al.* (2007) ที่กล่าวว่าความไวในการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ต่ำสุดที่ 10 นาโนกรัม นอกจากนี้สามารถตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ที่ระดับค่าการเจือจางสูงสุดเท่ากับ 1:4,000 มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $1.2903 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $5.0942 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ และสามารถตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ต่ำสุดเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $4.0689 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.6711 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 9-11)

จากผลการทดสอบความไวของการเกิดปฏิกิริยาของ PAb ในการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ทั้ง 3 รูปแบบด้วยเทคนิค PTA-ELISA จึงเลือกความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคดังกล่าวมาทดสอบความไวของ PAb ด้วยเทคนิค SPR biosensor เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง 2 เทคนิค โดยพบว่า PAb ดังกล่าวสามารถตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 3.906 ไมโครกรัม มีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เท่ากับ 7.50 RU มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $2.0922 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.0357 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ ตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ระดับค่าการเจือจางเท่ากับ 1:4,000 มีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เท่ากับ 25.00 RU มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $3.400 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.5628 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ และตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม มีค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เท่ากับ 368.00 RU มีค่า K_a และ K_d เท่ากับ $2.0660 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ และ $6.4297 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

เปรียบเทียบความไวของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่เท่ากันเทคนิค SPR biosensor ให้ค่า K_a ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ทั้ง 3 รูปแบบ สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA

จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor พบว่าเทคนิค SPR biosensor ให้ผลการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ดีกว่าเทคนิค PTA-ELISA ในทุกคุณสมบัติที่ทดสอบ โดยพิจารณาจากค่า K_a ที่สูงกว่าในการทดสอบ ความจำเพาะ ค่าไคเตอร์ และความไวในการตรวจสอบ (ตารางที่ 13) และพบว่าเทคนิค SPR biosensor มีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อมากกว่าเทคนิค PTA-ELISA ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cho *et al.* (2006) เนื่องจากการทำปฏิกิริยา ไม่จำเป็นต้องมีการติดฉลากโมเลกุลของสารเพื่อขยายสัญญาณสำหรับการรายงานผล จึงลดโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดในการแปลผลการทดลองที่ได้ภายหลังปฏิกิริยาเสร็จสิ้น (Lane *et al.*, 2007)

ผลการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ด้วยเทคนิค SPR biosensor พบว่าให้ค่า K_a ที่ดีกว่าการทดสอบคุณสมบัติ PAb ด้วยเทคนิค PTA-ELISA ในทุกการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SPR biosensor สามารถให้ผลการทดลองที่ชัดเจนและมีความถูกต้องมากกว่าเทคนิค PTA-ELISA ดังนั้นถ้านำเทคนิค SPR biosensor มาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันได้ เช่น เชื้อ ChiVMV กับเชื้อ PVMV

เนื่องจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วยเทคนิค ELISA และ RT-PCR มักเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อทั้งสองเสมอ หรือนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคพิษที่เป็นศัตรูพืชควบคุมของประเทศไทย เพื่อลดโอกาสเสี่ยงที่จะนำเข้าพืชที่มีเชื้อโรคเข้าสู่ประเทศ หรือนำมาตรวจรับรองคุณภาพเมล็ดพันธุ์พืชก่อนการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์สู่ตลาดต่างประเทศ



ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ (ไมโครกรัม)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹	ค่า K_d ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
1,000	1.856	1.220×10^4	6.522×10^{-3}
500	1.653	1.219×10^4	6.497×10^{-3}
250	1.541	1.218×10^4	6.478×10^{-3}
125	1.663	1.221×10^4	6.533×10^{-3}
62.5	1.429	1.223×10^4	6.577×10^{-3}
31.25	1.081	1.215×10^4	6.825×10^{-3}
15.625	0.755	1.207×10^4	7.062×10^{-3}
7.813	0.430	1.193×10^4	5.955×10^{-3}
3.906	0.305	1.153×10^4	5.152×10^{-3}
1.953	0.236	1.128×10^4	4.641×10^{-3}

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ (ไมโครกรัม)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ¹	ค่า K_d ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
0.977	0.158	1.068×10^3	3.425×10^{-3}
0.488	0.130	1.096×10^3	2.231×10^{-3}
0.244	0.114	1.538×10^2	1.299×10^{-3}
0.122	0.109	1.432×10^2	1.083×10^{-3}
0.061	0.109	1.342×10^2	0.992×10^{-3}
0.031	0.109	1.270×10^2	0.664×10^{-3}
0.015	0.105	1.294×10^2	0.413×10^{-3}
0.007	0.106	1.253×10^2	0.222×10^{-3}
PBS pH 7.4	0.122	0.361×10^2	0.611×10^{-4}

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังจากเติมยับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

น้ำคั้นใบพริก (อัตราส่วน) ¹	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร ²	ค่า K_a ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:10)	1.218	4.806×10^3	6.928×10^{-3}
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	1.124	4.435×10^3	6.653×10^{-3}
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:500)	1.080	4.262×10^3	6.217×10^{-3}
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:1,000)	1.039	4.010×10^3	6.701×10^{-3}
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:2,000)	0.892	3.520×10^3	6.475×10^{-3}
น้ำคั้นพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:4,000)	0.327	1.290×10^3	5.094×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:10)	0.200	0.485×10^2	1.201×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:100)	0.138	0.441×10^2	1.196×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:500)	0.130	0.079×10^2	1.085×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:1,000)	0.131	0.076×10^2	1.085×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:2,000)	0.130	0.058×10^2	1.060×10^{-3}
น้ำคั้นพริกปกติ (1:4,000)	0.115	0.022×10^2	1.010×10^{-3}

^{1/} อัตราส่วนการเจือจางของน้ำคั้นใบพริกที่มีและไม่มีการมีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (กรัม:มิลลิลิตร) บดตัวอย่างใบพืชใน PBS pH 7.4

^{2/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังจากเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

น้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ ก่อนข้างบริสุทธิ์(ไมโครกรัม) ^{1/}	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่		
	405 นาโนเมตร ^{2/}	ค่า K_a ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
1,000	0.494	4.069×10^3	6.671×10^{-3}
500	0.200	1.673×10^3	6.516×10^{-3}
250	0.161	1.996×10^3	6.016×10^{-3}
125	0.140	1.120×10^3	6.096×10^{-3}
62.5	0.128	1.096×10^3	6.079×10^{-3}
31.25	0.124	6.758×10^2	6.040×10^{-3}
15.625	0.124	5.835×10^2	6.014×10^{-3}
7.813	0.119	5.629×10^2	6.010×10^{-3}
3.906	0.118	5.140×10^2	5.930×10^{-3}
1.953	0.119	4.741×10^2	5.192×10^{-3}
น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:10)	0.155	0.030×10^2	1.443×10^{-3}

^{1/} ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบพริกปกติอัตราส่วน 1:10 (กรัม: มิลลิลิตร) ที่บดใน PBS pH 7.4

^{2/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้คำนวณจาก 3 ซ้ำ ภายหลังจากเติมซับสเตรท 45 นาที เมื่อใช้ PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ (ไมโครกรัม)	ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU) ⁴	ค่า K_d (M ⁻¹ S ⁻¹)	ค่า K_d (S ⁻¹)
เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 3.906 ไมโครกรัม ¹	7.50	2.092×10^5	6.035×10^{-4}
เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 7.813 ไมโครกรัม ¹	14.00	2.157×10^5	6.017×10^{-4}
น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:2,000) ²	64.33	3.531×10^5	6.134×10^{-4}
น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:4,000) ²	25.00	3.400×10^5	6.562×10^{-4}
น้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 500 ไมโครกรัม ³	225.00	1.803×10^5	6.002×10^{-4}
น้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 1,000 ไมโครกรัม ³	368.00	2.066×10^5	6.429×10^{-4}
PBS pH 7.4	2.00	$(-1.850) \times 10^3$	$(-0.539) \times 10^{-4}$
น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100) ²	155.00	$(-2.150) \times 10^4$	$(-2.561) \times 10^{-4}$
น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:2,000) ²	25.00	$(-2.040) \times 10^4$	$(-2.390) \times 10^{-3}$
น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:3,000) ²	19.33	$(-2.004) \times 10^4$	$(-2.305) \times 10^{-3}$
น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:4,000) ²	12.00	$(-2.001) \times 10^4$	$(-2.101) \times 10^{-3}$

^{1/} เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์เจือจางใน PBS pH 7.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

^{2/} อัตราส่วนการเจือจางของน้ำคั้นใบพริกที่มีและไม่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (กรัม:มิลลิลิตร) บดตัวอย่างใบพืชใน PBS pH 7.4

^{3/} น้ำคั้นใบพริกปกติที่ใส่ลงใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100 นำมาผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

^{4/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PAb ที่ค่าการเจือจาง 1:4,000 กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ทั้ง 3 รูปแบบ คำนวณจากการทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่า K_d ของการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor

คุณสมบัติของ PAb	ค่า K_d ($M^{-1}s^{-1}$)	
	เทคนิค PTA-ELISA	เทคนิค SPR biosensor
ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์	1.196×10^4	3.018×10^5
ความจำเพาะเจาะจงต่อน้ำคั้นใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	1.917×10^4	9.010×10^5
ค่าไคเตอร์ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ ^{1/}	9.354×10^3	3.034×10^5
ความไวในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 3.906 ไมโครกรัม	1.153×10^4	2.092×10^5
ความไวในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 7.813 ไมโครกรัม	1.193×10^4	2.157×10^5
ความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:2,000)	3.520×10^3	3.531×10^5
ความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:4,000)	1.290×10^3	3.400×10^5
ความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 500 ไมโครกรัม	1.673×10^3	1.803×10^5
ความไวในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 1,000 ไมโครกรัม	4.069×10^3	2.066×10^5

^{1/} ค่าไคเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค PTA-ELISA และเทคนิค SPR biosensor มีค่าเท่ากับ 64,000 และมากกว่า 512,000 ตามลำดับ

5. ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

5.1 ตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ขณะทำปฏิกิริยากับสารชนิดต่างๆ บนพื้นผิวสโไลด์แก้ว

การเปลี่ยนแปลงค่ามุม SPR จะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำปฏิกิริยาของสารที่หยดลงบนผิวสโไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ โดยค่าดังกล่าวแปรผันตรงกับค่าดัชนีการสะท้อนกลับของแสง (reflection index) ซึ่งค่าการสะท้อนกลับของแสงขึ้นกับการทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวสโไลด์แก้ว ถ้ามีการทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นมากจะทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR เพิ่มขึ้นตามลำดับ จากเหตุผลนี้จึงทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงค่ามุม SPR ขณะทำปฏิกิริยากับสารชนิดต่างๆ เช่น 11MUA, สารผสม EDC กับ NHS, PAb และ ethanolamine 1 โมลาร์ โดยทดสอบบนพื้นผิวสโไลด์แก้วแผ่นเดียวกันซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่ทดสอบสารชนิดเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อทดสอบกับแอนติเจนที่ต่างชนิดกัน ได้แก่ PBS pH 7.4 และเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 14) แสดงว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ามุม SPR คือ ชนิดและความเข้มข้นของสาร ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jarupat (2005) และ Nice and Catimel (1999)

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ในแต่ละขั้นตอนที่เติมสารบนผิวแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ

ลำดับขั้นตอนการทำปฏิกิริยาบนผิวสไลด์แก้ว ¹	ผลต่างค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU) ²	
	ตำแหน่งที่ 1	ตำแหน่งที่ 2
แผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ (Bare Gold; BG)	85a	82a
BG+ 11MUA	144a	140a
BG+ 11MUA+EDC/NHS	179a	178a
BG+ 11MUA+EDC/NHS+PAb	277a	273a
BG+ 11MUA+EDC/NHS+PAb+Ethanolamine	476a	478a
BG+ 11MUA+EDC/NHS+PAb+Ethanolamine+Antigen ³	478b	770a

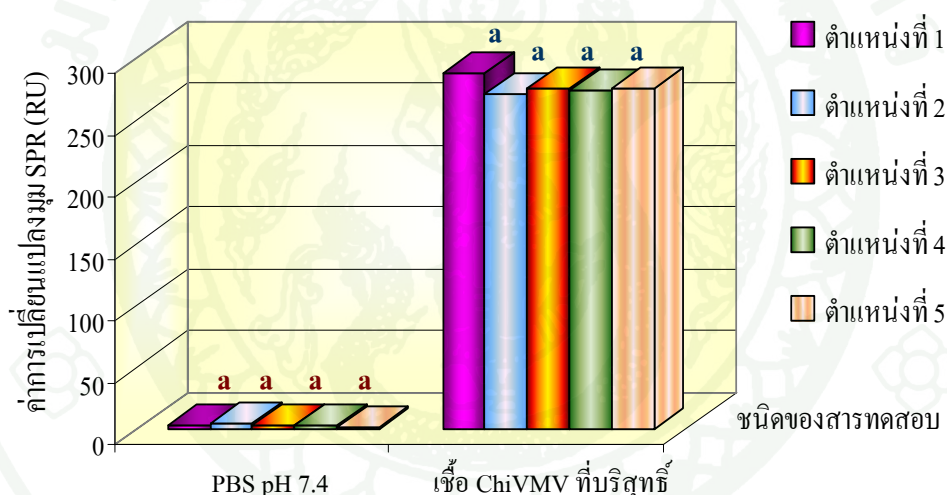
^{1/} ลำดับขั้นตอนการเติมสารต่างๆ บนผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ

^{2/} ผลต่างค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงมุมตั้งแต่เริ่มต้นถึงสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาต่อสารนั้น คำนวณจากการทำปฏิกิริยาซ้ำ 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.05$

^{3/} แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาดำเนินที่ 1 คือ PBS pH 7.4 และตำแหน่งที่ 2 คือ เชื้อ ChVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ (15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

5.2 ทดสอบความสม่ำเสมอ (uniformity) ของการเกิดปฏิกิริยาบนผิวสไลด์แก้วที่เคลือบสารต่างๆ

ทดสอบความสม่ำเสมอของแผ่นสไลด์แก้วที่เตรียมได้จำนวน 5 ตำแหน่ง บนแผ่นสไลด์แก้วแผ่นเดียวกัน ทดสอบกับสาร 2 ชนิด ได้แก่ PBS pH 7.4 และเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าการเกิดปฏิกิริยาทั้ง 5 ตำแหน่งที่ทดสอบสารชนิดเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (ภาพที่ 15) แสดงว่าการเคลือบสารปรับสภาพพื้นผิวสไลด์แก้วเช่น 11 MUA และการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาด้วยสารต่างๆ เช่น สารผสม EDC กับ NHS, PAb และ ethanolamine มีความสม่ำเสมอ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแผ่นสไลด์แก้วที่เตรียมไว้มีความเหมาะสมที่จะนำมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค SPR biosensor



ภาพที่ 15 ผลการทดสอบความสม่ำเสมอของการเกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตรา 1:4,000 โดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยากับสารแต่ละชนิดจำนวน 5 ตำแหน่ง บนสไลด์แก้วแผ่นเดียวกัน วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

5.3 ทดสอบชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ

การทดสอบสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะจำนวน 7 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับการทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับน้ำคั้นใบพริกปกติ จากนั้นพิจารณาผลต่างของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยากับสารทั้ง 2 ชนิด พบว่า casein 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะได้ดี เมื่อพิจารณาจากค่าผลต่างของการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ระหว่างการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับน้ำคั้นใบพริกปกติมีค่าเท่ากับ 217.34 RU ซึ่งมีค่าการเปลี่ยนแปลงมุมสูงที่สุดและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะของสารชนิดอื่น (ตารางที่ 15) และมีค่า K_d ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง PAb กับน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ $3.893 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ตารางที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kistina *et al.* (2008) ที่ทดสอบสารเพื่อลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ BSA, PEG และ casein พบว่า casein ช่วยลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะและมีคุณสมบัติในการกระจายตัวบนพื้นผิวแผ่นทองที่ทดสอบได้ดี

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบการทดสอบสารที่ใช้ลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ
ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ชนิดของสารที่ใช้ใน การยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ	ชนิดของสารทดสอบ ¹	ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU)	
		ค่าเฉลี่ย ²	ผลต่าง ³
Bovine serum albumin (BSA) 5 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	107.50	73.33d
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	34.17	
Casein 1 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	397.00	179.67b
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	217.33	
Casein 2 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	380.67	217.34a
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	163.33	
Ethanolamine 1 โมลาร์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	199.33	106.66c
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	92.67	
Polyethylene glycol (PEG) 10 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	108.67	65.34e
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	43.33	
non fat milk powder 3 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	72.50	58.83f
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	13.67	
non fat milk powder 5 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	48.50	8.45g
	น้ำคั้นใบพริกปกติ	40.05	

^{1/} น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่นำมาทดสอบบดใน PBS pH 7.4
อัตราส่วน 1:100 (กรัม: มิลลิลิตร)

^{2/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ขณะที่เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่าง PA6 กับแอนติเจน
คำนวณจากการทำปฏิกิริยาซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ PA6 ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

^{3/} ผลต่างของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR คำนวณจากผลต่างของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม
ระหว่างการทำปฏิกิริยาของน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับน้ำคั้นใบพริกปกติ
วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบค่า K_a และ K_d ของการทดสอบสารที่ใช้ในการลดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ชนิดของสารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ	แอนติเจนที่ทดสอบ (อัตราส่วน)	ค่า K_a ($M^{-1}S^{-1}$)	ค่า K_d (S^{-1})
BSA 5 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	2.802×10^5	6.166×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.201) \times 10^4$	$(-2.514) \times 10^{-4}$
Casein 1 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	3.106×10^5	6.038×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.510) \times 10^4$	$(-2.859) \times 10^{-4}$
Casein 2 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	3.893×10^5	6.004×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.310) \times 10^4$	$(-2.076) \times 10^{-4}$
Ethanolamine 1 โมลาร์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	2.915×10^5	6.304×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.401) \times 10^4$	$(-2.038) \times 10^{-4}$
Polyethylene glycol (PEG) 10 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	2.051×10^5	6.881×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.720) \times 10^4$	$(-2.815) \times 10^{-4}$
non fat milk powder 3 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	1.940×10^5	6.438×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.822) \times 10^4$	$(-2.585) \times 10^{-4}$
non fat milk powder 5 เปอร์เซ็นต์	น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	1.811×10^5	6.976×10^{-4}
	น้ำคั้นใบพริกปกติ (1:100)	$(-2.300) \times 10^4$	$(-2.721) \times 10^{-4}$

5.4 ทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา

การทดสอบ regenerate buffer จำนวน 9 ชนิด ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเชื้อบนตำแหน่งเดิมของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบสารปรับสภาพ โดยทดสอบ regenerate buffer ที่เหมาะสมกับน้ำคั้นในพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 อัตราส่วน 1:100 พบว่า NaOH 20 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าความแตกต่างระหว่าง base line เริ่มต้นก่อนการเติมน้ำคั้นพืชกับ base line สิ้นสุดหลังการเติม regenerate buffer น้อยที่สุด (12.93 RU) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับ regenerate buffer ชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 17 และภาพที่ 17) เมื่อพิจารณาค่า K_d และ K_a ของการทำปฏิกิริยาภายหลังการเติม NaOH 20 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีค่า $3.4962 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ และ $6.0695 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 19) จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า NaOH 20 มิลลิโมลาร์ สามารถล้างแอนติเจนออกและไม่ทำลายแอนติบอดี จึงสามารถตรวจสอบน้ำคั้นในพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Vanneste *et al.* (2008) ที่ใช้ NaOH 20 มิลลิโมลาร์ ในการทำลายพันธะระหว่างดีเอ็นเอตัวตรวจจับที่สังเคราะห์ขึ้นกับดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้ 200 ครั้ง โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR นอกจากนี้การทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า NaOH 25 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าความแตกต่างระหว่าง base line เริ่มต้นก่อนการเติมเชื้อ ChiVMV-KPS9 กับ base line สิ้นสุดหลังการเติม regenerate buffer น้อยที่สุด (5.23 RU) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับ regenerate buffer ชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 18 และภาพที่ 16) สำหรับค่า K_d และ K_a ของการทำปฏิกิริยาภายหลังการเติม NaOH 25 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีค่า $3.8641 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ และ $6.132 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9

สารที่ทำปฏิกิริยา	ชนิดของสาร regenerate buffer	ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU)			ผลต่างของค่า base line ⁴
		ทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ ¹	base line เริ่มต้น ²	base line สิ้นสุด ³	
น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9	Cabonate coating buffer pH 9.6	148.20	-1176.00	-918.40	257.60a
	Glycine 0.1 โมลาร์ pH 2.2	145.50	-1310.67	-1215.74	94.93d
	Glycine 0.1 โมลาร์ pH 3.5	145.00	-1300.00	-1201.63	98.37c
	NaOH 10 มิลลิโมลาร์	161.67	-1316.00	-1298.33	17.67h
	NaOH 15 มิลลิโมลาร์	159.67	-1268.33	-1241.74	26.59e
	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	162.67	-1325.67	-1312.74	12.93i
	NaOH 25 มิลลิโมลาร์	160.00	-1286.67	-1264.94	21.73g
	NaOH 40 มิลลิโมลาร์	158.33	-1296.67	-1272.07	24.60f
	PBST 0.1 โมลาร์	153.00	-1315.67	-1197.37	118.30b
น้ำคั้นใบพริกปกติ	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	64.70	-1285.00	-1273.00	12.00i

- ^{1/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ภายหลังการทำปฏิกิริยากับสารที่ทดสอบ เช่น น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 และน้ำคั้นใบพริกปกติ (น้ำคั้นใบพริกคั้นใน PBS pH 7.4 อัตรา 1:100) ด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000
- ^{2/} ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ของ base line เริ่มต้นก่อนการทำปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ
- ^{3/} ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ของ base line ภายหลังการทำปฏิกิริยากับสาร regenerate buffer เพื่อล้างสารที่ทดสอบออก
- ^{4/} ผลต่างของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ระหว่าง base line เริ่มต้นกับ base line สิ้นสุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$ เปรียบเทียบผลต่างค่า base line ของสาร regenerate buffer แต่ละชนิด

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบสาร regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์

สารที่ทำปฏิกิริยา	ชนิดของสาร regenerate buffer	ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR (RU)			
		ทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ ¹	base line เริ่มต้น ²	base line สิ้นสุด ³	ผลต่างของค่า base line ⁴
เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์	NaOH 10 มิลลิโมลาร์	160.67	-1449.00	-1436.83	12.17b
	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	158.33	-1466.33	-1451.10	15.23a
	NaOH 25 มิลลิโมลาร์	151.00	-1440.67	-1435.44	5.23c
PBS pH 7.4	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	2.00	-1409.67	-1409.34	0.33d

^{1/} ค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ภายหลังการทำปฏิกิริยากับสารที่ทดสอบ เช่น เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ PBS pH 7.4 ด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000

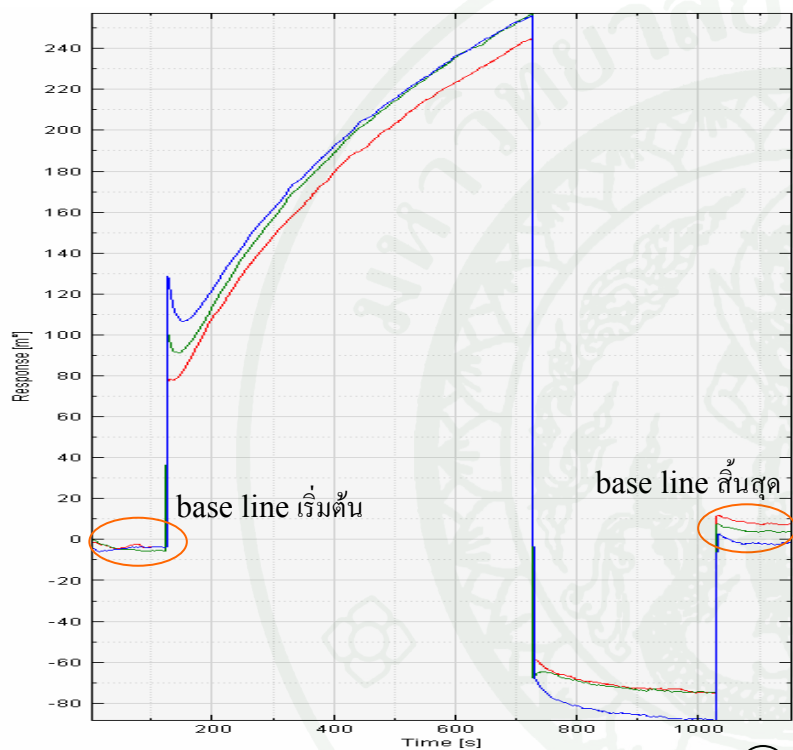
^{2/} ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ของ base line เริ่มต้นก่อนการทำปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ

^{3/} ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ของ base line ภายหลังการทำปฏิกิริยากับสาร regenerate buffer เพื่อล้างสารที่ทดสอบออก

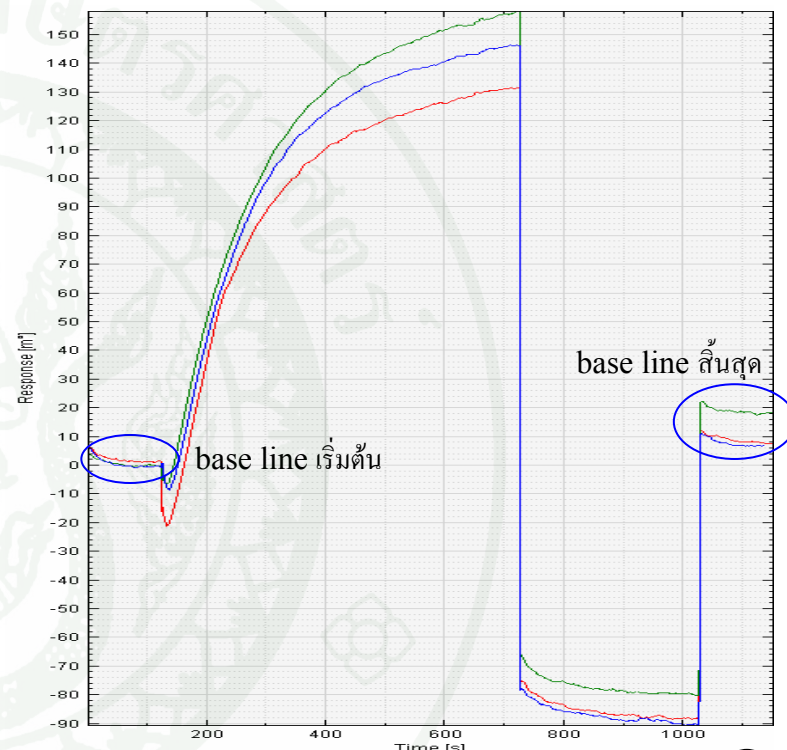
^{4/} ผลต่างของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ระหว่าง base line เริ่มต้นกับ base line สิ้นสุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$ เปรียบเทียบผลต่างค่า base line ของสาร regenerate buffer แต่ละชนิด

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบค่า K_a และ K_d ของการทดสอบ regenerate buffer ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

แอนติเจนที่ทดสอบ	ชนิดของ regenerate buffer	K_a ($M^{-1}S^{-1}$)	K_d (S^{-1})
น้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (1:100)	Carbonate coating buffer pH 9.6	2.866×10^5	4.161×10^{-4}
	Glycine 0.1 โมลาร์ pH 2.2	2.928×10^5	5.386×10^{-4}
	Glycine 0.1 โมลาร์ pH 3.5	2.930×10^5	5.713×10^{-4}
	NaOH 10 มิลลิโมลาร์	3.016×10^5	5.907×10^{-4}
	NaOH 15 มิลลิโมลาร์	3.121×10^5	6.426×10^{-4}
	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	3.496×10^5	6.069×10^{-4}
	NaOH 25 มิลลิโมลาร์	3.184×10^5	6.356×10^{-4}
	NaOH 40 มิลลิโมลาร์	3.032×10^5	6.005×10^{-4}
เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 250 ไมโครกรัม	PBST 0.1 โมลาร์	2.982×10^5	5.794×10^{-4}
	NaOH 10 มิลลิโมลาร์	3.222×10^5	6.085×10^{-4}
	NaOH 20 มิลลิโมลาร์	3.406×10^5	6.760×10^{-4}
	NaOH 25 มิลลิโมลาร์	3.864×10^5	6.132×10^{-4}



ก



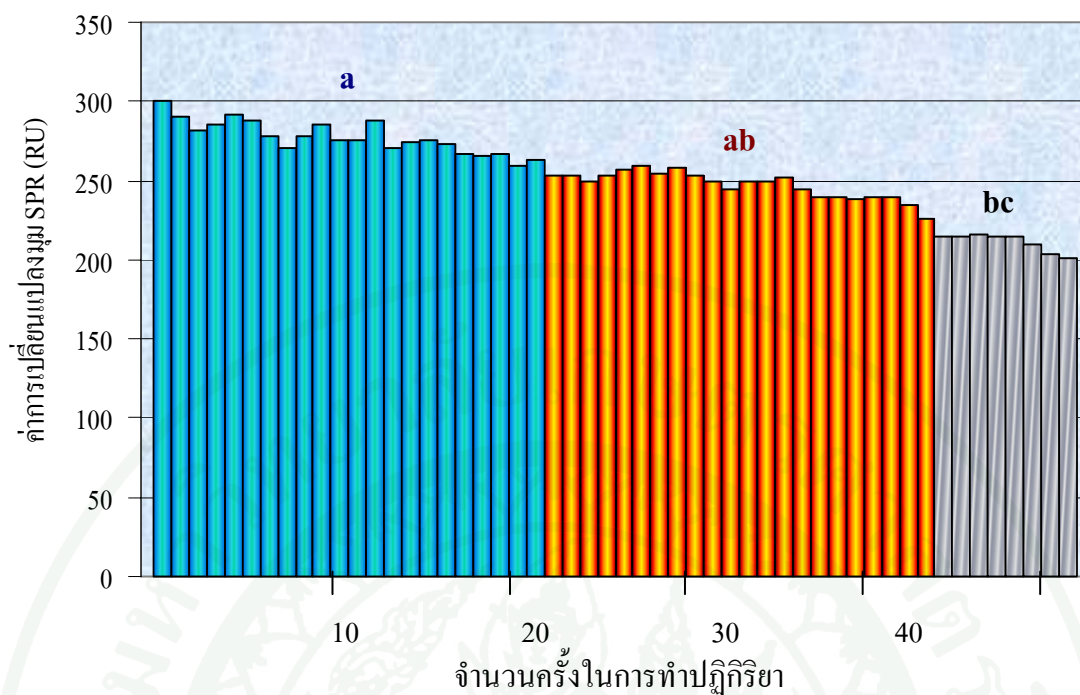
ข

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบการทดสอบ regenerate buffer ก) NaOH 20 มิลลิโมลาร์ สำหรับการล้างน้ำคั้นไบโพรตีนที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 และ ข) NaOH 25 มิลลิโมลาร์ สำหรับการล้างเชื้อ ChiVMV-KPPS9 ที่บริสุทธิ์ออกภายหลังการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค SPR biosensor

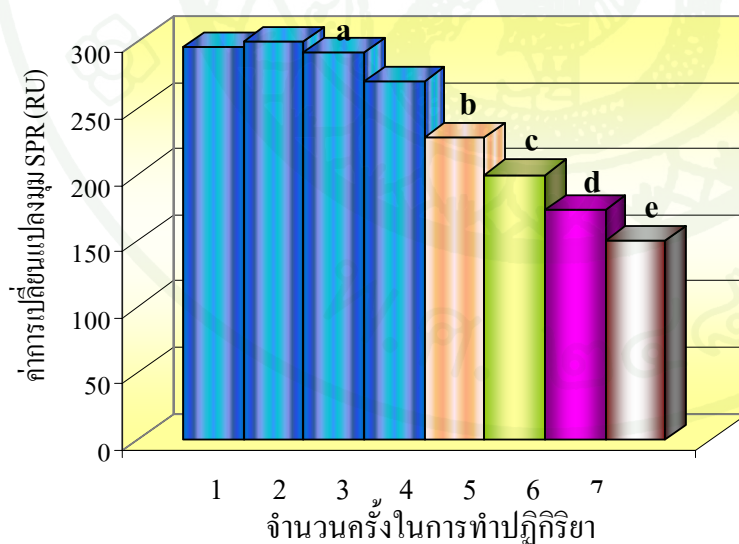
5.5 ทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ

การทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิม โดยไม่จำเป็นต้องเดิมแอนติบอดีเข้าไปใหม่เป็นคุณสมบัติของเทคนิค SPR biosensor ที่แตกต่างจากเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาอื่นๆ เช่น ELISA, dot blot และ western blotting เป็นต้น เนื่องจากเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาดังกล่าวมีการรายงานผลจากการติดฉลากโมเลกุลของตัวตรวจจับด้วยเอนไซม์ เพื่อขยายสัญญาณ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไม่สามารถผันกลับได้ แต่เทคนิค SPR ไม่จำเป็นต้องมีการติดฉลากโมเลกุลตัวตรวจจับ ทำให้คุณสมบัติของแอนติบอดียังคงเดิม เมื่อมีการทำลายพันธะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เข้าทำปฏิกิริยากัน แอนติบอดีก็พร้อมที่จะเริ่มต้นทำปฏิกิริยาครั้งใหม่ โดย regenerate buffer ที่ใช้ควรมีคุณสมบัติในการทำลายพันธะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี แต่ไม่ทำลายคุณสมบัติของแอนติบอดีสำหรับการทำปฏิกิริยาครั้งใหม่ จึงทำการทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ โดยใช้เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และใช้ NaOH 25 มิลลิโมลาร์ เป็นสารล้างพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้ 44 ครั้ง ซึ่งให้ค่าการเปลี่ยนแปลงมุมในช่วง 235 ถึง 300 RU และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (ภาพที่ 17) ส่วนการทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 อัตราส่วน 1:100 และใช้ NaOH 20 มิลลิโมลาร์ เป็นสารล้างพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้ 4 ครั้ง ให้ค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ในช่วง 265 ถึง 296 RU และไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (ภาพที่ 18)

เมื่อเปรียบเทียบการเข้าจับกันระหว่าง PAb กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ทั้ง 2 รูปแบบ พบว่าการตรวจเชื้อไวรัสชนิดนี้ในน้ำคั้นใบพริกสามารถตรวจซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้น้อยกว่าการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ประมาณ 10 เท่า อาจเนื่องจากโปรตีนในน้ำคั้นใบพริกเข้าไปขัดขวางการเข้าจับกันระหว่าง PAb กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นใบพริกก่อนนำมาตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค SPR biosensor ควรมีการกำจัดโปรตีนของพืชออกให้มากที่สุด เพื่อเพิ่มจำนวนครั้งในการตรวจเชื้อไวรัสในน้ำคั้นใบพริกซ้ำที่ตำแหน่งเดิม



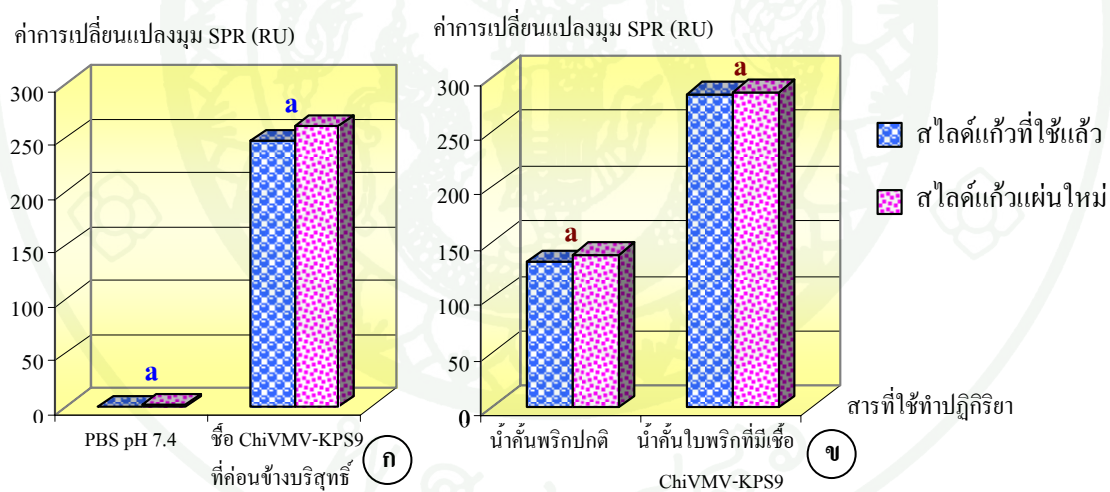
ภาพที่ 17 ผลการทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ที่ตำแหน่ง เดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบจำนวนครั้งในการตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ ตำแหน่งเดิมบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำ ด้วย PAb ที่เจือจางใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:4,000 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

5.5 ทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9

แผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้ว เมื่อนำมาล้างส่วนของสารที่ทำปฏิกิริยาอยู่ด้านบนพื้นผิวออกด้วยสาร piranha แล้วนำแผ่นสไลด์ดังกล่าวกลับมาเคลือบสารปรับสภาพพื้นผิว (11MUA) เพื่อทำปฏิกิริยาค้างใหม่ จึงมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วกับแผ่นใหม่ด้วยสาร 4 ชนิด ได้แก่ PBS pH 7.4 เชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ น้ำคั้นใบพริกปกติและน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ของการทดสอบสารชนิดเดียวกันบนผิวแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วกับแผ่นใหม่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ซึ่งผลการทดสอบสารทั้ง 4 ชนิด ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันระหว่างแผ่นสไลด์แก้วที่ใช้แล้วกับแผ่นสไลด์แก้วแผ่นใหม่ (ภาพที่ 19) จากผลการทดสอบในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาได้ใหม่



ภาพที่ 19 ทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำที่ใช้แล้วในการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ก) PBS pH 7.4 กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ และ ข) น้ำคั้นใบพริกปกติกกับน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 (น้ำคั้นใบพริกทั้ง 2 ชนิด บดใน PBS pH 7.4 อัตราส่วน 1:100) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD ที่ $p = 0.01$

6. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor โดยพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ พบว่าเทคนิค SPR biosensor มีค่า K_d สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 10 เท่า แต่ทั้ง 2 เทคนิค มีค่า K_d เท่ากันและผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิคทั้งสองพบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กันที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ส่วนการรายงานผลของเทคนิค SPR biosensor เกิดจากการตรวจวัดการเข้าจับกันของแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยตรง ไม่มีการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์เพื่อการรายงานผล ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค PTA-ELISA ที่แอนติบอดีต้องมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ ทำให้ระยะเวลาในการตรวจเชื้อ 1 ครั้ง ของเทคนิค SPR biosensor สามารถทำปฏิกิริยาได้เร็วกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 3 เท่า การตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor มีค่าใช้จ่าย 8.64 บาท และตรวจเชื้อไวรัสชนิดนี้ในน้ำคั้นพืชมีค่าใช้จ่าย 95.0 บาท ซึ่งเทคนิค PTA-ELISA เสียค่าใช้จ่าย 50 บาท เมื่อพิจารณาจำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยาซ้ำที่ตำแหน่งเดิมด้วยเทคนิค SPR biosensor พบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ได้ 44 ครั้ง และตรวจน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อได้ 4 ครั้ง โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าการเปลี่ยนแปลงมุม SPR ส่วนเทคนิค PTA-ELISA ตรวจเชื้อได้เพียง 1 ครั้ง (ตารางที่ 20) จากการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิคทั้งสองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค SPR biosensor มีคุณสมบัติในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิค PTA-ELISA

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบคุณสมบัติในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor

คุณสมบัติในการตรวจสอบ	เทคนิค PTA-ELISA	เทคนิค SPR biosensor
ค่าคงที่ในการเข้าจับกันของสาร (K_d) ($M^{-1}S^{-1}$)	10^2 - 10^4	10^4 - 10^5
ค่าคงที่ในการแยกออกจากกันของสาร (K_d) (S^{-1})	10^{-4} - 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-3}
การประมวลผลเชิงคุณภาพ (quality)	ไม่ได้	ได้
การประมวลผลเชิงปริมาณ (quantity)	ได้	ได้
การติดฉลาก (labeling)	เอนไซม์	ไม่มี
ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ครั้ง ¹	5-6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง
ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ 1 ตัวอย่าง ²	50 บาท	8.64 บาท (ตัวอย่างเชื้อที่บริสุทธิ์) 95.00 บาท (ตัวอย่างน้ำคั้นพืช)
ปริมาตรสิ่งตรวจ (แอนติเจน) ที่ใช้	50 ไมโครลิตร	20-150 ไมโครลิตร
จำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยาซ้ำ	1	44 ครั้ง (ตัวอย่างเชื้อที่บริสุทธิ์)
ที่ตำแหน่งเดิม		4 ครั้ง (ตัวอย่างน้ำคั้นพืช)

^{1/} ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างจนสิ้นสุดการตรวจสอบในแต่ละเทคนิค

^{2/} ค่าใช้จ่ายที่ทดสอบคำนวณจากอุปกรณ์และสารเคมีที่เกี่ยวข้องสำหรับการทำปฏิกิริยาในแต่ละครั้ง

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ ChiVMV

เชื้อ ChiVMV สายพันธุ์ KPS9 แยกได้จากตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการต่างประจักษ์จากอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP เปรียบเทียบกับเชื้อ ChiVMV ที่มีรายงานในทวีปเอเชียพบว่าเชื้อ ChiVMV-KPS9 (accession number EU 636198) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP คล้ายคลึงกับเชื้อ ChiVMV ของประเทศไทย เวียดนามและอินโดนีเซีย ที่มีรายงานไว้บนฐานข้อมูล GenBank

2. เปรียบเทียบการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor

2.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของ PAb

PAb ที่ผ่านการ cross absorb มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสดังต่อไปนี้ CaCV, CMV, PepMoV, PVY, TEV และ TMV

2.2 ทดสอบค่าไคเตอร์ของ PAb

PAb เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SPR biosensor มีค่าไคเตอร์ 512,000 และมีค่า K_d เท่ากับ $3.0339 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ส่วนเทคนิค PTA-ELISA มีค่าไคเตอร์เท่ากับ 64,000 มีค่า K_d เท่ากับ $9.354 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ค่าการเจือจางที่เหมาะสมของ PAb สำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 คือ 1:4,000

2.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยาของ PAb

ทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 3.906 ไมโครกรัม ตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ที่ค่าการเจือจางสูงสุด 1:4,000 และตรวจสอบน้ำคั้นใบพริกปกติที่ผสมเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่ 1,000 ไมโครกรัม เมื่อเปรียบเทียบความไวของ PAb ในการตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่เท่ากัน เทคนิค SPR biosensor ให้ค่า K_d ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 3 รูปแบบ สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA

3. ตรวจสอบปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค SPR biosensor

สารยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่ดีที่สุดสำหรับการทดลองในครั้งนี้คือ casein 2 เปอร์เซ็นต์ สาร regenerate buffer ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์และน้ำคั้นใบพริกที่มีเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้แก่ NaOH 25 มิลลิโมลาร์ และ NaOH 20 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค SPR biosensor กับเทคนิค PTA-ELISA

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ระหว่างเทคนิค PTA-ELISA กับเทคนิค SPR biosensor พบว่าเทคนิค SPR biosensor ให้ค่า K_d สูงกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 10 เท่า การตรวจเชื้อ 1 ครั้ง ของเทคนิค SPR biosensor สามารถทำปฏิกิริยาได้เร็วกว่าเทคนิค PTA-ELISA ประมาณ 3 เท่า การตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor มีค่าใช้จ่าย 8.64 บาท และสามารถตรวจเชื้อไวรัสชนิดนี้ในน้ำคั้นพืชมีค่าใช้จ่าย 95.0 บาท ซึ่งเทคนิค PTA-ELISA มีค่าใช้จ่าย 50 บาท เทคนิค SPR biosensor สามารถตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์และตรวจเชื้อ ChiVMV-KPS9 ในน้ำคั้นใบพริกซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้ 44 และ 4 ครั้ง ตามลำดับ แต่เทคนิค PTA-ELISA ตรวจเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้เพียง 1 ครั้ง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อ PVMV กับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor เพื่อแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิคนี้ว่าสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมได้หรือไม่
2. การตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อโพที่ไวรัสชนิดอื่นที่เป็นเชื้อศัตรูพืชควบคุมของประเทศไทยได้ เช่น *Banana bract mosaic virus*, *Cassava brown streak virus*, *Cassava common mosaic virus*, *Cassava virus X*, *Papaya mosaic virus*, *Rice hoja blanca virus* และ *Sorghum mosaic virus* หรือตรวจเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พืช เช่น *Alfalfa mosaic virus*, *Barley stripe mosaic virus*, *Tomato aspermy virus*, *Tomato bushy stunt virus* และ *Tomato ringspot virus* เพื่อรับรองคุณภาพเมล็ดพันธุ์
3. การเพิ่มประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ ควรจะมีการทดสอบสารต่างๆ ที่ใช้ปรับสภาพพื้นผิวของสไลด์แก้วที่เคลือบอนุภาคทองคำใหม่ อาทิ สาร Poly-L-Lysine (PLL) เพื่อให้แอนติบอดีสามารถเข้าจับกับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:2 ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์, ไชยา โนดา, นวลจันทร์ ดีมา และ สุวรรณ กัดพันธุ์. 2536. การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสของพริกและการคัดเลือกพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อเชื้อไวรัสบางชนิด, น. 331-340. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นันทยา ชนะรัตน์. 2553. **Biosensors**. แหล่งที่มา: <http://www.docstoc.com/docs/33814620/-Biosensors>, 27 เมษายน 2554.

บุญส่ง สุตะพันธุ์. ม.ป.ป. **ไบโอเซนเซอร์โดยใช้เทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน**. แหล่งที่มา: <http://www.researchgate.net/publication/39031640>, 17 มีนาคม 2554.

พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, สุจินต์ ภัทรภูวดล, สุพัฒน์ อรรถธรรม, นุชนาถ แซ่ฮึ้ง และ เพชรรัตน์ ศิริวงศ์. 2540. การจำแนกชนิดของโพที่ไวรัสที่แยกได้จากโรคเส้นใบด่างประของพริกโดยใช้ข้อมูลทางอนุชีวโมเลกุล, 237-245 น. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, อัญญา บุญชด, สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง, สุจินต์ ภัทรภูวดล, สุเทวี สุขปรากการ, นุชนาถ วารินทร์, ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2542. การปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานไวรัสโดยเทคนิคการถ่ายยีน, 118-125 น. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม. 2547. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชณี องประยูร. 2549. **บทปฏิบัติการชีวะมวิทยาทางด้านโรคพืช**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุจินต์ ภัทรภูวณ, วาริรัตน์ สมประทุม, รัชดาภรณ์ เขียวหวาน, กรุง สีตะธนี และสิริกุล วะสี.

2551. การคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานต่อโรคใบด่างแดงและใบด่างประของพริก. **ว. วิทย.**
กษ. 39(3) (พิเศษ): 376-379.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2552. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส (Virus Disease of Plants)**. ภาควิชาโรคพืช
คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุภาวณี ปานสอาด. 2550. การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ
โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกผสมของเชื้อทอสโปไวรัส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรภี กิตติยะอังกูร, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ดันติวานิช. 2550.
การผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิง
พาณิชย์. แหล่งที่มา: http://it.doa.go.th/refs/files/537_2550.pdf, 16 เมษายน 2554.

Adams, M.J., J.F. Antoniw and C.M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species
discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.** 150: 459-479.

Altschug, D., M.C. Dubs, E. Weiss, G.Z. Lutz and M.H.V. Regenmortel. 1992.
Determination of kinetic constants for the interaction between a monoclonal antibody and
peptides using surface plasmon resonance. **Biochem.** 31: 6298-6304.

Alvin, J.C.E., L. Huang, F.T. Chew, S.F.Y. Li and S.M. Wong. 2002. Detection of two orchid
viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. **J. Virol. Methods.**
99: 71-79.

Anindya, R, J. Joseph, T.D.S. Gowri and H.S. Savithri. 2004. Complete genomic sequence of
Pepper vein banding virus (PVBV): a distinct member of the genus Potyvirus.
Arch. Virol. 149: 625-632.

Anton, P.M. n.d. **Surface plasmon resonance**. Available Source: <http://users.path.ox.ac.uk->

/~vdmerwe/internal/spr.pdf., February 27, 2011

Attana Application Example. n.d. **Kinetic and affinity characterization – polyclonal antibodies.** Available Source: http://www.attana.com/attana-files/Application%20Examples/AE07-02-Kinetic&Affinity_PAbs.pdf., February 25, 2011.

Autolab application note. n.d. **Autolab SPR immunosensor for fibrinogen in human plasma.** Available Source: www.autolab-instruments.com, October 10, 2009.

_____. n.d. **Pre-treatment of the sensor disk for measurement of low molecular weight molecules.** Available Source: www.ecochemie.nl., October 10, 2009.

_____. n.d. **Surface plasmon resonance with the autolab SPR: an introduction.** Available Source: <http://www.autolabj.com/appl.files/appl%20note/-Appl010.pdf>., February 10, 2011.

_____. n.d. **Autolab SPR considerations on noise and baseline drift.** Available Source: <http://www.ecochemie.nl/export/Homepages/Autolab/download/-Applicationnotes/Apl041.pdf>., February 27, 2011.

AVRDC. 1999. **Progress Report.** Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan.

_____. 2004. **Progress Report.** Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan.

Barry, B., E. Stack, N. Gilmartin and R.O. Kennedy. 2009. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and association toxins. **Sensors** 9: 4407-4445.

- Benoit, M., A. Palloix, C. Carata, P. Gognalons, S. Souche and K.G. Selassiehoux. 2005. Serological, molecular and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chilli veinal mottle virus*. **Phytopathol.** 95: 227-232.
- Boltovets, P.M., V.R. Boyko, I.Y. Kostikov, N.S. Dyachenko, B.A. Snopok and Y.M. Shirshov. 2002. Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique. **J. Virol. Methods** 105: 141-146.
- , B.A. Snopok, V.R. Boyko, T.P. Shevchenko, N.S. Dyachenko and Y.M. Shirshov. 2004. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. **J. Virol. Methods** 121: 101-106.
- Bram, V.G., S. Spath, H. Dietrich, E. Stigter, G. Boonzaaijer, T.V. Osenbruggen and K. Koopal. 2003. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. **Food Con.** 14: 251-254.
- Bright Agindotan and K.L. Perry. 2007. Macroarray detection of plant RNA viruses using randomly primed and amplified complementary DNAs from infected plants. **Phytopathol.** 97:119-127.
- Brunt, A.A. and R.H. Kenten. 1972. *Pepper veinal mottle virus*. In Descriptions of Plant Viruse No. 104, Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, Surrey; 4 p.
- Burnet, F.M. 1962. **Natural History of Infectious Diseases**. 3rd ed. Cambridge England University Press. Cambridge, UK.
- Chen, J. and M.J. Adams. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Arch. Virol.** 146: 757–66.
- Chen, X., M. Pan and K. Jiang. 2010. Sensitivity enhancement of SPR biosensor by improving

surface quality of glass slides. **Microelec. Eng.** 87: 790-792.

Chiemsombat, P, N. Sae-ung, S. Attathom, S. Patarapuwadol and P. Siriwong. 1998. Molecular taxonomy of a new potyvirus isolated from chilli pepper in Thailand. **Arch. Virol.** 143: 1855-1863.

Cho, H.S., T.J. Kim, J. Lee and N.Y. Park. 2006. Serodiagnostic comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and surface plasmon resonance for the detection of antibody to porcine circovirus type 2. **The Canal. J. of Veterinary Res.** 70: 263-268.

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

Descriptions of plant viruses. n.d. **Members of Genus: Potyvirus.** <http://www.dpvweb.net/-notes/showgenusmembers- php?genus=Potyvirus.>, March 16, 2011.

Dijkma, M., B.A. Boukamp, B. Kamp, W.P. Bennekom. 2002. Effect of exacyanoferrate (II/III) on self-assembled monolayers of thioctic acid and 11-mercaptoundecanethiol on gold. **Langmuir** 18: 3105-3112.

Elma, M.L., J.M. Roelen, H.S. Damme, P.J. Bloemers, T.J. Gribnau and J.G. Shielen. 1995. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. **J. of Immunol. Met.** 184: 207-217.

Fahriye, C.D. and I.H. Boyac. 2008. Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensor. **Biotechnol.** 4: 1003-1011.

Fariba, N., D. Aili, T. Nayeri, J. Xu, S. Almer, I. Lundström, B. Åkerlind and B. Liedberg. 2005. Hepatocyte growth factor (HGF) in fecal samples: rapid detection by surface plasmon resonance. **BMC Gast.** 5: 13-20.

- Fujisawa, I., S.H. Anang, Y. Shen and A. Zhou. 1986. Virus diseases occurring on some vegetable crops in West Malaysia. **JARQ**. 20: 78-84.
- Glaser, R.W. and G. Hausdorf. 1996. Binding kinetics of an antibody against HIV p24 core protein measured with real-time biomolecular interaction analysis suggest a slow conformational change in antigen p24. **J. Immunol. Methods** 189: 1-14.
- Green, S.K. 1997. **A protocol for leaf curl and other virus resistance in tomato and chilli**. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, 13p.
- Ha, C., P. Revill, R.M. Harding, M. Vu and J.L. Dale. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. **Arch. Virol.** 153: 45-60.
- Hameed, S., H. Shah, H. Ali and S. Khalid. 1995. *In* **Prevalence of chilli viruses in Pakistan**. Fifth National Congress of Plant Sciences, NARC. Islamabad.
- Hardy, F., L.D. Ohaniance and M.E. Goldberg. 1997. Measurement of antibody/ antigen association rate constants in solution by a method based on the enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Immunol. Methods** 200: 155- 159.
- Harry, T., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 4350-4354.
- Hussain, S., T. Yasmin, M. Fahim, S. Hameed and M.I. Haque. 2009. Prevalence, occurrence and distribution of *Chilli veinal mottle virus* in Pakistan. **Pak. J. Bot.** 41: 955-965.
- Jan, C. 2010. **Surface plasmon resonance: principles and applications**. Available Source: <http://www.usp.org/pdf/EN/meetings/indiaPresentations/castropJan2.pdf>, February 27, 2011.

- Jarupat, D. 2005. **Development of surface plasmon resonance spectroscopy as a biological sensor**. M.Sc. Thesis, Mahidol University.
- Jean, F.M., T.M. Battaglia, J. Cramer, S. Beaudoin, M. Sierks and K.S. Booksh. 2006. Reduction of nonspecific protein binding on surface plasmon resonance biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.** 386: 1951-1959.
- John, R.C. 2001. **The ELISA Guidebook**. Humana Press Inc. USA, 421p.
- Julian, A. 2001. Surface plasmon resonance (SPR) technology improves drug lead selection. **Modern drug disc.** 4: 34-40.
- Jyoung, J.Y., S. Hong, W. Lee and J.W. Choi. 2006. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. **Biosens. Bioelectron.** 21: 2315-2319.
- Katsamba, P.S., S. Park and I.A.L. Offringa. 2002. Kinetic studies of RNA-protein interaction using surface plasmon resonance. **Meth.** 26: 95-104.
- Krishna R. M., M.K Reddy, C.N. Reddy, R. Smitha, S. Jalali. n.d. **Molecular characterization and genetic variability of Chilli veinal mottle virus and its reaction on chilli pepper genotypes**. Available Source: <http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/-/2006/20063220143.pdf>, March 15, 2011.
- Kristina, R., K. Petersson and A. Krozer. 2008. QCM-D analysis of the performance of blocking agents on gold and polystyrene surfaces. **Langmuir** 24: 8695-8700.
- Laemmli, U.K. 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lane, C.R., E. Hobden, L. Walker, V.C. Barton, A.J. Inman, K.J.D. Hughes, H. Swan, A.

- Colyer and I. Barker. 2007. Evaluation of a rapid diagnostic field test kit for identification of *Phytophthora* species, including *P. ramorum* and *P. kernoviae* at the point of inspection. **Plant Pathol.** 56: 828-835.
- Lee, J.M., H.K. Park, Y. Jung, J.K. Kim, S.O. Jung and B.H. Chung. 2007. Direct immobilization of protein g variants with various numbers of cysteine residues on a gold surface. **Anal. Chem.** 79: 2680-2687.
- Leonard, P., S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty and R.O. Kennedy. 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. **Enzyme Microb. Tech.** 32: 3-13.
- Lidstrom, P. n.d. **Outstanding sensitivity for confident label-free interaction analysis using Biacore T200.** Available Source: http://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/-life_science_news/pdf/dm012_06.pdf, March 16, 2011.
- Liyang, W., Y. Sun, J. Wang, J. Wang, A. Yu, H. Zhang and D. Song. 2010. Water-soluble ZnO-Au nanocomposite-based probe for enhanced protein detection in a SPR biosensor system. **J. Colloid Interface Sci.** 351: 392-397.
- Man, S.W., C.C. Fong and M. Yang. 1999. Biosensor measurement of the interaction kinetics between insulin-like growth factors and their binding proteins. **Bioc. Et Bio. Acta.** 1432: 293-301.
- Marie, C.D., D. Altschuh and M.V. Regenmortel. 1992. Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance. **Immunol. Lett.** 31: 59-64.
- Marjorie, B.M. 2006. A biosensor method for detection of Staphylococcal enterotoxin A in raw

whole egg. **J. Rap. Meth. Auto. Microb.** 14: 119–132.

Moi, L.K. 1992. **Transmission and pattern of *Chilli veinal mottle virus* by *Aphis gossypii* glover (Homoptera: Aphididae).** M.Sc. Thesis, University of Putra.

Monthatip, T., A. Bhunchoth, N. Warin, O. Chatchawankanphanich and P. Burns. 2009. Cloning and expression of Ethylene Response Sensor 1 (Den-ERS1) gene of *Dendrobium* ‘Pompadour’ flower during development and senescence. **Agricultural Sci. J.** 42: 227-236.

Moonil, K., S.H. Han, Y.B. Shin and B.H. Chung. 2007. Surface plasmon resonance biosensor chips. **Biochip.** 2: 81-89.

Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, P. Gognalons, S. Souche, K.G. Selassie and G. Marchoux. 2005. Serological, molecular and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. **Phytopathol.** 95: 227-232.

Mowat, W.P. and S. Dawson. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **J. Virol. Methods** 15: 233–247.

Nice, E.C. and B. Catimel. 1999. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. **BioEs.** 21: 339-352.

Nono, W.R. 2001. An overview of major virus diseases of vegetable crops in Africa and some aspects of their control. **Plant virol. in sub Sah. Africa** 1: 213-230.

Olivier, L., F.J.D. Campo and F.X. Munoz. 2007. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosens. Bioelectr.** 22: 1205-1217.

Ong, C.A., G. Varghese and W.P. Ting. 1979. Etiological investigations on veinal mottle

virus of chilli (*Capsicum annuum* L.) newly recorded from peninsular Malaysia.

MARDI Res. Bull. 7: 78-88.

——— and T.W. Poh. 1980. The effect of *Chilli veinal mottle virus* on yield of chili (*Capsicum annuum* L.). Malaysia Agriculture Research and Development Institute (MARD) **Res. Bull.** 8: 74-79.

Peter S., H. Frokiaer, S. Hearty, R.O. Kennedy, J. Hejgaard, M. Nicolaisen and A.F. Justesen. 2007. Detection of fungal spores using a generic surface plasmon resonance immunoassay. **Biosens. Bioelectr.** 22: 2724–2729.

———, M. Nicolaisen and A.F. Justesen. 2008. Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor. **J. Microbiological Methods** 68: 507-515.

Prakash S., S.J. Singh, R.K. Singh and P.P. Upadhyaya. 2002. Distribution incidence and detection of a potyvirus on chilli from eastern Uttar Pradesh. **Ind. Phytopath.** 55: 294-298.

Rajendran, K.S. and P.D. Nagy. 2008. Surface plasmon resonance analysis of infections between replicase proteins of *Tomato bushy stunt virus*. **Methods Mol. Biol.** 451: 267-277.

Rakhee, G., K. Sharma, M. Mathew and S. Kumbhat. 2008. Surface plasmon resonance for label free detection of cholesterol. **Indian J. of Chem.** 47: 1804-1808.

Rebert, K. and A. Fait. 1997. Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensor. **J. of Immuno. Meth.** 200: 121-133.

Renate, K. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant. **J. gen. Virol.** 55: 53-62.

Rosa F.D. and L.T. Kubota. 2007. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. **Clinica. Chimica. Acta.** 376: 114-120.

Ross, J. and J. Robert. 2009. **R program**. Available Source: <http://www.robertjross.org/-LightNEasy.php?page=publications>., March 10, 2009.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd Ed. Cold spring harbor laboratory Press, Cold spring harbor, New York. 2,344 p.

Sang, W.K., M.G. Kimb, J. Kima, H.S. Lee and H.S. Roa. 2008. Detection of the mycovirus OMSV in the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* using an SPR biosensor chip. **J. Virol. Methods** 148: 120–124.

Satoshi, S., E. Kai, H. Miyachi, H. Muguruma, K. Ikebukuro, H. Ohkawa and I. Karube. 1998. Direct determination of etofenprox using surface plasmon resonance. **Analytica. Chimica. Acta.** 363: 229-233.

Shankar, G.S.B., V.A. Petrenko and A.L. Simonian. n.d. **Prevention of non-specific binding as a way to increase sensitivity of SPR-based biosensors**. Available Source: <http://www.electrochem.org/dl/ma/206/pdfs/2196.pdf>, March 1, 2010.

Siriwong, P., K. Kittipakorn and M. Ikegami. 1995. Characterization of *Chilli vein-banding mottle virus* isolated from pepper in Thailand. **Plant Pathol.** 44: 718-727.

Son, J.R., G. Kim, A. Kothapalli, M.T. Morgan and D. Ess. 2007. Detection of *Salmonella enteritidis* using a miniature optical surface plasmon resonance biosensor. **J. Phys.** 61: 1086-1090.

Stenberg, E., B. Persson, H. Roos and C. Urbaniczky. 1991. Quantitative determination of

surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. **J. Colloid Interface Sci.** 143: 513-526.

Su, J.L., B.S. Youn, J.W. Park, J.H. Niazi, Y.S. Kim and M.B. Gu. 2008. ssDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes. **Anal. Chem.** 80: 2867-2873.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24: 1596-1599.

Thierry C., H. Lot, S.G. Retana, R.K. Sakate, J. Thomas, S. Souche, T. Delaunay, M. Lanneau and O.L. Gall. 2007. Analysis of the serology variability of *Lettuce mosaic virus* using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. **J. Gen. Virol.** 88: 2605-2610.

Torrance, L., A. Ziegler, H. Pittman, M. Paterson, R. Toth, and I. Eggleston. 2006. Oriented immobilisation of engineered single-chain antibodies to develop biosensors for virus detection. **J. Virol. Methods.** 134: 164-170.

Torreri, P., M. Ceccarini, P. Macioce and T.C. Petrucci. 2005. Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology. **Ann. Ist. Super. Sanita.** 41: 437-441.

Tsai, W.S., Y.C. Huang, D.Y. Zhang, K. Reddy, S.H. Hidayat, W. Srithongchai, S.K. Green and F.J. Jan. 2008. Molecular characterization of the *CP* gene and 3'UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. **Plant Pathol.** 57: 408-416.

Vanneste, J.L., J. Yu and Y. Wu. 2008. Potential of surface plasmon resonance (SPR) for the rapid identification of *Erwinia amylovora*. **Acta. Hort.** 793: 529-532.

Vitalii, S., H. Weetall and D.J. Vanderah. 1997. SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers

(SAMs). **J. Coll. Interf. Sci.** 185: 94-103.

Wang, J., Z. Liu, S. Niu, M. Peng, and D. Wang. 2005. Natural occurrence of *Chilli veinal mottle virus* on *Capsicum chinense* in China. **Plant Dis.** 90: 377-379.

Webster, C.G., S.J. Wylie and M.G.K. Jones. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. **Curr. Sci.** 86:1604-1607.

Wikipedia. n.d. **The plant cell**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_cell, October 30, 2010.

Wu, L., H.S. Chu, W.S. Koh and E.P. Li. 2010. Highly sensitive grapheme biosensor based on surface plasmon resonance. **O. S. A.** 18: 395-400.

Xia, L., D. Song, Q. Zhang, Y. Tian and H. Zhang. 2004. An optical surface plasmon resonance biosensor for determination of tetanus toxin. **Tala.** 62: 773–779.

———, J. Wei, D. Song, Z. Zhang, H. Zhang and G. Luo. 2003. Determination of affinities and antigenic epitopes of bovine cardiac troponin I (cTnI) with monoclonal antibodies by surface plasmon resonance biosensor. **Analy. Bio.** 314: 301-309.

Zsofia, B., G. Lautner, V. Bardoczy, B. Komorowska, R. E. Gyurcsanyi and T. Meszaros. 2010. Selection and versatile application of virus-specific aptamers. **The FASEB J.** 24: 4187-4195.





1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการปลูกเชื้อ ChiVMV-KPS9

สารละลาย A	0.1 M NaH_2PO_4	6.85	กรัม
ละลายในน้ำปริมาตร	500 มิลลิลิตร		
สารละลาย B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	17.95	กรัม
ละลายในน้ำปริมาตร	500 มิลลิลิตร		

เตรียม 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 โดยนำสารละลาย A และสารละลาย B ผสมกัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0

2. การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยวิธี PTA- ELISA

2.1 Carbonate coating buffer pH 9.6

NaHCO_3	2.93	กรัม
Na_2CO_3	1.59	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.2 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.3 Washing buffer (PBST)

PBS	1,000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

2.4 Substrate buffer pH 9.8

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

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่บดแสง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัด RNA

3.1 TLES ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Tris-HCl pH 8.0	0.363	กรัม
LiCl	0.032	กรัม
EDTA	0.112	กรัม
SDS	0.3	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อจนครบ 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.2 PCI (phenol : chloroform : isoamyl ; 25 : 24 : 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Phenol	5	มิลลิลิตร
Chloroform	4.8	มิลลิลิตร
Isoamyl	0.2	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายภายในตู้ดูดควันและเก็บสารละลายในภาชนะที่บ่มแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 TLES ที่เติม 2% Na_2SO_3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

TLES	10	มิลลิลิตร
Na_2SO_3	0.2	กรัม

ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.3 70% Ethanol

Absolut ethanol	21	มิลลิลิตร
-----------------	----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) จนครบ 30 มิลลิลิตร

3.4 2.5 M CH_3COONa

CH_3COONa	20.51	กรัม
---------------------------	-------	------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) จนครบ 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียและสารที่ใช้ในการเตรียม competent cell

4.1 อาหาร LB

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 อาหาร SOB (Rich medium)

Tryptone	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 RF1 solution

KCl	0.745	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.899	กรัม
KOAc	0.294	กรัม
CaCl ₂	0.111	กรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร

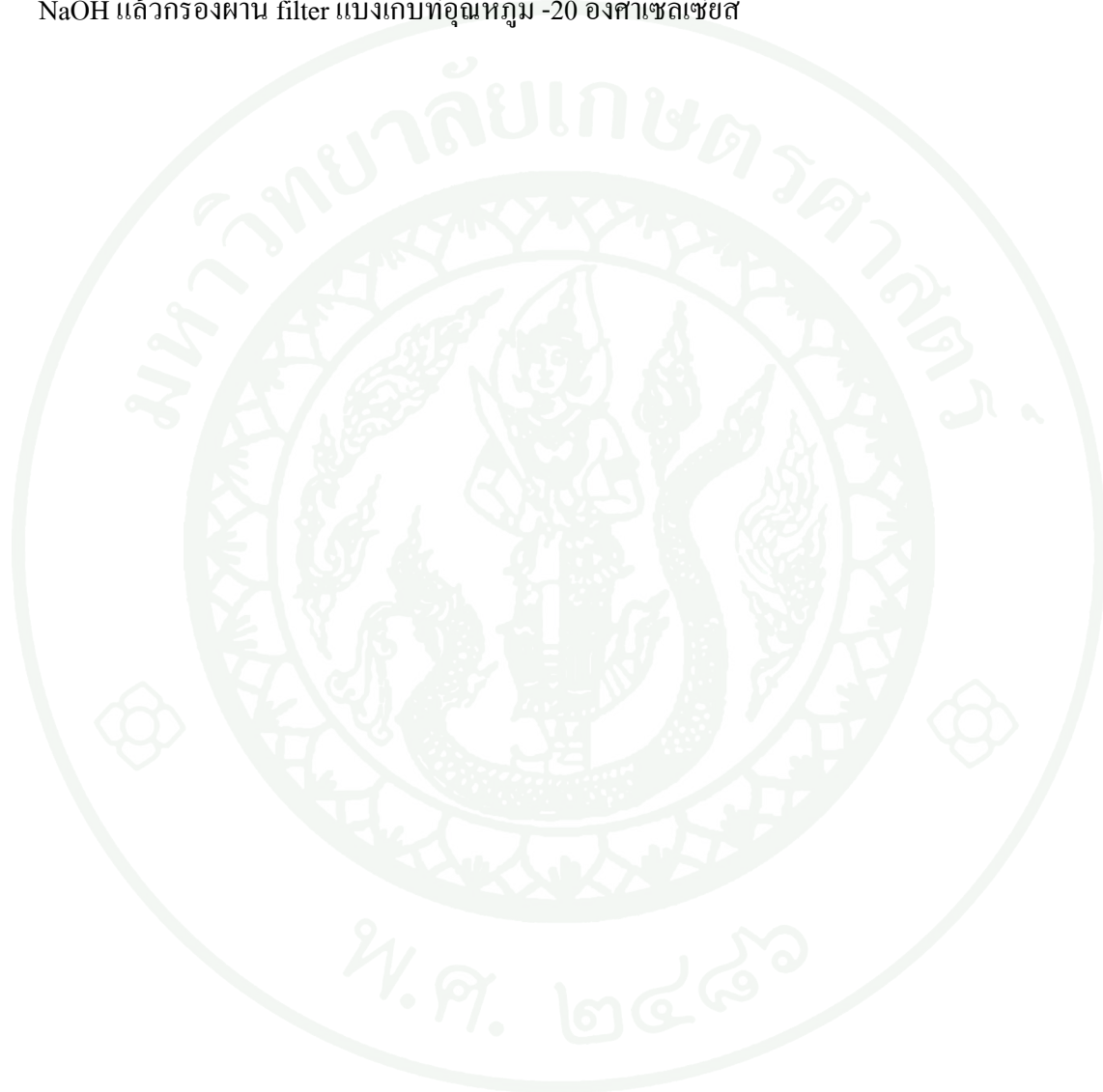
ปรับปริมาตรด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ด้วย acetic acid แล้วกรองผ่าน filter แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.4 RF2 solution

MOPs	0.210	กรัม
KCl	0.74	กรัม

CaCl_2	0.833	กรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร

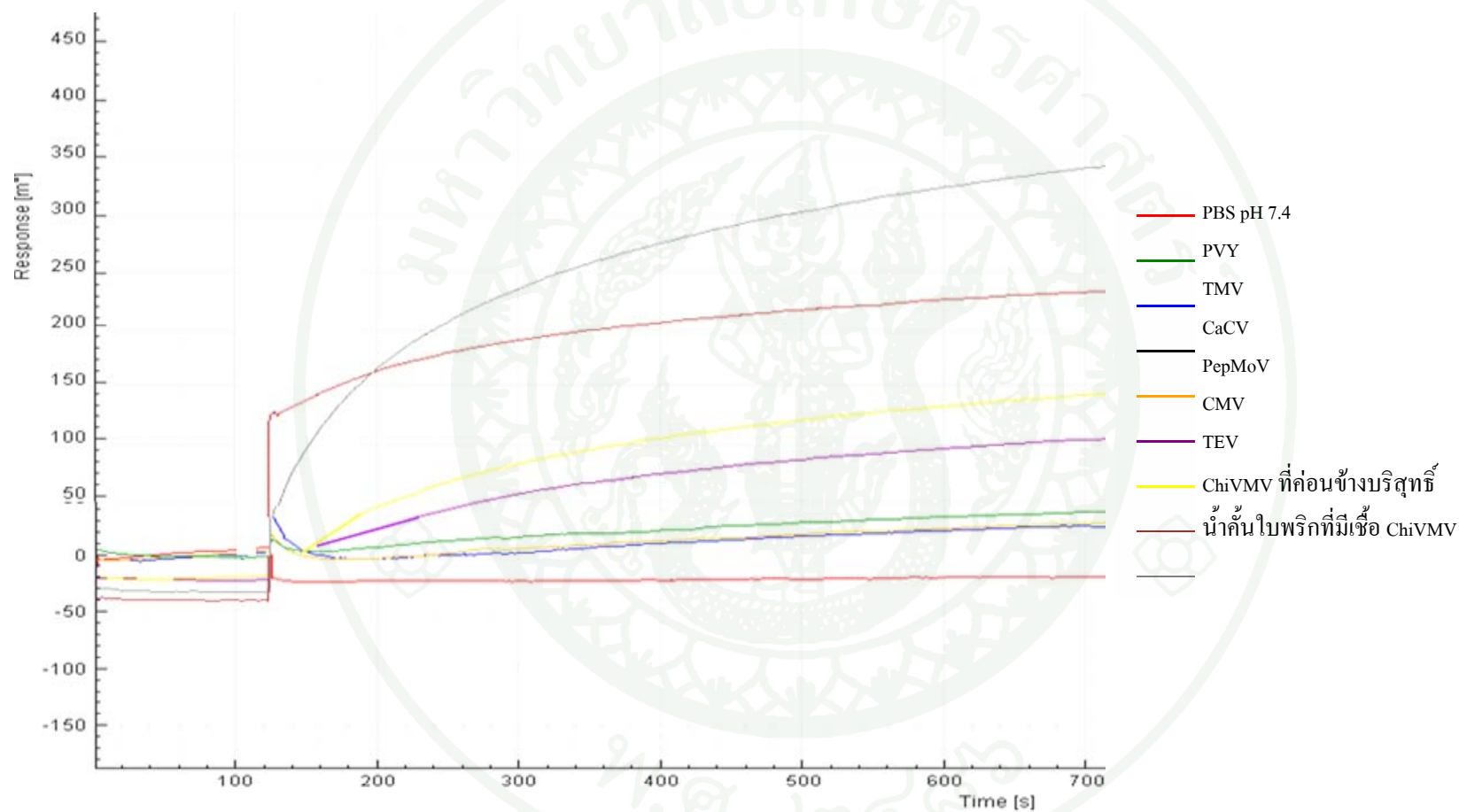
ปรับปริมาตรด้วยน้ำนิ่งมาเช็จนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ด้วย NaOH แล้วกรองผ่าน filter แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



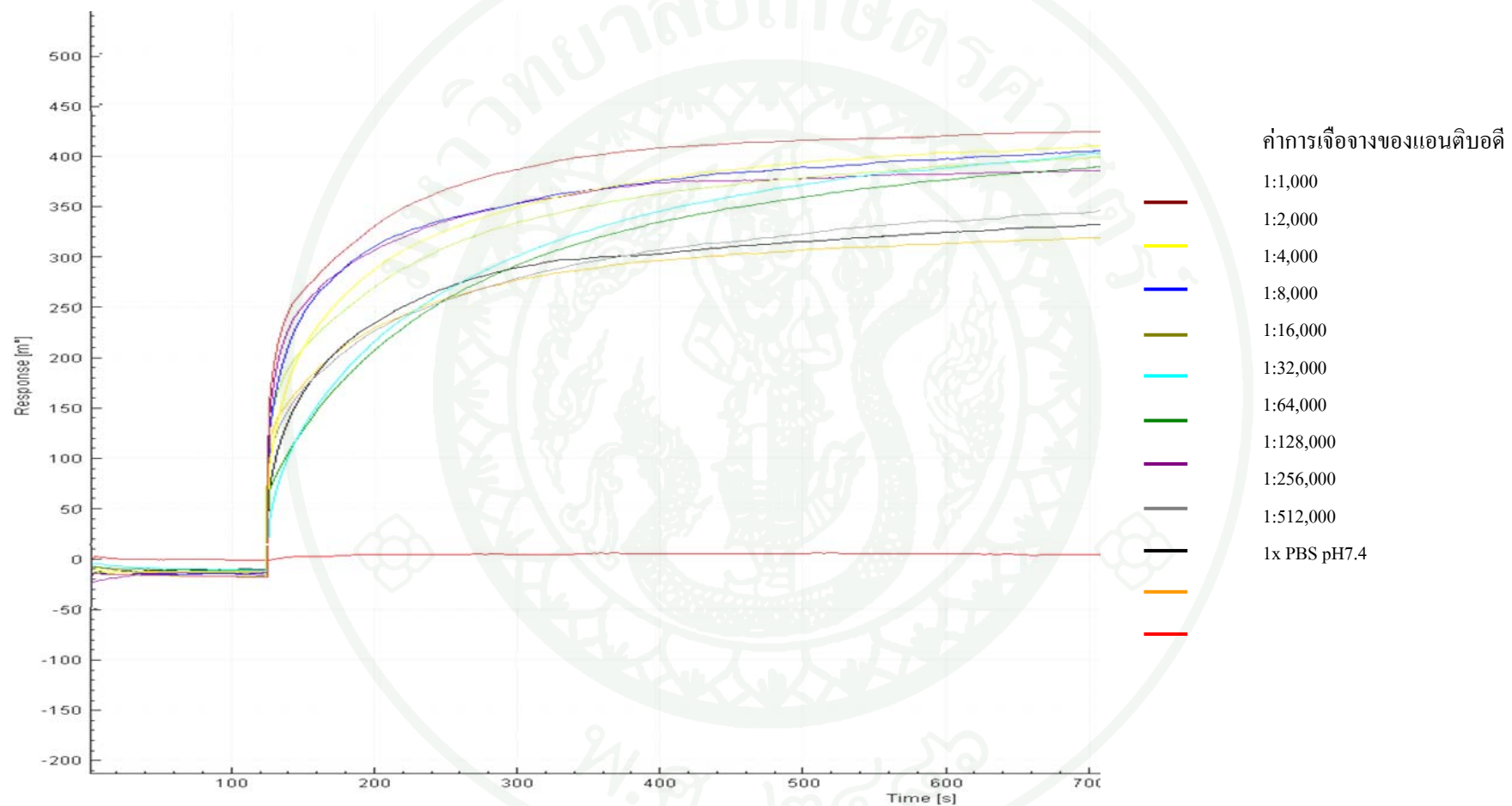


ภาคผนวก ข

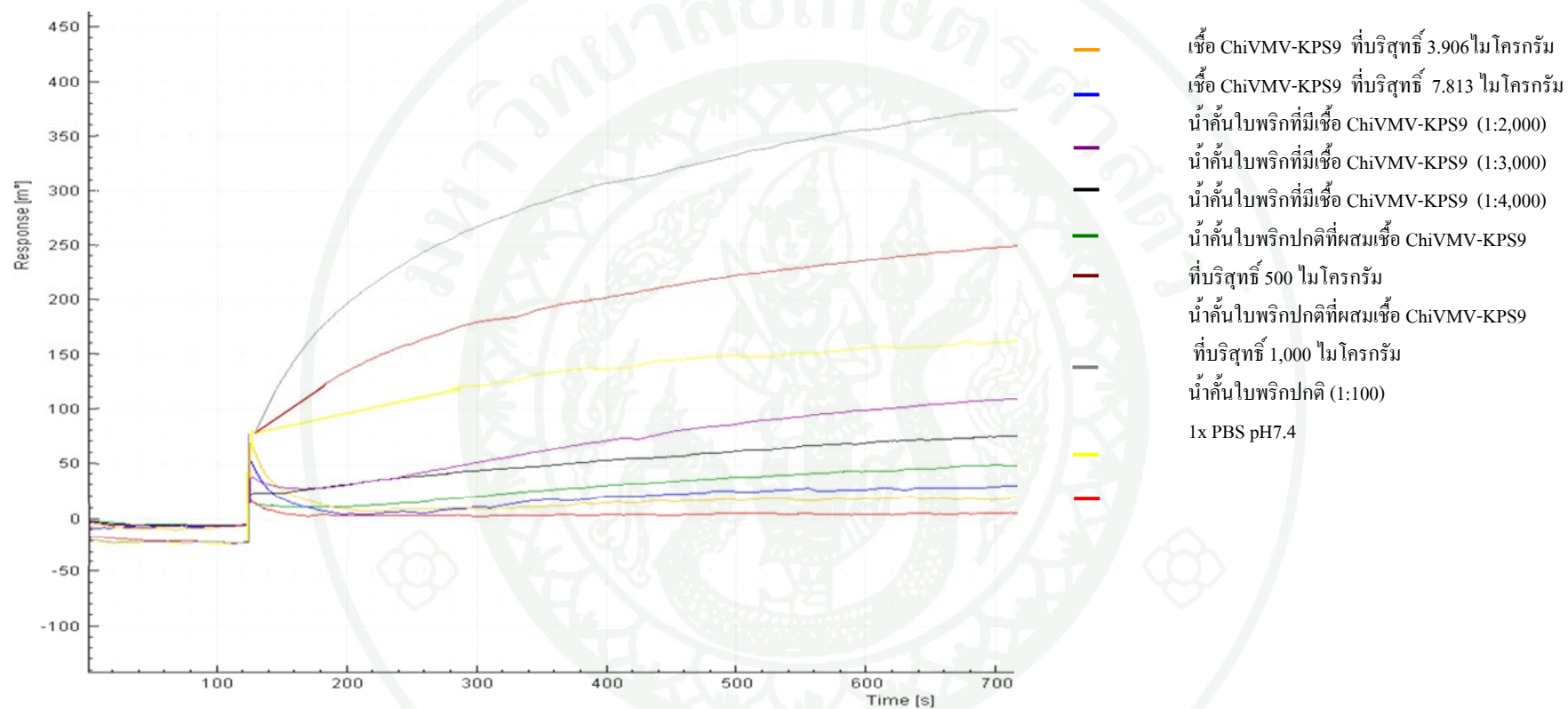
ภาพผลการทดสอบคุณสมบัติของ PAb ด้วยเทคนิค SPR biosensor



ภาพผนวกที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ PAb กับเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ 7 ชนิด ด้วยเทคนิค SPR biosensor



ภาพผนวกที่ 2 ผลการทดสอบค่าไตเตอร์ของ PAb ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ ChiVMV-KPS9 ที่บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SPR biosensor



ภาพผนวกที่ 3 ผลการทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของ PAb ต่อเชื้อ ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค SPR biosensor

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววาริรัตน์ สมประทุม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 ตุลาคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	ต. โพนางคำออก อ. สรรพยา จ. ชัยนาท
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)
ตำแหน่งหน้าที่การงาน ปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงาน	-สุจินต์ ภัทรภูวคณ, วาริรัตน์ สมประทุม, รัชดาภรณ์ เขียวหวาน, กรุง สีตะธนี และศิริกุล วสี. 2551. การคัดเลือกพันธุ์พริก ด้านทานโรคใบด่างแดงและใบด่างประของพริก. ว. วิทย์. กษ. 39 (3) (พิเศษ): 376-379. -รางวัลชมเชยในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ สาขาพืชผัก ในงานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7 ประจำปี 2551 เรื่อง “การคัดเลือกพันธุ์พริกด้านทานโรคใบด่างแดงและใบด่างประของพริก” -วาริรัตน์ สมประทุม, สุจินต์ ภัทรภูวคณ, กรุง สีตะธนี และศิริกุล วสี. 2552. การประเมินความต้านทานพริกต่อเชื้อ <i>Chilli veinial mottle virus</i> ในสภาพแปลงทดลอง. ว. วิทย์. กษ. 40(3) (พิเศษ): 39-42. -Sujin Patarapuwadol, Wareerat Sompratoom, Krung Sitathani and Sirikul Wasee. 2010. New source of resistance to Thai isolate of <i>Cucumber mosaic virus</i> and <i>Chilli venial mottle virus</i> in Capsicum germplasm collection. In The XIVth EUCARPIA meeting on Genetic s and Breeding of Capsicum and Eggplant
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สังกัดกระทรวงวิทยาศาสตร์ -สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ