รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

----

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. **โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
   โครงการวิจัยย่อยที่ 3 : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
   กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

3. **ชื่อการทดลอง** **:** การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) สำหรับตรวจไวรัสในกลุ่ม *Tospovirus*
   : Research and development of test kit for detection of *Topovirus Group*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : เยาวภา ตันติวานิช
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน : ปรียพรรรณ พงศาพิชณ์
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใชเปนชุดตรวจสอบไวรัสในกลุ่มทอสโพไวรัส ที่สามารถตรวจสอบไดแมนยำ ใชงาย สะดวกและอานผลไดรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการทางเซรุมวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane; NCM) การเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของทอสโพไวรัส โดยการตรวจสอบดวยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) เตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมตอ (conjugate) กับ IgG ของ SCMV และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใชปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ทำเสน control line ดวย GAR (Goat anti rabbit เขมขนอัตรา 1:3) และ test line ดวย IgG ของทอสโพไวรัส ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนแผน NCM (วัสดุเปน S&S – AE 99, ขนาด 8 ไมโครเมตร) เมื่อประกอบเปนชุดตรวจสอบแลว และทำการทดสอบกับน้ำคั้นใบพืชจากตนที่เปนโรคพบวา ชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่ไดพัฒนานี้สามารถตรวจสอบทอสโพไวรัส แตให้ผลที่ไม่ชัดเจนและใช้เวลาในการตรวจสอบนานกว่า 5 นาที

คำสำคัญ : ทอสโพไวรัส ชุดตรวจสอบ

Abstract

Gold labeled IgG flow test (GLIFT) was developed as test kit for *Tospovirus* detection based on serology and lateral flow technique. Accuracy, convenience and rapid detection are the novel properties of this technique. The GLIFT kit will be very useful for varietal screening in breeding program, forecasting and early warning of *Tospovirus* epidemic. The Tospovirus IgG was purified and tested by dot immunobinding assay (DIBA) to obtain the proper concentration for using in GLIFT kit. IgG was conjugated with colloidal gold and amount of 100-120 μl (6.6 μl/cm) of IgG conjugated gold were used for lining on 15 –18 cm conjugated release pad Control line and test line were made on nitrocellulose membrane using 40 μl (2.2 μl/ cm) of goat anti-rabbit and IgG respectively. The appearance of color on both test line and control line indicated positive result. While no color was shown on the test line in case of negative result. GLIFT kit were tested for their efficacy to detect *Tospovirus* from infected plants. But the result was not clear and take the time to check for more than five minutes.

Keywords: Tospovirus, test kit, detection

คำนำ

ทอสโพไวรัส (Tospovirus) เป็นกลุ่มเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก มีพืชอาศัยมากกว่า 800 ชนิด ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่มากกว่า 80 family และพบมากใน Family Solanaceae และ Asteraceae พืชเศรษฐกิจที่พบการเข้าทำลายของทอสโพไวรัส ได้แก่ พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ยาสูบ ถั่วลิสง ผักกาดหอม มะละกอ และไม้ประดับ เช่น เบญจมาศ บีโกเนีย Impatiens รวมทั้งกล้วยไม้ด้วย ซึ่งถือว่าทอสโพไวรัสมีความหลากหลายมากทางด้านพืชอาศัยมาก ส่วนแมลงพาหะนั้น ทอสโพไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะถ่ายทอดโรค รวมทั้งลักษณะอาการของพืชที่ถูกทอสโพไวรัสเข้าทำลายนั้นก็มีอาการที่เป็นลักษณะเฉพาะหลายแบบแตกต่างกันออกไปตามแต่ละพืช ได้แก่ อาการแผลจุดเป็นวงสีเหลือง หรือแผลไหม้เป็นวงซ้อนกัน บนใบ ก้าน ผล อาการเนื้อเยื่อตายเป็นสะเก็ดบนผล อาการยอดไหม้ ในพืชตระกูลแตงพบอาการจุดแผลสีเหลือง และแผลเนื้อเยื่อตายบนใบและยอดค่อนข้างรุนแรง และปัจจุบันพบลักษณะอาการที่คล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากทอสโพไวรัสในพืชหลายชนิดมากขึ้น และจำนวนมากขึ้น บางครั้งไม่สามารถตรวจพบทอสโพไวรัสสาเหตุโรคได้จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เพราะไวรัสในกลุ่มนี้มีปริมาณน้อยมาก รวมทั้งมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิดในการตรวจไวรัสในกลุ่มทอสโพไวรัสนี้ เช่น เทคนิค dot blot hybridization Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) Tissue blot immunoassay (TBIA) multiplex RT-PCR และ Real Time PCR ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และ/หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้นำ

เทคนิค GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) มาปรับใช้ในการตรวจสอบทอสโพไวรัส เพื่อให้สามารถตรวจสอบทอสโพไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิดในการตรวจสอบไวรัสนี้ เช่น เทคนิค dot blot hybridization Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) Tissue blot immunoassay (TBIA) RT-PCR และ Real Time PCR ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และ/หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร ทั้งนี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้และไวรัสของมันฝรั่ง โดยวิธี Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ทำให้การตรวจสอบมีความสะดวกขึ้นมากและอ่านผลได้ในเวลารวดเร็ว คือ ใช้เวลาในการตรวจเพียง 5 นาที (สุรภี และคณะ, 2547 และ กิตติศักดิ์ และคณะ, 2549) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและนำวิธี GLIFT ไปปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่นๆ อีกหลายโรคด้วยกัน (สุรภี และคณะ, 2551) งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) มาปรับใช้ในการตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น สามารถควบคุมโรคอย่างได้ผลและมีประสิทธิภาพ สามารถดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็วและทันต่อเหตุการณ์ การตรวจวินิจฉัยโรคพืชนอกจากต้องเป็นวิธีการที่แม่นยำ และสะดวกแล้ว ควรที่จะสามารถใช้ตรวจสอบได้เองในผู้ใช้ทุกระดับ รวมทั้งต้องมีราคาที่ไม่แพงมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. Carbonate coating buffer
2. พืชทดสอบ
3. แผนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM)
4. สารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold)
5. Goat Anti Rabbit IgG
6. แผ่น conjugated release pad (CRP)
7. 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 carbonate buffer pH 9.6 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5
8. ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) พู่กันเบอร์ 0 ไม้บรรทัด

วิธีการ

มีขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

1. การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลองและการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

การเก็บตัวอย่างพืชในแปลงปลูก เช่น มะเขือเทศ พริกจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทำลายอัน ได้แก่ อาการด่างจุดวงแหวน

แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบด่างแบบใบโอ๊ค เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกปิดปากถุง จดบันทึกและบันทึกภาพลักษณะอาการของโรค และนำตัวอย่างพืชกลับมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการ

นำมาตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัส ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสทำตามขั้นตอนดังนี้ บดใบพืชที่แสดงอาการของโรคด้วย carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate, pH 9.6) ที่เติม diethyldithiocarbamic acid (NaDIECA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัดส่วนเนื้อเยื่อพืชต่อบัฟเฟอร์เป็น 1:10 (w/v) จากนั้นเติมลงในหลุม ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้น (ขั้นนี้สามารถบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน) เมื่อครบเวลาเทน้ำคั้นตัวอย่างออก แล้วล้างด้วย phosphate buffer saline ที่เติม 0.05 % tween 20 (PBS-T) เตรียม primary antibody ที่จับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ โดยเจือจางแอนติบอดีใน conjugate buffer (1% skim milk ใน PBS-T) เติม primary antibody หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้น แล้วล้างด้วย PBS-T จากนั้นเตรียม secondary antibody ซึ่งเป็น alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (AP conjugated-GAR IgG) เจือจาง1:10,000 (v/v) ใน conjugate buffer แล้วเติมในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้น ล้างด้วย PBS-T buffer เติมสารละลาย p-nitrophenyl phosphate ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมใน substrate buffer (10% Diethanolamine, pH 9.8) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่เวลา 60 นาที

ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาเป็นบวก นำมาแยกเชื้อให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวและเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส ด้วยวิธีทาน้ำคั้น โดยบดใบพืชใน 0.01 M sodium potassium phosphate buffer, pH 7.0 ที่เติม 0.2 % (w/v) sodium sulfite และเติมผงคาร์บอรันดัมในน้ำคั้นในอัตรา 0.01 % (w/v) จากนั้นทาน้ำคั้น บนใบเลี้ยงของถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) หรือถั่วฝักยาว (*V. unguiculata*) ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด เก็บต้นพืชไว้ในโรงเรือนจนเกิดแผลจุด จึงตัดเนื้อเยื่อใบบริเวณแผลแต่ละจุดมาบดในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทาน้ำคั้นลงบนใบยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi nc เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสและใช้เป็นแหล่งสะสมของไวรัส เก็บต้นพืชไว้ในโรงเรือนกันแมลง สำหรับใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการทดลอง

2. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในต้นยาสูบ จนได้ต้นยาสูบที่แสดงอาการของทอสโพไวรัส จึงนำเตรียมเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการดังนี้ คือ ตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ – 20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นำมาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มล. ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มล. กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืช เอาแต่ส่วนน้ำคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มล. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มล. กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มล. ใส่บีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5M Urea ปริมาตร 100 มล.กวนใน

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัส

นำสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ปรับความเข้มข้นของโปรตีนของเชื้อเป็น 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ในการฉีดกระต่ายครั้งแรก ใช้กระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 3 เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม และในครั้งต่อๆ ไปผสมกับ incomplete Freund's adjuvant แทน การฉีดทุกครั้งจะฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; SC) 2-3 ตำแหน่ง ฉีดกระตุ้นแบบสัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายที่ใบหูในสัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป นำเลือดกระต่ายที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเลือดแข็งตัว ก่อนนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ดูดส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดที่ความเร็ว 10000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำซีรัมที่ได้เก็บใส่ขวด เติม NaN3 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัส โดยวิธี Indirect ELISA การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัส และการทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัส

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ของเชื้อทอสโพไวรัส นำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อทอสโพไวรัส มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่นๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton *et al,*1990) นำแอนติซีรัม 1 มิลลิลิตรผสมกับ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร หยด saturated ammonium sulfate pH 7.2 ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ที่แช่เย็นค่อยๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรัม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40 เปอร์เซ็นต์ ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อยๆ ละลายตะกอนด้วย Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) 1 มิลลิลิตร เติม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร และ saturated ammonium sulfate 1.02 มิลลิลิตร ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33 เปอร์เซ็นต์ ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS 1.5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.2 ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยนำ IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจเชื้อทอสโพไวรัส ใน

ตัวอย่างพืชด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *et al*, 1990 โดยใช้ IgG ของเชื้อทอสโพไวรัสที่เจือจาง 1: 500

4.3 การเตรียม Gold conjugated IgG ทำการติดฉลาก IgG ของทอสโพไวรัส ด้วยอนุภาคทอง โดยนำ IgG ของทอสโพไวรัส 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold) (ของ DCN Diagnostic Consulting Network, Biodot, USA) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมากวนด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ กวนเบาๆ อีก 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled IgG) ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาณ 500-600 ไมโครลิตร จะมีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 เติม sucrose ในอัตรา 20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆ ให้ละลาย

4.4 การเตรียมแผ่น conjugated release pad (CRP) นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) มาตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.8–1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15–18 เซนติเมตร วางลงบนกระดาษขาวที่สะอาด ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่ม Gold conjugated IgG ป้ายลงบน CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ปริมาณ 100 – 120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินั่มฟอล์ย เก็บไว้ในที่แห้ง

4.5 การทำเส้น test line และ control line โดยนำแผ่น NCM (วัสดุเป็น S&S – AE 99, size 8 ไมโครเมตร) ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ backing) ทำเครื่องหมายด้วยดินสอที่ด้านบนของแผ่น เป็นตำแหน่ง control line ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจาก control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง แตะปากกาลงและลากเส้นจากซ้ายไปทางขวาช้าๆ จนสุดปลาย NCM ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น NCM มีขนาดเท่าๆ กันทั้งเส้นใช้ปากกาด้ามใหม่ (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มซับ IgG ของทอสโพไวรัส (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4.6 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

- นำแผ่น backing หรือ พลาสติก ขนาด 11X18 เซนติเมตร ที่เคลือบกาวไว้ 1 ด้าน
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงกลางที่ตำแหน่งของ NCM วางแผ่น NCM ลงให้เรียบ
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ CRP วางแผ่น CRP ให้เกยทับ NCM ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ Sample application pad (SAP) วางแผ่น SAP เกยแผ่น CRP 1-2 มิลลิเมตร
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ absorbing pad (Wick) วางแผ่น Wick เกยทับแผ่น NCM 1-2 มิลลิเมตร

- ตัดด้วยที่ตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 0.42 - 0.45 เซนติเมตร

- บรรจุชุดตรวจสอบลงตลับ ทดสอบคุณภาพกับตัวอย่างน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:10 เท่า

- เก็บ GLIFT kit ไว้ในถุงอลูมินั่มฟอล์ย และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง

4.7 การเตรียมตัวอย่างและทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ บดตัวอย่างใบพืชจากต้นที่เป็นโรคและต้นปกติใน extraction buffer อัตรา 1 : 10 (ตัวอย่างใบพืช : buffer) หยดน้ำคั้นจากใบพืชลงในชุดตรวจสอบ GLIFT kit ชุดละ 3 -4 หยด ตรวจผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เพื่อทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบทอสโพไวรัส GLIFT kit ที่ได้พัฒนาขึ้นในครั้งนี้

เวลาสถานที่

ห้องปฏิบัติการทดลองของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รวมระยะเวลาดำเนินการตลอดการทดลอง เริ่มต้น ตุลาคม 2555- สิ้นสุด กันยายน 2558

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างพืชในแปลงปลูกนั้น พบพืชที่มีอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากทอสโพไวรัส และนำมาตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) ใช้แอนติบอดีต่อเชื้อทอสโพไวรัสนั้น จากการตรวจวินิจฉัยทอสโพไวรัสในตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง ด้วยวิธี DAC-ELISA พบว่าตัวอย่างพืชเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติซีรัมต่อซีโรกรุ๊ป IV แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัม ซีโรกรุ๊ป I (TSWV) โดยตรวจพบทอสโพไวรัสในพริก 4 ตัวอย่าง มะเขือเทศ 2 ตัวอย่าง มันฝรั่ง 3 ตัวอย่าง จึงนำมาแยกเชื้อให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวและเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส ด้วยวิธีทาน้ำคั้นบนพืชทดสอบเก็บต้นพืชไว้ในโรงเรือนจนเกิดแผลจุด จึงตัดเนื้อเยื่อใบบริเวณแผลแต่ละจุดมาบดในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทาน้ำคั้นลงบนใบยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi nc เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสและใช้เป็นแหล่งสะสมของไวรัส เก็บต้นพืชไว้ในโรงเรือนกันแมลง ได้ทำการเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ หลังจากที่เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในต้นยาสูบ จนได้ต้นยาสูบที่แสดงอาการของทอสโพไวรัส และได้สารละลายไวรัส แต่ละตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร

การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อทอสโพไวรัสได้แล้วนั้น ดำเนินการฉีดกระต่ายและเจาะเลือดครั้งละประมาณ 25-35 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่นและเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-12 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 4 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:10,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถทำปฏิกิริยาได้ 1:10,000

สกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ของเชื้อทอสโพไวรัส และนำมาปรับความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบคุณภาพของ IgG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการตรวจสอบทอสโพไวรัส โดยวิธี DIBA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาทอสโพไวรัสและมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี DIBA คือ 1: 500

นำ IgG ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ได้เป็น IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold conjugated IgG or gold particle labeled IgG) ทำการเตรียมแผ่น CRP โดยใช้ภูกันจุ่มและป้ายลงบนแผ่น CRP ปริมาณ 100 – 120 ไมโครลิตร/แผ่น (15 – 18 เซนติเมตร) แล้วนำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินั่มฟอล์ย เก็บไว้ในที่แห้ง จากนั้นได้นำแผ่น NCM มาทำเส้น test line และ control line โดยใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม GAR ลากเส้น control line เป็นแนวเส้นตรง จากซ้ายไปทางขวาสุดปลาย NCM แล้วใช้ปากกาด้ามใหม่จุ่ม IgG ของทอสโพไวรัส ลากเส้น test line ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง นำแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง และแผ่น NCM ที่ได้ลากเส้น test line และ control line มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ บนแผ่น backing โดยประกอบร่วมกับแผ่น SAP และแผ่น wick เป็นชุดตรวจสอบ GLIFT kit

เมื่อนำชุดตรวจสอบ GLIFT kit มาทำการตรวจสอบทอสโพไวรัส ในน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค พืชปกติ และสารละลายไวรัสที่บริสุทธิ์ที่เจือจางในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 อัตรา 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 พบว่าชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่พัฒนาในครั้งนี้ ในตัวอย่างจากน้ำคั้นใบพืชปกติ และตัวอย่างที่พืชเป็นโรค ที่เส้น control line มีสีปรากฏขึ้นมาจางๆ และใช้เวลามากกว่า 5 นาที ส่วนในตัวอย่างที่พืชเป็นโรค เส้น test line ปรากฏสีจางๆ ไม่ชัดเจน ในทุกความเข้มข้น เมื่อทำซ้ำ ผลที่ได้ทั้งในเส้น control line และ เส้น test line ยังไม่มีความสม่ำเสมอ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อตรวจสอบทอสโพไวรัส ในครั้งนี้ ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบทอสโพไวรัสในพืชได้ เนื่องจากการปรากฏสีของชุดตรวจสอบ ใช้ระยะเวลานานเกินไป และสีไม่มีความคมชัด ไม่มีความสม่ำเสมอของผลการตรวจสอบ เพราะอาจเกิดจากประสิทธิภาพของแอนติซีรัมในการตรวจสอบโรคซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดค่อนข้างต่ำทำให้ผลการตรวจสอบได้ผลที่ไม่ชัดเจนจนถึงอ่านค่าไม่ได้ และความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ได้อาจจะไม่เหมาะสำหรับการทำเป็นชุดตรวจสอบ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA ได้ ดังนั้นมีการพัฒนาการผลิตแอนติซีรัมให้มีความเข้มข้นเหมาะสำหรับการผลิตชุดตรวจสอบ

สำหรับการผลิตชุดตรวจ GLIFT kit เพื่อตรวจสอบทอสโพไวรัส จะควรต้องมีการปรับปรุงการการผลิตแอนติซีรัมให้มีความเข้มข้นและความจำเพาะเจาะมากขึ้น เพื่อที่จะได้ชุดตรวจสอบที่มีคุณภาพและประสิทธภาพที่ดีขึ้น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อให้นักวิชาการ และเกษตรกร นำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อทอสโพไวรัสในพืชได้อย่างรวดเร็วได้ด้วยตนเองเพื่อการเฝ้าระวังและป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อทอสโพไวรัสได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวรุ่งนภา ทองเครง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2550. การผลิตชุดตรวจสอบไวรัสพืช (GLIFT kit) เพื่อใช้เอง. เอกสารประกอบการฝึกอบรม 13- 14 ธันวาคม 2550. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มงานวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ *Potato Virus Y* ในมันฝรั่ง. วารสารวิชาการเกษตร 24 (2) : 168-177.

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทฟันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพฯ

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2534. โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก tomato spotted wilt virus. รายงานประจำปี 2534. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ วิมล สีเทา อัญจนา บุญชด นุชนาถ วารินทร์ และอรประไพ คชนันทน์. 2548. การใช้เรียวไทม์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบชนิดของเชื้อทอสโพไวรัส. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช) (abstract) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ โสภณ วงศ์แก้ว อรประไพ คชนันทน อัญจนา บุญชด และนุชนารถ วารินทร์. 2548. การตรวจพบทอสโพไวรัสสองชนิดเข้าทำลายพืชร่วมกันในประเทศไทย น. 558-564 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสกล้วยไม้ในกล้วยไม้. วารสารโรคพืช 18 (1-2) : 1-14.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพานิชย์. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2536. โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ. 44 น.

โสภณ วงศ์แก้ว และ จุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2537. ระบาดวิทยาของไวรัสยอดไหม้ถั่วลิสง ปี 2536-2537, น. 197-202. ใน รายงานการสัมมนางานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 12, 25-27 ตุลาคม 2537. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Bezerra, I.C., R. de O. Resende, L. Pozzer, T. Nagata, R. Kormelink and A.C. de Avia. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new *tospovirus* species, one from chrysanthemum and one from zucchini. Phytopathology. 89: 823-830.

Brittlebank, C.C. 1919. Tomato diseases. J Agric Victoria 17: 231–235.

Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Honprayoon, A. Bhunchoth and P. Pongsapich. 2008. Biological and molecular characterization of *tospoviruses* in Thailand. Arch. Virol. 153(3): 571-7.

Cortes, I., IC. Livierators, A. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of *iris yellow spot virus*, a new and distinct *tospovirus* species. Phytopathology. 88: 1276-1282.

De Avila, A.C., P. de Haan, R. Kormelink, R. de O. Resende, R.W. Goldbach and D. Peters. 1993. Classification of *tospoviruses* based on the phylogeny of nucleocapsid gene sequences. J.Gen. Virol. 74: 153-159.

Elliot, R.M., M. Bouloy, C.H. Calisher, R. Goldbach, J.T. Moyer, S.T. Nichol, R. Pettersson, A. Plyusnin and C.S. Schmaljohn. 2000. Bunyaviridae. pp.617–621. In: van Regenmortal, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wicknewr (eds.). Virus Taxonomy, 7thReport of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA

German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. *Tospoviruses* : diagnosis, molecular biology,phylogeny, and vector relationships. Annu. Rev. Phytopathology. 30: 315-348.

Hassani-Mehraban, A., M. Botermans. J. Th. J. Verhoeven, E. Meekes , J. Saaijer, D. Peters,R. Goldbach and R. Kormelink. 2010. A distinct *tospovirus* causing necrotic streak on Alstroemeria sp. in Colombia. Arch. Virol. 155: 423–428.

Law, M.D., J. Speck and J.W. Moyer. 1991. Nucleotide sequence of the 30 non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct *tospovirus*. J. Gen. Virol. 72: 2597–2601.

Lin, Y.H., T.C. Chen, H.T. Hsu, F.L. Liu, F.H. Chu, C.C. Chen, Y.Z. Lin and S.D. Yeh. 2005. Serological comparison and molecular characterization for verification of *Calla lily chlorotic spot virus* as a new *tospovirus* species belonging to *Watermelon silver mottle virus* serogroup.Phytopathology 95: 1482–1488.

Mandal, B., A. S. Csinos, N. Martinez-Ochoa and H. R. Pappu. 2007. A rapid and efficient inoculation method for *Tomato spotted wilt tospovirus*. J. Virol. Methods 149: 195-198.

Mandal, B., A. S. Csinos,and A.K. Culbreath. 2006. Response of peanut, pepper, tobacco and tomato cultivars to two biologically distinct isolates *Tomato spotted wilt virus*. Plant Dis. 90: 1150-1155.

Mandal, B., A. S. H.R. Pappu and A.K. Culbreath. 2001. Factors Affecting Mechanical

Transmission of *Tomato spotted wilt virus* to Peanut (Arachis hypogaea). Plant Dis. 85: 1259-1263.

Mumford, R.A., I. Barker and K.R. Wood. 1996. An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 57: 109-115

Nichol, S.T., B.J. Beaty, R. M. Elliott, R. Goldbach, A .Plyusnin, C.S. Schmaljohn and R.B. Tesh. 2005. Bunyaviridae. In: Fauquet.,C.M , M.A.Mayo, J.Maniloff, U.Desselberger, L.A Ball. (eds) Virus Taxonomy, 8th Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press,

Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of Tospovirus Infecting Tomatoes in Thailand Revealed the Presence of Serogroup IV-*tospovirus* But Not Serogroup I-*tomato spotted wilt virus*. 92p. In The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.

Reddy, D.V.R., A.S. Ratana, M.R. Sudarshana, F. Poul and I.K. Kumar. 1992. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a *tospovirus* occurring in peanut (Arachia hypogaea L.) in India. Ann. Appl. Biol. 120: 279-286.

Yeh, S.D. and T.F. Chang. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of *watermelon silver mottle virus*, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. Phytophology. 85: 58-64.

Satyanarayana, T., S. Gowda, K. Lakshminarayana Reddy, S.E. Mitchell, W.O. Dawson and D.V.R. Reddy. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of serogroup V of *tospovirus* genus based on small(S) RNA sequence and organization. Arch. Virol. 143: 353-364.

ภาคผนวก

C

Figure 1. Symptoms of Tospovirus

A. *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) on chili

B. *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) on potato

C. *Tomato necrosis virus* (TNSV) on tomato

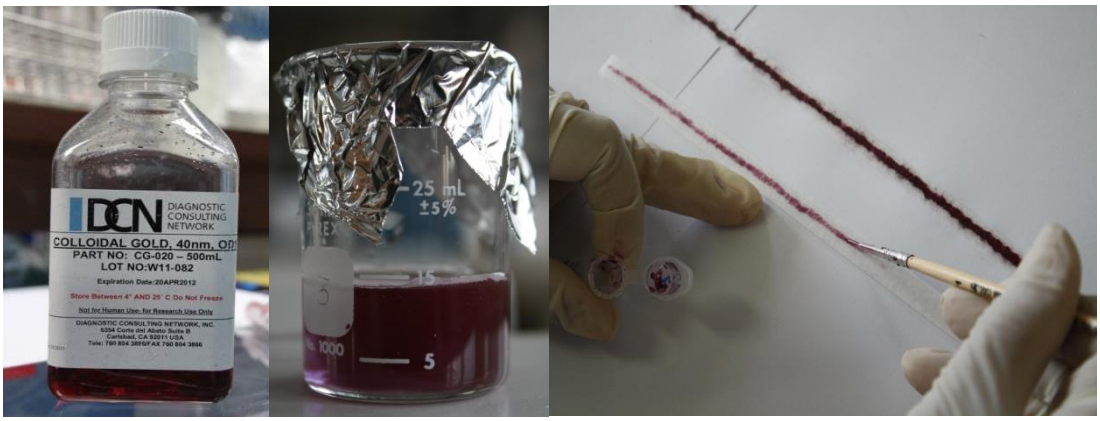

Figure 2. Collodal dold and preparing of gold conjugated IgG pad

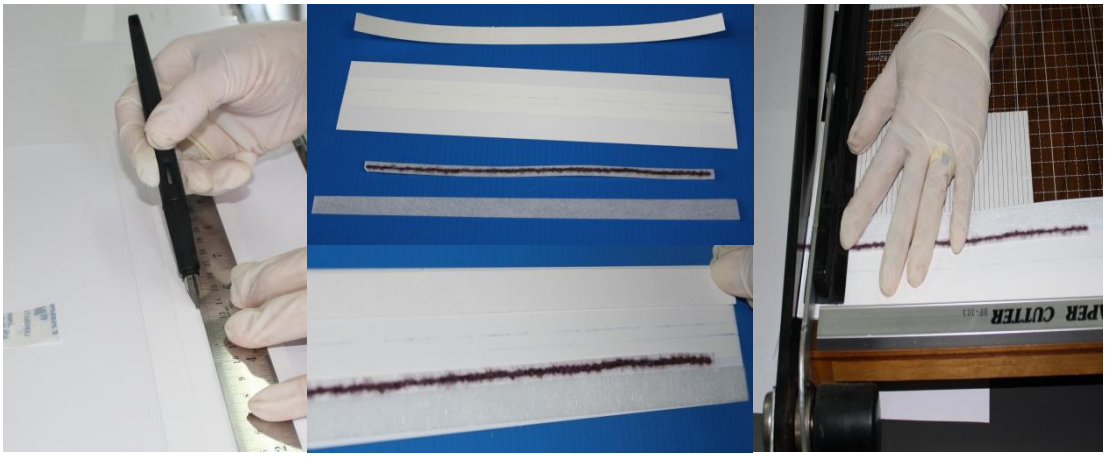

Figure 3. Assemble for GLIFT stripe

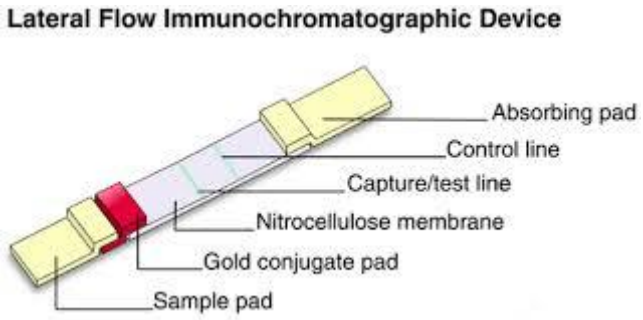

Figure 4. Diagram of GLIFT kit

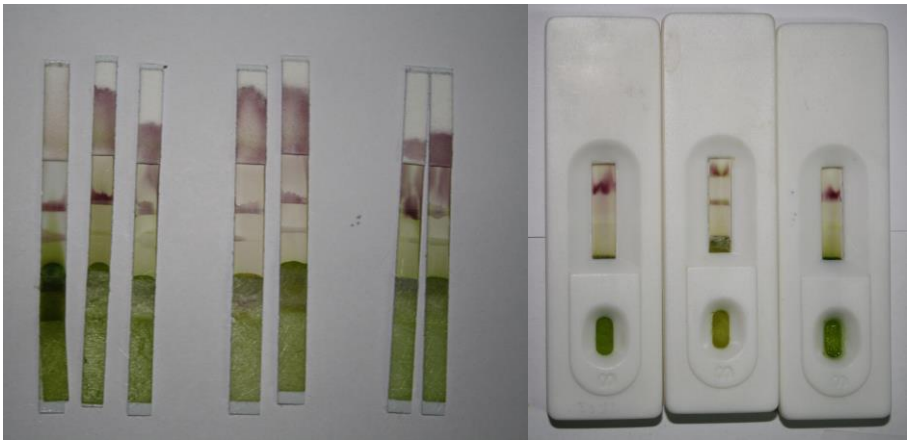

Figure 4 The result of *Tospovirus* detection on plantleaves by GLIFT Kit.
the result was not clear