1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

โครงการวิจัยย่อย ที่ 3 : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Development of GLIFT detection kit for PVY PVX PVS in Potato

4. คณะดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : สิทธิศักดิ์ แสไพศาล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : วิวัฒน์ ภานุอำไพ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

5. บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและการเคลื่อนย้ายของสารละลายบนแผ่น nitrocellulose membrane (lateral flow technique) ทำการทดสอบคัดเลือกเมมเบรน 4 ชนิด ที่เหมาะสมกับขนาดอนุภาคของเชื้อไวรัสและทอง 40 นาโนเมตร ที่ต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVY PVX และ PVS ที่ปรับให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 mg/ml ในการใช้ผลิต GLIFT kit นั้น พบว่าเมมเบรนชนิด S&S AE 99 มีความเหมาะสมสามารถใช้ได้กับเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยเลือกปฏิกิริยาที่ชัดเจนที่สุดพบว่า การใช้อนุภาคทองต่อเชื่อมกับ IgG ปริมาณ 2 μl/cm และใช้ IgG ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดปริมาณ 2 μl/cm ในการทำเส้น test line บนเมมเบรน โดยชุดทดสอบ GLIFT kit นี้ ทำการแยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด หลุมแรกใช้ตรวจสอบเชื้อ PVY และ PVS ส่วนอีกหลุมใช้ตรวจสอบเชื้อ PVX พบว่าเส้น test line ของทั้ง 3 เชื้อ และ control line สามารถตรวจสอบและเกิดปฏิกิริยาแถบสีชัดเจน

Detection kit for PVY PVX and PVS was developed by using a Gold Labeled IgG Flow Test (GLIFT) technique based on serology and nitrocellulose membranes (NCM) with lateral flow technique. Four types of nitrocellulose membranes were selected for suitable to the virus particle size and the particle of gold approximately size 40 nm which conjugated with IgG of PVY PVX and PVS at concentration of protein 1 mg / ml. In process of GLIFT kit production, it showed that the best reaction was found on nitrocellulose membrane S&S AE 99 which available with all three types of virus, including the gold particles were conjugated with IgG amount 2 μl /cm and amount of IgG of the virus particles at 2 μl /cm were used to produce test line membrane. GLIFT kit was separated into 2 wells, the virus particles of PVY and PVX were tested in the first wells and another wells were used testing only PVX virus, which

detected that the reaction of test line from three types of virus and control line showed clear and strip was dark.

6. คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปีและปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ฝ่ายวิชาการกักพืชทำหน้าที่กักตรวจศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน ที่ติดเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน แต่จากการที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจมีปริมาณมาก ทั้งการตรวจก่อนนำเข้าและมีการเฝ้าระวังหลังนำเข้าโดยออกสำรวจและเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งมีรายงานจากต่างประเทศที่ตรวจพบเชื้อไวรัสทั้ง PVY PVX และ PVS โดย Gray *et al.* (2003) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจนและ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *et al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ กิตติศักดิ์และคณะ (2532) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ รวดเร็วและแม่นยำ ดีกว่าอีก 2 วิธี Tsuda *at al.*(1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIPA) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี

Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา ซึ่งจากจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจมีปริมาณมากทำให้การตรวจมีปัญหาและทำให้ล่าช้า และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง หรือพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว ซึ่งจากเดิมได้พัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสอย่างง่ายของเชื้อไวรัส PVY บนหัวพันธุ์มันฝรั่งไปแล้วบนชุดตรวจสอบ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์มันฝรั่งได้ 3 ชนิด พร้อมกันในหนึ่งชุด คือ PVY PVX และ PVS จึงเป็นสิ่งที่ดีและมีความจำเป็น เพื่อให้สามารถตรวจได้มากขึ้น เร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อรองรับการนำเข้ามันฝรั่งที่มีปริมาณมากขึ้น

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์
    - เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
    - แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS
    - ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
    - สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และNitrocellulose membrane เป็นต้น
    - สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, Goat-anti mouse (GAM), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น
- วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS

สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ PVY PVX และ PVS โดยนำแอนติซีรัม PVY PVX และ PVS จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^{0}C ละลายตะกอน ด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

2. การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold)

เตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ เพื่อให้ได้อนุภาคทองที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร นำสารละลาย 1% ของ Gold chloride หรือ chloroauric acid ($HAuCl_4$, $AuCl_3$) จำนวน 1.2 ml ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 174 ml ที่ต้มเดือดแล้วนาน 2 นาที แล้วเติม Sodium citrate ลง 2 ml กวนต่อนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นให้เย็นลง นำไปวัด OD 530 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 แล้วปรับเป็น pH 7.3 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ที่เตรียมใหม่และใช้ทันที (Hampton *et al*., 1990) แล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของ PVY PVX และ PVS

3. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ PVY PVX และ PVS เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 20 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl/cm การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 μl/cm แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 μl/cm ส่วนการเตรียมเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) โดยการพ่น GAR ในอัตรา 1.0 μl/cm ลงบน NCM ในตำแหน่งห่างจาก test line ขึ้นไปด้านบนของ dip stick 0.5 cm แล้วนำไปอบแห้งเช่นเดียวกับ Conjugate Release pad (CRP) นาน 2 ชั่วโมง control line ทำไว้เพื่อให้ Gold labeling IgG ของ Rabbit IgG ละลายออกมาแล้วไหลไปจับกับ control line เพื่อเป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี

5. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ

PBS	pH 7.4
PBS-T	pH 7.4
TBS	pH 7.4
TBS-T	pH 7.4
extraction buffer 1	pH 8.5
extraction buffer 2	pH 7.5
general extraction buffer	pH 7.4 (Agdia)

6. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาวออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกย ด้านล่างของแผ่น

NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) ไว้ด้านบนของ NCM ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไป จนสุดปลายด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ

7. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้น ในอัตรา 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วนำ Lateral flow test strip จุ่มลงในน้ำคั้นในปริมาณที่เท่ากัน อ่านผลปฏิกิริยาเปรียบทียบกัน

- เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2557

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด gamma-globulin (IgG) ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ PVY PVX และ PVS เท่ากับ 6.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold ทำการทดสอบคุณภาพ Immunology ของ IgG พบว่าทั้งสามชนิดให้ปฏิกิริยาสีชมพูเข้ม สามารถนำไปใช้ผลิต GLIFT kit ได้ดี

2. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS ด้วยอนุภาคทอง ภายหลังจากการกวนกับ Sodium citrate จะได้สารละลายของ Colloidal Gold เป็นสี cherry red ซึ่งเป็นผลจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al*., 1990) ซึ่งจากผลการทดลองพ่น IgG ของ PVY PVX และ PVS ติดสลากอนุภาคทอง พบว่าการใช้ปริมาณ 2 μl/cm ให้ปฏิกิริยาของ test line และ control line ชัดเจนกว่าการใช้ IgG 1.5 μl/cm ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตรา 2 μl/cm โดยใช้ IgG ของ PVY PVX และ PVS ในอัตรา 2 μl/cm ทำเส้น test line และเลือกใช้เมมเบรน S&S AE 99 ซึ่งทำให้เส้น test line มีปฏิกิริยาดี (ตารางที่ 1) แต่สามารถใช้ S&S AE 100 ทดแทนได้ ทั้ง PVY PVX และ PVS เพราะเชื้อไวรัสทั้งสามมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน

3. การเตรียม test line และการเตรียม control line พบว่าการใช้ IgG ของ PVY PVX และ PVS spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 2.0 μl/cm ผลของปฏิกิริยาขึ้นแถบสีชัดเจนดี จากชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ที่เลือกใช้ชนิด S&S AE99 จากทั้งหมด 4 ชนิด และสามารถใช้ S&S AE 100 ทดแทนได้ ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไป

ทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีแม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG PVY PVX และ PVS ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line

4. การประกอบและตรวจสอบ ภายหลังจากประกอบชุดทดสอบและนำไปทำการทดสอบกับ positive เชื้อ PVX, PVS ซึ่งพบว่าเกิดปฏิกิริยา จากการใช้แผ่นเมมเบรน AE 99, spray ที่ 2.0 μl/cm เกิดแถบแบน PVY และ PVX ชัดเจน แต่ PVS นั้นจาง จึงได้ดำเนินการปรับแก้ไขทำการแยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด โดยหลุมแรกใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVYและ PVS เพราะเชื้อไวรัสทั้งสองมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถผลิตชุดตรวจไวรัสให้ทั้งสองเชื้อนี้อยู่บนเมมเบรนเดียวกันได้ ส่วนอีกหลุมใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVX เดี่ยวๆ แยกกันเพื่อหลีกเลี่ยงและแก้ปัญหาแถบแบนที่ไม่ชัดเมื่อนำมารวมกัน พบว่าในการดำเนินการทำ test line และ control line และนำมารวมกันเป็นชุดทดสอบ โดยแยกเป็น 2 หลุมนั้น สามารถตรวจได้ดีกว่าเดิม โดยจำนวนหยดนั้น ที่เหมาะสมยังคงเป็น 3 หยด เหมือนเดิม

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ Nitrocellulose membrane 4 ชนิด เพื่อเลือกขนาดที่เหมาะสม ที่เกิดปฏิกิริยา บนเส้น test line โดยใช้ IgG ของเชื้อ PVY PVX และ PVS 2.0 μl /cm และ IgG gold conjugate อัตรา 2 μl/cm

The line of	NCM S&S AE 100 Pore size 12 μm	NCM S&S AE 99 Pore size 8 μm	NCM millipore HC Pore size 10 μm	NCM immunopore FP Pore size 5 μm
Test line of PVY	++	+++	+	+
Test line of PVX	++	+++	++	++
Test line of PVS	++	+++	+	+
Control line	+++	+++	+++	+++

- = ไม่มีปฏิกิริยา , + = มีปฏิกิริยาสีชมพู, ++ = ปฏิกิริยาสีแดงอ่อน, +++ = ปฏิกิริยาสีแดงเข้ม

5. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS ของชุด GLIFT kit ตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่งหลังจากหยดตัวอย่างน้ำคั้นของพืชแล้ว รอเวลา 5 นาที จึงทำการอ่านผลของปฏิกิริยา พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS ได้ตั้งแต่อัตรา 1:10 ถึง 1:2,000 โดยอัตรา 1:10 ชัดเจนที่สุด ซึ่งจากการทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช พบว่าการใช้ extraction buffer 1 pH 8.5 ให้ผลดีที่สุดและไม่เกิดปฏิกิริยากับเส้น test line

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดลอง Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส PVY PVX และ PVS โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของสารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าว เป็นลักษณะของปฏิกิริยา

ลูกโซ่แบบแซนวิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง ซึ่งการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคมีด้วยกันหลายวิธี เช่นการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jesen and Gold, 1951) การตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Enyzme Linked-Immuno Sorbent Assay) (Clark and Adam,1977) และการตรวจสอบด้วยวิธีอณูชีววิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปในการวินิจฉัยโรคอาจต้องพิจารณาจากหลากหลายวิธีประกอบกัน และควรหาวิธีการใหม่ๆมาช่วยเพิ่มการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการที่แอนติบอดี้ที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน และการเคลื่อนย้ายของของเหลวในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือจากซ้ายไปขวาในลักษณะ lateral flow จะช่วยให้แอนติเจนหรือตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเคลื่อนย้ายเข้าหาแอนติบอดี (Haber and Knapen, 1989; Tseda *et al.*, 1992 and Tseda *et al.*, 1993) เมื่อเป็นชนิดเดียวกันย่อมเกิดปฏิกิริยาบน strip สังเกตเห็นแถบสี (band) ของอนุภาคและมีคุณสมบัติสามารถต่อเชื่อมกับแอนติซีรัมได้ ปฏิกิริยานี้ถูกกำหนดให้ไปเกิดขึ้นบน strip ชัดเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส และจากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS สรุปได้ว่าการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ดีแต่แถบแบนของสีไม่เข้ม ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากแอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS หรือขั้นตอนในการสกัด IgG ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ซึ่งสามารถระบุได้ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบเชื้อได้ และจากการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์ทั้งหมด 7 ชนิด พบว่า extraction buffer 1 pH 8.5 ให้ผลดีที่สุดและไม่เกิดปฏิกิริยากับเส้น test line และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ให้ ปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line ได้ชัดเจนดีคือ S&S AE 99 ซึ่งทำให้เส้น test line มีปฏิกิริยาดี แต่จากการทดสอบยังพบว่าสามารถใช้ S&S AE 100 ทดแทนได้ จากผลการทดลองพ่น IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่ติดสลากอนุภาคทอง พบว่าการใช้ปริมาณ 2 μl/cm ให้ปฏิกิริยาของ test line และ control line ดีที่สุด และจากการทดสอบได้เลือกใช้ IgG ของ PVY PVX และ PVS spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 2.0 μl/cm ผลของปฏิกิริยาขึ้นแถบสีได้ดี ส่วน control line นั้นทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line ในการประกอบได้แยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด โดยหลุมแรกใช้ในการทดสอบเชื้อ PVY PVS เนื่องจากเชื้อไวรัสทั้งสองมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถผลิตชุดตรวจไวรัสให้ทั้งสองเชื้อนี้อยู่บนเมมเบรนเดียวกันได้ ส่วนอีกหลุมใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVX เชื้อเดียว เพื่อหลีกเลี่ยงและแก้ปัญหาแถบแบนที่ไม่ชัดเมื่อนำมารวมกัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ช่วยให้สามารถนำวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVY, PVX และ PVS ที่แม่นยำนี้และรวดเร็ว ไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวได้ในเวลาไม่เกิน 10 นาที
- สามารถนำวิธีการตรวจเชื้อ PVY, PVX และ PVS นี้ ไปตรวจสอบจากหัวพันธุ์ได้ ช่วยย่นระยะเวลาในการตรวจโดยไม่ต้องรอให้หัวพันธุ์มันฝรั่งงอกยอดอ่อน

- กลุ่มวิจัยการกักกันศัตรูพืชหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบหัวพันธุ์เพื่อการอนุญาตนำเข้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 103-109.

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

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board.

Haber,S. and H.Knapen, 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero –diagnosis of plant viruses. Can. J. plant Pathol. 11:109-113.

Hampton, H., E. Ball, and S. De Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. 389 pp.

Hochleitner,K. and H. Kraus. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand . 180 pp.

Jesen, D.D. and A.H. Gold. 1951. A virus ringspot of odontoglossum orchid symptom, transmission, and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and K.Tomaru. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid mmunofilter paper assay (RIPA), plant Dis. 76:466-469

Tsuda,S., kameya-lwaki, M.,hanada, K.,Kouda, Y.,Hikata, M.,Fujisawa I and K.Tomaru. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. Ann. phythopath. Soc. Japan 59:200-203.