1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพันธุ์มะละกอ

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพันธุ์มะละกอ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การทดสอบความต้านทานต่อโรคจุดวงแหวนในมะละกอพันธุ์ต่างๆ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Screening for Papaya varieties to resistant to *Papaya ringspot virus*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

: นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

: นายธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

5. บทคัดย่อ

: เชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของมะละกอ ทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน สร้างความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ และขอนแก่น 1, 2 มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น ทำให้ปัญหาการเข้าทำความเสียหายของโรคด่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิมโดยนักปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ดีการตรวจคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ว่ามีคุณสมบัติในการต้านทานโรคได้หรือไม่เป็นสิ่งที่สำคัญที่นักไวรัสวิทยาความจำต้องเข้ามาร่วมประสานงานทำการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรค เพื่อให้มะละกอสายพันธุ์ต้านทานที่กรมวิชาการเกษตรผลิตได้มีคุณภาพและเข้าถึงเกษตรกรไทยได้ จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3,

KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12 พบว่าทั้ง 29 สายพันธุ์ไม่ต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* แต่พบว่ามี 4 พันธุ์ที่แสดงลักษณะการทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือพันธุ์ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 ซึ่งอาจมีศักยภาพนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอทนทานต่อโรคได้

6. คำนำ

: มะละกอ: (*Carica papaya* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ *Carecaceae* เป็น ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว 5-9 แฉก เกาะกลุ่มอยู่ด้านบนสุดของลำต้น ภายในก้านใบและใบมียางเหนียวสีขาวอยู่ มะละกอบางต้นอาจมีดอกเพียงเพศเดียว แต่บางต้นอาจมีดอกได้ทั้งสองเพศก็ได้ มะละกอเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ทั้งการทานผลไม้สด การนำมาทำอาหารคาว และการนำมาแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม ศัตรูพืชที่สำคัญอย่างหนึ่งของมะละกอคือเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ซึ่งทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน เชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ และขอนแก่น 1, 2 มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามะละกอตัดต่อสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นมาหลายสายพันธุ์มีช่วงความต้านทานที่แคบ คือแสดงความต้านทานได้เฉพาะเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมพืชแต่ไม่สามารถต้านทานเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันได้ ทำให้ปัญหาจากการเข้าทำความเสียหายของโรคด่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป

Papaya ringspot virus (PRSV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในมะละกอ ทำให้ใบมีอาการผิดรูป ด่างจุด มีอาการด่างจุดวงแหวนที่ผล ลำต้นและก้านใบแคระแกร็น ผลที่ได้มีขนาดและปริมาณน้อยลง และอาการจะทวีความรุนแรงในช่วงอากาศหนาว เชื้อ PRSV จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ *Potyviridae* สกุล *Potyvirus* ถ่ายทอดโรคผ่านทางแมลงพาหะ เพลี้ยอ่อนสองชนิด (*Myzus persicae* และ *Aphis gossypii*) โดยมีการถ่ายทอดโรคแบบ non-persistent ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกล แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทาง

เมล็ดพันธุ์ได้ เชื้อ PRSV สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ P strain และ W strain ซึ่งสายพันธุ์ P สามารถเข้าทำลายได้ทั้งมะละกอและพืชในกลุ่ม cucurbits ในขณะที่สายพันธุ์ W จะเข้าทำลายเฉพาะพืชในกลุ่ม cucurbits เท่านั้น เชื้อ PRSV เป็นสาเหตุปัญหาสำคัญกับทั้งการผลิตมะละกอและพืชในกลุ่ม cucurbits โดยเฉพาะในมะละกอจะทำให้ผลผลิตลดลงอย่างรุนแรง รวมถึงทำให้ระดับน้ำตาลในผลลดลงได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
6. ชุดตรวจสอบเชื้อ PRSV reagent set (Agdia)
7. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
8. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA
9. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

- วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลทางชีววิทยา วิธีการตรวจวินิจฉัย และการถ่ายทอดโรคของเชื้อ *Papaya ringspot virus* และวางแผนการทดลอง
2. เตรียมโรงเรือน วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ รวมถึงการจัดเตรียมไพรเมอร์และแอนติซีรัมสำหรับใช้ตรวจสอบโรค
3. สำรวจและเก็บรวบรวมไอโซเลตของเชื้อ *Papaya ringspot virus* จากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง และปลูกเชื้อบนมะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการทดลอง
4. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเก็บรวบรวมและพัฒนาพันธุ์ มาเพาะเพื่อทดสอบความต้านทานโรคในโรงเรือนทดลอง โดยเพาะเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเก็บรวบรวมไว้จำนวนทั้งสิ้น 31 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และเบอร์ 12 โดยใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ

5. ทดสอบความต้านทานต่อโรคด่างจุดวงแหวนโดยการปลูกเชื้อวิธีกล ประมาณ 2 – 6 สัปดาห์ จดลักษณะอาการและความรุนแรง เปรียบเทียบกับมะละกอพันธุ์แขกดำ ในกรณีที่พันธุ์ใดมีการแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน จะทำการปลูกเชื้อซ้ำ
6. ตรวจสอบเชื้อ PRSV บนมะละกอด้วยวิธี ELISA (Agdia) ในกรณีที่ปลูกเชื้อซ้ำ 2 ครั้งแล้วพืชยังไม่แสดงอาการผิดปกติ และอาจยืนยันผลซ้ำด้วยเทคนิค RT-PCR
7. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ และจัดทำรายงาน

- เวลาและสถานที่ ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2555 รวม 2 ปี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง : จากการทดสอบมะละกอทั้ง 31 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12 โดยใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ พบว่า

- 21 พันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, HO, HOS no.1, HOS no.2, ท่าพระ 3, สีทอง, KD-Si, KK 80, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, KN (SR), SK 001, SK 002 และ เบอร์ 12 แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนและรุนแรงโดยมีอาการใบด่างและหงิกม้วนผิดรูป (ภาพที่ 1)
- 3 พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมออสเตรเลีย, ครั่ง และฮาวาย แสดงอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป (ภาพที่ 2)
- พันธุ์ HOS no.3 แสดงอาการใบหดลดรูปชัดเจนแต่ไม่มีอาการด่างร่วม
- 4 พันธุ์ ได้แก่ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 จะแสดงอาการโรคที่ไม่รุนแรง มีความทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 3)
- ส่วนพันธุ์ SKLD และ HN เมล็ดที่ทดสอบไม่งอก ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อได้

และเมื่อนำใบจากพันธุ์มะละกอที่แสดงอาการของโรคไม่ชัดเจนมาตรวจสอบเชื้อ PRSV พบว่าให้ผลเป็นบวก จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ <u>ไม่มีความต้านทาน</u>ต่อโรคด่างวงแหวนจุดมะละกอ แต่พันธุ์ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 มี<u>ความทนทาน</u>ต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการใบด่างและรูปอย่างรุนแรง เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ 3 ลักษณะอาการใบด่างที่ไม่รุนแรง และไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความต้านทานโรคด่างวงแหวนของมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ

ลำดับ	สายพันธุ์	ลักษณะอาการ/ความรุนแรงโรค	ความต้านทานโรค
1	แขกดำ (control)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
2	KDDNS	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
3	KDLS1	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
4	KDLS2	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
5	KNLS1	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
6	LN	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
7	MA	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
8	Maradol	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
9	MIR	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
10	SEW 58	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
11	SKLD	เมล็ดไม่งอก	-
12	Taiwan	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
13	ครั่ง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
14	ท่าพระ 3	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
15	ปากช่อง	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
16	ลูกผสมออสเตรเลีย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
17	สีทอง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างเหลือง	ไม่ต้านทานโรค
18	ฮาวาย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
19	HN	เมล็ดไม่งอก	-
20	HO	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
21	HOS no.1	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
22	HOS no.2	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
23	HOS no.3	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
24	KD-Si	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
25	KK 80	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
26	KN (SR)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
27	MI	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
28	SK 001	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
29	SK 002	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
30	SK 003	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
31	SK 004	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
32	เบอร์ 12	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และเบอร์ 12 ไม่ต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* โดยที่พันธุ์ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 มีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ : ได้ข้อมูลว่ามะละกอทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบไม่มีพันธุ์ใดมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* ซึ่งทำให้ไม่สามารถนำมะละกอทั้ง 29 พันธุ์นี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานได้ แต่อย่างไรก็ดีพบว่ามีมะละกอ 4 พันธุ์คือ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 mujมีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่นซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ในอนาคต

11. ปัญหาและอุปสรรค : เนื่องจากในช่วงกลางปี 2554 เกิดปัญหาหนูระบาดกัดเข้าทำลายโรงเรือนมุ้งที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ (ชั้น 5 ตึกสิทธิพร) ซึ่งเกิดจากการปรับปรุงชั้น 4 ตึกสิทธิพร และมีการถอนเก็บเศษวัสดุไม้ ประตู ฝา ฯลฯ ไว้บริเวณชั้น 4 และ 5 ของตึกสิทธิพร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของหนู ทำให้หนูเข้ากัดกินเมล็ดพันธุ์และทำลายต้นกล้ามะละกอสายพันธุ์ที่ทดสอบจะหมดทำให้ต้องปลูกซ้ำใหม่หลายครั้ง ทำให้การทดลองดังกล่าวได้ผลล่าช้า รวมถึงปัญหาอุปสรรคอันเนื่องมาจากสภาพอากาศฝนตกหนัก รวมถึงอุทกภัยน้ำท่วมหนักในกรุงเทพ ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการทำการทดลองด้วย นอกจากนี้เมล็ดมะละกอบางสายพันธุ์ (SKLD และ HN) ไม่งอกและไม่สามารถขอเมล็ดเพิ่มใหม่ได้

12. เอกสารอ้างอิง

: CAB *international*. 2007. **Crop Protection Compendium 2003 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Conover, R.A. 1964. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 77: 440-444.

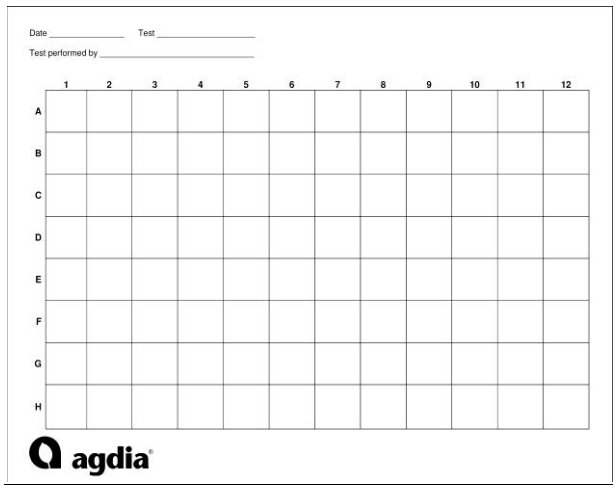
Conover, R.A. 1964. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 77:444-448.

Tripathi, S., J.Y. Suzuki, S.A. Ferreira and D. Gonsalves. 2008. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Mol Plant Pathol**. 9(3): 269 –280.

13. ภาคผนวก

: ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Papaya ringspot virus* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA

1. ลงรายละเอียดของตัวอย่างและ control ต่าง ๆ บนแผนผังการตรวจ (loading diagram) (ภาพที่ 4)
2. เติม “Capture Antibody” (เจือจาง Capture Antibody ด้วย “Carbonate Coating buffer” ความเข้มข้น 1X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (1:200) ผสมให้เข้ากัน) ลงใน ELISA plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ well
3. บ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4°C ข้ามคืน
4. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว
5. บดตัวอย่างพืชด้วย “General Extract buffer” ในอัตราส่วน 1:10 (weight : volume General Extract buffer)
6. เติมตัวอย่างพืช positive และ negative control ปริมาตร 100 □ ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หรือที่ 4°C ข้ามคืน
7. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว
8. เตรียม “Enzyme Conjugate” (เจือจาง Enzyme Conjugate ด้วย “ECI buffer” ความเข้มข้น 1X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (1:200) ก่อนใช้งาน 10 นาที) จากนั้นเติม enzyme conjugate ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate
9. บ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง
10. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว
11. เติมสารละลาย “PNP substrate buffer” ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ 37°C ในที่มืดนาน 30 - 60 นาที
12. ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยดูสีเปรียบเทียบระหว่าง control ทั้ง 3 คือ buffer, negative และ positive กับตัวอย่าง โดยปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกจะเกิดสีเหลืองใสชัดเจน ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นลบจะไม่เปลี่ยนสี หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ 405 nm จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3M sodium hydroxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อ well



ภาพที่ 4 ELISA loading diagram (agdia)

: Buffer ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย

1. Carbonate Coating buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium carbonate (anhydrous)	1.59 กรัม
- Sodium bicarbonate	2.93 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 9.6 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

2. General Extract buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium sulfite (anhydrous)	1.3 กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	2.0 กรัม
- Tween-20	20.0 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ลงใน Buffer powder ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและเติม Tween-20 ลงไปผสมจนเข้ากัน เก็บที่ 4 °C

3. 1X ECI buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Bovine serum albumin (BSA)	2.0 กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

4. PBST buffer (1X) (Wash Buffer) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium chloride	8.0 กรัม
- Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 กรัม
- Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 กรัม
- Potassium chloride	0.2 กรัม
- Tween-20	0.5 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

5. PNP substrate buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Magnesium chloride hexahydrate	0.1 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- Diethanolamine	97.0 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 9.8 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C
ก่อนใช้งาน ละลาย PNP tablet 1 เม็ด ด้วย PNP solution (1X) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในภาชนะทึบแสง โดยเตรียมก่อนการใช้งาน 15 นาที

6. Stop reaction solution: 3 M sodium hydroxide