

ผลงานวิจัยที่กลุ่มเป้าหมายนำไปใช้ประโยชน์ ปีงบประมาณ 2554

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป GLIFT kit สำหรับตรวจสอบไวรัส

จัดทำโดย

กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารบัญ

หลักการและเหตุผล

วัตถุประสงค์และเป้าหมายของโครงการ

วิธีดำเนินการ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

กลุ่มเป้าหมายที่นำไปใช้ประโยชน์ ปี 2554

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป GLIFT kit สำหรับตรวจสอบไวรัส
กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพิษ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสของพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ได้ถูกพัฒนาและผลิตขึ้นด้วยเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ขั้นตอนการผลิตใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและการไหลของสารละลายในเมมเบรน โดยศึกษาคัดเลือกเมมเบรนที่เหมาะสมกับขนาดอนุภาคของเชื้อไวรัส และทดสอบการต่อเชื่อมของอนุภาคทองกับ IgG รวมทั้งทดสอบและปรับความเข้มข้นของ IgG ที่นำมาใช้แต่ละชนิด จากนั้นเลือกสัดส่วนที่ให้ปฏิกิริยาชัดเจนที่สุด ซึ่งโดยรวมเชื้อไวรัสสามารถเลือกใช้เมมเบรน S&S AE 99 และ S&S AE 100 ได้ ปริมาณการใช้อนุภาคทองต่อเชื่อมกับ IgG อยู่ระหว่าง 1-2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาของสีที่ชัดเจน และการใช้ IgG ของแต่ละชนิดอยู่ในระหว่าง 1-1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ซึ่ง IgG ของเชื้อต้องผ่านการทดสอบคุณภาพแล้วว่ามีความเข้มข้นของ IgG ที่เพียงพอ ไม่น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีคุณสมบัติทาง Immunology ที่เฉพาะเจาะจงและดีเพียงพอในการนำมาผลิตเป็นชุดตรวจสอบแบบ GLIFT kit โดยทดสอบด้วยวิธี NCM-ELISA กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพิษ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้นำเทคโนโลยีการผลิต GLIFT kit ของเชื้อไวรัสไปใช้ประโยชน์ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้และมันฝรั่งขึ้นใช้เองในประเทศ เป็นผลิตภัณฑ์ในผลผลิตที่ 2 เพื่อให้บริษัท เกษตรกร นักวิจัยและผู้เกี่ยวข้องได้ใช้ชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้นเองในประเทศ สามารถทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ

คำหลัก: ไวรัส, กล้วยไม้, มันฝรั่ง, GLIFT kit

หลักการและเหตุผล

จากปัญหาและข้อจำกัดหลายๆประการของ ELISA KIT ที่มีอยู่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงเกิดแนวคิดที่จะพัฒนาการตรวจสอบไวรัส ให้มีความสะดวกในการใช้ที่ดีกว่ามาใช้ทดแทน และควรทำเป็นชุดสำเร็จที่ตรวจเฉพาะตัวอย่างเดียวและใช้ง่าย มีเพียงขั้นตอนเดียว วิเคราะห์ผลได้ง่าย โดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญ ใช้ง่ายทำนองเดียวกับการตรวจโรคเบาหวานที่คนไข้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ด้วยตนเอง หรือเช่นเดียวกับการตรวจการตั้งครรภ์ ที่ผู้หญิงทุกคนสามารถไปหาซื้อชุดตรวจการตั้งครรภ์จากร้านขายยา มาตรวจปัสสาวะ และอ่านผลได้ด้วยตนเอง ภายใน เวลา 5-10 นาที ซึ่งแนวคิดนี้จะเป็นแนวทางที่ทำให้เกษตรกรสามารถเข้าถึงเทคโนโลยีการตรวจสอบโรคไวรัสได้ด้วยตนเอง และได้ใช้ชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้นเองในประเทศไทยที่นำไปใช้ได้สะดวก ในราคาไม่แพง โดยอาศัยวิธีการเตรียมเชื้อไวรัส วิธีการผลิตแอนติบอดี และขั้นตอนการสกัด IgG จากโครงการผลิต ELISA KIT มาใช้เพื่อศึกษาทดลองเทคนิค Lateral Flow Test มาใช้ตรวจไวรัสของพืช Lateral Flow Test เป็นเทคโนโลยีที่ใช้กันมากในทางการแพทย์ การปศุสัตว์ และประมง มีการใช้เทคนิคนี้ตรวจวินิจฉัยโรคในคนอย่างรวดเร็วหลายโรค ได้แก่ การตรวจ Hepatitis C virus (HCV), Hepatitis B virus (HBV) tuberculosis, Human Immunodeficiency Virus (HIV) , ชุดตรวจการตกไข่เพื่อการผสมเทียม, ชุดตรวจโรคไวรัสในกุ้ง และตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) อย่างรวดเร็ว เป็นต้น (สุดาและคณะ, 2547, พิมลวรรณ, 2547) ซึ่งรูปแบบของอุปกรณ์ชุดตรวจดังกล่าวที่มีใช้อยู่ในท้องตลาดทั่วไป เป็นชุดตรวจสำเร็จรูป ใน 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบของ dipstick ใช้จุ่มลงในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ สารละลายจึงเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแผ่น NCM ในแนวตั้ง ปฏิกริยาเกิดขึ้นด้านบนของ dipstick ส่วนอีกรูปแบบ อุปกรณ์ตัวตรวจบรรจุอยู่ในตลับ ใช้วิธีหยดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจลงในตลับ ปฏิกริยาของสารละลายเคลื่อนที่ในแนวนอน (Nillawan, 2001) วิธี Lateral flow Test นี้เป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วและวิเคราะห์ผลง่าย ถ้าเกิดสีตรงแถบของปฏิกริยาตัวตรวจสอบ (positive check หรือ Test line) อ่านปฏิกริยาเป็นบวก เป็นการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างนั้น ถ้าไม่เกิดสีอ่านปฏิกริยาเป็นลบ แสดงว่าไม่มีเชื้อในตัวอย่างที่ตรวจ เป็นการตรวจสอบแยกแต่ละตัวอย่าง ชุดตรวจมีความสมบูรณ์ในชุด ซึ่งมีทั้งปฏิกริยาตัวตรวจสอบ (positive check, Test line) และ ปฏิกริยาควบคุม (control reaction, control line) (Anonymous. 2002) ชุดตรวจสอบชุดนี้ได้ให้ชื่อเรียกตามวิธีการที่พัฒนาปรับมาใช้ คือ Gold labeling IgG Flow Technique หรือ GLIFT การตรวจวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว เป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมโรคอย่างได้ผลและมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็วและทันต่อเหตุการณ์ สามารถใช้ตรวจสอบได้เองสำหรับผู้ใช้ทุกระดับ รวมทั้งราคาต้องไม่แพง เชื้อไวรัสเป็นศัตรูพืชที่ยากต่อการวินิจฉัยและจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีการง่ายๆ จำเป็นต้องใช้เครื่องมือ ห้องปฏิบัติการและเวลาในการตรวจวินิจฉัย เกิดความล่าช้าไม่ทันต่อเหตุการณ์ จากการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสโดยวิธี Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ทำให้การตรวจสอบไวรัสมีความสะดวกขึ้นมากและอ่านผลได้ในเวลาเพียง 5 นาที ทำ

ให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคไวรัสได้ทันทั่วทั้งที่ ในประเทศไทยมีการผลิตชุดตรวจสอบอย่างง่าย ด้านโรคของคนและสัตว์ ได้แก่ โรคไข้สมองอักเสบ โรคไข้หวัดนก เป็นต้น (ทิพวรรณ, 2547; Ninlawan, 2002) ดังนั้นกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงพัฒนาและนำวิธี GLIFT ไปปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ นับเป็นวิวัฒนาการของการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชใหม่ใหม่ของกรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานที่ริเริ่มและพัฒนาการตรวจสอบโรคพืชโดย GLIFT kit เป็นรายแรกในประเทศไทย (สุรภีและคณะ, 2547; กิตติศักดิ์และคณะ, 2549) ที่สามารถผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ได้ หากมีการฝึกอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่ภาคเอกชนให้สามารถผลิตชุดตรวจสอบนี้ขึ้นจำหน่ายเป็นการค้าในประเทศ จะทำให้ผลิตได้ตรงตามความต้องการของผู้ใช้ในประเทศ ทำให้เกษตรกรสามารถหาซื้อใช้ได้สะดวก ราคาไม่แพง เป็นผลดีต่อการป้องกันโรคไวรัสของพืชได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งนอกจากใช้ GLIFT เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคแล้ว ยังใช้ในการตรวจสอบเพื่อออกใบรับรองปลอดโรคไวรัสในสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก ใช้ตรวจเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสในโครงการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเพื่อการพยากรณ์โรคไวรัสที่สำคัญของพืชไรเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ถั่วเหลือง

วัตถุประสงค์และเป้าหมายของโครงการ

1. เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในก๊วยโมและมันฝรั่ง
2. เพื่อตรวจสอบโรคไวรัสได้อย่างถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว แม่นยำและราคาไม่แพง
3. ทำให้สามารถดำเนินการป้องกันโรคได้อย่างรวดเร็วและทันต่อเหตุการณ์และสามารถใช้ตรวจสอบได้เองสำหรับผู้ใช้ทุกระดับ
4. เพื่อแนะนำและเผยแพร่ให้เกษตรกรบริษัทและหน่วยงานราชการได้มีชุดตรวจสอบไวรัสใช้ก่อนขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการผลิตพันธุ์ที่มีคุณภาพปลอดโรคไวรัสที่สะดวก ทันสมัยและรวดเร็วมากขึ้น
5. เพื่อเป็นต้นแบบในการผลิตชุดตรวจสอบโรคไวรัสของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบเชื้อโรคพืชที่เกิดจากเชื้อชนิดอื่นๆ ได้ด้วย

วิธีดำเนินงาน

1. วิจัยการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส

1.1 การผลิต GLIFT kit ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV และ ORSV

ได้ดำเนินการทดลองทั้ง CyMV และ ORSV พร้อมกันเพื่อสร้างชุดตรวจสอบ 1 ชุดที่สามารถตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด แบ่งการทดลองเป็น 9 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของ CyMV และ ORSV

การสกัด IgG ของ CyMV และ ORSV ดำเนินการโดยนำแอนติซีรัมแต่ละชนิดเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา แอนติซีรัมต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:9 ผสมให้เข้ากัน ค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวลงไปจำนวนเท่ากับปริมาณสารละลายแอนติซีรัมที่เจือจาง กวนเบาๆ ขณะเติม บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ ห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge) ละลายตะกอนที่ได้ด้วยเครื่องเท่าของ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ในเครื่องเท่าของ PBS 1 ลิตร ดำเนินการ 3 ครั้ง แต่ละครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280 (สุรภีและคณะ, 2532(1); สุรภีและคณะ, 2532(2))

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CyMV และ ORSV

ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ใช้ Nitro cellulose membrane รองรับปฏิกิริยา (NCM-ELISA) โดยเจือจาง IgG ของเชื้อแต่ละชนิดในอัตรา 1:500 ดำเนินการทดสอบโดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. บดตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคจากเชื้อ CyMV และ ORSV ให้ละเอียดในถุงพลาสติก แยกชนิดกันด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืชต่อบัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบกล้วยไม้ปกติเช่นเดียวกัน
2. นำแผ่น NCM วางแช่ลงใน Tris buffer saline pH 7.5 เป็นเวลา 5 นาที คีบแผ่น NCM ขึ้นวางลงบนกระดาษกรองอีกชุดที่แห้ง รีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง
3. หยดบัฟเฟอร์ 1 หยด (หรือ 25 ไมโครลิตร) ในช่องแรก หยดน้ำคั้นพืชปกติ 2 ช่อง และน้ำคั้นพืชเป็นโรค 2 ช่อง หยดตัวอย่าง CyMV และ ORSV แยกกันคนละแผ่น
4. นำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้ว แช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (TBS 20 มิลลิลิตร + 0.4 กรัม non fat milk + 0.8 มิลลิลิตร triton X-100) แช่เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. คีบแผ่น NCM ตัวอย่าง CyMV และ ORSV แช่ลงในส่วนผสม IgG ของ CyMV และ ORSV แยกกันตามลำดับ IgG ทั้ง 2 ชนิดเจือจางเป็น 1:500 ใน buffer TBS+2% non fat milk 5 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
6. ล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 20 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
7. นำแผ่น NCM ตัวอย่างทั้ง 2 แผ่น แช่ลงใน Goat anti-rabbit IgG-conjugate alkaline phosphatase (SIGMA A-7778) ใน TBS + 2% non fat milk 5 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที
8. เทออกแล้วล้างเช่นเดียวกับ ข้อ 7
9. เทส่วนผสมของสารละลาย substrate ลงใน NCM เขย่าเบาๆ รอแสดงผลประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสีชมพูแล้วเทสารละลาย substrate ที่ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง เตรียมจากสารประกอบ HAuCl_4 เพื่อให้ได้อนุภาคทอง ที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร โดยนำสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของ gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง นำไปวัดค่า OD ที่ 530 ปรับให้ได้เท่ากับ 0.5 (Hampton *et al.*, 1990) นำสารละลายทองแขวนลอยไปใช้ในการติดสลาก (conjugate หรือ labeling) IgG ของ CyMV และ ORSV ต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การติดสลาก IgG ของ CyMV และ ORSV ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ CyMV และ ORSV จำนวนอย่างละ 2 มิลลิลิตร เติมนลงในสารละลายทองแขวนลอย ที่เตรียมไว้จำนวน 200 มิลลิลิตร กวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 ไมโครลิตร กวนเบาๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน IgG ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 นำไปพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) แยกกันในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคัดเลือกลักษณะของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CyMV และ ORSV บนเส้น test line

ในการวิจัยต่อยอดการผลิตชุด GLIFT kit ของ CyMV และ ORSV ได้ทดลองใช้เมมเบรน 4 ชนิด คือ

1. เมมเบรน S&S AE 100 ขนาด 12 ไมโครเมตร
2. เมมเบรน S&S AE 99 ขนาด 8 ไมโครเมตร
3. เมมเบรน Millipore HC ขนาด 10 ไมโครเมตร
4. เมมเบรน Immunopore FP ขนาด 5 ไมโครเมตร

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ CyMV และ ORSV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 3 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร เส้นทั้ง 3 เส้นถูกพ่นพร้อม กันและจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบว่าการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบมีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

ขั้นตอนที่ 6 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ชุด GLIFT kit ตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้

การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ GLIFT kit ในการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้นของกล้วยไม้พันธุ์อนิเดียม ในอัตรา 1:10 1:100 1:200 1:500 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วหยดทดสอบกับชุด GLIFT kit ตลับละ 3 หยด เท่าๆ กัน อ่านผลหลังหยดตัวอย่างแล้วประมาณ 5 นาที

ขั้นตอนที่ 7 ปรับปรุงและออกแบบของบรรจุ GLIFT kit ชุดตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้

การปรับปรุงและออกแบบการบรรจุของชุด GLIFT ตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้ เพื่อเก็บรักษาชุด GLIFT ให้ปลอดจากความชื้นและต้องมีความสะดวกในการใช้ สามารถเก็บรักษาชุด GLIFT ได้นาน สะดวกพกพา ออกแบบบนซองให้มีป้ายชื่อ ชนิดของเชื้อ และพื้นที่ใช้ตรวจสอบ ติดสลากวิธีการใช้ วันผลิตและหมดอายุ สลากเป็นสากลเหมาะสมในเชิงพาณิชย์โดยบรรจุ GLIFT ตลับเดี่ยวมีขนาดความกว้าง X ยาว เท่ากับ 5 X 11 เซนติเมตร ปิดรอบช่องทั้ง 4 ด้าน รอยซีลมีขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ภายในซองบรรจุ GLIFT kit 1 ตลับ ซิลิกาเจล 1 ซอง หลอดดูดสารละลายขนาด 0.5 มิลลิลิตร 1 หลอดและถุงพลาสติกแบบซิปล็อคขนาดเล็ก 1 ใบ รวม 4 อย่าง

ขั้นตอนที่ 8 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้ extraction buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชด้วยวิธี NCM-ELISA

ขั้นตอนที่ 9 การทดสอบอายุการเก็บและใช้งานของชุดตรวจสอบ GLIFT kit

การทดสอบอายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ GLIFT kit ของกล้วยไม้ โดยเก็บชุดตรวจสอบ เก็บรักษาไว้ที่สภาพแห้งที่อุณหภูมิห้องระหว่าง 25-30 °C และนำทุกชุดออกมาทดสอบหลังเก็บไว้นาน 6, 9, 12, 18 และ 24 เดือน ครั้งละ 10 ตลับ

1.2 การผลิต GLIFT kit ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส PVX และ PVY

ได้ดำเนินการทดลองทั้งเชื้อ PVX และ PVY พร้อมกันเพื่อสร้างชุดตรวจสอบ 1 ชุดที่สามารถตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด แบ่งการทดลองเป็น 5 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด IgG และทดสอบคุณภาพของ IgG ของเชื้อ PVX และ PVY

การสกัด IgG และปรับความเข้มข้นของ IgG ของ PVX และ PVY แยกกัน ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่ใช้ในการแยก IgG ของ CyMV และ ORSV ในข้อ 1.1

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม IgG ของ PVX และ PVY ติดสลาگونูภาคทองและทดสอบอัตราการใช้ที่เหมาะสม

นำ IgG ของ PVX และ PVY ที่สกัดได้มาต่อเชื่อมกับอนุภาคทอง เช่นเดียวกับข้อ 1.1

ขั้นตอนที่ 3 ทดลองเพื่อคัดเลือกเมมเบรนที่เหมาะสมกับการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อ PVX และ PVY

นำเมมเบรนทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ทดสอบในข้อ 1.1 มาทดลองทำเส้น test line ด้วย IgG ของ PVX และ PVY ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และทำเส้น control line ด้วย GAR ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร โดยให้เส้นทั้ง 3 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร อยู่กึ่งกลางของเมมเบรน อ่านผลเมื่อทำการหยดตัวอย่างของเชื้อ PVX และ PVY 3 หยดๆ ลงในตลับทดสอบ

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVX และ PVY ของชุด GLIFT kit ตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่ง

การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ GLIFT kit ในการตรวจสอบเชื้อ PVX และ PVY โดยการเจือจางน้ำคั้นของใบมันฝรั่งเป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ เริ่มตั้งแต่อัตรา 1:10 1:100 1:200 1:500 1:1,000 และ 1:2,000

ขั้นตอนที่ 5 การออกแบบของบรรจุและผลิตบริการ

พิมพ์ซองชุด GLIFT kit ของมันฝรั่งมีรูปแบบคล้ายกับชุดตรวจไวรัสของกล้วยไม้ ที่มีชื่อเชื้อไวรัส PVX & PVY ชื่อพืชมันฝรั่ง วิธีการใช้และอ่านผล มีตรากรมวิชาการเกษตร แต่เลือกใช้สีน้ำเงิน พิมพ์เป็น 2 ภาษา ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้ extraction buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชด้วยวิธี NCM-ELISA เช่นเดียวกับในข้อ 1.1

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลวิจัยการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส

1.1 ผลการผลิต GLIFT kit ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV และ ORSV

ผลขั้นตอนที่ 1 และ 2 การสกัดและทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CyMV และ ORSV ได้ IgG ของ CyMV และ ORSV วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ OD²⁸⁰ เท่ากับ 11.2 และ 8.6 ตามลำดับ ปรับค่า IgG ของทั้ง CyMV และ ORSV ให้ได้เท่ากับ 1.4 ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำ IgG ของ CyMV และ ORSV ที่ปรับ OD²⁸⁰ เท่ากับ 1.4 ไปตรวจสอบกับตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคได้ผลของปฏิกิริยาที่ติดสีชมพูเข้มบนแผ่น NCM สามารถนำไปใช้ผลิตชุด GLIFT kit ได้

ผลขั้นตอนที่ 3 และ 4 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold) และการติดสลากร IgG ของ CyMV และ ORSV ด้วยอนุภาคทองได้สารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง จากนั้นปรับให้ได้ค่า OD 540 เท่ากับ 0.5 เมื่อทวนสารละลายทองแขวนลอยที่มีอนุภาคขนาด 40 นาโนเมตร ผสมกับ IgG ของ CyMV และ ORSV ซึ่งเป็นการติดสลากรอนุภาคทองกับ IgG นำมาพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว

แล้วอบแห้งที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จึงได้แผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ CyMV และ ORSV ติดสลาگونภาคทองที่แห้งพร้อมนำไปประกอบเป็นชุด GLIFT kit

ผลขั้นตอนที่ 5 ทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CyMV และ ORSV บนเส้น test line จากการทดสอบเมมเบรนทั้ง 4 ชนิด ในการตรวจสอบ CyMV และ ORSV พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีในเมมเบรนที่มีขนาดของช่อง 8 และ 10 ไมโครเมตร (S&S AE 99 และ Millipore HC) ดังนั้นในการผลิตเป็นเชิงพาณิชย์จึงเลือกใช้ เมมเบรน S&S AE 99 ให้ปฏิกิริยาของ test line ได้ดีทั้งสองเส้นทำให้การปรับปรุงให้ชุดตรวจไวรัสของกล้วยไม้สามารถตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV ได้ดีทั้งสองเชื่อบนตลับเดียวกันอย่างสมบูรณ์

ผลขั้นตอนที่ 6 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ชุด GLIFT kit จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาไวรัสในน้ำคั้นที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าชุด GLIFT kit สามารถตรวจพบไวรัสในทุกความเข้มข้นของน้ำคั้น และให้สีแดงของปฏิกิริยาชัดเจนดี ยกเว้นอัตรา 1:2,000 จึงสรุปว่าชุด GLIFT kit มีความไวในการตรวจ CyMV และ ORSV ในน้ำคั้นตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์ออนซิเดียม ที่เจือจางตั้งแต่ 1:10-1:1,000

ผลขั้นตอนที่ 7 การปรับปรุงและออกแบบซองบรรจุ GLIFT kit ชุดตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้ พบว่าการบรรจุซองเดี่ยวใช้สะดวกและป้องกันความชื้นได้และการบรรจุตลับเดี่ยวมีความสะดวกและมีวัสดุพร้อมให้อยู่ในซองเรียบร้อย พกพาสะดวก พร้อมกันนี้ได้ออกแบบซองที่มีรายละเอียดของชื่อเชื้อที่ใช้ตรวจสอบ วิธีการใช้ วันที่ผลิต และวันหมดอายุ และตราของกรมวิชาการเกษตร โดยพิมพ์เป็น 2 ภาษา ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ รวมทั้งออกแบบกล่องบรรจุชุดตรวจสอบ 20 ซอง และ 100 ซอง เป็นตรากรมวิชาการเกษตรเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์

ผลขั้นตอนที่ 8 การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช พบว่าการใช้ extraction buffer ของ NCM-ELISA ในการเตรียมตัวอย่างพืชได้ดีเพราะไม่ทำให้เกิดสีเขียวบน NCM ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สะอาดอ่านผลได้ชัดเจน

ผลขั้นตอนที่ 9 การทดสอบอายุการเก็บและใช้งานของชุด GLIFT พบว่าที่อายุการเก็บนาน 24 เดือนของทุกชุดยังมีประสิทธิภาพการใช้งานได้ดี 100 เปอร์เซ็นต์

1.2 ผลการผลิต GLIFT kit ชุดตรวจเชื้อไวรัส PVX และ PVY

ผลขั้นตอนที่ 1 การสกัด IgG และทดสอบคุณภาพของ IgG ของเชื้อ PVX และ PVY วัดค่า IgG ของ PVX และ PVY ที่สกัดได้มีค่า OD 280 เท่ากับ 11.3 และ 9.4 ตามลำดับ นำมาปรับความเข้มข้นของ IgG ให้ได้ค่าเป็น 1.4 จากการทดสอบคุณภาพ Immunology ของ IgG พบว่าทั้งสองชนิดให้ปฏิกิริยาสีชมพูเข้ม สามารถนำไปใช้ผลิต GLIFT kit ได้ดี

ผลขั้นตอนที่ 2 และ 3 การทดสอบอัตราการใช้ IgG ของ PVX และ PVY ติดสลาگونภาคทองและชนิดเมมเบรนที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบ IgG ของ PVX และ PVY ติดสลาگونภาคทอง พบว่าการใช้ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ให้ปฏิกิริยาของ test line และ control line ชัดเจนกว่าการใช้ IgG 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตรา 2 ไมโครลิตร ต่อ

เซนติเมตร โดยใช้ IgG ของ PVX และ PVY ในอัตรา 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ทำเส้น test line และเลือกใช้เมมเบรน S&S AE 99 ซึ่งทำให้เส้น test line มีปฏิกิริยา ดีมากและสามารถใช้ S&S AE 100 ทดแทนได้ ให้ผลในระดับดี ทั้ง PVX และ PVY เพราะเชื้อไวรัสทั้งสองมีคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถผลิตชุดตรวจไวรัสให้ทั้งสองเชื้อนี้อยู่บนตลับเดียวกันได้

ผลขั้นตอนที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVX และ PVY ของชุด GLIFT kit ตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่งหลังจากหยดตัวอย่างน้ำคั้นของพืชแล้ว 5 นาที และอ่านผลของปฏิกิริยา พบว่าสามารถตรวจสอบ เชื้อ PVX และ PVY ได้ตั้งแต่อัตรา 1:10 ถึง 1:2,000 และอัตรา 1:10 และ 1:100 ชัดเจนที่สุด

ผลขั้นตอนที่ 5 การออกแบบของบรรจุและผลิตบริการพิมพ์ของชุด GLIFT kit ของมันฝรั่งมีรูปแบบคล้ายกับชุดตรวจไวรัสของกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัส PVX & PVY ชื่อพืชมันฝรั่ง วิธีการใช้และอ่านผลมีตรรกะการวิชาการเกษตรแต่เลือกใช้สีน้ำเงินพิมพ์เป็น 2 ภาษา ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

ผลขั้นตอนที่ 6 การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช พบว่าการใช้ extraction buffer ของ NCM-ELISA ในการเตรียมตัวอย่างพืชได้ดีเพราะไม่ทำให้เกิดสีเขียวบน NCM ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสะอาดอ่านผลได้ชัดเจน เช่นเดียวกับ GLIFT kit ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV และ ORSV

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองผลิต GLIFT kit ชุดตรวจเชื้อไวรัส CyMV และ ORSV และการผลิต GLIFT kit ชุดตรวจเชื้อไวรัส PVX และ PVY เพื่อตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้และมันฝรั่ง ได้เลือกใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของสารมีสีในตัว ได้แก่ Colloidal Gold หรือ Latex particles ที่สามารถเลือกขนาดที่เหมาะสมมาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีแดงส้มและสีชมพูดังกล่าว โดย นำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG เมื่อถูกละลายออกไปจะไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาจับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างกล้วยไม้และมันฝรั่งที่เป็นโรค แล้วไหลผ่านไปบนแผ่น NCM ชนิดที่มี pore size ขนาดที่เหมาะสม คือขนาด 8 μm ไหลไปพบกับ แถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่น NCM โดยห่างจากปลายด้านล่างของแผ่น NCM ประมาณ 3.5 cm นั้น IgG จึงทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสที่ถูกพาขึ้นมากับ Gold labeling IgG เกิดเป็นลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิช คือ (Gold labeling IgG)-(Virus)-(IgG) ที่จับติดบนแผ่น NCM ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้ เมื่อเกิดปฏิกิริยามาจับกันมากขึ้น จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีแดงอมส้มของอนุภาคทอง การผลิต GLIFT kit ชุดตรวจเชื้อไวรัส CyMV และ ORSV และการผลิต GLIFT kit ชุดตรวจเชื้อไวรัส PVX และ PVY เพื่อตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้และมันฝรั่ง จะใช้ชื่อเรียกตามวิธีการที่พัฒนาปรับมาคือ Gold Labeling IgG Flow Technique หรือใช้ตัวย่อได้เป็น GLIFT ซึ่ง GLIFT สามารถผลิตเป็น KIT ในเชิงพาณิชย์ได้และใช้สะดวกมากกว่า ELISA KIT ซึ่งชุดตรวจสอบนี้ใช้เป็นเครื่องมือ

ภาคสนามที่เกษตรกรสามารถหาซื้อชุด GLIFT KIT ไปใช้ตรวจไวรัสของกล้วยไม้และมันฝรั่งได้ในราคาไม่แพง ใช้ง่ายสะดวก อ่านผลได้ใน 3-5 นาที เกษตรกรสามารถตัดสินใจคัดเลือกต้นพันธุ์ปลอดโรคได้ทันที เป็นการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในกล้วยไม้และมันฝรั่งและใช้ตรวจเพื่อการออกใบรับรองปลอดไวรัสให้กับเกษตรกรที่ส่งออกไปยังต่างประเทศได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้นและยังเป็นการช่วยยกระดับคุณภาพของวงการกล้วยไม้และมันฝรั่งของประเทศไทยให้มีทั้งเทคโนโลยีด้านการผลิตและการรักษาที่สมบูรณ์แบบยิ่งขึ้น

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ทำให้ได้ชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในกล้วยไม้และมันฝรั่ง โดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test ที่สามารถตรวจเชื้อไวรัสในกล้วยไม้และมันฝรั่งได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งราคาถูกและเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจที่สามารถตรวจได้เร็วขึ้น โดยใช้เวลาเพียง 5 นาที และยังใช้ในการตรวจสอบเพื่อออกใบรับรองปลอดโรคไวรัสในสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก ใช้ตรวจเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสในโครงการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเพื่อการพยากรณ์โรคไวรัสที่สำคัญทำให้สามารถควบคุมการระบาดของโรคไวรัสได้ทันทั่วทั้งพื้นที่และเป็นข้อมูลด้านวิชาการในการตรวจสอบศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช และเป็นต้นแบบในการผลิตชุดตรวจสอบโรคไวรัสของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ ต่อไปและยังเป็นแนวทางนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบเชื้อโรคพืชที่เกิดจากเชื้อชนิดอื่นๆ

กลุ่มเป้าหมายที่นำไปใช้ประโยชน์ ปี 2554

ได้ติดตามการนำไปใช้ประโยชน์ระหว่างเดือนตุลาคม-มิถุนายน ๒๕๕๔ กับบริษัท ห้างหุ้นส่วนจำกัด หน่วยงานราชการ รวมทั้งเกษตรกรที่ได้นำชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในกล้วยไม้และมันฝรั่ง ไปใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส (กล้วยไม้: CyMV และ ORSV, มันฝรั่ง: PVY และ PVX) นั้น โดยชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ มีการนำไปใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมากจน ไม่เพียงพอต่อการใช้และได้จำหน่ายชุดตรวจสอบหมดไปในเดือนมิถุนายน ปี ๒๕๕๔ (บริษัทไพฑูรย์สพลี, บริษัทสุภาออร์คิด และ หจก.ประยูรออร์คิด มีการนำไปใช้ในปริมาณมากสุด ในปี ๒๕๕๔) เป็นการตรวจกล้วยไม้นำเข้าก่อนนำต้นพันธุ์ไปขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในมันฝรั่งนั้นได้นำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านงานวิจัยและการผลิตหัวพันธุ์ปลอดโรค (ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิต อ.ฝาง จ.เชียงใหม่) โดยนำไปใช้ในการตรวจสอบมันฝรั่ง ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความสำคัญและประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้นกล้วยไม้และมันฝรั่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกู สุรภี กิริติยะอังกู และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato virus Y ในมันฝรั่ง. วารสารวิชาการเกษตร. ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 หน้า 168-177.
- ทิพวรรณ บุญทอง. 2547. การควบคุมคุณภาพของชุดการติดเชื้อเอชไอวี “ Bioline HIV 1/2”. Thai: Medical Technologist Letter; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย. ปีที่ 15 :เมษายน-มิถุนายน 2547. ISSN 0858-0251.
- สุรภี กิริติยะอังกู กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกู และนวลจันทร์ ดีมา. 2532(1). การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของกล้วยไม้หวายลูกผสมและสาวน้อยเต๋นระบำ. รายงานประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา.
- สุรภี กิริติยะอังกู กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกู และนวลจันทร์ ดีมา. 2532(2). การตรวจCymbidium mosaic virus ด้วยวิธี DOT-ELISA และ DAS-ELISA. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 7(1-3):38-43.
- สุดา ลุยศิริโรจนกุล สนทนา ศิริตันติกร และระวีวรรณ ชันหยก. 2547. การตรวจวินิจฉัยใช้หัวदनกของห้องปฏิบัติการ. Thai : Medical Technologist Letter; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย. ปีที่ 15: กรกฎาคม-กันยายน 2547. ISSN 0858-0251.
- สุรภี กิริติยะอังกู ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กิริติยะอังกู. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้. วารสารโรคพืช ปีที่ 18 เล่มที่ 1-2 : 1-14. ISSN-0125-5878.
- Anonymous. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.
- Ninlawan Pichayayothin. 2001. PacificBiotech Co.,Ltd. (Thailand). Website:www.pacific-biotech.com

ภาคผนวก



ชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในกล้วยไม้ (กล้วยไม้: CyMV และ ORSV)



ชุดตรวจสอบไวรัสสำเร็จรูป (GLIFT kit) ในมันฝรั่ง (มันฝรั่ง: PVY และ PVX)

แบบสำรวจการติดตามการนำไปใช้ประโยชน์
สำหรับเกษตรกร

ลำดับที่	ชื่อ - สกุล	เลขที่บัตรประชาชน	ที่อยู่
1.	ภาควิชาพันธุศาสตร์ มก.		คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน
2.	นายจิระวัฒน์ วิวัฒน์		49/268 ม.4 ต. ตลาดขวัญ อ.เมือง จ. นนทบุรี
3.	นางอัญชลี กระจำง		135/9 หมู่ 2 ต.หนองกบ อ.บ้านโป่ง จ. ราชบุรี
4.	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่		ตู่ ปณ. 54 หางดง อ.หางดง จ.เชียงใหม่ 50230
5.	นางสาวกาญจนา ศรีลา		19/2 หมู่ 10 ต.บึงคำพร้อย อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี
6.	มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง		1875/1 ถ.พระราม 4 แขวงลุมพินี เขต ปทุมวัน กรุงเทพฯ
7.	นางผ่องพรรณ โพธิ์แก้ว		151/6 ถ. บ้านดอนตูม อ.บ้านโป่ง จ. ราชบุรี 70110
8.	รศ.ดร.พัฒนา ศรีฟ้า อินเนอร์		ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน

**แบบสำรวจการติดตามการนำไปใช้ประโยชน์
สำหรับบริษัท**

ลำดับที่	ชื่อบริษัท	ที่อยู่	ลายเซ็น
1.	บริษัทไพฑูรย์สพลี	93/57 อาคารเดอะโมเดิร์นกรุป ถ.แจ้งวัฒนะ ต.คลองเกลือ อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120	
2.	บริษัทนพพร ออร์คิดส์	85/2 หมู่ 4 ต.ศรีมหาโพธิ์ อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม 73120	
3.	ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูรออร์คิดส์	9 หมู่ 11 ถ.รังสิต- นครนายก ซอยวัดโปรยฝน ต.หนองสามวัง อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	
4.	บริษัทลำพญาฟลาวเวอร์ จำกัด	60 หมู่ 2 ต.ลำพญา อ.บางเลน จ.นครปฐม	
5.	บริษัทสุภาออร์คิดส์อินเตอร์แลบ จำกัด	111 หมู่ 10 ถ.พุทธมณฑล สาย 4 ต.อ้อมน้อย อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 74130	
6.	บริษัทเทพวงศ์ ออร์คิดส์ จำกัด	436 ถ.เชียงใหม่- ลำปาง ต.หนองป่าครั่ง อ.เมือง จ.เชียงใหม่	
7.	บริษัทไทยซัง ทรอปิคอลฟลάνท์ เนชเชอรี่ จำกัด	62/63 ซ. อมรพันธ์ 4 ถ.วิภาวดีรังสิต แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900	
8.	บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซ็นเตอร์ จำกัด	34/19 หมู่ 7 ถ.เพชรเกษม แขวงหนองค้างพลู เขตหนองแขม กรุงเทพฯ 10160	
9.	บริษัทดอยสะเก็ด ออร์คิดส์ จำกัด	88/3 หมู่ 4 ต.แม่โป่ง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	