พัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus*

Development of Lateral flow test strip for detecting *Cucumber mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[2/] กาญจนา วาระวิชะนี[1/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) มาปรับใช้ในการตรวจเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เพื่อการวินิจฉัยโรค ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวก และอ่านผลได้รวดเร็วภายใน 5-10 นาที เร็วกว่าวิธี ELISA ที่ใช้เวลามากกว่า 4-5 ชั่วโมง GLIFT ได้ถูกพัฒนาโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ซึ่งที่ให้ผลดีที่สุดคือ ด้วยการเลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ CMV ที่มีความเข้มข้นในปริมาณ 1 mg/ml ให้สีของปฏิกิริยาแดงเข้ม และให้สีของปฏิกิริยาที่ test line แดงเข้มชัดเจนเมื่อใช้ gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl /cm มีความเหมาะสมดีกว่าปริมาณ 1.0 และ 1.5 μl /cm สำหรับการใช้ IgG ของ CMV ในปริมาณ 1.0 μl /cm ทำ test line ให้ผลของปฏิกิริยาดี สามารถใช้ goat-anti rabbit IgG ทำ control line ได้ จากการเปรียบเทียบชนิดของ แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีในไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 100 และ Unisart CN 140 และการเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด พบว่าบัฟเฟอร์ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาเกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือ เกิดปฏิกิริยาบนเส้นtest line หรือปฏิกิริยาข้ามนั้นคือบัฟเฟอร์ TBS-T และ PBS-T และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่า การใช้ TBS-T ให้ผลดีที่สุด

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-03-54

คำนำ

ไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 60 วงศ์ ทั้งในธัญพืช ไม้เนื้อแข็ง ไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชไร่ และพืชผัก โดยเฉพาะพืชผัก พบว่า เชื้อ CMV มีผลกระทบต่อผลผลิตของพืชผักหลากหลายชนิด เช่น แตงกวา ฟักทอง ฟักเขียว แคนตาลูป มะเขือเทศ พริก ถั่วลันเตา และแครอท เป็นต้น พริกที่เป็นโรคใบด่างจากการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ผลผลิตลดลง 30-75% ทั้งนี้ขึ้นกับอายุของพริกขณะได้รับเชื้อ CMV (เครือพันธุ์และวันเพ็ญ, 2545; Sulyo *et al*., 1995; Anonymous, 2004)

ไวรัสชนิดนี้มีอนุภาคเป็นรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุลคิวคูโมไวรัส (*Cucumovirus*) สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกลและมีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดเป็นพาหะนำโรค เพลี้ยอ่อนที่สำคัญ ได้แก่ เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) รูปแบบในการถ่ายทอดโรคเป็นแบบ non-persistent (Kaper & Waterworth, 1981) ลักษณะอาการอาการของโรคบนพืชอาศัยมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ CMV และสายพันธุ์พืช แต่อาการโดยทั่วไป พบว่า ใบพืชแสดงอาการด่าง บางครั้งพบจุดแผลตายเฉพาะแห่งสีน้ำตาลบนใบ ใบเสียรูป บิดเบี้ยว อาจลดขนาด ใบเรียวเล็กเป็นเส้น เนื่องจากเนื้อใบไม่เจริญเติบโตขณะที่เส้นใบเจริญเป็นปกติ ใบร่วงหลุดได้ง่าย ดอกร่วง ผลมีขนาดเล็กและปริมาณลดลง อาจมีอาการด่าง บิดเบี้ยว และผิวขรุขระบนผล ต้นเตี้ยแคระแกรน นอกจากนี้ยังถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ ทำให้โรคแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว (เครือพันธุ์และวันเพ็ญ, 2545; Brunt *et al*., 1995; Berke *et al*., 2003)

วิธีการตรวจสอบเชื้อ CMV ได้มีการพัฒนาจากชีววิธี โดยการปลูกเชื้อและสังเกตอาการที่เกิดขึ้น แต่ใช้ระยะเวลานานนับสัปดาห์ ต่อมาได้มีการทดสอบโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา เช่น ELISA, dot immuno binding assay (DIBA) แต่ระยะเวลาการตรวจสอบอย่างน้อย 1 วัน ทำให้มีการพัฒนาการตรวจสอบที่สามารถใช้ระยะเวลาสั้น 5-10 นาที แต่ยังมีความแม่นยำสูง ได้แก่ เทคนิค lateral flow test strip (Kim, S. and Je-Kyun Park. 2004) ซึ่งช่วยให้การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV ได้รวดเร็ว อันจะส่งผลให้ดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็ว

โดย Tsuda *et al*. (1992 & 1993) ได้ศึกษาวิธีการตรวจสอบไวรัสพืชแบบ lateral flow test โดยใช้อนุภาคของ latex bead เป็นตัวติดฉลาก แต่ปฏิกิริยาไม่ค่อยคงที่และมีราคาแพง ในประเทศไทยได้มีการผลิตชุดตรวจเชื้อ HIV ยาบ้า และไข้หวัดนก ด้วยเทคนิค lateral flow test โดยใช้อนุภาคของทองเป็นตัวติดฉลาก ซึ่งสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ (ทิพวรรณ , 2547; สุดาและคณะ, 2547; Ninlawan, 2001) รวมทั้ง สุรภีและคณะ (2551) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส 11 ชนิด และแบคทีเรีย 2 strain โดยวิธี Gold labeled IgG Flow Technique (GLIFT) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ กล้วยไม้ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง พืชผักและยาสูบ เสาวรส มะละกอ ปทุมมา และพืชตระกูลแตง โดยการนำแอนติซีรัมของเชื้อแต่ละชนิดมาสกัด IgG และปรับความเข้มข้นเป็น 1 มก./มล. และทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อเชื้อด้วยเทคนิค DIBA จากนั้นนำมาติกฉลากด้วยอนุภาคทอง ขนาด 40 นาโนเมตร ทดสอบอัตราที่ใช้กับชนิดของ

membrane ขั้นตอนสุดท้ายประกอบเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับพืช ใช้เวลาในการตรวจ ประมาณ 5 นาที และชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

ดังนั้นเพื่อการตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus* ในพืชเศรษฐกิจ ให้มีความแม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดเวลา ทันต่อสถานการณ์และระบาดของโรค จึงได้ทำการศึกษาผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV)
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
  เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, Goat-anti mouse (GAM), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น

วิธีการ

1. **การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) ใบด่างแตง**

นำแอนติซีรัม polyclonal antibody ของกลุ่มงานไวรัสวิทยาที่ได้ผลผลิตไว้ใช้ในงานวิจัยมาทำการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของเชื้อ CMV โดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตรา 1:9 ผสมให้เข้ากันแล้วเติม ammonium sulphate ที่อิ่มตัวในปริมาตรเท่ากัน กวนเบาๆ แล้วบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บตะกอนและละลายใน ½ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ใน ½ PBS 1 ลิตร 3 ครั้ง แต่ละครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280 (สุรภีและคณะ, 2532 ก.; สุรภีและคณะ, 2532 ข.)

2. **การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ CMV ในการตรวจเชื้อไวรัสใบด่างแตงด้วยเทคนิค Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)**

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN_3, 0.2% Na_2SO_3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้

ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N^+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ CMV ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยา ประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจน แล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

3. 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 CMV

4. การติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ CMV จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอยที่เตรียมไว้จำนวน 200 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 20 มิลลิลิตร กวน

เบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน IgG ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540

การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ CMV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 μl/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ CMV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

5. การเตรียม test line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ CMV ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 2.0 และ 2.5 μl/cm

6. การเตรียม control line

ทำเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) ด้วยการพ่น 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

7. การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line

ได้ทดลองใช้เมมเบรน 7 ชนิด คือ

1. Unisart CN 95
2. AE 100
3. AE 99
4. AE 98 Fast
5. Millipore HF 13504
6. Prisma 60
7. Unisart CN 140

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/เซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ CMV พ่นเป็น test line

ในปริมาณ 2 μl/เซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดง เกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

8. 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 8.6

extraction buffer 2 pH 7.5

general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)

9. 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

10. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CMV

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ CMV 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

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) ใบด่างแตง

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ CMV เท่ากับ 8.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold

2. การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ CMV ในการตรวจเชื้อไวรัสใบด่างแตงด้วยเทคนิค Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

ผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี NCM-ELISA กับตัวอย่างพืชใบด่าง CMV ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ CMV ให้สีแดงเข้มและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ดังนั้นสามารถที่จะนำ IgG ของ CMV นี้ไปดำเนินการและขั้นตอนในการเตรียมทำชุดตรวจสอบต่อไป

ภาพที่ 1 ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ CMV

3. การติดสลาก IgG ของ CMV 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) ผลจากการทดลองหยอด Gold labeling IgG ในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 และ 2.5 μl/cm พบว่าทุกอัตราให้ปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line ที่ดีและชัดเจนใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นที่ 2.5 μl/cm จะมีปริมาณของ Gold labeling IgG มากเกินไป และจะไหลกลับลงมารบกวน control line และ test line ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงใช้อัตรา 1.5, 2.0 μl/cm ในการตรวจเชื้อ CMV ซึ่ง control line ได้ใช้ Gold labeling IgG ของ rabbit IgG ในปริมาณ 1.0 μl เหมาะสมดีแล้ว ให้ปฏิกิริยาที่ชัดเจน

4. การเตรียม Test line และ การเตรียม control line

พบว่าการใช้ IgG ของ CMV spray เป็น Test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 1 μl/ cm ให้ผลของสีคมชัด ดีเท่ากับปริมาณ 1.5 μl/cm จึงเลือกใช้ 1.0 μl/cm เป็นการประหยัด IgG ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/ซม. เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาไม่เข้มเนื่องจากการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line เพราะแผ่น conjugate Release pad ของ IgG CMV ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง Test line และ Control line จึงทำให้ปฏิกิริยามีสีที่อ่อนลง

5. การทดสอบคัดเลือกชนิดของแผ่น ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line

NCM / line	Unisart CN 95	AE 100	AE 99	AE 98 Fast	Millipore HF 13504	Prisma 60	Unisart CN 140
CMV	-	+++	+	+	+	+	+++
Control line	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด ในการตรวจสอบ CMV พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีในไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 100 และ Unisart CN 140 ทำให้มีความเข้มสีที่เกิดขึ้นบนชุดตรวจสอบ ที่ทำปฏิกิริยาบนเส้น control line เกิดได้เร็วที่สุด ซึ่งแตกต่างจากไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิดอื่นที่นำมาทดสอบอย่างเห็นได้ชัดดังนั้นในการผลิตเป็นชุดตรวจสอบตรวจสอบจึงเลือกใช้ เมมเบรน AE 100 และ Unisart CN 140 ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต่อไป

6. การเปรียบเทียบสารละลายบัพเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

การเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ จำนวน 7 ชนิด พบว่า บัพเฟอร์ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line หรือปฏิกิริยาข้ามนั้นคือบัพเฟอร์ TBS-T และ PBS-T และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่า การใช้ TBS-T ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ PBS-T ซึ่งไม่ทำให้เกิดสีเขียวบน NCM ทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สะอาดอ่านผลได้ชัดเจน ส่วนเมื่อใช้บัพเฟอร์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบนั้น จะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างพืชและมี background สีเข้มและสกปรก

7. การประกอบและตรวจสอบ

การเตรียม Gold labeled IgG ของ MAb-Poty1 เป็นการต่อเชื่อม IgG เข้ากับสารละลาย Colloidal Gold โดยทดสอบอัตราส่วนของ IgG ต่อ Colloidal Gold ที่เหมาะสม ได้เป็นสารละลาย Gold conjugated IgG นำไปพ่นลงบน แผ่นวัสดุที่ดูดซับเฉพาะต้องทดสอบปริมาณที่ พอเหมาะให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน อบให้แห้งในตู้อบ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเตรียม Test line และ Control line ทำเส้น Control line ด้วย Goat anti-rabbit (GAR) และ Test line ด้วย IgG บนแผ่น NCM ในอัตราที่ทดสอบแล้วว่าเหมาะสมเกิดปฏิกิริยาเร็วและชัดเจน แล้วอบให้แห้งก่อนนำไปประกอบ โดยทำการประกอบด้วยการนำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้วมาลอกกระดาษปิดกาวออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้ว เกยด้านล่างของแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยประมาณ 1 มิลลิเมตร จะปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี หลังจากนั้นวางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper)ไว้ด้านบนของ NCM ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไปจนสุดปลายด้านบนของ Backing และตัดออกเป็น strip กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ

8. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CMV

ในการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาไวรัส CMV ในน้ำคั้นที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ กัน พบว่าชุด Lateral flow test strip สามารถตรวจพบไวรัสได้ ที่ความเข้มข้นของน้ำคั้น ที่เจือจางตั้งแต่ 1:10-1:1,000 และให้สีแดงของปฏิกิริยาชัดเจนดี จึงสรุปว่าชุด Lateral flow test strip มีความไวในการตรวจ CMV ในน้ำคั้นตัวอย่าง และอัตรา 1:10 และ 1:100 ชัดเจนที่สุด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการทดลองผลิต Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส CMV ได้เลือกใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของสารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่น NCM AE 100 ไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่น NCM ดังกล่าว โดยห่างจากปลายด้านล่างของแผ่น NCM นั้น เกิดเป็นลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิช ที่จับติดบนแผ่น NCM ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้ จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง

การศึกษาชุด Lateral flow test strip ตรวจสอบเชื้อ CMV นี้มีความสะดวกมากกว่า NCM-ELISA สามารถใช้เป็นเครื่องมือภาคสนาม ที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ตรวจไวรัส CMV ได้

สะดวก ราคาไม่แพงและใช้ง่าย เพียงบดตัวอย่างพืชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในถุงพลาสติก จุ่ม Lateral flow test strip ลงในน้ำคั้นพืช อ่านผลได้ใน 3-5 นาที (Fig. 8) ทำให้เกษตรกรสามารถทราบได้ทันทีว่าเป็นดรคหรือไม่ เป็นการควบคุมการแพร่ระบาดโรคไวรัสได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น

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 วิธีการนี้มีหลักการที่แอนตีบอดี้ที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน 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 *Cucumber mosaic virus* (CMV)

และจากการใช้แอนติบอดีชนิดโพลีโคลนอลมาทำการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบนี้ ปฏิกิริยาที่ได้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจมากนัก และอาจสามารถพัฒนาปรับปรุงได้ด้วยการทดสอบใช้แอนติบอดีชนิด โมโนโคลนอลมาทำการทดสอบ อาจจะให้ผลเป็นที่น่าพอใจมากขึ้นไปอีกระดับหนึ่งจึงควรทำการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และวันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

ทิพวรรณ บุญกอง. 2547. การควบคุมคุณภาพของชุดการติดเชื้อเอชไอวี ‘Biotine HIV1/2”,Thai : Medical Technologist Letteer; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย. ปีที่ 15: เมษายน-มิถุนายน 2547, ISSN 858-0251.

สุดา ลุยศิริโรจนกุล สนทนา ศิริตันติกร และระวิวรรณ ขันหยก. 2547. การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดนกของห้องปฏิบัติการ. Thai : Medical Technologist Letteer; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย. ปีที่ 15: กรกฎาคม- กันยายน 2547, ISSN 858-0251.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532 ก. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของกล้วยไม้หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532 ข. การตรวจ Cymbidium mosaic virus ด้วยวิธี DOT-ELISA และ DAS-ELISA. *วารสารวิชาการเกษตร*.7(1-3):38-43.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ “ กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

Anonymous. 2004. Cucumber Mosaic Virus. 2 p. Available at : www.avrdc.org/pdf/pepper/CMV.pdf

Berke, T.G., L.L. Black, R.A. Morris, N.S. Talekar and J.F. Wang. 2003. Suggested Cultural Practices for Sweet Pepper. 5 p. Available at: http://www.avrdc.org.tw/LC/pepper/swtpepper.pdf

Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson. 1995. Viruses of Plants: Discriptions and Lists from the VIDE Database. University Press, Cambridge, U.K. 1484 p.

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.

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.

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

Kaper, J.M. and H.E. Waterworth. 1981. Chapter 11: Cucumoviruses. Pages 257-332. In : Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. E. Kurstak. ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 943 pp.

Kim, S. and Je-Kyun Park. 2004. Development of a Test Strip Reader for Lateral Flow Membrane-based Immunochromatographic Assay. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 127-131.

Ninlawan Pichayayothin. 2001. Pacific Biotech Co. Ltd. (Thailand). Website www. Pacific-biotech.com

Sulyo, Y., A.S. Duriat, N. Gunaeni and E. Korilna. 1995. Confirmation of potentially important pepper viruses in Indonesia. pp. 174-180. *In*: Proceeding of the AVNET-II Midterm Workshop AVRDC, ADB and PCARRD, February 21-25, 1995. PCARD, Los Banos,Lagana,Philippines. Asia Vegetable Research and Development Center 327 p.

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

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., Fujisawa I and Tomaru, K. 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.