การผลิตชุดตรวจสอบ Potato virus A สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

Production of Potato virus A Detection kit by technique Gold labeling IgG flow test

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] นางชลธิชา รักใคร่[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสกัดและวัดความเข้มข้น IgG ของ PVA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ OD^{280} พบว่าค่าที่ได้น้อยกว่า 11.2 มีความเข้มข้นของโปรตีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ทำการติดสลาก IgG ของ PVA ด้วยอนุภาคทองได้สารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง จากนั้นปรับให้ได้ค่า OD 540 เท่ากับ 0.5 เมื่อกวนสารละลายทองแขวนลอยที่มีอนุภาคขนาด 40 นาโนเมตร ผสมกับ IgG ของ PVA นั้น ซึ่งเป็นการติดสลากอนุภาคทองกับ IgG นำมาพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว แล้วอบแห้งที่ 37 $^{\circ}C$ นาน 2 ชั่วโมง และได้นำแผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ PVA แล้วนั้น ไปทดสอบกับเมมเบรนชนิดต่างๆ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่ไม่ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งคุณภาพของแอนติซีรัม ที่นำมาสกัด IgG ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียมแอนติซีรัมและ IgG ใหม่ ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-01-54

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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน จากที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจจึงมีปริมาณมากทำให้การตรวจมีปัญหา ล่าช้า ซึ่งเกิดจากปริมาณตัวอย่างมีมาก และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง รวมทั้งจากต้นที่ปลูกอยู่ในแปลงของเกษตรกร และเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว จึงมีส่วนสำคัญมาก เพื่อเป็นการป้องกันการนำเข้าเชื้อไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาภายในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้าน GLIFT
- เครื่องมือใช้ในการ spray IgG, IgG-conjugate ควบคุมปริมาณได้

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของ PVA

การสกัด IgG ของ PVA ดำเนินการโดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา แอนติซีรัมต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:9 ผสมให้เข้ากัน ค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวลงไปจำนวนเท่ากับปริมาณสารละลายแอนติซีรัมที่เจือจาง กวนเบาๆขณะเติม บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ ห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge) ละลายตะกอนที่ได้ด้วยครึ่งเท่าของ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ในครึ่งเท่าของ PBS 1 ลิตร ดำเนินการ 3 ครั้ง แต่ละครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบคุณภาพของ IgG ของ PVA

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

1. บดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคจากเชื้อ PVA ให้ละเอียดในถุงพลาสติก ด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืชต่อบัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบพืชปกติเช่นเดียวกัน
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 PVA
4. นำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี 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 PVA แช่ลงในส่วนผสม IgG ของ PVA ตามลำดับ IgG เจือจาง 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 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 รอดูผลประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสีชมพูแล้วเทสารละลาย substrate ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทองเตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ 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 PVA ต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การติดสลาก IgG ของ PVA ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ PVA จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอยที่เตรียมไว้จำนวน 200 มิลลิลิตร กวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย 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 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ PVA บนเส้น test line

ในการวิจัยการผลิตชุด GLIFT kit ของ PVA ได้ทดลองใช้เมมเบรน 7 ชนิดคือ

1. เมมเบรน S&S AE 100
2. เมมเบรน S&S AE 99
3. เมมเบรน S&S AE 98 Fast
4. เมมเบรน Unisart CN 95
5. เมมเบรน Unisart CN 140
6. เมมเบรน Millipore HF 13504

7. เมมเบรน Prisma 60

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ PVA 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 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบว่าการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบมีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดสอบหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำคั้นจากหัวพันธุ์มันฝรั่งในการตรวจเชื้อ PVA ในเนื้อมันฝรั่งทดลองนำ sample pad buffer-Na_2BO_3 มาเติมสาร Na_2SO_3 เปรียบเทียบกัน ในปริมาณ 0.4, 0.6 และ 0.8 % นำมาบดตัวอย่างเนื้อมันฝรั่งเป็นน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 7 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส PVA

การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ GLIFT kit ในการตรวจสอบเชื้อ PVA ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้นพืชเป็นโรค ในอัตรา 1:10 1:100 1:200 1:500 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วหยดทดสอบเท่าๆ กัน อ่านผลหลังหยดตัวอย่างแล้วประมาณ 5 นาที

ขั้นตอนที่ 8 ทดสอบจำนวนหยดที่เหมาะสม

โดยทดลองเปรียบเทียบจำนวนหยดที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนโดยทดสอบที่จำนวน 3, 4 และ 5 หยด

ขั้นตอนที่ 9 สรุปผลการดำเนินงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2556

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของ PVA และ
ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบคุณภาพของ IgG ของ PVA

ผลในขั้นตอนที่ 1 และ 2 การสกัดและทดสอบคุณภาพของ IgG ของ PVA ได้ IgG ของ PVA วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ OD^{280} พบว่าค่าที่ได้น้อยกว่า 11.2 ซึ่ง IgG ที่ได้จะต้องมีค่า 11.2 เพื่อปรับ IgG ให้ได้เท่ากับ 1.4 และจะมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปทดสอบกับตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและสามารถนำไปใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียม IgG ใหม่เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ต้องการก่อนนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold) และ
ขั้นตอนที่ 4 การติดสลาก IgG ของ PVA ด้วยอนุภาคทอง

ผลในขั้นตอนที่ 3 และ 4 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold) และการติดสลาก IgG ของ PVA ด้วยอนุภาคทองได้สารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง จากนั้นปรับให้ได้ค่า OD 540 เท่ากับ 0.5 เมื่อกวนสารละลายทองแขวนลอยที่มีอนุภาคขนาด 40 นาโนเมตร ผสมกับ IgG ของ PVA ในขั้นตอนที่ 1 นั้น (ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นการติดสลากอนุภาคทองกับ IgG นำมาพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว แล้วอบแห้งที่ 37 $^{\circ}$C นาน 2 ชั่วโมง จึงได้แผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ PVA ติดสลากอนุภาคทองที่แห้งพร้อมนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และได้นำแผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ PVA แล้วนั้น ไปทดสอบกับเมมเบรนชนิดต่างๆ พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่ไม่ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งคุณภาพของแอนติซีรัม ที่นำมาสกัด IgG ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมแอนติซีรัมและ IgG ใหม่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการทดลองปรับใช้ GLIFT เพื่อตรวจสอบเชื้อ PVA ในมันฝรั่งสามารถทำได้เช่นเดียว กับการพัฒนาการผลิต GLIFT Kit เพื่อตรวจสอบเชื้อ PVY ในมันฝรั่ง ซึ่งจะมีความแตกต่างกันบ้างในปริมาณของสารที่ใช้เพื่อความชัดเจนของปฏิกิริยาเท่านั้น และจากผลการทดลองใช้ Gold labeling IgG ของ PVA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่เส้น Test line ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นจะต้องทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ line และความเข้มข้นที่ใช้ ให้เหมาะสม รวมทั้งจะต้องทำการตรวจเช็คแอนติซีรัมของเชื้อ PVA ก่อนนำมาสกัด IgG อีกครั้ง ซึ่งทั้งหมดยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

เอกสารอ้างอิง

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

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board. Hochleitner,K. and Kraus, H. (2002) Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180pp.

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-Iwaki,M.,Hanada,K.,Fujisawa,I. And Tomaru,K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plant Infected with Multiple Viruses Employing Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) with two step Method; Multi RIPA. Annaul Phytopathology Society. Japan 59:200-203