การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* subgroup *Maize dwarf mosaic virus*

Research and development of test kit for detection of *Sugarcane mosaic virus* subgroup *Maize dwarf mosaic virus*.

เยาวภา ตันติวานิช[1/] ศิวิไล ลาภบรรจบ[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใช้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสโรคใบด่างข้าวโพด (SCMV) ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวกและอ่านผลได้รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane; NCM) การเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของ SCMV โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) เตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG ของ SCMV และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช้ปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ทำเส้น control line ด้วย GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) และ test line ด้วย IgG ของ SCMV ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนแผ่น NCM (วัสดุเป็น S&S – AE 99, ขนาด 8 ไมโครเมตร) เมื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบแล้ว และทำการทดสอบกับน้ำคั้นใบข้าวโพดจากต้นข้าวโพดที่เป็นโรคพบว่า ชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่ได้พัฒนาปรับใช้ครั้งนี้สามารถตรวจสอบไวรัสใบด่างข้าวโพดได้ที่ความเข้มข้น 1 : 10 โดยสามารถทราบผลได้ภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว คือ เส้น control line และ test line ปรากฏสีในเวลาประมาณ 5 นาที

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-04-54

คำนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจมากพืชหนึ่งของโลก ผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งใช้เป็นอาหารมนุษย์ ใช้บริโภคทั้งภายในประเทศและส่งขายต่างประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น ฮ่องกง ไต้หวัน และสิงค์โปร์ จึงจัดเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2546) ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกข้าวโพดหวานเป็นอันดับ 4 ของโลก ทำรายได้เข้าประเทศปีละประมาณ 600-900 ล้านบาท โดยส่งออกข้าวโพดในรูปของข้าวโพดหวาน บรรจุกระป๋อง ข้าวโพดหวานแช่แข็ง ข้าวโพดฝักอ่อนบรรจุกระป๋อง ครีมข้าวโพด เมล็ดพันธุ์ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547) ข้าวโพดหวานจัดเป็นข้าวโพดที่สำคัญที่สุดในการส่งออก ในปี 2548 ประเทศไทยส่งออกข้าวโพดหวานในรูปแบบต่างๆ เป็นมูลค่ารวม 3,200 ล้านบาท แต่ในช่วงที่ผ่านมาพบว่าเกษตรกรประสบปัญหาความแห้งแล้งร่วมกับการระบาดของไวรัสและโรคใบไหม้แผลใหญ่จากเชื้อราทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา

โรคไวรัสที่สำคัญของข้าวโพดที่เคยมีรายงานในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบด่างลายที่เกิดจากเชื้อ *Maize dwarf mosaic virus*-B (MDMV-B) (ธีระ, 2532) ซึ่งปัจจุบันชื่อได้เปลี่ยนเป็น *Sugarcane mosaic virus* สายพันธุ์ MDB (SCMV-MDB) ตามข้อกำหนดของ ICTV (International committee for taxonomy of Viruses) เชื้อ *Sugarcane mosaic virus* หรือ SCMV จัดอยู่ในจีนัส *Potyvirus* แฟมิลี่ *Potyviridae* เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด และ ข้าวฟ่าง (Pirone, 1972; Teakle *et al*.,1989) เดิม SCMV มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น grass mosaic virus หรือ maize dwarf mosaic virus strain B (MacKenzie , 1966; Louie และ Knoke, 1975; Shukla; 1989) ไวรัสมีอนุภาคเป็นท่อนยาวคด ขนาดประมาณ 750 นาโนเมตร ถ่ายทอดได้ด้วยวิธีกลและแมลงจำพวกเพลี้ยอ่อนหญ้า (*Hysteronerura setariae* Thos.) และเพลี้ยอ่อนข้าวโพด (*Rhopalosiphum maidis* Fitch.) ไม่ถ่ายทอดผ่านเมล็ด พืชอาศัยจำกัดอยู่ในวงศ์ Gramineae ผลจากการปลูกเชื้อโดยวิธีสัมผัสลงบนพืชในวงศ์ Gramineae 26 ชนิด และวงศ์Leguminosae 7 ชนิด พบว่าพืชส่วนมากแสดงลักษณะอาการของโรคคล้ายกัน คือ ในระยะแรก หลังการปลูกเชื้อ 5-7 วัน เกิดอาการด่างประเป็นขีดเล็ก ๆ สีขาวบริเวณโคนใบ จากนั้นอาการด่างจะแพร่กระจายทั่วใบแต่สังเกตอาการได้ชัดเจนบริเวณใบอ่อน ส่วนพืชในวงศ์ Leguminosae ที่ใช้ทดสอบปรากฏว่าไม่เกิดอาการของโรค (ธีระ, 2532) SCMV มีหลายสายพันธุ์ จัดแบ่งได้เป็น 4 subgroups ได้แก่ 1) Johnson grass mosaic virus 2) Maize dwarf mosaic virus 3) Sugarcane mosaic virus 4) Sorghum mosaic virus (Shukla *et al*., 1989)

ปี พ.ศ. 2547 พิสสวรรณ และคณะ ได้รายงานว่าพบเชื้อ เชื้อ *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) เข้าทำลายข้าวโพดหวานจากจังหวัดตาก เรียกชื่อโรคว่า โรคใบด่างประจุดเหลืองจำแนกเชื้อโดยผลการตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา ชีวโมเลกุล ร่วมกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และจัดว่าเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรง ทำให้เกิดอาการด่างและแผลไหม้บนใบ ลำต้น และฝักข้าวโพดอย่างรุนแรง ต่อมาพบโรคใบด่างประจุดเหลืองในข้าวโพดจากแหล่งปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา ในช่วงปี 2547-2548 เกษตรกรพบโรคใบด่างและใบไหม้ของข้าวโพดระบาดกว้างขวางในหลายพื้นที่ เช่น จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี แต่เมื่อตรวจสอบใบข้าวโพดที่เป็นโรคด้วยแอนติซีรัมต่อเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่แยกจากอ้อยแล้ว พบปฏิกิริยาไม่ชัดเจน แต่ตรวจพบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคดในใบข้าวโพดดังกล่าว การทดลองครั้งนี้จึงมี

จุดประสงค์เพื่อศึกษาจำแนกเชื้อไวรัส สาเหตุโรคใบด่างลายของข้าวโพด ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ รวมทั้งศึกษาข้อมูลของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein gene or CP gene) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิดในการตรวจสอบไวรัสนี้ เช่น เทคนิค dot blot hybridization Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) Tissue blot immunoassay (TBIA) RT-PCR และ Real Time PCR ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และ/หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร ทั้งนี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้และไวรัสของมันฝรั่งโดยวิธี Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ทำให้การตรวจสอบมีความสะดวกขึ้นมากและอ่านผลได้ในเวลารวดเร็ว คือ ใช้เวลาในการตรวจเพียง 5 นาที (สุรภี และคณะ, 2547 และ กิตติศักดิ์ และคณะ, 2549) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและนำวิธี GLIFT ไปปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่น ๆ อีกหลายโรคด้วยกัน (สุรภี และคณะ, 2551) งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) มาปรับใช้ในการตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น สามารถควบคุมโรคอย่างได้ผลและมีประสิทธิภาพ สามารถดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็วและทันต่อเหตุการณ์ การตรวจวินิจฉัยโรคพืชนอกจากต้องเป็นวิธีการที่แม่นยำ และสะดวกแล้ว ควรที่จะสามารถใช้ตรวจสอบได้เองในผู้ใช้ทุกระดับ รวมทั้งต้องมีราคาที่ไม่แพงมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แอนติซีรัมของไวรัสใบด่างข้าวโพด *Sugarcane mosaic virus* subgroup MDB (SCMV-MDB)
2. แผนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM)
3. สารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold)
4. Goat Anti Rabbit IgG
5. แผ่น conjugated release pad (CRP)
6. 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 carbonate buffer pH 9.6 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5

วิธีการ

1. การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลองจากตัวอย่างข้าวโพดหวานที่เป็นโรคและการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างและมีอาการเตี้ยแคระจากแปลงปลูก ตรวจสอบไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ SCMV โดยบดตัวอย่างใบข้าวโพดใน carbonate buffer (0.015M Na_2CO_3, 0.035M $NaHCO_3$ pH 9.6) ในอัตราใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร (1:20) ดูดน้ำคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้างด้วยสารละลาย PBST (140 mM Na_2CO_3, 2mM KH_2HPO_4, 8 mM $Na_2HPO42H_2O$, 2 mM

KCl, 0.05% Tween20) เตรียมแอนติซีรัมเจือจาง 1:1000 ใน conjugate buffer (PBST, 2% polyvinyl- pyrrodidone, 0.2% ovalbumin) ใส่ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBST จากนั้นเติม anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ใน conjugate buffer ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกและเตรียมสารละลาย substrate p-Nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน substrate buffer (diethanolamine 9.7%, pH 9.8) ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3M KOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่า ELISA (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาเป็นบวก นำมาเพิ่มปริมาณบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B โดยบดใบข้าวโพดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราใบพืชสด 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตรในโกร่งอบฆ่าเชื้อ และแช่เย็น ด้วยไนโตรเจนเหลวจนใบพืชละเอียด ผสมด้วยบัฟเฟอร์และแช่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล โดยโรยผงคาร์บอรันดัมลงผสมในน้ำคั้นใบพืช ใช้นิ้วมือจุ่มลงในน้ำคั้น และทาใบพืชให้ทั่วทั้งใบ เก็บรักษาในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองที่กันแมลงได้ ภายหลังข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง เก็บใบมาเพื่อใช้ในการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์

2. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

ตัดใบข้าวฟ่างเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ –20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นำมาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืช เอาแต่ส่วนน้ำคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5M Urea ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. การผลิตแอนติบอดีของเชื้อ SCMV

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อ SCMV สาเหตุโรคใบด่างของข้าวโพด เตรียมแอนติเจนโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในข้าวฟ่าง การแยกเชื้อไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์จากข้าวฟ่างด้วยวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำสลับสูง (differential centrifugation) ได้สารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 45 มก./มล. ผลิตแอนติซีรัมในกระต่ายด้วยวิธีการฉีดเข้าผิวหนัง การทดสอบไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1: 2,048 ถึง 1: 32,768 และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ SCMV สามารถนำไปใช้ตรวจไวรัส SCMV ในพืช ด้วยวิธีการต่างๆ ทางเซรัมวิทยา

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ของเชื้อ SCMV นำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ SCMV มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่นๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton *et al,*1990) นำ แอนติซีรัม 1 มิลลิลิตรผสมกับ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร หยด saturated ammonium sulfate pH 7.2 ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ค่อยๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรัม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40 เปอร์เซ็นต์ ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อยๆ ละลายตะกอนด้วย Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) 1 มิลลิลิตร เติม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร และ saturated ammonium sulfate 1.02 มิลลิลิตร ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS 1.5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.2 ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยนำ IgG ของเชื้อ SCMV ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจเชื้อ SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *et al*, 1990 โดยใช้ IgG ของเชื้อ SCMV ที่เจือจาง 1: 500

4.3 การเตรียม Gold conjugated IgG ทำการติดฉลาก IgG ของ SCMV ด้วยอนุภาคทอง โดยนำ IgG ของ SCMV 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold) (ของ DCN Diagnostic Consulting Network, Biodot, USA) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมากวนด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10% กวนเบาๆ อีก 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled IgG) ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาณ 500-600 ไมโครลิตร จะมีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 เติม sucrose ในอัตรา 20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆ ให้ละลาย

4.4 การเตรียมแผ่น conjugated release pad (CRP) นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) มาตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.8–1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15–18 เซนติเมตร วางลงบนกระดาษขาวที่สะอาด ใช้ภู่กันเบอร์ 0 จุ่ม Gold conjugated IgG ป้ายลงบน CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ปริมาณ 100 – 120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินั่มฟอล์ย เก็บไว้ในที่แห้ง

4.5 การทำเส้น test line และ control line โดยนำแผ่น NCM (วัสดุเป็น S&S – AE 99, size 8 ไมโครเมตร) ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร (ขึ้นกับ

ขนาดของ backing) ทำเครื่องหมายด้วยดินสอที่ด้านบนของแผ่น เป็นตำแหน่ง control line ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจาก control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง แตะปากกาลงและลากเส้นจากซ้ายไปทางขวาช้าๆ จนสุดปลาย NCM ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น NCM มีขนาดเท่าๆ กันทั้งเส้นใช้ปากกาด้ามใหม่ (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่มซับ IgG ของ RRSV (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

4.6 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

- นำแผ่น backing หรือ พลาสติก ขนาด 11X18 เซนติเมตร ที่เคลือบกาวไว้ 1 ด้าน
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงกลางที่ตำแหน่งของ NCM วางแผ่น NCM ลงให้เรียบ
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ CRP วางแผ่น CRP ให้เกยทับ NCM ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ Sample application pad (SAP) วางแผ่น SAP เกยแผ่น CRP 1-2 มิลลิเมตร
- ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ absorbing pad (Wick) วางแผ่น Wick เกยทับแผ่น NCM 1-2 มิลลิเมตร
- ตัดด้วยที่ตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 0.42 - 0.45 เซนติเมตร
- บรรจุชุดตรวจสอบลงตลับ ทดสอบคุณภาพกับตัวอย่างน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:10 เท่า
- เก็บ GLIFT kit ไว้ในถุงอลูมินั่มฟอล์ย และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง

4.7 การเตรียมตัวอย่างและทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ บดตัวอย่างใบข้าวโพดจากต้นที่เป็นโรคใบด่างและต้นข้าวโพดปกติใน extraction buffer อัตรา 1 : 10 (ตัวอย่างใบข้าวโพด : buffer) หยดน้ำคั้นจากใบข้าวโพดลงในชุดตรวจสอบ GLIFT kit ชุดละ 3 -4 หยด ตรวจผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เพื่อทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบไวรัสใบหงิก GLIFT kit ที่ได้พัฒนาขึ้นในครั้งนี้

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม ๒๕๕๔ – กันยายน ๒๕๕๖

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ของ RRSV นำ IgG ที่ได้มาปรับความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบคุณภาพของ IgG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการตรวจสอบไวรัสใบด่างข้าวโพด โดยวิธี DIBA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาไวรัสโรคใบด่างของข้าวโพดและมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี DIBA คือ 1: 500

นำ IgG ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ได้เป็น IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold conjugated IgG or gold particle labeled IgG) ทำการเตรียมแผ่น CRP โดยใช้ภู่กันจุ่มและป้ายลงบนแผ่น CRP ปริมาณ 100 – 120 ไมโครลิตร/แผ่น (15 – 18 เซนติเมตร) แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ห่อด้วยอลูมินั่มฟอล์ย เก็บไว้ในที่แห้ง จากนั้นได้นำแผ่น NCM มาทำเส้น test line และ control line โดยใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม GAR ลากเส้น control line เป็นแนวเส้นตรง จากซ้ายไปทางขวาสุดปลาย NCM แล้วใช้ปากกาด้ามใหม่จุ่ม IgG ของ SCMV ลากเส้น test line ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/แผ่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง นำแผ่น CRP ที่ป้ายด้วย IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง และแผ่น NCM ที่ได้ลากเส้น test line และ control line มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ บนแผ่น backing โดยประกอบร่วมกับแผ่น SAP และแผ่น wick เป็นชุดตรวจสอบ GLIFT kit

เมื่อนำชุดตรวจสอบ GLIFT kit มาทำการตรวจสอบไวรัส SCMV ในน้ำคั้นจากใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบด่าง ต้นข้าวปกติ และสารละลายไวรัสที่บริสุทธิ์ที่เจือจางในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 อัตรา 1 : 100 พบว่า ชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่พัฒนาในครั้งนี้ สามารถตรวจสอบไวรัส SCMV จากตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบด่างที่ความเข้มข้น 1 : 10 และสารละลายไวรัสที่บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1 :100 โดย test line ปรากฏสีขึ้นมา เช่นเดียวกับ control line ภายในระยะเวลาประมาณ 5 นาที โดยที่ตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดจากต้นปกติปรากฏเฉพาะ control line

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อตรวจสอบไวรัสใบด่างของข้าวโพดในครั้งนี้ สามารถตรวจสอบไวรัสใบด่างจากตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบด่างที่ความเข้มข้น 1 : 10 โดย test line และ control line ปรากฏสีภายในระยะเวลาประมาณ 5 นาที ดังนั้นเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) นี้ สามารถนำมาปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อตรวจหาไวรัสใบด่างของข้าวโพด เพื่อให้นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดได้ด้วยตนเอง รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคไวรัส SCMV รวมทั้งการตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างในพืชอาศัยชนิดต่างบริเวณรอบๆ พื้นที่ปลูก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคใบด่างข้าวโพดด้อีกทางหนึ่ง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวรุ่งนภา ทองเครั่ง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2550. การผลิตชุดตรวจสอบไวรัสพืช (GLIFT kit) เพื่อใช้เอง. เอกสาร

ประกอบการฝึกอบรม. 13- 14 ธันวาคม 2550. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มงานวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2547. **ข้าวโพด**. แหล่งที่มา: http://www. 210. 86. 142. 87/. 30 มกราคม 2549.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT Kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อ Potato Virus Y ในมันฝรั่ง. วารสารวิชาการเกษตร 24 (2) : 168-177.

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทฟันนี่พับบลิชชิ่ง ,กรุงเทพฯ

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, อมรรัตน์ หล้าพรหม และ วิมล สีเทา. 2547. การตรวจพบ *Maize chlorotic mottle virus* เข้าทำลายข้าวโพดหวานร่วมกับ *Sugarcane mosaic virus*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสกล้วยไม้ในกล้วยไม้. วารสารโรคพืช 18 (1-2) : 1-14.

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพานิชย์. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. **สถิติการเกษตร**. [ออนไลน์] http://www.doae.go.th/plant/sweetcorn/, 30 มกราคม 2549.

ICTVdB Mangement. 2006. **00. 074. 0. 05. 001. *Maize chlorotic mottle virus*.** ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Available Source: [ออนไลน์] htt://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/, April 4, 2006.

Louis, R. and Knoke, J.K. 1975.*Pl. Dis. Reptr* 59 : 518

MacKenzie, D.R., Wernham, C.C. and Ford, R.E. 1966. Pl. Dis. Reptr 50 : 814

Pirone, T.P. 1972. Sugarcane mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of plant virus No.88.

Teakle, D.S., D.D. Shukla, and R.E.Ford. 1989. Sugarcane mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses. No.342

Shukla, D.D. andC.W. Ward. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Arch. Virol. 106:171-200.

ภาคผนวก

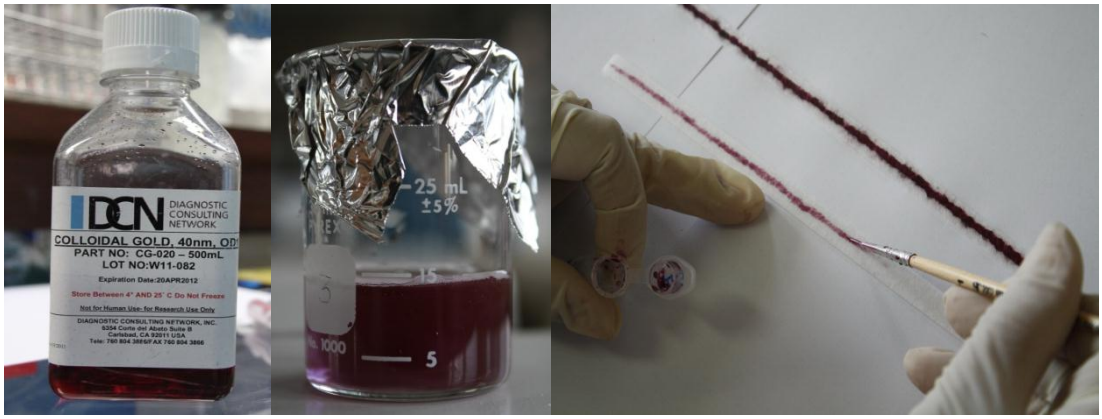

Figure 1. Collodal dold and preparing of gold conjugated IgG pad

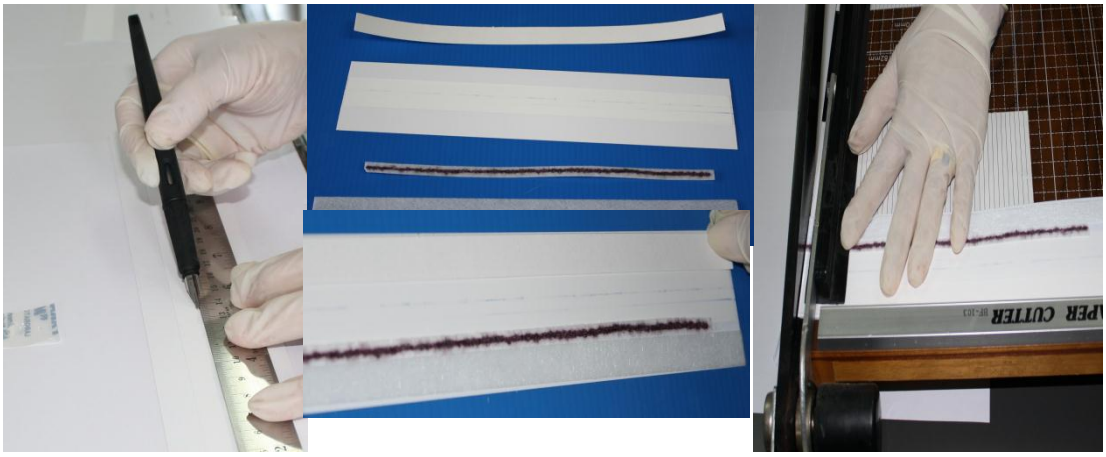

Figure 2. Assemble for GLIFT stripe

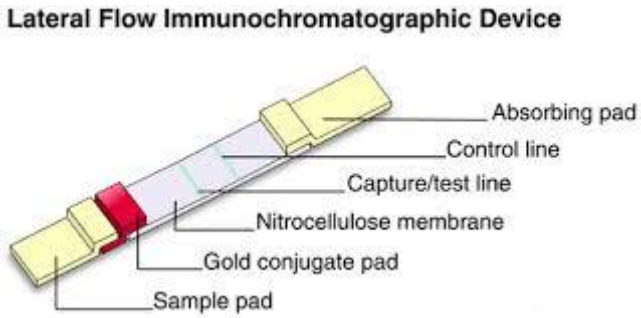

Figure 3. Diagram of GLIFT kit

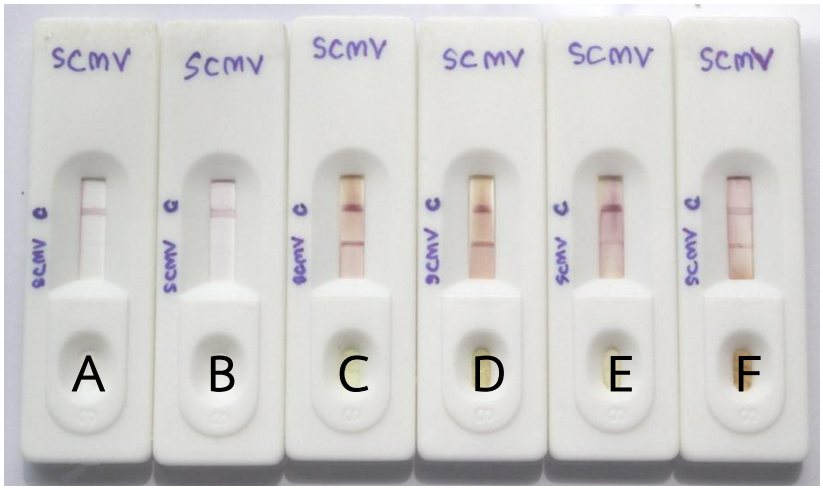

Figure 4 The result of SCMV detection on corn leaves by GLIFT Kit
A, B : Negative reaction; purple color stripe in only control line
C-F : Positive reaction; purple color stripe in both test line and control line