การพัฒนา GLIFT Kit เพื่อตรวจเชื้อไวรัส *Sugarcane Mosaic Virus subgroup Maize Dwarf Mosaic Virus*

Development of GLIFT Kit for Detection of *Sugarcane Mosaic Virus subgroup Maize Dwarf Mosaic Virus*

เยาวภา ตันติวานิช[1/]

Yaowapa Tantiwanich[1/]

ABSTRACT

Gold labeled IgG flow test (GLIFT) was developed as test kit for *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) detection based on serology and lateral flow technique. Accuracy, convenience and rapid detection are the novel properties of this technique. The GLIFT kit will be very useful for varietal screening in breeding program, forecasting and early warning of *Sugarcane mosaic virus* epidemic. The SCMV IgG was purified and tested by dot immunobinding assay (DIBA) to obtain the proper concentration for using in GLIFT kit. IgG was conjugated with colloidal gold and amount of 100-120 μl (6.6 μl/cm) of IgG conjugated gold were used for lining on 15 –18 cm conjugated release pad Control line and test line were made on nitrocellulose membrane using 40 μl (2.2 μl/ cm) of goat anti-rabbit IgG and SCMV IgG respectively. The appearance of color on both test line and control line indicated positive result. In case of negative result, no color was shown on the test line. GLIFT kit were tested for their efficacy to detect SCMV from infected corn leaves. Satisfactory result was obtained with color gradually appeared on control line and test line within 5-10 minutes.

Key-words: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), GLIFT Kit, detection

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การนำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใช้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสโรคใบด่างข้าวโพด (*Sugarcane mosaic virus* ; SCMV) ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวก และอ่านผลได้รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการทางเชรุ่มวิทยา และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane; NCM) ทดสอบคุณภาพและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IgG ต่อเชื้อ SCMV ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) เตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อกับ IgG ของเชื้อ SCMV ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช้ Gold conjugated IgG ปริมาณ 6.6 μl/cm ทำเส้น control line ด้วย Goat anti rabbit IgG ความเข้มข้นอัตรา 1:3 และทำเส้น test line โดยใช้ IgG ของเชื้อ SCMV ปริมาณ 40 μl (2.2 μl/cm) บนแผ่น NCM (S&S – AE 99, ขนาด 10 μm) เมื่อประกอบส่วนต่าง ๆ เป็นชุดตรวจสอบ GLIFT Kit และทำการทดสอบกับน้ำคั้นใบข้าวโพดจากต้นข้าวโพดที่เป็นโรค พบว่าชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่พัฒนาปรับใช้ครั้งนี้สามารถตรวจสอบไวรัสใบด่างข้าวโพดได้ที่ความเข้มข้น 1 : 10 สามารถทราบผลได้รวดเร็ว คือ เส้น control line และ test line ปรากฏสีในเวลาประมาณ 5-10 นาที

คำหลัก : โรคใบด่างข้าวโพด ชุดตรวจสอบ GLIFT Kit

คำนำ

โรคไวรัสสำคัญของข้าวโพดที่เคยมีรายงานในประเทศไทย 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 จัดอยู่ในสกุล Potyvirus วงศ์ Potyviridae เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด และข้าวฟ่าง (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 ถ่ายทอดเชื้อได้ด้วยวิธีกล และแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อนหญ้า (*Hysteronerura setariae* Thos.) และเพลี้ยอ่อนข้าวโพด (*Rhopalosiphum maidis* Fitch.) ไม่สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด พืชอาศัยของเชื้อ SCMV จำกัดอยู่ในวงศ์ Gramineae ผลจากการปลูกเชื้อโดยวิธีสัมผัสลงบนใบพืชในวงศ์ Gramineae 26 ชนิด และวงศ์ Leguminosae 7 ชนิด พบ

ว่าพืชส่วนมากแสดงลักษณะอาการของโรคคล้ายกัน คือ ในระยะแรก หลังการปลูกเชื้อ 5-7 วัน เกิดอาการด่างประเป็นขีดเล็ก ๆ สีขาวบริเวณโคนใบ จากนั้นอาการด่างจะแพร่กระจายทั่วใบแต่สังเกตอาการได้ชัดเจนที่บริเวณใบอ่อน 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 พิสสวรรณและคณะ ได้รายงานว่าพบโรคใบด่างประจุดเหลืองในข้าวโพดจากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จ.นครราชสีมา และจ.สระบุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2547-2548 เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัมต่อเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่แยกจากอ้อยพบปฏิกิริยาไม่ชัดเจน แต่ตรวจพบเป็นอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคดในใบข้าวโพดดังกล่าว จึงได้จำแนกเชื้อไวรัสด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แยกไวรัสบริสุทธิ์และศึกษาข้อมูลของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein gene หรือ CP gene) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อ *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) ที่เคยเข้าทำลายข้าวโพดหวานใน จ.ตาก เรียกว่า โรคใบด่างประจุดเหลือง เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดอาการด่าง และแผลไหม้บนใบ ลำต้น และฝักข้าวโพด ก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรง

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคไวรัสหลายเทคนิค เช่น Dot blot hybridization Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) Tissue blot immunoassay (TBIA) RT-PCR และ Real Time PCR ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนาม และการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสแบบรวดเร็วขึ้น เช่น ตรวจไวรัสในกล้วยไม้ และมันฝรั่ง โดยวิธี Gold labeled IgG flow test (GLIFT) ทำให้การตรวจสอบมีความสะดวกมากขึ้น และสามารถอ่านผลได้รวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 5 นาที (สุรภีและคณะ, 2547, กิตติศักดิ์และคณะ, 2549) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและนำวิธี GLIFT ไปปรับใช้ในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัส และแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดด้วยกัน (สุรภีและคณะ, 2551) งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค GLIFT มาพัฒนาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ SCMV-MDB ในข้าวโพด เพื่อการตรวจสอบไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้องแม่นยำ สะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น และผู้ใช้สามารถตรวจสอบได้เอง รวมทั้งต้องมีราคาไม่แพง

อุปกรณ์และวิธีการ

การพัฒนาผลิตชุดตรวจ GLIFT ปัจจัยที่สำคัญคือแอนตีซีรั่มต่อเชื้อ SCMV-MDB และตัวอย่างพืชที่เป็นโรคจากเชื้อดังกล่าว ซึ่งแบ่งการดำเนินงานได้เป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การจำแนกเชื้อ SCMV-MDB จากตัวอย่างข้าวโพดหวาน

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่าง และมีอาการเตี้ยแคระจากแปลงปลูก ตรวจสอบจำแนกชนิดไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ SCMV นำตัวอย่างใบข้าวโพดมาบดใน carbonate buffer (0.015M Na_2CO_3, 0.035M $NaHCO_3$ pH 9.6) ในอัตราใบพืช 1 ก./บัฟเฟอร์ 2 มล. (1:2) ดูดน้ำคั้นปริมาตร 100 μl ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชม. ครบเวลาแล้วล้างด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline-Tween 20 (PBS-T) (140 mM Na_2CO_3, 2mM KH_2HPO_4, 8 mM Na_2HPO_4 $2H_2O$, 2 mM KCl, 0.05% Tween20) เตรียมแอนติซีรัมเจือจาง 1:1000 ใน conjugate buffer (PBS-T, 2% polyvinyl- pyrrodidone, 0.2% ovalbumin) ใส่ลงในหลุมๆ ละ 100 μl บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 1 ชม. ล้างด้วยสารละลาย PBS-T จากนั้นเติม Goat anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ใน conjugate buffer ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 หลุมละ 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชม. ล้างออก และเตรียมสารละลาย substrate (p-Nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 5 มก./มล. ใน substrate buffer (diethanolamine 9.7%, pH 9.8) ใส่หลุมละ 100 μl บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชม. หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3M KOH หลุมละ 50 μl อ่านค่าความเข้มของสี (Optical Density; O.D) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาเป็นบวก นำมาเพิ่มปริมาณบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B โดยบดใบข้าวโพดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราใบพืชสด 1 ก./บัฟเฟอร์ 10 มล. ในโกร่งอบฆ่าเชื้อด้วยไนโตรเจนเหลว จนใบพืชละเอียด ผสมด้วยบัฟเฟอร์และแช่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล โดยโรยผงคาร์บอรันดัมลงผสมในน้ำคั้นใบพืช ใช้นิ้วมือจุ่มในน้ำคั้น และทาใบพืชให้ทั่วทั้งใบ เก็บรักษาในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองที่กันแมลง หลังจากข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง เก็บใบมาเพื่อใช้ในการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์

2. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

ตัดใบข้าวฟ่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1 ซม. น้ำหนัก 150 ก. แช่แข็งที่ -20 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. นำมาบดในเครื่อง Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มล. ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มล. กรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนน้ำคั้น ปริมาตร 300 มล. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มล. กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มล. ใส่บีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชม. แล้วนำมาหมุน

เหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5M Urea ปริมาตร 100 มล. นำมากวนที่อุณหภูมิ 4 °ซ นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงต่อที่ 40,000 รอบ/นาที นาน 1.30 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มล.

3. การผลิตแอนติบอดีของเชื้อ SCMV

ผลิตแอนตีบอดีของเชื้อ SCMV สาเหตุโรคใบด่างข้าวโพด โดยนำสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมจากข้อ 2 ความเข้มข้น 45 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. มาผสมให้เข้ากันอย่างดีกับ freund's complete adjuvant 1 มล.(อัตราส่วน 1:1) นำมาฉีดเข้าผิวหนังของกระต่ายพันธุ์ไวท์นิวซีแลนด์ สำหรับการฉีดครั้งแรก และฉีดต่ออีก 2 ครั้งห่างกันครั้งละสัปดาห์ด้วยสารละลายไวรัสผสมกับ freund's incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 แล้วเจาะเลือดกระต่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 7 ครั้งหลังฉีดครั้งสุดท้าย 3 สัปดาห์ นำแอนตีเซรั่มที่ผลิตได้มาทดสอบความเข้มข้น (titer) ด้วยวิธี ELISA

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสแบบ GLIFT kit

4.1 สกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ต่อเชื้อ SCMV

นำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ SCMV มาแยกเฉพาะส่วน IgG ออกจากเซรุ่ม โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton *et al.*,1990) นำแอนติซีรัม 9 มล.ผสมกับ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มล. หยด saturated ammonium sulfate pH 7.2 ปริมาตร 10 มล. ที่แช่เย็น ค่อยๆ หยดบนเครื่องกวน (stirrer) ทำให้แอนติซีรัม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน แล้วค่อยๆ ละลายตะกอนด้วย Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) 1 มล. เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 มล. และ saturated ammonium sulfate 1 มล. ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย PBS 1.5 มล. นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40 °ซ เป็นเวลา 36 ชม. มีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชม. หลังจากนั้นนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20 °ซ

4.2 ทดสอบคุณภาพของ IgG

นำ IgG ต่อเชื้อ SCMV ที่ได้ มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางด้วยครึ่ง

เท่า PBS ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. นำไปทดสอบคุณภาพการตรวจเชื้อ SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี Indirect 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 μl ผสมกับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอยของ DCN (Diagnostic Consulting Network, Biodot, USA) ปริมาณ 10 มล. นำมากวนเบาๆ ด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10% จำนวน 1 มล. กวนเบาๆ อีก 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) ที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาณ 500-600 μl จะมีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ O.D. 540 เติม sucrose ในอัตรา 20 % เขย่าเบาๆ ให้ละลาย

4.4 การเตรียมแผ่น CRP (Conjugate Release Pad)

นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) มาตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.8-1.0 ซม. ยาวประมาณ 15-18 ซม. วางลงบนกระดาษขาวที่สะอาด ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบน CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ gold labeled IgG ปริมาณ 100 -120 μl/15-18 ซม. แล้วนำไปอบแห้งที่ 37 °ซ นาน 2 ซม. ห่อด้วยอะลูมินั่มฟอยล์เก็บไว้ในกล่องกันความชื้น

4.5 การทำเส้น test line และ control line

นำแผ่น NCM (วัสดุเป็น S&S - AE 99, size 10 μm) ขนาดกว้าง 2.5 ซม. ตัดให้มีความยาว 18 ซม. (ขึ้นกับขนาดของ backing) ติด NCM ลงบนแผ่น backing ทำเครื่องหมายด้วยดินสอที่ด้านบนของแผ่น เป็นตำแหน่ง control line ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น NCM 1 ซม. และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจาก control line 0.5 ซม. ใช้ปากกาหมึกซึม ขนาดปาก 0.7 มม. จุ่ม GAR เข้มข้นอัตรา 1:3 ปริมาณ 40 μl/แผ่น ลากเส้น control line โดยใช้ไม้บรรทัดวางเป็นแนวเส้นตรง ลากเส้นจากซ้ายไปทางขวาช้า ๆ จนสุดปลาย NCM ทั้งนี้ไม่ต้องออกแรงกด หากปากกาแห้งให้จุ่ม GAR ใหม่ แล้วลากเส้นต่อ ให้ขนาดเส้นที่เปียกบนแผ่น NCM มีขนาดเท่า ๆ กันทั้งเส้นใช้ปากกาด้ามใหม่จุ่มซับ IgG ของ SCMV ที่เข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาณ 40 μl/แผ่น ลากเส้น test line ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ control line นำไปอบแห้งที่ 37 °ซ เป็นเวลานาน 2 ซม.

4.6 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

1. ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ CRP ออก วางแผ่น CRP ให้เกยทับ NCM ประมาณ 1-2 มม.

2. ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Sample application pad (SAP) ออกวาง

แผ่น SAP เกยแผ่น CRP 1-2 มม.

3. ลอกกระดาษปิดกาวออกตรงตำแหน่งของ absorbing pad (Wick) วางแผ่น Wick เกยทับแผ่น NCM ด้านบน 1-2 มม.

4. ตัดด้วยที่ตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 0.42 - 0.45 ซม.

5. บรรจุชุดตรวจสอบลงตลับ

6. เก็บ GLIFT kit ไว้ในถุงอะลูมินั่มฟอยล์ ที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง

7. การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ บดตัวอย่างใบข้าวโพดจากต้นที่เป็นโรคใบด่าง และต้นข้าวโพดปกติใน extraction buffer อัตรา 1 : 10 (ตัวอย่างใบข้าวโพด : buffer) และสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจางใน Phosphate buffer pH 7.4 ความเข้มข้น 1:100 โดยหยดน้ำคั้นจากใบข้าวโพดและสารละลายไวรัส ลงในชุดตรวจสอบ GLIFT kit ชุดละ 3 หยด แล้วตรวจผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การผลิตแอนตีบอดีของเชื้อ SCMV

ผลการเตรียมเชื้อไวรัส SCMV สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่าย โดยการเพิ่มปริมาณไวรัสในข้าวฟ่าง ปรากฏว่าข้าวฟ่างแสดงอาการของโรคด่างอย่างชัดเจน (Figure 1) และเมื่อนำมาใช้ในการผลิตแอนติซีรัมสามารถผลิตได้ความเข้มข้นสูงถึง 1: 32,768 (Table 1) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ SCMV สามารถนำไปใช้ตรวจไวรัส SCMV ได้

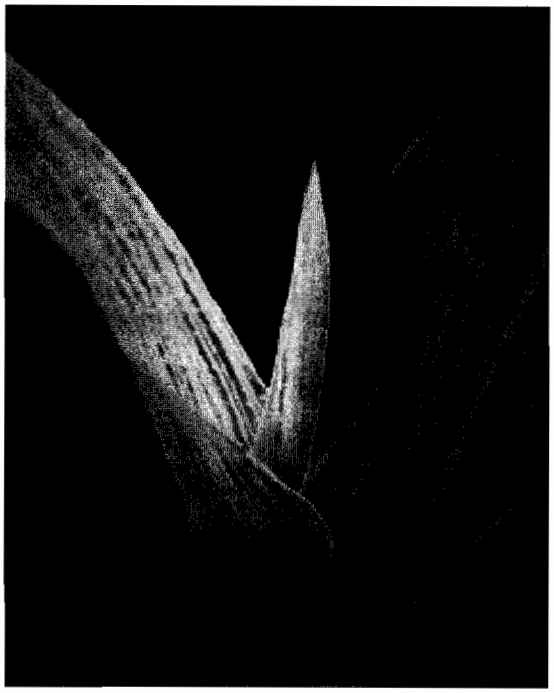


Figure 1 Symptoms of SCMV on sorghum leaf

2. การทดสอบคุณภาพของ IgG

จากการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) ของ SCMV-MDB นำ IgG ที่ได้มาปรับความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มก/มล. ที่ OD 280 นาโนเมตร แล้วทำการทดสอบคุณภาพของ IgG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการตรวจสอบไวรัสใบด่างข้าวโพดโดยวิธี DIBA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาไวรัสโรคใบด่างของข้าวโพดและมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี DIBA คือ 1: 500 (Figure 2)

3. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสแบบ GLIFT kit

นำ IgG ของ ไวรัส SCMV ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทอง

Table 1 SCMV antibody titer test by ELISA technique.

Antibody titer	OD value at 405 nm		
	SCMV	PBS pH 7.2	Normal serum
1:1,024	2.971	0.199	0.287
1:2,048	3.234	0.188	0.275
1:4,096	3.543	0.179	0.217
1:8,192	3.821	0.195	0.246
1:16,384	3.486	0.188	0.252
1:32,768	3.075	0.196	0.231
1:65,536	0.663	0.23	0.249

Figure 2 The quality of immunoglobulin (IgG) test using Dot Immunobinding Assay (DIBA). A : SCMV, B : Infected leaf

แขวนลอย ได้เป็น gold labeled IgG (Figure 3) นำ gold labeled IgG ไปป้ายบนแผ่น CRP ปริมาณ 2 μl/cm แล้วทำเส้น Test line โดยใช้ IgG ของ SCMV ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาณ 2.2 μl/cm ขีด บนแผ่น NCM ที่มีขนาดกว้าง 2.5 ซม. ยาว 18 ซม. และทำเส้น control line โดยใช้ GAR ความเข้มข้น 1:3 ปริมาณ 2.2 μl/cm แล้วนำมาประกอบเป็น GLIFT kit (Figure 4)

4. การทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้ สามารถตรวจสอบไวรัส SCMV-MDB จากตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบด่างที่ความเข้มข้น 1 : 10 และสารละลายไวรัสที่บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1 : 100 ได้โดย test line ปรากฏสีม่วงแดง เช่นเดียวกับ control line ภายในเวลาประมาณ 5 นาที ขณะที่ตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดจากต้นปกติ ปรากฏสีม่วงแดงเฉพาะ control line เพียงเส้นเดียว (Figure 5)

(A) (B) (C)

Figure 3 (A) Collodal gold DCN, Biodot, USA. (B) gold conjugated SCMV IgG

(C) preparing of conjugated release pad (CRP)

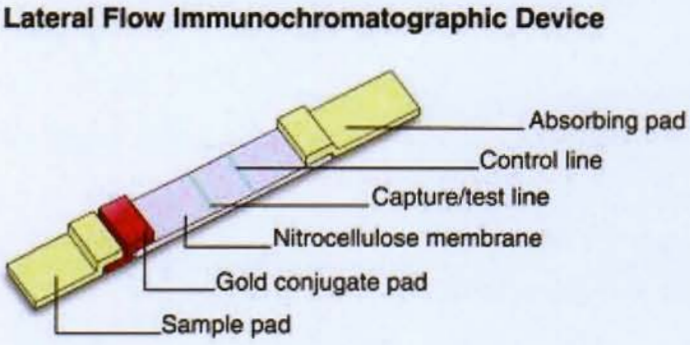
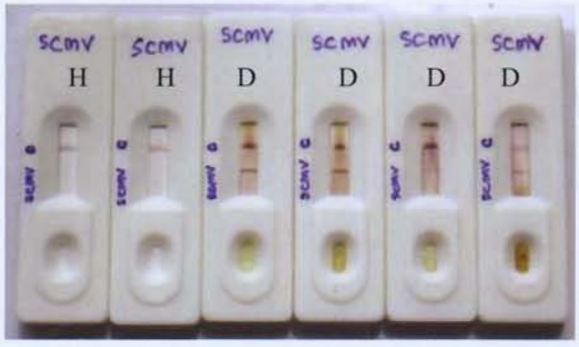


Figure 4 Composition of GLIFT kit



1 2 3 4 5 6

Figure 5 Detection of SCMV-MDB on corn leaves by GLIFT Kit

1, 2 : Negative reaction; purple color appears only at control line

3-6 : Positive reaction; purple color appears both at test line and control line

H= Healthy plant D= SCMV infected plant

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อตรวจสอบไวรัสใบด่างของข้าวโพด (SCMV) ในครั้งนี้ สามารถตรวจสอบไวรัสใบด่างจากตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวโพดเป็นโรคที่ความเข้มข้น 1 : 10 โดย test line และ control line ปรากฏสีม่วงแดงภายในระยะเวลาประมาณ 5 นาที ดังนั้นเทคนิค Gold labeled IgG flow test นี้ สามารถนำมาปรับใช้ ตรวจหาไวรัสใบด่างของข้าวโพด เพื่อให้นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดได้ด้วยตนเอง สามารถนำไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคไวรัส SCMV-MDB รวมทั้งการตรวจหาเชื้อไวรัสใบด่างในพืชอาศัยชนิดต่างๆ บริเวณรอบๆ พื้นที่ปลูกข้าวโพด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคใบด่างข้าวโพดได้อีกทางหนึ่ง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวรุ่งนภา ทองเครง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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 : 310 หน้า

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, อมรรัตน์ หล้าพรหม และ วิมล สีเทา. 2547. *การตรวจพบ Maize chlorotic mottle virus เข้าทำลายข้าวโพดหวานร่วมกับ Sugarcane mosaic virus.* ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 8 หน้า.

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 เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์.* รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

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

Louis, R. and Knoke, J.K. 1975. Strain of *maize dwarf mosaic virus. Plant Dis.*

Reptr. 59 : 518-522.

MacKenzie, D.R., Wernham, C.C. and Ford, R.E. 1966. Differences in *maize dwarf mosaic virus* isolates of the North eastern United states. *Plant Dis. Reptr.* 50 : 814

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

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

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