การศึกษาประสิทธิภาพของอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริปที่จำเพาะต่อ *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* และสภาพการเก็บรักษาที่เหมาะสม

Study on the Efficacy of *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*-specific Immunochromatographic Strip and Its Optimal Storage Condition

ธีร์วศิษฐ์ แพทย์สมาน[1/, 2/, 3/] ศรีหรรษา มลิจารย์[2/, 3/] รัชนี ฮงประยูร[1/, 2/, 3/*]

Teewasit Phatsaman[1/, 2/, 3/] Srihunsa Malichan [2/, 3/] Ratchanee Hongprayoon[1/, 2/, 3/*]

Received 19 Dec 2018/Revised 15 May 2019/Accepted 11 June 2019

ABSTRACT

Immunochromatographic strip (ICS) is a simple, convenient and rapid test kit which is very useful for the detection of plant viruses. Appropriate storage conditions will extend its shelf life. This research aims to produce the ICS specific to *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), evaluate its efficacy for the target virus detection and determine the appropriate storage conditions. Comparison of the storage conditions were conducted on the packaging materials, lighting conditions and storage temperatures i.e., between conical tube and zip lock bag, under natural light or dark condition and at room temperature and at 4°C. Results showed that the developed ICS was highly specific to CGMMV and the sensitivity could reach up to 0.098 μg/ml of the purified CGMMV, 1:10,000 of diseased plant sap and 0.024 μg/ml of the CGMMV in soil suspension. The reaction could be visualized within 5 minutes. The study on its storage conditions found that the ICS should be stored with desiccant in either conical tube or zip lock bag at 4°C under dark which gave the best reaction lines over 12 months storage.

Key words: rapid test kit, CGMMV, detection, storage condition

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2/] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1/] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen,Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140. Thailand

[2/] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140. Thailand

[3/] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา, กรุงเทพฯ 10900

[3/] Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900 Thailand

* Corresponding author: agrrat@ku.ac.th

บทคัดย่อ

อิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป (Immunochromatographic Strip; ICS) เป็นชุดตรวจสอบที่ใช้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว มีประโยชน์มากในการตรวจสอบเชื้อไวรัสพืช ซึ่งการเก็บรักษาที่เหมาะสมจะช่วยรักษาประสิทธิภาพการใช้งานให้ยาวนานขึ้น งานวิจัยนี้ได้ผลิต ICS ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) ประเมินประสิทธิภาพการตรวจเชื้อไวรัสเป้าหมาย และศึกษาสภาพการเก็บรักษาที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบบรรจุภัณฑ์ สภาพแสง และอุณหภูมิ ได้แก่ หลอดทดสอบหรือถุงซิป สภาพแสงธรรมชาติหรือที่มืด และอุณหภูมิห้องหรือที่ 4°ซ. ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่า ICS ที่ผลิตได้มีคุณภาพดี มีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CGMMV มีความไวในการตรวจไวรัสบริสุทธิ์ที่ระดับ 0.098 ไมโครกรัม/มล. หรือตรวจน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่เจือจางได้ถึง 1:10,000 และสามารถตรวจเชื้อ CGMMV ในสารละลายดินได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.024 ไมโครกรัม/มล. การอ่านผลใช้เวลาเพียง 5 นาที ผลการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเก็บรักษา ICS พบว่าควรเก็บ ICS โดยมีสารดูดความชื้นในหลอดทดสอบหรือถุงซิป ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ในสภาพที่มืด ซึ่งช่วยรักษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบได้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 12 เดือน

คำสำคัญ: ชุดตรวจสอบแบบรวดเร็ว ไวรัสใบด่างเขียวแตง การตรวจสอบ สภาพการเก็บรักษา

คำนำ

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) จัดอยู่ในจีนัส *Tobamovirus* มีพืชอาศัยส่วนใหญ่ในวงศ์ Cucurbitaceae เช่น แตงกวา (*Cucumis sativus*) แตงโม (*Cirtullus vulgaris*) เมลอน (*Cucumis melo*) เป็นต้น เมื่อแตงกวาได้รับเชื้อ CGMMV เข้าทำลายจะแสดงอาการใบด่างทั่วทั้งต้น ใบอาจโป่งนูน และบิดเบี้ยว ต้นแคระแกร็น ทำให้ผลแตงกวามีลักษณะผิดปกติและอาจทำให้ผลผลิตลดลงถึงมากกว่า 50% (Fletcher, 1969) นอกจากนั้นเชื้อไวรัสชนิดนี้ยังมีความคงทนสูง สามารถอยู่ได้ในซากพืชที่เป็นโรค ในดิน รวมทั้งติดไปกับอุปกรณ์ที่ใช้ทางการเกษตร สามารถแพร่ระบาดได้ดีด้วยวิธีกล และติดไปกับเมล็ดพันธุ์ แต่ยังไม่มีรายงานว่ามีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ (Dombrovsky *et al*., 2017; Inoue *et al*., 1967; Nagai *et al*., 1974) เนื่องจากไม่มีวิธีการรักษาโรคไวรัสพืชที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสเพื่อคัดกรองพืชที่ปราศจากโรคสำหรับการเพาะปลูกจึงเป็นวิธีการที่ช่วยในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ การตรวจวินิจฉัยที่นิยมใช้สำหรับเชื้อไวรัสพืชโดยทั่วไป ได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ polymerase chain reaction (PCR) แต่วิธีการดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่อยู่ในห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ และใช้เวลาหลายชั่วโมงในการตรวจวินิจฉัย ดังนั้นชุดตรวจสอบแบบรวดเร็วชนิดอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป (immunochromatographic strip, ICS) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้การตรวจสอบทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถพกพาไปยังแปลงปลูกได้ ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและเครื่องมือพิเศษในการใช้งาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิต ICS ที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV และทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจหาไวรัสในตัวอย่าง ได้แก่ ความจำเพาะ ความไว และความแม่นยำ รวมทั้งศึกษาสภาพการเก็บรักษาที่เหมาะสมซึ่งจะช่วยยืดอายุการใช้งาน

ของชุดตรวจสอบเพื่อประโยชน์ในการใช้งานและการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์

เตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CGMMV ที่ผลิตโดยการฉีดกระต่ายพันธุ์ New Zealand White ด้วยเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งผ่านการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อไวรัสพืช 14 ชนิด พบว่า มีความจำเพาะกับ CGMMV เท่านั้น (สุพจน์, 2551) นำแอนติซีรัมมาตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (Deutcher, 1990) จากนั้น ผ่านลงใน Rec Protein A-Sepharose column (ZYMED, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต เก็บตัวอย่าง fraction ละ 1 มล. จำนวน 5 fraction ปรับค่า pH ให้เป็นกลางโดยรองก้นหลอดด้วย 2 M Tris, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไป dialyse ใน 0.5xPBS, pH 7.4 ข้ามคืนที่ 4°ซ. (Deutcher, 1990) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ IgG โดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

2. การติดฉลากอนุภาคทองกับแอนติบอดี

ติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG โดยใช้อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) ปริมาตร 10 มล. ปรับค่า pH ให้ได้ 7.3 ด้วย 0.2 โมล KCO_3 เติม IgG ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 1 ชม. เติม 10% Bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 1 มล. กวนต่อ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer, pH 7.4 ให้ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20% เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (IgG-gold conjugate) ที่ 4°ซ. (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2550)

3. การผลิตชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป (ICS)

ผลิต ICS โดยดัดแปลงจากวิธีการของกันตินันท์ (2551) ชุดตรวจสอบประกอบด้วย 1) sample application pad (SAP) 2) conjugate releasing pad (CRP) ซึ่งทั้งสองส่วนใช้ glass ber (Whatman, USA), 3) nitrocellulose membrane (NCM) ใช้ Prima 40 (Whatman, Germany) เป็นส่วนแสดงผล และ 4) absorbent pad (AP) ใช้กระดาษ 3MMChr (Whatman, Germany) วางชิ้นส่วนต่าง ๆ บน backing pad ใช้ระยะดังนี้ 0-1.6 (SAP), 1.5-2.1 (CRP), 2.0-4.5 (NCM) และ 4.4-6.0 (AP) ซม. ตามลำดับ จากปลายของ ICS ด้านล่างสำหรับ CRP ฉีดพ่นด้วย IgG-gold conjugate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/ซม. บริเวณ test line (T) ฉีดพ่นด้วย IgG ความเข้มข้น 1 มก./มล. (ฉีด 2 ครั้ง) และ control line (C) ฉีดพ่นด้วย Goat anti-rabbit IgG antibody (GAR) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 มก./มล. อัตรา 0.5 ไมโครลิตร/ซม. ห่างจากปลายของ ICS ด้านล่าง 1.0 และ 1.5 ซม. ตามลำดับ การฉีดพ่นทำโดยเครื่อง Biojet XYZ 2000 (Biodot, USA) อบแผ่น CRP และ NCM ให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 37°ซ. นาน 2 ชม. ประกอบชุดตรวจสอบโดยวางแต่ละชิ้นส่วนเหลื่อมกัน 1 มม. ตัดส่วนประกอบให้มีขนาด 0.4x6 ซม. ด้วยเครื่อง BioDot Cutter V3.09 (Biodot, USA) (Figure 1)

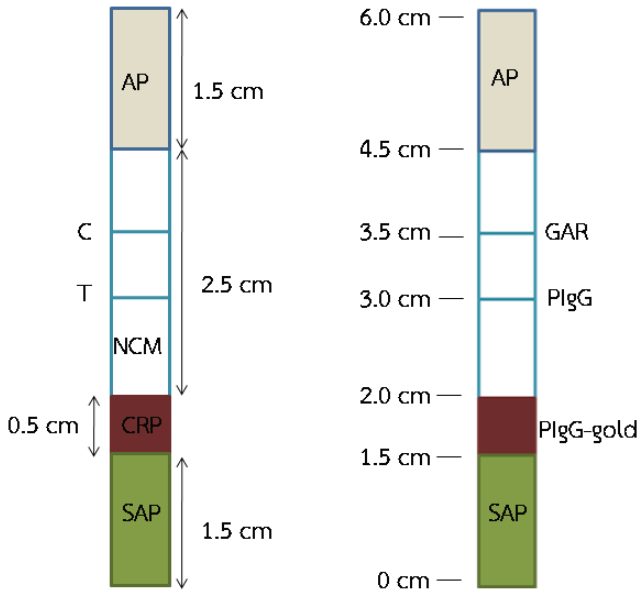


Figure 1 Schematic diagram of the ICS format composing of a sample application pad (SAP); a conjugate release pad (CRP) with immobilized IgG-gold conjugate; a nitrocellulose membrane (NCM) with immobilized IgG and GAR at the test and control lines, respectively; and an absorbent pad (AP)

4. การทดสอบ extraction buffer สำหรับการบดตัวอย่างพืช

ทดสอบ ICS กับ extraction buffer ที่จะใช้ในการบดตัวอย่างพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่

1) Adgen buffer [Polyvinylpyrrolidone (PVP) 20 g. + Ovalbumin 2 g. + Sodium sulte (anhydrous) 1.3 g. + Sodium azide 0.2 g. + Tween-20 0.5 ml. + NaCl 8 g. + Potassium dihydrogen orthophosphate 0.2 g. + disodium hydrogen orthophosphate 1.5 g. + KCl 0.2 g. ปรับให้ได้ pH 7.4 และปริมาตร 1,000 มล. (Adgen, UK)

2) Agdia buffer [Sodium sulte (anhydrous) 1.3 g. + PVP 20 g. + Sodium azide 0.2 g. + Powderedegg (chicken) albumin 2 g. + Tween-20 20 ml. ผสมในสารละลาย PBST ปริมาตร 1,000 ml. ปรับให้ได้ pH 7.4] (Agdia, USA)

3) DOA buffer (PVP 10 g. + Sodium sulte4 g. + Triton X-100 10 ml. Na_2BO_3 38.10 g. + SDS 3 g. ปรับให้ได้ pH 8.6 และปริมาตร 1,000 ml.) (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2550)

4) Bioreba buffer [Tris-(hydroxymethyl) aminomethane 2.4 g. + NaCl 6 g. + PVP 20 g. + Tween-20 0.5 ml. + KCl0.2 g. + NaN_3 0.2 g. ปรับให้ได้ pH 7.4 และปริมาตร 1,000 ml.) (Bioreba, Switzerland)

5) PBST (NaCl 8 g. + $Na_2HPO_4.12H_20$ 2.9 g. + KH_2PO_4 0.2 g. + KCl 0.2 g. + Tween-20 0.5 ml. ปรับให้ได้ pH 7.4 และปริมาตร 1,000 ml. (Crowther, 2001)

คัดเลือกบัฟเฟอร์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน control line และไม่เกิด false positive บน test line เพื่อทดสอบกับน้ำคั้นพืชต่อไป

5. การทดสอบความจำเพาะ (Specicity) ของ ICS

ทดสอบความจำเพาะของ ICS ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ 13 ชนิด ได้แก่ CGMMV, *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Odontoglossum ring spot virus* (ORSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Brome mosaic virus* (BMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Potato virus Y* (PVY), *Passionfruit woodiness virus* (*PWV*), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Chili*

veinal mottle virus (CVMV), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) โดยนำตัวอย่างใบพืชเป็นโรคที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ว่ามีเชื้ออยู่จริงมาบดใน DOA extraction buffer อัตราส่วน 1:10 (W/V) จากนั้น หยดน้ำคั้นพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนส่วน SAP ของชุดตรวจสอบ ICS ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ อ่านผลการทดลองเมื่อครบ 5 นาทีหลังจากหยดตัวอย่าง

6. การทดสอบความไว (Sensitivity) ของ ICS ในการตรวจเชื้อ CGMMV

ทดสอบความไวของ ICS ในการตรวจเชื้อ CGMMV โดย 1) ทดสอบกับเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. (สุพจน์, 2551) เจือจางแบบ 2 เท่า ทั้งหมด 16 ความเข้มข้น 2) ทดสอบกับน้ำคั้นแตงกวาที่เป็นโรค โดยบดตามวิธีการในข้อ 5. และเจือจางแบบ 2 เท่า โดยมีน้ำคั้นแตงกวาปกติและบัฟเฟอร์เป็น negative control 3) ทดสอบกับสารแขวนลอยดินที่ผสมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ โดยนำดินนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaved) มาเติม DOA extraction buffer (1:10) คนให้เข้ากันและรอให้ดินตกตะกอนประมาณ 3-5 นาที ดูดสารแขวนลอยดินใส่หลอดทดสอบใหม่ และเติมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์เป็น 50 ไมโครกรัม/มล. จากนั้น เจือจางแบบ 2 เท่า อีก 16 ความเข้มข้น เพื่อทดสอบกับ ICS โดยมีสารแขวนลอยปลอดเชื้อและบัฟเฟอร์เป็น negative control สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบน ICS ภายในเวลา 5 นาที แล้วบันทึกผล

7. การทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นใบพืชและเมล็ดของพืชอาศัยในวงศ์แตง

นำพืชวงศ์แตงที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อ CGMMV จำนวน 13 ชนิด ได้แก่ แตงกวา แตงโม แตงร้าน แคนตาลูป น้ำเต้า ฟักทอง แฟงใหญ่ แตงไทย มะระ บวบ ตำลึง เมลอน และซุกินี มาทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ที่พัฒนาขึ้น โดยทดสอบพืชตัวอย่างเบื้องต้นด้วยวิธี ELISA ว่าไม่มีเชื้อ CGMMV แล้วนำตัวอย่างมาบดใน DOA extraction buffer อัตราส่วน 1:10 ส่วนเมล็ดนำมาบดในอัตราส่วน 1 เมล็ดต่อบัฟเฟอร์ 1 มล. จากนั้นเติม CGMMV บริสุทธิ์ลงในน้ำคั้นพืช และน้ำบดเมล็ดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 ไมโครกรัม/มล. (เป็นความเข้มข้นที่เคยทดสอบเบื้องต้นว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนโดยวิธี ELISA) หยดน้ำคั้นพืชที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบน ICS ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นพืชและน้ำคั้นเมล็ดพืชที่ไม่เติมเชื้อ CGMMV

8. การทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ในการตรวจตัวอย่างพืชโดยเปรียบเทียบกับวิธีการ ELISA

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง 3 ชนิด ได้แก่ แตงกวา น้ำเต้า และฟักทอง ที่แสดงอาการใบด่างเขียว จำนวน 6 ตัวอย่าง และที่ไม่แสดงอาการใบด่าง จำนวน 4 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จากพื้นที่ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม ทดสอบโดยใช้ ICS ตามวิธีข้อที่ 5 เปรียบเทียบกับวิธี triple antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA) (สุพจน์, 2551) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

9. การทดสอบสภาพการเก็บรักษา ICS ระยะเวลา 12 เดือน

ทดสอบการเก็บรักษา ICS ในสภาพต่าง ๆ โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่

1) บรรจุภัณฑ์ ได้แก่ หลอดทดลองและถุงซิปโดยนำ ICS มาเก็บในหลอดทดลองขนาด 15 มล. (CORNING, USA) หรือ ถุงซิปขนาด 3 x 4 นิ้ว ใส่สารดูดความชื้น (Silica gel) น้ำหนัก 3.5 ก./ถุง/หลอด

2) สภาพแสง ภายใต้แสงธรรมชาติโดยเก็บในตู้กระจกในห้องปฏิบัติการ หรือ ในที่มืดโดยห่อบรรจุภัณฑ์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

3) สภาพอุณหภูมิ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-32°ซ.) ในตู้กระจก หรือ ในตู้เย็นที่ 4°ซ.

แบ่งการทดลองเป็น 8 รูปแบบดังต่อไปนี้

1. สภาพหลอดทดลอง แสงธรรมชาติ อุณหภูมิห้อง
2. สภาพหลอดทดลอง แสงธรรมชาติ อุณหภูมิ 4°ซ.
3. สภาพหลอดทดลอง ในที่มืด อุณหภูมิห้อง
4. สภาพหลอดทดลอง ในที่มืดอุณหภูมิ 4°ซ.
5. สภาพถุงซิป แสงธรรมชาติ อุณหภูมิห้อง
6. สภาพถุงซิป แสงธรรมชาติ อุณหภูมิ 4°ซ.
7. สภาพถุงซิป ในที่มืด อุณหภูมิห้อง
8. สภาพถุงซิป ในที่มืดอุณหภูมิ 4°ซ.

ทำการเตรียมชุดตรวจสอบ ICS สำหรับเก็บในรูปแบบต่าง ๆ โดยแต่ละรูปแบบจะเตรียมทั้งหมด 12 ชุด และสุ่มชุดตรวจสอบ ICS มาตรวจประสิทธิภาพทุกเดือน ๆ ละ 1 ชุด เป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยทดสอบเปรียบเทียบกับน้ำคั้นพืชปกติน้ำคั้นพืชเป็นโรคและน้ำคั้นพืชปกติที่ผสมเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบก่อนการเก็บรักษา (control)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์

IgG บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1-2 มก./มล. รวมทั้งสิ้น 20.3 มก. จากแอนติซีรัม 4 มล. และมีความบริสุทธิ์สูงจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยเกิดแถบขนาด 50 และ 25 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของ heavy chain และ light chain ตามลำดับ

2. การทดสอบ extraction buffer ที่เหมาะกับชุดตรวจสอบอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริป

รูปแบบของ ICS ที่ผลิตขึ้นเมื่อนำไปทดสอบกับบัฟเฟอร์ 5 ชนิด พบว่า DOA extraction buffer ให้ผลดี คือ เกิดปฏิกิริยาบน control line ชัดเจนโดยไม่มี false positive เกิดขึ้นที่ test line แต่พบผล false positive เกิดขึ้นเมื่อใช้ extraction buffer อีก 4 ชนิด คือ PBST, Adgen, Agdia และ Bioreba และเมื่อนำ ICS มาทดสอบกับน้ำคั้นพืชปกติและน้ำคั้นพืชที่เป็นโรคที่บดใน DOA extraction buffer พบว่าให้ปฏิกิริยาชัดเจนเช่นเดียวกัน จึงเลือกใช้ DOA extraction buffer ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของ ICS

การทดสอบ ICS ที่พัฒนาขึ้นกับน้ำคั้นพืชเป็นโรค 13 ชนิด พบว่า ICS สามารถตรวจเชื้อ CGMMV ได้อย่างชัดเจนและไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อทั้งหมดอีก 12 ชนิด ที่นำมาทดสอบ (Figure 2)

4. การทดสอบความไว (Sensitivity) ของ ICS ในการตรวจเชื้อ CGMMV

ICS ที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจเชื้อ CGMMV บริสุทธิ์และน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ระดับ 0.098 ไมโครกรัม/มล. และน้ำคั้นพืชเป็นโรคเ จือจางได้ถึง 1:10,000 โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชปกติ และสามารถตรวจเชื้อ CGMMV ในสารแขวนลอยดินได้ความไวที่ระดับ 0.024 ไมโครกรัม/มล.

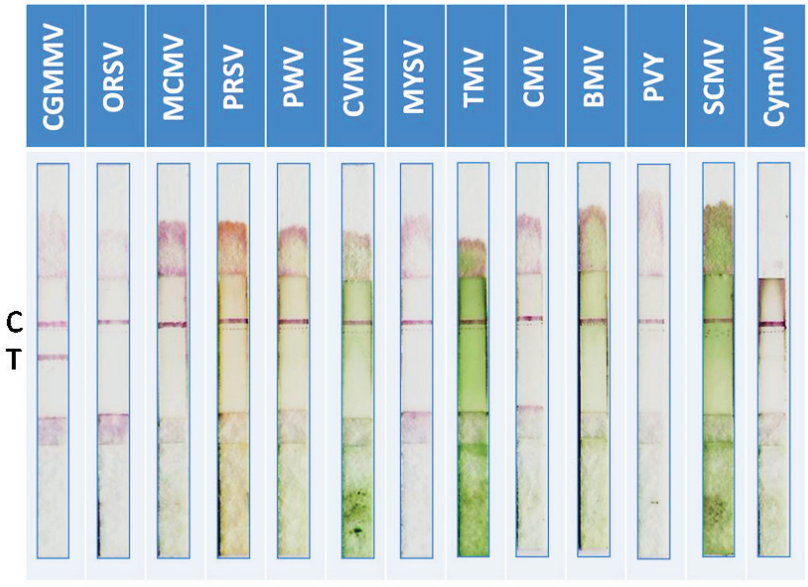


Figure 2 Specificity testing of the developed ICS showed highly specific reaction with CGMMV (C = control line and T = test line)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นใบพืชและเมล็ดของพืชอาศัยในวงศ์แตง

การทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ในการตรวจสอบเชื้อ CGMMV ในน้ำคั้นใบพืชและน้ำบดเมล็ดพันธุ์ของพืชตระกูลแตงทั้ง 13 ชนิด พบว่า สามารถใช้ตรวจได้โดยไม่มีปฏิกิริยารบกวนจากสารชนิดอื่นที่ละลายอยู่ในตัวอย่างน้ำคั้นพืชและน้ำบดเมล็ด (non specific reaction) และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชปกติทุกชนิด (Figure 3 and 4) ที่นำมาทดสอบ ICS ที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV ที่ผลิตจากงานวิจัยนี้เป็นชุดตรวจสอบแรกที่ผลิตขึ้นได้ในประเทศไทย ซึ่งราคาถูกกว่าจากต่างประเทศประมาณ 2-5 เท่า (ขึ้นกับจำนวน ICS) จากการตรวจเอกสาร รายงานนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงถึงประสิทธิภาพการตรวจสอบ CGMMV ในสารแขวนลอยดินและในน้ำบดเมล็ดพันธุ์

6. การทดสอบประสิทธิภาพของ ICS ในการตรวจตัวอย่างพืชโดยเปรียบเทียบกับวิธีการ ELISA

การตรวจสอบประสิทธิภาพของ ICS โดยใช้ตัวอย่างพืช 3 ชนิด ได้แก่ แตงกวา น้ำเต้า และฟักทอง รวม 10 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธี TAS-ELISA จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันทุกตัวอย่างที่ตรวจด้วย ICS โดยตรวจพบตัวอย่างที่เป็นโรค จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค จำนวน 4 ตัวอย่าง (Figure 5)

7. การทดสอบสภาพการเก็บรักษา ICS ระยะเวลา 12 เดือน

การทดสอบ ICS ที่เก็บในสภาพต่าง ๆ รวม 8 รูปแบบ เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า ICS ที่เก็บรักษาไว้ครบ 1 เดือน ยังคงเกิดปฏิกิริยาชัดเจน ไม่แตกต่างจากชุดตรวจสอบก่อนการเก็บรักษา หลังการเก็บรักษาครบ 3 เดือน พบว่า ICS ที่เก็บในถุงซิปที่สภาพแสงธรรมชาติและอุณหภูมิห้อง (รูปแบบที่ 5) มีปฏิกิริยาลดลงมากที่สุด รองลงมา คือ การเก็บในถุงซิปที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืด (รูปแบบที่ 7) พบเส้นปฏิกิริยาสีซีดจาง

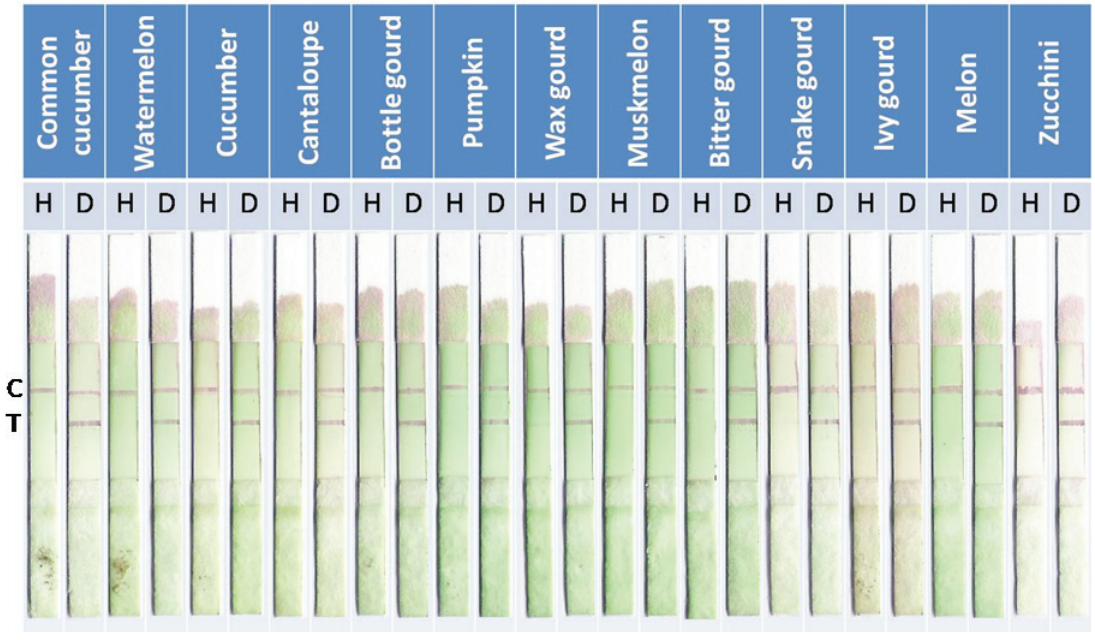


Figure 3 Detection of CGMMV-contaminated cucurbits (D) compared to the healthy Sap (H) by using the developed ICS

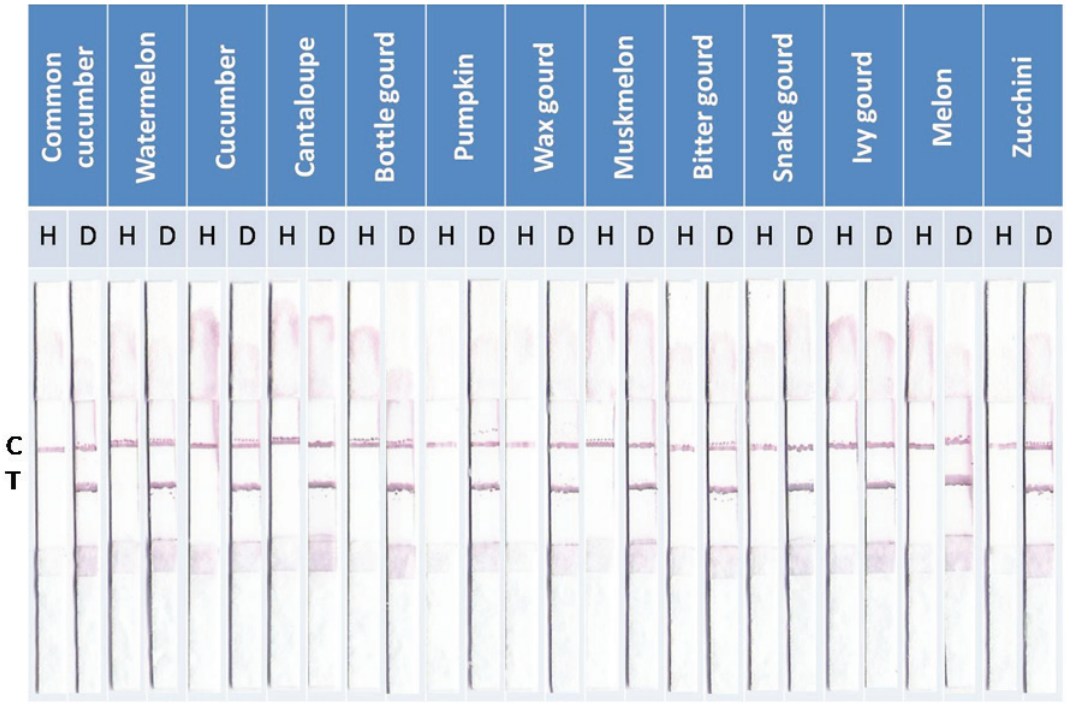


Figure 4 Detection of CGMMV-contaminated extracted seed samples compared to the non-contaminated extracted seed samples (H) by using the developed ICS

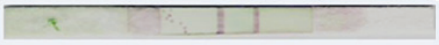
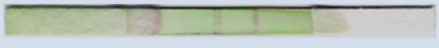
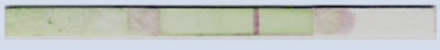
Samples	ICS	Result	TAS-ELISA
S1 Cucumber		-	0.280 (-)
S2 Cucumber		+	1.848 (+)
S3 Bottle gourd		+	1.687 (+)
S4 Bottle gourd		+	1.833 (+)
S5 Pumpkin		-	0.236 (-)
S6 Cucumber		+	1.717 (+)
S7 Bottle gourd		+	1.628 (+)
S8 Pumpkin		-	0.210 (-)
S9 Cucumber		-	0.278 (-)
S10 Cucumber		+	1.713 (+)

Figure 5 Efficacy evaluation of the developed ICS by testing with ten collected cucurbit samples compared to TAS-ELISA (A cut off value in TAS-ELISA is twice of the average value from the negative control which was 0.308, (data not shown)

ขณะที่ ICS ที่เก็บในหลอดทดลองยังคงให้เส้นปฏิกิริยาที่ชัดเจน เช่นเดียวกับ ICS ก่อนการเก็บรักษา

เมื่อเก็บรักษา ICS ไว้เป็นระยะเวลา 4 5 และ 6 เดือน พบว่า ปฏิกิริยาบน ICS ที่เก็บในถุงซิปอุณหภูมิห้อง (รูปแบบที่ 5) ลดลงมากจนถึงไม่เห็นปฏิกิริยาเลยเมื่อเก็บรักษาไปจนครบ 6 เดือน โดยสังเกตได้ว่าบริเวณ CRP มีสีเข้มของ conjugate ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนตัวได้ตามปกติ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างในขณะที่ ICS ที่เก็บรักษาในถุงซิป อุณหภูมิ 4°ซ. ทั้งในที่มืดและสว่าง (รูปแบบที่ 6 และ 8) และ ICS ที่เก็บในหลอดทดลองทั้ง 4 สภาพการเก็บรักษานั้น (รูปแบบที่ 1-4) ยังคงให้เส้นปฏิกิริยาที่มีสีเข้มใกล้เคียงกับเมื่อเริ่มการทดลอง (Table 1)

Table 1 Study on the appropriate condition for long-term storage of the ICS for 12 months. The ICSs were stored with desiccant in 8 formats; conical tube or ziplock bag; under natural light or dark; and stored at room temperature (RT) or 4 °C

Condition			Long-term storage (months)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conical tube	Natural light	RT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dark	RT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ziplock bag	Natural light	RT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dark	RT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ positive reaction ontest line - no reaction on test line

การทดสอบประสิทธิภาพเมื่อเก็บรักษาไว้ครบ 12 เดือน พบว่า ICS ที่เก็บในสภาพหลอดทดลองทั้ง 2 อุณหภูมิ ในสภาพแสงธรรมชาติและในที่มืด (รูปแบบที่ 1-4) ยังคงให้เส้นปฏิกิริยาที่เข้มเช่นเดียวกับเมื่อเริ่มการทดลอง และการเก็บในสภาพถุงซิปที่อุณหภูมิ 4°ซ. ทั้งในที่มืดและสว่าง (รูปแบบที่ 6 และ 8) ยังคงให้เส้นปฏิกิริยาใกล้เคียงกับเมื่อเริ่มการทดลองเช่นเดียวกัน

ในภาพรวมการเก็บรักษา ICS โดยเปรียบเทียบสภาพการเก็บรักษา 3 สภาพ คือ บรรจุภัณฑ์ พบว่า การเก็บในหลอดทดลองดีกว่าถุงซิป เนื่องจาก หลอดทดลองมีฝาที่ปิดสนิทรวมทั้งการพันด้วยพาราฟิล์มอีกชั้น ทำให้ป้องกันความชื้นเข้าได้ดีขึ้น ซึ่งความชื้นมีผลกระทบต่อแรงแคบปิลลารี่ (capillary flow) ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของสารไปทำปฏิกิริยาที่ CRP, Test line และ control line ตามลำดับ ส่วนถุงซิปถึงแม้ว่าจะปิดได้สนิทแต่อากาศและความชื้นยังถ่ายเทได้ง่ายกว่าหลอดทดลองดังกล่าว พิจารณาได้จากรูปแบบที่ 1-4 ที่เก็บในหลอดทดลองยังคงให้เส้นปฏิกิริยาที่ชัดเจนแม้จะผ่านมานานถึง 12 เดือน ส่วนรูปแบบที่ 5 และ 7 ที่เก็บในถุงซิปนั้นปฏิกิริยาเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนแรกและจางหายไปหลังจากเก็บรักษาไว้ 3 เดือน

การเปรียบเทียบสภาพแสงและอุณหภูมิ พบว่า การเก็บในสภาพแสงธรรมชาติและในที่มืดไม่มีความแตกต่างกันหากอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 4°ซ. อย่างไรก็ตามแนะนำให้เก็บรักษาไว้ในที่มืด เนื่องจาก ICS มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ NCM ซึ่งคำแนะนำของบริษัทควรเก็บในที่มืดและมีสารดูดความชื้น (Whatman, USA) ส่วนแอนติบอดีและอนุภาคทองที่เป็นสิ่งแสดงผลนั้นก็มีคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตให้เก็บไว้ในที่มืด ภายใต้อุณหภูมิ 4°ซ. เช่นกัน (Biodot, USA; Liu *et al*., 2017)

ผลจากงานวิจัยนี้ พบว่า การเก็บรักษาที่ 4°ซ. ยังคงรักษาประสิทธิภาพของ ICS ได้ดีที่สุดจนครบ 12 เดือน (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Liu *et al*. (2017) ที่สามารถเก็บ ICS ที่จำเพาะกับเชื้อ *Spiroplasma eriocheiris* ซึ่งเข้าทำลายคลัสเตเชียนได้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและนาน 12 เดือน ที่ 4°ซ. โดยไม่มีผลต่อความไวในการตรวจสอบ ขณะที่ Zhihao *et al*., (2018) รายงานว่า เก็บรักษา ICS ที่จำเพาะต่อเชื้อ H7N9 *Inuenza virus* ไว้ได้เพียง 10 เดือนเท่านั้น ภายใต้อุณหภูมิ 4°ซ. โดยมีสารดูดความชื้น แต่ทั้งสองรายงานไม่ได้ระบุบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ นอกจากนั้น Xiang and Li (2011) ซึ่งเก็บรักษา ICS ที่จำเพาะกับเชื้อ *Human cytomegalovirus* ไว้ที่ 4°ซ. ในถุงพลาสติก พบว่า ICS ที่เก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทนั้นจะมีอายุการใช้งานอย่างน้อย 12 เดือน แต่มีการสูญเสียความไวในการตรวจสอบ สำหรับงานวิจัยนี้แม้ว่าผลการวิจัยจะยืนยันประสิทธิภาพของการตรวจสอบที่ 12 เดือน แต่การแสดงผลที่ test line และ control line ยังมีคุณภาพดีไม่ต่างจากการเก็บในเดือนแรก ดังนั้น หากทำการศึกษาต่อไป ผู้วิจัยเชื่อมั่นว่าสภาพการเก็บรักษาในหลอดทดลอง โดยมีสารดูดความชื้น ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ในที่มืด จะยังคงรักษาประสิทธิภาพของ ICS ชนิดนี้ได้นานขึ้นอีก

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนา ICS เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CGMMV โดยใช้ IgG-gold conjugate ฉีดพ่นที่บริเวณ CRP ส่วนที่ test line และ control line ฉีดพ่นด้วย IgG และ GAR ตามลำดับ บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการใช้บดตัวอย่าง คือ DOA extraction buffer อัตราส่วน 1:10 (ใบพืช : buffer) ใช้เวลาในการสังเกตปฏิกิริยา

ภายใน 5 นาที ICS ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูงกับเชื้อ CGMMV โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติและไวรัสชนิดอื่น 12 ชนิด ที่นำมาทดสอบ และสามารถใช้ ICS ในการตรวจเชื้อไวรัสในน้ำคั้นของใบและเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงชนิดอื่นได้ มีความไวในการตรวจสอบเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ 0.098 ไมโครกรัม/มล. สามารถใช้ตรวจน้ำคั้นที่เจือจางได้ถึงระดับ 1:10,000 และความไวในการตรวจเชื้อ CGMMV ในสารแขวนลอยดินที่ระดับ 0.024 ไมโครกรัม/มล. และประสิทธิภาพของ ICS ให้ผลสอดคล้องกับวิธี TAS-ELISA การเก็บรักษา ICS แนะนำให้เก็บรักษาไว้ในหลอดทดลองที่มีวัสดุดูดความชื้น ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ในที่มืด สามารถเก็บได้นาน 12 เดือน โดย ICS ยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจเชื่อไวรัสได้ดีเท่ากับชุดตรวจสอบ ICS ก่อนการเก็บรักษา

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

กันตินันท์ ลีธนศักดิ์สกุล. 2551. การพัฒนาชุดทดสอบแบบรวดเร็วโดยใช้เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีคเพื่อตรวจหาเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

สุพจน์ ภูมิสุข. 2551. การผลิตแอนติบอดีและการตรวจเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2550. เอกสารประกอบการอบรม เรื่อง การผลิตชุดตรวจสอบไวรัสเพื่อใช้เอง GLIFT kit. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 50 หน้า.

Crowther, J.R. 2001. The ELISA Guidebook. In Methods in Molecular Biology, vol. 149. Humana Press, Inc. 421 pp.

Deutcher, M.P. (ed.). 1990. Guide to protein purication. *In* : Methods in enzymology, vol. 182. Academic press, Inc., San Diego. 894 pp.

Dombrovsky, A.; L.T.T. Tran-Nguyen and R.A.C. Jones. 2017. *Cucumber green mottle mosaic virus*: Rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management. *Ann. Rev. Phytopathol.* 55: 231–256.

Fletcher, J.T. 1969. *Cucumber green mottle mosaic virus*, its effect on yield and its control in the Lea Valley, England. *Plant Pathol.* 18: 16–22.

Inoue, T.; N. Inoue; M. Asatani and K. Mitsuhata. 1967. Studies on *Cucumber green mottle mosaic virus*

in Japan (in Japanese). *Nogaku Kenkyu* 51: 175–186.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Ling, K.-S.; Li, R. and Zhang, W. 2014. First Report of *Cucumber green mottle mosaic virus* Infecting greenhouse cucumber in Canada. *Plant Dis*. 98: 701

Liu, H.; Y. Xiu; Y. Xu; M. Tang, S. Li; W. Gu,; Q. Meng and W. Wang. 2017. Development of a colloidal gold immunochromatographicassay (GICA) for the rapid detection of *Spiroplasma eriocheiris* in commercially exploited crustaceans from China. *J. Fish Dis.* 40: 1839–1847.

Nagai Y.; T. Tok and R. Fukatsu. 1974. Studies on the virus disease and fruit deterioration of watermelon of *Cucumber green mottle mosaic virus*–watermelon strain I. Occurrence, epidemiology and control of the virus disease of watermelon. *Bull. Chiba Ken Agri. Exp. Stat.* 15: 1–53.

Xiang L. and L. Li. 2011. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for the detection of Human cytomegalovirus. *Letters Appl. Microbiol*. 52: 233–238.

Zhihao, S.; B. Shi; F. Meng; R. Ma; Q. Hu; T. Qin; S. Chen; D. Peng and X. Liu. 2018. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of H7N9 Influenza viruses. *Front. Microbiol*. 9: 1–8.