รายงานการวิจัย

การผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแตงในพริก

Production of Antiserum for Diagnosis of *Cucumber mosaic virus* in Chili Plants

โดย

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา สดุดี อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ได้ดูแลเอาใจใส่และให้คำปรึกษาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนี ฮงประยูร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อาจารย์ประจำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ anti-CMV monoclonal antibody เชื้อไวรัส CMV ไอโซเลท 30RS และเชื้อ CVMV, PVY, TMV และ TSWV

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม สำหรับสถานที่ทดลอง อุปกรณ์ และเครื่องมือ เพื่อให้ดำเนินการวิจัยได้สำเร็จลุล่วงลงได้ดี

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

เมษายน 2554

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ในพริก เริ่มจากนำเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS (CMV 30RS) ที่แยกได้จากพริก มาเพิ่มปริมาณในยาสูบ *Nicotiana glutinosa* แยกสกัดเชื้อ CMV บริสุทธิ์จากใบยาสูบโดยใช้วิธี sucrose density gradient centrifugation ปริมาณเชื้อ CMV ที่สกัดได้เท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อใบยาสูบหนัก 500 กรัม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ข องอนุภาคไวรัสด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) นำเชื้อ CMV บริสุทธิ์มาเตรียมเป็นแอนติเจน โดยผสมกับ Freund's complete adjuvant อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ของ กระต่ายพันธุ์ New Zealand White ในครั้งแรก หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดเชื้อ CMV บริสุทธิ์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ เก็บเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหูกระต่ายตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5-12 หลังการฉีดครั้งแรก การตรวจหาค่าไตเตอ ร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 8,000-1,024,000 แอนติซีรัม ที่ผลิตได้มีความจำเพาะเจาะจงกับ เชื้อ CMVทั้ง subgroup I, II และเชื้อ CMV ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากพริกทั้งหมด 15 ไอโซเลท แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่เข้าทำลายพริก

Abstract

Production of antiserum specific to anti-*Cucumber mosaic virus* (CMV) antiserum was raised using CMV30RS isolated from chili. The virus was inoculated into *Nicotiana glutinosa* and purified by sucrose gradient centrifugation. Total of 8 mg of purified CMV per 500 g fresh weight leaves was obtained and purity of virus preparation was analyzed by SDS-PAGE. The CMV antigen was prepared by mixing 1 mg of purified virus with Freund's complete adjuvant at a ratio of 1:1 (v/v). Emulsion was subcutaneously injected into a New Zealand White rabbit for the first time, followed by 3 additional immunizations with 1 mg of purified virus mixed with Freund's incomplete adjuvant at weekly intervals. Bleeding was done every week during week 5-12. Titers of the antisera were determined by indirect ELISA which ranged from 8,000-1,024,000. The produced antiserum was highly specific to CMV of both subgroup I, II and 15 samples of CMV isolated from chili no cross- reaction with other virus species tested was observed.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
หลักการละเหตุผล	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตการวิจัย	3
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลและวิจารณ์ผลกาทดลอง	15
สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	36
ประวัตินักวิจัยหัวหน้าโครงการ	41

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ความสามารถของบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างใบพริกเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA 25

2 ความสามารถในการป้องกันการเกิด non-specific reaction ของ blocking solution 2 ชนิด ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) และ skim milk (SK) เพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA 26

3 ความสามารถของบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างใบพริกเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA 27

4 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสจำนวน 7 ชนิด ที่เข้าทำลายพริก ด้วยวิธี indirect ELISA 29

5 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ด้วยวิธี indirect ELISA 30

ตารางผนวกที่

ก1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริกและเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ด้วยวิธี indirect ELISA 37

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นลำโพงปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS แสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน	16
2	ผลการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS จากต้นลำโพงด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV (ก) เปรียบเทียบกับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* แยกสกัดบริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็น positive control (ข) และตัวอย่างต้นลำโพงปกติซึ่งใช้เป็น negative control	17
3	พริกพันธุ์บางช้างปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบพริกมีรูปร่างผิดไปจากปกติ ลีบเรียวเล็กและลำต้นพริกแคระแกร็น หลังจากได้รับเชื้อไวรัสภายในระยะเวลา 30 วัน	18
4	ยาสูบ *Nicotiana glutinosa* แสดงอาการใบด่างด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยาสูบมีรูปร่างผิดไปจากปกติและลำต้นยาสูบแสดงอาการแคระแกร็นหลังจากได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS 30 วัน	20
5	ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ ด้วย 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ช่องที่ 1) และยาสูบ *Nicotiana glutinosa* ปกติ (ช่องที่ 2)	21
6	กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บเลือดจากกระต่าย	23
7	ผลของบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างใบพริกติดเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise (S/N) ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

8 ผลของบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างใบพริกติดเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจน ด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise (S/N) ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) 26

9 ผลของการเจือจางแอนติซีรัม (As-CMV) ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) 27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A 405	=	optical density at 405 nanometer wavelength
AMV	=	*Alfalfa mosaic virus*
anti-CMV MAb	=	anti-*Cucumber mosaic virus* monoclonal antibody
anti-CMV PAb	=	anti-*Cucumber mosaic virus* polyclonal antibody
BSA	=	bovine serum albumin
CB	=	carbonate coating buffer
CFA	=	Complete Freund's Adjuvant
CMV	=	*Cucumber mosaic virus*
CRD	=	completely randomized design
CVMV	=	*Chili veinal mottle virus*
DAS-ELISA	=	double - antibody sandwich enzyme - linked immunosorbent assay
DIECA	=	diethyldithiocarbamic acid sodium salt
DMRT	=	Duncan's New Multiple-Range Test
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	=	immunoglobulin G
IFA	=	Incomplete Freund's Adjuvant
indirect ELISA	=	indirect enzyme-linked immunosorbent assay
NaOH	=	sodium hydroxide
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20
PMMoV	=	*Pepper mild mottle virus*
PNPP	=	*p*-nitrophenyl phosphate
PVY	=	*Potato virus Y*
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SK	=	skim milk

S/N ratio	=	signal-to-noise ratio
TEV	=	*Tobacco etch virus*
TMV	=	*Tobacco mosaic virus*
TSWV	=	*Tomato spotted wilt virus*

การผลิตแอนติซีรัมสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแตงในพริก

Production of antiserum for diagnosis of *Cucumber mosaic virus* in chili plants

หลักการและเหตุผล

พริกจัดเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวันต่อประชากรทั่วทุกภาคของประเทศไทยมาช้านาน โดยเฉพาะประชากรในเขตพื้นที่ภาคใต้ อาจกล่าวได้ว่าอาหารปักษ์ใต้แทบทุกชนิดที่มีรสชาติอร่อย น่าลิ้มลองและเป็นสิ่งที่ประทับใจผู้คนทั้งภายในและต่างประเทศจนเป็นเอกลักษณ์นั้นมาจากความเผ็ดร้อนของรสชาติอาหารที่มาจากพริก ประโยชน์ของพริกนอกจากจะช่วยเพิ่มรสชาติและคุณค่าของอาหารแล้ว ในด้านเศรษฐกิจพริกเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยสูงกว่าพันล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากตลาดโลกยังมีความต้องการพริกอยู่อีกมาก

การเพาะปลูกพริกในเขตพื้นที่ภาคใต้มีทั้งที่ปลูกไว้เพื่อจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ตลาดค้าพริกที่สำคัญของภาคใต้ได้แก่ ตลาดหาดใหญ่ ตลาดหัวอิฐ และภูเก็ตตลาดส่งออกพริกในต่างประเทศที่สำคัญได้แก่ ประเทศมาเลเซียและสิงค์โปร แหล่งผลิตพริกที่สำคัญในภาคใต้ได้แก่ จังหวัดพัทลุง กระบี่ นครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา จากนโยบายส่งเสริมการปลูกพริกให้กับเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ของภาครัฐโดยกรมวิชาการเกษตร เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับสมาชิกในครัวเรือนยามว่างจากการทำสวนยางพารา ทำให้ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกพริกในภาคใต้ขยายเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการรายงานของศูนย์บริหารศัตรูพืช จังหวัดสงขลา พบว่าปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตพริกในพื้นที่ภาคใต้คือเรื่องของโรคและแมลงโดยเฉพาะโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัส จากการสำรวจโรคพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัสใน 13 จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกพริกขนาดใหญ่ โดยกลุ่มงานไวรัสของกรมวิชาการเกษตร พบว่ามีเชื้อไวรัสแพร่ระบาดในทุกแหล่งปลูก โดยอัตราการเป็นโรครุนแรงอยู่ระหว่าง 10-100% ซึ่งโรคใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*, CMV) และโรคใบด่างประของพริก (*Chili veinal mottle virus*, CVMV) เป็นโรคไวรัสที่แพร่กระจายมากที่สุดถึง 56.96% และ 26.67% ตามลำดับ การแก้ปัญหาโรคไวรัสของพริกทำได้โดยการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าพริกก่อนนำลงปลูกในแปลงหรือการตรวจสอบเชื้อไวรัสในช่วงที่มีการแพร่ระบาดซึ่งจะช่วยลดความเสียหายจากการถูกทำลายและลดค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดของเกษตรกรได้อย่างมาก

การตรวจสอบเชื้อ CMV ที่นิยมในปัจจุบันได้แก่ การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา โดยใช้วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ทำได้ง่ายและสามารถตรวจสอบพืชตัวอย่างได้คราวละมากๆ ให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำ และวิธีการตรวจสอบดังกล่าวสามารถใช้ได้ทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส แม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะมีข้อดีตรงที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ชนิดใดชนิดหนึ่งบนเชื้อ CMV เท่านั้น ซึ่งทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสสูงกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามโพลีโคลนอลแอนติบอดีก็ยังเป็นที่นิยมและมักถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CMV อยู่เสมอ เนื่องจากเชื้อ CMV เป็นไวรัสที่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายในสภาพแวดล้อม ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีผลโดยตรงต่ออีพิโทปบนผิวของไวรัส การใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีข้อดีตรงที่มีแอนติบอดีอยู่หลายชนิดในซีรัม ทำให้สามารถจับกับอีพิโทปที่อยู่บนผิวของไวรัสชนิดนี้ได้หลายรูปแบบ แม้จะต่างสายพันธุ์ต่างพื้นที่และต่างพืชอาศัยก็ตาม เพราะไวรัสชนิดเดียวกันแม้จะมีความแตกต่างกันแต่ก็จะมีบางอีพิโทปที่เหมือนกัน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CMV ในพื้นที่ปลูกพริกของภาคใต้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อการประเมินพันธุ์พริกต้านทานเชื้อ CMV ต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CMV ที่พบในแปลงปลูกพริกในภาคใต้

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อ CMV เป็นเชื้อไวรัสที่พบว่ามีการแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับพริกซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของเกษตรกรในภาคใต้ (Green, 1993) การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อ CMV มีพืชอาศัยจำนวนมากประกอบกับความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพืชเป็นโรคไปยังพืชปกติมีได้หลายวิธี ได้แก่ การสัมผัสกันระหว่างต้นพืช การถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ และการถ่ายทอดโรคโดยผ่านทางเมล็ด การตรวจสอบเชื้อไวรัสจากเมล็ดพันธุ์ก่อนนำลงไปปลูกในแปลงหรือตรวจสอบชิ้นส่วนของพริกในช่วงที่มีการแพร่ระบาดของแมลงพาหะด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV โดยใช้เทคนิคทางซีรัมวิทยาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมาก (Hsu และคณะ, 2000; Yu และคณะ, 2005; Haggag และคณะ, 2009) เพราะไม่เพียงแต่จะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสและการใช้สารเคมีฉีดพ่นเพลี้ยอ่อนได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถนำมาใช้คัดเลือกพันธุ์พริกที่ต้านทานเชื้อ CMV จากพันธุ์พริกที่มีอยู่ในปัจจุบันได้ในระยะเวลาอันสั้นอีกด้วย (สุจินต์ และคณะ, 2551) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเสนอการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ทั้งนี้เพื่อนำผลการวิจัยมาใช้ประโยชน์ให้กับเกษตรกรและพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชื้อ CMV ต่อไป

ตรวจเอกสาร

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ ผลผลิตพริกสามารถส่งจำหน่ายได้ทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ได้แก่ ประเทศมาเลเซียและสิงค์โปร แหล่งผลิตพริกที่สำคัญในภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดพัทลุง กระบี่ นครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา (พัชรี และคณะ, 2550; ปัญญา, 2552) อย่างไรก็ตามจากการรายงานของศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดสงขลา พบว่าปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตพริกในพื้นที่ภาคใต้ ก็คือเรื่องของโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV (พัชรี และคณะ, 2550; Green, 1993) จากการศึกษาของ ธีระ (2532) พบว่าลักษณะอาการของพริกที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้มีทั้งที่ไม่แสดงอาการของโรค (no symptom) จนถึงแสดงอาการใบด่าง (mosaic) แผลจุดตายเฉพาะแห่ง (necrosis) ใบลดขนาดเรียวเล็กคล้ายใบเฟิร์น (fern leaf) และต้นเตี้ยแคระแกร็น (stunting) โดยความเสียหายของพริกที่ติดเชื้อไวรัสมักส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตพริก

การตรวจสอบเชื้อ CMV ก่อนนำเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าพริกลงปลูกในแปลงหรือการตรวจสอบเชื้อไวรัสในช่วงที่มีการแพร่ระบาด เป็นการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้อีกวิธีหนึ่งซึ่งไม่เพียงแต่จะช่วยลดการแพร่ระบาดของเชื้อ CMV และความเสียหายของผลผลิตพริกจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดเพลี้ยอ่อนแมลงพาหะของเชื้อ CMV สำหรับเกษตรกรได้อย่างมาก (สุจินต์ และคณะ, 2551) การตรวจสอบเชื้อ CMV ที่นิยมในปัจจุบันได้แก่ การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาโดยใช้โมโนโคลนอลและโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส (Porta และคณะ, 1989; Wahyuni และคณะ, 1992; Hsu และคณะ, 2000; Haggag และคณะ, 2009) การตรวจสอบเชื้อ CMV โดยทั่วไปมักนิยมใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากเชื้อ CMV ซึ่งเป็นไวรัสที่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายในสภาพแวดล้อม และการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจมีผลโดยตรงต่ออีพิโทปบนผิวของไวรัส ซึ่งการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีมีข้อดีตรงที่มีแอนติบอดีอยู่หลายชนิดในซีรัม ทำให้สามารถจับกับอีพิโทปที่อยู่บนผิวของไวรัสชนิดนี้ได้หลายรูปแบบ แม้จะต่างสายพันธุ์กันก็ตาม (Roossinck, 2002) ดังการรายงานของ Wahyuni และคณะ (1992) ที่ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV สายพันธุ์ Y_{wa} ที่แยกได้จากถั่ว lupin ในประเทศออสเตรเลีย ด้วยวิธี gel immunodiffusion tests โดยดูผลจาก spur ที่เกิดขึ้น ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ตรวจสอบและศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ CMV ที่เข้าทำลายถั่ว lupin ในประเทศออสเตรเลียได้

ต่อมา Yordanova และคณะ (2002) ได้ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ในการวินิจฉัยโรคไหม้ที่ผลและลำต้นของมะเขือเทศในประเทศบัลแกเลียว่าเกิดจากเชื้อ CMV สายพันธุ์ NB ซึ่งนำไปสู่การหาวิธีการควบคุมโรคที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไปได้

นอกจากนี้ Bashir และคณะ (2006) รายงานความสำเร็จในการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ CMV ในพืชตระกูลแตงในแถบตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอิหร่าน จากการทดสอบด้วยวิธี Double - antibody sandwich enzyme - linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) และเมื่อนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) แล้ว สามารถเพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบและจำแนกกลุ่มเชื้อ CMV ที่แพร่ระบาดในประเทศ Iran ได้ ซึ่งข้อมูลการแพร่ระบาดของสายพันธุ์เชื้อ CMV ที่ได้ มีประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานเชื้อ CMV และการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ CMV เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

1.1 แหล่งที่มาของเชื้อ CMV

เนื่องจากในการทดลองยังขาดแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกเชื้อ CMV จากพริกในพื้นที่ปลูกในภาคใต้ได้โดยตรง ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ตัวอย่างเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างพริกที่เก็บได้จากจังหวัดปทุมธานี และผ่านการแยกให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวๆ (single isolation) บนใบถั่วพุ่มแล้ว นำมาใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรัมก่อน โดยเชื้อ CMV ไอโซเลทดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งทำการเพิ่มปริมาณและเก็บรักษาเชื้อไวรัสในต้นลำโพง (*Datura stramonium*)

1.2. การตรวจสอบเชื้อไวรัส CMV ด้วยวิธี indirect ELISA

ตรวจสอบต้นลำโพงที่ได้รับมาอีกครั้งว่าติดเชื้อไวรัส CMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีการของ มณีรัตน์ (2547) ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนี ฮงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) โดยบดตัวอย่างใบลำโพงที่ติดเชื้อไวรัสใน carbonate coating buffer (CB, pH 9.6) อัตราส่วนใบพืชเป็นโรคต่อบัฟเฟอร์ 1: 5 จากนั้นเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นพืช ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA ด้วย PBST [phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 +Tween 20] หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (supernatant) ที่มี anti-CMV monoclonal antibody (anti-CMV MAb) ที่เจือจางใน blocking solution (PBS+2% skim milk) อัตราส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ต่อ blocking solution เท่ากับ 1: 8 ลงในหลุม ELISA ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นล้างหลุม ELISA ด้วย PBST ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น เติมสารละลาย goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

ล้างหลุม ELISA ตามวิธีการข้างต้นแล้วเติมสับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3N NaOH ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A405) ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จาก anti-CMV MAb ทำปฏิกิริยากับใบลำโพงปรกติ 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control และ positive control คือ ตัวอย่างเชื้อ CMV ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสสวรรณ เจียมสมบัติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม)

1.3 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ CMV

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในพริก (*Capsicum annuum*) ของเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่ได้รับมาอีกครั้งก่อนการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส โดยการปลูกเชื้อ CMV ลงบนใบพริกอายุ 30-45 วัน ด้วยวิธีกลตามวิธีการของ มณีรัตน์ และ รัชนี (2547) โดยบดใบลำโพงติดเชื้อ CMV ใน 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร ในโกร่งแช่เย็น ผสมผงซีไลต์ (celite) ลงในน้ำคั้น จากนั้นทาน้ำคั้นพืชลงบนใบพริกทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ล้างใบพริกด้วยน้ำกลั่น เก็บต้นพริกที่ปลูกเชื้อในโรงเรือนซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.4 การเพิ่มปริมาณและการแยกสกัดเชื้อ CMV

เพิ่มปริมาณเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่ผ่านการทดสอบว่ายังคงความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพริกแล้ว โดยการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลตามวิธีการในข้อ 1.3 ข้างต้น ลงในยาสูบ *Nicotiana glutinosa* อายุ 45-60 วัน จากนั้นแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Lot และคณะ (1972) โดยเก็บใบยาสูบที่แสดงอาการใบด่าง (mosaic) หรือได้รับการปลูกเชื้อไวรัสมาแล้วประมาณ 30 วัน มาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นบดใบยาสูบ 500 กรัม ใน 0.5 M sodium citrate buffer, pH 6.5 ที่แช่เย็นและเติม 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) และ 0.5% thioglycollic acid อัตราส่วนใบยาสูบ 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่นที่แช่เย็น กรองน้ำคั้นด้วย ผ้าขาวบางแล้วนำ น้ำคั้นที่ได้ไปกวนต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกับเติม chloroform ลงในน้ำคั้นในอัตราส่วนปริมาตรน้ำคั้น1 มิลลิลิตรต่อ chloroform 1 มิลลิลิตร กวนนาน

3-5 นาที เมื่อครบกำหนดนำ น้ำคั้นมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (KUBOTA 7930, rotor GSA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสเติม 10% polyethylene glycol (PEG) (M.W. 6,000) นำ ไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไวรัสที่ได้ละลายใน suspending buffer (5 mM sodium borate buffer ที่ผสม 0.5 mM EDTA, pH 9.0) ปริมาตร 120-150 มิลลิลิตร เติม 2% Triton X-100 แล้วนำ ไปกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำ ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที (Optima TM L-90K Ultracentrifuge, rotor 50.2 Ti) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เก็บตะกอนไวรัสที่ได้ละลายใน suspending buffer ดูดสารละลายไวรัสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด sucrose gradient ความเข้มข้น 5-25% ที่เตรียมไว้ข้ามคืน นำ ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 40,000 รอบต่อนาที (rotor SW 41) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะสังเกตเห็นแถบของไวรัส (viral zone) ดูดสารละลายจากแถบนั้นแล้วนำไป dialyse ใน suspending buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง วัดความเข้มข้นของไวรัสที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของไวรัสที่สกัดได้ตามสูตร $C = A260/E260^{0.1\%}$ กำหนดค่า $E260^{0.1\%}$ ของเชื้อ CMV เท่ากับ 5.0 (Franki *et al*., 1966)

2. การตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV

ตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเชื้อ CMV ที่แยกสกัดได้โดยใช้ 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) อัตราส่วน 6% stacking gel และ 12% running gel ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำตัวอย่างสารละลายไวรัสที่สกัดได้จากข้อ 1.4 ผสมกับ 2X loading buffer (0.1% bromophenol blue, 4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol และ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำ ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อครบเวลาให้รีบแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายไวรัสลง หลุมละ 15 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ 30 นาที สำหรับเจลส่วน stacking gel และ 100 โวลต์ 100 นาที สำหรับ running gel ย้อมสีเจลด้วย staining solution (0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 ที่ละลายใน 50% methanol และ 7% acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25% methanol และ 7% acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CMV ที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (LabAid; protein molecular weight marker #SM0431) คำนวณน้ำหนักโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส

CMV ดัดแปลงจาก Wilson *et al*. (1985) (โดยการวัดระยะห่างของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละแถบจากหัว running gel จำนวน 3 เจล ค่าเฉลี่ยที่ได้นำ มาเขียนกราฟเทียบกับขนาดน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานหาน้ำหนักโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CMV โดยลากเส้นตัดกราฟ)

3. การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV

ทำตามวิธีการของ รัชนี (2549) โดยเก็บเลือดที่หูของกระต่ายก่อนที่จะฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ CMV เพื่อเป็น normal serum ซึ่งใช้เป็น negative control สำหรับแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากนั้นผสมเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS บริสุทธิ์ กับ Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1:1 ฉีดกระตุ้นกระต่ายพันธุ์ White New Zealand อายุ 2 เดือน จำนวน 1 ตัว โดยใช้ปริมาณไวรัส 1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนังทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยที่การฉีดในครั้งที่ 2-4 จะผสม Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) เก็บเลือดที่หูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และสัปดาห์ที่ 12

4. การตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม

หาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บได้ในแต่ละครั้งต่อเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ด้วยเทคนิค indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน carbonate coating buffer (CB) pH 9.6 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างหลุม ELISA ด้วย PBST [phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 +Tween-20] หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking solution (PBS+2% skim milk) แบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1:100 จนถึง 1:819,200 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว จึงล้างหลุม ELISA ด้วย PBST ตามวิธีการในข้อ 1.2 เติมสารละลาย goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุม ELISA แล้วเติมสับสเตรท *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3N NaOH ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A 405) ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จาก normal serum

ทำปฏิกิริยากับใบพริกที่ไม่เป็นโรค 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control การทดสอบเพื่อหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมแต่ละครั้งในแต่ละค่าความเจือจางทำทั้งหมด 2 ซ้ำ นำแอนติซีรัมครั้งที่มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากแอนติซีรัมในครั้งดังกล่าวมีปริมาณแอนติบอดีในซีรัมมากที่สุดและแอนติบอดีที่ได้มีความแข็งแรงในการจับกับอีพิโทปบนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV (affinity) ดีที่สุด แม้ว่าแอนติซีรัมแต่ละครั้งที่ได้จากการผลิตในครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้ได้ทั้งหมดก็ตาม แต่ในงานทดลองทางซีรัมวิทยามักเลือกแอนติซีรัมครั้งที่มีค่าไตเตอร์ดีที่สุดมาใช้ก่อน

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการตรวจเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA

5.1 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบตัวอย่างใบพริก

ทดสอบความเหมาะสมของบัฟเฟอร์ 6 ชนิด ที่ใช้บดตัวอย่างใบพริกได้แก่ CB, CB ที่ผสม 1% polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma–Aldrich, Gillingham, UK), CB ที่ผสม 0.2% diethyldithiocarbamic acid sodium salt (DIECA; Sigma, St. Louis, USA), PBS, PBS ที่ผสม 1% PVP และ PBS ที่ผสม 0.2% DIECA ตามวิธีการในข้อ 4 โดยใช้อัตราส่วนใบพริกเป็นโรคต่อบัฟเฟอร์ 1: 5 ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน blocking solution และ goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยมีแบบแผนการทดลองดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 บดใบพริกเป็นโรคใน CB
ทรีทเมนต์ที่ 2 บดใบพริกเป็นโรคใน CB ที่ผสม 1% PVP
ทรีทเมนต์ที่ 3 บดใบพริกเป็นโรคใน CB ที่ผสม 0.2% DIECA
ทรีทเมนต์ที่ 4 บดใบพริกเป็นโรคใน PBS
ทรีทเมนต์ที่ 5 บดใบพริกเป็นโรคใน PBS ที่ผสม 1% PVP
ทรีทเมนต์ที่ 6 บดใบพริกเป็นโรคใน PBS ที่ผสม 0.2% DIECA
ทรีทเมนต์ที่ 7 บดใบพริกปกติใน CB (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 8 บดใบพริกปกติใน CB ที่ผสม 1% PVP (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 9 บดใบพริกปกติใน CB ที่ผสม 0.2% DIECA (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 10 บดใบพริกปกติใน PBS (ชุดควบคุม)

ทรีทเมนต์ที่ 11 บดใบพริกปกติใน PBS ที่ผสม 1% PVP (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 12 บดใบพริกปกติใน PBS ที่ผสม 0.2% DIECA (ชุดควบคุม)

ในการทดลองทำ 4 ซ้ำ (replication) ต่อทรีทเมนต์ เปรียบเทียบค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) (Halli *et al*., 2003) ของแต่ละทรีทเมนต์โดยคำนวณจากค่า S/N ratio = ค่า A 405 นาโนเมตร ของ positive control/ค่า A 405 นาโนเมตร ของ negative control ค่า positive control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกเป็นโรคที่บดในบัฟเฟอร์แต่ละทรีทเมนต์ และ negative control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกปกติที่บดในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับใบพริกเป็นโรค นำค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละทรีทเมนต์ มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ทดสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05โดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ผลที่ได้จะทำให้สามารถคัดเลือกชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการนำมาบดตัวอย่างในพริกเป็นโรคซึ่งให้ค่า A 405 นาโนเมตร ที่ดีที่สุด

5.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ blocking solution

เปรียบเทียบความสามารถของ blocking solution ได้แก่ bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, USA) และ skim milk (SK; Difco Laboratories, Detroit, USA) ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific reaction) ตามวิธีการในข้อ 4 ในการทดลองใช้ BSA และ SK ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1% BSA, 3% BSA, 5% BSA, 1% SK, 3% SK และ 5% SK ตามลำดับ โดยบดใบพริกเป็นโรคในบัฟเฟอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 อัตราส่วน 1: 5 ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจาง 1:1,000 ใน blocking solution และ goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยมีแบบแผนการทดลองดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% BSA
ทรีทเมนต์ที่ 2 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% BSA
ทรีทเมนต์ที่ 3 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 5% BSA
ทรีทเมนต์ที่ 4 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% SK
ทรีทเมนต์ที่ 5 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% SK
ทรีทเมนต์ที่ 6 ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 5% SK

ทรีทเมนต์ที่ 7 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% BSA (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 8 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% BSA (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 9 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 5% BSA (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 10 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 1% SK (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 11 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 3% SK (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 12 ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 ใน 5% SK (ชุดควบคุม)

ทำ 4 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ เปรียบเทียบค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ตามวิธีการในข้อ 5.1 กำหนด positive control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking solution แต่ละทรีทเมนต์ และ negative control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกปกติที่ใช้ blocking ความเข้มข้นและชนิดเดียวกันกับ ใบพริกเป็นโรค นำค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละทรีทเมนต์มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ทดสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ผลที่ได้จะทำให้สามารถคัดเลือกชนิดของ blocking solution ที่สามารถให้ผลการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะเจาะจงดีที่สุด

5.3 การศึกษาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติซีรัม

เลือกแอนติซีรัมครั้งที่มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดมาใช้ในการเปรียบเทียบอัตราการเจือจางของแอนติซีรัมที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ตรวจสอบปฏิกิริยา 3 ระดับ คือ 1:250, 1:500 และ 1:1,000 ตามวิธีการในข้อ 4 โดยบดใบพริกเป็นโรคในบัฟเฟอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 อัตราส่วน 1: 5 ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางใน blocking solution ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2 และ goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยมีแบบแผนการทดลองดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ใช้ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:250
ทรีทเมนต์ที่ 2 ใช้ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:500
ทรีทเมนต์ที่ 3 ใช้ใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000
ทรีทเมนต์ที่ 4 ใช้ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:250 (ชุดควบคุม)
ทรีทเมนต์ที่ 5 ใช้ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:500 (ชุดควบคุม)

ทรีทเมนต์ที่ 6 ใช้ใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 (ชุดควบคุม)

ทำ 4 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ เปรียบเทียบค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ตามวิธีการในข้อ 5.1 ค่า positive control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกเป็นโรคทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมในแต่ละทรีทเมนต์ และ negative control คือค่าเฉลี่ย A 405 นาโนเมตร ของใบพริกปกติที่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ค่าความเจือจางเดียวกันกับใบพริกเป็นโรค นำค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละทรีทเมนต์มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ทดสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05โดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ผลที่ได้จะทำให้สามารถคัดเลือกค่าความเจือจางของแอนติซีรัมที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบ CMV ด้วยวิธี indirect ELISA ต่อไป

6. การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

6.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริก

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัสที่พบว่ามีการแพร่ระบาดเข้าทำลายพริกในประเทศไทยตามการรายงานของ Green (1993) ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) และ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการในข้อ 4 โดยใช้บัฟเฟอร์ blocking solution และอัตราส่วนของแอนติซีรัม ที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ในข้อ 5 สำหรับเชื้อ CVMV, PVY, TMV และ TSWV ที่นำมาทดสอบได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในขณะที่เชื้อ AMV, PMMoV และ TEV สั่งซื้อเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่ไม่มีความสามารถในการก่อโรคแล้วจากบริษัท Agdia Inc. (Elkhart, Indiana, USA) กำหนดให้น้ำคั้นจากใบพริกที่ติดเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิตได้เป็น positive control และน้ำคั้นจากใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมเป็น negative control

6.2 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV

ตัวอย่างที่นำมาทดสอบได้แก่ ตัวอย่างพริกที่แสดงลักษณะอาการใบด่าง สีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบลีบเรียวเล็ก ผิดรูปร่างและลำต้นแคระแกร็น ซึ่งเก็บจากแปลงปลูกพริกในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุงและจังหวัดสงขลา ตัวอย่างเชื้อ CMV subgroup I และ subgroup II (Agdia Inc., Elkhart, USA) ทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการในข้อ 6.1 เปรียบเทียบผลที่ได้กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CMV ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CMV subgroup I และ subgroup II ซึ่งได้รับมาจาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งใช้เป็น positive control สำหรับ negative control คือตัวอย่างใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ที่ผลิตได้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ CMV เพื่อใช้เป็นแอนติเจน

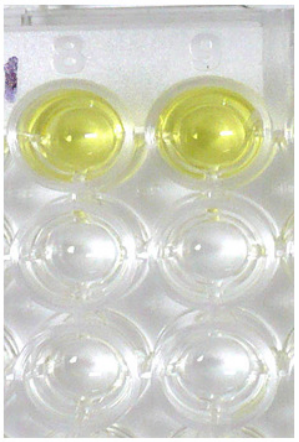
1.1 แหล่งที่มาของเชื้อ CMV

เนื่องจากในการทดลองยังขาดแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกเชื้อ CMV จากพริกในพื้นที่ปลูกในภาคใต้ได้โดยตรง ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ตัวอย่างเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างพริกที่เก็บได้จากจังหวัดปทุมธานี และผ่านการแยกให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวๆ (single isolation) บนใบถั่วพุ่มแล้ว นำมาใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรัมก่อน โดยเชื้อ CMV ไอโซเลทดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเชื้อ CMV ที่นำมาใช้ในการทดลองขณะนั้นถูกเก็บและเพิ่มปริมาณอยู่ในต้นลำโพง (*Datura stramonium*) (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามภายหลังได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS แล้ว ในการทดลองได้ทำการตรวจสอบเชื้อ CMV ในต้นลำโพงอีกครั้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ด้วยวิธี indirect ELISA ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ได้รับมาให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ภาพที่ 2ก) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อ CMV ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็น positive control (ภาพที่ 2ข) และตัวอย่างต้นลำโพงปกติซึ่งใช้เป็น negative control

1.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ CMV

ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในพริก (*Capsicum annuum*) ของเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่ได้รับมาซึ่งเพิ่มปริมาณเชื้ออยู่ในต้นลำโพงอีกครั้งโดยการปลูกเชื้อไวรัสลงบนใบพริกพันธุ์บางช้างอายุ 30 วัน ด้วยวิธีกล ตามวิธีการของ มณีรัตน์ และ รัชนี (2547) ผลที่ได้พบว่าเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ยังคงความสามารถก่อโรคให้กับต้นพริกได้ โดยพริกจะเริ่มแสดงอาการให้เห็นภายในระยะเวลา 20 วัน หลังจากได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งลักษณะอาการที่ปรากฏหลังจากต้นพริกได้รับเชื้อไวรัสไปแล้วประมาณ 30 วัน ได้แก่อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบพริกมีรูปร่างผิดไปจากปกติ ลีบเรียวเล็กและลำต้นพริกแคระแกร็น (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 1 ต้นลำโพงปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS แสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน



ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS จากต้นลำโพง ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV (ก) เปรียบเทียบกับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* แยกสกัดบริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็น positive control (ข) และตัวอย่างต้นลำโพงปกติซึ่งใช้เป็น negative control

ภาพที่ 3 พริกพันธุ์บางช้างปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบพริกมีรูปร่างผิดไปจากปกติ ลีบเรียวเล็กและลำต้นพริกแคระแกร็น หลังจากได้รับเชื้อไวรัสภายในระยะเวลา 30 วัน

1.3 การเพิ่มปริมาณและการแยกสกัดเชื้อ CMV

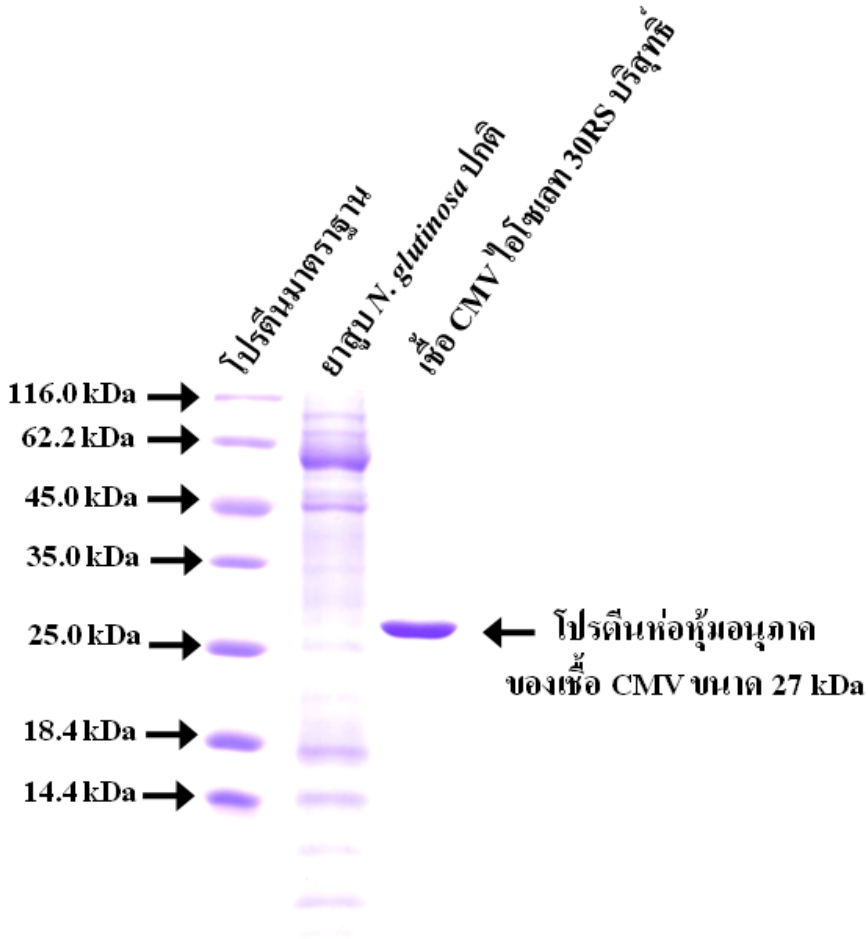
เพิ่มปริมาณเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่ผ่านการทดสอบว่ายังคงความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพริกแล้วในข้อ 1.2 โดยการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลลงในยาสูบ *Nicotiana glutinosa* ตามวิธีการของ มณีรัตน์ และ รัชนี (2547) จากนั้นแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Lot และคณะ (1972) ผลที่ได้พบว่าภายหลังจากปลูกเชื้อ CMV ลงในยาสูบในระยะเวลา 5-7 วัน ยาสูบจะเริ่มแสดงอาการให้เห็นที่บริเวณใบยอดซึ่งจะมีลักษณะโค้งงอ จากนั้นใบยอดยาสูบจะแสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยาสูบมีรูปร่างผิดไปจากปกติและลำต้นยาสูบแสดงอาการแคระแกร็นหลังจากได้รับเชื้อไวรัสประมาณ 14-30 วัน (ภาพที่ 4)

ในการแยกเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS จากใบยาสูบ *N. glutinosa* ที่ปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 30 วัน ตามวิธีการของ Lot และคณะ (1972) ภายหลังคำนวณความเข้มข้นของเชื้อไวรัส (C) ที่เตรียมได้จากสูตร $C = A260/E260^{0.1\%}$ โดยค่า $E260^{0.1\%}$ ของเชื้อ CMV เท่ากับ 5.0 พบว่าในการทดลองสามารถแยกสกัดเชื้อไวรัสได้ประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อใบยาสูบที่นำมาแยกเชื้อไวรัส 500 กรัม

2. การตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV

ตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่แยกสกัดได้โดยใช้ 12% SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970) ผลที่ได้พบว่าเชื้อไวรัสที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ โดยพบแถบน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV เพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดประมาณ 27 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ มณีรัตน์และคณะ (2547) ที่แยกสกัดเชื้อ CMV ไอโซเลท เดียวกันกับในการทดลองแล้วได้น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสชนิดนี้ประมาณ 27 กิโลดาลตัน

ภาพที่ 4 ยาสูบ *Nicotiana glutinosa* แสดงอาการใบด่างด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยาสูบมีรูปร่างผิดไปจากปกติและลำต้นยาสูบแสดงอาการแคระแกร็นหลังจากได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS 30 วัน



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท 30RS ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ ด้วย 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ช่องที่ 1) และยาสูบ *Nicotiana glutinosa* ปกติ (ช่องที่ 2)

3. การผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV

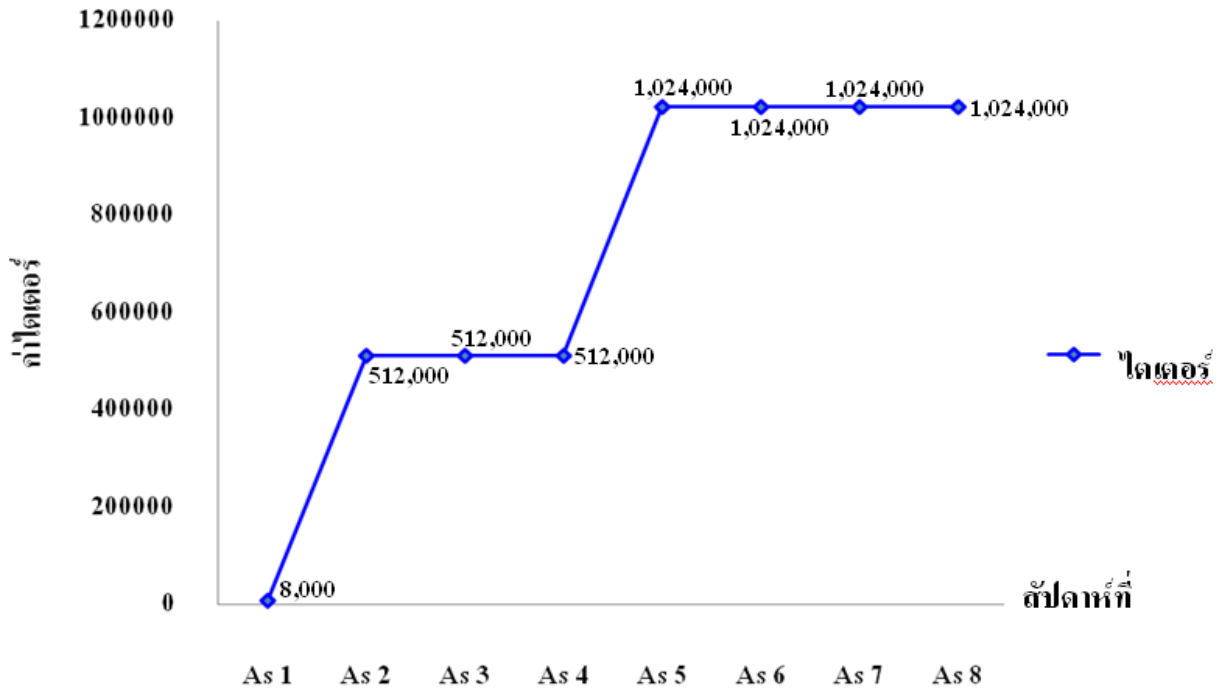
การผลิตแอนติซีรัมใช้เชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่แยกให้บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นกระต่าย จำนวน 1 ตัว จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 8,000-1,024,000 โดยสัปดาห์ที่ 5, 6, 7 และ 8 จะมีค่า ไตเตอร์สูงสุดคือ 1,024,000 (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามในการทดสอบได้นำแอนติซีรัมครั้งที่มีค่าไตเตอร์สูงได้แก่สัปดาห์ที่ 5, 6, 7 และ 8 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากแอนติซีรัมในครั้งดังกล่าวมีปริมาณแอนติบอดีในซีรัมมากที่สุดและแอนติบอดีที่ได้มีความแข็งแรงในการจับกับอีพิโทปบนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV (affinity) ดีที่สุด

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA

4.1 การทดสอบชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตัวอย่างใบพริก

ในการทดลองเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการบดตัวอย่างพืชในการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA ได้แก่ carbonate coating buffer (CB) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับให้โปรตีนยึดติด ELISA plate ได้ดี (Crowther, 2001) และ phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานทดลองด้านซีรัมวิทยาและชีวโมเลกุล (Scarpa และคณะ 2010) อย่างไรก็ตามในการทดลองได้ผสมสารยับยั้งการเกิด phenolic oxidation ที่เกิดขึ้นขณะบดใบพริก ได้แก่ 1% PVP และ 0.2% DIECA ลงในบัฟเฟอร์ CB และ PBS ตามลำดับ รวมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่างใบพริกในการทดลองครั้งนี้มีทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ บัฟเฟอร์ CB และCB ที่ผสม 1% PVP, CB ที่ผสม 0.2% DIECA, PBS, PBS ที่ผสม 1% PVP และ PBS ที่ผสม 0.2% DIECA

จากการเปรียบเทียบความสามารถของบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด พบว่าตัวอย่างใบพริกที่บดด้วยบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด สีของน้ำคั้นยังคงมีสีเขียว เมื่อนำน้ำคั้นใบพริกเป็นโรคที่เตรียมจากบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด มาตรวจสอบปฏิกิริยาพบว่าใบพริกติดเชื้อ CMV ซึ่งบดในบัฟเฟอร์ CB และCB ที่ผสม 1% PVP, CB ที่ผสม 0.2% DIECA, PBS, PBS ที่ผสม 1% PVP และ PBS ที่ผสม 0.2% DIECA ให้ค่า A405 เฉลี่ยประมาณ 2.244, 2.240 1.213, 1.638, 1.037 และ 2.116 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบพริกปกติซึ่งบดด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันให้ค่า A405 เฉลี่ยประมาณ 0.438, 0.482, 0.322, 0.623, 0.569 และ 0.684 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทาง



ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บเลือดจากกระต่าย

สถิติโดยใช้ค่า S/N ratio พบว่าการใช้บัฟเฟอร์ CB และCB ที่ผสม 1% PVP ให้ค่าไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) สามารถใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ CB เนื่องจากไม่จำเป็นต้องผสมสาร PVP ซึ่งต้องซื้อเพิ่มเติม

4.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ blocking solution

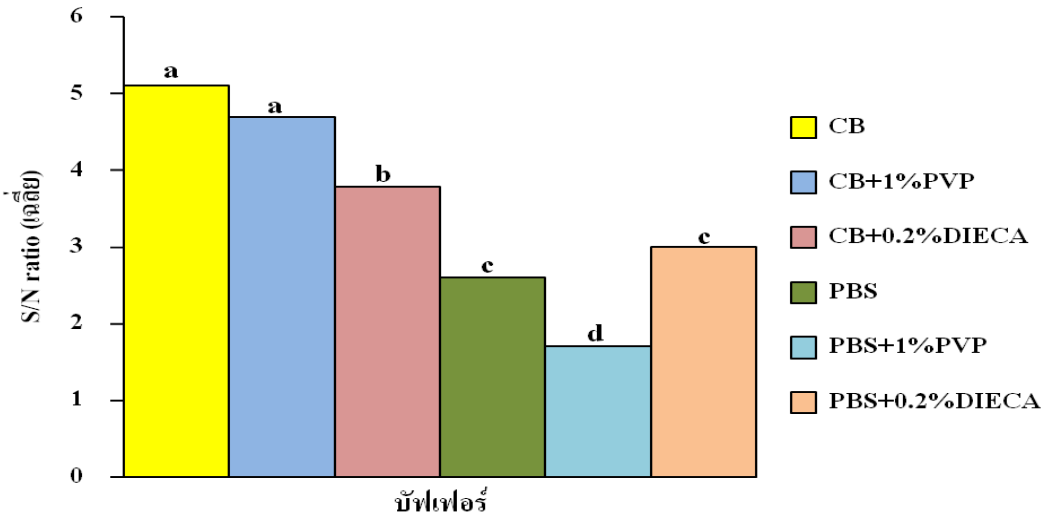
การเปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันการเกิด non-specific reaction ของ blocking solution 2 ชนิด ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) และ skim milk (SK) ที่ความเข้มข้น 1% BSA, 3% BSA, 5% BSA, 1% SK, 3% SK และ 5% SK ตามลำดับ พบว่า blocking solution ชนิดที่ใช้ skim milk สามารถป้องกันการเกิด non-specific reaction ได้ดีกว่า BSA ซึ่งสังเกตได้จากค่า A405 จากการทดสอบกับบัฟเฟอร์ซึ่งมีค่าต่ำ และไม่ต่างจากพืชปกติ (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ค่า S/N ratio พบว่า การใช้ blocking solution ที่เตรียมจาก 1% SK, 3% SK และ 5% SK ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทำให้สามารถใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ (ภาพที่ 8) อย่างไรก็ตามในการทดลองเลือก 1% SK สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำ

4.3 การศึกษาค่าการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติซีรัม

การเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ที่ค่าการเจือจาง 3 ระดับ ได้แก่ 1:250, 1:500 และ 1:1,000 ใน 1% skim milk (SK) พบว่าให้ค่า A405 เฉลี่ยประมาณ 3.898, 3.652 และ 3.555 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบพริกปกติซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ค่าความเจือจางเดียวกันให้ค่า A405 เฉลี่ยประมาณ 0.192, 0.175 และ 0.110 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ค่า S/N ratio พบว่าทุกค่าการเจือจางไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ภาพที่ 9) ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้แอนติซีรัมที่เจือจางใน 1% SK อัตราส่วน 1:1000 เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CMV ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากสามารถเจือจางแอนติซีรัมได้สูงสุด จึงใช้แอนติซีรัมปริมาณที่น้อยในการตรวจสอบตัวอย่างเชื้อไวรัสในจำนวน (sample) ที่เท่ากัน

ตารางที่ 1 ความสามารถของบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างใบพริกเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

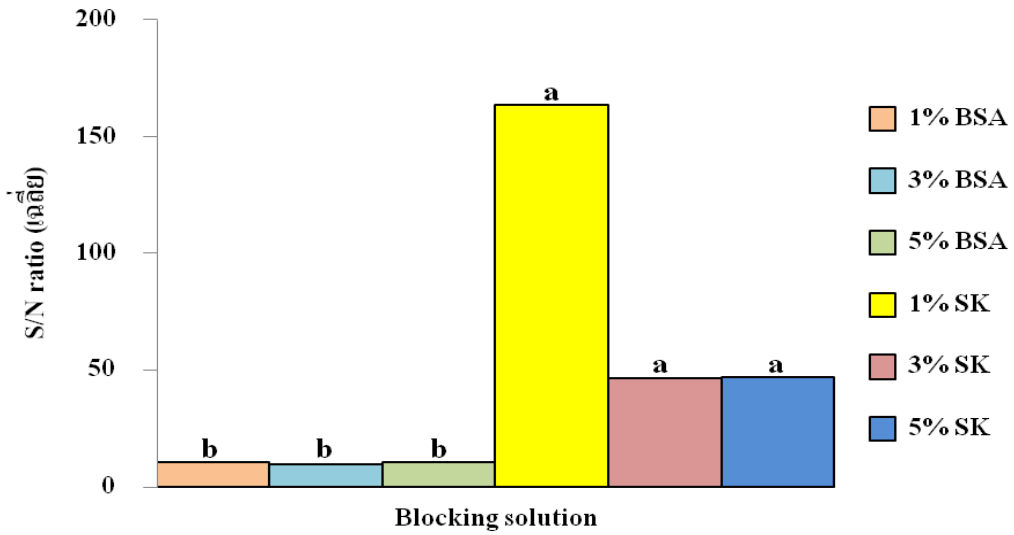
ทรีทเมนต์	ค่า A405 เฉลี่ย (4 ซ้ำ)		ค่า S/N ratio เฉลี่ย
	ใบพริกติดเชื้อไวรัส CMV	ใบพริกปกติ	
บดตัวอย่างใบพริกใน CB	**2.244**	**0.438**	**5.1**
บดตัวอย่างใบพริกใน CB+1%PVP	2.240	0.482	4.6
บดตัวอย่างใบพริกใน CB+0.2%DIECA	1.213	0.322	3.7
บดตัวอย่างใบพริกใน PBS	1.638	0.623	2.6
บดตัวอย่างใบพริกใน PBS+1%PVP	1.037	0.569	1.7
บดตัวอย่างใบพริกใน PBS+0.2%DIECA	2.116	0.684	3.0



ภาพที่ 7 ผลของบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างใบพริกติดเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจน ด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise (S/N) ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 2 ความสามารถในการป้องกันการเกิด non-specific reaction ของ blocking solution 2 ชนิด ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) และ skim milk (SK) เพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

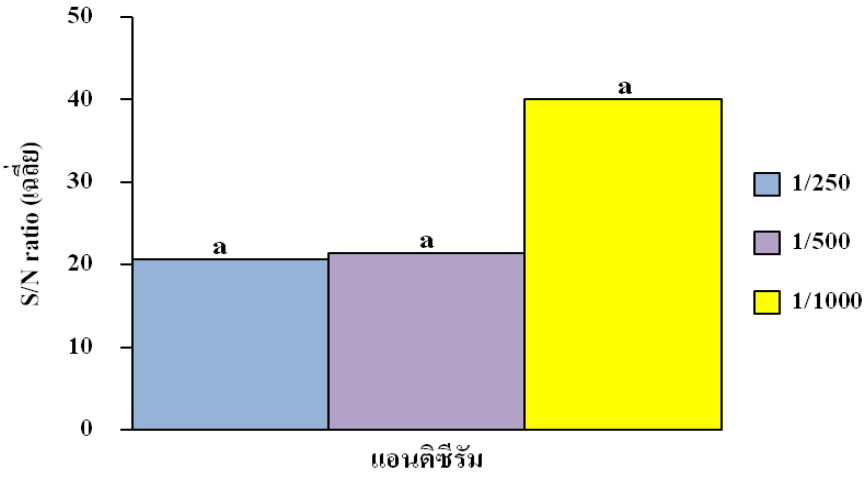
ทรีทเมนต์	ค่า A405 เฉลี่ย (4 ซ้ำ)			ค่า S/N ratio
	ใบพริกติดเชื้อไวรัส CMV	ใบพริกปกติ	บัฟเฟอร์	เฉลี่ย
1% BSA	2.75	0.45	0.25	10.4
3% BSA	3.00	0.53	0.34	9.7
5% BSA	3.05	0.53	0.27	10.5
1% SK	**2.27**	**0.20**	**0.16**	**163.8**
3% SK	2.33	0.19	0.14	46.7
5% SK	2.73	0.20	0.16	47.1



ภาพที่ 8 ผลของบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างใบพริกติดเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจน ด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise (S/N) ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 3 ความสามารถของบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างใบพริกเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

ทรีทเมนต์	ค่า A405 เฉลี่ย (4 ซ้ำ)		ค่า S/N ratio
	ใบพริกติดเชื้อไวรัส CMV	ใบพริกปกติ	เฉลี่ย
บดตัวอย่างใบพริกใน CB	3.898	0.192	20.69
บดตัวอย่างใบพริกใน CB+1%PVP	3.652	0.175	21.37
บดตัวอย่างใบพริกใน CB+0.2%DIECA	**3.555**	**0.110**	**40.01**



ภาพที่ 9 ผลของการเจือจางแอนติซีรัม (As-CMV) ต่อค่าความดูดกลืนแสงที่ A405 นาโนเมตร เมื่อทดสอบด้วยแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA ประเมินความแตกต่างทางสถิติต่อค่า signal-to-noise ratio ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

5. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV

ในสภาพแปลงปลูกนอกจากเชื้อ CMV ที่เข้าทำลายพริกแล้วยังมีเชื้อ *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Chili veinal mottle virus* (CVMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) และ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ที่สามารถเข้าทำลายพริกได้ ดังนั้นการนำแอนติซีรัมไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CMV ในพริกจึงควรตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมกับเชื้อไวรัสดังกล่าวข้างต้นด้วย

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริกดังกล่าวข้างต้นจำนวน 7 ชนิด พบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส CMV ไอโซเลท 30RS โดยให้ค่า A405 เท่ากับ 1.57 และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 4) และเมื่อนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาตรวจวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ CMV subgroup I, II และตัวอย่างเชื้อ CMV ซึ่งเก็บได้จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุงและจังหวัดสงขลา จำนวน 15 ไอโซเลท ที่ให้ผลเป็นบวกจากการตรวจสอบด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV (มณีรัตน์, 2554) จากการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าแอนติซีรัมสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ทั้ง 2 subgroup และเชื้อ CMV ทั้ง 15 ไอโซเลท ได้ ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งแสดงว่าแอนติซีรัมดังกล่าวมีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับอีพิโทปที่มีอยู่บนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส CMV ทั้ง 2 subgroup (common epitope)

แม้ว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ซึ่งจัดอยู่ใน subgroup I (ภูวนารถ, 2553) จะสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ได้ทั้ง 2 subgroup อย่างไรก็ตามในการทดลองพบว่าปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV subgroup I และ II ให้ค่า A405 ที่แตกต่างกัน โดยแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดี (strong reaction) ต่อเชื้อ CMV subgroup I โดยให้ค่า A405 เท่ากับ 2.51 ในขณะที่แอนติซีรัมซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อ CMV subgroup II ให้ค่า A405 เพียง 0.52 ทั้งนี้อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากความหลากหลายของเชื้อ CMV ในแต่ละ subgroup ที่มีจำนวนของอีพิโทปซึ่งอยู่บนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสแตกต่างกัน (Hsu และคณะ, 2000) ส่งผลให้แอนติซีรัมซึ่งผลิตได้จากเชื้อ CMV subgroup I สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับเชื้อ CMV ที่อยู่ใน subgroup I มากกว่าเชื้อ CMV ที่อยู่ใน subgroup II

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสจำนวน 7 ชนิด ที่เข้าทำลายพริก ด้วยวิธี indirect ELISA

เชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบ	Anti-CMV PAb
CMV ไอโซเลท 30RS	+
AMV	-
CVMV	-
PMMoV	-
PVY	-
TEV	-
TMV	-
TSWV	-
ใบพริกปกติ	-

หมายเหตุ negative control คือ แอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างน้ำคั้นใบพริกปกติ ค่า A405 เฉลี่ยเท่ากับ 0.1 (ตารางผนวกที่ ก1)

ตารางที่ 5 ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรัมต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ด้วยวิธี indirect ELISA

ไอโซเลท	พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	Anti-CMV PAb
CMV30RS	พริก	รังสิต จ. ปทุมธานี	+
CMV subgroupI	-	-	+
CMV subgroupII	-	-	+
TaN-6	พริก	อ. ท่าชนะ จ. สุราษฎร์ธานี	+
TaN-10	พริก	อ. ท่าชนะ จ. สุราษฎร์ธานี	+
PaN-3	พริก	อ. ปากพนัง จ. นครศรีธรรมราช	+
PaN-5	พริก	อ. ปากพนัง จ. นครศรีธรรมราช	+
KhaP-1	พริก	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	+
KhaP-2	พริก	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	+
KhaP-7	พริก	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	+
KhaP-9	พริก	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	+
KhP-2	พริก	อ. ควนขนุน จ. พัทลุง	+
RaS-4	พริก	อ. ระโนด จ. สงขลา	+
RaS-6	พริก	อ. ระโนด จ. สงขลา	+
RaS-8	พริก	อ. ระโนด จ. สงขลา	+
RatS-3	พริก	อ. รัตภูมิ จ. สงขลา	+
RatS-8	พริก	อ. รัตภูมิ จ. สงขลา	+
RatS-10	พริก	อ. รัตภูมิ จ. สงขลา	+
ใบพริกปกติ	-	-	-

หมายเหตุ negative control คือ แอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างน้ำคั้นใบพริกปกติมีค่า A405 เฉลี่ยเท่ากับ 0.1 (ตารางผนวกที่ ก1)

สรุปผลการทดลอง

1. ใช้ตัวอย่างเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างพริกที่เก็บได้จากจังหวัดปทุมธานี เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรัม ภายหลังทดสอบการก่อโรคในพริกอีกครั้งโดยการปลูกเชื้อ CMV ลงในพริกพันธุ์บางช้างอายุ 30 วัน ด้วยวิธีกล พบว่าเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ยังคงความสามารถในการก่อโรคให้กับต้นพริกได้ โดยพริกจะแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบพริกมีรูปร่างผิดไปจากปกติ ลีบเรียวเล็กและลำต้นพริกแคระแกร็นให้เห็นภายในระยะเวลา 30 วัน หลังจากได้รับเชื้อไวรัส

2. เพิ่มปริมาณเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่ผ่านการทดสอบว่ายังคงความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพริกแล้ว โดยการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลลงในยาสูบ *Nicotiana glutinosa* ซึ่งภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเป็นเวลานาน 7 วัน ยาสูบจะเริ่มแสดงอาการให้เห็นที่บริเวณใบยอดซึ่งจะมีลักษณะโค้งงอ จากนั้นใบยอดยาสูบจะแสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยาสูบมีรูปร่างผิดไปจากปกติและลำต้นยาสูบแสดงอาการแคระแกร็นหลังจากได้รับเชื้อไวรัสประมาณ 14-30 วัน

3. แยกสกัดเชื้อไวรัส CMV จากยาสูบ *N. glutinosa* ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation จากนั้นตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และตรวจดูแถบน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสด้วย 12% SDS -PAGE พบว่าเชื้อ CMV ที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ โดยพบแถบน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV เพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดประมาณ 27 กิโลดาลตัน

4. การผลิตแอนติซีรัมใช้เชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS บริสุทธิ์เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นกระต่ายโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์ ทั้งหมด 4 ครั้ง ก่อนเก็บเลือดที่หูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และสัปดาห์ที่ 12 จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 8,000-1,024,000 โดยสัปดาห์ที่ 5, 6, 7 และ 8 จะมีค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 1,024,000

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรวจเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า ควรบดใบพริกใน CB และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific reaction) ด้วยการใช้ 1% skim milk เป็น blocking solution ใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV ที่เจือจาง 1:1,000

6. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมโดยใช้เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริก จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus*, *Chili veinal mottle virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Potato virus Y*, *Tobacco etch virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato spotted wilt virus* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ CMV ทั้ง subgroup I และ II และเชื้อ CMV ทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบจำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งเก็บมาจากแปลงปลูกพริกในพื้นที่ภาคใต้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติและเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบทั้งหมด

บรรณานุกรม

ธีระ สูตะบุตร. 2532. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย.** ห้างหุ้นส่วนจำกัดฟันนี่พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ หน้า 107-113.

ปัญญา ยวงเกตุ. 2552. การปลูกพริกในภาคใต้ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://pmc06.doae.go.th/chilly.htm [วันที่ 4 พฤศจิกายน พ. ศ. 2552]

ภูวนารถ มณีโชติ 2553: ความหลากหลายทางชีวภาพของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกจากแตงกวาในประเทศไทย. **วิทยานิพนธ์ปริญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ

พัชรี เนียมศรีจันทร์ นันทิการ์ เสนแก้ว อภิญญา สุราวุธ สุพร ฆังคมณี อาริยา จูดคง ลักษมี สุภัทรา ศรินณา ชูธรรมธัช อุดร เจริญแสง นลินี จาริกภากร และไพโรจน์ สุวรรณจินดา. 2550. **การทดสอบการผลิตพริกแบบผสมผสานเพื่อพัฒนามาตรฐานคุณภาพพริกในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง.** แบบรายงานเรื่องเต็ม. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8. 13 หน้า

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม. 2547. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสาหรับการวินิจฉัยเชื้อ ไวรัสใบด่างแตง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม และ รัชนี ฮงประยูร. 2547. ความผันแปรของลักษณะอาการบนพืชอาศัยที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างแตงในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 35: 207-214.

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม. 2554. **การแพร่กระจายและการจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อไวรัสใบด่างแตงในพริกที่ปลูกในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้วิธี RT-PCR**. แบบรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. 44 หน้า

รัชนี ฮงประยูร. 2549. **บทปฏิบัติการซีรัมวิทยาทางด้านโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 86 หน้า.

สุจินต์ ภัทรภูวดล วารีรัตน์ สมประทุม รัชดาภรณ์ เขียวหวาน กรุง สีตะธนี และ สิริกุล วะสี. 2551. การคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างแตงและใบด่างประของพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39: 376-379.

Bashir, N. S., M. R. Kalhor and S. N. Zarghani. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. **Virus Gene** 32: 277-288.

Clark, M.F. and A. N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology** 34: 475-483.

Crowther, J.M. 2001. **The ELISA Guidebook**. Humana Press Inc. Totowa. 149 pp.

Francki, R.I.B., J.W. Randles, T.C. Chambers and S.B. Wilson. 1966. Some properties of purified *Cucumber mosaic virus* (Q strain). **Virology** 28: 729–741.

Haggag, S. Z., J. A. T. Silva and K. Miyatake. 2009. Antigenic properties of the coat of *Cucumber mosaic virus* using monoclonal antibodies. **Journal of Virological Methods** 162: 223-230.

Halli, G., R. Rajasekariah, G. E. Kay, N. V. Russell and M. Anthony. 2003. Assessment of assay sensitivity and precision in a malaria antibody ELISA. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry** 24: 89-112.

Hsu, H. T., L. Barzuna, Y. H. Hsu, W. Bliss and K. L. Perry. 2000. Identification and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibody. **Phytopathology** 90: 615-620.

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

Lot, H., J. Marrou, J. B. Quiot and C. Esvan. 1972. Contribution a I'etude de virus de la mosaTque du concombre (CMV). II. Methods de purification rapide du virus. **Ann. Phytopathology** 4: 25-38.

Noordam, D. 1973. **Identification of plant viruses Method&experiments.** Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), Wageningen. 191 pp.

Porta, C., J. C. Devergne, L. Cardin, J. P. Briand and M. H. V. Van Regenmortel. 1989. Serotype specificity of monoclonal antibodies to *Cucumber mosaic virus*. **Archives of Virology** 104: 271-285.

Roossinck, M. J. 2002. Evolution history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. **Journal of Virology** 76: 3382-3387.

Scarpa, G., A.L. Idzko, E. Martin and S. Thalhammer. 2010. Toward cheap disposable sensing devices for biological assays. **IEEE Transactions on Nanotechnology** 9: 527-532

Green, S. K. 1993. **Pepper virus research in Taiwan and other Asian countries.** In proceeding of the symposium on plant virus and virus-like diseases. Editor by Chiu, R.J. and Yeh, Y. Dec 23-24, 1992 ,Taiwan. pp. 213-243.

Wahyuni, W. S., R. G. Dietzgen, K. Hanada and R. I. B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. **Plant Pathology** 41: 282-297.

Wilson, A.D. and R.S. Halliwell. 1985. Characterization and field studies of a *Cucumber mosaic virus* isolate from spinach in the Winter Garden area of Texas. **Plant Disease** 69: 751-754.

Yordanova, A., D. Hristova and E. Stoimenova. 2002. Serological and electrophoretic characterization of the necrotic strain CMV-NB of *Cucumber mosaic virus*. **Journal of Culture Collections** 3: 84-91.

Yu, C., J. Wu and X. Zhou. 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. **Journal of Virological Methods** 123: 155-161.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ตารางผนวกที่ ก1 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริกและเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ด้วยวิธี indirect ELISA

เชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบ	แอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV	เชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบ	แอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV
CMV30RS	1.57	CMV ไอโซเลท PaN-5	1.29
CMV subgroupI	2.51	CMV ไอโซเลท KhaP-1	1.32
CMV subgroupII	0.52	CMV ไอโซเลท KhaP-2	1.46
AMV	0.043	CMV ไอโซเลท KhaP-7	1.39
CVMV	0.052	CMV ไอโซเลท KhaP-9	1.37
PMMoV	0.035	CMV ไอโซเลท KhP-2	1.33
PVY	0.074	CMV ไอโซเลท RaS-4	1.42
TEV	0.093	CMV ไอโซเลท RaS-6	1.41
TMV	0.047	CMV ไอโซเลท RaS-8	1.34
TSWV	0.087	CMV ไอโซเลท RatS-3	1.33
CMV ไอโซเลท TaN-6	1.31	CMV ไอโซเลท RatS-8	1.37
CMV ไอโซเลท TaN-10	1.30	CMV ไอโซเลท RatS-10	1.29
CMV ไอโซเลท PaN-3	1.39	ใบพริกปกติ	0.10

หมายเหตุ ค่า negative control ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ CMV มีค่าเท่ากับ 0.2

ภาคผนวก ข.

บัฟเฟอร์ที่ใช้ปลูกเชื้อไวรัส CMV ลงพืชทดสอบ (Noordam, 1973)

1. 0.01M phosphate buffer, pH 7.0

เตรียมได้จากละลาย KH_2PO_4 1.362 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายโพแทสเซียม) จากนั้นละลาย Na_2HPO_4 1.781 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (สารละลายโซเดียม) นำสารละลายโพแทสเซียมปริมาตร 49 มิลลิลิตร ผสมสารละลายโซเดียมปริมาตร 51 มิลลิลิตร

การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในเทคนิคทาง indirect ELISA (Clark และ Adam, 1977)

1. Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.9	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. Carbonate coating buffer; pH 9.6 (CB)

$NaHCO_3$	2.93	กรัม
Na_2CO_3	1.59	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. Washing buffer (PBST)

PBS	100	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

สามารถเตรียมเป็นความเข้มข้น 10xPBST และ autoclave ก่อนเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้

4. Substrate buffer; pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์ (Lot และคณะ 1972)

1. Grinding buffer

0.05 mM sodium citrate buffer (pH 6.5)

5 mM EDTA

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้เติม 0.5% thioglycolic acid

2. Suspending buffer (pH 9.0)

5 mM sodium borate buffer

0.5 mM EDTA

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. Sucrose gradient 5–25%

ละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ใน suspending buffer จากนั้นค่อยๆใส่สารละลายน้ำตาลแต่ละความเข้มข้นลงในหลอด centrifuge tube โดยใส่เรียงจากความเข้มข้น 25, 15, 10 และ 5% ตามลำดับ โดยปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ดังนี้ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล 25% เติม 3.63 มิลลิลิตร 15% เติม 3 มิลลิลิตร 10%เติม 3 มิลลิลิตร และ 5% เติม 2.23 มิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

1. 2x sample buffer

100 mMTris–HCl (pH 6.8)

2% SDS

10% glycerol

5% β–mercaptoethanol

0.02% bromophenol blue

2. Tris–glycine electrophoresis buffer

25 mM Tris (pH 8.3)

250 mM glycine

0.1% SDS

3. Coomassie–blue

0.2% Coomassie–blue R–250

50% methanol

70% acetic acid

4. Destain solution

25% methanol

7% acetic acid

ประวัตินักวิจัยหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Maneerat Koohapitagtam

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail): ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

E-mail: maneenoi_agbiot@yahoo.com; maneerat.k@psu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	มหาวิทยาลัย	ปีที่จบ	เกรดเฉลี่ย
ปริญญาตรี วท.บ (เกษตรศาสตร์)	แม่โจ้	2542	2.49
ปริญญาโท วท.ม (โรคพืช)	เกษตรศาสตร์	2547	3.72
ปริญญาเอก ปร.ด (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)	เกษตรศาสตร์	2552	3.65

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม (recombinant protein)
- ชีวโมเลกุลทางด้านไวรัสพืช (molecular of plant virology)
- การผลิตแอนติบอดีด้วยเทคนิค conventional, hybridoma และ phage display technology

7. ประวัติการร่วมฝึกอบรม การนำเสนอผลงานวิจัยและการดูงานในต่างประเทศ (ย้อนหลัง 5 ปีหลัง)

การนำเสนอผลงานภาค oral presentation

1) Koohapitagtam, M., S. Rungpragayphan. and R. Hongprayoon. 2007. Construction of Single-Chain Variable Fragment (scFv) Specific to *Cucumber Mosaic Virus* by Phage Display Technology. 7th National Graduate Research Conference (GRAD-RESEARCH 2007). April 4-5, 2007. Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani. **(รางวัลงานวิจัยและการ presentation ดีเด่น)**

2) Koohapitagtam, M., R. Hongprayoon, S. Rungpragayphan, W. Kositrattana. and T.

Sirinarmitr. 2007. Efficient Amplification and Construction of Single-Chain Variable Fragment (scFv) from Naïve Mouse Splenocytes. AgBiotech Graduate Conference III. December 7-8, 2007. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom.

3) Koohapitagtam, M., R. Hongprayoon, S. Rungpragayphan, W. Kositrattana. and T. Sirinarmitr. 2010. Selection of ScFv Specific to *Cymbidium Mosaic Virus* from ScFv Naïve Mouse Antibody Library. BioScience for the Future 2010. October7-8, 2010. Prince of Songkla University, Hat Yai Campus,Thailand

8. ผลงานตีพิมพ์ (ย้อนหลัง 5 ปีหลัง)

Koohapitagtam, M., S. Rungpragayphan and R. Hongprayoon. 2009. Construction of single-chain variable fragment (scFv) specific to *Cucumber Mosaic Virus* by phage display technology. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 43: 330-338.

Koohapitagtam, M., S. Rungpragayphan, R. Hongprayoon, W. Kositratana and T. Sirinarmit. 2009. Efficient amplification of light and heavy chain variable regions and construction of a non-immune phage scFv library. **Mol. Biol. Rep.** 37: 1677-1683**.**