MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

รายงานผลงานวิจัย
สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช โดยใช้ ELISA

A PRELIMINARY STUDY OF DETECTION FOR PLANT VIRAL DISEASES BY ELISA

โดย

อุทัย รุ่งเรืองศรี นลินี รุ่งเรืองศรี

2536

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แม่โจ้ ๒๕๓๙

สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ MAEJO INSTITUTE OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY แม่โจ้ ๒๕๓๙

รายงานผลงานวิจัย
สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช โดยใช้ ELISA

A PRELIMINARY STUDY OF DETECTION FOR PLANT VIRAL DISEASES BY ELISA

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2536
จำนวน 384,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายอุทัย รุ่งเรืองศรี
ผู้ร่วมงาน นางนลินี รุ่งเรืองศรี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 12 มิถุนายน 2539

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	9
สรุปและวิจารณ์	20
เอกสารอ้างอิง	26

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

คำนิยม

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณของสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร ประจำปีงบประมาณ 2536 ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจงกิจ มาศิริ นักวิชาการ กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างยาสูบที่เป็นโรค และขอขอบคุณ S.A. White Plant Introduction officer แห่ง USDA Agricultural Research Center, ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ได้กรุณาให้พืชทดสอบต่าง ๆ

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า absorbance ที่ 405 nm ของ paranitrophenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:3200 และ 1:800 (2 replications) โดยใช้ 20 % ABS เป็น blocking agent 12

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:800 (3 replications) โดยใช้ 2 % BSA เป็น blocking agent ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชตระกูลแตงจากแหล่งต่าง ๆ กัน 13

ตารางที่ 4 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเพลี้ยอ่อน 14

ตารางที่ 5 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-TMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated autibody ที่ไตเตอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเพลี้ยอ่อน 16

ตารางที่ 6 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-TMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated autibody ที่ไตเตอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชเดียวกันกับตารางที่ 5 18

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ต้นยาสูบแสดงอาการใบด่างของโรค CMV	22
ภาพที่ 2 พืชทดสอบ Chenopodum amaranticolor แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation โดยใช้น้ำคั้นของตัวอย่างโรคที่ผ่านการอบแห้ง	23
ภาพที่ 3 พืชทดสอบ Nicotiana tabacum cv. Samsun NN แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation	24
ภาพที่ 4 พืชทดสอบ Nicotiana spp. แสดง necrosis ที่เริ่มจาก local lesions ซึ่งเกิดขึ้นหลังทำ sap inoculation	25

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชโดยใช้ ELISA

A preliminary study of detection for plant viral diseases by ELISA

อุทัย รุ่งเรืองศรี[1]และ นลินี รุ่งเรืองศรี[2]

[1] ภาควิชาอารักขาพืช
คณะผลิตกรรมการเกษตร

[2] ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

บทคัดย่อ

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหา ไวรัส CMV (cucumber mosaic virus) และ TMV (tobacco mosaic virus) ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของไทยซึ่งน่าจะต้องให้ความสำคัญมากกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการติดเชื้อร่วมกัน (mixed infection) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองทำ ELISA แบบ sandwich โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตจำหน่ายจากสหรัฐอเมริกาจนได้วิธีการที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อร่วมของ CMV และ TMV โดยวิธี bioassay กับวิธี ELISA ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการตรวจสอบไวรัสโรคพืชสองวิธีนี้สามารถที่จะเสริมกันได้เพราะมีข้อดีต่างกัน

ABSTRACT

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) has been in general use for detecting plant viruses. In Thailand, cucumber mosaic virus(CMV) and tobacco mosaic virus (TMV) are found in a wide variety of economic crops and thus, deserve more attention especially when mixed infection occurs. The present study reports a workable sandwich-mode ELISA protocol using commercial antiviral antibodies from the U.S. The developed protocol led to a comparative study with the more time-consuming bioassay which was aimed to detect CMV-TMV mixed infection. It was concluded that both methods should be utilized as they complement each other.

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

คำนำ

ไวรัสหลายชนิดก่อความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพ สินค้าเกษตรที่ติดเชื้อ หรือ ปนเปื้อนด้วยไวรัสย่อมไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและนอกประเทศ มาตรการในการคัดเลือกพืชและการควบคุมป้องกันโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็น การวินิจฉัยโรคพืชจากอาการของพืชนั้นมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย โดยเฉพาะพืชที่ติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด ปัจจุบันวิธีการทางอิมมูโนวิทยา เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หลายแบบได้รับการดัดแปลงให้เหมาะสมเพื่อที่จะนำมาใช้งานตรวจหาการติดเชื้อ หรือ วินิจฉัยโรคที่เกิดจากไวรัส หรือเชื้ออื่นอย่างแพร่หลาย แต่เดิมนั้นการวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัสนั้นต้องอาศัยการใช้พืชทดสอบ (index plants) ที่ต้องมีการเตรียมพืชให้อยู่ในระยะที่เหมาะสม ใส่เชื้อ รักษาไว้ในสภาพที่ถูกต้องแล้วสังเกตอาการที่แสดงออก วิธีการนี้เรียกว่าการทดสอบทางชีวะ (bioassay) (Spiegel and Converse, 1993) ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ เวลา และเทคนิค และสภาพแวดล้อมที่ถูกต้อง

การศึกษาเบื้องต้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาวิธีการทำ ELISA แบบ sandwich สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตจำหน่ายจากต่างประเทศที่เหมาะสม จากนั้นจึงนำวิธีการนั้นมาใช้ตรวจสอบและวินิจฉัยตัวอย่างพืชที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัสพืชที่พบในแปลงเกษตรกร ส่วนหนึ่งของการศึกษานี้จะเป็นการเปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อปน (mixed infection) ด้วยวิธี bioassay และ ELISA การศึกษานี้จะเน้นการวินิจฉัยเชื้อไวรัส cucumber mosaic virus (CMV) และ tobacco mosaic virus (TMV) ที่ก่อโรคใน พริก พืชตระกูลแตง และยาสูบ โดยทั่วไปนั้นทั้ง CMV และ TMV มักทำให้พืชที่ติดเชื้อก่ออาการใบด่าง (mosaic) แต่ภายใต้บางสภาพแวดล้อมนั้นนั้นพืชที่ติดเชื้อดังกล่าวนี้อาจไม่แสดงอาการให้เห็น เรียกว่าเป็นการติดเชื้อแบบแฝงเร้น (latent infection) เชื้อไวรัสทั้ง CMV และ TMV นี้แม้ก่ออาการใบด่างแก่พืช แต่ลักษณะ และคุณสมบัติหลายอย่างรวมทั้งสัณฐานวิทยา พาหะสำหรับการถ่ายทอดเชื้อ และความคงทนในการรักษาสภาพ (stability) จะมีความแตกต่างกัน ในต่างประเทศนั้น เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ได้มีการศึกษาไว้แล้วอย่างกว้างขวาง แต่ละอย่างยังประกอบด้วยสายพันธุ์ (strains) หลายสายพันธุ์ (C.M.I./A.A.B. Descriptions) แต่การศึกษาการก่อโรคแก่พืชในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากนัก สายพันธุ์ที่มีก่อโรคในประเทศของเราก็ยังไม่มีการศึกษา และกำหนดออกไปให้ชัดเจน

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ลักษณะสำคัญบางประการของไวรัส CMV และ TMV

ความเหมือนกัน

- พืชอำนวย (hosts) กว้าง ก่อโรค และ ติดเชื้อทั้งพืชใบแคบและใบกว้าง
- เมื่อติดเชื้อจะก่ออาการใบด่าง (mosaic) ในพืช ดังอาการใบด่างที่เกิดบนใบยาสูบในภาพที่1 พืชที่ติดเชื้อไวรัสนี้อาจไม่แสดงอาการโรค แต่เป็นการติดเชื้อแบบแฝงเร้น (latent infection)
- ในต่างประเทศสามารถจำแนกออกเป็นหลายสายพันธุ์ (strains)

ความแตกต่างบางประการ

CMV

- CMV มีอนุภาคแบบ isometric ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร
- จัดอยู่ในกลุ่ม cucumovirus
- ถ่ายทอดเชื้อได้โดยทางน้ำคั้น (sap) และมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ
- จุดอุณหภูมิเสื่อมฤทธิ์ (thermal inactivation piont) นาน10 นาที ที่ 70 ซ
- จุดความเจือจางของการเสื่อมฤทธิ์ที่ (dilution end piont) ที่ 10^{-4}
- การคงความสามารถติดเชื้อของน้ำคั้นนาน 3-6 วัน ที่ 20 ซ
- สร้าง อาการ local lesions กับ *C. amaranticolor* ไม่แสดงอาการนี้กับยาสูบ *N. tabaccum* แต่บางสเตรนอาจก่ออาการ necrotic lesions ได้

TMV

- อนุภาคแบบท่อนตรง (rigid tubular) ขนาด 18 X 300 นาโนเมตร
- จัดอยู่ในกลุ่ม tobamovirus
- ถ่ายทอดเชื้อโดยทางน้ำคั้น และวิธีกล (sap and mechanical inoculation)
- จุดอุณหภูมิเสื่อมฤทธิ์ (thermal inactivation piont) นาน 10 นาที ที่เกิน 90 ซ
- จุดความเจือจางของการเสื่อมฤทธิ์ (dilution end point) ที่ 10^{-6}
- คงความสามารถในการการติดเชื้อได้นานหลายสิบปี
- สร้างอาการ local lesion ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 28 ซ กับพืชทดสอบหลายชนิดเช่น *N. tabaccum* cvs. Xanthi-nc, Samsun NN, *N. glutinosa*, *C. amaranticolor* ส่วน *N. tabaccum* cvs. Turkish และ White Burley ก่ออาการกำซาบ (systemic symptom)

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

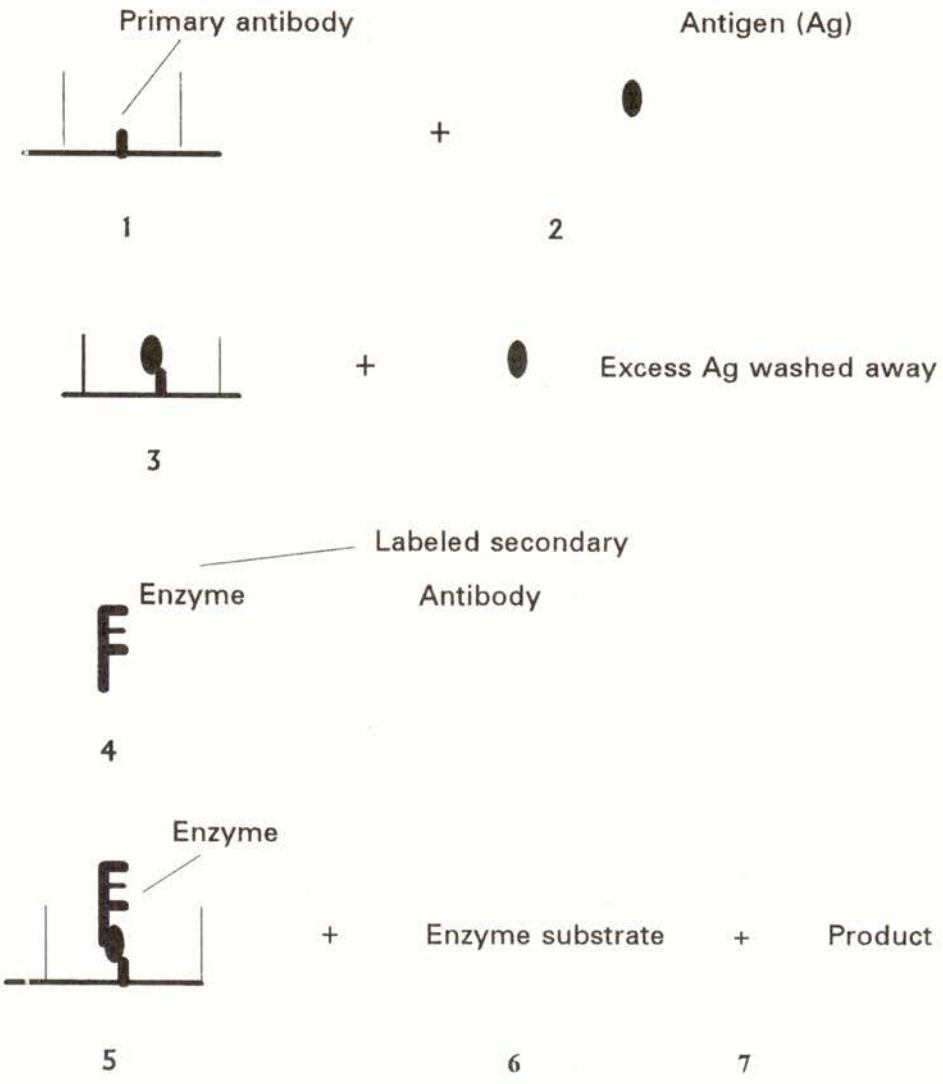
เหตุผลที่มีการนิยมใช้ ELISA อย่างกว้างขวางในปัจจุบันนั้นมีหลายประการ เช่น สะดวกรวดเร็วในกรณีที่ต้องตรวจสอบตัวอย่างพืชจำนวนมากในเวลาอันสั้น เพื่อการ ตรวจหาการติดเชื้อควบคุมโรค และคุณภาพพืช หรือการกักกันพืช ELISA ยังไวต่อการตรวจหาสารความเข้มข้นต่ำ ปฏิกริยาเอ็นไซม์สามารถได้ค่าของการวัดได้สูงหากตรวจพบว่ามีสารที่ตรวจหาอยู่ในปริมาณมาก จึงจัดว่าวิธีนี้มีความดีทั้งด้านความไวทั้งด้าน ความสามารถตรวจหา และให้การตอบสนองเชิงปริมาณ (sensitivity และ detectability) เนื่องจากมีความจำเพาะ (specificity) ต่อแอนติเจน (antigen)เป้าหมายที่ต้องการศึกษา (Tijssen, 1985)

ปฏิกริยา ELISA สามารถวัดออกมาเป็นปริมาณได้เนื่องจากปฏิกริยาเฉพาะระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนหรือสารเป้าหมายที่ต้องการทำการตรวจสอบ เอ็นไซม์ซึ่งติดเชื่อมกับแอนติบอดี (enzyme-conjugated antibody) จะทำให้ ซับสเตรทเกิดการเปลี่ยนรูปและเกิดสี ทำให้วัดการอ่านค่าการดูดกลืนสีในบางคลื่นแสง การผลิตและเตรียมแอนติบอดีเฉพาะอย่างที่มีประสิทธิภาพสูงจะช่วยให้การทดสอบหรือการตรวจหาแอนติเจนได้อย่างจำเพาะแม้เมื่อใช้ในอัตราความเข้มข้นต่ำ นับว่าเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาให้สามารถทำการผลิตขึ้นมาในประเทศไทย

วงการโรคพืชได้มีการเริ่มใช้เทคนิค ELISA มานานกว่ายี่สิบปีแล้ว (Clark และ Adams, 1977) หลังจากนั้นมาก็ได้มีการปรับปรุงวิธีการให้เหมาะสมขึ้นไปเรื่อย ๆ จนสามารถใช้ตรวจวัดได้ทั้งเชิงปริมาณ และและเชิงคุณภาพได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถนำวิธีการทางสถิติมาใช้ในการวางแผนการทดลองได้ (Bauske และคณะ,1994)

เทคนิคการทำ ELISA แบบ Sandwich อย่างหนึ่งนั้นพอสรุปออกเป็นผังภาพดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES



รูปที่ 1 แสดงการทำ ELISA แบบ antibody sandwich ELISA ชนิด non-competitive (ดัดแปลงจาก Goers, J., 1993 Immunological Techniques)

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

แอนติบอดีที่สอง (secondary antibody) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแอนติบอดีที่ติดกับเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (alkaline phosphatase - conjugated antibodies) เนื่องจากเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (Apase) นี้เป็น orthophosphoric monoester phosphohydrolase มีประสิทธิภาพดีในสภาพ alkaline เป็นเอ็นไซม์ที่พบในสัตว์ ไม่พบในพืช ชนิดที่ใช้นี้สกัดจาก bovine intestinal mocosa ในการปฏิบัติจะใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่ใช่ phosphate buffer saline เนื่องจาก inorganic phosphate ที่มีจะเป็นตัว inhibitor ของ Apase เอ็นไซม์นี้ยังเหมาะกับ para-phenyl phosphate (p-NPP) ที่ใช้เป็นซับสเตรท เพราะที่ต่ำกว่า 30 ซ จะเกิด spontaneous hydrolysis น้อย นอกจากนี้ hydrolysis product ที่ได้จากปฏิกริยาเอ็นไซม์ คือ para-nitrophenol (p-NP) มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรที่ใช้อ่านได้ดี

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อหาวิธีการทำ ELISA ที่ใช้ sandwich antibody แบบ non-competitive ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแอนตินอดีที่ผลิตจำหน่าย จากนั้นจึงนำวิธีการที่ได้มาใช้ตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่พบในแปลงปลูกของเกษตรกร และ สุดท้ายคือการเปรียบเทียบการตรวจหาการติดเชื้อปน (mixed infection) ของไวรัสโรคพืชโดยใช้วิธีทางชีวะ (bioassay) และ ELISA

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ขั้นตอนการทำ ELISA แบบ sandwich และ non-competitive

รูปแบบการทดลองปฏิบัติการ ELISA แบบ sandwich และ non-competitive รวมถึงการใส่แอนติบอดีเพื่อก่อปฏิกริยาสร้างสี และการวัดผลมีแสดงไว้เป็นผังภาพดังแสดงในรูปที่ 1 แอนติบอดีที่หนึ่ง (first antibody) ที่ใช้เคลือบหลุมของไมโครไตเตอร์ เพลท (microtiter plate) ได้แก่anti cucumber mosaic virus หรือ anti tobacco mosaic virus (common strain) นั้นเป็น IgG fraction (Agdia 1000 Reagent, Agdia Inc., 30380 County Road 6, Elkhart, IN 46514 U.S.A.) แล้วแต่กรณี ส่วนไมโครเพลทที่ใช้คือ Inter Med Nunc, Nunc-Immuno Plate MaxiSorp F96 ชนิด 96 หลุม(A/S Nunc, Kamstrup. DK-4000 Roskilde, Denmark)

การใส่แอนติเจนนั้นทำโดยการบดตัวอย่างใบพืช ตัวอย่างละ 1 กรัม ในครกทดลอง (mortar and pestle) ที่เติม extraction buffer (TBS-Tween 20 + 20 g/l poly-vinylpyrrolidone)

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สารที่ใช้เป็น blocking agent ได้แก่ 2% bovine serum albumin (Sigma Chemical company) เป็นส่วนใหญ่ โดยมีการทดลองใช้ adult bovine serum ที่สกัดจากเลือดวัวสดจากตลาดเข้าเปรียบเทียบด้วย

แอนติบอดีที่สอง (second antibody) คือ alkaline phosphatase conjugated chicken IgG, anti-CMV และ alkaline phosphatase conjugated chicken IgG, anti- TMVc (Agdia Co.) แล้วแต่กรณี

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อการใช้นั้น แอนติบอดีที่หนึ่งใช้ความเข้มข้น หรือไตเตอร์ต่างกันคือ 0.1 และ 1.0 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ส่วนแอนติบอดีที่สองได้ทดลองใช้สัดส่วนของไตเตอร์คือ 1:3,200 และ 1:800 น้ำคั้นจากตัวอย่างพืชต่างๆ ที่ใช้เป็นแอนติเจนนั้นใช้พืชที่ได้จากแปลงปลูกของเกษตรกรในท้องที่ จังหวัดเชียงใหม่ เช่น อำเภอเมือง อำเภอดอยสะเก็ด และอำเภอสันทราย ได้แก่ตัวอย่างพริก แตงกวา และยาสูบ ที่แสดงอาการของโรคใบด่างซึ่งเข้าใจว่าจะเป็นโรคอันเนื่องจาก CMV หรือ TMV

การวัดการเกิดสี (calorimetry) ซึ่งเป็นผล (product) จากปฏิกริยาของเอ็นไซม์กับซับสเตรทนั้นเป็นการอ่านค่าด้วย ELISA reader ชนิดอัตโนมัติ (Automated Microplate Reader Model EL311, Bio-Tek Instruments, Inc. Laboratory Division. Highland Park, Winooski, VT 05404-0998, U.S.A.) ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405} หรือ absorbance 405 nm) สารซับสเตรทการทดลองนี้ใช้ para-nitrophenylphosphate (PNPP) ซึ่งขณะเกิดปฏิกริยาเชิงบวกขึ้นนั้นเอ็นไซม์ alkaline phosphatase จะเปลี่ยน PNPP ให้เป็นผลิตผลคือ paranitrophenol (PNP) สีเหลืองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

โดยเหตุที่ค่าการอ่านผลด้วย ELISA reader นั้นเป็นค่าเชิงปริมาณที่สำคัญ จึงต้องมีการทดสอบค่าที่ได้จากการอ่าน โดยใช้สารละลาย PNP ที่เตรียมขึ้นเป็นสารละลายความเข้มข้น 0.484 mM ก่อนเพื่อใช้ปรับเปลี่ยนความเจือจางเป็น dilutions ต่าง ๆ สำหรับนำไปวัดผลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{405} เพื่อสังเกตค่าที่วัดได้ว่าเป็นสัดส่วน และสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ PNP

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

2. การตรวจสอบติดเชื้อซ้อน (mixed infection) ของตัวอย่างต้นยาสูบจากแปลงปลูก

2.1 **การตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่ปรากฏอาการ CMV โดย ELISA**

นำต้นยาสูบ 4 ต้น จากแปลงปลูก ซึ่งปรากฏอาการของโรค CMV มาปลูกต่อในกระถางในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายกันแมลง ต้นยาสูบเหล่านี้ได้มีการวินิจฉัยจากอาการที่ปรากฏมาก่อน การทดสอบการถ่ายเชื้อ CMV ผ่านเพลี้ยอ่อน สูกล้าแตงกวาอายุ 10 วัน เมื่อต้นแตงกวาอยู่ในระยะที่เริ่มงอกใบจริง โดยนำเพลี้ยอ่อนปล่อยบนต้นยาสูบทั้ง 4 ต้น หลังการดูดน้ำเลี้ยงจากต้นยาสูบที่เป็นโรคนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเพลี้ยอ่อนไปเลี้ยงต่อบนต้นกล้าแตงกวาเพื่อถ่ายเชื้อต้นละ 5 ตัว ปล่อยให้ดูดน้ำเลี้ยงเพื่อปล่อยเชื้อนาน 1 ชั่วโมง แล้วกำจัดเพลี้ยอ่อนทิ้ง เก็บตัวอย่างใบแตงกวาหลังปล่อยเชื้อนาน 7 วัน พร้อมกับใบของต้นยาสูบที่ใช้เป็นต้นเชื้อเพื่อการทดสอบการติดเชื้อ CMV และ TMV โดย ELISA ตาม protocol ที่ได้ทดลองไว้แล้ว

แต่ละตัวอย่างใช้น้ำคั้น (sap) หยอดในหลุมของไมโครเพลท 3 ซ้ำ โดยการสุ่มตำแหน่งตัวอย่างทั้งหมด (randomization across a plate)

2.2 **การตรวจสอบโดยใช้ bioassay**

การใส่เชื้อด้วยน้ำคั้น (sap inoculation); นำตัวอย่างต้นยาสูบจากแปลงสถานีทดลองยาสูบมาทำการใส่เชื้อแบบ sap inoculation ไปพร้อม ๆ กัน โดยใช้น้ำคั้นจากใบยาสูบที่มีอาการของโรค นำไปใส่บนใบพืชทดสอบ โดยใช้ผงคาร์โบรันดัม (carborundum) โรยเล็กน้อยก่อนลูบช่วยการติดเชื้อ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำแล้วคอยสังเกตอาการโรคของต้นทดสอบ

พืชทดสอบหรือ indicator plants ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่

(1) Nicotiana tabacum cv. Xanthi NC

(2) Nicotiana tabacum cv. Samsun NN

(3) Nicotiana tabacum cv. White Barley

(4) Nicotiana glutinosa

(5) Chenopodum amaranticolor

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

การใส่เชื้อด้วยเพลี้ยอ่อน (aphid transmission): ปล่อยเพลี้ยอ่อนให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นยาสูบที่คาดว่าติดเชื้อไวรัส CMV แล้วไปปล่อยบนพืชทดสอบ N. tabacum cv. White Burley รอ 20 วัน แล้วเตรียมน้ำคั้นจากพืชทดสอบ (ยาสูบพันธุ์ White Burley) เพื่อทำ sap inoculation กับพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด แล้วรอดูอาการโรต การทดลองถ่ายเชื้อจากใบยาสูบอบแห้ง: นำใบยาสูบที่ปรากฏอาการใบด่างที่ได้จากแปลงไปอบ ด้วยความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วบดในน้ำกลั่นเอาน้ำคั้น ทำ sap inoculation กับพืชทดสอบ ต่าง ๆ รอสังเกตอาการของโรค

ผลการทดลอง

1. **ผลของการทดสอบเครื่องอ่าน ELISA**

เครื่องอ่านปฏิกริยา ELISA ทำงานได้อย่างน่าเชื่อถือ เห็นจากค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาว 405 นาโนเมตร (A_{405}) จาก standard PNP (0.484 mM) ที่ปรับให้มีความเข้มข้นต่างกัน สีที่เกิดขึ้นทำให้ได้ค่าซึ่งสอดคล้องกันกับความเข้มข้นที่เปลี่ยน ดังตารางที่ 1

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงขนาดความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}nm) ของ paranitrophenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

PNP standard (0.484 mM), ml	สารเจือจาง 0.1 N NaoH ml.	A_{405} (อ่าน 3 ครั้ง)	ค่าเฉลี่ย A_{405}
0.05	4.95	0.046	0.045
		0.043	
		0.046	
0.10	4.90	0.095	0.093
		0.094	
		0.089	
0.25	4.75	0.228	0.221
		0.216	
		0.220	
0.50	4.50	0.445	0.444
		0.450	
		0.438	

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

2. ผลจากการหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำ ELISA แบบ sandwich ชนิด non-competitive

วิธีการปฏิบัติ (protocol) ที่ดัดแปลงจากของ Tijssen, 1985 และของ Goers, 1993 สามารถนำมาใช้ปฏิบัติสำหรับ ELISA แบบ sandwich ชนิด noncompetitive ซึ่งพบว่าได้ผลดีดังสรุปเป็นข้อได้ดังต่อไปนี้ คือ

1. เคลือบภายในหลุมไมโครเพลทด้วยแอนติบอดีที่หนึ่งในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3(0.05 M, pH 9.6) ที่ 4°C ตลอดคืน
2. ป้องกัน non-specific binding โดย blocking agent(2% BSA หรือ20%ABS) ในบัฟเฟอร์ TBS-T (Tris buffered saline with tween 20, pH7.4)
3. ล้างไมโครเพลทด้วย TBS-T
4. เตรียมตัวอย่างพืชที่จะใช้เป็นแอนติเจนโดยบดพืช 1 กรัม ใน extraction buffer (TBS-T + polyvinylpyrrolidon)ใช้ส่วนที่เป็นน้ำ หยอดตัวอย่างลงในหลุม ทิ้งไว้ที่ 4°C ตลอดคืน
5. ล้างตัวอย่างจากหลุมของเพลทแล้วจึงใส่แอนติบอดีที่สอง ซึ่งมีเอ็นไซม์ (alkaline phosphates conjugated antibody) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 ชั่วโมง จึงล้างออกด้วย TBS แอนติเจนจะถูกยึดไว้ด้วยแอนติบอดีที่ติดไว้ด้วยเอ็นไซม์
6. ทดสอบปฏิกริยาที่เกิดจากเอ็นไซม์ alkaline phosphates โดยใส่ substrate คือ PNPP 1 g/100 ml ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้อง
7. อ่านปฏิกริยาโดยเครื่องอ่าน ELISA ที่คลื่นแสง 405 nm หยุดปฏิกริยาด้วย 2N NaOH เมื่อเห็นว่าผลของการอ่าน (ตัวเลข) แสดงความแตกต่าง ระหว่าง negative control กับตัวอย่างทดลองจนเป็นที่น่าพอใจ

ในการทดลองนี้ negative control จะผ่านการปฏิบัติเหมือนกับหลุมทดสอบทุกประการยกเว้นการใส่แอนติเจนหรือตัวอย่างพืช

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

3. **ผลการตรวจสอบ CMV จากตัวอย่างพริกซึ่งเก็บมาจากแปลงเกษตรกร**

ตัวอย่างทั้ง 7 (S_1-S_7) แสดงอาการของโรคที่น่าสงสัยว่าติดเชื้อ CMVในการทำ ELISA ยังได้ลองใช้ adult bovine serum (20 % ABS) เพื่อเทียบกับ bovine serum albumin (2 % BSA) ให้ค่า A_{405} ดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:3200 และ 1:800 (2 replications) เมื่อใช้ 20 % ABS เป็น blocking agent

	ความเข้มข้น 0.1 ug/ml		ความเข้มข้น 1 ug/ml	
ไตเตอร์	1:3200	1:800	1:3200	1:800
ตัวอย่าง				
Control	0.1855	0.337	0.332	0.625
S_1	0.217	0.406	0.436	0.877
S_2	0.193	0.356	0.468	0.972
S_3	0.205	0.373	0.487	1.013
S_4	0.217	0.401	0.519	1.070
S_5	0.182	0.341	0.400	0.699
S_6	0.1995	0.359	0.454	0.940
S_7	0.081	0.231	0.322	0.647

ปฏิกริยาเอ็นไซม์ซึ่งบ่งชี้ความรุนแรงของโรคในตัวอย่างทั้ง 7 ซึ่งเก็บมาจากแปลงเดียวกันนั้นอยู่ในระดับที่แตกต่างกันโดยของตัวอย่าง S_5 และ S_7 แสดงปฏิกริยาต่ำกว่า นอกจากนี้ การใช้ anti-CMV antibody ความเข้มข้น 1ug/ml และ conjugated antibody ที่ 1: 800 จะแสดงความแตกต่างระหว่าง control กับตัวอย่างทดสอบอย่างชัดเจนกว่า

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ตารางที่ 3 -แสดงค่าเฉลี่ย absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:3200 และ 1:800 (2 replications) blocking agent คือ 2 % BSA

	ความเข้มข้น 0.1 ug/ml		ความเข้มข้น 1 ug/ml	
ไตเตอร์	1:3200	1:800	1:3200	1:800
ตัวอย่าง				
Control	0.018	0.025	0.023	0.078
S_1	0.031	0.099	0.092	0.363
S_2	0.036	0.114	0.097	0.323
S_3	0.030	0.108	0.086	0.310
S_4	0.048	0.088	0.085	0.325
S_5	0.022	0.042	0.047	0.179
S_6	0.023	0.057	0.081	0.278
S_7	0.020	0.042	0.059	0.026

ผลการทดลองพบว่าปฏิกริยาเอ็นไซม์ของตัวอย่าง S_5 และ S_7 ให้ค่าต่ำเหมือนกับในตารางที่ 2 ที่ใช้ ABS เป็น blocking agent

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

4. **ผลการตรวจสอบ CMV จากตัวอย่างพืชตระกูลแตง** ตัวอย่างพืชกลุ่มนี้แสดงอาการโรคหลากหลายและได้มาจากแหล่งต่าง ๆ กัน (S_8 - S_{17}) การทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่างพริก S_1 และ S_7 จากการ ทดลองครั้งก่อนเข้าเปรียบเทียบ

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:800 (3 replications) โดยใช้ 2% BSA เป็น blocking agent ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชตระกูลแตงต่างที่ปลูก

Samples	A405+/-SEM
Control	0.009 +/- 0.002
S1	0.441 +/- 0.015
S7	0.267 +/- 0.007
S8	0.015 +/- 0.001
S9	0.014 +/- 0.001
S10	0.007 +/- 0.001
S11	0.010 +/- 0.001
S12	0.015 +/- 0.003
S13	0.031 +/- 0.007
S14	0.011 +/- 0.002
S15	0.020 +/- 0.004
S16	0.056 +/- 0.027
S17	0.026 +/- 0.007

จากการทดลองที่ 2 นี้ ตัวอย่างพืชตระกูลแตง S_8 - S_{17} ไม่ก่อให้เกิดปฏิกริยาเอ็นไซม์ที่สูง ซึ่งหมายถึงว่าไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อ CMV ยกเว้น S_{16} ซึ่งแสดงผลบวกเพียงเล็กน้อย ส่วนตัวอย่างพริก S_1 และ S_7 ยังคงแสดงปฏิกริยาบวก ดังการทดลองที่แล้ว

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

5. ผลการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบจากแปลงและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเชื้อผ่านเพลี้ยอ่อน โดยการใช้วิธี ELISA

ต้นยาสูบจำนวน 4 ต้น (T_1, T_2, T_3, T_4) ที่แสดงอาการของโรค CMV จากสถานีทดลองยาสูบ เชียงใหม่ และต้นกล้าแตงกวา (C_1 - C_3) ที่ได้รับการใส่เชื้อโรคจากต้นยาสูบผ่านเพลี้ยอ่อนก็ได้รับการทดสอบได้รับการทดสอบการติดเชื้อทั้ง CMV และ TMV โดยวิธี ELISA ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ตารางที่ 5 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไตเตอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการ และต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับการใส่เชื้อผ่านเพลี้ยอ่อน

	ยาสูบ		แตงกวา	
ต้นที่ 1	T_{11}	2.097	C_{11}	-0.011
	T_{12}	1.984	C_{12}	-0.014
	T_{13}	1.863	C_{13}	0.003
ต้นที่ 2	T_{21}	-0.025	C_{21}	0.09
	T_{22}	-0.028	C_{22}	0.080
	T_{23}	-0.020	C_{23}	0.013
ต้นที่ 3	T_{31}	1.935	C_{31}	-0.019
	T_{32}	1.845	C_{32}	-0.019
	T_{33}	2.034	C_{33}	-0.003
ต้นที่ 4	T_{41}	2.150		
	T_{42}	1.960	แตงกวาต้นที่ 4 ไม่มีข้อมูล	
	T_{43}	1.928		
control	T_{c1}	0.000	C_{c1}	0.012
	T_{c2}	0.009	C_{c2}	0.116
	T_{c3}	0.020	C_{c3}	0.010

หมายเหตุ ในการเตรียมแอนติเจนได้สุ่มตัวอย่างจากใบของแต่ละต้น 3 ครั้ง (เช่น T_{11}, T_{12}, T_{13}) และในขั้นตอนการหยอดตัวอย่างบนหลุมได้ทำ randomization ตำแหน่งตัวอย่างทั้งเพลท ตัวอย่างยาสูบและแตงกวาทำพร้อมกัน

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ผลของ ELISA แสดงว่าต้นยาสูบทั้ง 4 ต้นนั้นมีอัตราการติดเชื้อ CMV แตกต่างกัน ยาสูบต้นที่ 2 ให้ค่าสูงสุดในขณะที่ต้นที่ 1 ได้ค่าต่ำหรือไม่เกิดปฏิกริยาเอ็นไซม์เลย ส่วนต้นกล้าแตงกวาที่ได้ ทดลองทำ aphid transmission ให้ถ่ายเชื้อจากยาสูบมายังแตงกวานั้นปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะให้ค่า ELISA ต่ำมากในทุกกรณี ซึ่งอาจจะเป็นเพราะเทคนิคการถ่ายทอดเชื้อไม่เหมาะสมหรือพันธุ์แตงกวาที่ใช้ไม่เหมาะสมกับ aphid transmission แต่พอสรุปได้ว่ายาสูบทั้ง 4 ต้น ซึ่งได้รับการวินิจฉัยตามอาการของโรคว่าเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV นั้น มีเพียง 3 ต้นเท่านั้นที่ให้ค่า absorbance เป็นปฏิกริยาบวกของ CMV ที่สูงมาก

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ตารางที่ 6 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-TMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated autibody ที่ ไตเตอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชเดียวกันกับตารางที่ 5

		ยาสูบ		แตงกวา	
ต้นที่ 1	T_{11}	0.091	C11	0.072	
	T_{12}	0.098	C12	0.070	
	T_{13}	0.072	C13	0.069	
ต้นที่ 2	T_{21}	2.246	C21	0.072	
	T_{22}	2.265	C22	0.121	
	T_{23}	2.212	C23	0.081	
ต้นที่ 3	T_{31}	0.165	C31	0.061	
	T_{32}	0.188	C32	0.059	
	T_{33}	0.179	C33	0.069	
ต้นที่ 4	T_{41}	0.237	แตงกวาต้นที่สี่ไม่มีข้อมูล		
	T_{42}	0.215			
	T_{43}	0.215			
Control	T_{c1}	0.081	Cc1	0.058	
	T_{c2}	0.108	Cc2	0.075	
	T_{c3}	0.069	Cc3	0.063	

หมายเหตุ ในการเตรียมแอนติเจนได้สุ่มตัวอย่างจากใบของแต่ละต้น 3 ครั้ง (เช่น T_{11}, T_{12}, T_{13}) และในขั้นตอนการหยอดตัวอย่างบนหลุมได้ทำ randomization ตำแหน่งตัวอย่างทั้งเพลทตัวอย่างยาสูบและแตงกวาทำการตรวจสอบพร้อมกัน

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

ผลจากการตรวจสอบเชื้อ TMV โดย ELISA พบว่า ยาสูบต้นที่ 2 ติดเชื้อ TMV แต่ไม่เกิดปฏิกริยากับ anti-CMV ผลที่ได้กับยาสูบต้นที่ 4 น่าจะเป็นกรณีของ mixed infection ผลของ ELISA ต่อ anti-TMV แสดงผลบวกถึงแม้ว่าจะค่อนข้างต่ำ ซึ่งในการทดสอบกับ anti-CMV ต้นที่ 4 นี้แสดงปฏิกริยาสูงมาก

6. ผลจากการตรวจสอบ mixed infection โดยใช้ bioassay.

การทำ bioassay เป็นการถ่ายทอดเชื้อโรคจากพืชที่จะทำการศึกษาสู่พืชทดสอบหรือ indicator plants 5 ชนิด ดังกล่าวแล้ว พืชที่ติดเชื้อ เริ่มแรกคือ ต้นยาสูบจากแปลงของสถานีทดลองยาสูบ ซึ่งปรากฏอาการใบด่างจำนวน 4 ต้น ที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่ามีอาการของโรคจากการติดเชื้อของ CMV ชัดเจน

การศึกษาจากการทดสอบในโรงเรือนแบ่งเป็น 3 ส่วน ซึ่งได้ผลดังต่อไปนี้

ก. ผลจากการทำ sap inoculation กับพืชทดสอบโดยตรง พบว่าเกิด local lesions บนพืชทดสอบภายใน 3-5 วัน

ข. ผลจาก aphid transmission บนพืชทดสอบชนิด N. tabacum cv. White Burley แล้วนำน้ำคั้นมาทำ sap inoculation บนพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ปรากฏว่าไม่เกิด local lesions เมื่อรอดูอาการถึง 15-20 วัน

ค. ผลจากการอบแห้งใบที่ติดเชื้อก่อนแล้วเอาน้ำคั้นไปทำ sap inculation พบว่าพืชทดสอบเกิด local lesions ตามด้วย necrosis (ภาพที่ 2 - 4)

การทำ bioassay ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าต้นยาสูบที่เก็บจากแปลง ซึ่งปรากฏอาการของโรค CMV นั้นคงไม่ได้ติดเชื้อ CMV แต่เพียงอย่างเดียว แต่จะเป็นการติดเชื้อที่ปนกัน (mixed infection) และแสดงอาการซ้อนหรือปนกันอยู่ของทั้ง CMV และ TMV เมื่อทำลายเชื้อ CMV โดยการอบด้วยความร้อนแล้ว TMV ก็ยังสามารถก่อโรคจนเกิดเป็น local lesionsในพืชทดสอบต่าง ๆ ได้

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีตรวจสอบไวรัสโรคพืชโดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยา คือ ELISA ประเภท แซนด์วิช ซึ่งกำหนดให้แอนติเจนเชื่อมอยู่ระหว่างแอนติบอดีที่หนึ่งและแอนติบอดีที่สองที่มี conjugated enzyme ELISA โดยวิธีการนี้เหมาะแก่การทดลองเชิงคุณภาพเบื้องต้น เนื่องจากว่าไม่จำเป็นต้องมีแอนติเจนบริสุทธิ์หรือ purified viral particles แต่ต้องมีแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ เช่น เป็น polyclonal antibody ซึ่งอาจเชื่อมกับแอนติเจนหนึ่ง ๆ ได้หลายจุด หากต้องการเพิ่ม คุณค่าของการตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้ ควรมีแอนติเจนบริสุทธิ์ที่เตรียมเองจากเชื้อไวรัสในเขตนี้ โดยเฉพาะการเตรียมแอนติบอดีแบบ monoclonal antibody ที่จะช่วยให้มีความสามารถทำการวินิจฉัย หรือ บ่งชี้อไวรัสต่างๆ ถึงระดับสเตรนลงไป ความพร้อมที่จะผลิตแอนติบอดีได้เองให้สามารถมีมีแอนติเจนบริสุทธิ์จะทำให้การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณได้จาก calibration curve ได้

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี และขั้นตอนการทำ ELISA ที่ปรับปรุงขึ้นมีความเหมาะสมต่อการใช้ปฏิบัติเพื่อการตรวจหาเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีซึ่งสั่งซื้อจากบริษัท Agdia, U.S.A. นั้นมีคุณภาพดี เพียงพอที่จะใช้ทำ ELISA เพื่อการตรวจสอบโรค CMV และ TMV ที่พบในประเทศไทย (จังหวัดเชียงใหม่และใกล้เคียง) ได้ แม้ว่าแอนติเจนเริ่มแรกของ TMV ที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดีของ Agdia นั้นจะเป็น common strain ซึ่งยังไม่มีรายงานไว้ในประเทศไทย

เมื่อได้ protocol สำหรับการทำ ELISA แล้วได้ทดลองปรับปรุงในบางจุด ได้แก่ การสุ่มตำแหน่งหลุมของตัวอย่างทั้งหมดบนเพลทสำหรับการทำ ELISA แต่ละครั้ง ทั้งนี้เพื่อลด experimental error ในทางทฤษฎีนั้นควรมีการวางแผนการทดลองทางสถิติ เช่น Bauske et al., 1994 ได้ เปรียบเทียบหลาย model พร้อมกับข้อสรุปว่าความแตกต่างระหว่างแถวและระหว่างคอลัมน์บนไมโครเพลท ก่อให้เกิด type I error ที่สูงเกินไป และไม่ควรนำผลการอ่าน ELISA จากไมโครเพลทคนละอันมา วิเคราะห์ผลรวมกัน และยังสรุปว่าการใช้ block designs ชนิด RCB จะแม่นยำกว่า CRB ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถ้าจะใช้ประโยชน์จาก ELISA อย่างจริงจัง โดยเฉพาะในการตรวจสอบเชิงปริมาณ (quantitative) ควรมีการทดสอบก่อนว่าการวางแผนการทดลองทางสถิติแบบใดให้ผลซึ่งเกิดความแม่นยำสูง

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

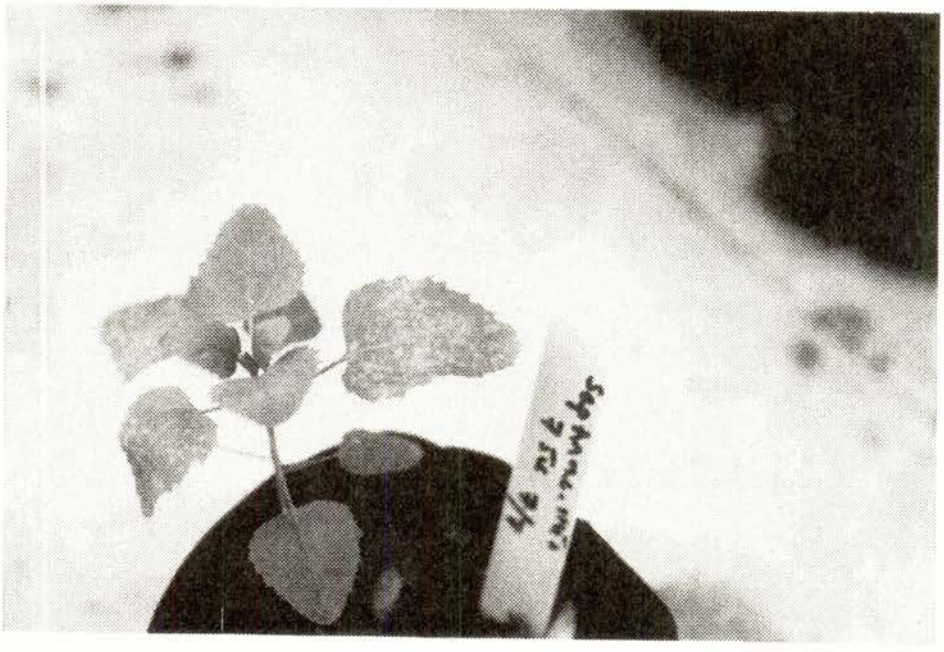
ในการทดลองครั้งนี้ยังได้ลองใช้ adult bovine serum (ABS) จากเลือดวัวสดเป็น blocking agent ซึ่ง ABS นั้นสามารถหาซื้อได้จากตลาด ถ้าได้ผลดีก็จะเป็นการลดต้นทุนการทำ ELISA แม้ผลปรากฏว่า bovine serum albumin (BSA) ของ sigma ให้ผลดีกว่า คือ negative control ให้ค่า A_{405} ต่ำในขณะที่ negative control ของการทดลองที่ใช้ ABS ให้ค่า A_{405} สูงเกินไป อย่างไรก็ตามในกรณีที่มีความจำเป็นต้องใช้ ABS ก็ยังเป็นไปได้ เพราะสามารถ เห็นความแตกต่างระหว่าง negative control กับตัวอย่างพืชที่สงสัยว่าติดโรค อีกประการหนึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้มีการเปรียบเทียบ ABS จากต่างที่มาเนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่ ABS ที่ได้จากวัว หรือสัตว์บางตัว จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่ากัน

ทั้ง CMV และ TMV เป็นไวรัสที่ก่ออาการใบด่างแบบกำซาบ (systemic mosaic) ในพืชเศรษฐกิจหลายอย่าง และยังก่อให้เกิด local lesions แก่พืชทดสอบที่ต่างกัน ไวรัสสองชนิดนี้สามารถบุกรุกและก่อโรคในพืชต้นเดียวกันการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อร่วมกัน (mixed infection) เกิดขึ้นได้จริงในแปลงปลูกและ ELISA มีบทบาทในการช่วจตรวจสอบได้ดี ผลการตรวจสอบของ ELISA จะได้ผลรวดเร็วกว่าการทดสอบแบบ bioassay คือ 3 วันถ้าใช้ protocal เหมือนคราวนี้ ส่วน bioassay ใช้เวลารวมทั้งการเตรียมพืชประมาณ 3-4 สัปดาห์ อย่างไรก็ดีคุณค่าของ bioassay นั้น ไม่สามารถมองข้ามได้ เพราะให้ความมั่นใจอย่างสูงเมื่อมองเห็นอาการของโรคในพืชทดสอบ จุดอ่อน ของ ELISA อยู่ที่ความเฉพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อแอนติเจน ในกรณีที่ได้ผลที่ลบ (ไม่แตกต่างจาก negative control) อาจทำให้เกิดความไม่มั่นใจในบางครั้ง ดังนั้นในการตรวจสอบโรคพืชไวรัสนั้น จึงควรกระทำด้วยวิธีการที่มากกว่า 1 วิธีการเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ใกล้ความเป็นจริงมากที่สุด วิธีการอื่น ๆ ได้แก่ การใช้ภาพอิเล็กตรอนจุลทรรศน์ การใช้ nucleic acid technology และการใช้ วิธีการของอิมมูโนวิทยาอื่น ๆ ที่นักโรคพืชนิยมใช้ ยิ่งใช้หลายวิธีการประกอบกันมากขึ้นก็จะเป็นการเพิ่ม ความมั่นใจและความน่าเชื่อถือ เนื่องจากแต่ละวิธีการจะมีข้อดีต่างกัน

MAEJO
UNIVERSITY
ARCHIVES

ภาพที่ 1 ต้นยาสูบแสดงอาการใบด่างของโรคไวรัส

MAEJO
UNIVERSITY
ARCHIVES



ภาพที่ 2 พืชทดสอบ Chenopodum amaranticolor แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation โดยใช้น้ำคั้นของตัวอย่างโรคที่ผ่านการอบแห้งแล้ว

MAEJO
UNIVERSITY
ARCHIVES

ภาพที่ 3 พืชทดสอบ Nicotiana tabacum cv. Samsun NN แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation

MAEJO
UNIVERSITY
ARCHIVES

ภาพที่ 4 พืชทดสอบ Nicotiana spp. แสดง necrosis ที่เริ่มจาก local lesions ซึ่งเกิดขึ้นหลังทำ sap inoculation

MAEJO UNIVERSITY ARCHIVES

เอกสารอ้างอิง

1. Bauske, E.M., A.D. Hewings, F.L. Kolb, and Carmer, S.G. 1994. Valiability in enzyme-linked immunosorbent assays and control of experimental error bye use of experimental designs. Plant Dis.78:1206-1210.
2. Clarlk, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characterics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol.34:475 - 483.
3. Gibbs, A.J. and Harrisson, B.D. 1970. Cucumber mosaic virus. C.M.I/A.A.B. Descriptions of plant viruses. Perthshire, Scotland.
4. Goers, J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manuals. Academic Press, Inc., California
5. Spiegel, S., Frison, E.A., and Converse, R.H. 1993. Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germplasm. Plant dis. 77:1176-1190.
6. Tijssen, P. 1985. Laboratory Techniquesin Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdams.
7. Zaitlin, M. and Israel, H.W. 1975. Tobacco Mosaic Virus (Type Strain). C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses. Perthshire, Scotland.