

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสโรคพืชด้วย
เทคนิคแบบ ELISA, Dot Blotting และ Western Blotting
A COMPARATIVE STUDY OF PLANT VIRAL DISEASE
DETECTABILITIES BY ELISA, DOT-BLOTTING AND WESTERN
BLOTTING

อุทัย รุ่งเรืองศรี¹ และ นลินี รุ่งเรืองศรี²

U-TAI ROONGRUANGSREE AND NALINEE ROONGRUANGSREE

¹ ภาควิชาอารักขาพืช

คณะผลิตกรรมการเกษตร

² ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

ไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) และ *Tobacco mosaic virus* (TMV) พบได้ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของไทยซึ่งอาจติดเชื้อมันกันอยู่ โดยที่อาการใบด่างนั้นไม่สามารถแยกแยะได้พืชจากแปลงปลูกที่แสดงอาการของโรคดังกล่าวถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA ปรากฏว่าได้ผลเป็นดังความคาดหมาย พืชที่แสดงอาการเช่นกันอีกส่วนหนึ่งถูกนำมาถ่ายทอดเชื้อด้วยน้ำคั้นบนพืชทดสอบ ได้แก่ แตงกวา และ ยาสูบเพื่อการขยายเชื้อไวรัส หลังจากนั้นทำการสกัดโปรตีนจากพืชทดสอบและแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายลายแถบโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อทำเวสต์เทิร์นบลอต ในการตรวจพบการติดเชื้อ CMV และ TMV อย่างจำเพาะเมื่อใช้แอนติบอดีชนิด rabbit anti-CMV หรือ rabbit anti-TMV ต่อด้วยแอนติบอดี goat anti-rabbit ที่คอนจูเกตด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ผลจากปฏิกิริยาแสดงให้เห็นว่าพืชทดสอบที่ติดเชื้อ TMV มีแถบโปรตีนเพียงอันเดียวเหมือนกันหมด ส่วนพืชที่ติดเชื้อ CMV แสดงแถบโปรตีน 4 อัน ที่มีความแตกต่างกัน สันนิษฐานได้ว่าเป็นชนิดโปรตีนที่มีหน้าที่แตกต่างกัน

ABSTRACT

A wide range of economic crops grown in Thailand are infected with viruses--*Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV); mixed infection is not

uncommon. While symptoms alone are not distinguishable, various immunological detection methods are helpful. In this study, plant samples apparently infected with the viral diseases were subjected to the routine ELISA testing. For Western blotting, diseased samples were sap-inoculated onto test plants—cucurbits and tobacco. The extracted plant proteins were denatured and separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The specific immunodetection was performed by using rabbit anti-CMV and rabbit anti-TMV as primary antibodies, followed by a goat anti-rabbit conjugated with alkaline phosphatase reaction. Results showed that TMV-infected samples gave similarly one positive band, whereas CMV-infected plants yielded four positive protein bands of variable mobilities. The apparent differences in protein sizes may suggest their different functions.

คำนำ

ไวรัสโรคพืชมีหลายชนิด และการเรียกชื่อโรคยังใช้วิธีการเรียกจากอาการของโรคอยู่ จึงเกิดความสับสนเมื่อมีเชื้อไวรัสหลายชนิดเข้าทำลายพืช เชื้อไวรัสสามารถทำลายผลผลิตของเกษตรกรทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพอย่างมาก โรคพืชที่เกิดจากไวรัสโดยทั่วไปยังไม่อาจรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ การควบคุมโรคจึงต้องใช้วิธีการป้องกันโรคที่อาจเกิดขึ้นและการกำจัดพืชที่เป็นโรคแล้วเพื่อมิให้เป็นต้นตอของการกระจายต่อไป แต่ทั้งการป้องกันและกำจัดยังมีปัญหาสำคัญด้านการตรวจหาการติดเชื้อ (detection) ที่ถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งต้องอาศัยวิธีการวินิจฉัยโรค (diagnosis) ที่เหมาะสม แต่เนื่องจากทั้งการตรวจหาและการวินิจฉัยโรคไวรัสทั่วไปทำได้ยาก จึงมักอาศัยวิธีการสังเกตอาการโรคที่พืชแสดงออกมาควบคุมคู่ไปกับการทดสอบถ่ายทอดเชื้อสู่พืชทดสอบ สำหรับห้องปฏิบัติการที่พร้อมแล้วมักอาศัยวิธีการทางซีรั่มวิทยา (serological methods) ได้แก่ วิธี ELISA ร่วมกับวิธี dot blotting และ Western blotting ซึ่งประสิทธิภาพอาจจะไม่เท่ากัน จึงควรศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเหล่านี้ เพื่อหาวิธีที่ให้ข้อมูลแม่นยำและประหยัด

วิธีการที่เรียกว่า ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ใช้แอนติซีรั่มของไวรัสนั้นๆ อย่างเฉพาะ โดยให้แอนติซีรั่มทำปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ ผลของปฏิกิริยาจะวัดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาเอ็นไซม์ให้กลายเป็นสีเข้มหลังจากที่เติมสับสเตรทของเอ็นไซม์