รายงานผลงานวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสโรคพืชด้วยเทคนิคแบบ ELISA, Dot Blotting และ Western Blotting

A COMPARATIVE STUDY OF PLANT VIRAL DISEASE DETECTABILITIES BY ELISA, DOT- BLOTTING AND WESTERN BLOTTING

โดย

อุทัย รุ่งเรืองศรี นลินี รุ่งเรืองศรี

2545

รายงานผลงานวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสโรคพืชด้วยเทคนิคแบบ ELISA, Dot Blotting และ Western Blotting

A COMPARATIVE STUDY OF PLANT VIRAL DISEASE DETECTABILITIES BY ELISA, DOT-BLOTTING AND WESTERN BLOTTING

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2539
จำนวน 256,500 บาท

หัวหน้าโครงการ นายอุทัย รุ่งเรืองศรี
ผู้ร่วมงาน นางนลินี รุ่งเรืองศรี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 30 พฤศจิกายน 2545

คำนิยม

(Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2539 การดำเนินงานวิจัยเป็นไปด้วยความล่าช้า เนื่องจากประสพปัญหาในการเก็บตัวอย่างโรคพืชในท้องที่จากแปลงเกษตรกรหลายๆครั้ง การปรากฏอาการขึ้นกับฤดูกาลและดินฟ้าอากาศ และยังต้องเก็บตัวอย่างจากแปลงมาถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบในโรงเรือนเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นอาการของโรคที่เกิดจากไวรัส คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อนุมัติให้ทุนสนับสนุนในครั้งนี้ ทำให้ได้มีโอกาสเรียนรู้วิธีการใหม่ในการตรวจหาโรคพืช เช่น วิธีเวสเทอร์นบล็อท

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	1
คำนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์ผลการทดลอง	13
เอกสารอ้างอิง	14

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพประกอบที่ 1	อนุภาคไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) และ *Tobacco mosaic virus* (TMV)	6
ภาพประกอบที่ 2	อาการโรคใบด่าง (mosaic) ของยาสูบพืชทดสอบ	7
ภาพประกอบที่ 3	ลายแถบโปรตีนจากพืชใบด่างและผลจากการตรวจหา TMV ด้วยเวสเทอร์นบล็อท	10
ภาพประกอบที่ 4	การแยกโปรตีนจากพืชทดลองและพืชจากแปลงเกษตรกร และผลจากการตรวจหา TMVด้วยเวสเทอร์นบล็อท	11
ภาพประกอบที่ 5	การแยกโปรตีนจากพืชทดลองที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ และผลจากการตรวจหา CMVด้วยเวสเทอร์นบล็อท	11
ภาพประกอบที่ 6	การแยกโปรตีนจากพืชทดลองที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ และผลจากการตรวจหา CMVด้วยเวสเทอร์นบล็อท	12

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสโรคพืชด้วยเทคนิคแบบ ELISA, Dot Blotting และ Western Blotting

A COMPARATIVE STUDY OF PLANT VIRAL DISEASE DETECTABILITIES BY ELISA, DOT-BLOTTING AND WESTERN BLOTTING

อุทัย รุ่งเรืองศรี [1] และ นลินี รุ่งเรืองศรี [2]

U-TAI ROONGRUANGSREE AND NALINEE ROONGRUANGSREE

[1] ภาควิชาอารักขาพืช
คณะผลิตกรรมการเกษตร

[2] ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

ไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) และ *Tobacco mosaic virus* (TMV)พบได้ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของไทยซึ่งอาจติดเชื้อปนกันอยู่ โดยที่อาการใบด่างนั้นไม่สามารถแยกแยะได้ พืชจากแปลงปลูกที่แสดงอาการของโรคดังกล่าวถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA ปรากฏว่าได้ผลเป็นดังความคาดหมาย พืชที่แสดงอาการเช่นกันอีกส่วนหนึ่งถูกนำมาถ่ายทอดเชื้อด้วยน้ำคั้นบนพืชทดสอบ ได้แก่ แตงกวา และ ยาสูบเพื่อการขยายเชื้อไวรัส หลังจากนั้นทำการสกัดโปรตีนจากพืชทดสอบและแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายลายแถบโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเพื่อทำเวสเทอร์นบล็อท ในการตรวจพบการติดเชื้อ CMV และ TMV อย่างจำเพาะเมื่อใช้แอนติบอดีชนิด rabbit anti-CMV หรือ rabbit anti-TMV ต่อด้วยแอนติบอดี goat anti-rabbit ที่คอนจูเกทด้วยเอ็นไซม์ 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 จึงมักอาศัยวิธีการสังเกตอาการโรคที่พืชแสดงออกมาควบคู่ไปกับการทดลองถ่ายทอดเชื้อสู่พืชทดสอบ สำหรับห้องปฏิบัติการที่พร้อมแล้วมักอาศัยวิธีการทางซีรัมวิทยา (serological methods) ได้แก่ วิธี ELISA ร่วมกับวิธี dot blotting และ Western blotting ซึ่งประสิทธิภาพอาจจะไม่เท่ากัน จึงควรศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเหล่านี้ เพื่อหาวิธีที่ให้ข้อมูลแม่นยำและประหยัด

วิธีการที่เรียกว่า ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)ใช้แอนติซีรัมของไวรัสนั้นๆอย่างเฉพาะ โดยให้แอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชที่สงสัยว่าจะติดเชื้อ ผลของปฏิกิริยาจะวัดได้โดยอาศัยปฏิกิริยาเอ็นไซม์ให้กลายเป็นสีเข้มหลังจากที่เติมสับสเตรทของเอ็นไซม์

แล้ว ระดับของปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถวัดค่าออกมาเป็นค่าดูดกลืนของแสง ส่วนวิธี dot blot นั้นอาศัยปฏิกิริยาแอนติเจนกับแอนติบอดีเช่นเดียวกับ ELISA แต่ใช้วัสดุจับยึดแอนติเจน คือแผ่นไนลอนหรือแผ่นไนโตรเซลลูโลส ส่วนในเวสเทอร์น บล็อท(Western blotting) ต้องแยกโปรตีนหรือแอนติเจนในตัวอย่างพืชก่อน โดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โปรตีนต่างชนิดจะถูกแยกเป็นแถบต่างๆตามน้ำหนักโมเลกุลและการเคลื่อนตัวในเจล หลังจากนั้นจึงย้ายตัวอย่างไปไว้บนแผ่นไนลอนซึ่งเป็นวัสดุจับยึดแอนติเจน ตามด้วยการทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมและปฏิกิริยาเอ็นไซม์เพื่อการสังเกตผล วิธีนี้มีประโยชน์ในกรณีที่เป็น mixed infection หรือการติดเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด และมีประโยชน์ที่จะได้ข้อมูลว่าเอพิโทป (epitope) ของแอนติบอดีเฉพาะนั้นเป็นโปรตีนชิ้นใด

เวสเทอร์น บล็อทเป็นวิธีการใช้ตรวจหาโปรตีนจำเพาะชนิด มักใช้เพื่อการวิเคราะห์และยืนยันผลการตรวจสอบโปรตีนจำเพาะชนิดต่างๆ การทำเวสเทอร์บล็อทนั้นแบ่งออกเป็นสามขั้นตอนคือ (1) ใช้กระแสไฟฟ้าแบบอิเล็คโตรโฟรีสิสสำหรับแยกโปรตีนให้อยู่เป็นแถบตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลภายในแผ่นเจลโปลีอาคริลาไมด์ ซึ่งประกอบด้วยโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟตสำหรับช่วยทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพที่เหมาะสม ขั้นตอนนี้มักเรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE, (2) ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลสู่เมมเบรน (electroblotting) และ, (3) ตรวจหาแถบโปรตีนจำเพาะโดยวิธีการทางอิมมิวโนวิทยา (immunodetection) ตามด้วยการใช้ซับสเตรทของเอ็นไซม์ที่มีในแอนติบอดีขยายผลให้เกิดสีที่มองเห็นได้

การย้ายแถบโปรตีนสู่เมมเบรนด้วยไฟฟ้านั้นเริ่มขึ้นจากที่ Tobin และคณะ (1979)ประกบเจลเข้ากับเมมเบรนจำพวกไนโตรเซลลูโลส แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านบัฟเฟอร์ให้โปรตีนย้ายจากเจลทางขั้วลบเข้าสู่แผ่นเมมเบรนทางขั้วบวก เวสเทอร์นบล็อทนี้นอกเหนือจากการแพทย์แล้วยังมีการนำมาใช้วิเคราะห์หาโปรตีนแอนติเจนของเชื้อโรคทั้ง เชื้อรา แบ็คทีเรีย ไฟโตพลาสมา และไวรัส (De Boer และ Ward, 1990; Sambrook และ คณะ, 1989; Ohshima และคณะ, 2000; Reddy และคณะ, 2002; Sanchez-Sanchez และคณะ, 2001; Prieto และคณะ, 2001; Takaichi และคณะ, 2001; Wichman และ Hopkins, 2002)

โรคพืชหลายชนิดมีอาการแบบเดียวกันมักทำให้วินิจฉัยด้วยการสังเกตอาการได้ไม่แน่นอนเป็นผลให้ทำการควบคุมโรคไม่ได้ผล ตัวอย่างของโรคเช่นนี้จะเห็นได้จากโรคใบด่าง (mosaic)ที่อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เชื้อไวรัสเช่น*Cucumber mosaic virus* (CMV) และ *Tobacco mosaic virus* (TMV)แม้มีรูปร่างอนุภาคและลักษณะสมบัติสำคัญที่แตกต่างกัน (ภาพประกอบที่ 1)นับว่าเป็นไวรัสสำคัญของพวกที่สามารถก่อโรคที่ทำให้เกิดอาการใบด่างกับ

ยาสูบและพืชเศรษฐกิจหลายชนิดจนทำให้เกิดความเสียหายทางคุณภาพและปริมาณของผลผลิตได้ เชื้อไวรัสทั้งสองนี้จะพบเสมอกับยาสูบทั่วไป

โดยที่พื้นที่ปลูกพืชของมหาวิทยาลัยแม่โจ้และบริเวณอำเภอใกล้เคียงเคยมีการปลูกยาสูบติดต่อกันมานานหลายสิบปี โรคพืชที่มีอาการใบด่างในเขตนี้หลายโรคอาจมีสาเหตุมาจาก CMV และ TMV ที่เคยก่อโรคกับยาสูบมาก่อน ทั้ง CMV และ TMV นั้นสามารถติดต่อเชื้อไปด้วยการสัมผัส แต่ CMV ก็ยังติดต่อไปด้วยเพลี้ยอ่อนที่เป็นพาหะได้อีกด้วย ไวรัสทั้งสองนี้อยู่ได้โดยการติดเชื้อกับพืชได้อย่างกว้างขวาง TMV ยังอยู่ได้ในเศษพืชได้เป็นเวลานาน

การตรวจหาเชื้อโรคทั้งสองนี้แม้ทำได้ดีโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA (อุทัย และ นลินี, 2544)แต่วิธีการ ELISA นั้นจะไม่สามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติของเชื้อโรคแต่หากใช้วิธีเวสเทอร์น บล็อทสำหรับวินิจฉัยโรคก็อาจช่วยให้เห็นคุณสมบัติของแอนติเจนจำเพาะของเชื้อโรคพืช จนอาจตรวจหา สเตรนได้โดยอาศัยลายแถบโปรตีนที่ปรากฏเป็นเอกลักษณ์

การทดลองนี้ทำเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีที่อาจนำมาใช้วินิจฉัยโรคพืชที่มีอาการใบด่างเนื่องจากเชื้อไวรัส พร้อมกับสังเกตลักษณะแถบโปรตีนที่อาจพบจากการตรวจสอบเพื่อเป็นแนวทางการศึกษาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การตรวจหา TMV และ CMV โดยวิธี ELISA

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัส CMV และ TMV ด้วยวิธี double antibody sandwich enzyme-linked immunoassays (DAS ELISA) โดยมีalkaline phosphataseเป็นเอ็นไซม์ติดฉลาก (label) (Clark กับ Adams,1977 และ Converse กับ Martin,1990) โดยใช้ coating antibody anti-TMV และ alkaline phosphatase conjugated anti-TMV (Agdia Incorporated, Elkhart, Indiana 46514 USA) เจือจาง 1:200 ในการทดลองเดียวกันใช้ coating antibody anti-CMV และ alkaline phosphatase conjugated anti-CMV (Agdia)

เตรียมตัวอย่างพืชโดยใช้ยาสูบใบอ่อนจากต้นที่มีอาการใบด่างซึ่งเก็บจากสถานีทดลองยาสูบแม่โจ้เชียงใหม่และที่ปลูกไว้ในเรือนปลูกพืช และที่เก็บจากแปลงเกษตรกรใกล้มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งอยู่ในเขตอำเอสันทราย จ.เชียงใหม่ ทั้งหมดนี้เป็นยาสูบที่แสดงอาการใบด่าง พบช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน สำหรับnegative control ใช้ใบจาก *Nicotiana tabaccum* 'Xanthi' ใช้ตัวอย่างละ 0.05 – 0.08 กรัมบดด้วยก้านบดพลาสติคในหลอดสำหรับไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5

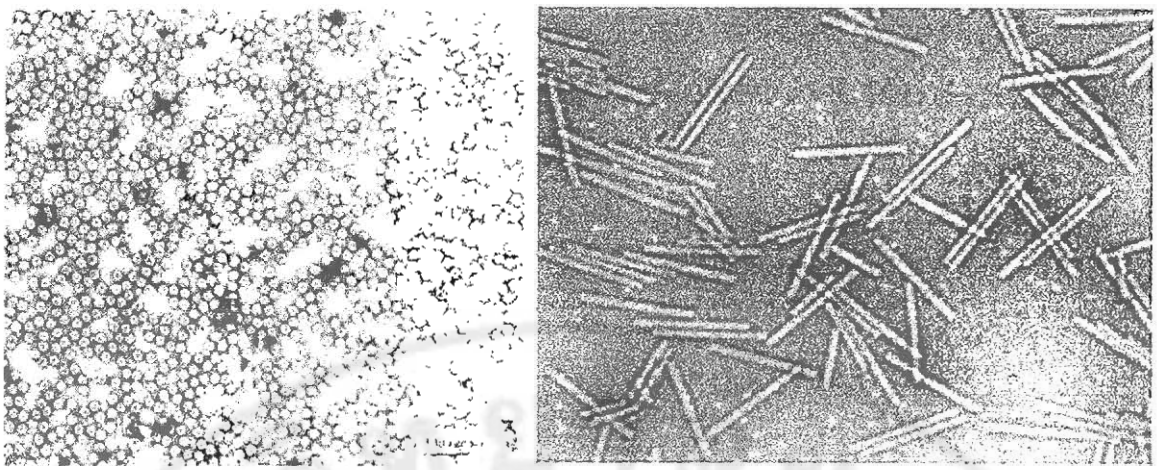
มิลลิลิตรที่บรรจุ TBST (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl pH 7.5) ผสม 2% polyvinylpyrrolidone (mol. wt.10,000) อัตราส่วนน้ำหนักตัวอย่างพืช 1 ต่อปริมาตร 10

บรรจุ anti-TMV หรือ anti-CMV ที่ผสมใน 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (Na_2CO_3 1.59 g l^{-1}, $NaHCO_3$ 2.92 g l^{-1}), pH 9.6 อัตรา 1:200) ลงใน 96-well flat bottom polystyrene plate (Nunc-Immuno plate, F96 Maxisorp. Nalge Nunc International) หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ (หยอด 3 หลุม) ก่อนอบนาน 2 ชั่วโมงที่ 37 ซ ล้างแต่ละหลุมด้วย TBST (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl pH 7.5 ผสม Tween 20, 0.5 มล./ลิตร) 5 ครั้ง แล้วจึงหยอดน้ำคั้นที่ได้จากการบดตัวอย่าง ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร มีการเปรียบเทียบด้วยหลุมที่บรรจุ TBST(ไม่มีแอนจิเจน) เก็บถาดในอุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือค้างคืนในตู้เย็นที่ 4 ซ ทำการล้าง 5 ครั้งด้วย TBST ก่อนบรรจุ conjugated antibody หลุมละ 100 ไมโครลิตร ครอบถาดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมงแล้วล้าง 5 ครั้งด้วย TBST ก่อนใส่ enzyme substrate (p-nitrophenyl phosphate ใน10 % diethanolamine buffer, pH 9.8 อัตรา1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกริยานาน 30 นาที จึงหยุดโดยการเติม 3 M NaOH ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดปฏิกิริยาด้วยเครื่องอ่านอัตโนมัติซึ่งวัดการดูดกลืนของแสงในแต่ละหลุมที่คลื่น 405 นาโนเมตร(nm)

2. การตรวจหาโดยการวิเคราะห์โปรตีนแบบเวสเทอร์นบล็อท (Western Blotting)

1. <u>การเตรียมตัวอย่างพืชที่เป็นโรคใบด่าง</u>

เก็บตัวอย่างใบพืชแสดงอาการใบด่างที่พบในพื้นที่ปลูกพืชของภาควิชาพืชไร่ และบริเวณแปลงเกษตรกรใกล้มหาวิทยาลัยมาบดในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1: 5 น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร นำน้ำคั้นผสมกับ diatomaceous earth ก่อนใช้ลูบกับใบของกล้ายาสูบและพืชทดลอง เป็นการถ่ายเชื้อแบบ sap inoculation แล้วใช้ใบอ่อนจากพืชเหล่านั้นไปเตรียม crude protein สำหรับตรวจหาและวิเคราะห์แถบโปรตีน ภาพประกอบที่ 2 แสดงใบยาสูบที่แสดงอาการใบด่างจากการใส่เชื้อต่างกัน อาการใบด่างที่พบมักมีได้ต่างกันจนทำให้บอกสาเหตุของโรคได้ยาก ภายใต้สภาพแวดล้อมบางอย่างเช่นเมื่ออากาศร้อนอาการใบด่างอาจหายไปได้ พืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการใบด่างได้อีกเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่ร้อนเกินไป หรือเมื่อเข้าหน้าหนาว



ภาพประกอบที่ 1 ซ้าย *Cucumber mosaic virus* (CMV)ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคราว 29 นาโนเมตร จีโนมแบบ linear positive-sense single stranded RNA, structural protein 24.25 kDa, 3 non-structural proteins; 36.3, 31.0 และ 9.9 kDa ติดเชื้อกับพืชอำนายมากชนิด ถ่ายทอดเชื้อทางเพลี้ยอ่อนพาหะ, การสัมผัส, และทางเมล็ดพันธุ์ พบเชื้อทั่วไป เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในจีนัส *Cucumovirus* แฟมิลี *Bromoviridae*; ขวา *Tobacco mosaic virus* (TMV)อนุภาคท่อนตรงขนาด 300 X 18 นาโนเมตร ไส้กลางกลวง คงสภาพอยู่ได้นานหลายสิบปี ทนความร้อนสูงถึง 90 ซ จีโนม linear positive-sense single stranded RNA, capsid protein 17.5 kDa, movement protein 30 kDa, overlapping replication proteins 126 และ 183 kDa ติดเชื้อกับพืชหลายชนิด ทางการสัมผัสและน้ำค้น เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในจีนัส *Tobamovirus*

เก็บตัวอย่างใบพืชมาชั่งและบดในsodium dodecyl sulfate reducing buffer (SDS reducing buffer: 0.5 M Tris.HCl, pH 6.8; 25 % Glycerol; 10 % (w/v) sodium dodecyl sulfate; 0.5 % (w/v) bromophenol blue; 0.5 % 2- mercapto-ethanol)ในอัตราส่วน 1:5 (น้ำหนัก/ปริมาตร)) แล้วต้มนาน 5 นาทีก่อนปั่นเหวี่ยงเอาน้ำใสที่ 14,000 X g เก็บโปรตีนสกัดจากตัวอย่างพืชไว้ที่ – 20 ซ จนกระทั่งใช้

2. การเตรียมเจลโปลีอะครีลาไมด์ผสมโซเดียมโดเดซีลซัลเฟต(SDS Polyacrylamide Gel)

ใช้อุปกรณ์แยกวิเคราะห์โปรตีน Mini-PROTEAN^{R} 3 (Cat. No. 165-3301) ผลิตโดย BioRad สำหรับเตรียมโปลีอาครีลาไมด์เจล (separating gel หรือ running gel)และแยกโปรตีน เจลโปลีอะครีลาไมด์ผสมโซเดียม โดเดซีล ซัลเฟต ใช้เข้มข้น 12.5 % หนา 0.75 มิลลิเมตร ทำครั้งละ 2 แผ่นจาก stock solutions ต่างๆคือ 1) Monomer Solution (30.8 % T, 2.7 % C_{bis}: Acrylamide 15 กรัม, Bis acrylamide 0.4 กรัม, น้ำขจัดไอออน 50 มิลลิลิตร (มล)) ปริมาตร 4.2 มล. 2) Running Gel Buffer (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8: Tris 9.08 กรัม น้ำขจัดไอออน 40 มล.) ปริมาตร 2.5 มล. 3) 10 % sodium dodecyl sulfate จำนวน 0.1 มล. 4) น้ำขจัดไอออน 3.2 มล.

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

5) Ammonium Persulfate (APS) ละลายน้ำ10% จำนวน 60 ไมโครลิตร (µl) 6) N,N,N',N' tetramethylenediamine (TEMED)ปริมาตร 6 µl

ภาพประกอบที่ 2 อาการโรคใบด่าง (mosaic) ของยาสูบทดลองที่เกิดขึ้นจากการใช้น้ำคั้นของตัวอย่างพืชจากแปลงมาลูบใบตามวิธี sap inoculation อาการใบด่างเช่นนี้หากพืชอยู่ใต้สภาพแวดล้อมบางอย่างอาจสังเกตอาการได้ยาก

ส่วนบนของเจลแยกตัวอย่างทั้งสองมีเจลบรรจุตัวอย่าง (stacking gel 4.0 %)) ที่ผสมจาก (1) monomer solution ปริมาตร 0.44 มิลลิลิตร, (2) 4X stacking gel buffer (0.5 M Tris-Cl, pH 6.8: Tris 3.0 กรัม, น้ำขจัดไอออน 50 มล.) ปริมาตร 0.83 มล, (3) น้ำขจัดไอออน 2.03 มล., (4) 10% SDS 33 µl, (4) 10% APS 25 µl, (5) TEMED 5 µl, ส่วนผสมของเจลแต่ละอย่างที่เตรียมนั้นดูดอากาศออกก่อนด้วยปั๊มสูญญากาศราว 4-5 นาทีแล้วจึงเติม APS และ TEMED ก่อนนำไปเทในประกบกระจกและติดตั้งตามตำแนะนำของผู้ผลิตเครื่องมือ การแยกตัวอย่างนี้ใช้แทงค์บัฟเฟอร์ (running buffer หรือ tank buffer) ที่มีส่วนประกอบคือ 0.025 M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1 % SDS

3. การแยกโปรตีนในตัวอย่างด้วยอิเล็คโตรโฟรีสิส

ใช้ออโตเมติดไปเปิตบรรจุ SDS reducing buffer ที่ไม่มีโปรตีนจากพืชลงในช่องบรรจุ (wells) ใดๆที่ไม่ใช้บรรจุตัวอย่างโปรตีน ใส่ protein marker ซึ่งได้แก่ Rainbow molecular weight marker RPN 755 low molecular weight range 2.35 – 46 กิโลดาลตัน (kDa) (Amersham pharmacia biotech) หรือ Kaleidoscope pre-stained standard range 3.4 – 38.6 kDa (BioRad) อย่างใดอย่างหนึ่งผสมกับ SDS reducing buffer 1:1 บรรจุไว้ 1 ช่อง ใช้ตัวอย่างโปรตีนสกัดจากใบพืชทั้งที่ติดเชื้อ ไม่ติดเชื้อ มีอาการโรค หรือไม่มีอาการใดจากพืชทดลองที่ใส่เชื้อ

ไว้ บรรจุลงในช่องบรรจุตัวอย่าง ช่องละ 10 µl อิเล็คโตรโฟรีสิสด้วยกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ นาน 74 นาที หยุดอิเล็คโตรโฟรีสิสเมื่อ tracking dye ใน SDS reducing buffer ของตัวอย่างแต่ละช่องลงสุดปลายเจลด้านล่าง โปรตีนต่างขนาดและรูปร่างจะถูก SDS ซึ่งเป็น detergent เปลี่ยนรูปให้กลายเป็นเส้นโปลีเป็ปไทด์ที่มีประจุลบ ขนาดต่างกัน เส้นเหล่านี้จะเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวกในเจลที่ทำเป็นสนามไฟฟ้าเป็นกลุ่มตามขนาด ที่เล็กกว่าจะไปได้เร็วกว่าที่โตกว่า กลุ่มของโปรตีนที่มีขนาด, ประจุเท่ากันจะเคลื่อนตัวไปพร้อมกัน เมื่อหยุดให้กระแสไฟฟ้า โปรตีนต่างขนาดจะคงอยู่เป็นแถบในเจล ทำการแกะกระจกนำเจล 1 แผ่นไปย้อมด้วย สีคูแมสซี บริลเลียนท์บลู (Coomassie brilliant blue: 0.025 % Coomassie brilliant blue R 2500), 40% methanol, 7% acetic acid)ก็จะเห็นลายแถบที่โปรตีนแยกตัวต่างบริเวณตามทางวิ่งของแต่ละช่องตัวอย่างภายในเจล เจลคู่กันอีกหนึ่งแผ่นนั้นก็เป็นการแยกโปรตีนคล้ายกันจะนำไปถ่ายโปรตีนเข้าสู่ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน

ในเจลที่ย้อมสีจะสามารถเปรียบเทียบแถบ (band)โปรตีนจากพืชและเชื้อโรคกับแถบโปรตีนแสดงน้ำหนักโมเลกุลของมาร์คเกอร์โดยการประมาณ

4. <u>การถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนโดย เวสเทอร์น บล็อทด้วยกระแสไฟฟ้า</u>

ถ่ายโปรตีนจากเจลสู่ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนโดยใช้ Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Cat. No. 170-390) จากบริษัท BioRad ผ่านทรานสเฟอร์ บัฟเฟอร์ (transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % methanol, 0.1 % SDS ในน้ำขจัดไอออน) ด้วยกระแสไฟฟ้า 400 มิลลิแอมแปร์ นาน 1 ชั่วโมง โปรตีนจะออกจากเจลไปติดอยู่กับเมมเบรนตามตำแหน่งที่อยู่เหมือนเดิม นำเมมเบรนออกผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องสำหรับตรวจโปรตีนภายหลัง

<u>5.การตรวจสอบหาโปรตีนจากเชื้อไวรัสด้วย immunodetection</u>

นำเมมเบรนที่ถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปบล็อคด้วย TTBS (100 mM Tris.HCl, 0.9 NaCl pH 7.5, 0.1% Tween-20) ละลาย 5% non-fat dry milk นาน 2 ชั่วโมงในภาชนะบน shaker เคลื่อนที่รอบตัว 40 รอบต่อนาทีก่อนล้างด้วย TTBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาทีโดยแกว่งในภาชนะวางบนเชคเกอร์เช่นเดิม แช่เมมเบรนใน primary antibody (anti-CMV หรือ anti-TMV)ที่ผสมใน TTBS อัตรา 1:200 นาน 2 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย TTBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วแช่ใน secondary antibody (goat anti mouse IgG conjugated ด้วย alkaline phosphatase) จาง1/1,000 – 1/5,000 ใน TTBS-T นาน 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย TTBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

6.การตรวจสอบด้วยซับสเตรทของเอนไซม์

แช่เมมเบรนใน ALP buffer (alkaline phosphatase buffer:100 mM NaCl, 5mM MgCl2, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) นาน 5 นาที ก่อนนำไปใส่ในซับสเตรท(ALP buffer 5 ml., nitroblue tetrazolium (NBT) 50 mg/ml ใน 70% N,N' dimethylformamide ปริมาตร 33 µl และ 5-bromo-4-chloro –3 indolyl phosphate disodium salt ((BCIP) 50 mg/ml ใน 100% N,N' dimethylformamide (DMF)ปริมาตร16.5 µl นาน1-5 นาที ล้างด้วยน้ำหลายครั้งเพื่อหยุดปฏิกริยา ตรวจสอบแถบ (band) ที่ปรากฏโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาร์คเกอร์ (โปรตีนมาตรฐาน)

ผลการทดลอง

1. การตรวจหา TMV และ CMV โดยวิธี DAS ELISA

ผลจากการทดสอบน้ำคั้นของตัวอย่างใบพืชที่มีอาการใบด่างจากแปลงปลูกกับแอนติซีรัม anti-TMV กับanti-CMV ซึ่งตรวจสอบได้จากปฏิกิริยาเกิดสีของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase

ตัวอย่างพืช	การดูดกลืนแสงที่ 405 nm (A_{405})		ผลการตรวจดูปฏิกิริยาด้วยสายตา	
มีอาการใบด่าง	CMV	TMV	CMV	TMV
ตัวอย่างที่ 1	0.587±0.030	0.139± 0.018	+	–
ตัวอย่างที่ 2	0.113± 0.001	ค่า A สูงมาก *	–	+++
ตัวอย่างที่ 3	0.112± 0.001	ค่า A สูงมาก *	–	+++
ตัวอย่างที่ 4	0.100± 0.002	ค่า A สูงมาก *	–	+++
ตัวอย่างจากสถานีทดลองยาสูบ	1.764± 0.494	0.233± 0.036	++	+
Negative control *N. tabaccum* 'Xanthi'	0.115± 0.066	0.140± 0.004	–	–

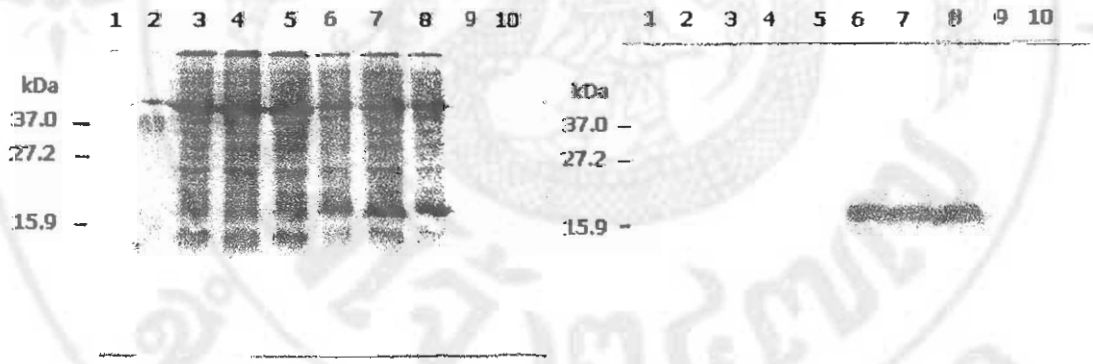
*การดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรสูงมาก เครื่องไม่อ่านเป็นตัวเลข

\+ / ++ / +++ ความเข้มของสีจากปฏิกิริยาเอ็นไซม์ จากน้อยไปหามาก ตามลำดับ

2. การตรวจหาโปรตีนของเชื้อไวรัสด้วยวิธีเวสเทอร์นบล็อท (Western blotting)

การใช้SDS-PAGEทำให้สามารถแยก crude protein ของพืชทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสในแผ่นเจลโปลีอาคริลาไมด์ได้ดีเมื่อใช้ไฟฟ้าเพียง 20 มิลลิแอมแปร์นานราว 74 นาที โปรตีนโดยรวมของพืชจะแยกออกอยู่เป็นแถบในโปลีอาคริลาไมด์เจลตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล รูปแบบ

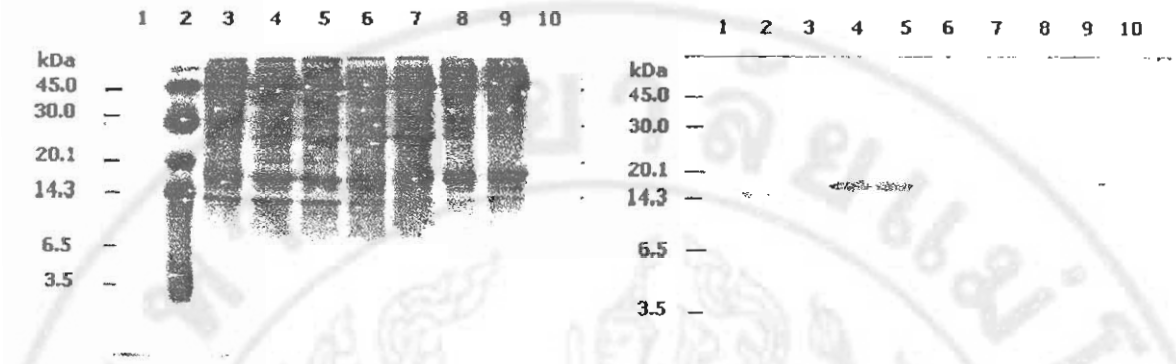
การแยกของโปรตีนนั้นจะเห็นได้จากการย้อมเจลด้วยสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู ซึ่งไม่อาจแยกออกได้ว่ามีการติดเชื้อโรคหรือไม่ เมื่อนำเจลที่ทำคู่กันไปถ่ายโปรตีนสู่เมมเบรนไนโตรเซลลูโลสโดยวิธี electroblotting จากนั้นติดตามผลโปรตีนที่เป็นแอนติเจนจำเพาะบนเมมเบรนโดยวิธี immunodetection จะสามารถตรวจพบแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลขนาด 17.5 kDa และ 24.2 kDa เป็นสีน้ำเงินเข้มจากโปรตีนโดยรวมที่สกัดจากพืชตัวอย่าง โดยที่โปรตีนอื่นๆดังพบเป็นลายแถบที่เห็นจากการย้อมสีเจลคู่กันจะไม่จับกับแอนติบอดีของ TMV หรือ CMV และแอนติบอดีที่สองที่ใช้ติดตามผล(goat anti rabbit conjugate to alkaline phosphatase)ปฏิกิริยากับซับสเตรท BCIP/NBTจึงไม่พบว่าเกิดแถบสีให้เห็นแต่อย่างใด แถบสีที่ตรวจพบในเมมเบรนจึงเป็นโปรตีนเปลือกหุ้มอนุภาค (coat หรือ capsid proteins) ของ TMV และ CMV ตามลำดับซึ่งจะมีความจำเพาะตามชนิดแอนติเจนทำให้สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นพืชที่ติดเชื้อ หรือ เป็นโรคจากไวรัส TMV หรือ CMV ภาพที่ 3 แสดงลายแถบโปรตีนที่สกัดจากพืชซึ่งแสดงอาการใบด่างคล้ายกันแต่ต่างต้นกันช่องบรรจุตัวอย่างที่ 3, 4, 5 เป็นโปรตีนจากตัวอย่างใบยาสูบในภาพที่ 2 ด้านซ้ายมือที่เป็นโรคจากเชื้อสาเหตุอื่น แต่ในช่องที่ 6, 7 และ 8 เป็นโปรตีนจากยาสูบในภาพที่ 2 ใบขวาสุดซึ่งวินิจฉัยได้ว่าเป็นโรคจากการติดเชื้อ *Tobacco mosaic virus*



ภาพประกอบที่ 3. ซ้าย, แสดงโปรตีนที่สกัดจากตัวอย่างใบยาสูบที่แสดงอาการใบด่างเหมือนกันแต่จากต่างต้น ช่องที่ 1, 9, และ 10 บรรจุมัฟเฟอร์, 2, ดาไลโดสโคป มาร์เกอร์, 3 – 5 เป็นตัวอย่างจากยาสูบต่างต้นกับตัวอย่างที่บรรจุในช่องที่ 6 – 8 **ขวา,** แผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรนถ่ายโปรตีนจากเจลซึ่งทำคู่กันกับเจลในภาพซ้ายมือ เมื่อนำไปตรวจผลด้วย anti – TMV (common strain: Agdia U.S.A.) และ goat anti rabbit IgG (whole molecule) conjugate with alkaline phosphatase (Sigma) โดยใช้ NBT/ BCIP เป็นซับสเตรท

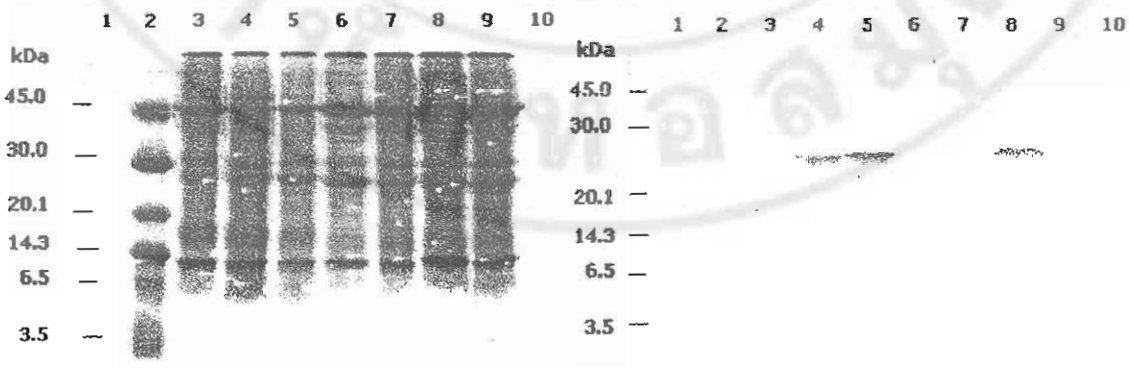
เมื่อนำน้ำคั้นจากยาสูบที่เป็นโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส TMV ซึ่งยืนยันผลจากภาพประกอบที่ 3 ไปใส่เชื้อกับต้นกล้ายาสูบนาน15 วันจึงนำพืชทดลองเหล่านั้นมาเตรียมเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โปรตีนรวมในเจล เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีราเช่นเดียวกันกับการทดลองแรกจะได้ผลดังภาพประกอบที่ 4 ซึ่งพบความแตกต่างกันระหว่างต้นยาสูบที่ไม่ได้ทำการใส่เชื้อผ่าน

น้ำคั้น และพืชที่ติดเชื้อจากการใส่น้ำคั้น กับต้นพืชอาการใบด่างที่พบในแปลงเกษตรกร วิธีเวสเทอร์นบล็อทนี้จึงสามารถใช้ตรวจสอบ วินิจฉัย และยืนยันการติดเชื้อไวรัส TMV ได้อีกวิธีหนึ่ง



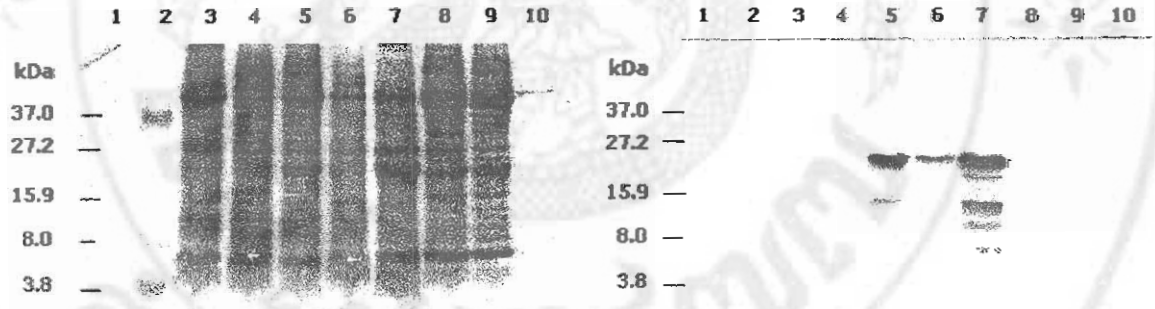
ภาพประกอบที่ 4 ซ้าย, การแยกโปรตีนรวมจากพืชทดลองในโปลีอาคริลาไมด์เจลเมื่อย้อมด้วยสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู ช่องบรรจุตัวอย่างในเจลที่ 1 และ 10 รีดิวซิงบัฟเฟอร์; 2, เรนโบว์ มาร์เกอร์; 3, ยาสูบไม่ใส่เชื้อ; 4 และ 5, ยาสูบใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นจากยาสูบใบด่างในภาพที่ 2 ขวามือ; 6และ7, ใบยาสูบอาการใบด่างแบบภาพที่ 2 ซ้ายมือ; 8 และ 9, ใบยาสูบอาการใบด่างจากแปลงเกษตรกร

การทดลองใช้พืชที่มีอาการใบด่างที่พบในแปลงเกษตรกร(ภาพประกอบที่ 2 ซ้ายมือ)ที่ตรวจสอบแล้วว่าไม่ติดเชื้อไวรัส TMV มาทำน้ำคั้นแล้วนำไปถูเบาๆกับพืชทดลองต่างกันคือ ยาสูบซูกินี และแตงกวา แล้วนำตัวอย่างใบไปสกัดโปรตีนรวมและตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเวสเทอร์นบล็อท จะได้ผลดังภาพประกอบที่ 5



ภาพประกอบที่ 5 ซ้าย, การแยกโปรตีนรวมจากพืชทดลองที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสด้วย SDS PAGE เมื่อย้อมด้วยสีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู ช่องบรรจุตัวอย่าง 1 และ 10 ใส่รีดิวซิงบัฟเฟอร์; 2, เรนโบว์มาร์คเกอร์; 3, ยาสูบปกติและไม่ใส่น้ำคั้น; 4, ยาสูบอาการใบด่างพบในแปลงเกษตรกร; 5, ยาสูบใบด่างได้จากการใส่เชื้อด้วยน้ำคั้น; 6, ซูกินีไม่ใส่เชื้อ; 7, ซูกินีใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นแต่ไม่พบอาการโรค(ไม่ติดเชื้อ); 8, แตงกวาใส่เชื้อมีอาการใบด่างและขนาดใบเล็กกว่าปกติ; 9, แตงกวาผ่านการใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นแต่ไม่ติดเชื้อ **ขวา**, ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่บล็อทและติดตามผลด้วย anti- CMV common strain (Agdia Co.) และ goat anti rabbit conjugate with alkaline phosphatase (Sigma)โดยใช้ NBT/BCIP เป็นซับสเตรท

ผลการทดลองในภาพประกอบที่ 5 ที่ชี้ว่าพืชติดเชื้อและเป็นโรคจากไวรัส CMV นั้นเป็นจากการบล็อคแผ่นเมมเบรนด้วยนมผงไร้ไขมันที่ละลายในตริสบัฟเฟอร์โดยแกว่งให้เคลื่อนไหวตลอดเวลาด้วยออร์บิตอล เชคเกอร์จากนั้นจึงทำการตรวจผลด้วยแอนติซีรา ผลจากเมมเบรนนี้แสดงให้เห็นรอยการแสดงผลของ anti- CMV ที่เข้าจับกับโปรตีนมากกว่า 1 ลายแถบในช่องบรรจุตัวอย่างที่ 4 และ 5 จึงทำการทดลองซ้ำโดยทำการบล็อคโปรตีนในเมมเบรนเพียง 2 ชั่วโมงซึ่งให้ผลดังภาพประกอบที่ 6



ภาพประกอบที่ 6 ซ้าย การวิเคราะห์โปรตีนรวมของพืชทดลองด้วย SDS-PAGE ช่องบรรจุตัวอย่างที่ 1 และ10 ใส่รีดิวซิงบัฟเฟอร์; 2, คาไลโดสโคป โปลีเปปไทด์มาร์เกอร์; 3, ยาสูบไม่ติดเชื้อ; 4, ยาสูบใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นและแสดงอาการใบด่าง; 5, ยาสูบอาการใบด่างจากแปลงเกษตรกร; 6, ยาสูบใส่เชื้อด้วยน้ำคั้น; 7, แตงกวาใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นจากยาสูบที่มีอาการใบด่างและแสดงอาการใบด่างหลังการใส่เชื้อ 12 วัน; 8, แตงกวาใส่เชื้อด้วยน้ำคั้นจากยาสูบเหมือน 7 แต่ใบแตงกวาไม่แสดงอาการใบด่าง; 9, แตงกวาที่ไม่ใส่เชื้อ **ขวา**, ผลการตรวจสอบจายแถบโปรตีนในเมมเบรนด้วยแอนติซีรา

การตรวจผลในเมมเบรนนั้นพบว่าลายแถบหลักของโปรตีนอยู่ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 24.2 kDa ซึ่งเป็นขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแค็พสิดของ CMV ลายแถบโปรตีนจากยาสูบจากแปลงเกษตรกรในช่องบรรจุตัวอย่างที่ 6 นั้นคล้ายกับพืชที่เกิดโรคโดยการใส่เชื้อผ่านน้ำคั้นในช่องที่ 5 แต่ในการติดเชื้อใหม่นั้นจะพบปริมาณโปรตีนที่มากกว่า ดังความเข้มของสีที่ปรากฏ เชื้อโรคใบด่างจากยาสูบในแปลงเกษตรกรเมื่อนำมาใส่เชื้อผ่านน้ำคั้นสู่ใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงกวาแล้วตรวจผล 12 วันหลังจากนั้นจะพบว่าแอนติซีราที่ใช้สามารถตรวจพบปริมาณโปรตีนที่มากและแยกออกเป็น 4 ลายแถบอยู่ต่างตำแหน่งกันในช่วงราว 6, 10, 14, และ 24.2 kDa

วิจารณ์ผลการทดลอง

ทั้ง CMV และ TMV จัดเป็นไวรัสพืชที่ติดเชื้อและทำความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจมากชนิด โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้งสองมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่แม่นยำสำหรับการการวินิจฉัยโรค การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีเวสเทอร์นบล็อทสามารถใช้วิเคราะห์โปรตีนและวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ดีและได้ข้อมูลในรายละเอียดเกี่ยวกับโปรตีนของอนุภาคไวรัส การตรวจสอบไวรัสโดย ELISA ในวิธีที่รายงานมานี้เหมาะสมในเชิงคุณภาพเบื้องต้น (อุทัย และ นลินี 2539) ปัจจัยสำคัญคือแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ ทั้ง polyclonal และ monoclonal แต่ในทางกลับกันความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมอาจกลายเป็นจุดอ่อนของวิธีการได้ ในกรณีที่ได้ผลลบจะเกิดความไม่มั่นใจ จึงจำเป็นต้องตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นอีก เช่น bioassay ซึ่งใช้เวลานาน 3 วันแต่สามารถสังเกตอาการโรคได้ ในงานทดลองครั้งนี้ได้ลองวิธีวิเคราะห์โปรตีนโดย Western blotting ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากเป็นครั้งแรกที่คณะผู้วิจัยได้ลองใช้เทคนิคนี้และแอนติซีรัมที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศมีราคาสูงมากจึงต้องแน่ใจว่ามีตัวอย่างไวรัสเพียงพอสำหรับการทดสอบ เป็นเหตุผลที่ต้องทำ sap inoculation บนพืชทดสอบเสียก่อน วิธีวิเคราะห์โปรตีนจำเพาะเช่นนี้น่าจะใช้ตรวจหาโปรตีนไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำได้ดี (detectability สูง)ถ้าได้ปรับขั้นตอนปฏิบัติการอย่างดีแล้ว ข้อดีของการทำเวสเทอร์นบล็อทคือใช้ตรวจสอบโรคไวรัสสองชนิดนี้ได้โดยไม่ต้องรออาการของโรคให้แสดงออกชัดเจน เช่นในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อ นอกจากนี้ความรุนแรงของอาการโรคไวรัสCMVและTMVนั้นขึ้นกับภูมิอากาศอย่างมาก ทำให้ยากแก่การวินิจฉัยโรค ส่วนวิธี dot-blot หรือ dot immuno-binding assay(DIBA) ซึ่งเป็นอีกวิธีทางอิมมุโนวิทยา นั้นโดยหลักการจะอยู่ระหว่าง ELISA กับ Western blot คือ จะได้ผลในเชิงคุณภาพจากปฏิกิริยาการเกิดสี ได้ผลเป็นบวกหรือลบ เช่นเดียวกับ ELISA แต่หลังจากที่แอนติเจนจากตัวอย่างพืชจับยึดกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสแล้วอย่างดี มีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาต่างๆเหมือนกับการทำเวสเทอร์นบล็อท คือใช้ แอนติบอดี (ทั้ง primary และ secondary antibody) และสับสเตรทของปฏิกิริยาเอ็นไซม์ alkaline phosphatase อย่างเดียวกัน

เพียงแต่ใช้เวลาน้อยกว่าเพราะไม่ได้แยกโปรตีนโดยอิเลคโทรโฟรีซิส ดังนั้นผลการทดสอบจึงให้ข้อมูลไม่ละเอียดเท่ากับการวิเคราะห์โดยเวสเทอร์นบล็อท ในงานทดลองครั้งนี้ไม่ได้แสดงผลจากการทำ dot-blot เนื่องจากต้องหยุดการลองผิดลองถูกในขั้นตอน optimization ของเทคนิคเพราะแอนติบอดีจากต่างประเทศราคาสูงมาก จำเป็นต้องมุ่งไปเน้นเทคนิคเวสเทอร์นบล็อท ซึ่งถ้าเวสเทอร์นบล็อททำได้สำเร็จ เทคนิค dot-blot จะให้ผลเช่นกัน

ผลจากเวสเทอร์นบล็อทบ่งชี้ลักษณะสำคัญเกี่ยวกับโปรตีนของเชื้อโรคได้ กล่าวคือ สามารถบอกตำแหน่งและแสดงน้ำหนักโมเลกุลของลายแถบโปรตีนหลักของไวรัส โดยเฉพาะของโปรตีนแค็พสิด ดังการพบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 17.5 kDa ของ TMV และ 24.2 kDa ของ CMV แต่โปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 6, 10, 14, และ 24.2 kDa ที่พบในตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อ CMV นั้น อาจยังแสดงลักษณะสมบัติอื่นให้ศึกษารายละเอียดต่อไปได้ เนื่องจากอาจชี้ให้เห็นว่าโปรตีนอย่างอื่นของไวรัส โดยอาจเป็นลักษณะของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่ต่างกัน หรือ อาจเป็นการแสดงออกในระยะติดเชื้อกับพืชบางอย่าง นอกจากนี้ CMV ยังอาจมีพาราไซท์โมเลกุลที่เรียกว่า satellite RNA ซึ่งอาจทำให้ CMV สังเคราะห์โปรตีนแอนติเจนอื่นขึ้นได้ ในการศึกษา ไวรัส CMV ที่เข้าติดเชื้อร่วมกับ potyviruses ของ Wang และคณะ (2002) นั้นภาพที่ได้จากการใช้เวสเทอร์นบล็อทวิเคราะห์โปรตีนก็แสดงว่ามีแถบโปรตีนอื่นนอกเหนือจากแถบโปรตีนของแค็พสิดโปรตีนในตัวอย่างพืชตระกูลแตง (ซูกินี)ที่ทดลองใส่เชื้อ CMV ร่วมกับ satellite RNA การพบลักษณะนี้ทำให้เห็นความจำเป็นที่ควรมีการศึกษาเชื้อไวรัสที่สำคัญทางเศรษฐกิจให้ละเอียดยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

อุทัย รุ่งเรืองศรี และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2536. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชโดยใช้ ELISA. รายงานผลงานวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้.

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.

Converse, R. H. and R. R. Martin. 1990. ELISA methods for plant viruses. in Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (editors). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. P. 179-196.

De Boer, S. H., and Ward, L. 1990. Western blotting for detection of bacterial antigens. Pages 281- 285 In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral

and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. R. Hampton, E. Ball and S. De Boer, editors. The American Phytopathological Society. 389 pp.

Knapp, E. and Lewandowski, D.J. 2001. *Tobacco mosaic virus*, not just a single component virus anymore. Mol. Plant Path Pathol. 2:117-123.

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

Prieto, H., Bruna, P., and Munoz, C. 2001. Isolation and molecular characterization of a Chilean isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Dis. 85:644-648.

Roossinck, M. J. 2001. Cucumber mosaic virus, a model fir RNA virus evolution. Mol. Plant Pathol. 2: 59-63.

Sánchez-Sánchez, H., Henry, M., Cárdenas-Soriano, E. and Arviso-Villasana, H. F. 2001. Identification of *Wheat streak mosaic virus* and its vector *Aceria tosichella* in Mexico. Plant Dis. 85:13-17.

Tobin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4350.

Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-On, A. 2002. Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. Phytopath. 92:51-58.

Sambrook. J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning; A Laborotory Manual 2nd. Ed. Coldspring Habor Laboratory, Coldspring Harbor, New York.

Ohshima, K., Sako, K., Haraishi, C., Nakagawa, T., Shigata, E., and Sako, N. 2000. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: Its association with potato virus Y necrotic strain. Plant Dis. 84:1109-1115.

Reddy, A., S., Prasada Rao, R. D. V. J., Thirumala-Devi, K., Reddy, S. V., Mayo, M.A. Roberts, I., Satyanarayana, T., Subramaniam, K. and Reddy, D.V.R. 2002. Occurrence of *Tobacco streak virus* on peanut (*Arachis hypogaea*) in India. Plant Dis. 86: 173-178.

Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-On, A. 2002. Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. Phytopathology 92:51-58.