



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

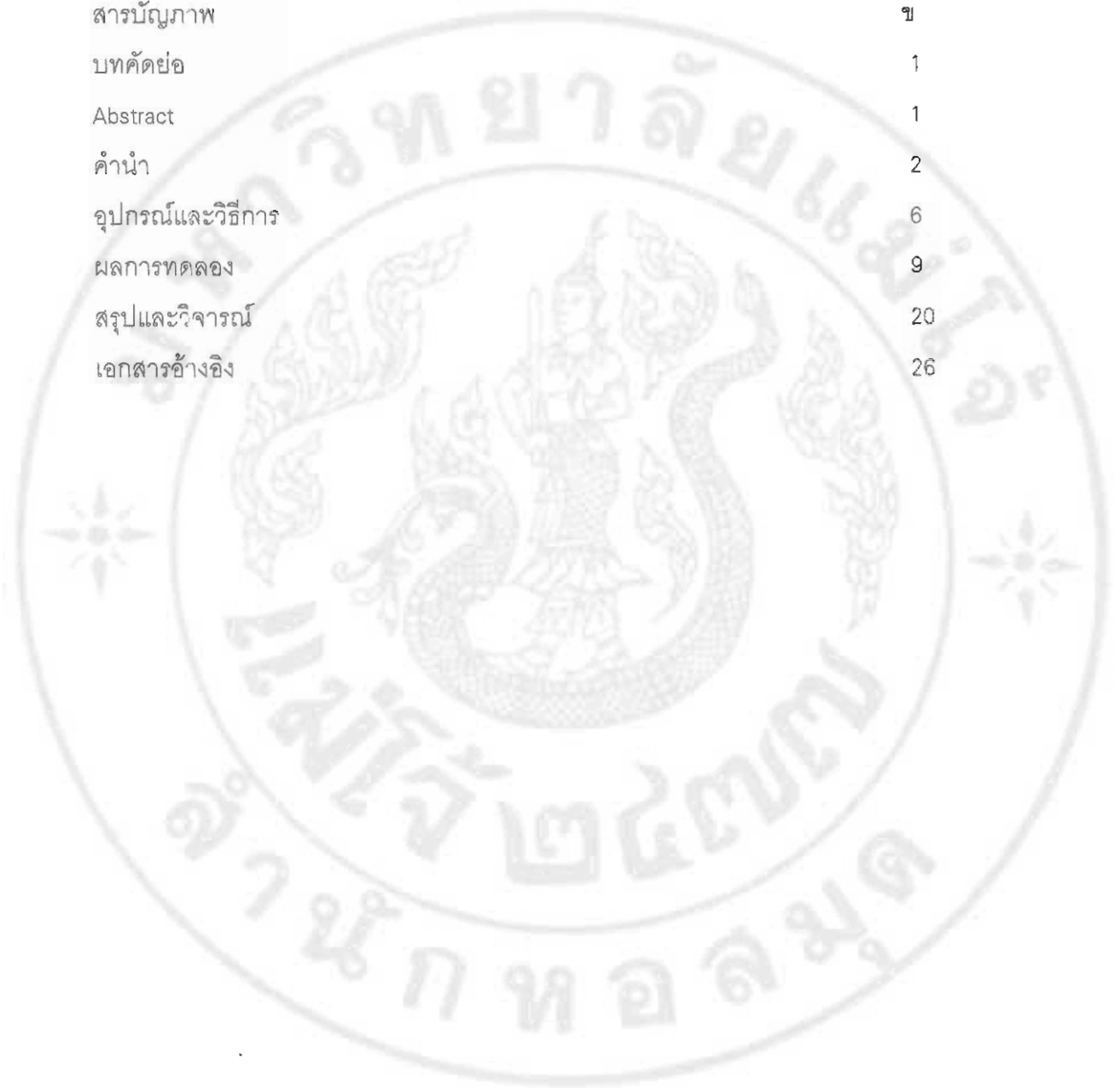
คำนิยม

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



สารบัญ

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



ก
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 ที่ไทดเดอร์ 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 ที่ไทดเดอร์ 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 ที่ไทดเดอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเชื้ออ่อน	14
ตารางที่ 5 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-TMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไทดเดอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเชื้อก่อน	16
ตารางที่ 6 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-TMV antibody ที่ความเข้มข้น 0.1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไทดเดอร์ 1:800 ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชเดียวกันกับตารางที่ 5	18

๒
สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ต้นยาสูบแสดงอาการใบด่างของโรค CMV	22
ภาพที่ 2 พืชทดสอบ <i>Chenopodium amaranticolor</i> แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation โดยใช้ น้ำคั้นของตัวอย่างโรคที่ ผ่านการอบแห้ง	23
ภาพที่ 3 พืชทดสอบ <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN แสดง local lesions จากการทำ sap inoculation	24
ภาพที่ 4 พืชทดสอบ <i>Nicotiana</i> spp. แสดง necrosis ที่เริ่มจาก local lesions ซึ่งเกิดขึ้นหลังทำ sap inoculation	25

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจสอบโรคไวรัสของพืชโดยใช้ ELISA

A preliminary study of detection for plant viral diseases by ELISA

อุทัย รุ่งเรืองศรี¹ และ นลินี รุ่งเรืองศรี²

¹ ภาควิชาอารักขาพืช

² ภาควิชาชีววิทยา

คณะผลิตกรรมการเกษตร

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

บทคัดย่อ

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาไวรัส CMV (cucumber mosaic virus) และ TMV (tobacco mosaic virus) ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของไทยซึ่งน่าจะต้องให้ความสำคัญมากกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีการติดเชื้อร่วมกัน (mixed infection) การศึกษานี้ได้ทำการทดลองทำ 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.

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 มักทำให้พืชที่ติดเชื้อมีอาการใบด่าง (mosaic) แต่ภายใต้บางสภาพแวดล้อมนั้นพืชที่ติดเชื้อมีอาการนี้อาจไม่แสดงอาการให้เห็น เรียกว่าเป็นการติดเชื้อแบบแฝงเร้น (latent infection) เชื้อไวรัสทั้ง CMV และ TMV นี้แม้ก่ออาการใบด่างแก่พืช แต่ลักษณะ และคุณสมบัติหลายอย่างรวมทั้งพื้นฐานวิทยา พาหะสำหรับการถ่ายทอดเชื้อ และความคงทนในการรักษาสภาพ (stability) จะมีความแตกต่างกัน ในต่างประเทศนั้น เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ได้มีการศึกษาไว้แล้วอย่างกว้างขวาง แต่ละอย่างยังประกอบด้วยสายพันธุ์ (strains) หลายสายพันธุ์ (C.M.I./A.A.B. Descriptions) แต่การศึกษาก่อนโรคแก่พืชในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากนัก สายพันธุ์ที่มีก่อโรคในประเทศของเราก็ก็น่าจะมีการศึกษา และกำหนดออกไปให้ชัดเจน

ลักษณะสำคัญบางประการของไวรัส CMV และ TMV

ความเหมือนกัน

- ๑ พืชอเนกวัย (hosts) กว้าง ก่อโรค และ ติดเชื้อทั้งพืชใบแคบและใบกว้าง
- ๑ เมื่อติดเชื้อจะก่ออาการใบด่าง (mosaic) ในพืช ดังอาการใบด่างที่เกิดบนใบยาสูบในภาพที่ 1 พืชที่ติดเชื้อไวรัสนี้อาจไม่แสดงอาการโรค แต่เป็นการติดเชื้อแบบแฝงเร้น (latent infection)
- ๑ ในต่างประเทศสามารถจำแนกออกเป็นหลายสายพันธุ์ (strains)

ความแตกต่างบางประการ

CMV

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

TMV

- ๑ อนุภาคแบบท่อนตรง (rigid tubular) ขนาด 18 X 300 นาโนเมตร
- ๑ จัดอยู่ในกลุ่ม tobamovirus
- ๑ ถ่ายทอดเชื้อโดยทางน้ำคั้น และวิธีกล (sap and mechanical inoculation)
- ๑ จุดอุณหภูมิเสื่อมฤทธิ์ (thermal inactivation point) นาน 10 นาที ที่เกิน 90 °C
- ๑ จุดความเจือจางของการเสื่อมฤทธิ์ (dilution end point) ที่ 10^{-6}
- ๑ คงความสามารถในการการติดเชื้อได้นานหลายสัปดาห์
- ๑ สร้างอาการ local lesion ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 28 °C กับพืชทดสอบหลายชนิดเช่น

N. tabaccum cvs. Xanthi-nc, Sansun NN, *N. glutinosa*, *C. amaranticolor*

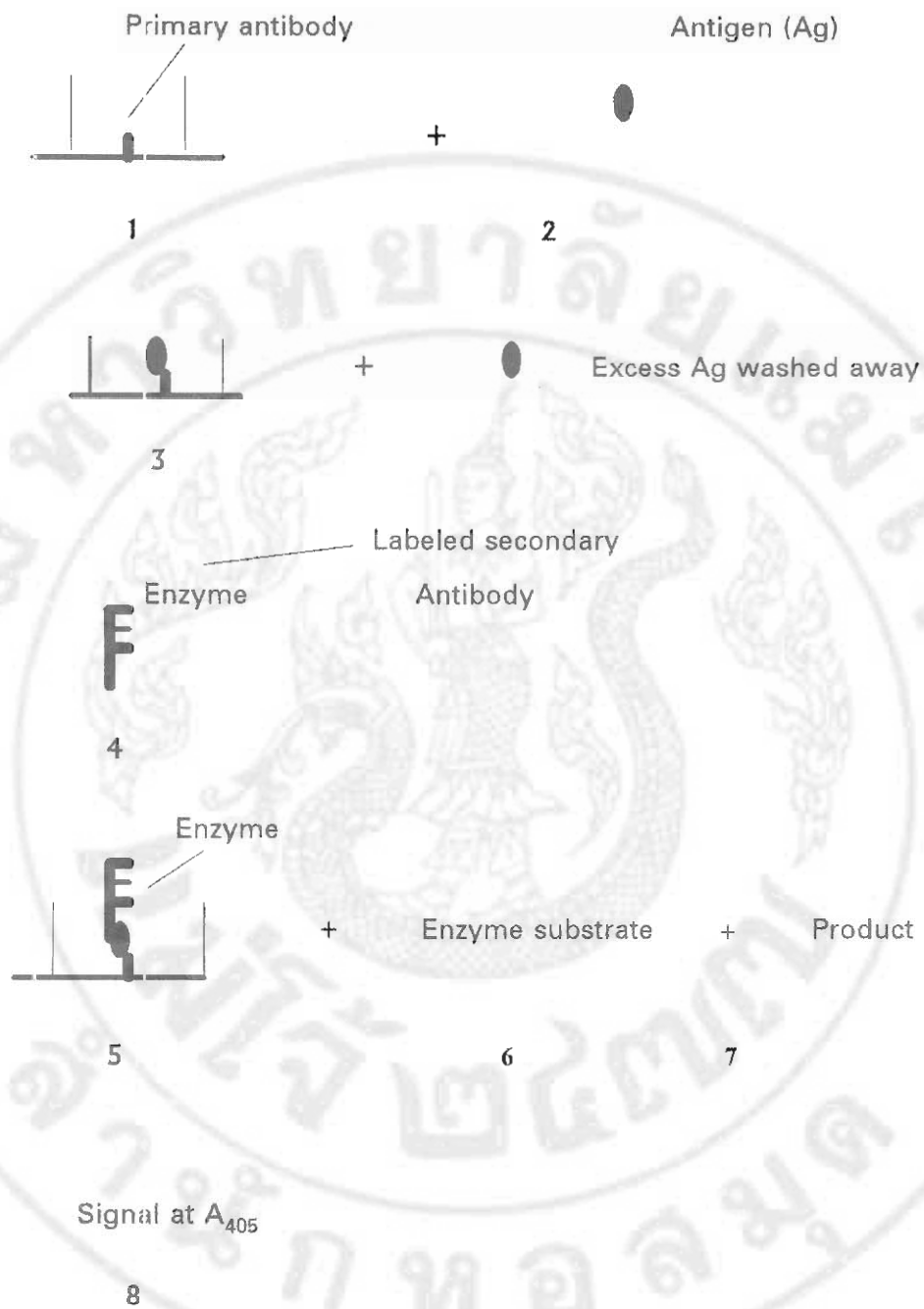
สัณ *N. tabaccum* cvs. Turkish และ White Burley ก่ออาการกำซาบ (systemic symptom)

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



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

แอนติบอดีที่สอง (secondary antibody) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแอนติบอดีที่ติดกับเอนไซม์ alkaline phosphatase (alkaline phosphatase - conjugated antibodies) เนื่องจากเอนไซม์ alkaline phosphatase (Apase) นี้เป็น orthophosphoric monoester phosphohydrolase มีประสิทธิภาพดีในสภาพ alkaline เป็นเอนไซม์ที่พบในสัตว์ ไม่พบในพืช ชนิดที่ใช้สกัดจาก bovine intestinal mucosa ในการปฏิบัติจะใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่ใช่ phosphate buffer saline เนื่องจาก inorganic phosphate ที่มีจะเป็นตัว inhibitor ของ Apase เอนไซม์นี้ยังเหมาะกับ para-phenyl phosphate (p-NPP) ที่ใช้เป็นซับสเตรท เพราะที่ต่ำกว่า 30 °C จะเกิด spontaneous hydrolysis น้อย นอกจากนี้ hydrolysis product ที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์ คือ para-nitrophenol (p-NP) มีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรที่ใช้อ่านได้ดี

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ เพื่อหาวิธีการทำ ELISA ที่ใช้ sandwich antibody แบบ non-competitive ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ผลิตจำหน่าย จากนั้นจึงนำวิธีการที่ได้มาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่พบในแปลงปลูกของเกษตรกร และสุดท้ายคือการเปรียบเทียบการตรวจหาการติดเชื้อปน (mixed infection) ของไวรัสโรคพืชโดยใช้วิธีทางชีว (bioassay) และ ELISA

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ขั้นตอนการทำ ELISA แบบ sandwich และ non-competitive

รูปแบบการทดลองปฏิบัติการ ELISA แบบ sandwich และ non-competitive รวมถึงการใส่แอนติบอดีเพื่อก่อปฏิกิริยาส่งสี และการวัดผลมีแสดงไว้เป็นผังภาพดังแสดงในรูปที่ 1 แอนติบอดีที่หนึ่ง (first antibody) ที่ใช้เคลือบหลุมของไมโครไตเตอร์ เพลท (microtiter plate) ได้แก่ anti 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)

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

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

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

การวัดการเกิดสี (colorimetry) ซึ่งเป็นผล (product) จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์กับซับสเตรทนั้นเป็นการอ่านค่าด้วย 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) ซึ่งขณะเกิดปฏิกิริยาเชิงบวกขึ้นนั้นเอ็นไซม์ alkaline phosphatase จะเปลี่ยน PNPP ให้เป็นผลิตภัณฑ์คือ paranitrophenol (PNP) สีเหลืองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

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

2. การตรวจสอบเกิดเชื้อซ้อน (mixed infection) ของตัวอย่างต้นยาสูบจากแปลงปลูก

2.1 การตรวจสอบตัวอย่างยาสูบที่ปรากฏอาการ CMV โดย ELISA

นำต้นยาสูบ 4 ต้น จากแปลงปลูก ซึ่งปรากฏอาการของโรค CMV มาปลูกต่อในกระถางในโรงเรือนที่คลุมด้วยตาข่ายกันแมลง ต้นยาสูบเหล่านี้ได้มีการวินิจฉัยจากอาการที่ปรากฏมาก่อน การทดสอบการถ่ายเชื้อ CMV ผ่านเพลี้ยอ่อน สุกัลยาณางอายุ 10 วัน เมื่อต้นแตกกวายุ้งในระยะที่เริ่มงอกใบจริง โดยนำเพลี้ยอ่อนไปปล่อยบนต้นยาสูบทั้ง 4 ต้น หลังการดูดน้ำเลี้ยงจากต้นยาสูบที่เป็นโรคนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเพลี้ยอ่อนไปเลี้ยงต่อบนต้นกล้าแตกกวายุ้งเพื่อถ่ายเชื้อต้นละ 5 ตัว ปล่อยให้ดูดน้ำเลี้ยงเพื่อปล่อยเชื้อนาน 1 ชั่วโมง แล้วกำจัดเพลี้ยอ่อนทิ้ง เก็บตัวอย่างใบแตกกวายุ้งหลังปล่อยเชื้อนาน 7 วัน พร้อมกับใบของต้นยาสูบที่ใช้เป็นต้นเชื้อเพื่อทดสอบการติดเชื้อ CMV และ TMV โดย ELISA ตาม protocol ที่ได้ทดลองไว้แล้ว

แต่ละตัวอย่างใช้น้ำคั้น (sap) หยดในหลุมของไมโครเพลท 3 ข้ว โดยการสุ่มตำแหน่งตัวอย่างทั้งหมด (randomization across a plate)

2.2 การตรวจสอบโดยใช้ bioassay

การใส่เชื้อด้วยน้ำคั้น (sap inoculation); นำตัวอย่างต้นยาสูบจากแปลงทดลองยาสูบมาทำการใส่เชื้อแบบ 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) *Chenopodium amaranticolor*

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

ผลการทดลอง

1. ผลของการทดสอบเครื่องอ่าน ELISA

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

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงขนาดความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405\text{nm}}$) 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 0.043 0.046	0.045
0.10	4.90	0.095 0.094 0.089	0.093
0.25	4.75	0.228 0.216 0.220	0.221
0.50	4.50	0.445 0.450 0.438	0.444

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 หรือ 20% ABS) ในบัฟเฟอร์ TBS-T (Tris buffered saline with tween 20, pH 7.4)
3. ล้างไมโครเพลทด้วย TBS-T
4. เตรียมตัวอย่างพืชที่จะใช้เป็นแอนติเจนโดยบดพืช 1 กรัม ใน extraction buffer (TBS-T + polyvinylpyrrolidone) ใช้ส่วนที่เป็นน้ำ หยอดตัวอย่างลงในหลุม ทิ้งไว้ที่ 4°C ตลอดคืน
5. ล้างตัวอย่างจากหลุมของเพลทแล้วจึงใส่แอนติบอดีที่สอง ซึ่งมีเอ็นไซม์ (alkaline phosphates conjugated antibody) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 ชั่วโมง จึงล้างออกด้วย TBS แอนติเจนจะถูกยึดไว้ด้วยแอนติบอดีที่ติดไว้ด้วยเอ็นไซม์
6. ทดสอบปฏิกิริยาที่เกิดจากเอ็นไซม์ alkaline phosphates โดยใช้ substrate คือ PNPP 1 g/100 ml ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง
7. อ่านปฏิกิริยาโดยเครื่องอ่าน ELISA ที่คลื่นแสง 405 nm หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N NaOH เมื่อเห็นว่าผลของการอ่าน (ตัวเลข) แสดงความแตกต่าง ระหว่าง negative control กับ ตัวอย่างทดลองจนเป็นที่น่าพอใจ

ในการทดลองนี้ negative control จะผ่านการปฏิบัติเหมือนกับหลุมทดสอบทุกประการยกเว้นการใส่แอนติเจนหรือตัวอย่างพืช

3. ผลการตรวจสอบ CMV จากตัวอย่างพริกซึ่งเก็บมาจากแปลงเกษตรกร

ตัวอย่างทั้ง 7 (S₁-S₇) แสดงอาการของโรคที่น่าสงสัยว่าติดเชื้อ CMV ในการทำ ELISA ยังได้ลองใช้ adult bovine serum (20 % ABS) เพื่อเทียบกับ bovine serum albumin (2 % BSA) ให้ค่า A₄₀₅ 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
<u>ตัวอย่าง</u>					
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

ปฏิกิริยาเอ็นไซม์ซึ่งบ่งชี้ความรุนแรงของโรคในตัวอย่างทั้ง 7 ซึ่งเก็บมาจากแปลงเดียวกันนั้นอยู่ในระดับที่แตกต่างกันโดยของตัวอย่าง S₅ และ S₇ แสดงปฏิกิริยาดำกว่า นอกจากนี้ การใช้ anti-CMV antibody ความเข้มข้น 1ug/ml และ conjugated antibody ที่ 1: 800 จะแสดงความแตกต่างระหว่าง control กับตัวอย่างทดสอบอย่างชัดเจนกว่า

ตารางที่ ๑ -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

ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาเอ็นไซม์ของตัวอย่าง S₅ และ S₇ ให้ค่าต่ำเหมือนกับในตารางที่ 2 ที่ใช้ ABS เป็น blocking agent

4. ผลการตรวจสอบ CMV จากตัวอย่างพืชตระกูลแตง ตัวอย่างพืชกลุ่มนี้แสดงอาการโรคหลากหลายและได้มาจากแหล่งต่าง ๆ กัน (S₈ - S₁₇) การทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่างพริก S₁ และ S₇ จากการ ทดลองครั้งก่อนเข้าเปรียบเทียบ

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

Samples	A405+/-SEM
Control	0.009 +/- 0.002
S ₁	0.441 +/- 0.015
S ₇	0.267 +/- 0.007
S ₈	0.015 +/- 0.001
S ₉	0.014 +/- 0.001
S ₁₀	0.007 +/- 0.001
S ₁₁	0.010 +/- 0.001
S ₁₂	0.015 +/- 0.003
S ₁₃	0.031 +/- 0.007
S ₁₄	0.011 +/- 0.002
S ₁₅	0.020 +/- 0.004
S ₁₆	0.056 +/- 0.027
S ₁₇	0.026 +/- 0.007

จากการทดลองที่ 2 นี้ ตัวอย่างพืชตระกูลแตง S₈ - S₁₇ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเอ็นไซม์ที่สูง ซึ่งหมายถึงว่าไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อ CMV ยกเว้น S₁₆ ซึ่งแสดงผลบวกเพียงเล็กน้อย ส่วนตัวอย่างพริก S₁ และ S₇ ยังคงแสดงปฏิกิริยาบวก ดังการทดลองที่แล้ว

**5. ผลการตรวจสอบตัวอย่างยาสูบจากแปลงและต้นกล้าแตงกวาที่ได้รับเชื้อผ่านเพลี้ย
อ่อน โดยการใช่วิธี ELISA**

ต้นยาสูบจำนวน 4 ต้น (T_1 , T_2 , T_3 , T_4) ที่แสดงอาการของโรค CMV จากสถานีทดลอง
ยาสูบ เชียงใหม่ และต้นกล้าแตงกวา (C_1 - C_3) ที่ได้รับการใส่เชื้อโรคจากต้นยาสูบผ่านเพลี้ย
อ่อนก็ได้รับการทดสอบได้รับการทดสอบการติดเชื้อทั้ง CMV และ TMV โดยวิธี ELISA ซึ่งผลการ
ทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6



ตารางที่ 5 ค่า absorbance ที่ 405 nm โดย ELISA เมื่อใช้ anti-CMV antibody ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และ alkaline phosphatase conjugated antibody ที่ไต่อเตอร์ 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 ในการเตรียมแอนติเจนได้สุ่มตัวอย่างจากใบของแตงกวาต้น 3 ครั้ง (เช่น T₁₁, T₁₂, T₁₃) และในขั้นตอนการหยอดตัวอย่างบนหลุมได้ทำ randomization ตำแหน่งตัวอย่างทั้งเพลท ตัวอย่างยาสูบและแตงกวาทำพร้อมกัน

ผลของ ELISA แสดงว่าต้นยาสูบทั้ง 4 ต้นนั้นมีอัตราการติดเชื้อ CMV แตกต่างกัน ยาสูบต้นที่ 2 ให้ค่าสูงสุด ในขณะที่ต้นที่ 1 ได้ค่าต่ำหรือไม่เกิดปฏิกิริยาเอ็นไซม์เลย ส่วนต้นกล้าแดงกว่าที่ได้ ทดลองทำ aphid transmission ให้ถ่ายเชื้อจากยาสูบมายังต้นที่ปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะให้ค่า ELISA ต่ำมากในทุกกรณี ซึ่งอาจจะเป็นเพราะเทคนิคการถ่ายทอดเชื้อไม่เหมาะสมหรือพันธุ์ต้นที่ใช้อย่างใดอย่างหนึ่งไม่เหมาะสมกับ aphid transmission แต่พอสรุปได้ว่ายาสูบทั้ง 4 ต้น ซึ่งได้รับการวินิจฉัยตามอาการของโรคว่าเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV นั้น มีเพียง 3 ต้นเท่านั้นที่ให้ค่า absorbance เป็นปฏิกิริยาบวกของ CMV ที่สูงมาก



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

		ยาสูบ	แตงกวา	
ต้นที่ 1	T ₁₁	0.091	C ₁₁	0.072
	T ₁₂	0.098	C ₁₂	0.070
	T ₁₃	0.072	C ₁₃	0.069
ต้นที่ 2	T ₂₁	2.246	C ₂₁	0.072
	T ₂₂	2.265	C ₂₂	0.121
	T ₂₃	2.212	C ₂₃	0.081
ต้นที่ 3	T ₃₁	0.165	C ₃₁	0.061
	T ₃₂	0.188	C ₃₂	0.059
	T ₃₃	0.179	C ₃₃	0.069
ต้นที่ 4	T ₄₁	0.237	แตงกวาต้นที่สี่ไม่มีข้อมูล	
	T ₄₂	0.215		
	T ₄₃	0.215		
Control	T _{c1}	0.081	C _{c1}	0.058
	T _{c2}	0.108	C _{c2}	0.075
	T _{c3}	0.069	C _{c3}	0.063

หมายเหตุ ในการเตรียมแอนติเจนได้สุ่มตัวอย่างจากใบของต้นแต่ละต้น 3 ครั้ง เช่น T₁₁, T₁₂, T₁₃) และในขั้นตอนการหยอดตัวอย่างบนหลุมได้ทำ randomization ตำแหน่งตัวอย่างทั้งเพลท ตัวอย่างยาสูบและแตงกวาทำการตรวจสอบพร้อมกัน

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

6. ผลจากการตรวจสอบ mixed infection โดยใช้ bioassay.

การทำ bioassay เป็นการถ่ายทอดเชื้อโรคจากพืชที่จะทำการศึกษาสู่พืชทดสอบหรือ indicator plants 5 ชนิด ดังกล่าวแล้ว พืชที่ติดเชื้อ เริ่มแรกคือ ต้นยาสูบจากแปลงของสถานีทดลองยาสูบ ซึ่งปรากฏอาการใบต่างจำนวน 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 *T. tabacum* cv. White Burley แล้วนำน้ำคั้นมาทำ sap inoculation บนพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด ปรากฏว่าไม่เกิด local lesions เมื่อรอดูอาการถึง 15-20 วัน
- ค. ผลจากการอบแห้งใบที่ติดเชื้อมาก่อนแล้วเอาน้ำคั้นไปทำ sap inoculation 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 lesions ในพืชทดสอบต่าง ๆ ได้

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้วิธีตรวจสอบไวรัสโรคพืชโดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยา คือ ELISA ประเภท แชนดิวิช ซึ่งกำหนดให้แอนติเจนเชื่อมอยู่ระหว่างแอนติบอดีที่หนึ่งและแอนติบอดีที่สอง ที่มี conjugated enzyme ELISA โดยวิธีการนี้เหมาะแก่การทดลองเชิงคุณภาพเบื้องต้น เนื่องจากว่าไม่จำเป็นต้องมีแอนติเจนบริสุทธิ์หรือ purified viral particles แต่ต้องมีแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ เช่น เป็น polyclonal antibody ซึ่งอาจเชื่อมกับแอนติเจนหนึ่ง ๆ ได้หลายจุด หากต้องการเพิ่ม คุณค่าของการตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้ ควรมีแอนติเจนบริสุทธิ์ที่เตรียมเอง จากเชื้อไวรัสในختนี้ โดยเฉพาะการเตรียมแอนติบอดีแบบ monoclonal antibody ที่จะช่วยให้มีความสามารถทำการวินิจฉัย หรือ บ่งชี้ไวรัสต่างๆ ถึงระดับสเตรนลงไป ความพร้อมที่จะผลิตแอนติบอดีได้เองให้สามารถมีแอนติเจนบริสุทธิ์จะทำให้การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณได้จาก 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 การสุมตำแหน่งหลุมของตัวอย่างทั้งหมดบนเพลทสำหรับการทำ ELISA แต่ครั้ง ทั้งนี้เพื่อลด experimental error ในทางทฤษฎีนั้นควรมีการวางแผนการทดลองทางสถิติ เช่น Bauske et al., 1994 ได้ เปรียบเทียบหลาย model พร้อมกับข้อสรุปว่าความแตกต่างระหว่างแถวและระหว่างคอลัมน์บนไมโครเพลท ก่อให้เกิด type I error ที่สูงเกินไป และไม่ควรรนำผลการอ่าน ELISA จากไมโครเพลทคนละอันมา วิเคราะห์ผลรวมกัน และยังสรุปว่าการใช้ block designs ชนิด RCB จะแม่นยำกว่า CRB ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถ้าจะให้ประโยชน์จาก ELISA อย่างจริงจัง โดยเฉพาะในการตรวจสอบเชิงปริมาณ (quantitative) ควรมีการทดสอบก่อนว่าการวางแผนการทดลองทางสถิติแบบใดให้ผลซึ่งเกิดความแม่นยำสูง

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 A₄₀₅ ต่ำในขณะที่ negative control ของการทดลองที่ใช้ ABS ให้ค่า A₄₀₅ สูงเกินไป อย่างไรก็ตามในกรณีที่มีความจำเป็นต้องใช้ ABS ก็ยังเป็นไปได้ เพราะสามารถ เห็นความแตกต่างระหว่าง negative control กับตัวอย่างพืชที่สงสัยว่าติดโรค อีกประการหนึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้มีการเปรียบเทียบ ABS จากต่างที่มาเนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่ ABS ที่ได้จากวัว หรือสัตว์บางตัว จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่ากัน

ทั้ง CMV และ TMV เป็นไวรัสที่ก่ออาการใบด่างแบบก้ำก๋าย (systemic mosaic) ในพืชเศรษฐกิจหลายอย่าง และยังก่อให้เกิด local lesions แก่พืชทดสอบที่ต่างกัน ไวรัสสองชนิดนี้สามารถปลูกและก่อโรคในพืชต้นเดียวกันการศึกษารังนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อร่วมกัน (mixed infection) เกิดขึ้นได้จริงในแปลงปลูกและ ELISA มีบทบาทในการช่วยตรวจสอบได้ดี ผลการตรวจสอบของ ELISA จะได้ผลรวดเร็วว่าการทดสอบแบบ bioassay คือ 3 วันถ้าใช้ protocol เหมือนคราวนี้ ส่วน bioassay ใช้เวลารวมทั้งการเตรียมพืชประมาณ 3-4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามค่าของ bioassay นั้น ไม่สามารถมองข้ามได้ เพราะให้ความมั่นใจอย่างสูงเมื่อมองเห็นอาการของโรคในพืชทดสอบ จุดอ่อน ของ ELISA อยู่ที่ความเฉพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อแอนติเจน ในกรณีที่ได้ผลที่ลบ (ไม่แตกต่างจาก negative control) อาจทำให้เกิดความไม่มั่นใจในบางครั้ง ดังนั้นในการตรวจสอบโรคพืชไวรัสนั้น จึงควรกระทำด้วยวิธีการที่มากกว่า 1 วิธีการเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด วิธีการอื่น ๆ ได้แก่ การใช้ภาพอิเล็กทรอนิกส์ การใช้นิวคลีอิก acid technology และการใช้ วิธีการของอิมมูโนวิทยาอื่น ๆ ที่นักโรคพืชนิยมใช้ ยิ่งใช้หลายวิธีการประกอบกันมากขึ้นก็จะเป็นการเพิ่ม ความมั่นใจและความน่าเชื่อถือ เนื่องจากแต่ละวิธีการจะมีข้อดีต่างกัน



ภาพที่ 1 ต้นยาสูบแสดงอาการใบต่างของโรคไวรัส



ภาพที่ 2 พืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* แสดง local lesions จากการทำ
sap inoculation โดยใช้น้ำคั้นของตัวอย่างโรคที่ผ่านการอบแห้งแล้ว



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



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

เอกสารอ้างอิง

1. Bauske, E.M., A.D. Hewings, F.L. Kolb, and Carmer, S.G. 1994. Variability in enzyme-linked immunosorbent assays and control of experimental error by use of experimental designs. *Plant Dis.* 78:1206-1210.
2. Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. Characteristics 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 Harrison, 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 Techniques in 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.