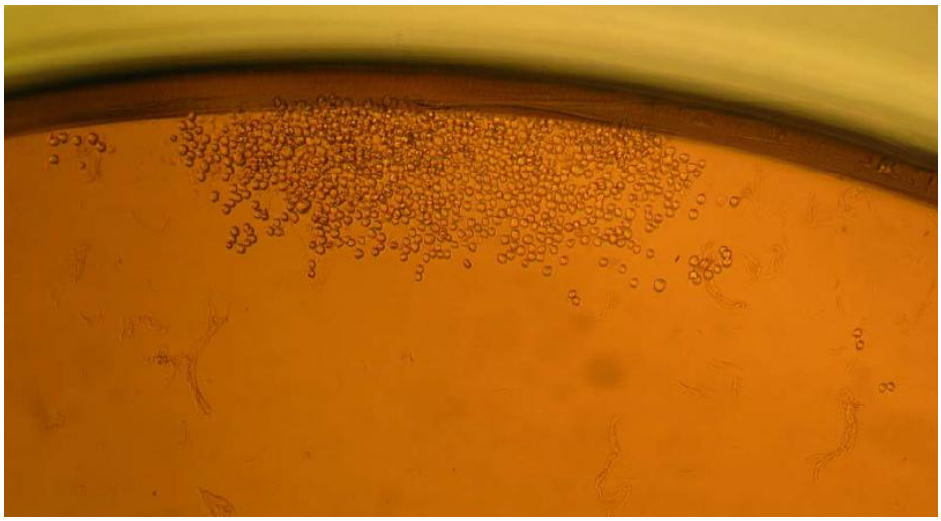
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง

Production of Monoclonal Antibody Specific to Severe Strain of Citrus Tristeza Virus



โดย

รัตนา สดุดี ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภทเงินรายได้ ประจำปี 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง

Production of Monoclonal Antibody Specific to Severe Strain of Citrus Tristeza Virus

โดย

รัตนา สดุดี ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภทเงินรายได้ ประจำปี 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยความร่วมมือจาก ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พร้อมทั้งได้รับการอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ ผศ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ในการเชื่อมเซลล์ไฮบริโดมา จึงใคร่ขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

(รศ.ดร.รัตนา สดุดี)
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

เชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) บริสุทธิ์ถูกแยกออกจากเปลือกเขียวของมะนาวติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SM4 แล้วนำไปฉีดกระตุ้นให้หนูขาว Balb/c สร้างแอนติบอดี และพบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Pab) ของเชื้อไวรัส CTV ถูกสร้างขึ้นภายใน 2 สัปดาห์หลังจากฉีดกระตุ้น 2 ครั้ง และแอนติบอดีขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 ภายหลังฉีดกระตุ้นครบ 4 ครั้ง นำสปลีนโนไซต์ซึ่งสกัดจากม้ามของหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ CTV มาเชื่อมกับไมยีโลมาเซลล์ (P3X) ได้ไฮบริโดมาเซลล์ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ที่มีความ จำเพาะต่อเชื้อ CTV จำนวน 2 โคลน คือ 2E11 และ 13E11 เมื่อทดสอบโดยเทคนิค ELISA พบว่า Mab ของโคลน 2E11 และ 13E11 มีไตเตอร์1:32 และ 1:512 ตามลำดับ สำหรับโคลน 2E11 มีความไวต่อการตรวจ หาเชื้อ CTV ในน้ำคั้นที่ระดับเจือจางมากกว่า 1:1280 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมากับเชื้อ CTV ระบุว่า Mab ของโคลน 2E11 และ 13E11ตอบสนองต่อเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรง ที่พบในประเทศไทยประกอบด้วยสายพันธุ์ SM4-P2, DAT4-5-P5, DAT4-5-P6, CrO 4-6, CmS20-3, SN8-3 สูงกว่าสายพันธุ์อ่อน SM4-P2 และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับมะนาวปกติเมื่อทดสอบด้วย ELISA

Abstract

Citrus tristeza virus was purified using green bark from acid lime infected with SM4 strain. The purified CTV was injected into Balb/c mouse to induce polyclonal antibody (Pab) production. The CTV Pab was produced in the immunized mouse 2 weeks after second injection and Pab reached the maximum peak in 5 weeks or after the forth injection. Splenocytes were extracted from spleen of the immunized mouse and were then fused with myeloma cells (P3X) for hybridoma cell producing monoclonal antibody (Mab) against CTV. Hybridoma cells were screened for production of CTV-Mab by ELISA and Western blot and resulted in two clones including 2E11 and 13E11 obtained. Mab titre of 2E11 and 13E11 was examined by ELISA and result indicated that 2E11 and 13E11 have titre at 1:32 and 1:512, respectively. Moreover, it was found that sensitivity of 2E11 Mab for CTV detection in sap extract was at 1:1280 dilution. Specificity of the Mab was also tested and resulted in Mab 2E11 and Mab 13E11 reacted with severe strain of CTV including SM4-P2, DAT4-5-P5, DAT4-5-P6, CrO 4-6, CmS20-3, SN8-3 better than the reaction to mild strain SM4-P2. In addition, Mab 2 E11 and Mab 13E11 did not cross react with healthy acid lime as tested by ELISA

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ข
สารบัญเรื่อง	ค
สารบัญภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลวิจัย	8
สรุปและวิจารณ์	19
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก ก.	23
1. อาหาร RPMI (อิสระ, 2550)	23
2. Hybridoma selective medium (HAT medium) (อิสระ, 2550)	23
3. อาหาร RPMI เสริมด้วยเซรัม (อิสระ, 2550)	23
4. สูตรเตรียม ELISA บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร (Roistacher, 1991)	24
5. สูตรเตรียม Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)	25
ภาคผนวก ข.	26
1. การทำบริสุทธิ์ทริสเตซาไวรัสโดยวิธีการดัดแปลงจาก Bar – Joseph *et al*.(1985)	26
2. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส CTV โดยวิธี indirect ELISAซึ่งดัดแปลงมาจาก Clark and Adam (1977)	27
3. การเชื่อมเซลล์ซึ่งดัดแปลงมากจาก (Linddell and Cryer, 1991)	27
4. การคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ด้วยวิธี Dot blot โดยวิธีการดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล (2548)	28
5. การคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ด้วยวิธี Western blotting โดยวิธีการดัดแปลงจาก Sithigorngul *et al*., 2002	28
6. วิธีการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (Roistacher, 1991)	29

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 1	9
2	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 2	10
3	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 3	10
4	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 4	11
5	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 5	11
6	กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 6	12
7	การตรวจพบโปรตีนหุ้มอนุภาค CTV โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของ CTV ด้วยวิธี Western blotting	12
8	การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CTV ด้วยวิธี Dot blot	14
9	การตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนหุ้มอนุภาค CTV ด้วยวิธี Western blotting ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	15
10	แสดง single clone ของไฮบริโดมาเซลล์ จากโคลน 2E11(ก) และโคลน 13E11 (ข)	15

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณและคุณภาพของเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) บริสุทธิ์แยกได้จากเนื้อเยื่อมะนาวติดเชื้อสายพันธุ์ SM4	8
2	การตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน 13E11 ด้วยวิธี Plate Trapped ELISA	16
3	การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีผลิตโดยไฮบริโดมาโคลน 2E11 และ 13E11 ต่อเชื้อ CTV โดย DAS-ELISA	17
4	การตรวจไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน 2E11 โดยเทคนิค ELISA	18
5	ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2E11 ในการตรวจหาเชื้อ CTV ในน้ำคั้นจากพืชติด เชื้อโดยเทคนิค ELISA	18

บทนำ

ส้มโอเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการส่งออก จากรายงานปี 2548 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร มีพื้นที่ปลูกส้มโอที่ให้ผลแล้ว 192,103 ไร่ ให้ผลผลิต 276,628 ตัน แหล่งผลิตห้าอันดับแรกประกอบด้วย จังหวัดนครปฐม จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดชุมพร จังหวัดนครนายก และจังหวัดสมุทรสงคราม สำหรับผลผลิตส้มโอแบ่งเป็นการบริโภคภายในประเทศ 269,128 ตัน และส่งออก 7,500 ตัน คิดเป็นมูลค่า 150 ล้านบาท คิดเป็นส่วนแบ่งตลาดโลกเพียง 0.6% ขณะที่ตลาดโลกมีการซื้อถึง 1.108 ล้านตัน ในปี 2548 สำหรับคู่ค้าที่สำคัญของส้มโอจากประเทศไทยคือ จีน ฮ่องกง สิงคโปร์ แคนาดา และมีการขยายตลาดไปยังสหรัฐเอมิเลตส์ พื้นที่ปลูกส้มโอของจังหวัดนครศรีธรรมราชอยู่ในเขตลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องจากพระราชดำริ อำเภอปากพนัง รวม 11 ตำบล จากรายงานของสำนักงานเกษตรจังหวัดนครศรีธรรมราช มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 4,604 ไร่ ให้ผลผลิตโดยรวมประมาณ 2.7 ล้านผล พันธุ์ส้มโอซึ่งปลูกเป็นหลักในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังคือ พันธุ์ขาวทองดี และพันธุ์ที่กำลังขยายพื้นที่ปลูกเพื่อการส่งออก คือ พันธุ์ทับทิมสยาม ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมของจังหวัดปัตตานี ซึ่งเกษตรกรได้นำมาคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ที่มีรสชาติหวานเนื้อผลภายในมีสีแดงเหมือนทับทิมเป็นที่ต้องการของตลาด

ในการผลิตพืชตระกูลส้มซึ่งรวมทั้งส้มโอ มักประสบปัญหาการระบาดของโรคทริสเตซา ทำความเสียหายให้พืชตระกูลส้มทุกชนิด โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพผลต่ำ และหากการเข้าทำลายตั้งแต่ระยะกิ่งพันธุ์ จะทำให้ต้นตายก่อนให้ผลผลิต เนื่องจาก Citrus tristeza virus เชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา แพร่กระจายโดยเริ่มต้นจากการติดไปกับกิ่งพันธุ์ที่ผลิตมาจากต้นแม่ที่ติดเชื้อ ต้นที่เจริญจากกิ่งพันธุ์เหล่านี้จะเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อในแปลงปลูกโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน สำหรับกิ่งพันธุ์ส้มที่ผลิตจากต้นแม่เป็นโรคทริสเตซา พบว่ากิ่งพันธุ์ติดเชื้อทริสเตซาไวรัส ประมาณ 80% จากการทดลองในส้มจุกกิ่งพันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง เมื่อนำไปปลูกจะตายก่อนให้ผลผลิตและหากเกิดการติดเชื้อในแปลงปลูกมีอายุการให้ผลผลิตต่ำกว่า 8 ปี

ปัจจุบันการระบาดของโรคทริสเตซา ในส้มโอทวีความรุนแรงเมื่อต้นปี 2552 คณะผู้วิจัยได้รับเชิญจากเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอในจังหวัดราชบุรี ให้ตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุโรคโทรมใบเหลือง และผลร่วงของส้มโอพันธุ์ขาวทองดี พบว่าต้นที่มีอาการดังกล่าว 80% ติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาและโรคฮวงลองบิงร่วมกัน และอีก 20% ติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง และผลการสำรวจเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยฯ ร่วมกับ สำนักงานเกษตรจังหวัดนครศรีธรรมราช ในพื้นที่ปลูกส้มโอเขตลุ่มน้ำปากพนัง พบโรคทั้งสองชนิดในส้มโอพันธุ์ทองดี สำหรับในพันธุ์ทับทิมสยามพบเฉพาะโรคทริสเตซาที่มีอาการรุนแรง ดังนั้นจึงใคร่ขอเสนอโครงการวิจัยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง เพื่อนำไปใช้ในการคัดกรองการติดเชื้อ

ทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรงในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามและป้องกันการแพร่กระจายของไวรัสในพื้นที่ปลูกส้มโอในเขตลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องจากพระราชดำริ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ก่อโรครุนแรง
2. ตรวจไตเตอร์และความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการวิจัยการจัดการโรคทริสเตซาในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โดยมุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุที่สามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์รุนแรงได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อนำไปสู่การจัดการโรคทริสเตซาที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากการติดเชื้อทริสเตซาสายพันธุ์อ่อนไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตส้ม

ตรวจเอกสาร

โรคทริสเตซาของพืชตระกูลส้ม

โรคที่เกิดกับพืชตระกูลส้มมีหลายชนิดแต่ที่สำคัญและทำความเสียหายมาก คือ โรคทริส เตซา ซึ่งสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Citrus Tristeza *Closterovirus* (CTV) (Bar-Joseph, 1985)ทริสเตซาไวรัสสามารถเข้าทำลายส้มเกือบทุกชนิด ซึ่งมีการรายงานครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้ ในปี ค.ศ. 1946 โรคได้ทำลายต้นส้มนับล้านต้นในอาร์เจนตินา บราซิล คาลิฟอร์เนีย ฟลอริดา และสเปน ต่อมาโรคได้กระจายออกไปยังพื้นที่ปลูกส้มในแถบเอเชียและอาฟริกาใต้ (Roistacher, 1991) สำหรับประเทศไทยมีรายงานโรคทริสเตซาเกิดขึ้นกับส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มตรา ส้มจุก ส้มโชกุน และมะนาว ความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์ของทริสเตซาเป็นเหตุให้เกิดความแตกต่างของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ สายพันธุ์อ่อน (Mild strain, CTV-M) จะก่อให้เกิดอาการเพียงเล็กน้อยสังเกตได้ยากในต้นส้มที่ติดเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์รุนแรงก่อให้เกิดอาการหลายประเภท สายพันธุ์ที่สำคัญและทำให้เกิดความเสียหายรุนแรง คือสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการทรุดโทรมและต้นแห้งตาย (Decline, CTV-D) กับต้นส้มที่ติดตากับต้นตอ sour orange และสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการลำต้นบุ๋ม (Stem pitting, CTV-SP) ซึ่งส่งผลให้ต้นแคระแกรน คุณภาพผลและผลผลิตลดลง ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ CTV-SP จะไม่ทำให้ต้นส้มตายแต่จะมีผลกระทบสูงในแง่ผลผลิต (Lee *et al*., 1987) สำหรับสายพันธุ์ CTV-D ยังไม่มีรายงานการพบในประเทศไทย เนื่องจากการปลูกส้มในประเทศไทยไม่ใช้ต้นตอ sour orange มีรายงานการพบสายพันธุ์ CTV-SP ในส้มจุกและส้มโอในภาคใต้ (รัตนา สดุดี, 2537) จากรายงานการสำรวจโรคทริสเตซาในพื้นที่ปลูกส้มทั่วประเทศไทยระหว่างปี 2547-2552 พบการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ลำต้นบุ๋ม (Citrus tristeza virus-stem pitting strain, SP) ซึ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงในส้มหลายชนิดรวมทั้งส้มโอซึ่งปลูกใน จ.ราชบุรี และ จ.สงขลา ซึ่งสายพันธุ์ไวรัสชนิดนี้ทำให้ต้นส้มโอแคระแกรน เนื่องจากเกิดโพรงขนาดเล็กในลำต้นบริเวณ vascular cambium ทำให้ท่อน้ำ (xylem vessel) ขาดหายไป ซึ่งโพรงดังกล่าวนี้ คือ ร่องบุ๋มที่ปรากฏในเนื้อไม้ของลำต้นและกิ่งของต้นส้ม (รัตนา และคณะ 2551)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา

การติดเชื้อทริสเตซาไวรัสของส้มในธรรมชาติมีเปอร์เซ็นต์สูง แต่ทริสเตซาไวรัสนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ มีทั้งสายพันธุ์ที่มิได้ทำอันตรายแก่ต้นส้มและสายพันธุ์ที่ทำความเสียหายอย่างรุนแรง ในหลายประเทศใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อทริสเตซา ระยะแรกการตรวจใช้ polyclonal antiserum (PCA) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อทริสเตซาทุกสายพันธุ์ ต่อมาได้ผลิต monoclonal antiserum (MCA) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์ของทริสเตซา เช่น MCA13 เป็นแอนติเซรัมที่จำเพาะ

ต่อสายพันธุ์รุนแรง (T36) แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์อ่อน (T30) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไวรัสที่พบในฟลอริดา (Permar *et al*., 1990) แต่แอนติเซรัม MCA13 จะไม่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์รุนแรง (decline-strain) ของทริสเตซาไวรัสในประเทศสเปน (Cambra *et al*., 2000) ขณะเดียวกัน MCA4H6 ซึ่งเป็นแอนติเซรัมที่ผลิตในไต้หวัน และตอบสนองกับเชื้อสายพันธุ์อ่อน เมื่อนำมาทดสอบกับสายพันธุ์ทริสเตซาในประเทศไทย ให้ผลที่แตกต่างไป เพราะ MCA4H6 ตอบสนองกับเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (รัตนา สดุดี และคณะ, 2543) 3DF1 และ 3CA5 เป็น MCA ที่ผลิตในประเทศสเปนเมื่อใช้ร่วมกันสามารถตรวจหาเชื้อทริสเตซาสายพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลก (Cambra *et al*., 2000) ต่อมามีการพัฒนาแอนติเซรัมที่ตอบสนองต่อเปลือกโปรตีน โดยการถ่ายโอนรหัสพันธุกรรมของเปลือกโปรตีน (CP gene) ไปยัง *Escherichia coli* แล้วนำผลผลิตโปรตีน (bacterially expressed coat protein fragment) ไปผลิตแอนติเซรัมตามกรรมวิธีการผลิต polyclonal antiserum แอนติเซรัมที่ผลิตโดยวิธีนี้มีคุณภาพดี (high titre) และผลิตได้ในปริมาณมาก (Nikolaeva *et al*., 1995) ตัวอย่างแอนติเซรัมที่ผลิตด้วยวิธีโดยวิธีดังกล่าว คือ CREC35 และ G604

เนื่องจากความก้าวหน้าทางชีวโมเลกุล ทำให้สามารถโคลนแอนติบอดียีนและชักนำให้ยีนผลิตแอนติบอดี (ScFv) ในแบคทีเรีย โดยที่แอนติบอดีดังกล่าวยังคงความจำเพาะต่อแอนติเจนของตัวเอง ทั้งนี้ ScFv อาจได้จาก hybridomas ที่ผลิต monoclonal antibodies ที่มีความจำเพาะ หรือจาก phage display libraries (Ziegler *et al*, 1995) นอกจากนี้เทคโนโลยี phage display ยังช่วยลดเวลาในการผลิตแอนติบอดีและให้ผลผลิตสูงกว่าวิธีดั้งเดิม (Ziegler and Torrance, 2002)

ต่อมาได้มีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สามารถปฏิบัติได้ด้วยตัวเองโดยไม่ต้องการความชำนาญเป็นพิเศษ และใช้ระยะเวลาสั้น (10 นาที) โดยใช้หลักการของ Immunochromatographic lateral flow (LF) ซึ่งมีทั้งที่ใช้ latex bead (Tsuda *et al*., 1992; รัตนา และคณะ, 2551) และใช้ colloidal gold เป็นตัวบ่งชี้ (marker) และจากรายงานของ Salomone *et al* (2004) ซึ่งเปรียบเทียบชุดตรวจ LF ซึ่งใช้ colloidal gold เป็นตัวบ่งชี้กับเทคนิค ELISA พบว่าชุดตรวจ LF มีประสิทธิภาพการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัส 92% ของเทคนิค ELISA

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจนของเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส (CTV)

ทำการแยกเชื้อ CTV บริสุทธิ์โดยวิธีการของ Bar-Joseph และคณะ (1985) ดังรายละเอียดใน ภาคผนวก ข. จากเปลือกเขียวของกิ่งมะนาวติดเชื้อสายพันธุ์ SM4 นำสารละลายไวรัสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการวัดค่า OD 280 และ OD 260 แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายไวรัสบริสุทธิ์จากค่า OD 280 เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตโมโนโคลนอล

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การฉีดกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดี

ดัดแปลงจากวิธีการของ Peroni *et al* (2009) โดยผสมไวรัส CTV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมกับ Complete Freund Adjuvant (CFA) อัตราส่วน1:1 ฉีดกระตุ้นหนูพันธุ์ Balb/C อายุ 3 เดือน ฉีดเข้าทางหน้าท้อง (intraperitoneal injection, IP) ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยที่การฉีดในครั้งที่ 2-4 จะผสม Incomplete Freund Adjuvant (IFA) หลังจากนั้นเก็บเลือดที่หางหนูเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark and Adam (1977) ฉีดกระตุ้น (boost) หนูอีกครั้งก่อนเชื่อมเซลล์ (fusion) 3 วัน ตามวิธีการของ Liddell and Cryer (1991)

การเชื่อมเซลล์

วิธีการเชื่อมเซลล์ดัดแปลงมาจาก Linddell and Cryer (1991) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข แยกเซลล์ม้าม (splenocyte) จากหนูขาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ CTV แล้วผสมกับเซลล์มะเร็งไมย์โลมา (myloma) P3X ในอัตรา 1:2 หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เติมสารละลาย PEG (Polyethylene glycol MW 4,000) 1 มล. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหาร RPMI (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 39 มล. จากนั้นบ่มในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ผสมไว้ที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที กระจายเซลล์ในอาหาร HAT medium (ภาคผนวก ก) ดูดส่วนผสมใส่ใน microculture plate 20 ถาด (96 หลุมต่อถาด) บ่มในตู้ CO_2 incubator ประมาณ 10 วัน ตรวจดูการเจริญเติบโตของเซลล์ในหลุมที่เลี้ยงไว้ภายใต้ inverted microscope จากนั้นคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อไวรัส CTV

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

ทำการคัดเลือกไฮบริโดมาซึ่งผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV สองขั้น การคัดเลือกขั้นที่ 1 กระทำ 2 ครั้ง โดยวิธี Dot blot (Sithigorngul *et al*., 2002) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข. โดยใช้ CTV บริสุทธิ์และน้ำคั้นจากพืชติดเชื้อ CTV เป็นแอนติเจนในการทดสอบ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกไปคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting (ภาคผนวก ข) ปริมาตร

นำเซลล์ไฮบริโดมาซึ่งผ่านการคัดเลือกมารีโคลนด้วยวิธี Limiting dilution โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก (Spinger, 1985) 2 ครั้ง กระจายเซลล์ในหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยใช้ปิเปตดูดเข้าออกหลายๆ ครั้ง แล้วหยดเซลล์ลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ได้ประมาณ 100 เซลล์ภายใต้ inverted microscope เติมอาหาร RPMI 1640 (ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum เม็ดเลือดแดง, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วดูดเซลล์ลงใน microculture plate (96 หลุมต่อถาด) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงใน CO_2 incubator ประมาณ 10 – 12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยว (single clone) ภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นคัดเลือกโดยวิธี ELISA แล้วเพิ่มขยายเซลล์โดยเลี้ยงในอาหาร RPMI ที่มี 20% fetal bovine serum

3. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตต่อเชื้อไวรัส CTV

โดยวิธี indirect ELISA

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส CTV (anti-CTV monoclonal antibody, anti-CTV Mab) ต่อไวรัสบริสุทธิ์และต่อไวรัสในน้ำคั้นจากเปลือกเขียวติดเชื้อ CTV ไอโซเลท SM4 ด้วยวิธี indirect DAS ELISA ซึ่งดัดแปลงมาจาก Clark and Adam (1977) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข. โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทำปฏิกิริยากับเชื้อ CTV บริสุทธิ์และเชื้อไวรัสในน้ำคั้นพืช เปรียบเทียบปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV กับปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ CTV

โดยวิธี Western Blotting

ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส CTV ด้วยวิธี Western Blotting ตามวิธีการของ Sithigorngul และคณะ(2002) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข. โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส CTV จากน้ำคั้นพืชเป็นโรค เปรียบเทียบปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส CTV

4. การตรวจหาค่าไตเตอร์และความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของ anti-CTV Mab ด้วยวิธี plate trapped ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adam (1977) โดยเติมน้ำคั้นที่มีเชื้อไวรัส SM4 เจือจาง 1:10 ลงในหลุม ELISA plate จากนั้นเติม blocking buffer (2%BSA) แล้วนำ anti-CTV Mab ที่ได้จาก cell culture ของไฮบริโดมาเซลล์มาทำปฏิกิริยากับเชื้อ CTV โดยเจือจาง anti-CTV Mab ใน conjugate buffer แบบ 2-fold dilution โดยเริ่มจาก 1:2 ตรวจสอบค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส CTV เติม goat anti-mouse conjugated with alkaline phosphatase เจือจาง 1:3000 และสับสเตรท p-nitrophenyl phosphate ที่อัตรา 1 มกต่อมล. โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

ตรวจหาค่าความไว(sensitivity)สูงสุดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส CTV ได้ด้วยวิธี plate trapped ELISA ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยเจือจางเชื้อไวรัส CTV สายพันธุ์ SM4 ในน้ำคั้นด้วย coating buffer แบบ 2-fold dilution ตั้งต้นที่ 1:10 จากนั้นนำเชื้อ CTV แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลุม ELISA plate ตรวจสอบปฏิกิริยา ค่าความเจือจางสูงสุดของเชื้อไวรัส CTV ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ anti-CTV Mab เจือจาง 1:2

ผลการวิจัย

1. เตรียมแอนติเจนของเชื้อทริสเตซาไวรัส

ผลการแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสบริสุทธิ์โดยวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Bar-Joseph และคณะ (1985) ซึ่งใช้ PEG (Polyethene Glycol) ตกตะกอนไวรัสและแยกตะกอนไวรัสออกมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง พบว่า เมื่อใช้เนื้อเยื่อเปลือกเขียวของกิ่งมะนาว 10 กรัม จะได้ทริสเตซาบริสุทธิ์เฉลี่ย 1.41 และ 0.61 มก.ต่อมล. ตกตะกอนไวรัสด้วย PEG รอบ1 และ รอบ2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการตรวจความบริสุทธิ์ของไวรัสที่แยกได้โดยอาศัยค่าสัดส่วนของการดูดกลืนแสง 260:280 พบว่าการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย PEG สองรอบไวรัสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าการตกตะกอนเพียงรอบเดียว ทั้งนี้ค่าสัดส่วน 260 : 280 ของเชื้อทริสเตซาบริสุทธิ์ที่รายงานไว้คือ 1.12 สำหรับการทดลองครั้งนี้ ค่าเฉลี่ยที่ได้ของการตกตะกอนหนึ่งรอบ(1^{st} PEG) และสองรอบ (2^{nd} PEG) คือ 0.97 และ 1.04 ตามลำดับ ดังจะเห็นได้ว่าค่า 260:280 ของการตกตะกอนด้วย PEG สองรอบใกล้เคียงกับที่รายงานไว้

ตารางที่ 1 ปริมาณและคุณภาพของเชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) บริสุทธิ์แยกได้จากเนื้อเยื่อมะนาวติดเชื้อสายพันธุ์ SM4

การทำบริสุทธิ์ครั้งที่	ปริมาณ (CTV) บริสุทธิ์ (มก/มล)[1/]		OD 260 : OD 280[2/]	
	PEG รอบ 1	PEG รอบ 2	PEG รอบ 1	PEG รอบ 2
1	0.79	0.10	0.95	1.14
2	2.00	0.66	1.10	1.11
3	2.00	0.73	1.00	1.13
4	1.08	0.69	0.91	1.07
5	1.09	0.68	0.83	0.92
6	1.50	0.81	1.02	0.87
เฉลี่ย	1.41	0.61	0.97	1.04

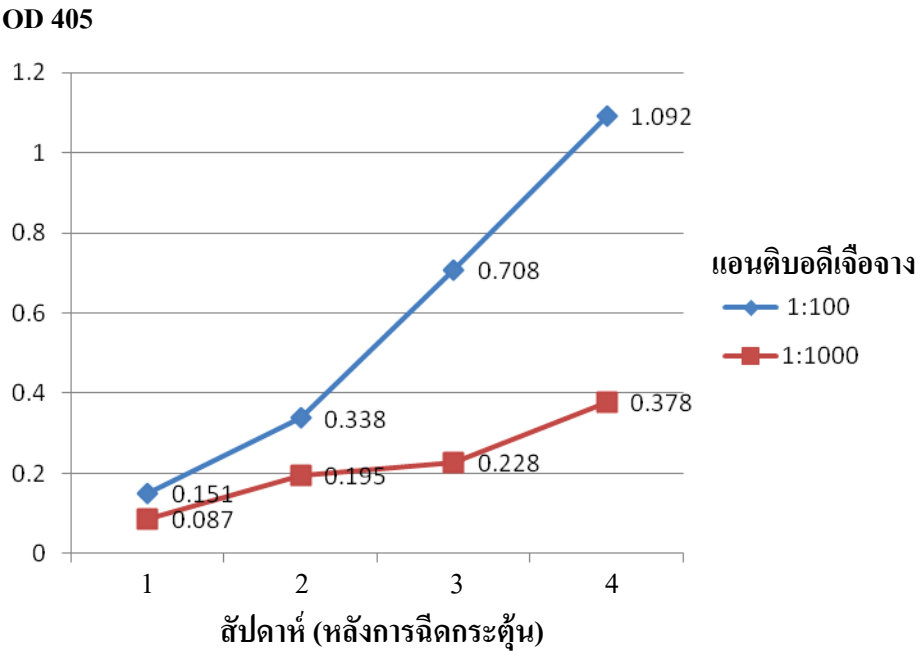
[1/] ปริมาณของ CTV ที่แยกได้คำนวณจาก $\frac{OD280 \times dilution\ factor}{E}$ ค่า E = 2.0

[2/] เชื้อบริสุทธิ์ของ CTV มีค่า OD 260:280 = 1.12

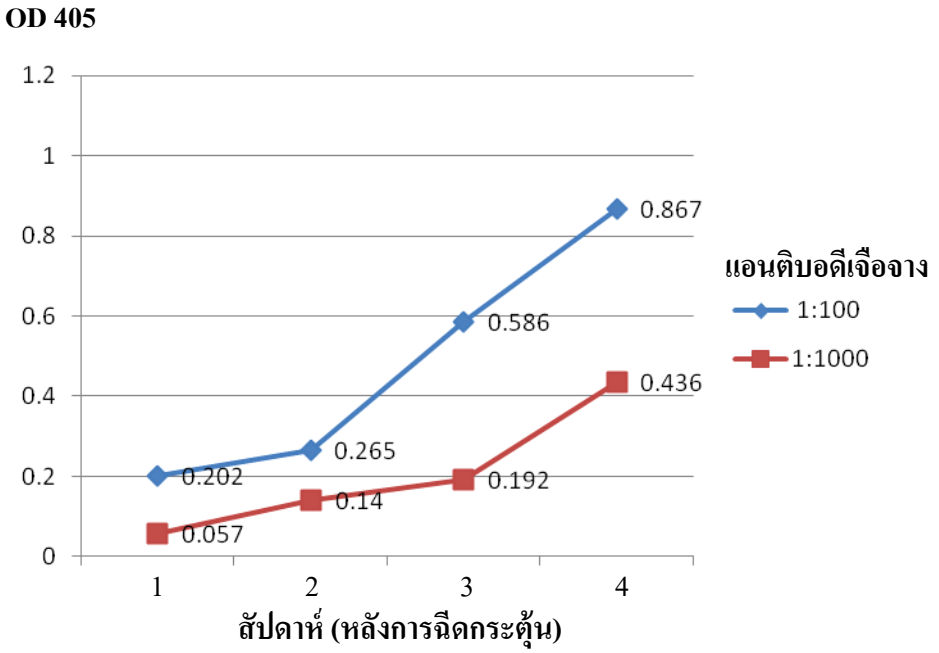
2. **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี**

การฉีดกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดี

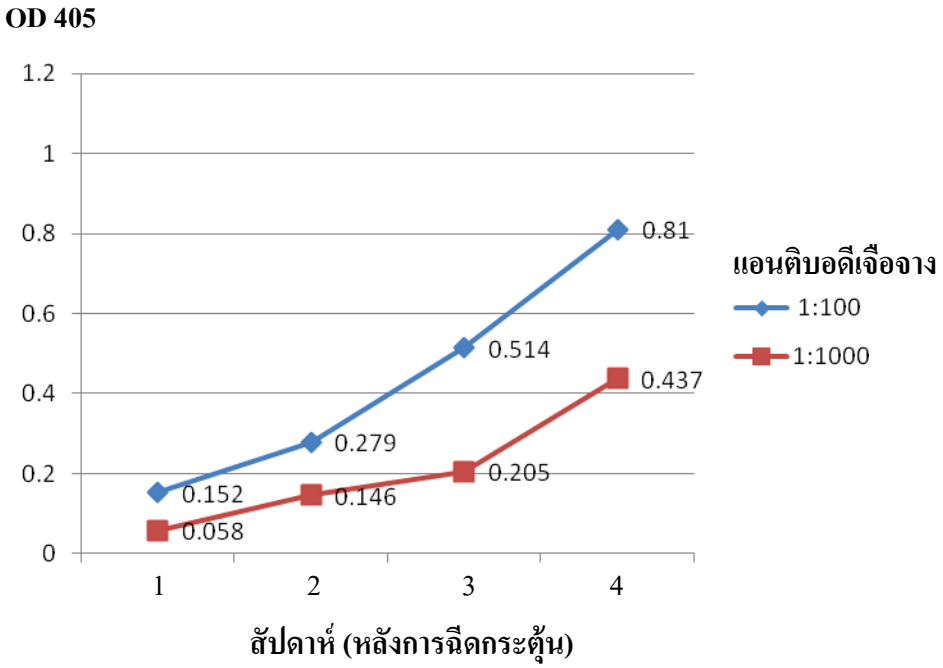
ภายหลังฉีดกระตุ้นหนูด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของทริสเตซาไวรัส (แอนติเจน) และดูดเลือดมาตรวจหาโพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อไวรัสโดยELISA พบว่า 6/6 ของหนูที่ได้รับการกระตุ้นสร้างแอนติบอดีในสัปดาห์ที่ 2 หรือ หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และเมื่อกระตุ้น ครบ 4 ครั้ง หนูที่ได้รับการกระตุ้นผลิตแอนติบอดีสูงสุด (ภาพที่1-6) และผลการตรวจความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน CTV ด้วยวิธี Western blot บ่งชี้ว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากหนู 3/3 ตัว มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่เป็น เปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส โดยปรากฏแถบของโปรตีนขนาด 25 kDa (ภาพที่ 7) ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนที่หุ้มอนุภาคไวรัส CTV



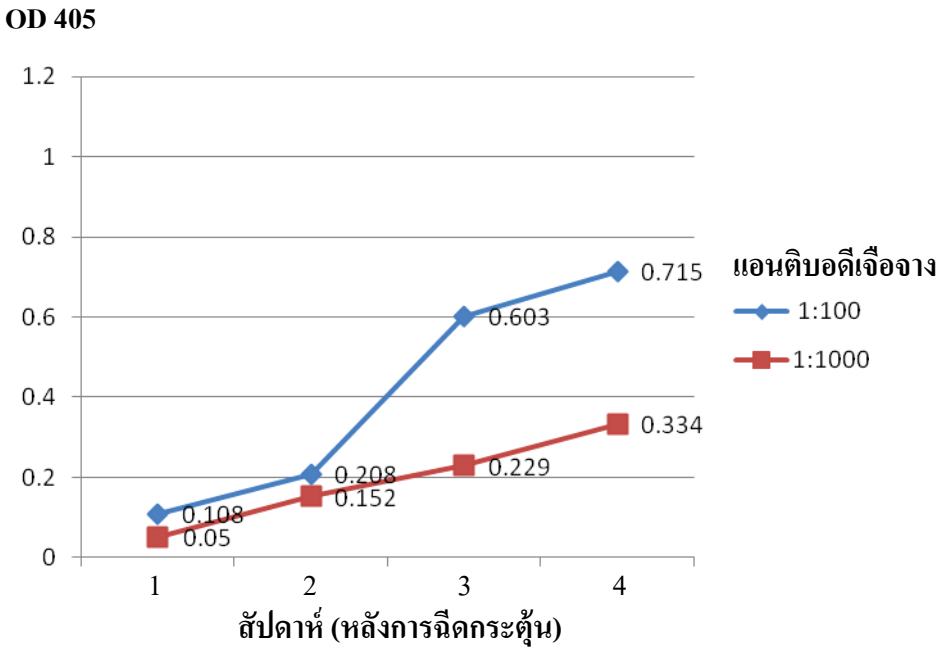
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 1



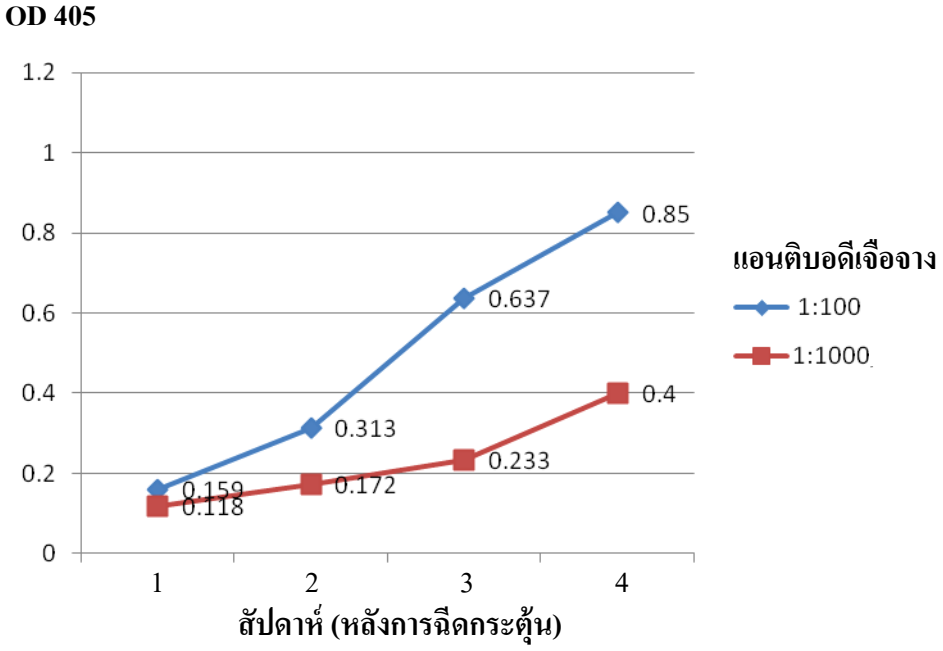
ภาพที่ 2 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 2



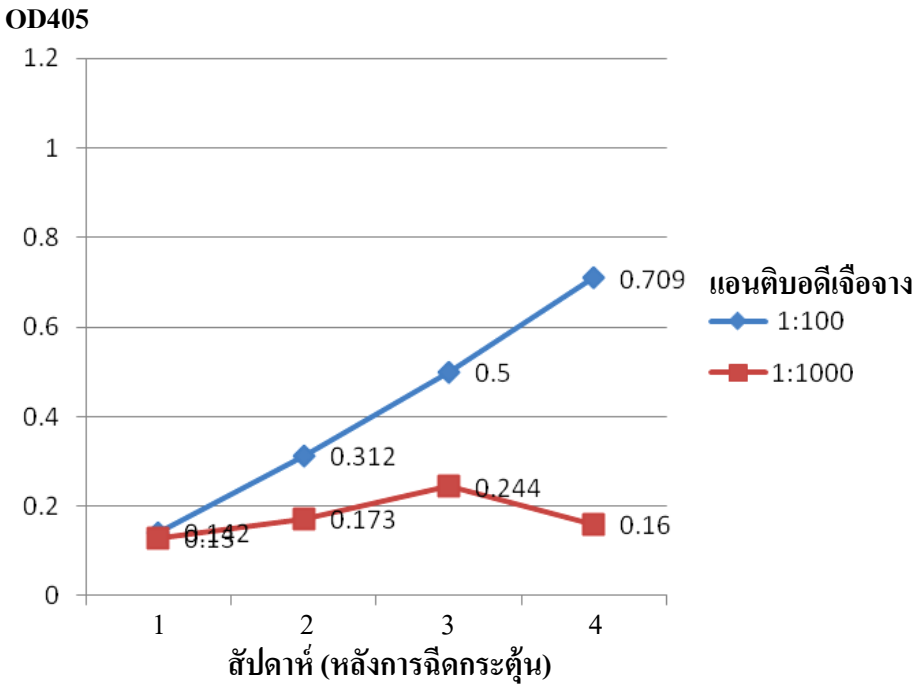
ภาพที่ 3 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 3



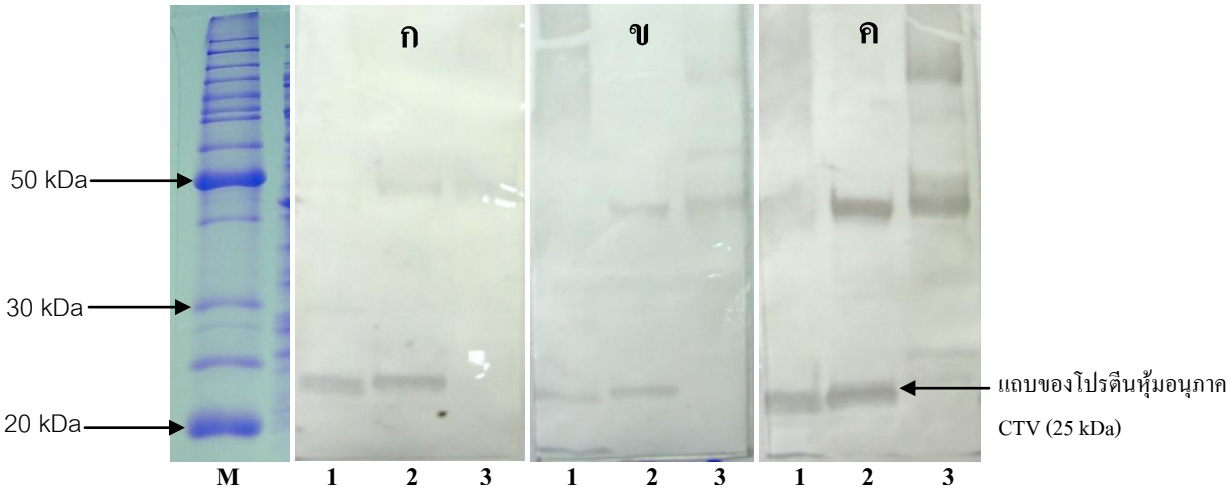
ภาพที่ 4 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 4



ภาพที่ 5 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 5



ภาพที่ 6 กราฟแสดงการสร้างแอนติบอดีของหนูตัวที่ 6



ภาพที่ 7 การตรวจความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของ CTV ด้วยวิธี Western blotting: ช่อง M Standard molecular weight protein marker; ช่อง 1 CTV บริสุทธิ์; ช่อง 2 น้ำคั้นจากมะนาวติดเชื้อ CTV; ช่อง 3 น้ำคั้นจากมะนาวปกติ

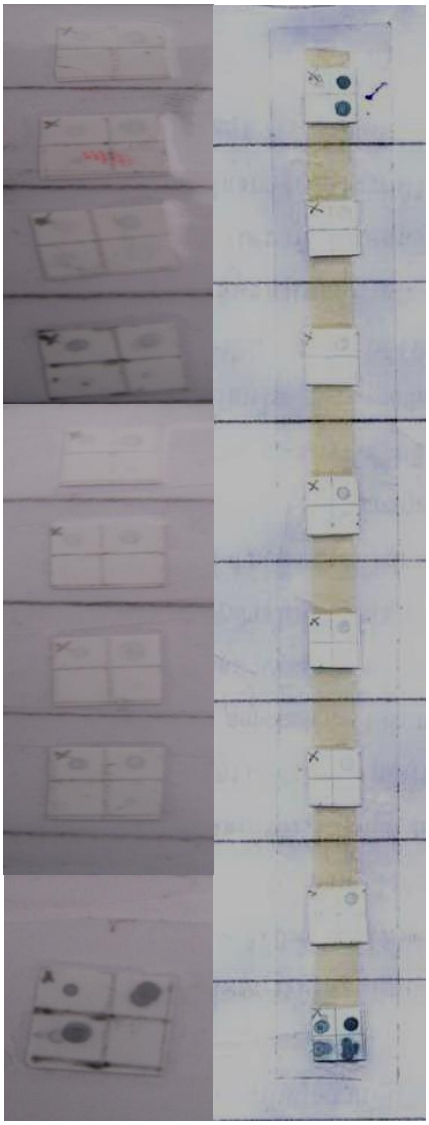
ก. หนูตัวที่ 1

ข. หนูตัวที่ 2

ค. หนูตัวที่ 5

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CTV ขั้นที่ 1 โดยวิธี Dot blot พบว่าจาก จำนวนหลุมที่เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 1960 หลุมต่อหนูหนึ่งตัว มีเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส CTV จำนวนทั้งสิ้น 15 หลุม แยกเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากหนูตัวที่ 1 8 หลุม และหนูตัวที่ 5 7 หลุม (ภาพที่ 8) ในการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี Western blotting ได้ไฮบริโดมาจำนวน 2 โคลน คือ 2E11 และ 13E11 (ภาพที่ 9) นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 ไปรีโคลนได้ เป็น single clone (ภาพที่ 10) ของกลุ่ม 2E11 จำนวน 1 โคลน ซึ่งตอบสนองต่อเชื้อ CTV และจากกลุ่ม 13E11 3 โคลน เลือก single clone ของ 13E11 ไปเลี้ยงขยายจำนวนเซลล์แล้วตรวจหาปริมาณแอนติบอดีที่หลั่งออกมา พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีอายุ 4 วัน มีปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีสูงสุด (ตารางที่ 2)



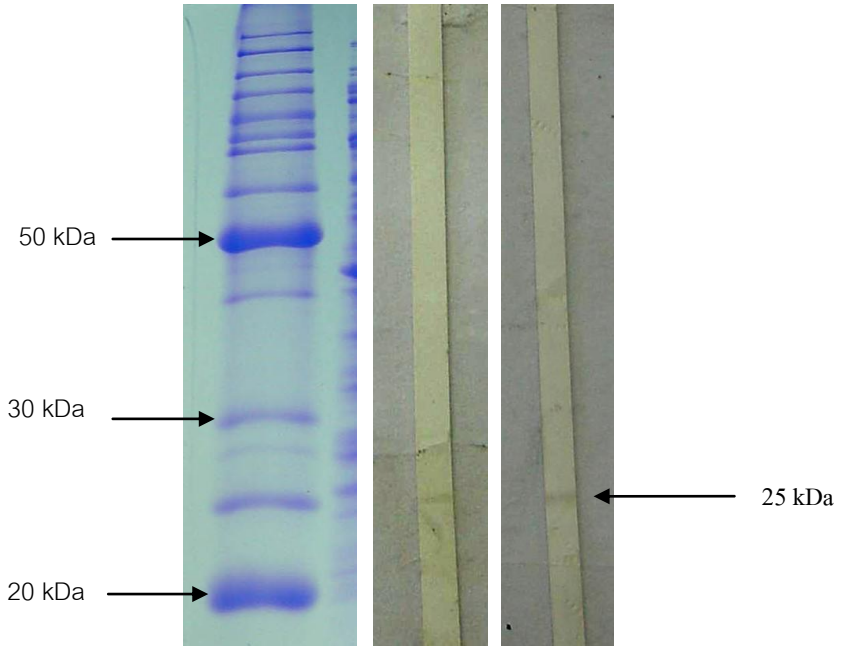
1	2
3	4

1 = พืชปกติเจือจาง 1:8, 2 = CTV ในน้ำคั้นพืชเจือจาง 1:2
3 = CTV บริสุทธิ์เจือจาง 1:2, 4 = CTV บริสุทธิ์เจือจาง 1:2 + CTV ในน้ำคั้นพืชเจือจาง

ภาพที่ 8 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CTV ด้วยวิธี Dot blot

ก. เซลล์ไฮบริโดมาจากหนูตัวที่ 1

ข. เซลล์ไฮบริโดมาจากหนูตัวที่ 5

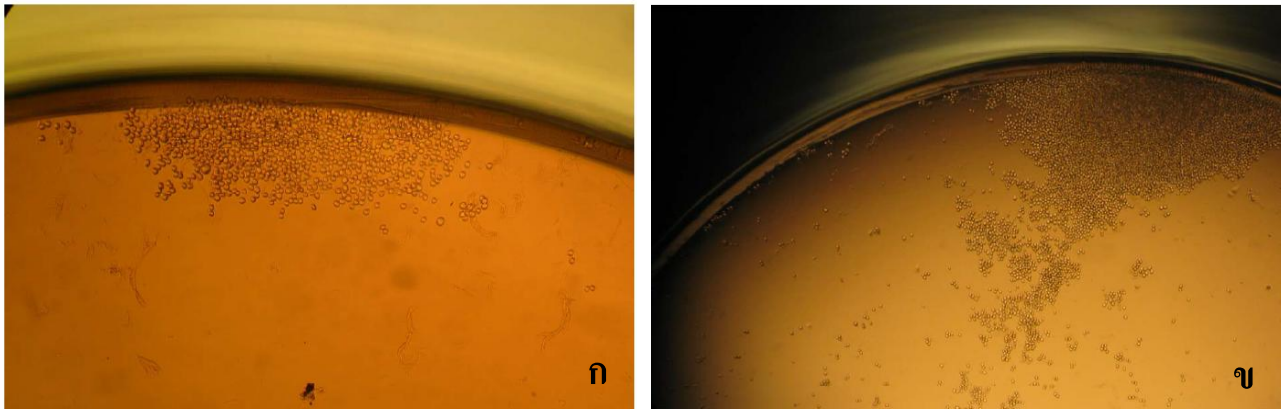


ภาพที่ 9 การตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีนหุ้มอนุภาค CTV ด้วยวิธี Western blotting ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาขั้นที่ 2

ช่อง M Standard molecular weight protein marker

ช่อง 1 โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 5

ช่อง 2 โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไฮบริโดมาโคลน 2E11 จากหนูตัวที่ 5



ภาพที่ 10 แสดง single clone ของไฮบริโดมาเซลล์ จากโคลน 2E11(ก) และโคลน 13E11 (ข)

ตารางที่ 2 การตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน 13E11 ด้วยวิธี Plate Trapped ELISA

ระยะเวลาเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (ชม.)	OD 405[1/] ($\overline{X}$ ± SD)	
	CTV-SM4	มะนาวปกติ
24	2.083±0.305	0.008±0.004
48	2.516±0.203	0.039±0.001
72	2.628±0.091	0.036±0.013
96	3.200±0.698	0.059±0.010
120	2.687±0.490	0.002±0.001
144	1.799±0.225	0.001±0.001
168	1.665±0.030	-0.002±0.003

[1/] ค่าดูดกลืนแสง (OD 405) ของปฏิกิริยา ELISA ที่ได้จากการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (undilute) ตรวจเชื้อ CTV

3. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตต่อเชื้อไวรัส CTV โดยวิธี indirect ELISA

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งผลิตโดยไฮบริโดมาโคลน 2E11 และ 13E11 ต่อเชื้อ CTV พบว่าแอนติบอดีของ 2E11 และ 13E11 ตอบสนองต่อไวรัสสายพันธุ์อ่อนและสายพันธุ์รุนแรงแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) โดย 2E11 มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์รุนแรงมากกว่าสายพันธุ์อ่อน ในขณะที่ 13E11 มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์รุนแรงของเชื้อ CTV ที่พบในส้มโอ (DAT4-5-P6) และส้มโอเชี่ยน (CrO4-6) มากกว่าสายพันธุ์รุนแรงที่พบในส้มโชกุน (CmS20-3) และส้มจุก (SN8-3) ซึ่งใกล้เคียงกับปฏิกิริยาของ 13E11 ที่มีต่อสายพันธุ์อ่อน (SM4-P9) และเมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ CTV พบว่าปฏิกิริยา ELISA (OD 405) ของโมโนโคลนอล 2E11 และ 13E11 ต่อเชื้อ CTV สายพันธุ์ SM4 คือ 2.302 และ 2.552 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าปฏิกิริยาที่ได้จากโพลีโคลนอล คือ >4.000 ประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีผลิตโดยไฮบริโดมาโคลน 2E11 และ 13E11 ต่อเชื้อ CTV โดย DAS-ELISA[1/]

สายพันธุ์ CTV	ระดับความรุนแรง	ค่าเฉลี่ย OD 405 ($\overline{X}$ ± SD)		
		2E11	13E11	CTV โพลีโคลนอล[2/]
SM4-P10	สายพันธุ์อ่อน	0.582±0.028	0.386±0.056	12.700±0.665
SM4-P2	สายพันธุ์รุนแรง	0.744±0.025	0.346±0.035	10.610±0.240
DAT4-5-P5	สายพันธุ์รุนแรง	0.802±0.021	0.322±0.004	14.600±0.000
DAT4-5-P6	สายพันธุ์รุนแรง	0.952±0.019	0.396±0.030	16.280±0.000
CrO4-6	สายพันธุ์รุนแรง	0.530±0.005	0.339±0.008	16.270±0.000
CmS20-3	สายพันธุ์รุนแรง	0.777±0.011	0.325±0.008	11.385±0.841
SN8-3	สายพันธุ์รุนแรง	0.994±0.081	0.319±0.011	14.440±0.000
SM4	สายพันธุ์รุนแรง+อ่อน	2.302±0.181	0.316±0.012	13.030±0.000
มะนาวปกติ	-	0.005±0.003	0.002±0.002	-0.065±0.092

[1/] เคลือบหลุมของ ELISA plate ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (IgG) เข้มข้น 2 มกต่อมล. และใช้โมโนโคลนอลของ 2E11 เจือจาง 1:2 และ 13E11 เจือจาง 1:16 ใช้ Goat anti mouse conjugated Alkaline phosphatase (GAM-AP) เจือจาง 1:3000 ใช้น้ำคั้นจากเส้นกลางใบมะนาวติดเชื้อ CTV สายพันธุ์ต่างๆ ที่เจือจาง 1:10

[2/] ค่า OD 405 ของปฏิกิริยา ELISA เมื่อใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีตรวจสอบเชื้อ CTV คำนวณจากปฏิกิริยา ELISA เจือจาง 1:10 (ค่าที่ได้เกินสเกลคือ >4)

4. การตรวจหาค่าไตเตอร์และค่าความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 2E11 และโคลน 13E11 พบว่า 2E11 มีค่าไตเตอร์ที่ 1:32 (ตารางที่ 4) และ 13E11 ที่ 1:512 (ตารางที่ 4) ดังนั้นจึงนำแอนติบอดีของโคลน 2E11 มาทดสอบความไวต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2E11 สามารถตรวจพบเชื้อ CTV ในน้ำคั้นจากเส้นกลางใบมะนาวติดเชื้อสายพันธุ์ SM4 ในระดับที่เจือจางต่ำกว่า 1:1280 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 การตรวจไตเตอร์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ผลิตจากไฮบริโดมาโคลน 2E11 และ 13E11 โดยเทคนิค ELISA[1/]

ระดับเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	OD 405[1/] ($\overline{X}$ ± SD)	
	โคลน 2E11[2/]	โคลน 13E11
1:2	1.549±0.098	2.376±0.377
1:4	1.058±0.011	2.036±0.158
1:8	0.961±0.029	1.935±0.181
1:16	0.779±0.062	1.674±0.341
1:32	0.324±0.004	1.013±0.049
1:64	0.032±0.000	0.592±0.014
1:128	0.006±0.001	0.337±0.047
1:256	0.013±0.004	0.251±0.041
1:512	NA	0.188±0.049

[1/] ใช้เทคนิค Plate trapped ELISA (ภาคผนวก ข) และใช้ไวรัส CTV สายพันธุ์ SM4 ในน้ำคั้นเจือจาง 1:10 เป็นแอนติเจน

[2/] NA = Not applicable (ไม่ได้ทดสอบ)

ตารางที่ 5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 2E11 ในการตรวจหาเชื้อ CTV ในน้ำคั้นจากพืชติดเชื้อโดยเทคนิค ELISA[1/]

ระดับเจือจางของน้ำคั้นติดเชื้อ CTV(SM4)	OD 405[2/] ($\overline{X}$ ± SD)
1:10	2.659±0.037
1:20	2.518±0.012
1:40	2.704±0.035
1:80	3.071±0.045
1:160	1.465±0.093
1:320	1.390±0.013
1:640	1.475±0.081
1:1280	1.335±0.320

[1/] ใช้เทคนิค Plate trapped ELISA (ภาคผนวก ข) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีของโคลน 2E11 เจือจาง 1:2

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ของน้ำคั้นมะนาวปกติเจือจาง 1:10 คือ 0.142±0.002

สรุปและวิจารณ์

ในการทำบริสุทธิ์เชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส (CTV) โดยวิธีการของ Bar-Joseph *et al* (1985) ได้ผลผลิตไวรัสบริสุทธิ์ประมาณ 1.41 มกต่อมล. และ 0.61 มกต่อมล. เมื่อใช้การตกตะกอนโดย PEG หนึ่งรอบ และ PEG สองรอบ, ตามลำดับ และพบว่าไวรัสที่ได้จากการตกตะกอนด้วย PEG สองรอบมีความบริสุทธิ์มากกว่าเมื่อตกตะกอนเพียงรอบเดียว แต่จะมีปริมาณไวรัสต่ำกว่า (ตารางที่ 1) ในการฉีดกระตุ้นหนูด้วยไวรัสบริสุทธิ์ พบว่าหนูเริ่มสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV (Pab) ภายใน 2 สัปดาห์ หรือหลังการฉีดครั้งที่ 2 และ Pab ขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 หรือหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4 ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการผลิต Pab ต่อเชื้อ CTV ในกระต่าย (รัตนา และคณะ, 2551)

การทดลองเชื่อมสปีนโนไซด์ซึ่งสกัดจากม้ามของหนูเข้ากับไมอีโลมาเซลล์พบว่ามีการเชื่อมเป็นไฮบริโดมาเซลล์จำนวนมาก ในการคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วย dot blot พบน้ำเลี้ยงของไฮบริโดมาจำนวน 15 โคลน ที่ตอบสนองต่อเชื้อ CTV และจากการคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วย Western blotting พบไฮบริโดมา 2 โคลน คือ 2E11 และ 13E11 นอกจากนี้พบว่า single clone ซึ่งได้จากการรีโคลนเซลล์ไฮบริโดมา 2E11 และ 13E11 ด้วยวิธี limiting dilution เมื่อเลี้ยงเพิ่มขยายเซลล์ในอาหาร RPMI 1640 ซึ่งเสริมด้วย fetal bovine serum สามารถผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัส CTV และมีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีโคลน 13E11 ที่ 1:521 และโคลน 2E11 ที่ 1:32 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ครั้งนี้จากโคลน 2E11 มีความไวในการตรวจหาเชื้อ CTV ในน้ำคั้นจากมะนาวติดเชื้อที่ระดับเจือจางมากกว่า 1:1280 จัดอยู่ในระดับความไวสูง

ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการทดลองครั้งนี้พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2E11 และ 13E11 ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเชื้อไวรัส CTV สายพันธุ์รุนแรงซึ่งพบในประเทศไทย (ตารางที่ 3) สำหรับโคลน 2E11 มีปฏิกิริยาต่อเชื้อสายพันธุ์อ่อน SM4-P10 และสายพันธุ์รุนแรง CrO4-6 ต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ขณะที่โคลน 13E11 มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CTV ทุกสายพันธุ์ในระดับใกล้เคียงกัน ซึ่งจะได้ศึกษาแอพิโทบของเชื้อไวรัส CTV ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อไป เพื่อประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ของ CTV ดังรายงานของ Nikolaeva และคณะ (1990) ซึ่งใช้โมโนโคลนอล 2 ชนิด คือ MAB 17G11 ซึ่งทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส CTV เกือบทุกสายพันธุ์ที่พบในฟลอริดา และ MCA 13 ซึ่งทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์รุนแรงของฟลอริดา แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์อ่อน นอกจากนี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ครั้งนี้มีปฏิกิริยาจำเพาะต่อ CTV แอนติเจนเท่านั้น ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV ที่ผ่านการขจัดแอนติบอดีต่อโปรตีนพืช (รัตนา และคณะ, 2551) เมื่อทดสอบด้วย DAS-ELISA (ตารางที่ 3)

สำหรับปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ CTV แต่ละสายพันธุ์สูงกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 2E11 และ 13E11 ประมาณ 80% และ 92% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับกการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

รัตนา สดุดี. 2537. โรคโทรมของส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco): เชื้อสาเหตุและปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงของโรค. ว.สงขลานครินทร์ 16(4):353-367.

รัตนา สดุดี มงคล แซ่หลิม และ สุภาพ เกียรติทับทิว. 2543. รายงานการวิจัย เรื่อง การควบคุมโรคทริสเตซาในส้มจุกโดยการปลูกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 43 หน้า.

รัตนา สดุดี สมปอง เตชะโต และ John Milne. 2551. การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

อิสระ พลจังหรีด. 2550. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Vibrio harveyi สายพันธุ์ 1526. วิทยาศาสตร์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรมหาวิทยาลัย.

Bar-Joseph, M., Gumpf, D.J., Dodds, J.A. Rosner, A., and Ginzberg, I. 1985. A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. Phytopathology 75: 195-198.

Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquín, C., Román, M. P., Olmos, A. Martínez, M. C., de Mendoza, A.H., Lo´pez, A. and Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. Virus Research 71: 85–95.

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

Lee. R.F., Garnsey, S.M., Brlansky, R.H. and Goheen, A.C. 1987. A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem-limited viruses. Phytopathology. 77: 543-549.

Liddell, J.E. and Cryer, A. 1991. Apractical guide to monoclonal antibodies. Joh Wiley & Sons, Inc., Baffins Lane, Chichester West Sussex PO19 1UD. England. 188 pp.

Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Carnsey, S.M. and Lee, R.F. 1990. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. Plant disease. 82: 1276-1280.

Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F. and Garnsey, S.M. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli* : Application for immunodiagnosis. Phytopathology. 85(6): 691-694.

Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D. and Lee, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. Phytpathology 80: 691-694.

Peroni, L.A., M. Lorencini, J. Raimundo, R. dos Reis, M. A. Machado and Stach-Machado, D. R. 2009. Differential diagnosis of Brazilian strains of *Citrus tristeza virus* by epitope mapping of coat protein using monoclonal antibodies. Virus Research 145: 18–25.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible Disease of Citrus: Handbook for Detection and Diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 286 pp.

Salomone, A.,Mongelli, M., Roggero, P. And Boscia, D. 2004. Reliability of detection of *citrus tristeza virus* by an immunochromatographic lateral flow assay in comparison with ELISA. Journal of Plant Pathology. 86(1): 43-48.

Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. 49: 71-76.

Spinger, P.A. (edit). 1985. Hybridoma Technology in Biosciences and Medicine. Plenum Press, New York. 602 p.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

Tsuda, S., Lwaki-Kameya, M., Hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M. and Tomaru, K. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: rapid immunofillter paper assay (RIPA). Plant Disease. 76: 466-469.

Ziegler, A., Torrance, L., Macintosh, S.M., Cowan, G.H. and Mayo, M.A. 1995. Cucumber mosaic virus Cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library. Virology 214(1), 235-238.

Ziegler, A. and Torrance, L. 2002. Application of recombinant antibodies in plant pathology. Mol. Plant Pathol. 3(5), 401-407.

ภาคผนวก ก

1. อาหาร RPMI (อิสระ, 2550)

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
$NaHCO_3$	2.0160	กรัม
HEPES (N-2Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9525	กรัม
น้ำ (Meri Q water)	1000.1	มล.

สุดท้ายเติมสารละลาย penicillin G, streptomycin และ kanamycin ความเข้มข้น 20,000 ยูนิต, 200 มก. และ 200 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore membrane (ขนาด 0.22 ไมโครเมตร) และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

2. Hybridoma selective medium (HAT medium) (อิสระ, 2550)

อาหาร RPMI (1)	80.0	มล.
FCS	20.0	มล.
100 × HT supplement	1.0	มล.
50 × Aminopterin (Sigma)	2.0	มล.

เม็ดเลือดแดงของหนูขาว 1%

3. อาหาร RPMI เสริมด้วยเซรัม (อิสระ, 2550)

อาหาร RPMI (1)	80.0	มล.
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0	มล.
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)		
100 × HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มล.
- 10 มิลลิโมลาร์ Sodium hypoxanthine		
- 1.6 มิลลิโมลาร์ Thymidine		

4. สูตรเตรียม ELISA บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร (Roistacher, 1991)

4.1 Coating buffer

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
NaN_3	0.20	กรัม

(pH 9.6)

4.2 Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.00	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
$Na_2HPO_412H_2O$	2.90	กรัม
KCl	0.20	กรัม

(pH 7.2 – 7.4)

4.3 Washing buffer (PBS-T)

PBS	1.0	ลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

4.4 Conjugate buffer

PBS-T	1.0	ลิตร
Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000	20	กรัม

4.5 Substrate buffer

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
NaN_3	0.2	มิลลิลิตร

(ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl)

4.6 Reaction stopping solution

NaOH	120	กรัม

5. สูตรเตรียม Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ภาคผนวก ข

1. การทำบริสุทธิ์ทริสเตซาไวรัสโดยวิธีการดัดแปลงจาก Bar – Joseph *et al.*(1985)

1.1 นำ 40 g ของเปลือกเขียวของลำต้นส้มหรือมะนาว บดในครกที่มี Liquid N_2 จนเป็นผงละเอียด

1.2 นำผงที่บดละลาย (thaw) ใน 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.8 (อัตราส่วน 1g ของผงเปลือก ต่อ 5 ml buffer) บดในครกนาน 5 นาที

1.3 นำของเหลวที่ได้กรองผ่านผ้ากรอง 4 ชั้น และชั้นบนปิดทับด้วยกระดาษ Kimwipe

1.4 นำกากที่ค้างอยู่บนผ้ากรองมาละลายใน 0.1 M Tris-HCl ซ้ำอีกครั้งโดยวิธีในข้อ2-3

1.5 นำของเหลวที่กรองได้ทั้งสองครั้งรวมกัน จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 5000 g เป็นเวลา 10 นาที (ใช้ Swing head ของ Cool Spin Centrifuge ที่ 3800 rpm 10 นาที)

1.6 นำ Supernatant (ของเหลวที่ผ่านการ Centrifuge) มา Centrifuge ที่ 6000 g นาน 8 นาที (ใช้ Angle head ของ Cool Spin Centrifuge ที่ 6500 rpm นาน 7 นาที)

1.7 ทิ้งกาก (pellet) เก็บของเหลว (Supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4

1.8 เติม 20 ml ของ 30 % (w/v) PEG 6000 ซึ่งละลายอยู่ใน 0.6 N NaCl และ 2 ml ของ 20 % (w/v) NaCl ต่อทุก 100 ml ของเหลวที่กรองได้

1.9 กวนให้ส่วนผสมเข้าด้วยกันทิ้งไว้ 4°C เป็นเวลา 30-60 นาที Centrifuge ที่ 6000 rpmนาน 45 นาที (ใช้ Beckman UC rotor 50.2 Ti ที่ 14,500 rpm 15 นาที)

1.10 เก็บตะกอน (pellet) แล้วนำมาละลาย (resuspend) ใน 0.04 M sodium phosphate buffer pH 8.2 ปริมาตร 8 หรือ 25 ml คนให้ละลายอย่างเบาๆ 1 ชม. ที่ 4°C แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นค้างคืน (4°C)

1.11 นำ suspension จากข้อ 10 มา Centrifuge ที่ 5700 rpm 10 นาที ที่ 4°C (angle head , Cool Spin Centrifuge) เก็บ supernatant ซึ่งถือเป็น partially purified viral extract

1.12 เติม PEG 6000 และ NaCl ให้มีความเข้มข้น 4% และ 2% ตามลำดับ (0.08 g PEG กับ 200 µl 20% NaCl เมื่อใช้ supernatant 2 ml) คนที่ 4°C 1 ชม. แล้ว Centrifuge ที่ 6000 rpm นาน 45 นาที

1.13 เก็บ pellet แล้วละลายใน 0.015 M Sodium phosphate pH 8.2 ปริมาตร 1.5 ml คนประมาณ 15 นาที แล้ว Centrifuge ที่ 3500 rpm นาน 10 นาที

1.14 เก็บ supernatant

2. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเชื้อไวรัส CTV โดยวิธี indirect ELISAซึ่งดัดแปลงมาจาก Clark and Adam (1977)

2.1 เจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ CTV ด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1-2 มกต่อมล.

2.2 หยอดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางแล้วปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุมลงใน plate

2.3 นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปบ่มในตู้บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 เทโมโนโคลนอลแอนติบอดีทิ้ง แล้วล้าง plate 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที ด้วย washing buffer (PBS-T)

2.5 เติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ 200 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เคลือบไว้ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตัวอย่าง ละ 2 หลุม (การเตรียมตัวอย่างทำโดยบดเส้นใบหรือเปลือกสีเขียว ที่ลอกออกจากกิ่งส้มหนัก 0.5 กรัมใน extraction 4.5 มล. โดยใช้ครกบดจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางหรือนำไปปั่นที่แรง 7000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อขจัดเศษชิ้นส่วน ของพืช ของเหลวที่ได้ใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจ หาไวรัส)

2.6 นำตัวอย่างบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน

2.7 เทตัวอย่างทิ้งแล้วล้าง plate 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที ด้วย washing buffer (PBS-T)

2.8 เติม enzyme – antibody conjugate ที่เจือจาง 1:4000 ด้วย conjugate buffer ลงในหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

2.9 ล้าง plate 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที ด้วย washing buffer (PBS-T) เพื่อขจัด enzyme-antibody ส่วนเกิน

2.10 เติม substrate ซึ่งเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ความเข้มข้น 1 มกต่อมล. ของ substrate buffer แล้วบ่มจนเกิดปฏิกิริยาโดยมีสีเหลืองเกิดขึ้น(ใช้ alkaline phosphatase และ p-nitrophenylphosphate) โดยปกติประมาณ 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 37 องศาเซลเซียส

2.11 จากนั้นอ่านค่าความเข้มของสีด้วยเครื่อง ELISA reader โดยใช้คลื่นแสง 405 นาโนเมตร อาจหยุดปฏิกิริยาก่อนทำการอ่านโดยเติม reaction stopping solution

2.12 อ่านค่าความเข้มของสีบันทึกผลลงในแผ่นบันทึกผล

3. การเชื่อมเซลล์ซึ่งดัดแปลงมาจาก (Linddell and Cryer, 1991)

3.1 นำเซลล์ม้ามของหนูขาวมาผสมกับเซลล์มัยอิโลมา P3X ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2 เติมสารละลาย polyethylene glycol (PEG) 1 มิลลิลตร ใช้นิ้วตีก้นหลอดให้เซลล์ผสมกับ PEG เป็นเวลา 1 นาที

3.3 ค่อยๆ เติม RPMI ปริมาตร 39 มิลลิลิตร ลงข้างหลอดช้าๆ บ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4 ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ผสมด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.5 กระจายเซลล์ใน HAT medium (RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, เม็ดเลือดแดง 0.5%, hypoxanthine, aminopterin และ thymidine)

3.6 ดูดใส่ microculture plate 30 ถาด (96 หลุมต่อถาด) บ่มใน CO_2 incubator ประมาณ 10-12 วัน

3.7 ตรวจดูการเติบโตของเซลล์ในหลุมต่างๆ ภายใต้กล้อง inverted microscope

3.8 คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน

4. การคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ด้วยวิธี Dot blot โดยวิธีการดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล (2548)

4.1 หยดแอนติเจนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตรต่อหยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อ Mab เท่านั้น อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.2 แช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk 0.1% triton X 100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงหลัง

4.3 ล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน GAM-AP เจือจาง 1:1500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4 ล้างด้วย PBS แล้วบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

5. การคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ด้วยวิธี Western blot โดยวิธีการดัดแปลงจาก Sithigorngul *et al*., 2002

5.1 นำ CTV บริสุทธิ์, น้ำคั้นจากพืชที่ติดเชื้อ CTV, น้ำคั้นจากพืชปกติ และน้ำ มาแยกใน 15% SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลล์

5.2 นำเจลที่ได้มาย้ายแถบโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transport apparatus (BiORad) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.3 นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไป แช่ใน 5% blotto ตัดแบ่งลงใน microculture plate ที่มี 1% blotto นำไปบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุม ที่ให้ผล dot blot เป็นบวกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

5.4 ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 3 ชั่วโมง ใน GAM-HRP ที่เจือจาง 1:1500 ใน 1% blotto

5.5 ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสาร ละลายผสม 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบกับผลของโพลีโคลนอลแอนติบอดี

6. วิธีการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (Roistacher, 1991)

6.1 บดเส้นกลางใบหรือเปลือกซึ่งลอกจากกิ่งของตัวอย่างส้มในบัฟเฟอร์(coating buffer) ในอัตรา 1:10 ด้วยครกบดจนได้น้ำคั้น (sap extract) นำน้ำคั้นไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

6.2 ใส่น้ำคั้นลงในหลุม (Polystyrene ELISA plate) ตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง (หรือหนึ่งคืน)

6.3 เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำคั้นทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

6.4 ใส่แอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัส (ผลิตโดย DSMZ ประเทศเยอรมันนี) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ให้มีระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบัพเฟอร์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มแอนติเซรัมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง

6.5 เมื่อครบกำหนดเวลาเทแอนติเซรัมทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

6.6 ใส่เอ็นไซม์ (Goat antirabbit conjugate with alkaline phosphatase, ZYMED) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ในอัตรา 1:4,000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6.7 เมื่อครบกำหนดเวลาเทเอ็นไซม์ทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

6.8 ใส่ substrate (p – nitrophenyl phosphate, ZYMED) ซึ่งละลายด้วยบัฟเฟอร์ (substrate buffer) ในอัตราความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบัฟเฟอร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ (stopping reagent) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ก่อนนำปฏิกิริยา ELISA ไปดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (OD405) ด้วยเครื่อง ELISA Reader