การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ในระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antibody Production for Watermelon silver mottle virus (WSMoV) in the Bacterial Cell System

กาญจนา วาระวิชะนี แสนชัย คำหล้า

กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจตัวอย่างในแปลงปลูกพื้นภาคตะวันออกเฉียงรวม 2 จังหวัด ได้แก่ จ.นครราชสีมา และ จ.ขอนแก่น ได้ตัวอย่างใบและผลแตงโมจำนวนรวม 30 ตัวอย่าง จากลักษณะอาการเนื้อใบไหม้เนื้อเยื่อผลแผลที่นูนไหม้ดำ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม และพบแมลงศัตรูพืชและเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสดังกล่าวจากแปลงปลูกที่ทำการสำรวจ จากผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Agdia) ตรวจพบเพียง 5 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ทั้ง 5 ตัวอย่างแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp จากคู่ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากส่วน nucleocapsid protein เท่านั้น ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องออกแบบไพร์เมอร์คู่ใหม่จากส่วนยีน nonstructural protein เพื่อใช้เป็นทางเลือกในขั้นตอนการผลิตโปรตีนที่เป็นแอนติเจนสำหรับนำไปผลิตแอนติบอดีต่อไป

คำหลัก : แตงโม, *Watermelon Silver mottle virus* (WSMoV), Double Antibody-sandwich Enzyme-linked Immunosorbent (DAS-ELISA), RT-PCR

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-02-60

คำนำ

ทอสโพไวรัส (Tospovirus) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก และมีพืชอาศัยที่กว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับ และพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) ซึ่งพืชในตระกูลแตงเองก็พบกับปัญหาโรคไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) เช่นกัน สำหรับประเทศไทยมีข้อมูลรายงานว่าตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและทำความเสียหายกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน และแตงโมลูกผสมเพื่อการส่งออกในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ และราชบุรี ลักษณะอาการที่พบผิวผลจะเป็นสะเก็ดแผลสีดำเงาทั่วไปทั้งผล ทำให้ผลมีขนาดเล็กลงทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ได้ไม่มีคุณภาพเท่าทีควร ซึ่งสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก และทอสโพไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในด้านการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ Ie (1970) เคยมีรายงานไว้ว่า Tomato spotted wilt virus (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด cineraria ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตรวจสอบหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิคทางด้านอินโมโนวิทยาเป็นที่นิยม เพราะนอกจากมีความแม่นยำในการตรวจสอบแล้ว ยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้มากในแต่ละครั้งการตรวจสอบ แต่มีปัญหาเรื่องต้นทุนของแอนติบอดีที่ต้องซื้อจากบริษัทการค้าซึ่งราคาค่อนข้างแพงมาก ดังนั้น นักวิจัยพยายามผลิตแอนติบอดีเพื่อลดต้นทุนและนำมาพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบด้านอิมโมโนวิทยาในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส WSMoV ที่อาจจะติดไปได้กับเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - โกร่งบดตัวอย่าง
    - หลอดไมโครทิวป์ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
    - ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียล
    - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
    - เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
    - ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
    - เครื่อง Thermal cycler
    - เครื่อง Gel electrophoresis
    - เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

3. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific)
- เอ็นไซม์ SuperscripIIIRT/platinum Taqmix (Invitrogen)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Agarose gel (SeaKem)
- ชุดสกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)
- ชุดสกัด Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany)
- DNA Purification System (Promega, USA),
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)
- Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen,USA),
- เอ็นไซม์ One step RT-PCR (Invitrogen,USA)
- β-mercaptoethanol (Sigma, USA)
- สารปฏิชีวนะ
- ชุดไพรเมอร์
- GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega,USA), pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen,USA)
- T4 DNA Ligase (Promega,USA)
- competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen,USA)
- ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตง จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) และจากเอกสารที่เคยได้รายงานไว้ เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกสำคัญในประเทศไทย ได้แก่ จ.พิจิต จ.พิษณุโลก จ.ขอนแก่น จ.นครพนม จ.สกลนคร และจ.นครราชสีมา และทำการบันทึกข้อมูลสำคัญระหว่างการสำรวจได้แก่ เช่น พิกัดพื้นที่ สถานที่ปลูก อายุพืช ลักษณะอาการที่พบ ศัตรูพืชที่พบในระหว่างการสำรวจ จำนวนตัวอย่างที่สำรวจได้ ถ่ายภาพลักษณะแปลงปลูกและลักษณะอาการที่พบระหว่างการสำรวจ วันที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

3. ทำการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสสาเหตุด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาแบบ DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia (ดำเนินการปี 2560-2561) โดยการเตรียม capture antibody ที่ความเข้มข้น 1 : 200 เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศา

เซลเซียส ข้ามคืน ล้างด้วย 1X PBST แล้วทำการบดตัวอย่างใบพืชด้วย general extract buffer ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตรเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม enzyme conjugate ที่ความเข้มข้น 1 : 200 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่ละลาย PNP solution ที่ความเข้มข้น 1X (ในอัตราส่วน 1 เม็ดต่อ 5 มิลลิลิตร) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที และตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (รุ่น GO Multiskan, Thermo Scientific) เพื่อเลือกตัวอย่างไปทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

4. แยกสกัดสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) โดยชั่งตัวอย่างใบพืชที่ทดสอบให้ได้น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดเติมสารละลาย buffer1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี Proteinase K ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม buffer2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ เติม buffer3 ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย (volume) แล้วดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด RNeasy Mini column นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างด้วย W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

4. เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส WSMoV จาก GenBank จาก segment S RNA ได้แก่ ACCESSION : AY864852, KM242056, JX177645 และ NC_003843 จาก segment M RNA ได้แก่ ACCESSION : DQ157768, JX177646 และ NC_003841 และ จาก segment L RNA ได้แก่ ACCESSION : JX177647, NC_003832 นำมาเข้า Clustal Omega programs (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) เพื่อเลือกหาส่วนยีนที่สนใจศึกษา และนำไปใช้เลือกหาตำแหน่งไพร์เมอร์ด้วย Primer3 programs (http://simgene.com/Primer3) แล้วนำมาเข้า BLASTN programs (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อหาความจำเพาะของไพร์เมอร์ และตรวจสอบคุณสมบัติด้วย Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator(http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) เพื่อให้ได้คู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมอย่างน้อย 1 คู่ สำหรับทดสอบต่อด้วยเทคนิค RT-PCR ในไตรมาส 4 ต่อไป

5.ทำการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้มาใช้เป็นส่วนประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitogen) ให้ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ต่อ 1 ปฏิกิริยารวม ประกอบด้วย น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O) จำนวน 17.0 ไมโครลิตรม 10x buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร MgCl2 (25 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร dNTP (10 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร SuperscriplIIRT/platinum

Taqmix จำนวน 0.5 ไมโครลิตร (,0.1 unit/µl) และอาร์เอ็นเอต้นแบบจำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler)

6. ตรวจสอบผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เตรียมในสารละลาย 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System และบันทึกภาพ

7. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลองเพื่อเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559-กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคพืชของแตงโมพบการระบาดและทำความเสียหายกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน และแตงโมลูกผสมเพื่อการส่งออกส่วนใหญ่อยู่แถบภาคตะวันออกเฉียง ซึ่งสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก

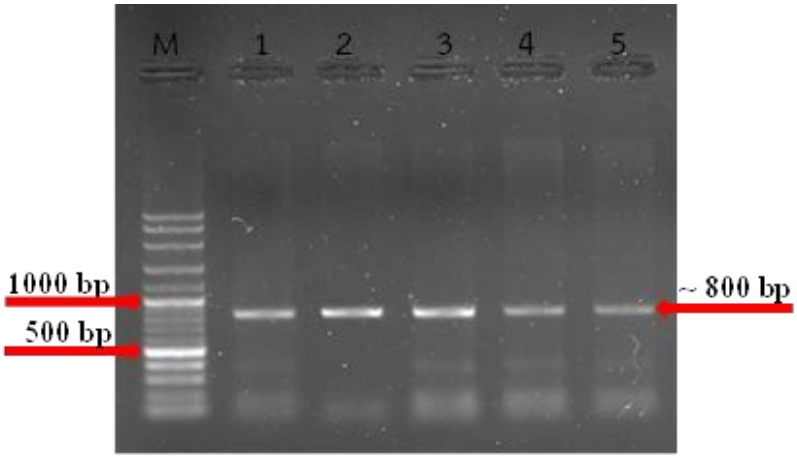
2. เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จาก segment S RNA ได้แก่ ACCESSION : AY864852, KM242056, JX177645 มาเป็นตัวแทนเชื้อไวรัส WSMoV สำหรับการออกแบบไพร์เมอร์ หลังจากนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเข้า Clustal Omega programs สามารถเลือกยีนเป้าหมายที่สามารถแปลรหัสเบสเป็นโปรตีนได้จำนวนรวม 2 ยีน ได้แก่ nonstructural protein และ nucleocapsid protein และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาเข้า Primer3 programs เพื่อเลือกตำแหน่งไพร์เมอร์ หลังจากนั้นหาความจำเพาะของไพร์เมอร์ด้วย BLASTN programs และตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมด้วย Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator สรุปปี 2560 ได้คู่ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ สำหรับทดสอบความเหมาะสมต่อด้วยเทคนิค RT-PCR ในไตรมาส 4 ต่อไป

3. จากการสำรวจตัวอย่างในแปลงปลูกพื้นภาคตะวันออกเฉียงรวม 2 จังหวัด ได้แก่ จ.นครราชสีมา และ จ.ขอนแก่น (ภาพที่ 1) ได้ตัวอย่างใบและผลแตงโมจำนวน 30 ตัวอย่าง จากลักษณะอาการเนื้อใบไหม้เนื้อเยื่อผลแผลที่นูนไหม้ดำ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Agdia) และพบแมลงศัตรูพืชและเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสดังกล่าวจากแปลงปลูกที่ทำการสำรวจ

4. ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Agdia) จากตัวอย่างได้ตัวอย่างใบและผลแตงโมรวมทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบเพียง 5 ตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบผลด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไปเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบในไตรมาส 4 ต่อไป

5. ปี 2560 จากผลการตรวจสอบจาก 5 ตัวอย่างที่ได้ตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Agdia) แล้ว นำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบแล้วจำนวน 2 คู่ จากส่วนยีน nonstructural protein และ nucleocapsid protein พบว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากส่วน nucleocapsid protein สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp (ภาพที่ 2) ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) เพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์จากยีน nonstructural protein คู่ใหม่ เพื่อใช้เป็นทางเลือกในขั้นตอนการผลิตโปรตีนที่เป็นแอนติเจนสำหรับนำไปผลิตแอนติบอดีต่อไป

ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างแปลงปลูกแตงโมที่สำรวจและเก็บตัวอย่างจาก จ.ขอนแก่น



ภาพที่ 2 แสดงผลการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างแตงโมจำนวน 5 ตัวอย่างจาก จ.ขอนแก่น จากส่วน nucleocapsid gene ของเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค RT-PCR

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentas)

ช่องเจลที่ 1-5 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp จากคู่ไพร์เมอร์ที่ถูกออกแบบจากส่วนยีน nucleocapsid protein

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ACCESSION : AY864852, KM242056, JX177645 เป็นตัวแทนเชื้อไวรัส WSMoV จากส่วน segment S RNA ได้จำนวนรวม 2 ยีน ได้แก่ nonstructural protein และ nucleocapsid protein เนื่องจากเป็นยีนที่สามารถแปลรหัสเบสเป็นโปรตีนเพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์ สรุปผล ปี 2560 ได้ไพร์เมอร์ยีนละ 1คู่ รวมจำนวน 2 คู่ เพื่อใช้ทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

จากการสำรวจตัวอย่างในแปลงปลูกพื้นภาคตะวันออกเฉียงรวม 2 จังหวัด ได้แก่ จ.นครราชสีมา และ จ.ขอนแก่น ได้ตัวอย่างใบและผลแตงโมจำนวนรวม 30 ตัวอย่าง จากลักษณะอาการเนื้อใบไหม้เนื้อเยื่อผลแผลที่นูนไหม้ดำ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม และพบแมลงศัตรูพืชและเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสดังกล่าวจากแปลงปลูกที่ทำการสำรวจ ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Agdia) จากตัวอย่างได้ตัวอย่างใบและผลแตงโมรวมทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ตรวจพบเพียง 5 ตัวอย่าง จึงนำไปสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบผลด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากส่วนยีน nonstructural protein และ nucleocapsid protein พบว่า คู่ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากส่วน nucleocapsid protein เท่านั้นที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องออกแบบไพร์เมอร์คู่ใหม่จากส่วนยีน nonstructural protein เพื่อใช้เป็นทางเลือกในขั้นตอนการผลิตโปรตีนที่เป็นแอนติเจนสำหรับนำไปผลิตแอนติบอดีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ie, T.S. 1970. *Tomato Spotted wilt Virus*. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Deseription No. 39. 4 p.

Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.