การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 causing pineapple wilt disease by bacterial cell system

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ศรีเมฆ ชาวโพงพาง เยาวภา ตันติวานิช

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ Lumi_PMWaV2F (5' CACCGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3') และ Lumi_PMWaV2R (5' CCCTGAAAC AGCTCCCTG GTTCAGCT 3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 909 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pCR®8/GW/TOPO® , Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 909 คู่เบส หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 เข้าสู่ protein expression vector (pET160/GW/D-TOPO® , Invitrogen) ซึ่งมีขนาด 5.8 กิโลเบส และ transform เข้า *E. coli* Top 10 ตรวจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส คัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปผ่าน Ni-NTA column แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือด 6 ครั้ง ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า Polysorp plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด แต่ให้ปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านผลยาก แอนติซีรัมที่ผลิตได้อาจเหมาะนำไปใช้ในการตรวจหาไวรัสโดยวิธี Immunosorbent electron microscopy มากกว่าวิธี ELISA

รหัสการทดลอง 09 01 49 02 03 04 10 51

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปี จนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple) พบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2546; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547) นอกจากนี้เริ่มพบการเข้าทำลายของโรคนี้ในเขตจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานแปรรูปของภาคตะวันออก พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือพันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด เพราะนอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์ คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย

ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al*., 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

วิธีการที่สามารถใช้จำแนกไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 คือ วิธีอิมมูโนวิทยา (Immunology) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether & Hu, 2002) และวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละชนิด (Beardsley, 1993; Hu *et al*., 1996) ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดเป็นจำนวนมาก และในฮาวายมีรายงานว่า สับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยว เมื่อได้รับเชื้อไวรัส PMWaV-2 และไม่แสดงอาการของโรคถ้าได้รับเชื้อ PMWaV-1 เพียงชนิดเดียว แต่ถ้าได้รับเชื้อทั้งสองชนิดสับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยวอย่างรุนแรง ฉะนั้นควรมีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก เพราะเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากปริมาณของคลอสเตอโรไวรัสในพืชมีน้อย ทำให้ประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังไม่ดีที่สุด ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่างๆในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากได้ และมีความบริสุทธิ์สูง จึงเป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองต่อไป

Druka และคณะ (1996) รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นของ coat protein ยีน จากสายพันธุ์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteins จากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มรูปทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM ต่อมา Cerovska และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีจากยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (ยีน CP) ของเชื้อ *Potato mop-top virus* (PMTV) โดยโคลนชิ้นของยีน CP เข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส PMTVได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA หรือ Osmar และคณะ (2004) ได้นำยีน CP ของเชื้อ *Apple stem grooving virus* (ASGV) มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RT-PCR นำไปโคลนใน vector ตรวจหาลำดับเบส และ โคลนเข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส ASGV ได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และ

นำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค ฉะนั้นควรพัฒนาวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-2 โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ การโคลนยีน และนำมาเพิ่มปริมาณโปรตีนของเชื้อในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่าย เพื่อให้ได้แอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-2
2. ไพรเมอร์
3. พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
5. กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค(cp gene) ของเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยวสับปะรด ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ PMWaV-2 ได้แก่

Lumi_PMWaV2F 5' CACCGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3'

Lumi_PMWaV2R 5' CCCTGAAACAGCTCCCTGGTTCAGCT 3'

เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

1.2 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อ

โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบสับปะรดที่มีอาการของโรค ประมาณ 0.1 กรัม บดในโกร่งที่เย็นโดยการเติมไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนสเตนเลสที่ผ่านเผาด้วยเปลวไฟ ตักผงละเอียดที่บดไว้ ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม buffer RLT ที่เติม beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยและนำหลอดไปแช่ที่ 56 °ซ นาน 1-3 นาที จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAshredder spin column (สีม่วง) นำ column ซ้อนบนหลอดขนาด 2

มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที น้ำไสจะผ่าน column ลงในหลอดที่รองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ส่วนเศษชิ้นส่วนพืชติดอยู่ด้านบนcolumn

3. เติม absolute ethanol ในหลอดที่รองรับน้ำใส ปริมาตร 0.5 เท่า (225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นลง

4. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) และวางซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 12,00 รอบ/นาที นาน 15 วินาที

5. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วเติมสารละลาย RW1 ลงใน column ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,00 รอบ/นาที 15 วินาที

6. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วล้าง column ด้วย RPE 500 ไมโครลิตร โดยการหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

7. ย้าย column ซ้อนบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ (RNase-free water) 50 ไมโครลิตร ใน column เพื่อชะล้าง RNAจาก column รอประมาณ 1 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที อาร์เอ็นเอ ที่ได้ละลายในน้ำผ่าน column และถูกเก็บไว้ในหลอดรองรับ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 °ซ

1.3 การเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR และการโคลนยีน

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) เพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์

Lumi_PMWaV2F 5' CACCGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3'

Lumi_PMWaV2R 5' CCCTGAAACAGCTCCCTGGTTCAGCT 3'

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RNase free water	15.0	ไมโครลิตร
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0	ไมโครลิตร
dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2F (20 uM)	0.5	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2R (20 uM)	0.5	ไมโครลิตร
QIAGEN OneStep RT-PCR enz. Mix	1.0	ไมโครลิตร
RNA template	2.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

50 ° ซ 30 นาที
94° ซ 15 นาที (activated hot start *Taq* DNA pol, deactivated reverse)
Denature 94 ° ซ 45 วินาที
Annealing 58 ° ซ 45 วินาที } 30 รอบ
Extension 72 ° ซ 45 วินาที
Final extension 72° ซ 5 นาที

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4 การต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

นำ PCR product 2 ไมโครลิตร ผสมกับ โคลนนิ่งเวคเตอร์ pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว / ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นดูดมา 3 ไมโครลิตรใส่ในหลอดของ One Shot® cell แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติมอาหาร SOC ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37°C นาน 30 นาที ดูดมา 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 ° ซ ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด และการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 150 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) 150 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมา

เติมด้วย หนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที

นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R และใช้ Deep Vent DNA Polymerase (Proof reading) แทน *Taq* Polymerase เพื่อให้ได้ PCR Product ที่เป็น blunt ends โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2F (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2R (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Deep Vent DNA Polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Buffer	1.0	ไมโครลิตร
template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	19.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตาม program ดังนี้

94° ซ	5	นาที	
Denature 94° ซ	1	นาที	30 รอบ
Annealing 58 ° ซ	1	นาที	
Extension 72 ° ซ	1	นาที	
Final extension 72° ซ	5	นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.6 การ subclone เข้าสู่ protein expression vector

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ1.5 นำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายเข้าสู่ (transformation)เข้า *E. coli* Top 10 โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือก

โคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ (ขั้นตอนเหมือนข้อ 1.5) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *cp* ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นแล้วเติม 2xSDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β-Mercaptoethanol) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *cp* หลังจากลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B : 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM Tris-HCl (MW.=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (4 °ซ) เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย

buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวนปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1สัปดาห์ อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง ริน ส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS + 0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1: 10 ถึง 1:1,000,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ทีค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรด โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำโคนใบที่มีสีขาวของสับปะรดที่เป็นโรคและใบปกติ มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10 , 15 มิลลิลิตร หยอดน้ำคั้นพืชลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย

PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader) โดยมีการเปรียบเทียบชนิดของเพลท 2 ชนิด ได้แก่ polysorp microplate ของ Nunc และ ELI/RIA Plate ขอ งCostar

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2551 - กันยายน 2553
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

ปริมาณอาร์เอ็นเอของใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-2 ที่ได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 909 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 1)

การตรวจสอบโคลนต่างๆของพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (909 คู่เบส) โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 (ภาพที่ 2)

หลังจาก subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 5.8 กิโลเบส) (ภาพที่ 3) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส (ภาพที่ 4) ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดเมื่อปล่อยให้เกิดการชักนำข้ามคืน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันทุก fraction และ พบว่า โปรตีนสามารถผ่าน column Ni-NTP ได้น้อยมาก จึงได้นำโคลนมา purify และส่งไปตรวจสอบลำดับเบสอีกครั้งหนึ่ง ผลการตรวจสอบลำดับเบสของโคลนที่สังเคราะห์โปรตีนได้ พบว่าลำดับเบสถูกต้อง ขณะนี้กำลังทำการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกชะล้างไปในขั้นตอนของการล้าง column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 41 กิโลดาลตันตั้งแต่ fraction ที่ 3-13 (F3-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F7-F10จึงเก็บน้ำใสของ F4-F11 มารวมกัน และจากการคำนวนหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund’s adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

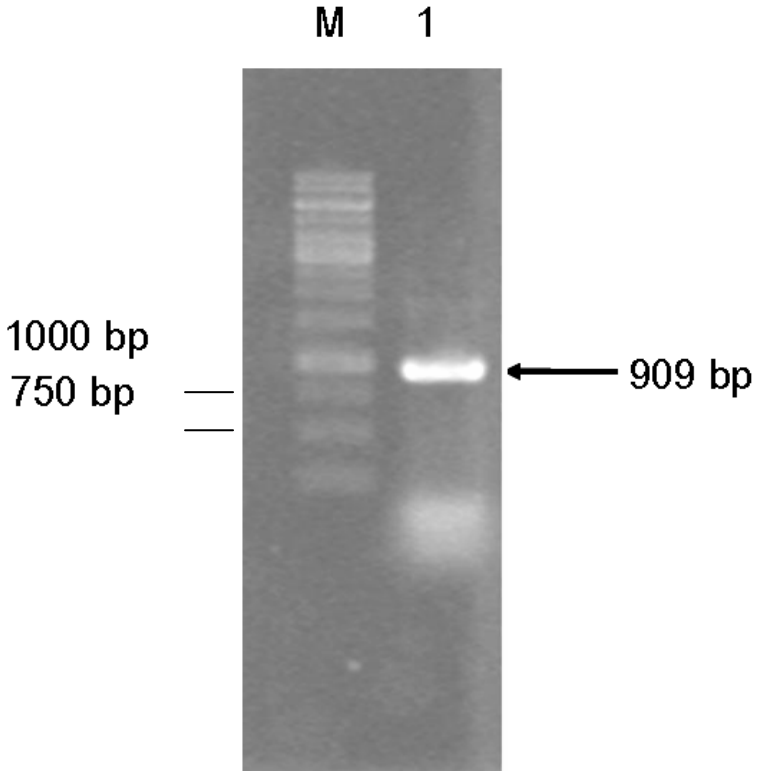
4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80 °ซ ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 6 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 (ภาพที่ 7)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า Polysorp ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีกว่า ELI/RIA Plate ของ Costar ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองทุกหลุม ทำให้ไม่สามารถอ่านผลความแตกต่างระหว่างสับปะรดเป็นโรคและสับปะรดปกติได้ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรด พบว่า เกิดปฏิกิริยาเกิดค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านค่า absorbance ของต้นเป็นโรคได้ต่ำใกล้เคียงกับค่าที่อ่านได้จากต้บปกติ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัส โดยวิธี

Immunosorbent electron microscopy (IEM) โดยนำแอนติซีรัมมาทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคบนกริด แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)



ภาพที่ 1. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

1 = ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส จากสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว

ภาพที่ 2. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (909 bp) ที่เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pCR®8/GW/TOPO®

```
      M  A  Q  N  Y  V  A  V  V  E  G  T  I  L  E  S  L  T  A  P
1     ATGGCTCAGA ATTACGTAGC CGTAGTAGAA GGCACTATTC TCGAAAGTTT GACGGCTCCA
      TACCGAGTCT TAATGCATCG GCATCATCTT CCGTGATAAG AGCTTTCAAA CTGCCGAGGT
      P  K  R  F  R  V  A  T  S  D  V  G  K  Y  Y  D  S  S  K  Y
61    CCTAAACGAT TTAGAGTGGC GACGTCTGAT GTGGGGAAAT ATTACGATAG TAGCAAATAC
      GGATTTGCTA AATCTCACCG CTGCAGACTA CACCCCTTTA TAATGCTATC ATCGTTTATG
      R  S  V  T  G  V  A  T  A  E  R  D  R  L  P  A  I  E  E  T
121   CGCTCTGTAA CGGGCGTAGC TACAGCCGAG AGGGATCGGT TACCAGCGAT AGAGGAAACT
      GCGAGACATT GCCCGCATCG ATGTCGGCTC TCCCTAGCCA ATGGTCGCTA TCTCCTTTGA
      E  L  L  A  T  I  P  T  E  A  S  T  D  K  G  V  I  P  E  T
181   GAACTATTGG CAACAATCCC AACGGAAGCT TCAACAGATA AGGGTGTTAT TCCCGAGACT
      CTTGATAACC GTTGTTAGGG TTGCCTTCGA AGTTGTCTAT TCCCACAATA AGGGCTCTGA
      V  K  R  S  S  N  K  P  E  I  V  D  D  V  S  T  L  L  L  N
241   GTTAAGAGGT CGAGTAATAA ACCAGAAATA GTAGATGATG TATCAACGTT GCTGTTAAAT
      CAATTCTCCA GCTCATTATT TGGTCTTTAT CATCTACTAC ATAGTTGCAA CGACAATTTA
      P  R  K  N  V  V  L  N  I  G  S  V  K  T  V  P  K  V  V  N
301   CCTAGAAAGA ACGTTGTACT AAATATTGGA TCGGTTAAAA CCGTGCCAAA GGTAGTTAAT
      GGATCTTTCT TGCAACATGA TTTATAACCT AGCCAATTTT GGCACGGTTT CCATCAATTA
      Q  P  G  L  I  S  R  E  I  A  I  R  I  G  E  A  L  K  E  H
361   CAGCCGGGTT TGATATCCCG GGAGATTGCT ATCCGTATAG GAGAGGCTCT GAAGGAACAT
      GTCGGCCCAA ACTATAGGGC CCTCTAACGA TAGGCATATC CTCTCCGAGA CTTCCTTGTA
      C  K  Q  V  M  G  S  D  S  S  T  D  L  A  T  Y  F  I  H  L
421   TGCAAACAAG TTATGGGTTC GGATAGTAGT ACGGACTTAG CTACATACTT TATACATTTG
      ACGTTTGTTC AATACCCAAG CCTATCATCA TGCCTGAATC GATGTATGAA ATATGTAAAC
      I  Q  L  A  I  T  F  S  T  S  K  N  S  E  Y  K  E  F  D  Y
481   ATTCAACTCG CTATTACGTT CTCTACATCC AAAAATAGCG AATACAAAGA GTTTGACTAT
      TAAGTTGAGC GATAATGCAA GAGATGTAGG TTTTTATCGC TTATGTTTCT CAAACTGATA
      I  E  T  E  T  Q  K  K  I  Y  I  K  D  V  S  E  V  V  E  R
541   ATAGAAACAG AGACGCAAAA GAAAATATAC ATCAAGGACG TGAGTGAGGT GGTTGAGAGA
      TATCTTTGTC TCTGCGTTTT CTTTTATATG TAGTTCCTGC ACTCACTCCA CCAACTCTCT
      A  A  M  N  S  G  Y  E  N  P  F  R  Q  Y  M  R  Y  F  T  S
601   GCGGCGATGA ATTCGGGGTA CGAAAACCCG TTTAGGCAAT ATATGCGTTA TTTTACAAGC
      CGCCGCTACT TAAGCCCCAT GCTTTTGGGC AAATCCGTTA TATACGCAAT AAAATGTTCG
```

S S I T L T L N G K I T P N E R T M A H

661 TCGAGTATAA CACTAACTTT AAATGGTAAA ATAACACCTA ACGAGAGAAC TATGGCTCAT

AGCTCATATT GTGATTGAAA TTTACCATTT TATTGTGGAT TGCTCTCTTG ATACCGAGTA

H G V P K Q F F A Y T Y D F I D P D Y S

721 CACGGAGTAC CCAAGCAGTT CTTTGCATAT ACTTACGATT TTATTGACCC CGACTATAGC

GTGCCTCATG GGTTCGTCAA GAAACGTATA TGAATGCTAA AATAACTGGG GCTGATATCG

L M N H S A I N A Y N L T R I Q A F K N

781 CTCATGAATC ATTCGGCGAT TAATGCTTAC AACTTAACGA GGATTCAAGC ATTTAAGAAT

GAGTACTTAG TAAGCCGCTA ATTACGAATG TTGAATTGCT CCTAAGTTCG TAAATTCTTA

K I A S V N N T M H N T Y Q L N Q G A V

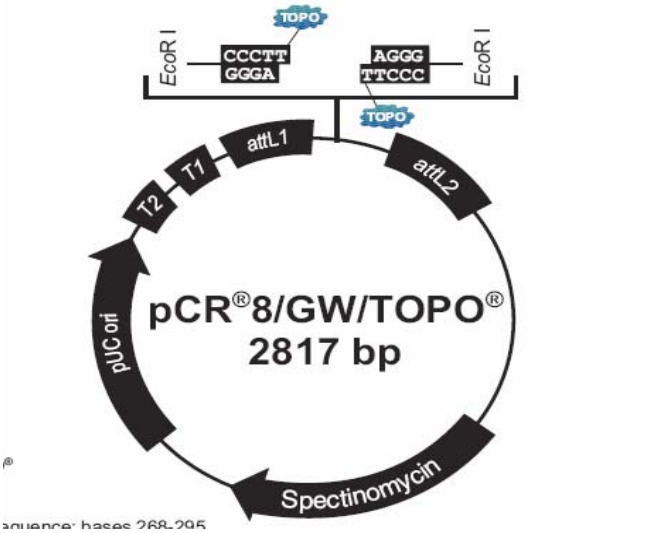
841 AAGATAGCTT CAGTGAACAA TACTATGCAT AACACATACC AGCTGAACCA GGGAGCTGTT

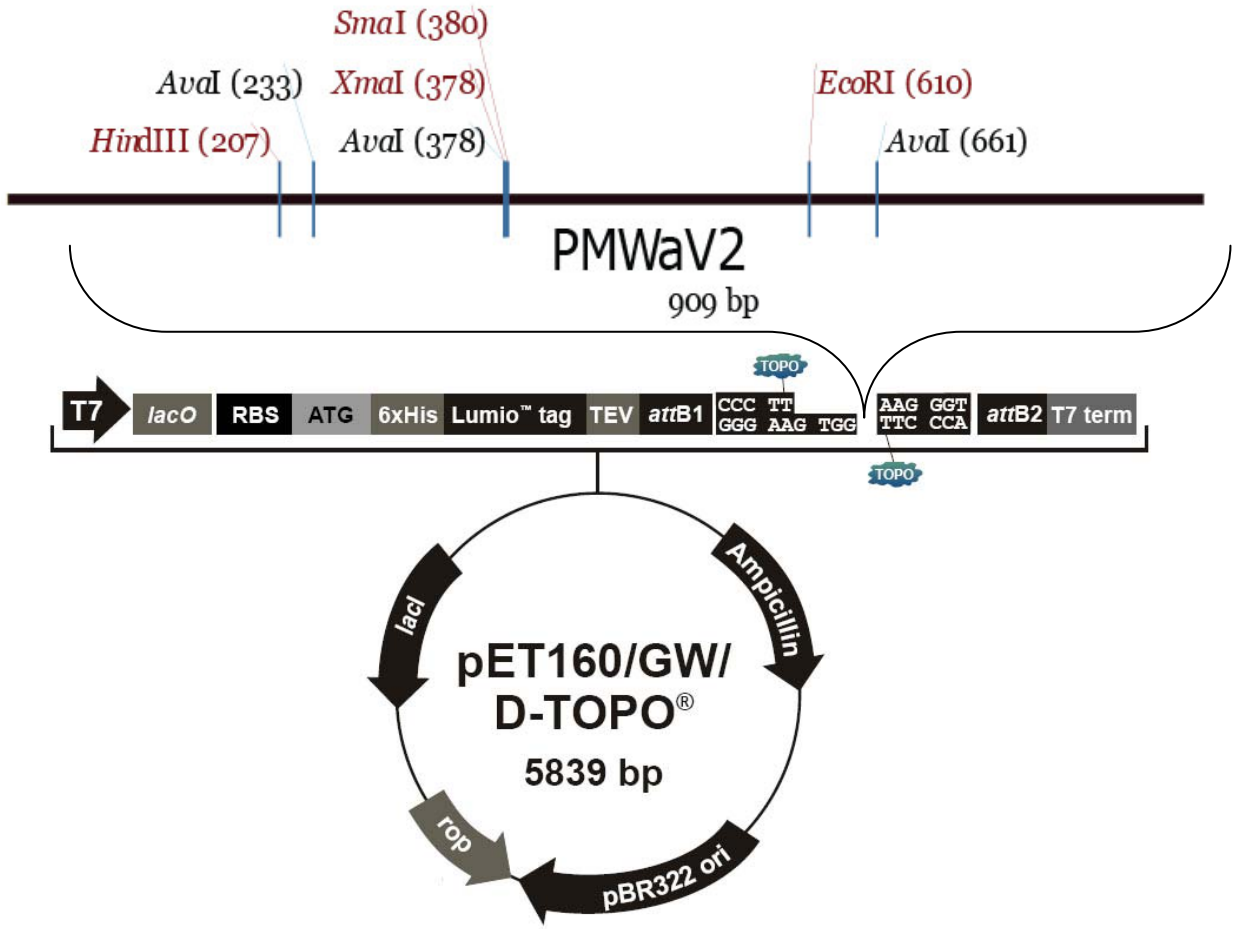
TTCTATCGAA GTCACTTGTT ATGATACGTA TTGTGTATGG TCGACTTGGT CCCTCGACAA

S G *

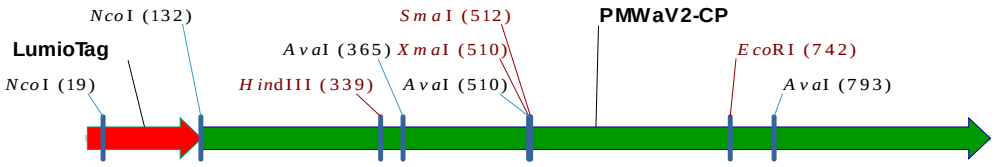
901 TCAGGGTAG

AGTCCCATC





ภาพที่ 3. subcloning ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ขนาด 909 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen)



PWMaV2AF283103+132

1041 bp

NcoI

~~~~~~~~

M H H H H H H G A G G C C P G C C G G G

1 ATGCATCATC ACCATCACCA TGGTGCTGGT GGCTGTTGTC CTGGCTGTTG CGGTGGCGGC

TACGTAGTAG TGGTAGTGGT ACCACGACCA CCGACAACAG GACCGACAAC GCCACCGCCG

E N L Y F Q G I I T S L Y K K A G S A A

61 GAAAACCTGT ATTTTCAGGG AATTATCACA AGTTTGTACA AAAAAGCAGG CTCCGCGGCC

CTTTTGGACA TAAAAGTCCC TTAATAGTGT TCAAACATGT TTTTTCGTCC GAGGCGCCGG

NcoI

~~~~~~

A P F T M A Q N Y V A V V E G T I L E S

121 GCCCCCTTCA CCATGGCTCA GAATTACGTA GCCGTAGTAG AAGGCACTAT TCTCGAAAGT

CGGGGGAAGT GGTACCGAGT CTTAATGCAT CGGCATCATC TTCCGTGATA AGAGCTTTCA

L T A P P K R F R V A T S D V G K Y Y D

181 TTGACGGCTC CACCTAAACG ATTTAGAGTG GCGACGTCTG ATGTGGGGAA ATATTACGAT

AACTGCCGAG GTGGATTTGC TAAATCTCAC CGCTGCAGAC TACACCCCTT TATAATGCTA

S S K Y R S V T G V A T A E R D R L P A

241 AGTAGCAAAT ACCGCTCTGT AACGGGCGTA GCTACAGCCG AGAGGGATCG GTTACCAGCG

TCATCGTTTA TGGCGAGACA TTGCCCGCAT CGATGTCGGC TCTCCCTAGC CAATGGTCGC

HindIII

~~~~~~~~

I E E T E L L A T I P T E A S T D K G V

301 ATAGAGGAAA CTGAACTATT GGCAACAATC CCAACGGAAG CTTCAACAGA TAAGGGTGTT

TATCTCCTTT GACTTGATAA CCGTTGTTAG GGTTGCCTTC GAAGTTGTCT ATTCCCACAA

AvaI

~~~~~~

I P E T V K R S S N K P E I V D D V S T

361 ATTCCCGAGA CTGTTAAGAG GTCGAGTAAT AAACCAGAAA TAGTAGATGA TGTATCAACG

TAAGGGCTCT GACAATTCTC CAGCTCATTA TTTGGTCTTT ATCATCTACT ACATAGTTGC

L L L N P R K N V V L N I G S V K T V P

421 TTGCTGTTAA ATCCTAGAAA GAACGTTGTA CTAAATATTG GATCGGTTAA AACCGTGCCA

AACGACAATT TAGGATCTTT CTTGCAACAT GATTTATAAC CTAGCCAATT TTGGCACGGT

SmaI

~~~~~~~~

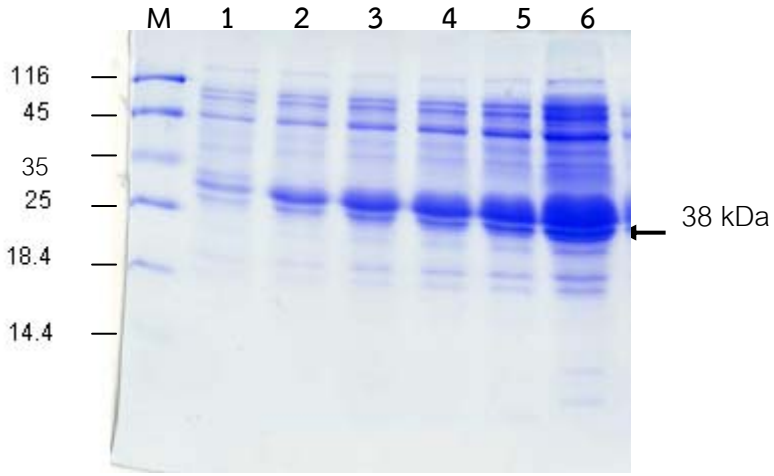
XmaI

~~~~~~~~

AvaI

```
                                ~~~~~~~~
                  K  V  V  N  Q  P  G  L  I  S  R  E  I  A  I  R  I  G  E  A
481   AAGGTAGTTA ATCAGCCGGG TTTGATATCC CGGGAGATTG CTATCCGTAT AGGAGAGGCT
      TTCCATCAAT TAGTCGGCCC AAACTATAGG GCCCTCTAAC GATAGGCATA TCCTCTCCGA
                  L  K  E  H  C  K  Q  V  M  G  S  D  S  S  T  D  L  A  T  Y
541   CTGAAGGAAC ATTGCAAACA AGTTATGGGT TCGGATAGTA GTACGGACTT AGCTACATAC
      GACTTCCTTG TAACGTTTGT TCAATACCCA AGCCTATCAT CATGCCTGAA TCGATGTATG
                  F  I  H  L  I  Q  L  A  I  T  F  S  T  S  K  N  S  E  Y  K
601   TTTATACATT TGATTCAACT CGCTATTACG TTCTCTACAT CCAAAAATAG CGAATACAAA
      AAATATGTAA ACTAAGTTGA GCGATAATGC AAGAGATGTA GGTTTTTATC GCTTATGTTT
                  E  F  D  Y  I  E  T  E  T  Q  K  K  I  Y  I  K  D  V  S  E
661   GAGTTTGACT ATATAGAAAC AGAGACGCAA AAGAAAATAT ACATCAAGGA CGTGAGTGAG
      CTCAAACTGA TATATCTTTG TCTCTGCGTT TTCTTTTATA TGTAGTTCCT GCACTCACTC
                           EcoRI
                           ~~~~~~~
                  V  V  E  R  A  A  M  N  S  G  Y  E  N  P  F  R  Q  Y  M  R
721   GTGGTTGAGA GAGCGGCGAT GAATTCGGGG TACGAAAACC CGTTTAGGCA ATATATGCGT
      CACCAACTCT CTCGCCGCTA CTTAAGCCCC ATGCTTTTGG GCAAATCCGT TATATACGCA
                        AvaI
                        ~~~~~~~
                  Y  F  T  S  S  S  I  T  L  T  L  N  G  K  I  T  P  N  E  R
781   TATTTTACAA GCTCGAGTAT AACACTAACT TTAAATGGTA AAATAACACC TAACGAGAGA
      ATAAAATGTT CGAGCTCATA TTGTGATTGA AATTTACCAT TTTATTGTGG ATTGCTCTCT
                  T  M  A  H  H  G  V  P  K  Q  F  F  A  Y  T  Y  D  F  I  D
841   ACTATGGCTC ATCACGGAGT ACCCAAGCAG TTCTTTGCAT ATACTTACGA TTTTATTGAC
      TGATACCGAG TAGTGCCTCA TGGGTTCGTC AAGAAACGTA TATGAATGCT AAAATAACTG
                  P  D  Y  S  L  M  N  H  S  A  I  N  A  Y  N  L  T  R  I  Q
901   CCCGACTATA GCCTCATGAA TCATTCGGCG ATTAATGCTT ACAACTTAAC GAGGATTCAA
      GGGCTGATAT CGGAGTACTT AGTAAGCCGC TAATTACGAA TGTTGAATTG CTCCTAAGTT
                  A  F  K  N  K  I  A  S  V  N  N  T  M  H  N  T  Y  Q  L  N
961   GCATTTAAGA ATAAGATAGC TTCAGTGAAC AATACTATGC ATAACACATA CCAGCTGAAC
      CGTAAATTCT TATTCTATCG AAGTCACTTG TTATGATACG TATTGTGTAT GGTCGACTTG
                  Q  G  A  V  S  G  *
1021  CAGGGAGCTG TTTCAGGGTA G
      GTCCCTCGAC AAAGTCCCAT C
```

ภาพที่ 4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (909 bp) + Lumio tag 132 bp

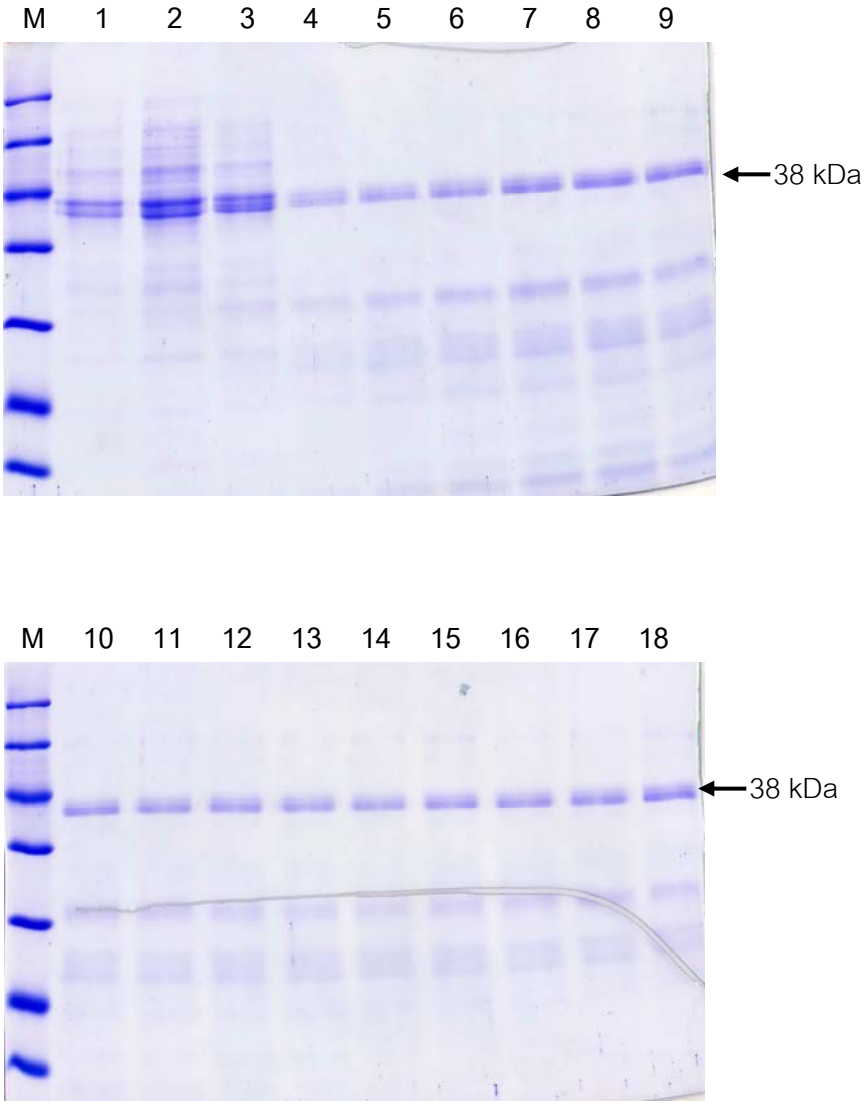


ภาพที่ 5 ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET 160/GW/D-TOPO®-*cp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

2-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังการชักนำ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง

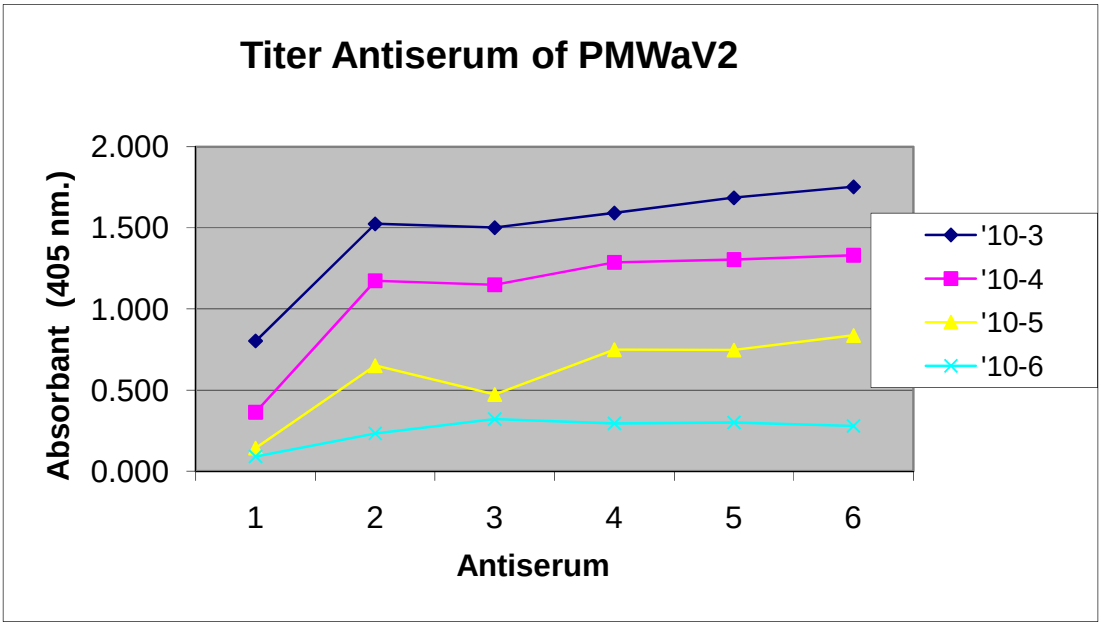


ภาพที่ 6 ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังจากล้าง column ด้วย washing buffer

6-18 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-18 หลังการใช้ eluting buffer



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากการเจาะเลือด 6 ครั้ง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่Lumi_PMWaV2F (5' CACCGCTCA GAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3') และ Lumi_PMWaV2R (5' CCCTGAAACAGCTCCCTG GTTCAGCT 3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 909 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pCR®8/GW/TOPO® , Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep แล้วส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 909 คู่เบส หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 เข้าสู่ protein expression vector (pET160/GW/D-TOPO® , Invitrogen) ซึ่งมีขนาด 5.8 กิโลเบส และ transform เข้า *E. coli* Top 10 ตรวจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนที่หลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏ

ว่า เริ่มพบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันทุก fraction (fraction 1-18) แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 4 - 6 มีไตเตอร์สูงสุด สามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant protein ที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลองได้จนถึง 1:100,000 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างใบสับปะรดโรคเหี่ยว พบว่า เกิดปฏิกิริยาเกิดค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านค่า absorbance ของต้นเป็นโรคได้ต่ำใกล้เคียงกับค่าที่อ่านได้จากต้นปกติ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้ไปใช้ตรวจหาอนุภาคไวรัส โดยวิธี Immunosorbent electron microscopy (IEM) โดยนำแอนติซีรัมมาทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคบนกริด แล้วนำไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช (17) 1-2 : 48-53.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) 334:383-386.

Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato mop-top virus. Journal of Phytopathology* 151 (4) : 195-200.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. 29: 337-348.

Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virology.* 77: 1975-1983.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* . 45: 829-836.

Nickel Osmar, Maria, L.P.N. Targon, Thor V.M. Fajardo, Marcos A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli* : production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29 (5) : 558-562.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology*. 92: 928-935.