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 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 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 ซึ่งพบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า พบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันในทุก fraction และ พบว่า โปรตีนสามารถผ่าน column Ni-NTP ได้น้อยมาก ขณะนี้กำลังทำการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกชะล้างไปในขั้นตอนของการล้าง column

---

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 ปีจนถึงปัจจุบัน 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 ไทยและคิวบา 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 พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยวคือพันธุ์ปัตตาเวีย 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 proteinsจากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี 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 จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้

ตรวจหาไวรัส ASGV ได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค 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 ตักผงละเอียดที่บดไว้ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม buffer RLT ที่เติม beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยและนำหลอดไปแช่ที่ 56 ºซ 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 ºซ

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 º ซ 30 นาที

94º ซ 15 นาที (activated hot start *Taq* DNA pol, deactivated reverse)

Denature 94º ซ	45	วินาที	30 รอบ
Annealing 58 º ซ	45	วินาที	
Extension 72 º ซ	45	วินาที	
Final extension 72º 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 °C ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด และการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยง

ที่ 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 นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วย 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 จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 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

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

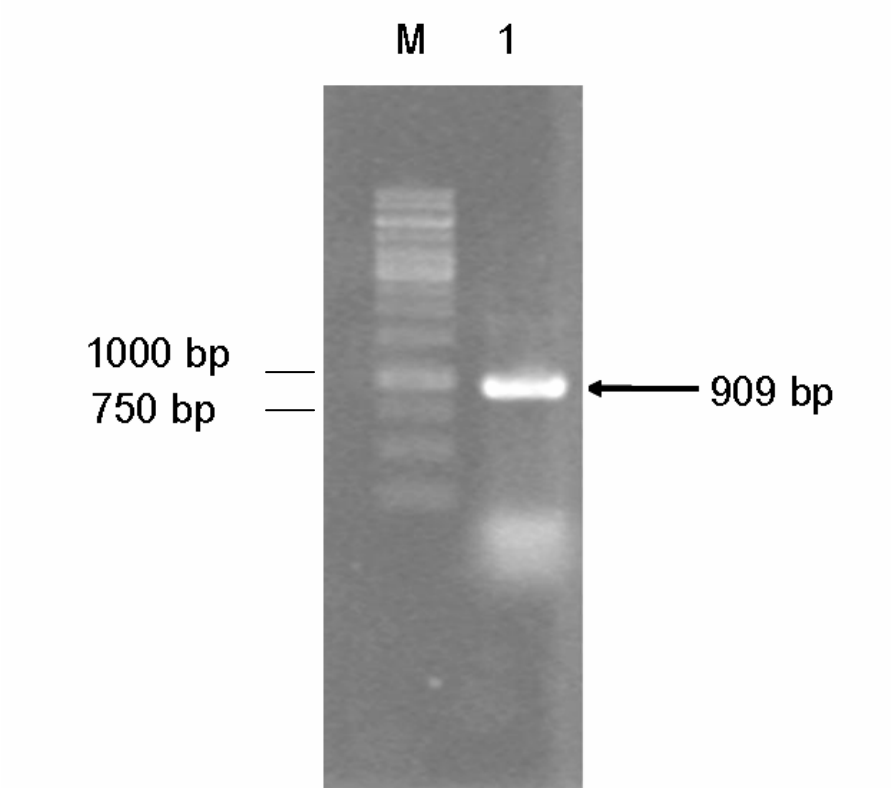
(ขนาด 5.8 กิโลเบส) (ภาพที่ 3) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส (ภาพที่ 4) ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 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



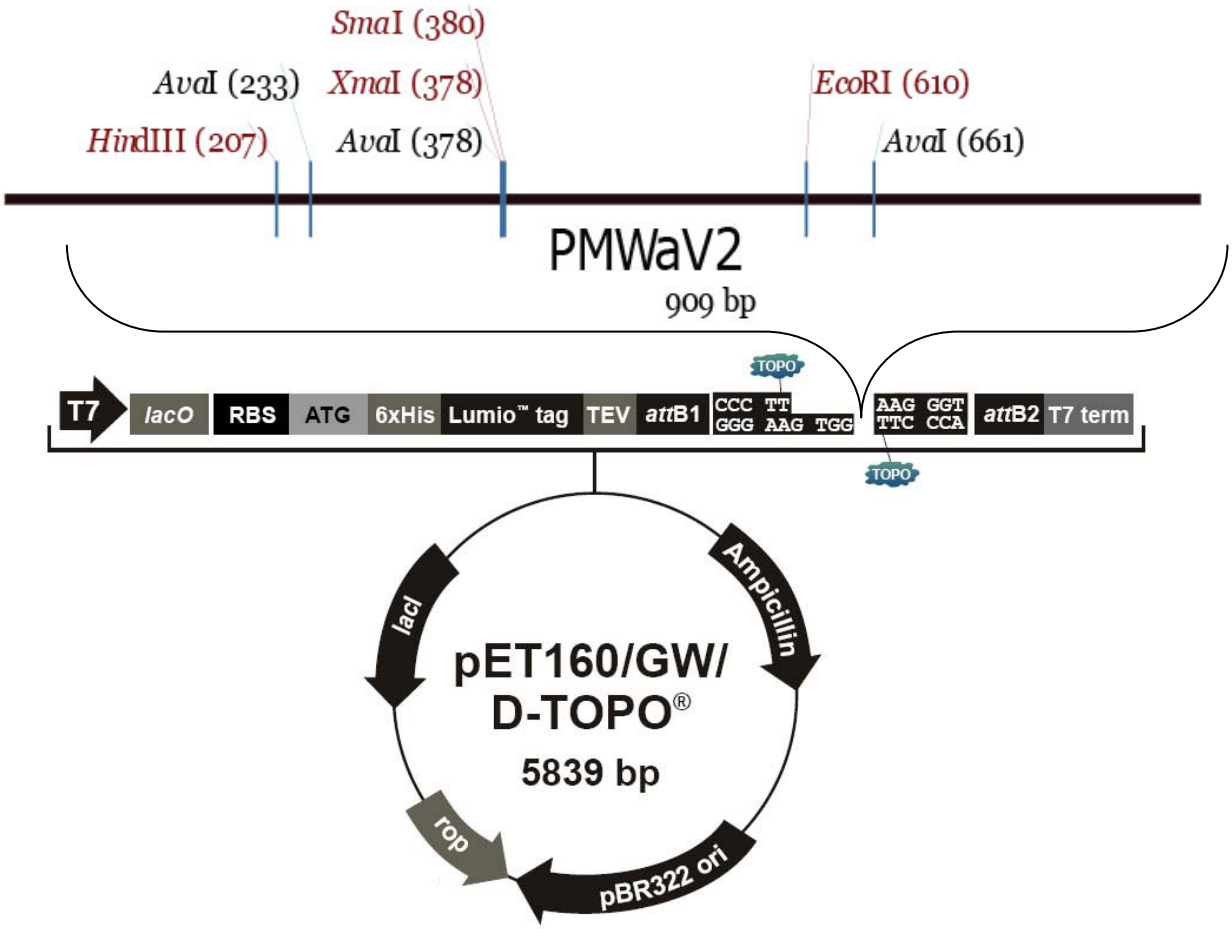
ภาพที่ 1. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

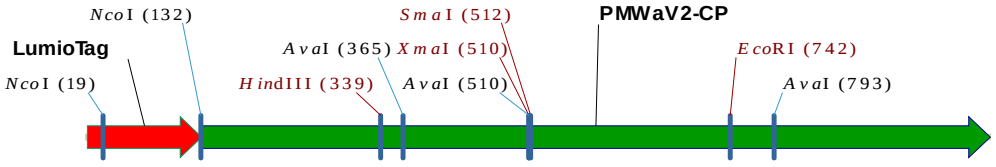
1 = ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส จากสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว

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)

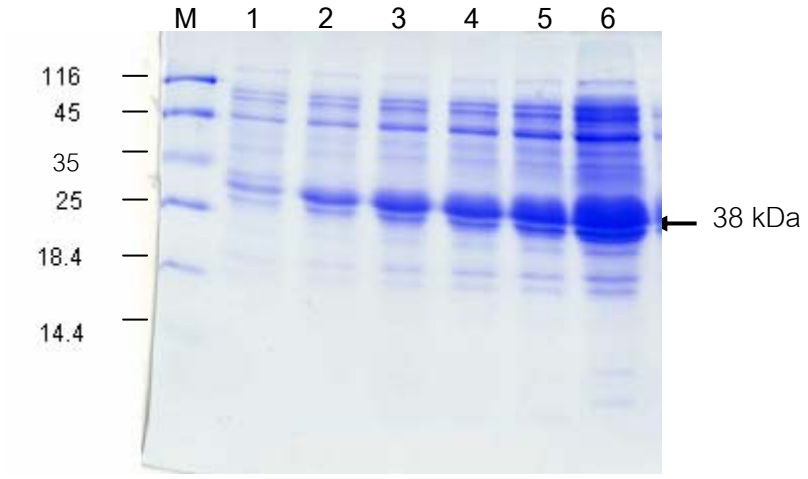


PWMaV2AF283103+132

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

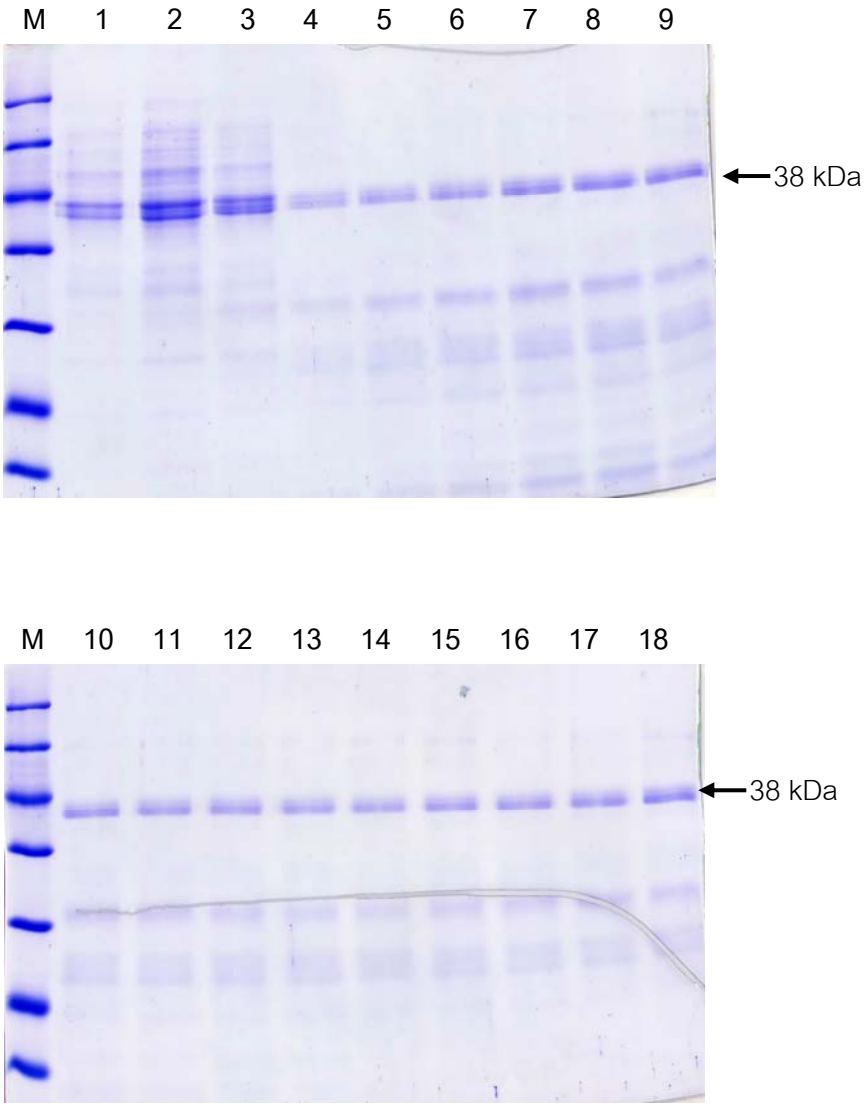


ภาพที่ 5 ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET 160/GW/D-TOPO®-*cp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

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

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

เอกสารอ้างอิง

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

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิขาการ 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.