การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Potato virus* A
Antiserum Production of *Potato virus* A

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] ชลธิชา รักใคร่[1/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2/]
[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *potato virus* A (PVA) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ *Potato virus* A ขนาด 789 คู่เบส (bp) และต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอส่วนของ CP gene ที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี miniprep และส่งไปตรวจสอบหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 789 bp หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP เข้าสู่ protein expression vector (pET 200/D-TOPO) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 และขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL21 ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG)

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-10-54

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปีและปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน จากที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจจึงมีปริมาณมาก ทำให้การตรวจมีปัญหา ล่าช้า ซึ่งเกิดจากปริมาณตัวอย่างมีมาก และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ และควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง รวมทั้งจากต้นที่ปลูกอยู่ในแปลงของเกษตรกร และเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว จึงมีส่วนสำคัญมาก เพื่อเป็นการป้องกันการนำเข้าเชื้อไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาภายในประเทศไทย ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อไวรัสจึง จัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยโรค การจำแนกเชื้อสาเหตุอาจใช้วิธีการทางสรีรวิทยา สัญฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ

สุรภีและคณะ(2533) ใช้วิธีและขั้นตอนการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสของกล้วยไม้และทำการแยกให้ได้ไวรัสที่บริสุทธิ์ นำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพที่ดีแล้วทดลองนำวิธีการตรวจสอบแบบ NCM ELISA มาปรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่รวดเร็ว Gray *et.al.* (2003) สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *at al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ Tsuda *at al.*(1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว

(multi RIPA) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา

เพราะฉะนั้นวิธีการทางเซรุ่มวิทยาจึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อ จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสต่อเชื้อนั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์หรือหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ยีนสังเคราะห์ ในส่วน coat protein gene (CP) ของ Potato virus A
- พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
- อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
- กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
- อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

1.1 สังเคราะห์ดีเอ็นเอและต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

ดำเนินการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ขนาด 789 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นเติม competent cell 50 ไมโครลิตร (*E. coli*, DH5α) แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที อีก 5 นาที เติมอาหาร 2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 °ซ นาน 60 นาที ดูดมา 5 ไมโครลิตร และเทแผ่ (spread) ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °ซ ข้ามคืน

1.2 การสกัดโคลนของพลาสมิด

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 °ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 400 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 3000 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 200 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10

นาที แล้วนาไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนาไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2% ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที แล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลาดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ T7F และ T7R เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีการกลับทิศหรือไม่ จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42 °ซ นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนาการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET 101/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% ของอาหารเขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นามาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 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* หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว 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 NaH2PO4·H2O, 10 mM Tris-HCl (MW=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทาให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง 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 เพื่อนาไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ผ่าน 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 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆ ไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °ซ อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทอร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 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 ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบโรค *Potato virus* A โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำ positive ของ PVA มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10, 15 มิลลิลิตร แล้วหยอดลงในหลุมของไมโครเพลท (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 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จานวน 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) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate ของ Nunc

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2558
สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ได้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ ขนาด 789 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร ทำการตรวจสอบโคลนต่างๆ ของพลาสมิด pET 101/D-TOPO® (Invitrogen ขนาด 5753 bp) หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (789 bp) โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อไวรัส PVA ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนาการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดที่ 8 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 25 กิโลดาลตัน ตั้งแต่ fraction ที่ 2-13 (F2-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F3-F6 และจากการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *potato virus* A (PVA) โดยทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ *Potato virus* A ขนาด 789 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอส่วนของ CP gene ที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี miniprep และส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 789 bp หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP เข้าสู่ protein expression vector (pET 200/D-TOPO) และ transform เข้า E. coli Top 10 และขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ E.

coli BL21 ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทำการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG)

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board. Hochleitner,K. and Kraus, H. (2002) Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Tsuda,S.,Kameya-Iwaki,M.,Hanada,K.,Fujisawa,I. And Tomaru,K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plant Infected with Multiple Viruses Employing Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) with two step Method; Multi RIPA. Annaul Phytopathology