

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : วิจัยการกักกันพืช
กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส Potato virus A
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Antiserum Production of Potato virus A

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ชลธิชา รักใคร่	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

5. บทคัดย่อ

สังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ขนาด 825 คู่เบส (bp) ต่อเชื่อม (ligation) เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) แล้วนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC57 plasmid DNA GenScript คัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพาหะนำมาทำให้บริสุทธิ์ และเชื่อมต่อเข้าสู่ expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen) ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* Top10 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DES 3) ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) ซึ่งที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุดที่มีขนาดประมาณ 27 กิโลดาลตัน ทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE นำโปรตีนที่แยกได้ไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกระต่ายสีขาวพันธุ์ นิวซีแลนด์ไวท์ จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 7 วัน เจาะเลือดเก็บแอนติบอดี 7 ครั้ง และทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA สามารถทำปฏิกิริยาได้สูงสุดที่ 1:204,800

Abstract

Synthesized coat protein gene(CP) of potato virus A about 269 bp ligated into plasmid vector and cloned into pUC57 plasmid DNA Gene Script respectively. Selection of inserted cloned and purification was ligated into expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen) the recombinant plasmid was cloned into *E. coli* competent cell (Top10). The positive clone

was selected and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Induced synthesized protein clone about 27 kilodaton was using isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) at 24 hours which following protein purification by using Ni-NTA column within SDS-PAGE, following promoted vaccination in rabbit by using injected protein into New Zealand white, intramuscular injection 3 times with one week interval. Collected antibody about 7 times and an antibody titration assays by using direct ELISA which reached to 1:204,800

6. 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 สกอตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน จากที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจจึงมีปริมาณมาก ทำให้การตรวจมีปัญหาล่าช้า 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) สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบต่างจากต้นมันฝรั่งจำนวน 1,330 ตัน จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการต่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นต่างๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM

และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่าการเข้าทำลายของเชื้อ 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 ขั้นตอนบนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา

เพราะฉะนั้นวิธีการทางเซรุ่มวิทยาจึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อ จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสต่อเชื้ออื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์หรือหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- 1 ยีนสังเคราะห์ ในส่วน coat protein gene (CP) ของ Potato virus A
- 2 ไพรเมอร์
- 3 พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
- 4 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนนิ่ง
- 5 กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

- วิธีการ

1. การโคลนนิ่งโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

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

ดำเนินการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวกเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติม competent cell 50 ไมโครลิตร (*E. coli*, DH5α) แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 90 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที อีก 5 นาที เติมหาอาหาร

2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 °C นาน 60 นาที ตามมา 5 ไมโครลิตร และเทแผ่ (spread) ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37°C ซ้ำมคืน

1.2 การสกัดโคลนของพลาสมิด

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37°C ซ้ำมคืน 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 แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2% ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ T7F และ T7R เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีการกลับทิศหรือไม่ จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ CaCl₂ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือก

โคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย

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°C 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 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นามาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20°C 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°C) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °C ซ้ำมคืน 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 และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายเหน็ดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (4°C) 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 และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °C จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทออร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C 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°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphatase 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°C 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°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตราร 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอีไลซา (ELISA Reader) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate ของ Nunc

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2558

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ได้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) ดีเอ็นเอสังเคราะห์เข้าสู่ expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), ขนาด 5741 bp การตรวจสอบโคลนต่างๆของพลาสมิด หลังต่อเชื่อมกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP

8.2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ 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 27 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 3)

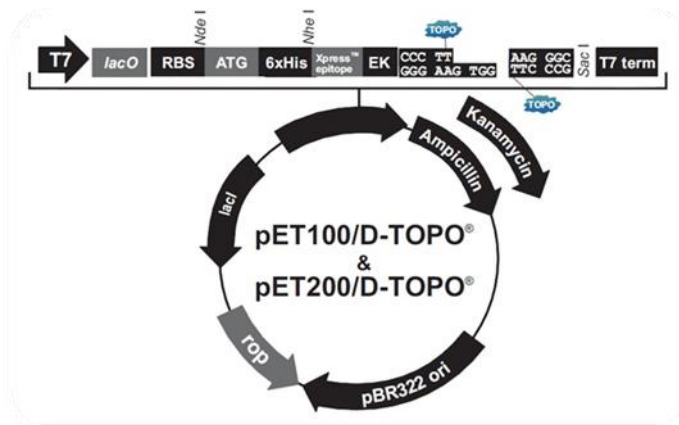
8.3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 27 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

8.4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

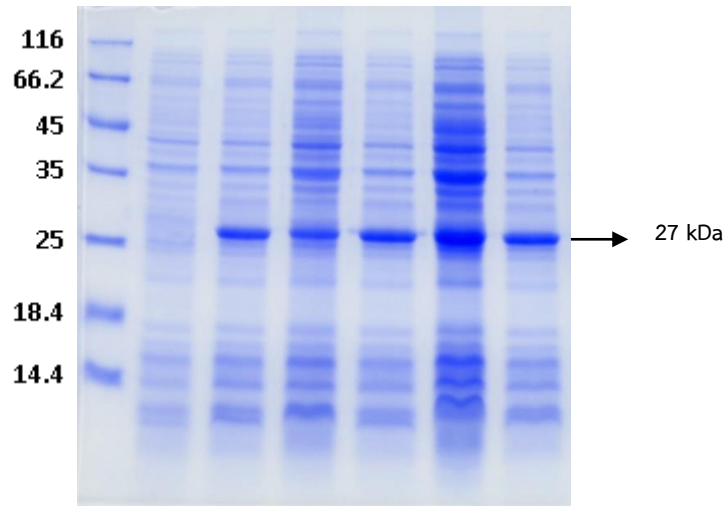
ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80 °C ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 7 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:204,800 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5-7 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:51,200 (ตารางที่ 1) ฉะนั้นเมื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบ ต้องทำให้เจือจาง 1: 500 และ 1: 1,000

ATGGCAGAAACCCCTGGACGCAAGCGAAGCACTGGCGCAGAAAAGCGAAGGTCGTAAGAAAGAACGTGAATCGAATAGCAGCAAAGCAGTCGCGGT
 GAAAGATAAAGACGTTGATCTGGGTACCGCGGGTACGCATAGCGTCCCGCGCCTGAAATCCATGACCAGTAACTGACGCTGCCGATGTGAAAGG
 CAAATCTGTGGTTAATCTGGACCATCTGCTGAGCTATAAACCGAAACAGGTGCATCTGTGCAATGCGCGTGCCACCCACGAACGTTTCAAACCTG
 GTATGATGGCGTGATGGCAAGCTACGAACTGGAAGAAAGCTCGATGAAATTATCCTGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGCACCTC
 GCCGGACATCAACGGTGTGTGGACGATGATGGATAACGAAGAACAGGTTTCCATCCGCTGAAACCGATGCTGGATCATGCCAAACCGTCCCTGCG
 CCAAATTATGCGTCACCTTGTAGTGCACCTGGCGGAAGCCTACATCGAAATGCGCTCGCGTAAAAACCGTATATGCCGCGCTACGGTCTGCAGCGCAA
 TCTGCGTGACCAAAGCCTGGCACGTTATGCGTTTGATTCTACGAAATTACCGCGACCACGCCGATCCGCGCCAAAGAAGCACACCTGCAGATGAA
 AGCGGCCGCACTGAAAACTCTAATACCAACATGTTCCGGCCTGGACGGTAACGTGACCACGAGCGAAGAAGATACGGAACGTACACGGCGACCGA
 TGTC AACCGCAATATGCACCACCTGCTGGCGCTCAAAGGCGTTTAA



รูปที่ 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (825 bp) ที่เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pET 101/D-TOPO®

M 1 2 3 4 5 6

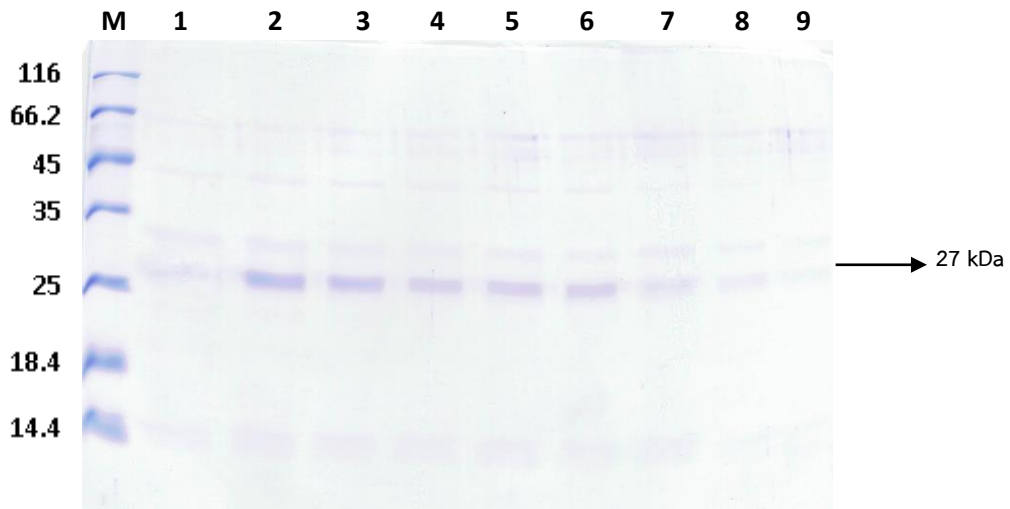


รูปที่ 2. ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO[®]-cp ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

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



รูปที่ 3. ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-9 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-9 หลังการใช้ eluting buffer

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ จากการเจาะเลือด 7 ครั้ง

2-fold dilution	Normal serum	Antiserum 1	Antiserum 2	Antiserum 3	Antiserum 4	Antiserum 5	Antiserum 6	Antiserum 7
1:100	0.113	1.709	1.931	2.056	2.765	2.769	2.908	2.880
1:200	0.108	1.652	2.060	2.056	2.565	2.534	2.920	2.844
1:400	0.102	1.520	1.817	1.979	2.400	2.532	2.650	2.733
1:800	0.119	1.298	1.814	2.123	2.185	2.384	2.591	2.634
1:1600	0.094	0.961	1.492	1.845	1.587	1.868	2.028	2.220
1:3200	0.101	0.721	1.229	1.811	1.213	1.485	1.651	1.844
1:6400	0.088	0.420	0.816	1.268	0.782	1.029	1.161	1.261
1:12800	0.106	0.311	0.620	0.994	0.517	0.628	0.724	0.879
1:25600	0.101	0.211	0.422	0.658	0.292	0.380	0.445	0.514
1:51200	0.091	0.164	0.326	0.497	0.211	0.257	0.300	0.32
1:102400	0.086	0.129	0.200	0.334	0.154	0.188	0.198	0.224
1:204800	0.104	0.119	0.219	0.261	0.146	0.157	0.177	0.177

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส potato virus A (PVA) โดยทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวกเตอร์ pET200/D-TOPO® (Invitrogen) และทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอส่วนของ CP gene ที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี miniprep และส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 825 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) พบว่าที่ระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 27 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 28 กิโลดาลตันทุก fraction (fraction 2-9) จึงนำโปรตีนที่แยกได้นั้นจำนวน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณสะโพกของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 5-7 มี ไตเตอร์สูงสุด สามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant protein (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส Potato virus A ที่มีความจำเพาะเจาะจง ไปใช้ประโยชน์ในการตรวจจับเชื้อไวรัส Potato virus A ได้ถูกต้องและแม่นยำ ด้วยวิธีการทางเซรัมวิทยา และเป็นข้อมูลด้านวิชาการในการตรวจสอบเชื้อไวรัสดังกล่าว

11. เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กียรติยะอังกูร์ สุรภี กียรติยะอังกูร์ และ นवलจันทร์ ตีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA.
- รายงานผลงานวิจัยประจำปี. 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 103-109.
- 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. Annual Phytopathology
- Hochleitner, K. and Kraus, H. (2002) Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.