รายงานผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย : อนุกรมวิธานชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาเทคโนโลยีตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิทยา

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Citrus tristeza virus* สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Antiserum Production of *Citrus tristeza virus* causing citrus tristeza disease by bacterial cell system

2. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าโครงการวิจัย : ระบุชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าการทดลอง : แสนชัย คำหล้า สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : กาญจนา วาระวิชะนี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคทริสเทซ่า (Citrus tristeza disease) เป็นโรคติดเชื้อภายในที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) จัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ทำการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส แปลรหัสลำดับอะมิโนได้ 223 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความเหมือนในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ระดับ 93 – 94 เปอร์เซ็นต์ ทำการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้ากับ pBAD/His A expression vector สำหรับใช้สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ในระบบเซลล์แบคทีเรีย พบว่าสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจเชื้อ *Citrus tristeza virus* ได้

คำหลัก : ส้ม, โรคทริสเทซ่า, ไวรัส, เทคนิคการตรวจสอบไวรัส, แอนติซีรัม, โปรตีน,

Abstract

Citrus tristeza disease is an important internal infectious disease of Citrus spp. caused by *Citrus tristeza virus* (CTV) belonging to *Clostervirus*. *Citrus tristeza virus* genome comprises a single molecule of (+)- strand ssRNA. Coat protein gene of CTV was amplified using the CP1/CP2 primers. Amplicons of 672 bp were cloned into pGEM-T-easy vector (Promega) and sent for DNA sequencing. Analysis of nucleotide sequences in the GenBank database using the BLASTn method displayed the highest sequence identity (93 - 94%) with the coat protein gene of *Citrus tristeza virus.* DNA fragment were cloned into pBAD/His A expression vector to synthesize *Citrus tristeza virus* coat protein (CTV-CP) in bacterial system. CTV-CP of 30 kDa was obtained and will be used as an antigen to produce polyclonal antibody that can detect for *Citrus tristeza virus*.

Keywords: Citrus, Tristeza disease, Closterovirus, Detection technique, Antiserum, Coat Protein, Gene

คำนำ

โรคทริสเทซ่า (Tristeza disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* พบมีการระบาดทั่วโลกและเป็นโรคหนึ่งที่ทำความเสียหายอย่างมากทั้งต่อเกษตรกรรายย่อยจนถึงระดับอุตสาหกรรมการปลูกส้มขนาดใหญ่ สำหรับประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2515 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรี, 2534) เชื้อไวรัสสาเหตุโรคจัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* วงศ์ *Closteroviridae* จัดเป็นไวรัสขนาดใหญ่ที่สุดที่เข้าทำลายพืชมีลักษณะอนุภาคยาวคล้ายเส้นด้าย (thread-liked particle) ขนาดอนุภาค 11 x 2,000 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก (plus single strand RNA) มีขนาดจีโนมตั้งแต่ 14.5 – 19.3 kb เฉพาะเชื้อไวรัส CTV มีขนาดจีโนมประมาณ 19,296 nt (Hull,2014) สำหรับเชื้อไวรัสทริสเทซ่า CTV-A18 มีจีโนมขนาด 19,302 nt และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ CTV NUagA ในประเทศญี่ปุ่นมากที่สุด (กีรติ,2554) อยู่หนาแน่นเฉพาะภายในระบบลำเลียงของพืช โดยเฉพาะท่ออาหารของพืช (phloem) จากการศึกษาเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้มของ ยุพา (2556) ใน 10 จังหวัดพบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส 89 – 100% และส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์รุนแรง

ลักษณะอาการของโรค พืชตระกูลส้มสามารถติดเชื้อโรคทริสเทซ่าได้ทุกชนิด แต่มีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับทั้งสายพันธุ์พืช สายพันธุ์เชื้อไวรัส รวมถึงภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่พืชได้รับในขณะที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ในมะนาวจะแสดงอาการชัดเจนที่สุด โดยมีอาการใบเหลืองซีดคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ใบมี

ขนาดเล็ก หนาผิดปกติ ขอบใบม้วนเข้า ในใบอ่อนเส้นใบจะแสดงอาการขีดโปร่งแสง (vein clearing) ส่วนใบแก่เส้นใบจะนูนแข็งและแตก ต้นที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการแคระแกร็น ให้ผลผลิตต่ำและตายไปในที่สุด ในพืชตระกูลส้มอื่นๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มตรา และส้มโอ อาการของโรคไม่รุนแรงหรือแสดงอาการชัดเจนเท่ากับในมะนาว ในระยะแรกของการติดเชื้ออาการไม่ปรากฏชัดเจน แต่เมื่อต้นส้มให้ผลผลิตแล้ว 1-2 ปี และต้นส้มเริ่มอ่อนแอลงจะแสดงอาการใบกลับ ไม่เขียวสดชื่น คล้ายอาการขาดน้ำ หากต้นส้มติดลูกดกมากเกินไปจะสลัดใบและลูกทิ้งและแสดงอาการทรุดโทรม การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสามารถเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ การติดไปกับกิ่งพันธุ์ซึ่งได้มาจากต้นแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส การติดตาทาบกิ่งจากการใช้ตาที่ไม่ปลอดโรค และการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน มีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricida*), เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*), เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Toxoptera aurantii)* และเพลี้ยอ่อนผัก (*Apis spiraecola*) และจากการตรวจสอบการเป็นพืชอาศัยของ CTV จำนวน 45 ตัวอย่าง จาก 11 สกุล ซึ่งพบในสวนส้ม พบว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัส CTV ในทุกตัวอย่าง (กีรติ,2554)

วิธีการที่สามารถใช้ตรวจสอบโรคทริสเทซ่าที่ได้รับการยอมรับและใช้ตรวจตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศคือ วิธีอิมมูโนวิทยา (Immunology) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี หรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไวรัส และวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละชนิด แต่วิธี RT-PCR มีต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์และต้องการอุปกรณ์รวมทั้งทักษะความชำนาญมากกว่าวิธีอิมมูโนวิทยาและในปัจจุบันยังต้องสั่งซื้อแอนติบอดีจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงทำให้นำมาใช้ในงานได้จำกัด ฉะนั้นควรมีการผลิตแอนติซีรัมของเชื้อโรคทริสเทซ่า เพื่อใช้ในการคัดเลือกตา/กิ่งพันธุ์ปลอดโรคจากไวรัสทริสเทซ่า และใช้ในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรค เพราะเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก มีรายงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศที่ได้ใช้เทคนิคการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยระบบเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับนำไปฉีดกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติซัรัมขึ้นมา เช่น Druka และคณะ (1996) ได้รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นส่วนของ coat protein ยีนของเชื้อไวรัสในข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteins จากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มที่มีอนุภาคทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM, Cerovska และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสของเชื้อ *Potato mop-top virus* (PMTV) โดยโคลนชิ้นของยีน CP เข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส PMTVได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA, Nurhadi, Kamaruzaman S. และ Inon S. (2003) ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี จากการสกัดเชื้อไวรัสทริสเทซ่าบริสุทธิ์และใช้แม่ไก่พันธุ์ White leghorn ในการผลิตแอนติซีรัม พบว่าได้ผลดีและประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถนำมาใช้ในระดับห้องปฏิบัติการได้, Nickel และคณะ (2004) ได้นำยีน CP ของเชื้อ *Apple stem grooving virus* (ASGV) มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RT-PCR นำไปโคลนใน vector ตรวจหาลำดับเบส และ โคลนเข้าสู่ expression vector แล้ว

เพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส ASGV ได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA, ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายเพื่อผลิตแอนติซีรัมได้ ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถสังเคราะห์ coat protein ของเชื้อไวรัส CTV ในระบบเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูงซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับผลิตแอนติซีรัมที่มีความบริสุทธิ์และคุณภาพได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่เป็นโรคทริสเทซ่า
2. ตัวอย่างใบส้มและมะนาวปกติ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ โกร่งบดตัวอย่าง, หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร, ตู้แช่แข็ง -20 ^{0}C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker), เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge), เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Centrifuge) , ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood), เครื่อง Thermal cycler, เครื่อง Gel electrophoresis เครื่อง และ Gel Documentation UV-transilluminator
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว, GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit, สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40) , chloroform: isoamyl alcohol (24:1), 3M sodium acetate,pH 5.2 70% ethanol, TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) , เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen), GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®) และ Agarose gel
5. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*
6. pGEM-T Easy vector / pBAD/His A expression vector
7. ProBond™ Nickel Chelating Purification System (Invitrogen, USA)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการของโรคทริสเทซ่า

อาการของโรคทริสเทซ่า (ภาพที่ 3) เช่นอาการใบเหลืองซีดคล้ายอาการขาดธาตุ มีขนาดเล็กและหนา ขอบใบม้วนเข้า (leaf cupping) มีอาการเส้นใบนูนและแตก ในใบอ่อนอาจพบอาการใบขีดโปร่งแสง (vein clearing) จากแปลงปลูกเกษตรกร แล้วนำมาตรวจหาเชื้อโรคทริสเทซ่าขั้นต้นด้วยเทคนิค ELISA (enzyme linked immunosortbent assay)

จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกมาติดตากับต้นกล้ามะนาวที่เตรียมไว้เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสำหรับใช้สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้อเยื่อใช้โดยใช้ชุดสกัด GeneJET Plant RNA Purification Kit โดยตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบพืชแล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียด หลังจากนั้นเติมสารละลาย Plant RNA Lysis Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติม 96% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมเบาๆ ให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วดูดสารละลายปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ใน purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อให้อาร์เอ็นเอจับกับเมมเบรนของ purification column แล้วล้างด้วย Wash buffer 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วล้างด้วย Wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Citrus tristeza virus* ตามการรายงานของ Jiang et al. (2008) คือ CP1 5'-ATG-GAC-GAC-GAA-ACA-AAG-AA-3' และ CP2 5'-TCA-ACG-TGT-GTT-GAA-TTT-CC-3' โดยจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 bp ดำเนินการตามขั้นตอนของปฏิกริยา One step Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (complementary strand) โดยคู่ไพร์เมอร์ CTV-CP1 5'-ATG-GAC-GAC-GAA-ACA-AAG-AA-3' / CTV-CP2 5'-TCA-ACG-TGT-GTT-GAA-TTT-CC-3'

ส่วนประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen®)

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	4.5	ไมโครลิตร
- 2x buffer	12.5	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- SuperscripIIIRT/platinum Taqmix (Invitogen®, 0.1 unit/µl)	1	ไมโครลิตร
- อาร์เอ็นเอต้นแบบ	5	ไมโครลิตร
รวม	25.0	ไมโครลิตร

ตั้งโปรแกรมการทำงานเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler) ดังนี้

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (complementary DNA synthesis)

ขั้นที่ 1:	60°C	นาน 30 นาที	1 รอบ
Denaturation			
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 5 นาที	1 รอบ
PCR amplification			
ขั้นที่ 3: (denature)	94°C	นาน 30 วินาที	
ขั้นที่ 4: (anneal)	56 °C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 5: (extend)	72 °C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 6: (final extension)	72 °C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7: (hold)	15°C	นาน 5 นาที	1 รอบ

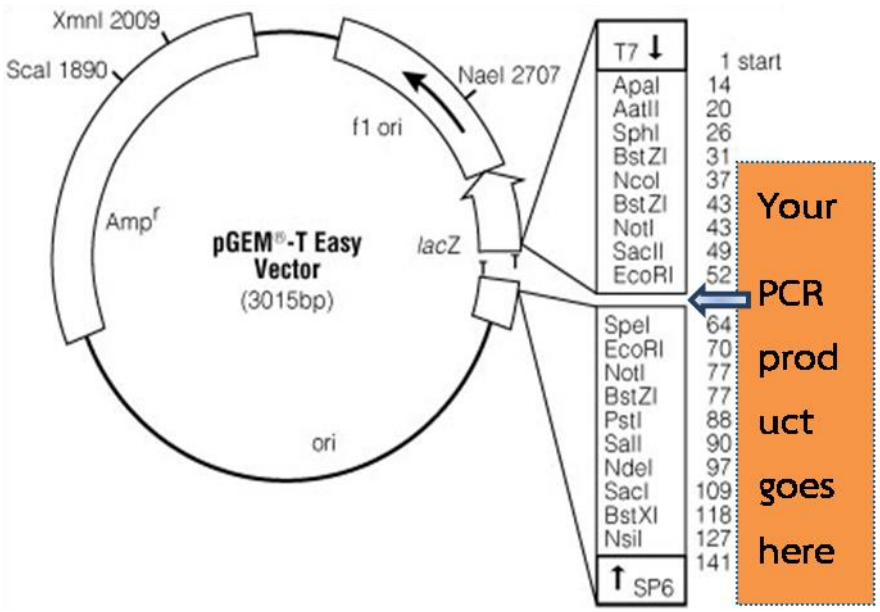
ตั้งโปรแกรมขั้นที่ 3 – 5 จำนวน 35 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่า 5 นาที และนำแผ่น agarose gel มาตรวจขนาดชิ้นดีเอ็นเป้าหมายด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง (ภาพที่ 4)

3. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทริสเทซ่าเข้ากับพลาสมิดพาหะ

นำผลผลิต PCR ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทริสเทซ่า (CTV-CP gene) มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการ อีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 1.2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักของเจลไม่เกิน 300 มิลลิกรัม ทำการสกัด DNA ออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) (ภาพที่ 1) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย Escherichia coli (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al*., 1989) ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสมสอดแทรกอยู่ แล้วทำการสกัดพลาสมิดลูกผสม ด้วยวิธี Alkaline lysis หลังจากได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่

ต้องการแล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไดเป็นลำดับเบสของยีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ*Citrus tristeza virus* สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มจริง



ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดของพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector ขนาด 3,015 bp

(ที่มา: http://www.enslyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/tp_gfp/Fig3.htm)

4. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ CTV-CP adapter gene ด้วยเทคนิค PCR

นำเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (E. *coli*) สายพันธุ์ DH 5α ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทริสเทซ่ามาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และใช้เป็นต้นแบบดีเอ็นเอสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CTV-CP adapter gene ด้วยเทคนิค PCR จากคู่ไพร์เมอร์ CP-XholF1 /CTV- EcoRIR1 ที่เพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoR* I บริเวณ 5’ ของแต่ละเส้นไพร์เมอร์ทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4

5. การตัดชิ้นส่วนยีนเป้าหมายด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแบบ Double digestion

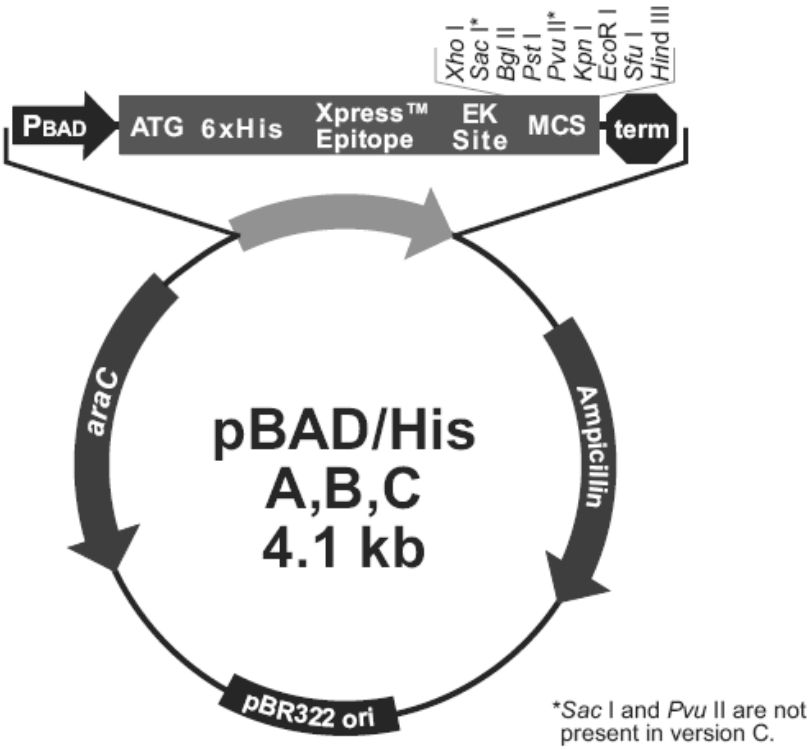
นำผลผลิต PCR ของ CTV-CP-adapter gene เชื้อไวรัสทริสเทซ่า และพลาสมิด pBAD/His A expression vector (ภาพที่ 2) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoR* I (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) แบบ Double digestion ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Double digestion ดังนี้

1. pBAD/His A expression vector / Purified PCR product (0.5 µg/µl) 10.0 ไมโครลิตร
2. 10X buffer 10.0 ไมโครลิตร
3. *XhoI* (10 U/µl) 4.0 ไมโครลิตร
4. *EcoR* I (10 U/µl) 4.0 ไมโครลิตร
5. Deionized water (dH_2O) 2.0 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม 30.0 ไมโครลิตร

Map of pBAD/His The figure below summarizes the features of the pBAD/His vector. Complete sequences for all three pBAD/His vectors are available for downloading at www.invitrogen.com or by contacting Technical Support (see page 28). Details of each multiple cloning site are shown on pages 9–11.



ภาพที่ 2 แสดงรายละเอียดของพลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector ขนาด 4,102 bp

(ที่มา : http://www.biosubway.com.img.800cdn.com/uploads/vector/pBadHis%20A-vector-map.gif)

6. การโคลนยีน CTV-CP adapter กับ digested pBAD/His A expression vector

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา Double digestion มาเชื่อมต่อชิ้น digested CTV-CP-adapter gene ของเชื้อไวรัสทริสเทซ่ากับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector (Invitrogen, USA) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำสารละลายจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย Escherichia coli (E. coli) สายพันธุ์ Top 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook et. al., 1989) แล้วทำการทดสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดสายผสมบนอาหารแข็ง 2XYT ที่มียาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียมาตรวจหาชิ้น CTV-CP gene/6xHisTag ด้วยเทคนิค colony PCR หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ตรวจแล้วว่าได้รับ พลาสมิดสายผสมดังกล่าวมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated

DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนต่อไป

7. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

วิเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/protscale.html) และตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (http://www.expasy. ch/tools/protparam.html)

8. ศึกษาการแสดงออกและช่วงเวลาที่เหมาะสมของโปรตีน CTV-CP/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย

นำโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่ามีพลาสมิดสายผสมของ CTV-CP-adapter gene/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 2XYT ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5–0.7 จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ลงในสารแขวนลอยเซลล์ และเขย่าต่อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาแยกสกัดโปรตีนจากเซลล์และวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrphoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 4-20% Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen,USA) และนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสารละลาย SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen,USA) เพื่อตรวจดูขนาดและปริมาณของ fusion protein โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, Invitrogen,USA)

9. เตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม CTV-CP-adapter gene/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector จำนวน 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมแอมพิซิลลิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนโดยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ ทำการเก็บตะกอนเซลล์ในช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุด นำมา

หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้งและสกัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี denature condition และวิธี native condition โดยการเติม buffer A, pH 8.0 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี lysozyme ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียและ Freeze/Thaw เซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหรือใช้ไนโตรเจนเหลว จำนวน 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บส่วนใส (supernatant) ไว้เพื่อนำไปใช้ในการสกัด fusion protein ให้บริสุทธิ์ ส่วนตะกอนเก็บมาสกัดโปรตีนเป็นแบบ denature condition โดยเติม buffer C, (8 M Urea, 1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl) และทำการเก็บส่วนใส (supernatant) ไว้เพื่อตรวจหาปริมาณ fusion protein ที่เหลืออยู่ วิธีการสกัด fusion protein ให้บริสุทธิ์ทำโดยเตรียมคอลัมน์ขนาด 10 ml ที่บรรจุ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ปริมาณ 2 ml จากนั้นนำส่วนน้ำใส (supernatant) นำมาเติมลงใน column ทำการล้าง column ด้วย washing buffer C (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl 8 M Urea ; pH 6.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นล้าง column ด้วย buffer D ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง และทำการแยกเอาส่วน fusion protein ออกจาก column โดยการเติม elution buffer E (100 mM NaH2 PO4 , 10 mM Tris-HCl, 8 Urea ; pH 4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ครั้ง ตรวจวิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยนำตัวอย่างสารละลายที่ไหลผ่าน column flow through, wash และ elution แต่ละ fraction ผสมกับ 2x loading buffer อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายที่เตรียมได้ลงหลุมๆ ละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อม comassie blue แล้วนำไปเขย่าเบาๆ เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีออกด้วย destain solution I แล้วเขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเจลด้วย destain solution II เขย่าเบาๆ นาน2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจนโดยเปรียบเทียบขนาดของ fusion protein กับแถบโปรตีนมาตรฐาน (NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, Invitrogen,USA)

10. ทำการบันทึกข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

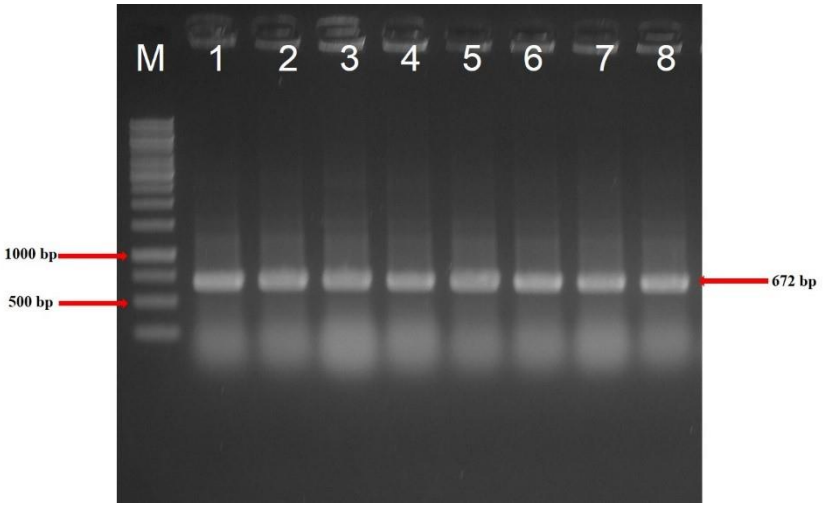
1. **ผลการเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการของโรคทริสเทซ่า**

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการของโรคทริสเทซ่าเช่นอาการใบเหลืองซีดคล้ายอาการขาดธาตุ มีขนาดเล็กและหนา ขอบใบม้วนเข้า(leaf cupping) ในใบอ่อนอาจพบอาการใบขีดโปร่งแสง (vein clearing) จากแปลงปลูกเกษตรกร พบว่าตัวอย่างที่เก็บมาส่วนใหญ่จะมีอาการของโรคกรีนนิ่งร่วมด้วยและนำมาตรวจยืนยันผลเบื้องต้นด้วยเทคนิค ELISA และนำตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกซึ่งแสดงว่าเป็นโรคทริสเทซ่าจริงไปติดตาบนต้นตอมะนาวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสำหรับใช้สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 3 มะนาวแสดงอาการของโรคทริสเทซ่า

2. **ผลการสกัดอาร์เอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าด้วยเทคนิค RT-PCR**

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าโดยใช้ชุดสกัด GeneJET Plant RNA Purification Kit และทำการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายคู่สมด้วยเทคนิค RT-PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ CP1 5'-ATG-GAC-GAC-GAA-ACA-AAG-AA-3' / CP2 5'-TCA-ACG-TGT-GTT-GAA-TTT-CC-3' (Jiang et al,. 2008) และนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas®) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าขนาดประมาณ 672 bp (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทริสเทซ่า (CTV coat protein gene) ขนาดประมาณ 672 bp สังเคราะห์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/ CP2

M = 1 kb DNA ladder (fermentas®)

1-8 = *Citrus tristeza virus*

3. ผลการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าเข้ากับพลาสมิดพาหะ

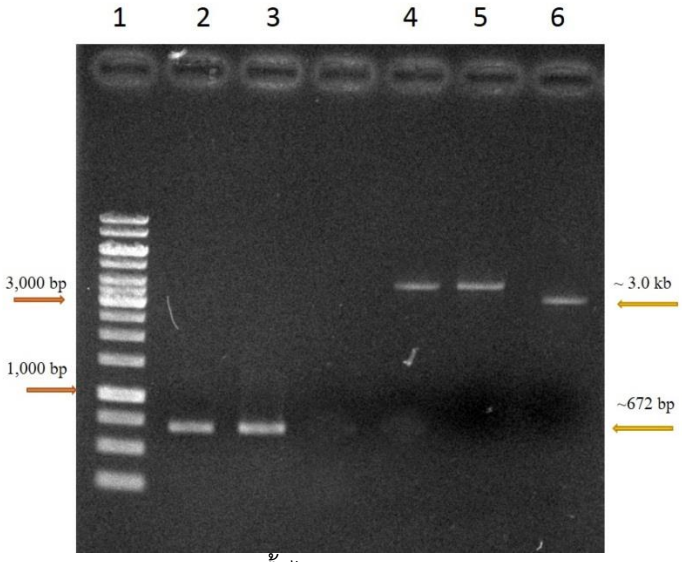
เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่า(CTV-CP gene) ที่มีขนาดประมาณ 672 เบส เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ได้ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่า จำนวน 672 เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไวรัสทริสเทซ่า มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสทริสเทซ่าที่มีรายงานในฐานข้อมูลอยู่ในระดับ 93-94 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาสกัดพลาสมิดสายผสม CTV-CP gene ด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และใช้เป็นต้นแบบดีเอ็นเอสำหรับการสังเคราะห์ CTV-CP-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR ในขั้นตอนถัดไป

4. ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสมของ CTV-CP adapter gene ด้วยเทคนิค PCR

ใช้ดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสม CTV-CP gene เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ CTV-CP-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ CTV-CP-XholF1 / CTV-CP -*EcoR*IR1 พบว่า ผลผลิต PCR ของ CTV-CP -adapter gene ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 672 เบส ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้เทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับขนาดของ CTV-CP gene เนื่องจากลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* (C/TCGAG) และ *EcoRI* (G/AATTC) บริเวณปลาย 5' ของคู่ไพร์เมอร์มีจำนวณเพียง 6 เบสเท่านั้น จึงไม่ส่งผลต่อขนาดแถบดีเอ็นหลังจากวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

5. ผลการตัดชิ้นส่วนยีนเป้าหมายด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแบบ Double digestion

นำผลผลิต PCR ของ CTV-CP-adapter gene เชื้อไวรัสทริสเทซ่าและพลาสมิดพาหะ pBAD/His A expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoR* I แบบ Double digestion ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า พลาสมิด pBAD/His A expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์ตัดจำเพาะแบบสมบูรณ์จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 4.1 kb เนื่องจากดีเอ็นเอมีสภาพแบบเส้นตรง เมื่อเทียบกับพลาสมิด pBAD/His A expression vector ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต่ำกว่าประมาณ 3.0 kb โดยที่พลาสมิดพาหะ pBAD/His A expression vector มีขนาดเท่ากัน 4,102 bp แต่เนื่องมาจากดีเอ็นเอที่มีสภาพแบบวงกลมสามารถการเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเส้นตรง (ภาพที่ 5) (Sambrook et. al., 1989) จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของขนาดได้หลังจากหยุดปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์เรียบร้อยแล้ว



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอของ CTV-CP-adapter gene เชื้อไวรัสทริสเทซ่า และพลาสมิด pBAD/HisA expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoR* I (double digestion)

1 = 100 bp DNA Ladder (fermentas)

2 = ชิ้นดีเอ็นเอ CTV-CP-adapter gene ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoR* I

3 = ชิ้นดีเอ็นเอ CTV-CP-adapter gene ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoR* I

4 = พลาสมิด pBAD/HisA expression vector ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoR* I

5 = พลาสมิด pBAD/HisA expression vector ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoR* I

6 = พลาสมิด pBAD/HisA expression vector

6. ผลการโคลนยีน CTV-CP adapter กับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา Double digestion ของชิ้น digested CTV-CP-adapter gene ของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector ทำการเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียเพื่อตรวจหาพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น CTV-CP-adapter gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 972 เบส เมื่อเทียบกับโคโลนีแบคทีเรียปกติที่ไม่ได้รับพลาสมิดสายผสมดังกล่าวจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 เบส เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ที่ประเทศมาเลเซีย พบว่า เฉพาะชิ้นยีนของ CTV-CP-adapter gene/6xHisTag มีจำนวน 972 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบสทั้ง start codon (ATG) และ stop codon (TAA) เมื่อทำการตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการจัดเรียงกรดอะมิโนได้ถูกต้องจำนวน 265 เรซิดิวส์รวมส่วนของ pBAD/His A expression vector จำนวน 42 เรซิดิวส์ (ภาพที่ 6) และพบตำแหน่งอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) เมื่อนำเฉพาะส่วนของลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าจำนวน 223 เรซิดิวส์ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Standard Protein BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าให้ค่า identities 96% และค่า Positives 98% กับส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่า GenBank : accession no. ABY82963.1 ซึ่งมีความยาว 223 เรซิดิวส์ เท่ากัน

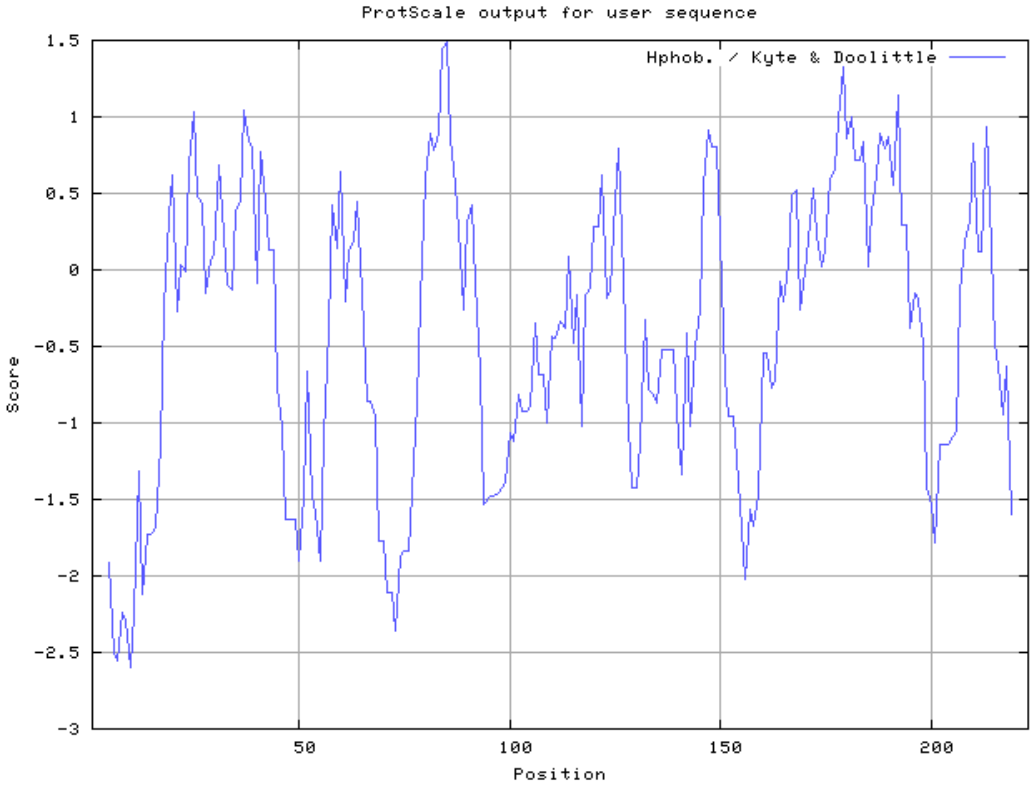
*MGGS*HHHHHH*GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEICS** MDDETKKL
KNKTKETIEGDNVVAAESSFGSLNLHIDPTLIAMNDVRQLNTQQNATLNRDLFLTLKGKY
PNLPDKDKDFHLAMMLYRLAVKSSSLQSDDDTTGVTYTREGVEVELSDKLWTNVVFNS
QGIGNRTNALRVWGRTNDALYLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGYHYLCADFLTGAG
LTDLECAVYIQAKEQLLKKRGADEVVVTNVRQLGKFNTR

ภาพที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนจำนวน 256 เรซิดิวส์

* ลำดับกรดอะมิโนของ pBAD/His A expression vector จำนวน 42 เรซิดิวส์

7. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/protscale. html) พบว่า amino acid position ของโปรตีนลูกผสม CTV-CP จำนวน 223 เรซิดิวส์ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position เป็นกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าติดลบ) มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงค่ามากกว่า 0 หรือค่าเป็นบวก) และเมื่อพิจารณาสาย polypeptide ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่าโปรตีนลูกผสม CTV-CP ยังคงละลายน้ำได้ค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html) แสดงค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.287 (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ โปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าเกี่ยวกับคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ProtScale และ ProtParam

- ลำดับกรดอะมิโนมีขนาด 223 เรซิดิวส์
- น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24.94 kDa
- มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.83
- มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{1093}H_{1747}N_{311}O_{342}S_{7}$

- มีค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.461

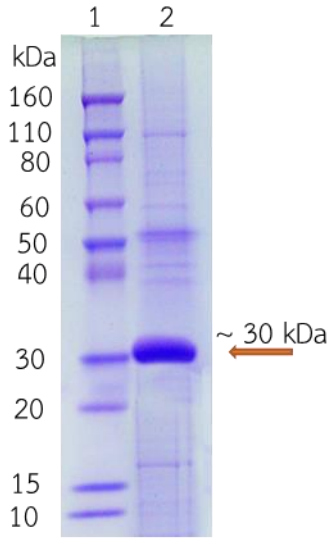
8. ศึกษาการแสดงออกและช่วงเวลาที่เหมาะสมของโปรตีน CTV-CP/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย

ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อแสดงออกโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย โดยนำ crude extracts จาก suspension culture ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จากช่วงเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเซลล์ มาวิเคราะห์หาปริมาณ CTV-CP- Protein/6xHisTag (fusion protein) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนเริ่มแสดงออกหลังจากเหนี่ยวนำด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ในสารแขวนลอยเซลล์ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และสามารถสังเกตเห็นแถบแบนโปรตีนชัดเจนเมื่อเวลาผ่าน 6 ชั่วโมง และช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุดคือ 10 ชั่วโมง ซึ่ง fusion protein แสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับการแสดงออกของโปรตีน pBAD/HisZ ใช้เป็น Positive control ของปฏิกิริยาแสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 120 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PR7OTEIN STANDARD, (Invitrogen,USA)

9. ผลการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Probond™ Nickel-Chelating Purification System

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสมของ CTV-CP-adapter gene/pBAD/HisA expression vector เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม CTV-CP - Protein/6xHisTag (fusion protein) เหนี่ยวนำด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ในสารแขวนลอยเซลล์ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทดสอบการสกัดโปรตีนด้วยวิธี Native condition และ denature condition ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า วิธีการสกัดโปรตีนแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนออกมาได้มากกว่าแบบ Native condition ดังนั้น จึงเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) มาแยกสกัด fusion protein ให้บริสุทธิ์ด้วยการผสมกับ ProBond Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) และใช้วิธี affinity column chromatography หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 4-20% Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen,USA) พบว่า fusion protein แสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน เนื่องจากขนาดโปรตีนจริงของ CTV-CP มีขนาดที่ประมาณ 25 กิโลดาลตันเท่านั้น แต่เมื่อรวมกับขนาดโปรตีนของ pBAD/HisA-6xHisTag ที่ประมาณ 5 กิโลดาลตัน จึงแสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PR7OTEIN STANDARD, (Invitrogen,USA) เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง(spectrophotometer) ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 8) ซึ่งโปรตีนที่ผลิตได้สามารถ

ใช้เป็นแอนติเจน เพื่อนำไปใช้ผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบหาเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้มได้



ภาพที่ 8 แสดงแถบโปรตีนที่แยกสกัดด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) โดยวิธี affinity column chromatography และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องที่ 1 = แถบโปรตีนมาตรฐาน (Invitrogen,USA)

ช่องที่ 2 = แถบโปรตีน CTV-CP- Protein/6xHisTag (fusion protein) ที่สกัดแยกให้บริสุทธิ์น้ำหนักประมาณ 30 กิโลดาลตัน (CTV-CP- Protein รวมกับ pBAD/HisA-6xHisTag)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการของโรคทริสเทซ่ามาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค ELISA นำตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก มาติดตาบนต้นกล้ามะนาวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส จำนั้นทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด (GeneJET Plant RNA Purification Kit) และทำการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อไวรัส CTV ที่มีรายงานใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ในระดับ 93-94 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการโคลนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ pBAD /His A expression vector สำหรับใช้สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่า และทำการตรวจสอบกรอบการอ่านรหัสพบว่ามีลำดับเบสของ pBAD /His A expression vector แทรกอยู่จำนวน 126 nt ซึ่งสามารถทำการแปลรหัสได้ จึงทำการสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top 10 เพื่อใช้ผลิตโปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส จากนั้นทำการแยกสกัดโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) และทำการตรวจสอบความบริสุทธุ์ของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจเชื้อ *Citrus tristeza virus* ได้ อย่างไรก็ตามการใช้ pBAD /His A expression vector ในการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสในครั้งนี้มีลำดับเบสของเวคเตอร์ติดมาจำนวน 126 nt และแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 42 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักประมาณ 5 กิโลดาลตัน ซึ่งทำให้โปรตีนลูกผสมที่ได้ (CTV-CP fusion protein) มีขนาดประมาณ 30 กิโลดาตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสทริสเทซ่าซึ่งมีขนาด 223 อะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24.94 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจปรับเปลี่ยนเวคเตอร์ เช่น pQE-80L expression vector เพื่อให้โปรตีนลูกผสมมีขนาดเล็กลงได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ คือ

- ได้ CTV-CP/6xHisTag (fusion protein) ของเชื้อไวรัสทริสเทซ่า จากการอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย อนาคตสามารถใช้โปรตีนบริสุทธ์ดังกล่าวมาเป็นแอนติเจนเพื่อผลิตเป็นแอนติบอดีในสัตว์ทดลองและสามารถนำไปพัฒนาต่อได้เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปอย่างง่าย สะดวก และรวดเร็ว ต่อการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสทริสเทซ่า ด้วยเทคนิคอิมโมโนวิทยาต่อไป

<u>กลุ่มเป้าหมาย คือ</u>

- ในอนาคตคาดหวังนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสาเหตุโรคทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้มแบบ Lateral-Flow Assay ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ใช้งานง่าย และประหยัดเวลา จึงเป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูก บริษัทผู้ผลิต และนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

11. เอกสารอ้างอิง

กีรติ สินธวาชีวะ. 2554. จีโนมเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในประเทศไทยและการตรวจสอบเชื้อไวรัสทริสเทซ่าในวัชพืชโดยใช้เทคนิค RT-PCR และ Dot Blot Hybridization. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(โรคพืช) ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารวิชาการเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.

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

ยุพา โพธิ์แก้ว. 2556. การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Ayapour K., Sijam K., Vadamalai G. and Jaafar H. 2011. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* strain in Peninsular Malaysia. African Journal of Microbiology Vol. 5(18), pp. 2838-2846.

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.

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.

Hull R. 2014. Plant Virology 5th. Elsevier Academic Press, New York, USA.

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.

Nurhadi, Kamaruzaman Sijam and Inon Saiman.2003.Production of polyclonal antibody to the coat protein of Citrus tristeza virus in chicken eggs. Indonesian Jouranal od Agricultural Science 4(1) : 18 -26.

Jiang, B., N. Hong, G.P. Wang, J. Hu, J.K. Zhang, C.X. Wang, Y. Liu and X.D. Fan. 2008. Characterization of Citrus trizteza virus strains from southern China bases on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. Virus Genes 37: 185-192.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manistis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.