รายงานผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย : อนุกรมวิธานชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาเทคโนโลยีตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิทยา

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การโคลนและสังเคราะห์โปรตีน *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรีย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Cloning and Expression Analysis of *secA* Gene of Phytoplasma associated with White Leaf Diseases of Sugarcane in Bacterial Cell System

2. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าโครงการวิจัย : ระบุชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าการทดลอง : กาญจนา วาระวิชะนี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : แสนชัย คำหล้า สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเข้ามาช่วยตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยนั้น พบว่า ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากยังไม่สามารถผลิตแอนติเจนเชื้อสาเหตุที่บริสุทธิ์ได้เพราะประสบปัญหาหลักในขั้นตอนการสกัดยังมีการปะปนของโปรตีนพืชมากเกินไปจึงส่งผลให้การผลิตแอนติบอดีที่ได้ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุมากพอ ในปัจจุบันมีการใช้ระบบเซลล์แบคทีเรียเข้ามาช่วยในกระบวนการผลิตโปรตีนจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางเพื่อนำมาช่วยลดปัญหาดังกล่าวเพื่อให้ได้แอนติเจนคุณภาพดีสำหรับใช้ผลิตแอนติบอดีที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุ กระบวนการเริ่มด้วยออกแบบไพร์เมอร์ SecAfor1 / SecArev3 ที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจาก partial *secA* gene แล้วสังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่า เหมือนกับ partial *secA* gene ของ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาทำการสังเคราะห์ยีนลูกผสม partial *secA*-adapter gene/6xHisTag และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 969 bp เมื่อแปลรหัสลำดับอะมิโนตามตำแหน่ง frame shift ได้จำนวน 322 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งกรดอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) ใช้ประโยชน์ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam และ ProtScale พบว่า สามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างดี แสดงค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.287 และช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อแสดงออกโปรตีน partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 หลังจากเหนี่ยวนำด้วย 2 เท่าของ 20 %L-(+)-Arabinose ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้นเพียง 50 ไมโครกรัม แสดงแถบแบนโปรตีนได้ชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จากการทดสอบวิธีการสกัดโปรตีน 2 แบบ คือ Native condition และ denature condition พบว่าวิธีสกัดโปรตีนแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนมากกว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิด SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เท่ากับ 0.544 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปผลการทดลองสามารถผลิตโปรตีน SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ได้ด้วยการอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียซึ่งสามารถใช้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อในอนาคตนำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวและคาดหวังว่าจะสามารถพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้อย่างแม่นยำ รวดเร็ว และใช้งานง่าย

รหัสการทดลอง **03-04-54-04-03-01-09-57**

Abstract

Serological relate techniques apply through Sugarcane white leaf detection not accomplished yet. As the high quality antigen is unattainable. Plant protein contamination in the extraction steps are the main problem caused nonspecific antibody. The obtained antigen from bacterium cell system is an alternative way to eradicate contaminated sugarcane's protein. Polymerase chain reaction using a primer pairs of SecAfor1/SecArev3 against to partial *secA* gene of phytoplasma yielded an amplicon approximately 800 bp and sent for DNA sequencing. Analysis of nucleotide sequences in the GenBank database using the BLASTn method displayed the highest sequence identity (97 - 98%) with partial *secA* gene of *Sugarcane grassy shoot phytoplasma and Sugarcane white leaf phytoplasma*. Partial *secA*-adapter gene/6xHisTag was constructed and sent for DNA sequencing. DNA fragment was 969 bp deducing to 322 aa. Polyhistidine region (6xHisTag) was found in the DNA fragments beneficial to protein purification using ProBondTM Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA). Physical properties of proteins analysis using the ProtScale and Protparam programme shows good solubility and average of hydropathicity equal to -0.287. High yield of fusion protein expression in *E. coli* Top10 strain is 6 hours after inducing with two fold of 20% L-(+)-Arabinose in 100 ml. of 2XYT containing 50 µg/ml ampicillin. Protein was extracted in both native and denature condition. Purified protein is more efficient and more yields in denature condition. *SecA*-protein/6xHisTag is about 37 kDa in SDS-PAGE analysis. Protein concentration measured at 280 nm and converted to 0.544 mg/ml. *SecA*-protein/6xHisTag proteins (fusion protein) produced from bacterial cell system can use as antigens to immunize high specific antibody against sugarcane

white leaf phytoplasma and hope to develop a rapid, accuracy and easy diagnostic test kit in the further experiment.

Keywords: Sugarcane white leaf, expression protein, phytoplasma, *SecA* gene

6.คำนำ

โรคใบขาวอ้อยเกิดจากสาเหตุเชื้อไฟโตรพลาสมาจัดอยู่ใน Class Moliicutes มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียขนาดเล็กที่สุด แต่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) รูปร่างไม่แน่นอนขนาด 80-900 นาโนเมตร ส่วนมากพบอยู่ในกลุ่มเซลล์ท่ออาหารของต้นพืช (พรทิพย์, 2544 ; Lee, *et. al*.,1993 ; Seemüller *et. al*., 1998 ; Marzachì, C., 2006) มีเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะในสภาพแปลงปลูก ลักษณะอาการของอ้อยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีใบแคบสีขาว เรียวเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกรน แตกหน่อเร็วและหน่อที่แตกใหม่จะมีสีขาวลักษณะคล้ายกอตะไคร้ (Shikata *et. al*., 1969 ; Matt and Jennifer., 2003) โรคใบขาวอ้อยแพร่กระจายไปทุกพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2495 จนถึงปัจจุบัน ถือเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพผลผลิตอ้อยลดลง ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นมากจากการรื้อแปลงอ้อยเพื่อปลูกใหม่ ทำให้เกษตรกรหันไปปลูกพืชเศรษฐกิจอื่น เช่น ยางพารา และมันสำปะหลัง ทำให้ผลผลิตอ้อยโดยรวมทั้งประเทศลดลงและขาดแคลนวัตถุดิบป้อนเข้าสู่โรงงานน้ำตาลทราย โรงงานเอทานอล และโรงไฟฟ้าชีวมวลซึ่งสร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจค่อนข้างสูง และในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดๆ ที่สามารถแก้ไขปัญหาโรคใบขาวอ้อยได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญโรคใบขาวอ้อยติดไปได้กับท่อนพันธุ์จึงก่อปัญหาอย่างมากกับอ้อยบางส่วนที่มีอาการแฝงของโรคนี้อยู่แล้วยังไม่แสดงอาการ ถ้าเกษตรกรนำท่อนพันธุ์ที่มีอาการแฝงไปขยายพันธุ์ปลูกและในสภาพแปลงมีเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลช่วยถ่ายทอดโรคยิ่งส่งเสริมให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไปอย่างกว้างขวางและรวดเร็วมากขึ้น (พรทิพย์, 2542 ; สุภาพร และคณะ 2540) ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูงเพื่อเข้ามาเข้าช่วยแก้ปัญหาข้างต้นนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างมากในขณะนี้ ในปัจจุบันมีรายงานว่าสามารถสังเคราะห์โปรตีน *sec A* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียได้แล้วและสามารถนำมาพัฒนางานวิจัยต่อยอดทางด้านอิมมูโนวิทยา จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับการเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์ทำให้สามารถแก้ปัญหาเรื่องการปะปนของโปรตีนพืชก่อนนำไปใช้ในกระบวนการการผลิตแอนติบอดีได้ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยการสังเคราะห์โปรตีน *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทั้งนี้ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ Sec translocase protein ถูกอ้างอิงมาจากกลไลการทำงานของเซลล์แบคทีเรีย โดย Sec translocase protein จะเปรียบเหมือนเครื่องจักรที่สำคัญที่ใช้สำหรับการโยกย้ายโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียก่อนการแปรรหัส (post-translitionally) จากส่วน cytosol ที่จะผ่านไป cytoplasmic membrane ซึ่งมีโปรตีนที่ทำงานร่วมกันอย่างน้อยประมาณ 5-7 ชนิด เช่น SecB, SecE, SecD, SecF, SecG, SecY, และ SecA สำหรับ *secA* gene หน้าที่สำคัญคือให้พลังงาน ATPase เพื่อให้เกิด hetero-trimeric complex ของ SecYEG ซึ่งเป็นช่องทางที่เกิดการเคลื่อนย้ายของ polypeptide chain ที่จะผ่านไป cytoplasmic membrane (Hiroyuki and Koreaki., 2001 ; Or. *al*., 2001) แต่อย่างไรก็ตามกลไกที่แท้จริงของ *secA* gene (SecA translocate protein) ยังคงไม่ทราบหน้าที่มากไปกว่านี้ (Eran *et. al*., 2005) Kakizawa *et. al*., 2001 รายงานว่าสามารถผลิต SecA protein ของ Onion yellow phytoplasma ด้วยการ expression โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* และนำมาใช้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์ฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองสามารถผลิตเป็นแอนติบอดีต่อ Onion yellow phytoplasma เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Immunoblot analysis พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 96 kDa ดังนั้น ถ้าสามารถทำการสังเคราะห์โปรตีนจาก *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค

ใบขาวอ้อยโดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียได้จะสามารถใช้เป็นแอนติเจนที่บริสุทธิ์ เพื่อในอนาคตนำมาฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองให้ผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวได้และคาดหวังว่าจะสามารถพัฒนางานวิจัยต่อเป็นชุดตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อยแบบ Lateral-Flow Assay ที่ใช้งานง่ายไม่จำกัดกลุ่มผู้ใช้ตรวจสอบได้อย่างแม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดเวลา

7. วิธีดำเนินการ

-อุปกรณ์

- ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาว

- ตัวอย่างอ้อยปกติ

- อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน, กระถาง, ตะกร้า, ดิน, ถุงปลูก, ปุ๋ย และป้ายชื่อ

- อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่

ตู้แช่แข็ง 4, -20, -40 และ -80 องศาเซลเซียส, เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance) ทศนิยม 3 ตำแหน่ง, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker), ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, โกร่งบดตัวอย่าง, เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (Denver,USA), เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge) (Jouan, USA), เครื่อง Thermal cycler (PCR), ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis equipment) (Hoefer, USA), Gel Documentation UV-transilluminator, ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette: Pipetteman, Gilson, France), เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Fisher scientific, USA) และหลอดไมโครทิวป์ขนาดต่างๆ ปริมาตรเป็นไมโครลิตร

- สารเคมีวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่

ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany), ชุดสกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany), ชุดสกัด Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany), DNA Purification System (Promega, USA), ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA), Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen,USA), เอ็นไซม์ PLATINUM Taq polymeras High quality (Invitrogen,USA), β-mercaptoethanol (Sigma, USA), สารปฏิชีวนะ, ชุดไพรเมอร์, GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas), พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector

(Promega,USA), พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen,USA), T4 DNA Ligase (Promega,USA), competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen,USA), ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.), และ Agarose gel (SeaKem)

-วิธีการ

1.เก็บตัวอย่างพืช

1.เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวจากสภาพแปลงปลูก และปลูกในกระถางภายในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งทดสอบเชื้อต่อไป

2.สกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)

ชั่งตัวอย่างอ้อยใบขาวทั้งในส่วนกาบใบ ก้านใบ และใบ ประมาณ 0.3 กรัม ตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่เย็นทำการเติมไนโตรเจนเหลวและบดให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนสเตนเลสที่ผ่านเผาด้วยเปลวไฟ ตักผงละเอียดที่บดใส่หลอดไมโคทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม buffer AP1 ปริมาตร 400 ไมรโคลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมรโคลิตร ผสมให้เข้ากันโดย และนำหลอดหลอดไมโคทิวป์ไปบ่มที่ 56 °ซ นาน 10 นาที จากนำมานั้นเติม buffer AP2 ปริมาตร 130 ไมรโคลิตร ผสมให้เข้ากันและวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า ผสมให้เข้ากันและดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ใน QIAshredder spin column นำ column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ผ่าน column ทิ้ง แล้วล้าง column ด้วย buffer RW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่าน column ทิ้ง แล้วย้าย column ซ้อนบนหลอดหลอดไมโคทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม buffer AE ปริมาตร 50 ไมรโคลิตรเพื่อชะล้าง DNA จาก column โดยหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที และเก็บ DNA ที่อยู่ในส่วนใสที่ผ่าน column ไว้ทดสอบต่อไป

3.ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ทำการออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene **(ตารางที่ 1)** ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 (http://simgene.com/Primer3) ออกแบบไพร์เมอร์ จำนวน 1 ชุด และคำนวณค่า Annealing Temperature (Tm °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html)

ตารางที่ 1 แสดงฐานข้อมูลเชื้อไฟโตพลาสมาจาก GenBank ที่เลือกใช้สำหรับการออกแบบไพร์เมอร์จากส่วน *secA* gene แหล่งที่มา : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Name	Acronym	Accession No.	Group (base on 16S rRNA)
Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB	AYWB	CP000061	16SrI-A
Onion yellows phytoplasma OY-M DNA	OY-M	AP006628	16SrI-B
Mulberry dwarf phytoplasma strain MD-TA SecA (secA)	MD-TA	GU441574	16SrI-B
Himachal periwinkle phytoplasma partial secA gene	Himachal	FM991883	16SrI-B
Toona witches'-broom phytoplasma partial secA gene, isolate Himachal	Toona	FM991884	16SrI-B
Sesame phyllody phytoplasma (Thailand 16SrI) strain SEPL3 SecA (secA) gene, partial cds	SEPL3	JN977037	Thailand 16SrI
Paulownia witches'-broom phytoplasma strain YL07 SecA (secA) gene, complete cds	YL07	EU665493	16SrI-D
Palm lethal yellowing phytoplasma preprotein translocase subunit (secA) gene, complete cds	OY-W	EU267187	16SrIV-A
Jujube witches'-broom phytoplasma strain PY SecA (secA) gene, partial cds	JWBP	GU471766	16SrV (Elm yellows group)
Candidatus Phytoplasma mali strain AT complete chromosome	AT	CU469464	16SrX
Napier grass stunt phytoplasma SecA (secA) gene, partial cds (Rice yellowdwarf group).	NPGS	EU168750	16SrXI
Sugarcane white leaf phytoplasma isolate SCWL1SL secA (secA) gene, partial cds	NGSP-A	JF754450	16SrXI
Sugarcane white leaf phytoplasma strain KHO002 SecA gene, partial cds	SWL	JX987241	16SrXI
Sugarcane grassy shoot phytoplasma partial secA pseudogene	Ssgh	AM261834	16SrXl-B
Sugarcane grassy shoot phytoplasma partial secA gene for preprotein translocase secA subunit	Ssgh	AM261835	16SrXl-B
Sugarcane grassy shoot phytoplasma SecA (secA) gene	Ssgh	DQ459440	16SrXl-B
Candidatus Phytoplasma pini strain PineBT	PineBT	JQ434465	16SrXXI; subgroup: 16SrXXI-A"

4. การสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย และดีเอ็นเออ้อยปกติที่สกัดได้ด้วยวิธีการ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) มาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับ partial *secA* gene

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
- 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
- $MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- *taq* DNA polymerase (0.1 unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

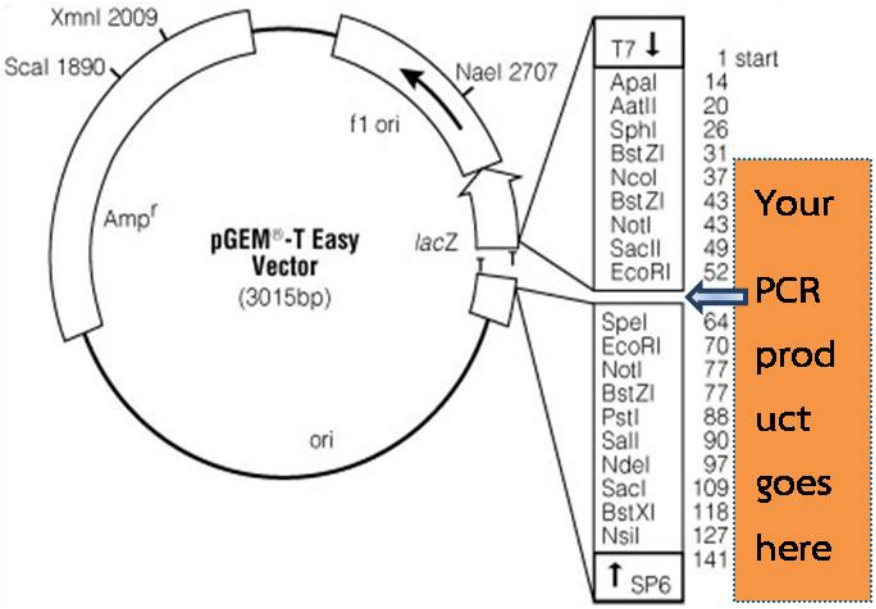
นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: (Pre-denature)	94°C	นาน 3 นาที	
ขั้นที่ 2: (Denature)	94°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 3: (Annealing)	52-56°C	นาน 2 นาที	
ขั้นที่ 4: (Extension)	72°C	นาน 3 นาที	
ขั้นที่ 5: กลับไปขั้นตอน	ขั้นที่ 2 - 4 จำนวน 34 รอบ		
ขั้นที่ 6: (Final extension)	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7: (Hold)	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

วิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1% gel agarose 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 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

5.การโคลน partial *secA* gene เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.)

นำผลผลิต PCR ของยีน *secA* gene มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 1.2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่หลอดไมโคทิวป์ขนาด 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 5 **α** ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al*., 1989) ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสมเพื่อเก็บไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดของพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector ขนาด 3,015 bp
(แหล่งที่มา:http://www.enslyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/tp_gfp/Fig3.htm)

6. การสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอลูกผสมของ *secA*-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR

นำเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (E. coli) สายพันธุ์ DH 5 α ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม *secA* gene มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และใช้เป็นต้นแบบดีเอ็นงสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *secA*-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR จากคู่ไพร์เมอร์ SecA-XholF1 /SecA- EcoRIR1 ที่เพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoRI* บริเวณ 5' ของแต่ละเส้นไพร์เมอร์ **(อ้างอิงปฏิกิริยา PCR ตามข้อ 4)**

7. การตัดชิ้นส่วนยีนเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แบบ Double digestion

นำผลผลิต PCR ของ partial *secA*-adapter gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และพลาสมิด pBAD/His A expression vector **(ภาพที่ 2)** มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoRI* (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. *Xhol* (10 U/µl) 4.0 ไมโครลิตร
4. *EcoRI* (10 U/µl) 4.0 ไมโครลิตร
5. Deionized water (dH_2O) 2.0 ไมโครลิตร

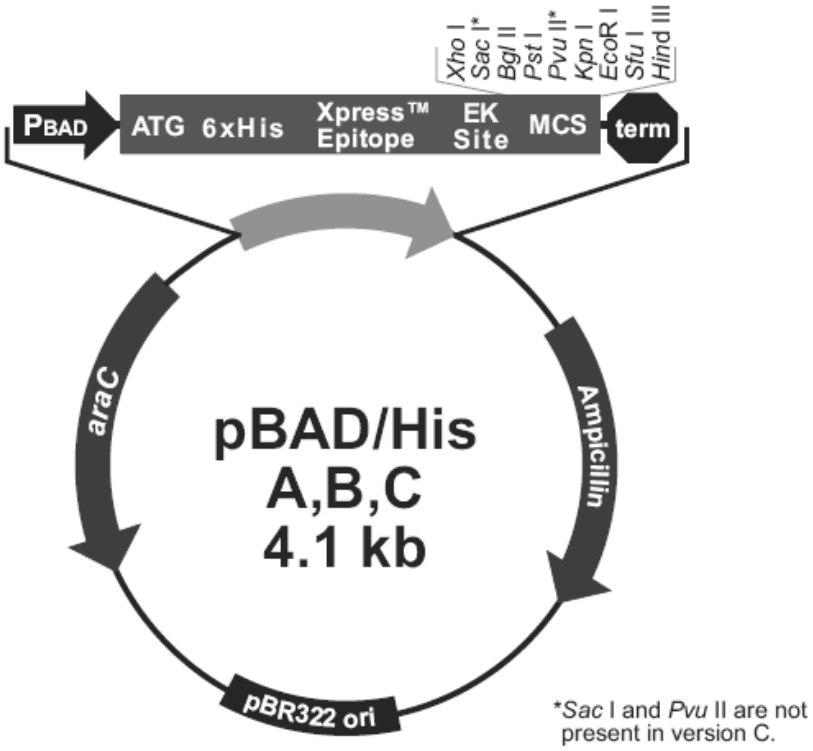
ปริมาตรรวม 30.0 ไมโครลิตร

8. การโคลนยีน digested partial *secA*-adapter gene กับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector และสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเทคนิค PCR

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา Double digestion **ตามข้อ 7** มาเชื่อมต่อชิ้น digested partial *secA*-adapter gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวเข้ากับพลาสมิดพาหะ 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 ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียมาตรวจหาชิ้น *secA*-adapter gene/6xHisTag ด้วยเทคนิค colony PCR หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ตรวจแล้วว่าได้รับพลาสมิดสายผสมดังกล่าวมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (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

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

9. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

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

10. ศึกษาการแสดงออกและช่วงเวลาที่เหมาะสมของโปรตีน partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย

นำโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่ามีพลาสมิดสายผสมชิ้นของยีน partial *secA*-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 จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ลงในสารแขวนลอยเซลล์ และเขย่าต่อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาแยกสกัดโปรตีนจากเซลล์และวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ด้วยเทคนิค 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) ด้วยเครื่อง XCell SureLock® Mini-Cell (Novex®) (Invitrogen,USA) และนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสารละลาย SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen,USA) เพื่อตรวจดูขนาดและปริมาณของ fusion protein โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, Invitrogen,USA)

11. การเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen,USA)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม secA-adapter gene/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector จำนวน 1 โคโลนี มาเลี้ยงอาหารในเหลว 2XYT ที่เติมแอมพิซิลลิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนโดยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ ทำการเก็บตะกอนเซลล์ในช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุด นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 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 เพื่อละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียและFreeze/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 NaH2PO4, 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 **(อ้างอิงตามข้อ 10)** 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 บนเครื่องเขย่าเบาๆเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีออกด้วย Destain solution I บนเครื่องเขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเจลด้วย Destain solution II บนเครื่องเขย่าเบาๆ นาน2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจนโดยเปรียบเทียบขนาดของ fusion protein กับแถบโปรตีนมาตรฐาน (NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, Invitrogen,USA)

12. ทำการบันทึกข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่แสดงอาการใบแคบสีขาว เรียวเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกร็น แตกหน่อเร็ว จากแปลงปลูกที่จังหวัดกาญจนบุรี **(ภาพที่ 3)** และนำมาปลูกในกระถางเก็บไว้ในเรือนทดลอง **(ภาพที่ 4)** เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อทดสอบต่อไป

ภาพที่ 3 แสดงอาการโรคอ้อยใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา จากแปลงปลูกอ้อย จ.กาญจนบุรี

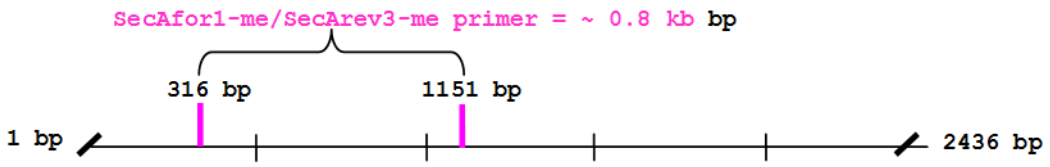
ภาพที่ 4 แสดงอาการโรคอ้อยใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาในกระถางปลูกภายในเรือนทดลอง

2.ผลการสกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) และนำมาตรวจความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร พบว่า ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 125.35 ng/ul ซึ่งมากเพียงพอต่อการทดสอบต่อด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อยู่ที่ประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Sambrook *et. al*., 1989)

3.ผลการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมาจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) **(ตารางที่ 1)** นำมาออกแบบไพร์เมอร์ได้จำนวน 1 คู่ คือ SecAfor1 / SecArev3 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในส่วน partial *secA* gene โดยตำแหน่งที่เลือกใช้เพื่อออกแบบไพร์เมอร์คู่นี้ได้แสดงไว้ใน**ภาพที่ 5**

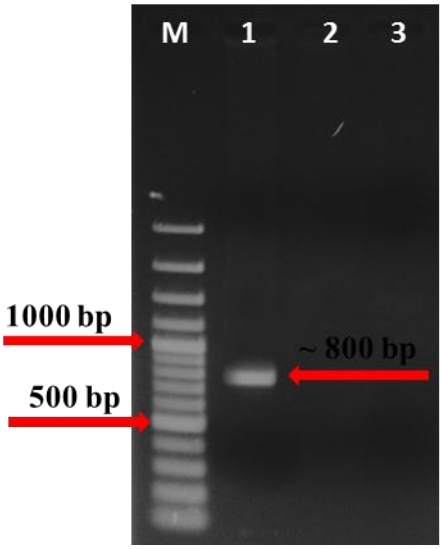


ภาพที่ 5 แสดงภาพจำลองตำแหน่งการออกแบบไพร์เมอร์ส่วน partial *secA* gene โดยอ้างอิงข้อมูลตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Palm lethal yellowing phytoplasma preprotein translocase subunit (secA), Accession No.EU267187

<u>หมายเหตุ</u> กำหนด Scale 2 cm เท่ากับ 0.5 kb

4. ผลการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค PCR

ผลการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3 ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับ partial *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวที่ประมาณ 800 bp **(ภาพที่ 6)**



ภาพที่ 6 แสดงแถบดีเอ็นเอส่วน partial *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุใบขาวอ้อยที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3

M = marker 100 bps DNA Ladder plus (fermentas)

ช่อง 1 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp จากคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1 / SecArev3

ช่อง 2 = ดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ (Negative control)

ช่อง 3 = น้ำ

5.ผลการโคลน partial *secA* gene เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.)

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ partial *secA* gene ที่ขนาดประมาณ 800 เบส เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ที่ประเทศมาเลเซีย ได้ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *secA* gene จำนวน 840 เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไฟโตพลาสมา มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) กับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาสกัดพลาสมิดสายผสม partial *secA* gene ด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และใช้เป็นต้นแบบดีเอ็นเอสำหรับการสังเคราะห์ partial *secA*-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR ในขั้นตอนถัดไป

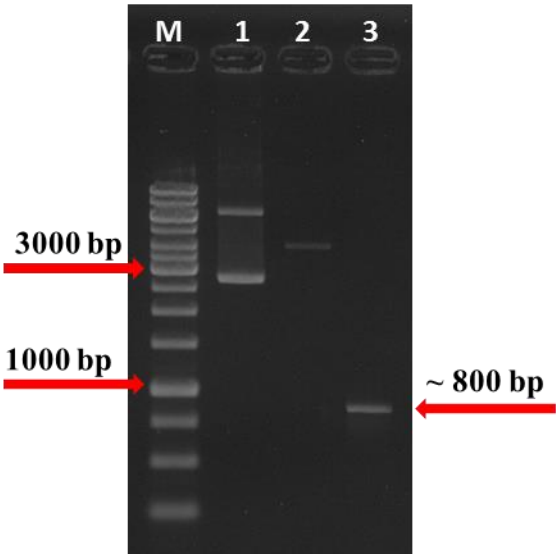
6. ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอลูกผสมของ partial *secA*-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสม partial *secA* gene เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ partial *secA*-adapter gene ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ SecA-XholF1 /SecA-EcoRIR1 พบว่า ผลผลิต PCR ของ partial *secA*-adapter gene ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้เทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับขนาดของ *secA* gene เนื่องจากลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* (C/TCGAG) และ *EcoRI* (G/AATTC) บริเวณปลาย 5’ ของคู่ไพร์เมอร์มีจำนวณเพียง 6 เบสเท่านั้น จึงไม่ส่งผลต่อขนาดแถบดีเอ็นหลังจากวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

7. ผลการตัดชิ้นส่วนยีนเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แบบ Double digestion

นำผลผลิต PCR ของ *secA*-adapter gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และพลาสมิดพาหะ pBAD/His A expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoRI* (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) แบบ Double digestion ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า พลาสมิด pBAD/His A expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์ตัดจำเพาะแบบสมบูรณ์จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่

ขนาดประมาณ 4.1 kb เนื่องจากดีเอ็นเอมีสภาพแบบเส้นตรง เมื่อเทียบกับพลาสมิด pBAD/His A expression vector ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์ตัดจำเพาะจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต่ำกว่าประมาณ 3.0 kb ทั้งที่พลาสมิดพาหะ pBAD/His A expression vector มีขนาดเท่ากัน 4,102 bp เนื่องมาจากดีเอ็นเอที่มีสภาพแบบวงกลมจะมีการเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเส้นตรง **(ภาพที่ 7)** (Sambrook et. al., 1989) จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของขนาดได้หลังจากหยุดปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซด์เรียบร้อยแล้ว



ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอของ partial *secA*-adapter gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และพลาสมิด pBAD/HisA expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoR* I (double digestion)

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentas)

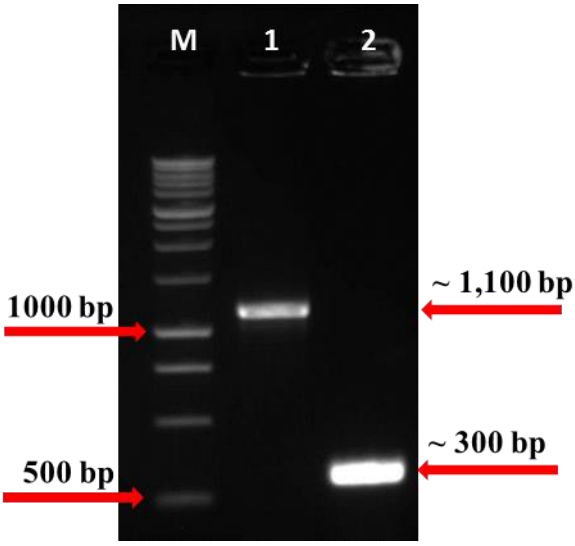
ช่อง 1 = พลาสมิด pBAD/HisA expression vector

ช่อง 2 = พลาสมิด pBAD/HisA expression vector ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI*

ช่อง 3 = ชิ้นดีเอ็นเอของ partial *secA*-adapter gene ตัดด้วยเอ็มไซด์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI*

8.การโคลนยีน digested *secA*-adapter gene กับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector และตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอลูกผสม partial *secA*- adapter gene/6xHisTag ด้วยเทคนิค PCR

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา Double digestion ของชิ้น digested partial *secA*-adapter gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/His A expression vector (Invitrogen, USA) ทำการเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียเพื่อตรวจหาพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น *secA*-adapter gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,100 เบส เมื่อเทียบกับโคโลนีแบคทีเรียปกติที่ไม่ได้รับพลาสมิดสายผสมดังกล่าวจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 เบส **(ภาพที่ 8)** ซึ่งเป็นขนาดของลำดับเบสบางส่วนของ pBAD/His A expression vector เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ที่ประเทศมาเลเซีย พบว่า เฉพาะชิ้นยีนของ partial *secA*-adapter gene/6xHisTag มีจำนวน 969 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบสทั้ง start codon (ATG) และ stop codon (TAA) เมื่อทำการตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการจัดเรียงกรดอะมิโนได้ถูกต้องจำนวน 322 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งอะมิโนของ <u>HHHHHH</u>-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)



ภาพที่ 8 แสดงผลการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอลูกผสม partial *secA*-6xHisTag ด้วยเทคนิค PCR

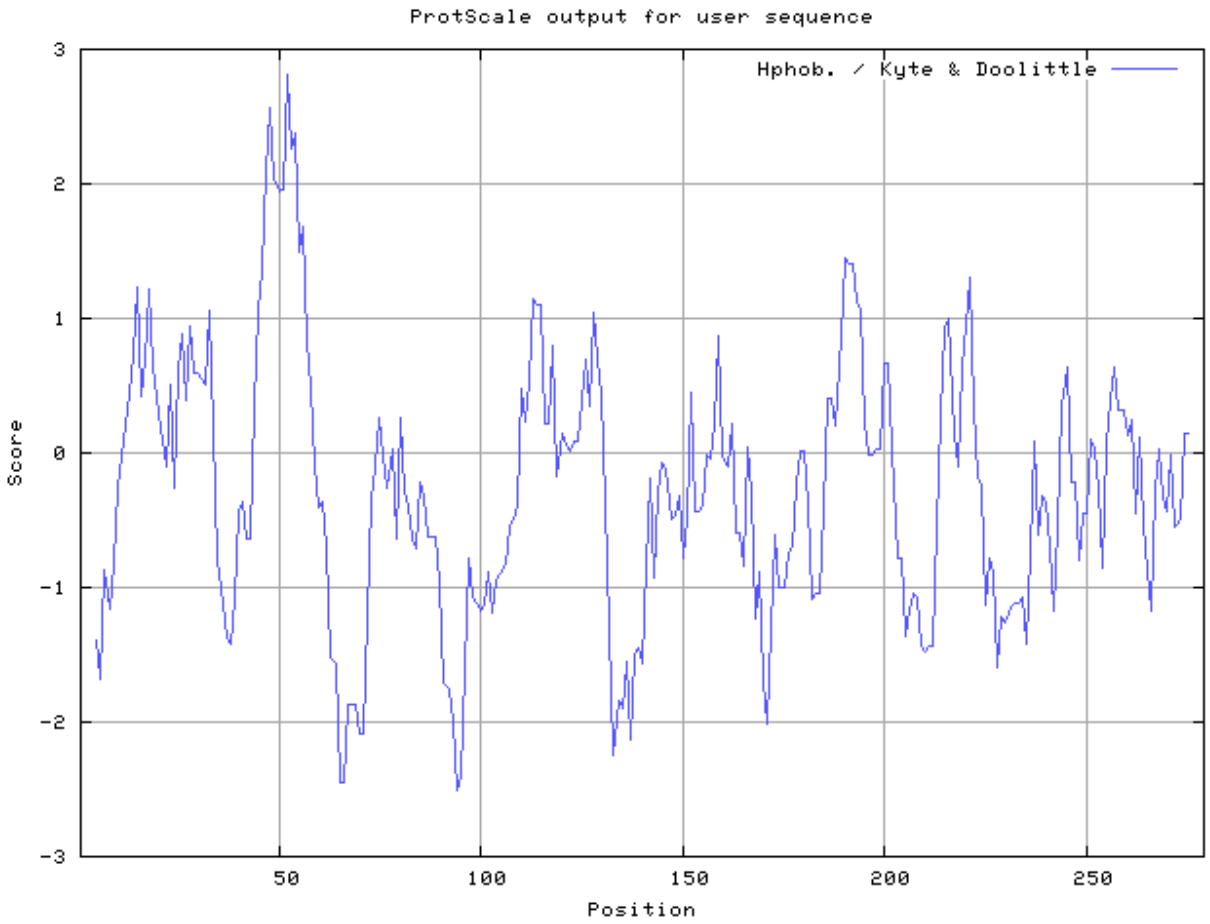
M = marker 1kb DNA Ladder (fermentas)

ช่อง 1 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 bp

ช่อง 2 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp

9. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/protscale.html) พบว่า amino acid position ของโปรตีนลูกผสม partial SecA-Protein จำนวน 279 เรซิดิวส์ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position เป็นพวกที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น –) มีปริมาณมากกว่าพวกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงมากกว่ากว่า 0 หรือค่าเป็น +) และเมื่อพิจารณาสาย polypeptide ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่าโปรตีนลูกผสม partial SecA-Protein ยังคงละลายน้ำได้ค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (http://www.expasy. ch/tools/protparam.html) แสดงค่า average of hydropathicity เป็นค่า -0.287 **(ภาพที่ 9)**



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ โปรตีนลูกผสม partial SecA- Protein เกี่ยวกับคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ProtScale และ ProtParam

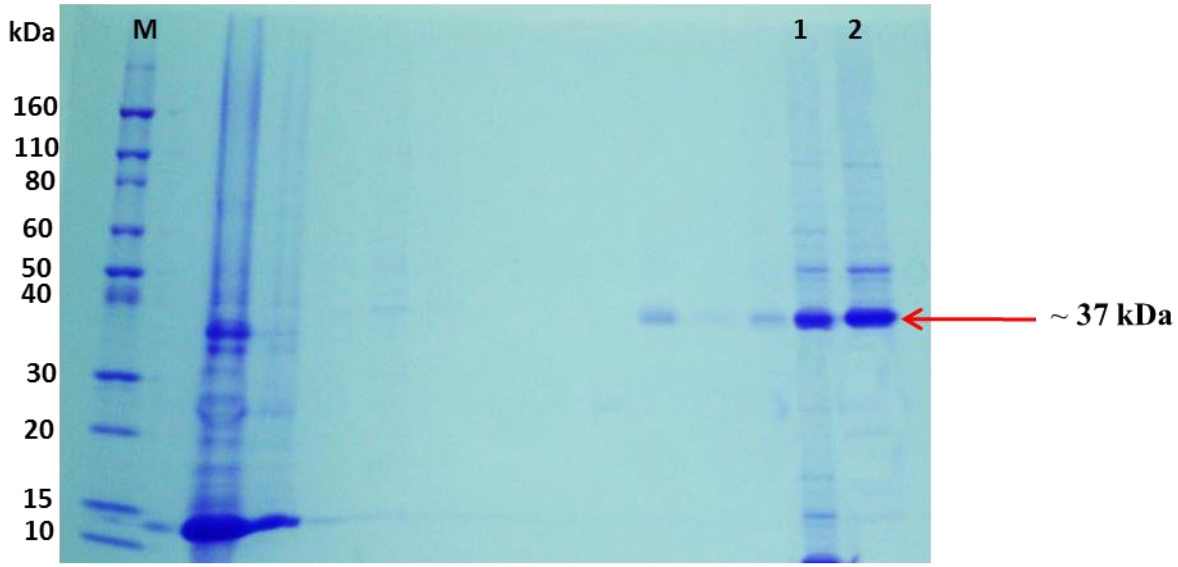
- ลำดับกรดอะมิโนมีขนาด 279 เรซิดิวส์
- น้ำหนักโมเลกุลของ partial SecA-Protein เท่ากับ 32.0448 kDa
- มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.13
- มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{1445}H_{2288}N_{370}O_{430}S_{10}$
- มีค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.287

10. ศึกษาการแสดงออกและช่วงเวลาที่เหมาะสมของโปรตีน partial SecA- Protein/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย

ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อแสดงออกโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย โดยนำ crude extracts จาก suspension culture ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จากช่วงเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์หาปริมาณ partial SecA- Protein/6xHisTag (fusion protein) ด้วยเทคนิค SDS PAGE พบว่าโปรตีนเริ่มแสดงออกหลังจากเหนี่ยวนำด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ในสารแขวนลอยเซลล์ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และสามารถสังเกตเห็นแถบแบนโปรตีนชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุดคือ 10 ชั่วโมง ซึ่ง fusion protein แสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับการแสดงออกของโปรตีน pBAD/HisZ ใช้เป็น Positive control ของปฏิกิริยาแสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 120 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PR7OTEIN STANDARD, (Invitrogen,USA)

11. ผลการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสมของ partial *secA*-adapter gene/pBAD/HisA expression vector เพื่อชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม partial SecA-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 37 กิโลดาลตัน เนื่องจากขนาดโปรตีนจริงของ partial SecA-Protein มีขนาดที่ประมาณ 32 กิโลดาลตันเท่านั้น แต่เมื่อรวมกับขนาดโปรตีนของ pBAD/HisA-6xHisTag ที่ประมาณ 5 กิโลดาลตัน จึงแสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PR7OTEIN STANDARD, (Invitrogen,USA) เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 8000 Spectrophotometer) ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 0.544 **(ภาพที่ 10)** ซึ่งโปรตีนที่ผลิตได้สามารถใช้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อในอนาคตนำไปใช้ผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยอย่างง่ายได้



ภาพที่ 10 แสดงแถบโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกสกัดด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) โดยวิธี affinity column chromatography และตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องที่ M	=	แถบโปรตีนมาตรฐาน (Invitrogen,USA)
ช่องที่ 1-2	=	แถบโปรตีน partial SecA- Protein/6xHisTag (fusion protein) ที่สกัดแยกให้บริสุทธิ์น้ำหนักประมาณ 37 กิโลดาลตัน (partial SecA- Protein ~ 32 kDa รวมกับ pBAD/HisA-6xHisTag ~ 5 kDa เท่ากับ ~ 37 kDa)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบขาวได้จากแปลงปลูกอ้อย จ.กาญจนบุรี สำหรับตัวอย่างอ้อยปกตินำมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุจากแปลงปลูกที่พบแมลงพาหะระบาดอยู่ทั่วไป เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit และวัดค่าความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 125.35 ng/ul ซึ่งมากเพียงพอต่อการทดสอบต่อด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3 ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในส่วน partial *secA* gene แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส ซึ่งเป็นขนาดที่เท่าหรือใกล้เคียงกับตำแหน่งการออกแบบ

ไพร์เมอร์ไว้ เมื่อโคลน partial *secA* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเข้าพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศมาเลเซีย ได้ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial *secA* gene จำนวน 840 เบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่า ตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์เป็นเชื้อไฟโตพลาสมา มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) กับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ สรุป ไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะต่อยีนในส่วน partial *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย แล้วสกัดพลาสมิดสายผสม *secA* gene ด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ *secA*-adapter gene ด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ SecA-XholF1 /SecA- EcoRIR1 พบว่า ผลผลิต PCR ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส ซึ่งขนาดเทียบเท่ากับ *secA* gene เนื่องจากบริเวณที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* (C/TCGAG) และ *EcoRI* (G/AATTC) ตรงบริเวณตำแหน่ง 5’ ของคู่ไพร์เมอร์มีจำนวนเพียง 6 เบสเท่านั้น จึงไม่ส่งผลต่อขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ เมื่อนำผลผลิต PCR ของ partial *secA*-adapter gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และพลาสมิด pBAD/His A expression มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xhol* และ *EcoRI* (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) แบบ Double digestion พบว่า พลาสมิด pBAD/His A expression ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์แบบสมบูรณ์จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 4.1 kb เพราะสภาพเป็นแบบเส้นตรง เมื่อเทียบกับพลาสมิด pBAD/His A expression vector ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซด์ยังคงสภาพแบบวงกลม จึงแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต่ำกว่าประมาณ 4.1 kb เมื่อโคลนยีน digested partial *secA*-adapter gene เข้ากับพลาสมิดพาหะ digested pBAD/HisA expression vector และตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอลูกผสม *secA*-adapter gene/6xHisTag ด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น partial *secA*-adapter gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,100 เบส เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่าชิ้นยีนส่วน partial *secA*-adapter gene/6xHisTag มีจำนวน 969 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบส start codon และ stop codon เมื่อตรวจความถูกต้องของตำแหน่ง frame shift การแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้อย่างถูกต้องจำนวน 322 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (http://www.expasy.ch/tools/protscale. html) พบว่า amino acid position ของโปรตีนลูกผสม partial SecA-Protein จำนวน 279 เรซิดิวส์ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position พวกเป็นพวกที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น –) มีปริมาณมากกว่าพวกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงมากกว่ากว่า 0 หรือค่าเป็น +) และเมื่อพิจารณาสาย polypeptide ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่าโปรตีนลูกผสม partial SecA-Protein ยังคงละลายน้ำได้ค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam

(http://www.expasy. ch/tools/protparam.html) แสดงค่า average of hydropathicity เป็นค่าติด – เท่ากับ -0.287 จากการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อแสดงออกโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า โปรตีนเริ่มแสดงออกหลังจากเหนี่ยวนำด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ในสารแขวนลอยเซลล์ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และสามารถสังเกตเห็นแถบแบนโปรตีนชัดเจนเมื่อเวลาผ่าน 6 ชั่วโมง และช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุดคือ 10 ชั่วโมง และทดสอบการสกัดโปรตีนทั้งวิธีแบบ Native condition และ denature condition เมื่อนำมาตรวจสอบขนาดโปรตีนลูกผสมด้วยเทคนิด SDS-PAGE แล้ว พบว่า วิธีการสกัดโปรตีนแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนออกมาได้มากกว่าแบบ Native condition เมื่อเตรียมโปรตีน fusion protein ให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ได้แถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, (Invitrogen,USA) เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 8000 Spectrophotometer) ของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 0.544 สรุปสามารถผลิต partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ที่บริสุทธ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้จากการอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสามารถใช้แก้ปัญหาเรื่องการปะปนของโปรตีนพืชได้ อนาคตสามารถใช้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อผลิตเป็นแอนติบอดีในสัตว์ทดลองและสามารถพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยอย่างง่ายได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

<u>ประโยชน์ คือ</u>

- ได้ partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ที่บริสุทธ์ ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จากการอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย อนาคตสามารถใช้โปรตีนบริสุทธ์ดังกล่าวมาเป็นแอนติเจนเพื่อผลิตเป็นแอนติบอดีในสัตว์ทดลองและสามารถนำไปพัฒนาต่อได้เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปอย่างง่าย สะดวก และรวดเร็ว ต่อการตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาว ด้วยเทคนิคอิมโมโนวิทยาต่อไป

<u>กลุ่มเป้าหมาย คือ</u>

- ในอนาคตคาดหวังนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยแบบ Lateral-Flow Assay ที่สามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ใช้งานง่าย และประหยัดเวลา และไม่จำกัดกลุ่มผู้ใช้งาน จึงเป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูก บริษัทผู้ผลิต และนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

11.เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2544. มอลลิคิวท์สาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุภาพร กลิ่นคง พิสสวรรณ เจียมสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทัศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย,น.418 - 425.ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์ เกษตรอุตสาหกรรมเกษตร วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ.

Eran, O., Dana, B., Stephanie G., Jonathan B. and Tom R., 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. The Jounal of Biological Chemistry. 280(10) : 9097-9105.

Hiroyuki, M. and Koreaki, I., 2001. The Sec protein-traslocation pathway. TRENDS in Microbiology. 9(10) : 494-500.

Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and Namba, S., 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 14(9) : 1043-1050.

Lee, I M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gunderson. D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16 SrDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms Phytopathology 83 : 834-842.

Matt, D. and Jennifer Hodgetts (eds.), 2013. Phytoplasma Methods and Protocols. Humana Press ,New York. 421 p.

Marzachì, C., 2006. Molecular Diagnosis of Phytoplasmas. Arab J. Pl. Prot. 24 : 139-142.

Or E., Boyd, D., Gon, S., Beckwith, J., and Rapoport, T., 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. The Journal of Biological Chemistry. 280(10) : 9097-9105.

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.

Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and GoschI, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. J. Plant Pathol. 80 : 224-225.

Shikata, E., Teng, W.S., and Matsumoto, T., 1969. Mycoplasma or PLT-like micro-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group, J.Fac.Agri.,Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90.